

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18685020

研究課題名（和文）機能性 RNA 創製の革新的新手法の確立と展開：

分子デザインと進化学の融合

研究課題名（英文）Development of novel methods for efficient construction of functional RNAs

研究代表者

井川 善也（IKAWA YOSHIYA）

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：70281087

研究成果の概要：

「人工酵素などの機能性生体高分子のテーラーメイドな創製」は、RNA に限らず、広く生体高分子研究において、基礎化学/生物学的に、また医療やバイオ工学などへの応用面からも重要な課題である。本研究では、研究代表者の考案した新手法「design & selection 法」を基盤とする人工リボザイムの創製、機能改変、機能解析に取り組み、本手法の確立を行い、その有効性を示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2007 年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2008 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	18,700,000	5,610,000	24,310,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：生体関連化学

キーワード：生体関連高分子化学、進化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 「人工酵素に代表される機能性生体高分子のテーラーメイドな創製」は、RNA に限らず、広く生体高分子研究において、基礎化学/生物学的に、また医療やバイオ工学などへの応用面からも重要な課題である。研究開始当初、その創製法としては、「立体構造の知見に基づいた合理的分子デザイン」と「ランダムライブラリーからの進化学法」の両極端のアプローチが試みられていた。

両手法については、長所とともに固有の短所も抱えていた。

(2) リボザイムやアプタマーなどの機能性 RNA はバイオテクノロジーのツールとして非常に有望であり、効率的かつエンジニアリングが容易な人工創製法の開発が望まれていた。

(3) 上述の背景のもと、研究代表者は「合理的分子デザイン」と「ランダムライブラリーからの進化学法」を複合化した新手法（design & selection 法）を考案した。

2. 研究の目的

本研究では「design & selection 法」の有用性を実証し、その展開を図ることを目的とし、3年間で下記の3課題に取り組んだ。

(1) design & selection 法で最初に得られた RNA 酵素 (DSL) の機能解析とバイオテクノロジーツールへの人工改変。

(2) DSL 創製に用いた分子骨格(scaffold)を利用した人工リボザイムの更なる創製。

(3) 他の分子骨格(scaffold)を利用した人工リボザイムの創製。

3. 研究の方法

(1) design & selection 法で最初に得られた RNA 酵素 (DSL) の機能解析とバイオテクノロジーツールへの人工改変。

DSL リボザイムは2つの RNA 断片を template 依存的に連結する活性を示す ligase リボザイムであり、その活性の高さとモジュール集積型の構造から注目を集めている。

DSL のモジュールは、酵素モジュール、基質モジュール、酵素モジュールと基質モジュールを連結するリンカーモジュールより構成されている。本研究では、そのモジュール性について理解を深めるために、リンカーモジュールに着目して機能解析を行った。

具体的な研究方法としてはリンカーモジュールを構成する機能モチーフのスワップ変異体、並びにリンカー部分の塩基対を系統的に置換し、その影響をリボザイムの酵素活性および RNA の構造形成能力を指標として解析する。

(2) DSL 創製に用いた分子骨格(scaffold)を利用した人工リボザイムの更なる創製。

DSL リボザイムは触媒反応に Mg²⁺イオンを補因子として要求する金属酵素であることが明らかとなっている。RNA を切断する蛋白質酵素の場合、DSL リボザイムと同様の金属イオンを用いる酵素反応機構に加え、アミノ酸側鎖の官能基を利用した一般酸塩基触媒の機構により RNA を切断する酵素も存在する。このような同一の化学反応を異なる反応機構により行っている例は生体内で幾つも見つかっているため、同様の多様性を人工リボザイムにおいても実現できれば、非常に興味深い。

具体的な研究方法としては、DSL 創製と同様の design & selection 法により、分子設計した RNA 構造体 (type-BRNA) に対し、計 45 塩基のランダム塩基配列のライブラリーを基質モジュールと接触可能な領域に組み

込み、進化工学法により目的とする酵素ユニットを選別する。DSL リボザイムの創製では、選別時に Mg²⁺イオンを添加したが、今回は Mg²⁺イオンは加えず、代わりに一般酸塩基触媒として機能しうるヒスチジンを含む短鎖ペプチドを反応系に添加する。

