

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K20405

研究課題名（和文）脱アミノ反応によりアデノシンをイノシンへ塩基変換する新奇機能性RNAの創製

研究課題名（英文）Creation of a novel functional RNA that converts adenosine to inosine by deamination reaction

研究代表者

鈴木 力憲（SUZUKI, Yoshinori）

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳・神経科学研究分野・研究員

研究者番号：80836172

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）：本研究では、RNA配列中のアデニン（A）塩基をシトシン（I）塩基へ変換する機能を持った新奇RNA配列の作出を目指した。この目的のため本課題では、多数のランダムな塩基配列を持つRNAから、目的の機能を有した配列を釣り上げる方法である *in vitro* 選別法と呼ばれる方法を用いた。この方法論では、目的の産物を必ずしも得られるとは限らない。したがって2つ目の目標として、特定のタンパク質の特定部位を認識し結合するRNA配列の探索も行った。その結果、概日リズム生成に関わるタンパク質に特異的に結合すると考えられるRNAモチーフを複数得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の第一の目標であった塩基変換するRNAの作出は、どのようにしてRNAが機能を持つ分子として進化してきたのか？という生命起源の根本に関わるテーマであった。また、近年注目されている塩基編集技術の発展にも貢献することが期待された。また、第二の目標であるタンパク質検知RNAの作製は、タンパク質の特定機能部位のみを阻害することで、タンパク質の多層的な働きを理解に寄与し、また、新たな治療薬開発にもつながりうるものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to create a novel RNA sequence that converts adenine (A) to cytosine (I) in RNA sequences. For this purpose, we used *in vitro* selection (SELEX), which is fishing out sequences with the desired function from random RNA sequences. However, this methodology does not always yield the desired product. Therefore, as a second goal, we also searched for RNA sequences that recognize and bind to specific sites of specific proteins. As a result, we obtained several RNA motifs that are thought to bind specifically to proteins involved in circadian rhythm generation.

研究分野：神経科学、合成生物学

キーワード：RNA *in vitro*選別法 塩基編集 脱アミノ反応

1. 研究開始当初の背景

酵素活性を有する RNA (リボザイム) が発見されて以来、従来はタンパク質酵素が必須であると考えられた生化学反応の多くが、実は RNA によって触媒可能であることが明らかになった。この発見から、生命システムの起源を説明するモデルとして現在コンセンサスを得ているものが RNA ワールド仮説である。しかしながら、塩基配列の単純な自己複製の繰り返しだけで、RNA ワールドが多様で複雑な機能を持つ現生生命システムへ進化したとは考えにくい。現生生命システムへの移行には、変異の蓄積によりシステムの多様性を増大させる必要がある。RNA 配列を変化させる駆動力として、複製エラーなどによるランダム変異と、酵素反応による塩基変換が考えられる。塩基変換では、ランダム変異と違い、配列情報に依存した能動的な変化が可能である。そこで本研究では、RNA ワールドにおいては、RNA 自身が配列情報を変換 (RNA 編集) しながら自己進化したというシナリオに着目した。

現生生命システムでの一般的な塩基変換は、脱アミノ反応を介したものである。アデノシンにおける脱アミノ反応では、水酸化イオンと 6 位炭素の球核置換反応によってアミノ基がオキソ基へ変換され、イノシンへ塩基変換が起こる。興味深いことに、現生生命システムでは塩基変換は全てタンパク質酵素が担っており、このような酵素活性を持つリボザイムは発見されていない。したがって、塩基変換を触媒するリボザイムの不在は RNA ワールド仮説における重大なミッシングリンクの一つであると言える。このような背景から、本研究課題では「脱アミノ反応によって塩基変換を触媒するリボザイムは存在するだろうか?」という問いに注目した。

また、後述するように、本研究では *in vitro* 選別法と呼ばれる方法論を用いる。*in vitro* 選別法はランダム性に依存した方法であるため、目的の活性をもつ配列を得られない可能性も高い。そこで第二の目標として、同じ *in vitro* 選別法によって、特定タンパク質の特定部位を認識する RNA 配列の作製も試みる。生命科学の基本的な方法論は、ある表現型に關与するタンパク質を同定しその機能を阻害することで、その関りを明らかにしていく。タンパク質の機能を阻害させる方法としては、遺伝子編集技術などを用いてノックアウト変異体を作成するなどが一般的である。しかしながらこの方法ではほとんどの場合、タンパク質の全ての機能が欠損してしまう。近年は、1つのタンパク質が複数の機能を持つことがわかってきており、それらはタンパク質配列内の様々なドメインによって分業されていると考えられている。したがって、ドメイン機能ごとにタンパク質の機能を阻害できる方法が確立されれば、生命機能の理解に寄与するだけでなく、新しい創薬法の展開にも繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、脱アミノ活性を有する新奇リボザイムの創出である。具体的には、脱アミノ反応により、アデノシンをイノシンへ塩基変換するリボザイムの作出を目指す。また第二の目的として、*in vitro* 選別法により特定タンパク質の特定モチーフに結合する RNA 配列を創出することを目指した。

