

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20710167

研究課題名（和文） *In vivo*セレクション法によるゲノムワイドなリボザイム探索研究課題名（英文） Genome-wide screening of functional ribozymes by *in vivo* selection

研究代表者

萩原 正規 (HAGIHARA MASAKI)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：40403000

研究成果の概要（和文）：研究提案「*In vivo*セレクション法によるゲノムワイドなリボザイム探索」では、機能性RNAのうち自己切断型リボザイムの探索を目標に設定し、ゲノムから転写されるRNAを網羅的にライブラリー化した「ゲノムRNAライブラリー」から、大腸菌を用いた*in vivo*セレクション法による効率的なスクリーニング系を用いて、リボザイムなどの機能性RNAの探索を行った。

研究成果の概要（英文）：*In vitro* selection provides one of the most powerful strategies for obtaining functional RNA molecules. The selection and evolution technique has produced RNA aptamers that specifically bind small molecules or ribozymes that catalyze a variety of chemical reactions from randomized pools of RNA. In this project, we performed an *in vitro* selection aimed at isolating functional RNAs from the human genome RNA library.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：(1)リボザイム (2)*in vivo*セレクション (3)ゲノム

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトによるヒトゲノムの完全解析の結果、遺伝子の大部分はRNAに転写され、さらに転写されるRNAの大部分（98%）はタンパク質配列をコードしないnon coding RNA (ncRNA) であることが明らかになった。ncRNAにはmicroRNA、リボザイム、リボスイッチに加えて未解明の機能が隠されてい

ると考えられている。しかしながら現在のマイクロアレイ、公的データベース情報では未知機能のRNAを探索することは困難である。すなわち、生理活性分子との結合に応じた翻訳制御（リボスイッチ機能）、あるいは触媒機能により翻訳を制御するリボザイム機能など機能性ncRNAなどを効率的に探索する化学的、生化学的方法論は、今後のncRNA研究を飛躍的

に進展させると期待されている。

本研究提案「In vivo セレクション法によるゲノムワイドなリボザイム探索」では、機能性 RNA のうち自己切断型リボザイムの探索を目標に設定し、ゲノムから転写される RNA を網羅的にライブラリー化した「ゲノム RNA ライブラリー」から、大腸菌を用いた in vivo セレクション法による効率的なスクリーニング系を用いて新規リボザイムの探索と機能解明を行う。ゲノム中にコードされたリボザイムは、RNA レベルにおける遺伝子発現制御、オルタナティブスプライシングなど重要な生物学的機能を持つと考えられるが、新規なリボザイムを探索する方法論はこれまであまり研究されてこなかった。リボザイムをはじめとして、生物学的に重要な意味を持つ新たな機能性 RNA の研究は、基礎研究、医療、診断など、生命科学における広い領域において重要なものとなる。

2. 研究の目的

近年、メッセンジャーRNA (mRNA) の5' 末端側に存在する非翻訳領域 (untranslated region: UTR) 中に、遺伝子発現を抑制する制御領域が存在することが発見された。また mRNA 前駆体における自己触媒的な RNA 切断機構が転写の終結に関わっていることも明らかにされた (Akoulitchev et al., *Nature*, 2004)。このように現在 ncRNA の探索と、機能解明が精力的に行われており、今後も生物学的に重要な機能を有する ncRNA が数多く発見されると考えられる。

これまでに申請者は、(1) in vitro セレクション法とペプチドライブラリーを組み合わせた蛍光 ATP センサーの開発研究 (*JACS*, 2002, 2006)、(2) 人為的なリボスイッチ制御を目指した光応答性 RNA レセプターの開発研究 (*JACS*, 2007) を通じて、合成 RNA ライブラリーを用いた in vitro セレクション法を用いた機能性 RNA の開発研究を進めてきた。これらの研究を通じて、合成 RNA ライブラリーを用いるのではなくゲノムに存在する機能性 RNA をセレクション法により探索する発想に至った。