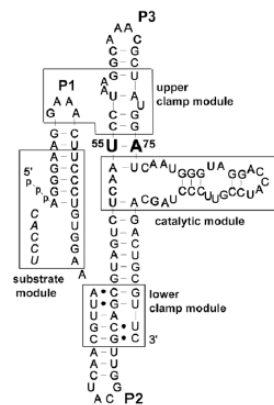
(3) 他の分子骨格(scaffold)を利用した人工リボザイムの創製。

DSL リボザイム創製に用いた RNA 構造体以外の RNA を用い、モジュールを集積化して新しい機能性 RNA を創製したり、既にある機能を改変、制御することを試みる。

本研究では、天然に既存の機能性 RNA 構造に対して進化工学的に創製した人工モジュールを付加し、既存の機能性 RNA 構造の性能に対する影響を生化学的解析により検討する。

4. 研究成果

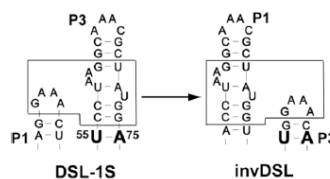
(1) design & selection 法で最初に得られた RNA 酵素 (DSL) の機能解析とバイオテクノロジーツールへの人工改変。



DSL リボザイムのリンカーモジュール中、上部リンカーモジュール (clamp module) についての機能解析を行った。上部リンカーモジュールと酵素モジュールを連結する

塩基対(55U-75A)について、塩基対を変化させてその効果を検討した所、A-U および G-C への塩基対置換は大きな性能低下を引き起こさなかった。しかし C-G へ置換した変異体の性能は大きく低下した。

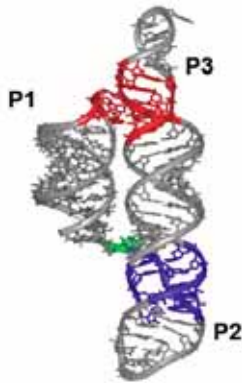
このモジュール同士を結合する 55-75 塩基の効果をさらに解析するため、モジュール工学により、上部リンカーモジュールを他の種類に変更した、invDSL リボザイムについても同様の解析を行った。その結果、invDSL リボザイムについても、モジュール間を連結する U-A 塩基対を C-G に置換した場合には活性が極端に低下することが明らかとなった。



これらの結果より、モジュール集積型 DSL リボザイムの性能最適

化には、機能モジュール自体の性能向上に加えて、モジュール間を連結する部分の最適化も有効である事が明らかとなった。この知見は、今後モジュール集積型機能性 RNA の機能向上について一般的な指針となり得る。

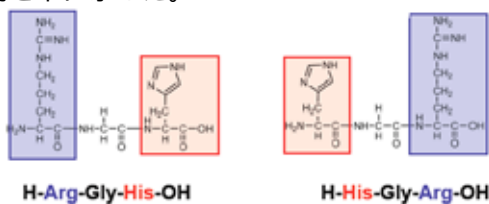
2) DSL 創製に用いた分子骨格(scaffold)を利用した人工リボザイムの更なる創製。



DSL リボザイムの創製に用いた RNA 構造体 (typeB-RNA、左図) に対し、計 45 塩基のランダム塩基配列のライブラリーを基質モジュール (P1) と接触可能な P2 と P3 の境界領域に組み込み、10 の 14 乗の

異なる分子種を含んだコンビナトリアル・ライブラリーを構築した。ライブラリーは化学合成法により DNA 分子として構築し、ついて試験管内転写により RNA へと変換した。

進化学法 (in vitro selection) を用いて触媒活性を示す配列を選別、濃縮する際、DSL 創製時に加えた Mg²⁺イオンを外し、触媒活性を補助できない [Co(NH₃)₆]³⁺イオンを RNA の 3D 構造形成の金属イオンとして添加した。さらに、RNA 断片同士の連結反応の加速に直接関与できる生体由来の一般酸塩基触媒としてヒスチジンを含むジペプチドとトリペプチド 4 種を化学合成し、反応系に添加した。これらのペプチドにはヒスチジンに加え、RNA との静電的な親和性を高める目的でアルギニンを導入した。トリペプチドの配列を下に示した。