3. 研究の方法

脱アミノ活性を持つリボザイムを作出するため、まず(1) *in vitro* 選別法を用いて脱アミノ活性を示す RNA 配列を探索する。その後、(2) 得られた RNA 配列から、脱アミノ活性に必要な最小の RNA モチーフを同定しリボザイムとして作出する。また同様に、タンパク質の特定部位に結合する RNA 配列を探索するため、(3) *in vitro* 選別法を用いてタンパク質 (Period) の特定ドメインに結合する RNA 配列を探索し、得られた RNA 配列から共通の RNA モチーフを同定する。

(1) *in vitro* 選別法による、脱アミノ活性を示す RNA 配列の探索

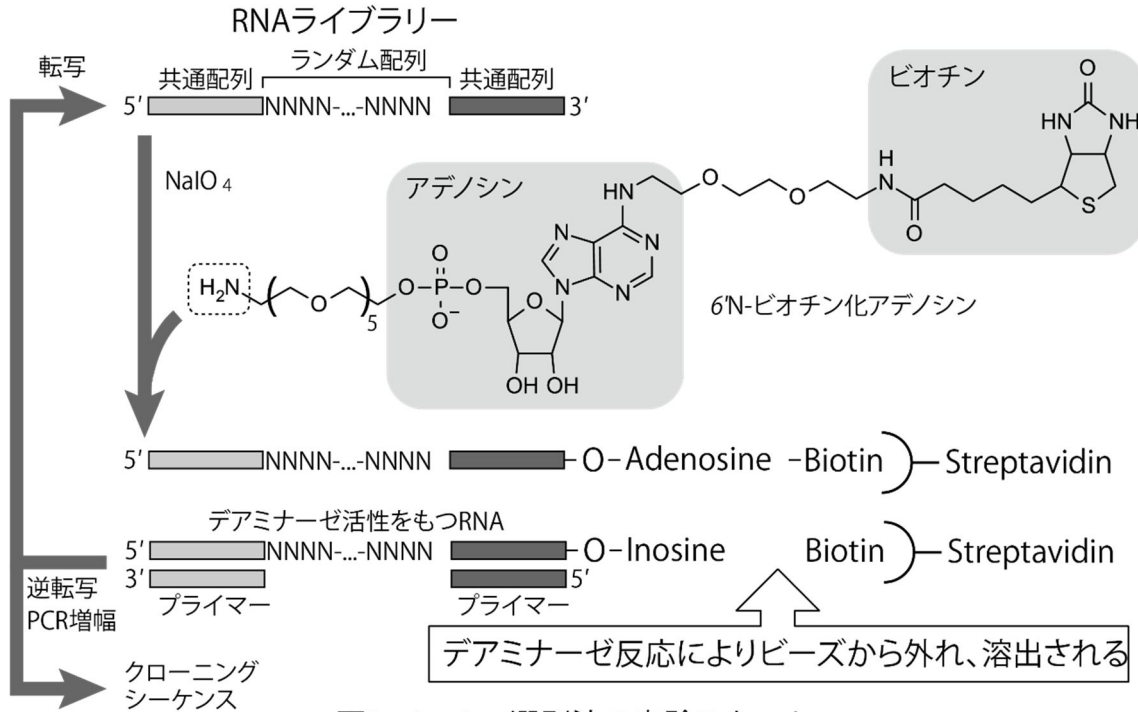


図1 *in vitro*選別法の実験スキーム

新規リボザイムを人工的に創出する一般的な方法として *in vitro* 選別法がある。目的とする酵素活性を示す RNA 分子の選別と増幅を繰り返し、 10^{14} 個程度の各々違った配列を持つ RNA 集団 (RNA ライブラリ) から、目的の機能に適した RNA 配列を取得する。*in vitro* 選別を効率的に行うためには、各 RNA 分子の酵素活性の有無を容易に判別できる系の構築が必要である。本研究では、6' N-ビオチン化アデノシンを各 RNA 分子の 3 末端に結合することで、脱アミノ活性をもった RNA 分子のみがストレプトアビジンビーズから外れ、溶出される実験系を新たに考案する(図 1) 溶出された RNA 分子集団は、逆転写、PCR 増幅、転写反応によって次のラウンドのライブラリとする。このラウンドを 10 回ほど繰り返し、脱アミノ活性を示す RNA 分子を増幅濃縮する。ここで、自己切断によって溶出した RNA 分子は末端のコンセンサス配列のいずれかを欠くと考えられるため、PCR 増幅の過程で希釈され淘汰されていくと考えている。

(2) 脱アミノ活性に必要なモチーフ配列の同定と機能評価

脱アミノ活性を示すと予想される RNA 配列が得られたら、この配列集団を類似度に基づいて系統樹分類し、脱アミノ活性に関わるモチーフ配列を調べる。このようにして決定されたモチーフ配列から候補リボザイムを多数合成し、それぞれの脱アミノ活性をフィルタバインディングアッセイなどで計測する。

(3) *in vitro* 選別法による、特定タンパク質の特定モチーフに結合する RNA 配列の探索

(1)と同様の方法で、特定タンパク質の特定部位に特異的に結合する RNA 配列を探索する。6' N-ビオチン化アデノシンの代わりに、概日リズム形成に関わる Period タンパク質の PAS ドメイン

ン部を用い、これによく結合する RNA 配列を探索する。Period の PAS ドメインをターゲットとした理由は、Period は概日リズム形成に関わるよく知られた重要なタンパク質であること。また、近年のショウジョウバエを用いた研究で、Period タンパク質は概日リズム形成に加えて学習記憶にも関わることを示されており、多層的な機能を持っていると考えられることから選定した。例えば、「概日リズム形成のみ」や「学習記憶機能のみ」を阻害することが可能となるかもしれないと期待した。

4. 研究成果

本研究では、残念ながら目標 1「脱アミノ反応により塩基変換する RNA 配列の作出」は達成できなかった。一方で、目標 2「Period タンパク質の PAS ドメイン特異的に結合する RNA 配列の作出」では、その候補となる配列を複数得ることができた(図 2)。得られた配列の内、上位 10 種類の配列で RNA プール全体の 80%以上を占めていた。また、それらの配列は非常に相同性が高く、共通の立体構造をもつことが予想されることから、正しく Period タンパク質の PAS ドメインを検知する RNA 配列が得られたのではないかと考えている。

今後は、得られた RNA 配列をより詳細に解析し、最小の RNA モチーフを同定することを目指す。また、その RNA モチーフが実際に PAS ドメインに結合することを確かめるため、ピアコアなどの分子間結合力を定量化できる装置などを用いて実験を進めていきたい。

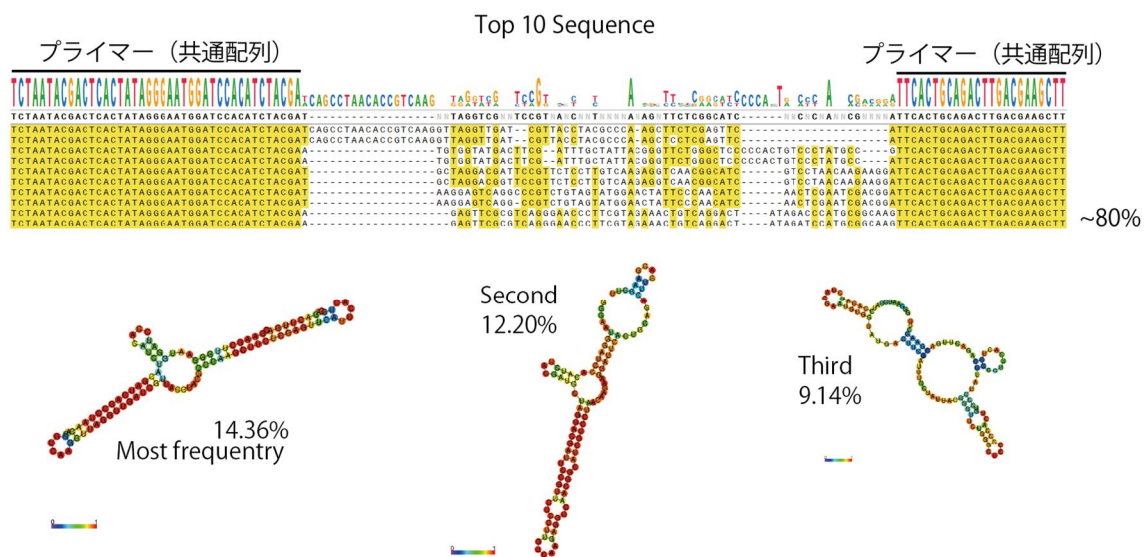


図 2 in vitro 選別法によって得られた Period タンパク質 PAS ドメイン結合性と考えられる RNA 配列群

(上) 10 回のセレクション後に得られた溶液中の全 RNA 配列をシーケンスしたときの上位 10 の RNA 配列。これらの RNA だけで全体の 80%を占めていた。TAG から始まり ATC で終わる相同性の高い配列が得られた。(下) CentroidFold による RNA の 2 次構造予測。上位 3 つの RNA について表示している。強い結合で形成されたヘアピン構造が共通して認められる。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshinori Suzuki, Jonathan E. Schenk, Hua Tan, Quentin Gaudry	4. 巻 30
2. 論文標題 A Population of Interneurons Signals Changes in the Basal Concentration of Serotonin and Mediates Gain Control in the Drosophila Antennal Lobe	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1110-1118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2020.01.018	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京都医学総合研究所 学習記憶プロジェクトHP https://www.igakuken.or.jp/memory/
--

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
---------	---------