近年、Szostak らは、ゲノムを断片化した RNA ライブラリーから、in vitro セレクション法を利用して新規リボザイムを発見した (Szostak et al., *Science*, 2006)。しかし、この手法はリボザイム活性画分を電気泳動法によりゲルから回収するために、塩基長の決まった RNA ライブラリーからの in vitro セレクションに限定されている。一方、レポータータンパク質の発現を指標とする細胞ベースの in vivo セレクション法は、極めて効率的に合目的分子のライブラリーからのスクリーニングが可能であるが、目的とする読み枠 (リーディングフレーム) でタンパク質が翻訳さ

れる確率が 1/3 しかないという問題があった。本研究で提案する大腸菌を用いた in vivo セレクション法では、すべての読み枠でタンパク質が翻訳できるタンパク質発現ベクターを利用することにより、塩基長に制限の無い RNA ライブラリーからのセレクションを可能にした。即ち、本研究提案で用いる RNA ライブラリーは、Szostak らにより報告された塩基長の限定された RNA ライブラリーと比較して、圧倒的に配列的、構造的多様性に優れている。この多様性が格段に向上したゲノム RNA ライブラリーを用いて、ゲノムワイドにリボザイムを探索する方法論は、新たな機能性 ncRNA 探索において極めて有効である。

本研究提案で用いる細胞をベースとしたスクリーニング系は、有機小分子 (エフェクター分子) との結合に応じて機能発現がコントロールされるリボザイム、リボスイッチのような ncRNA の探索にも応用でき、生物学的に重要な RNA を探索する画期的な方法論である。ゲノム RNA ライブラリーから選出された RNA は、機能性 ncRNA として生命維持に関わる可能性があり、遺伝子発現を操作可能な人工分子の開発にも有用な知見を与えると期待している。一方、ゲノム配列中には進化の過程において蓄積された情報も含まれており、生物種、時代を超えた生命現象が、機能性 ncRNA 探索をきっかけに理解できる可能性も開ける。将来的には、本研究で探索、機能解析するリボザイムをはじめとした ncRNA を、制御する有機小分子の開発研究へと展開することを考えている

3. 研究の方法

本研究提案「In vivo セレクション法によるゲノムワイドなリボザイム探索」では、ゲノムにコードされた自己切断活性を有するリボザイムを探索し、その機能評価を行う。具体的には、

(1) ヒト、酵母などのゲノムから調製したゲノム RNA ライブラリーの作製、

(2) 致死遺伝子を選択マーカーとした in vivo セレクション法の開発、リボザイムの探索を行う。

ヒト、酵母などのゲノムからゲノム RNA ライブラリーを作製し、大腸菌を用いた in vivo セレクションの実験系を立ち上げ、リボザイムを探索する。ゲノムライブラリーはゲノムを DNA 分解酵素 (DNase I) で部分消化した後、目的とする塩基長の DNA をゲル電気泳動法により分離して作製する。ライブラリーの塩基長は DNase I の反応時間により自由に制御可能であり、当初は 100-300 塩基長のゲノムライブラリーの作製を計画した。次に、作製したゲノムライブラリーを Phe-tRNA 合成酵素

変異体の遺伝子上流に融合させ、大腸菌に導入する。Phe-tRNA 合成酵素変異体は p-クロロフェニルアラニン (pCl-Phe) を基質として認識し、非天然アミノ酸を含むアミノアシル tRNA を合成する。その結果、Phe-tRNA 合成酵素変異体が発現した大腸菌は、pCl-Phe を取り込んだ異常タンパク質を生産するため、pCl-Phe を含む培地では生育できない (Kast, *Gene*, 1994)。この酵素変異体-基質ペアーを利用して、pCl-Phe を含む培地中で大腸菌の in vivo セレクションを行う。セレクション法における選択圧を培地中の pCl-Phe 濃度により制御できる点が、酵素-基質ペアーを利用する利点である。自己切断型リボザイムにより酵素の翻訳が阻害された結果、pCl-Phe を含有する培地中で生育可能になった大腸菌からプラスミドを回収する。プラスミド DNA の配列解析により自己切断活性を有するリボザイム配列が同定できる。

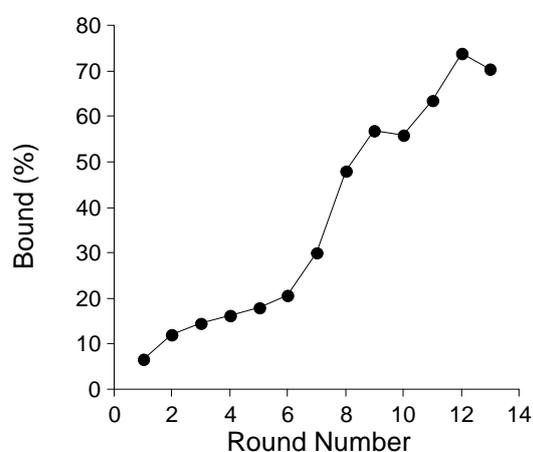
引き続き、公的ゲノムデータベースを用いてリボザイム配列の下流に存在する遺伝子を探索し、同定したリボザイムの生物学的な機能解明を行う。リボザイム活性は分光学的解析、フットプリント法などの分析手法、および RNA 配列の下流に導入したルシフェラーゼなどレポータータンパク質の発現量の変化から評価する。

4. 研究成果

(1) 大腸菌、枯草菌、ヒト、酵母などのゲノムからゲノム RNA ライブラリーを作製し、in vivo セレクションの実験系の立ち上げを行った。各種ゲノムを調整した後、ゲノムを DNA 分解酵素 (DNaseI) でゲノム DNA を部分消化した後、目的とする塩基長の DNA をゲル電気泳動法により分離した。ライブラリーの塩基長は DNaseI の反応時間により自由に制御可能であることが確認できた。本研究では 100-200 塩基長のゲノム DNA ライブラリーを作成した。

作成したゲノム DNA ライブラリーに、リンカー配列を連結して in vitro セレクションに利用可能なゲノム DNA ライブラリーへと変換した。ゲノム DNA ライブラリーから転写したゲノム RNA ライブラリーには、mRNA、リボソーム RNA をはじめとして、タンパク質へ翻訳されないイントロンや、様々な機能性 ncRNA が含まれていると考えられる。ゲノム RNA ライブラリーを初期ライブラリーとして利用すると、選択された配列は必ずゲノム中に存在する。すなわち、ゲノム RNA ライブラリーを用いた研究は、これまでの合成 RNA ライブラリーを用いた方法と比較して、より直接的に生物学的機能制御を指向したものとなりうる。

(2) 作製したゲノムライブラリーを使用して、in vitro セレクション法を行ったところ、目的としたリボザイムの獲得までにはいたらなかった。そこで、ヒトゲノム RNA ライブラリーから、in vitro セレクションを行い、核酸結合性小分子化合物 (ナフチリジンダイマー: ND) に対して選択的に結合する RNA を探索した。セレクションサイクルごとに ND カラムに対する結合 RNA 画分が増大していくことが確認できた (下グラフ) ことから、ヒトゲノム RNA ライブラリーからも in vitro セレクションが効率よく行えることがわかった。13回のセレクションサイクル後の RNA 配列を解析し、ヒトゲノムデータベースを利用して ND 結合性 RNA のゲノム上の位置を同定した。



(図) in vitro セレクションサイクル毎の ND 結合性 RNA 画分の変化

配列解析の結果、ND 結合性の様々な RNA 配列が同定できた。今回のセレクションでは、選択条件は変更せずに行った。そのため配列解析を行ったサンプル中には、高度に収束した配列は認められなかった。今後、セレクションを高塩濃度条件で行うことにより、高い親和性で結合する RNA が得られるものと考えている。解析した配列の中で、特に高い相同配列であったクローンについてゲノムデータより解析を行った。Blast 解析の結果、これらの配列は Contactin-associated protein-like 4 precursor (Cell recognition molecule Caspr4) 内に存在することがわかった。すなわち、これらの mRNA 配列は ND と結合することが示唆され、Caspr4 タンパク質は ND による発現制御の標的分子となることが期待された。誘起小分子化合物に対して、選択的に結合する RNA を獲得出来たことから、ゲノムライブラリーを利用したセレクション法の有用性が明らかになった。セレクションにより得られた配列は、タンパク質をコードする領域に存在しており、小分子を利用した新たな遺伝子発現制御の可能

性を提示するものであった。

ゲノム RNA ライブラリーから in vitro セレクションにより得られた RNA 配列は、標的小分子の生物学的機能を評価する上で重要な情報になる。今後、これらの RNA が実際に ND と高い親和性で結合すること、さらには標的 RNA に結合して生物学的な機能を発揮することを、標的遺伝子のタンパク質発現量解析により評価していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 8 件)

(1) Fumie Takei, Masako Igarashi, Masaki Hagihara, Yoshimi Oka, Yoshihiro Soya, Kazuhiko Nakatani
Secondary Structure-Inducible Ligand Fluorescence Coupled with PCR, *Angewandte Chemie International Edition*, 4, 2009, 7822-7824, 査読有

(2) Hanping He, Masaki Hagihara, Kazuhiko Nakatani,
Small Molecule Affecting the Replication of Trinucleotide Repeat d(GAA)_n, *Chemistry-A European Journal*, 15, 2009, 10641-10648, 査読有

(3) Marcelo D. Vinces, Matthieu Legendre, Marina Caldara, Masaki Hagihara, Kevin J. Verstrepen,
Unstable Tandem Repeats in Promoters Confer Transcriptional Evolvability, *Science*, 324, 2009, 1213-1216, 査読有

(4) Hayashi, Gosuke, Hagihara Masaki, Nakatani Kazuhiko,
RNA aptamers that reversibly bind photoresponsive azobenzene-containing peptides, *Chemistry-A European Journal*, 15, 2009, 424-432. 査読有

(5) Li-Ping Bai, Masaki Hagihara, Zhi-Hong Jiang and Kazuhiko Nakatani,
Ligand Binding to Tandem G-quadruplexes from Human Telomeric DNA, *ChemBioChem*, 9, 2008, 2583-2587, 査読有

(6) Hayashi, Gosuke, Hagihara, Masaki; Nakatani, Kazuhiko,
Genotyping by allele-specific l-DNA-tagged PCR, *Journal of Biotechnology*, 135, 2008, 157-160, 査読有

(7) Hasegawa, Tetsuya; Hagihara, Masaki;

Fukuda, Masatora; Nakano, Shun; Fujieda, Nobutaka; Morii, Takashi,
Context-dependent fluorescence detection of a phosphorylated tyrosine residue by a ribonucleopeptide, *Journal of the American Chemical Society*, 130, 2008, 8804-8812, 査読有

(8) Peng, Tao; He, Hanping; Hagihara, Masaki; Nakatani, Kazuhiko,
DNA Labeling by Ligand Inducible Secondary Structure, *ChemBioChem*, 9, 2008, 1893-1897, 査読有

〔学会発表〕 (計 3 件)

① 萩原 正規、中谷 和彦、RNA 四重鎖構造を介した遺伝子発現制御、日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月 27 日、近畿大学 (大阪府)

② 萩原 正規、中谷 和彦、mRNA の非翻訳領域に存在する四重鎖構造、日本ケミカルバイオロジー研究会第 4 回年会、2009 年 5 月 19 日、神戸市産業振興センター (兵庫県)

③ 萩原 正規、中谷 和彦、グアニンリッチ RNA 配列に構造変化を誘起する小分子化合物、第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム 2008、2008 年 9 月 18 日-20 日、東京工業大学すずかけ台キャンパス (神奈川県)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/rbc/member/hagihara.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 正規 (HAGIHARA MASAKI)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号：40403000

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし