

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16200

研究課題名（和文）tRNAのアミノアシル化を触媒するペプチド・リボザイム複合体の分子進化

研究課題名（英文）In vitro evolution of a peptide-ribozyme complex catalyzing aminoacylation

研究代表者

寺坂 尚紘（Terasaka, Naohiro）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・特任助教

研究者番号：40830071

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：生命誕生以前に存在していたと提唱されているRNAワールドから、現存のタンパク質を基盤とした生命システムへ移行する際には、RNAとアミノ酸を共有結合でつなげる反応（アミノアシル化）が重要であると考えられている。本研究ではアミノアシル化を触媒するリボザイム、そしてリボザイム・ペプチド複合体を実験室内進化によって人工的に作り出すことに成功し、生命起源の仮説の一つが確からしいことを実験的に証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、生命誕生以前に存在したと提唱されているアミノアシル化リボザイムを人工的に作り出した。このようなリボザイムは現存の生物から失われているため、人工的に作り出すことによって、仮説として提唱されている生命誕生プロセスが本当にあった可能性が高いことを示唆しており、生命起源という根源的な問いの一部を本研究によって解き明かした。また、このようなアミノアシル化リボザイムはペプチド創薬やバイオマテリアル開発などへの応用されることも期待される。

研究成果の概要（英文）：Conjugation of amino acids to RNA, which is called aminoacylation is supposed to be essential for transition from RNA world, which is hypothesized that existed before the emergence of life, to modern protein-based life system. In this research, aminoacylation ribozyme and ribozyme-peptide complex were created by laboratory evolution to experimentally support the RNA world hypothesis.

研究分野：合成生物学

キーワード：分子進化 リボザイム ペプチド RNAワールド アミノアシル化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 現存生物の細胞内では DNA が遺伝情報を保存・複製し、RNA が情報を伝達し、翻訳されたタンパク質が機能するというセントラルドグマが基本原理である。しかし触媒活性を持った RNA (リボザイム) や、リガンド分子との結合による構造変化で遺伝子発現を調節する RNA (リボスイッチ) のような機能性 RNA が存在することから、原始地球においては RNA が遺伝情報の保存と機能性分子としての役割の両方を担っていたという RNA ワールド仮説が提唱されている。さらに RNA ワールドのリボザイムがタンパク質酵素に置き換わり、現在の DNA/RNA/タンパク質ワールドに移り変わる間には、短いペプチドが RNA と協同して働いていた「RNA・ペプチドワールド」が存在していたと考えられる。現在ではリボソームや RNaseP のように、触媒活性中心は RNA ながらもタンパク質が結合することで構造が保たれ、活性を示すリボザイム・タンパク質複合体が存在する。このことから、RNA・ペプチドワールドにおいてもペプチド・リボザイム複合体 (ペプチドリボザイム) が存在し、これが現在のタンパク質酵素やリボザイム・タンパク質複合体に進化したと考えられる。

(2) RNA・ペプチドワールドにおいては、RNA からペプチドを合成する初期翻訳系が存在したと考えられる。現在のような高機能タンパク質酵素が存在しなかった初期翻訳系では、RNA にアミノ酸を共有結合させるアミノアシル化反応はリボザイムが担っていたと考えられ、この仮説を証明するためにこれまで多くのアミノアシル化リボザイムが人工的に作り出されてきた。申請者は研究開始当時、tRNA の配列とアミノ酸構造を認識してアミノアシル化を触媒する人工リボザイム (Tx2.1) を、天然の tRNA 認識リボスイッチを分子進化することで開発していた。Tx2.1 リボザイムの基質認識機構は現在のアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) のものと類似しており、このようなアミノアシル化リボザイムが RNA ワールドに存在し、その後現在のようなタンパク質のみで構成される aaRS に置き換わったと考えられる。しかし研究開始当時は、翻訳反応と Tx2.1 リボザイムを同一の反応系中で用いることはできず、タンパク質翻訳系における aaRS の機能を Tx2.1 で代替することはできていなかった。また、Tx2.1 は N 末端がビオチン化された活性化フェニルアラニン (Bio-Phe-CME) を選択的に認識するため、Tx2.1 によって合成されたアミノアシル tRNA は翻訳の開始反応にしか用いることができないという問題点があった。

### 2. 研究の目的

(1) Tx2.1 リボザイムの活性を向上させるペプチドを分子進化によって獲得し、アミノアシル化ペプチドリボザイムを開発することを目的とする。

(2) Tx2.1 とは異なり、N 末端がフリーなアミノ酸を基質として使用可能なアミノアシル化リボザイムを開発する。

(3) 上記で開発されたアミノアシル化ペプチドリボザイム・アミノアシル化リボザイムと無細胞翻訳系を組み合わせ、ペプチドリボザイムおよびリボザイムが現存の aaRS を代替してペプチドが翻訳されることを実証し、仮説として提唱される RNA・ペプチドワールドの存在を実験的に証明する。

### 3. 研究の方法

(1) ランダム配列を持つ mRNA と Tx2.1 を融合した RNA ライブラリーを構築し、再構成無細胞翻訳系と mRNA display 技術を用いて Tx2.1-ペプチドライブラリー複合体を調製する。基質アミノ酸である Bio-Phe-CME を加え、アミノアシル化反応が進行した RNA を選択的に回収し、アミノアシル化ペプチドリボザイムの分子進化を行う。

(2) *Bacillus subtilis* 由来 *glyQS* リボスイッチの、tRNA-3'末端認識部位をランダム化した RNA ライブラリーを調製する。N 末端がフリーなフェニルアラニン誘導体を加え、自己アミノアシル化反応を触媒する RNA を選択的に回収し、アミノアシル化リボザイムの分子進化を行う。

(3) 上記で開発されたリボザイム、tRNA、アミノ酸を、aaRS を除いた無細胞翻訳系に加え、aaRS が無い条件でペプチドの翻訳合成を行う。

### 4. 研究成果

(1) アミノアシル化ペプチドリボザイムの分子進化

10 - 15 個のランダムアミノ酸をコードした mRNA の下流に、Tx2.1、基質 tRNA を融合した RNA ライブラリーを PCR・試験管内転写反応によって調製した。mRNA の終止コドン直下に Puromycin 融合核酸プローブを結合させ、再構成無細胞翻訳系でペプチドを翻訳することで、ペプチドがピューロマイシンを介してディスプレイされる系を構築した。このペプチドリボザイム複合体をまずストレプトアビジンビーズと混合することで、ストレプトアビジンに結合するペプチドもしくは RNA 配列を除いた (Negative selection)。Bio-Phe-CME を加えてアミノアシル化反応を進行させ、Bio-Phe が共有結合した RNA 配列を回収した (Positive selection)。回収され

た RNA を逆転写・PCR・転写することで、再び RNA ライブラリーを構築した。この一連の操作(ラウンド)を繰り返すことで、アミノアシル化ペプチドリボザイムを分子進化させた。各ラウンドにおける、Negative selection, Positive selection での RNA の回収率を図 1 に示した。分子進化を 8 ラウンド繰り返すことで、Positive selection のみ回収率が上昇した。これは、mRNA にディスプレイされたペプチドが分子進化し、Tx2.1 のアミノアシル化反応を促進していることを示す結果である。ディープシーケンサーによって RNA の配列解析を行い、1 種類のペプチド配列が濃縮されていることを確認し、Tx-activating peptide (TAP) と名付けた。TAP を化学合成し、Tx2.1-tRNA と混合してアミノアシル化反応を行ったが、アミノアシル化反応効率の上昇は見られなかった。これは、分子進化では mRNA-TAP-Tx2.1-tRNA は連結した一つの分子であったが、RNA と TAP を別々に混合するという分子間反応条件では活性を持つ複合体の形成効率が低かったためと考えられる。今後は、TAP の更なる分子進化や、分子進化における反応条件を検討することで、分子間でもペプチドリボザイムを形成するペプチドを探索する予定である。

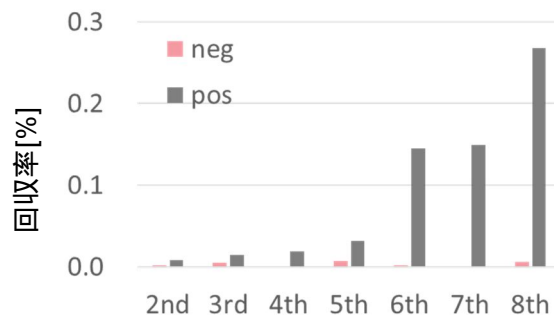


図 1 ペプチドリボザイムの分子進化

### (2) N 末端フリーアミノ酸を基質として用いる Tx リボザイムの開発

新たなアミノ酸基質として、4-azido-L-phenylalanin-cyanomethylester (N3-Phe-CME) を化学合成した。T-box リボスイッチの tRNA-3'末端認識部位をランダム化した RNA ライブラリーを PCR・試験管内転写反応によって調製した。RNA ライブラリーと N3-Phe-CME を混合し、アミノアシル化された RNA を azido-alkyne クリック反応によってビオチン修飾し、アミノアシル化触媒活性を持つ RNA を回収した。その結果、リボザイム中の末端ではない塩基を自己アミノアシル化するリボザイムと、基質 tRNA の 3'末端をアミノアシル化するリボザイムが得られた。

自己アミノアシル化リボザイムは翻訳系に適用できないため当初の目的のリボザイムとは異なるが、RNA 中のアミノ酸修飾は現存生物の RNA にも発見されている反応であり、このような反応を触媒するリボザイムはこれまで報告がない。3'末端アミノアシル化に限らず、RNA のアミノ酸修飾は RNA-ペプチドワールドにおいて重要な役割を果たしていると言われているので、自己アミノアシル化リボザイムの発見は、RNA-ペプチドワールドの存在を示唆する結果である。

一方で Tx2.1 と同様に、基質 tRNA の 3'末端を N3-Phe-CME でアミノアシル化するリボザイムを複数得ることに成功した(図 2)。このリボザイムは N 末端がフリーの基質のみを用いるので、Tx2.1 と基質直交性があり、翻訳系において aaRS を代替できる可能性がある。



図 2 N3-Phe-CME を用いる 3'-アミノアシル化リボザイム

### (3) 再構成無細胞翻訳系と Tx リボザイムによる、aaRS 非存在下におけるペプチド翻訳合成

アミノアシル化リボザイムを翻訳反応と同一系中で用いるため、Tx2.1 と Bio-Phe-CME をモデル分子として翻訳反応条件の検討を行った。翻訳因子・Tx2.1・アミノ酸基質の最適濃度を検討し、開始コドン天然の AUG コドンから人工の GGC コドン変更することで、Tx2.1 と無細胞翻訳系を同一系中で用いることに成功した(図 3)。Tx2.1 と Bio-Phe-CME は開始コドンにしか用いることができないため、本実験では翻訳伸長反応に Lys/Tyr/Asp などの aaRS を加えている。この結果は、RNA ワールドにおいて Tx2.1 のようなリボザイムが aaRS の代わりに働いていた可能性を示す結果である(引用)。

現在、新たに獲得した N3-Phe-CME を基質として用いるリボザイムと組み合わせることで、翻訳系中から完全に aaRS を除いた系で、ペプチドを翻訳することを検討している。

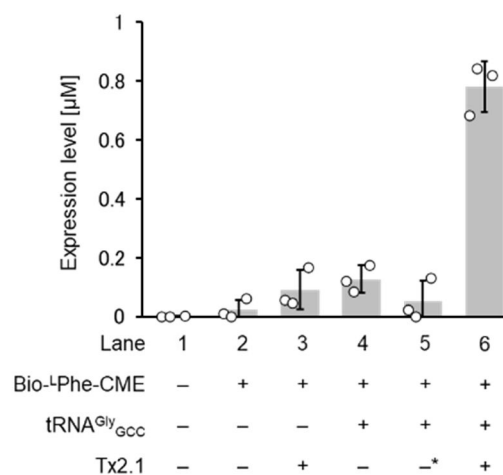


図 3 Tx2.1 と無細胞翻訳系によるペプチド翻訳

### <引用文献>

S. Ishida; N. Terasaka; T. Katoh; H. Suga, An aminoacylation ribozyme evolved from a natural tRNA-sensing T-box riboswitch. *Nat Chem Biol*, 16, 702 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishida Satoshi, Terasaka Naohiro, Katoh Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 16
2. 論文標題 An aminoacylation ribozyme evolved from a natural tRNA-sensing T-box riboswitch	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 702 ~ 709
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41589-020-0500-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Wei Lu, Naohiro Terasaka, Hiroaki Suga
2. 発表標題 Discovery of a cis-acting ribozyme conducting new type of reaction by in vitro selection
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺坂尚紘、石田啓、加藤敬行、菅 裕明
2. 発表標題 An aminoacylation ribozyme evolved from a natural tRNA sensing riboswitch
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺坂 尚紘、石田啓、加藤敬行、菅裕明
2. 発表標題 天然リボスイッチ配列から進化させ、翻訳系中で働くアミノ シル tRNA合成リボザイム
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田啓, 寺坂 尚紘, 加藤敬行, 菅裕明
2. 発表標題 T-box リボスイッチをベースにした tRNA 認識アミノアシル化リボザイムの創出
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Terasaka Naohiro, Ishida Satoshi, Katoh Takayuki, Suga Hiroaki
2. 発表標題 An aminoacylation ribozyme evolved from a natural tRNA sensing riboswitch
3. 学会等名 The 24th Annual Meeting of the RNA Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------