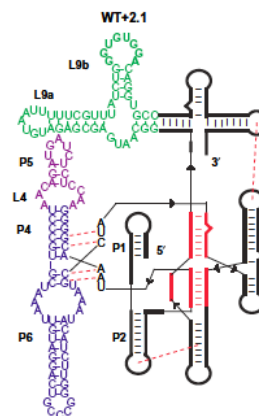
調整した RNA ライブラリーを上記の条件下で基質 RNA と反応させ、反応混合物中から基質との連結がおこった分子を逆転写-PCR 法により選択・増幅する。この一連の作業を、選別条件を段階的に厳しくしながら 6 ラウンド繰り返した。RT-PCR 産物の電気泳動の結果から、連結活性を持つ RNA 分子が濃縮されている事が示唆されたため、PCR 産物をクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、数種の配列について、基質 RNA が連結した配列が確認できた。

これらの DNA 配列から RNA を転写し、リボザイム活性を測定したが、現在のところ、有意な活性は見いだされていない。進化学法を行う上でのテクニカルな問題で、反応加速能力がないにも関わらず特定の配列が濃縮されてしまうのか、あるいは一定の反応加速能力を有する配列が選別/濃縮されているが、その効果が研究者の用いている機器の感度限界以下で確認できないのか、現在のところ明らかでない。進化学法の一つの欠点として、ライブラリー構築の際に原理的な可能な配列の数が実際の実験操作で取り扱い可能なモル数より多くなることが上げられる。従って、一回の in vitro selection で目的とする機能を示す配列が得られない場合、RNA にその能力が原理的にないためなのか、その実験で用いた RNA ライブラリーにたまたま目的配列が含まれていなかったのかの判別がむづかしい。しかしながら、いずれの結果にせよ、今回の進化学実験では DSL リボザイムに匹敵する反応加速能力を示す触媒モジュールは得られなかった。

(3)他の分子骨格(scaffold)を利用した人工リボザイムの創製。

モジュール構造を有することが知られており、その 3D 構造も解明されている T4td グループ I イントロンを機能が既に組み込まれている分子骨格(scaffold)として用い、その機能性構造体に対して更にアクチベーター機能を持つ人工構造モジュールを付加し、機能の向上を試みた。

人工構造モジュールは研究代表者により、T4td グループ I イントロンの天然のアクチベーターモジュールを削除した変異体を用い、進化学的に創製されたモジュールを利用した。このモジュールを野生型の T4td グループ I イントロンに組み込む事により、得られるリボザイムは、天然型、及び人工型の 2 つのアクチベーターモジュールを同時に有することになる。天然型モジュールがリボザイムの反応速度を向上させるのに対し、人工モジュールはリボザイムの基質に対する親和性を向上させる事が個別の解析から明らかになっていた。



従って、2 つのモジュールを同時に組み込んだハイブリッド体 (WT+2.1) は両者の活性化能の利点を併せ持ち、反応速度と基質親和性のいずれもが向上する事

が期待された。

しかし、ハイブリッド体(WT+2.1)の生化学的解析の結果は、予想に反したものであった。

天然型のアクチベーターモジュールのみを有する野生型リボザイムと2つのアクチベーターモジュールを有するハイブリッド・リボザイムの速度論パラメータを比較から、ハイブリッド化により、向上が予想された基質親和能は野生型よりも低下している一方で、野生型と変わらないと予想された反応速度が野生型より向上した事が判明した。

変異を導入した基質、および変異を導入したリボザイムを用いた系統的な変異体の性能比較、ならびに T4td グループ I イントロンに近縁な Twort グループ I イントロンの立体構造に基いた構造の検討から、この予期せぬ結果は以下の理由に起因すると考察した。

- 1) 本研究に用いた T4td グループ I イントロンが触媒する RNA 連結反応の反応速度の律速段階は、化学反応の段階ではなく、基質がリボザイムに会合した後、基質-酵素複合体が反応活性な構造に変化する、構造変化の段階であることが示唆された。ハイブリッドリボザイムでは、2つのアクチベーターモジュールが共存する事で、この過程に各モジュールが単独で存在する場合とは異なる効果が現れたと考えられる。
- 2) Twort グループ I イントロンの立体構造に基づいて、天然と人工のアクチベーターモジュールの立体的な位置関係を考察した所、2つのモジュールが立体的にぶつかりあう可能性が示唆された。生化学的解析からハイブリッド・リボザイムの性能は予想と異なり、二つのモジュールの加算にはなっていないものの、二つのモジュールの特性は、それぞれ部分的に保持されている事も明らかになった。したがって、2つのモジュールの立体的なぶつかり合いが、基質-酵素複合体が反応活性な構造に変化する、構造変化の過程に影響を与え、リボザイムの酵素活性が予期せぬ結果を示したと考えられる。

以上の結果は、個別の実験(あるいは自然界での進化)により獲得されたモジュールを集積化する際、モジュール間の相互作用により各モジュールの機能の加算とならず予期せぬ効果をもたらす場合があることを示している。この結果は、RNA や蛋白質のモジュール工学において、重要な知見であるのみならず、自然界での RNA の分子進化においても、モジュールの付加などによって、加算的でない機能の変化が起こって来た可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

Ikawa, Y., Ogawa, H., Harada, H., & Furuta, H. N-confused porphyrin possessing glucamine-appendants: aggregation and acid/base properties in aqueous media. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 6394-6397 (2008)

Ikawa, Y., Moriyama, S., Harada, H., & Furuta, H. Acid-base properties and DNA-binding of water soluble N-confused porphyrins with cationic side-arms. *Org. Biomol. Chem.*, 6, 4157-4166 (2008)

Ishikawa, J., Furuta, H., & **Ikawa, Y.** Mutation analysis of the base-pair connecting two functional modules in the DSL ribozyme. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 52, 523-524 (2008)

Ikawa, Y., Moriyama, S., & Furuta, H. Facile syntheses of BODIPY derivatives for fluorescent labeling of the 5' and 3' ends of RNAs. *Anal. Biochem.*, 378, 166-170 (2008)

Ohuchi, S.P., **Ikawa, Y.**, & Nakamura, Y. Selection of a novel class of RNA-RNA interaction motifs based on the ligase ribozyme with defined modular architecture. *Nucleic Acids Res*, 36, 3600-3607 (2008)

Kashiwagi, N., Furuta, H., & **Ikawa, Y.** Design and analysis of a structural RNA that acts as a template for peptide ligation. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 51, 387-388 (2007)

Moriyama, S., **Ikawa, Y.**, & Furuta, H. Synthesis of a water soluble N-confused porphyrin and its interaction with nucleic acids. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 51, 207-208 (2007)

Ikawa, Y. 人工RNA触媒創製の新手法: *de novo* デザインと進化分子工学の融合. *蛋白質核酸酵素*, 51, 950-957 (2006)

Fujita, Y., Furuta, H., & **Ikawa, Y.** Construction of an artificial ribozyme which ligates an RNA fragment activated by nicotinamide mononucleotide. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50, 349-350 (2006)

[学会発表](計 18 件)

High Turnover Ability of a *Trans*-Acting RNA Ligase Ribozyme Developed through Modular Engineering

Junya Ishikawa, Hiroyuki Furuta, Yoshiya Ikawa
Thirteenth Annual Meeting of the RNA Society
(2008.7.28-8.3 Berlin)

Tailoring RNA Modular Units on a Common Scaffold: A Modular Ribozyme Having a Catalytic Unit for b-NMN Activated RNA Ligation

Yuki Fujita, Hiroyuki Furuta, Yoshiya Ikawa
Thirteenth Annual Meeting of the RNA Society
(2008.7.28-8.3 Berlin)

RNA Science & Technology through Design & Evolution

Yoshiya Ikawa
Prof. Jean-Marie Lehn Symposium III (Nishijin Plaza, Fukuoka, Japan) (2008.10.17)

RNAとペプチドのcross-catalysisモデル構築へ向けた試み

Norimasa Kashiwagi, Hiroyuki Furuta,
Yoshiya Ikawa
第10回生命化学研究会シンポジウム・熊本
(2008.1.11)

デザイン型RNA上でRNP複合体形成を介する効率的ペプチド連結反応

Norimasa Kashiwagi, Hiroyuki Furuta,
Yoshiya Ikawa
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学学会大会・合同大会(2007.12.11-15 横浜)

モジュール工学によるDSLリボザイムの構造・活性相関の解析

Junya Ishikawa, Shohei Kuramitsu, Hiroyuki Furuta, Tan Inoue, Yoshiya Ikawa
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学学会大会・合同大会(2007.12.11-15 横浜)

小型化と高性能化に向けたユニット集積型人工リガーゼ・リボザイムの構造解析

Yuki Fujita, Hiroyuki Furuta, Yoshiya Ikawa
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学学会大会・合同大会(2007.12.11-15 横浜)

Design and analysis of a structural RNA that acts as a template for peptide ligation

Norimasa Kashiwagi, Hiroyuki Furuta, Yoshiya Ikawa

5th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (2007.11.20-22 Tokyo)

ユニット集積型人工リガーゼ・リボザイムの構造・機能相関解析

Yuki Fujita, Hiroyuki Furuta, Yoshiya Ikawa
第22回生体機能関連化学シンポジウム
(2007.9.28-29 東北大学)

テトラループ・レセプター・ユニットを標的としたDSLリボザイムのモジュール工学

Junya Ishikawa, Shohei Kuramitsu, Hiroyuki Furuta, Tan Inoue, Yoshiya Ikawa
第9回 日本RNA学会年会(2007.7.28-31 名古屋国際会議場)

ユニット集積型人工リガーゼ・リボザイムの構造・機能相関解析

Yuki Fujita, Hiroyuki Furuta, Yoshiya Ikawa
第9回 日本RNA学会年会(2007.7.28-31 名古屋国際会議場)

RNP形成によりペプチド連鎖反応を促進するデザイン型 RNA構造体の作成と解析

Norimasa Kashiwagi, Hiroyuki Furuta,
Yoshiya Ikawa
第9回 日本RNA学会年会(2007.7.28-31 名古屋国際会議場)

Modular Design & Evolution of RNA/RNP Catalysts

Yoshiya Ikawa, Norimasa Kashiwagi, Yuki Fujita, Hiroyuki Furuta
Synthetic Biology 3.0 (2007.6.24-26 Zurich, Switzerland)

Toward Construction of Mg²⁺-Free Catalytic Modules for RNA Ligase Ribozymes

Kuniyasu Kumon, Hiroyuki Furuta, Yoshiya Ikawa
12th Annual Meeting of the RNA Society
(2007.5.29-6.3 Madison, Wisconsin)

Effective Peptide Ligation on 3D-RNA through Formation of a Ribonucleo-Peptide Complex

Norimasa Kashiwagi, Hiroyuki Furuta, Yoshiya Ikawa
12th Annual Meeting of the RNA Society
(2007.5.29-6.3 Madison, Wisconsin)

A Novel RNA Catalyzing RNA-RNA Ligation Activated by -NMN

Yuki Fujita, Hiroyuki Furuta, Yoshiya Ikawa
12th Annual Meeting of the RNA Society
(2007.5.29-6.3 Madison, Wisconsin)

A novel RNA enzyme catalyzing

RNA-RNA ligation activated by b-NMN
Y. Fujita, Y. Ikawa, H. Furuta
RNA 2006 Izu Dec.3-7, 2006

Effective peptide ligation on a 3D-RNA
through formation of a ribonucleo-peptide
complex

N. Kashiwagi, Y. Ikawa, H. Furuta
RNA 2006 Izu Dec.3-7, 2006

〔図書〕(計1件)

Inoue, T., & Ikawa, Y.
Protein switched ribozymes. in Nucleic Acid
Switches and Sensors. (ed. Silverman, SK., Landes
Bioscience), p37-47 (2006)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.cstf.kyushu-u.ac.jp/~furutalab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井川 善也 (IKAWA YOSHIYA)
九州大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：70281087

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし