

## RNA 酵素, リボザイム



西川 諭\*

## RNA enzyme, ribozyme

**Key Words** : Hammerhead ribozyme, HDV ribozyme, RNA chemical synthesis, HIV-1, Ribozyme engineering

## 1. はじめに

最近, RNA が再び注目をあつめている. 再びというのは, 遺伝子操作が可能になる前の分子生物学では, DNA のように高分子をいわゆる分子生物学的に研究することは困難で, むしろ tRNA のように生体高分子の中では比較的小さく (70 数ヌクレオチド, 分子量約 2 万), しかも機能もはっきりとしている (アミノ酸の運搬を担う) 生体高分子の研究が盛んであったからである. 70 年代から起こってきた遺伝子工学 (DNA 工学ともいえる) が圧倒的な優勢をしめる現在であるが, RNA には DNA に見られない機能が発見された. すなわち RNA でありながら, 酵素と同じように反応を触媒する分子 “リボザイム” の発見である. 今から 10 年程前にテトラヒメナの rRNA がタンパク質成分なしに, グアノシンと  $Mg^{2+}$  イオンの存在下に, ある特定の位置で自己切断を起こすことが見付き, その後いろいろな種類のリボザイムが発見されてきた.

## 2. リボザイム研究の動き

リボザイムはおもに 2 つの点から興味を持たれ, 研究が進められている. 1 つは RNA がな

ぜタンパク質酵素とおなじように RNA 鎖を切断できるのかという疑問である. もうひとつはリボザイムの RNA 鎖切断活性を利用し, ある特定遺伝子の発現を人為的にコントロールする手段として応用することである.

最初の疑問については RNA の構造, 即ち塩基配列, それがつくる 2 次構造, 3 次構造が機能と密接に結び付いていることが予測されている. 例えば図 1 の植物ウイルス由来のハンマー

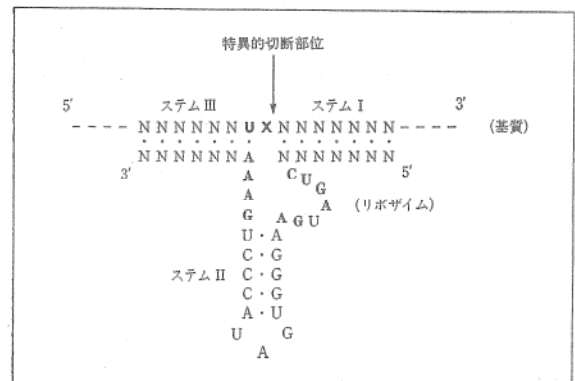


図 1 ハンマーヘッド型リボザイムの構造

ヘッドリボザイムは NUX の 3' 側で RNA 鎖を切断するが, ステム I, ステム III からなる基質認識部位とさらにその間でステム II で支えられた特定の塩基配列を持つ触媒ループ (太字が必須な残基), すなわち酵素で云う触媒部位からなることはすでに明らかである. 目下の最大の疑問点は立体構造, 特に触媒ループの構造と, その領域における真の触媒と考えられている  $Mg^{2+}$  イオンの位置である. 一方, 我々はヒトデルタ肝炎ウイルス (Human Hepatitis Delta Virus) 由来で, まだ最小の必須構造が明らかになっていない HDV リボザイム (図 2)

\*Satoshi NISHIKAWA

1949年7月2日生

昭和53年大阪大学大学院・薬学研究科・博士課程修了

現在, 通商産業省工業技術院, 生命工学工業技術研究所, 分子生物部分子遺伝学研究室, 室長, 薬博, RNA 工学, タンパク質工学

TEL 0298-54-6085



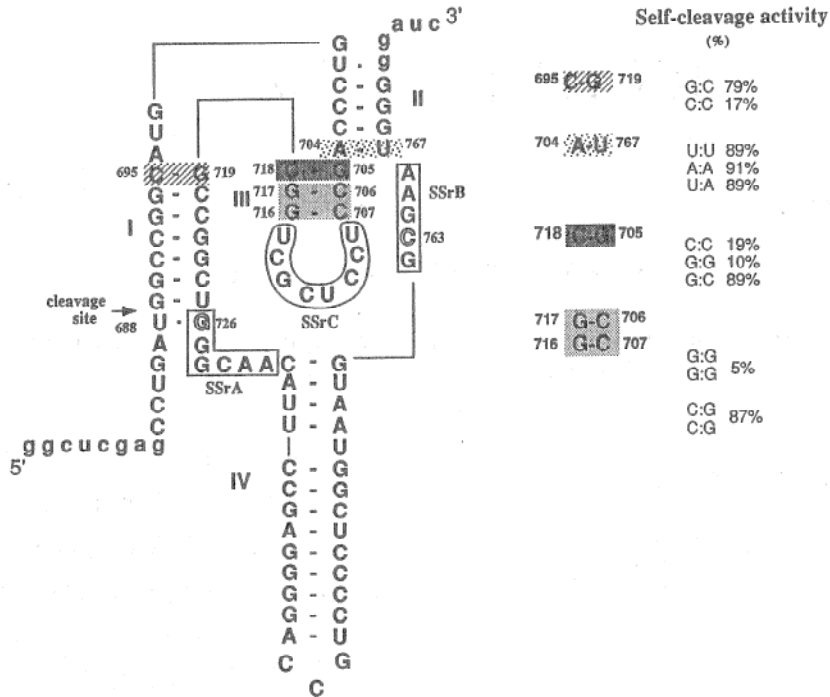


図2 HDVリボザイムの必須残基の探索

を対象に選び、上の問の答えを得るべく研究を進めている。このHDVリボザイムはハンマーヘッドリボザイムと同じ様式で自己切断を起こすが、両者の間にはなんら共通の構造は見られず、どのような機能構造が必要なのかに興味が集まっている。そこで、まず機能構造をできるだけ小さくすることを目的に、インビトロ・ミュータジェネシス法により活性に必須な領域の限定、並びに必須残基の探索を行い<sup>1,2,3)</sup>、さらに化学修飾法により2次構造や3次構造に対する情報を現在、得ている所である。

2番目の応用については、特にエイズウイルスのようなRNAウイルスに対する抗ウイルス剤として期待されている。というのはリボザイムは非常に基質特異性の高い酵素で、かつその基質認識部位をターゲットの塩基配列に合わせて自由に設計できるからである。タンパク質酵素ではそのような設計はまだ不可能である。しかし、現状のリボザイムでは生体内のRNaseの分解を受け易いこと、タンパク質酵素に比べて、一見活性の低いことなどの問題点がある。実際にリボザイムで遺伝子の発現を制御しようとした時、細胞への導入方法にはリボザイムを合成し外から細胞に導入する方法と、リボザイム遺伝子を細胞に導入し、細胞内で発現させる

2通りが考えられる。

### 3. 化学合成リボザイム

RNA化学合成の原料であるアミダイト試薬が市販されるようになり、従来に比べるとずっと容易にRNA合成ができるようになってきた。収率や精製度の点から、まだDNA合成には及ばないものの、前述のハンマーヘッドリボザイムは合成可能な鎖長で、活性に必須な残基もよくわかっておりちょうど良いモデルとなっている。最近、いくつかのグループによりハンマーヘッドリボザイムの基質認識部位をRNAに比べ安定なDNAに変えたキメラリボザイムが合成され、それらを用いての反応速度論的解析がなされている<sup>4,5,6)</sup>。もともとはリボザイムを生体内で使用する場合の安定化が目的であったが、興味深いことに $k_{cat}$ 値の増大することがわかった。すなわち、単位時間あたりに切断できる分子数が増えたわけである。基質認識部位をDNAに換えることで反応性( $k_{cat}$ 値)が増すのは、微妙な構造の変化で切断反応に必須な $Mg^{2+}$ イオンが前述した触媒ループでよりよい位置にくるためと推測されている。一方、 $K_m$ 値についても、基質結合部位の鎖長や塩基配列によりかなり差があるが、大概増大する。 $K_m$

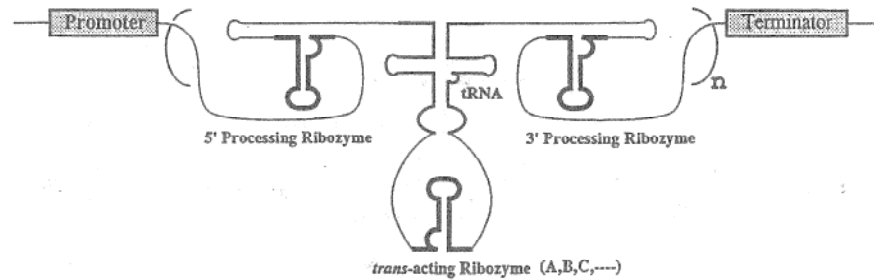


図3 散弾銃型リボザイムの発現システム(文献7より)

値の上昇は一見マイナスのように思われるが、リボザイムの $K_m$ 値が一般のタンパク質酵素に比べて非常に小さいことを考えると、 $K_m$ 値の上昇はむしろ基質との結合の際のミスマッチを防ぎ、酵素としての特異性の向上につながるため逆に有利な点となる。

#### 4. リボザイム発現ベクター

もう一つの発現方法にリボザイムをコードする遺伝子を細胞内に導入し、それを発現させる手法がある。正に遺伝子治療の一つでエイズ等のRNAウイルスに対してより根本的な治療法あるいは予防法として期待出来るがベクターや細胞の種類などだけでなく、リボザイムに限って見ても、いかにしてターゲット部位を見つけ、かつ効率よく切断できるかがポイントとなる。そのためにもまず十分な量のリボザイムを発現するシステムが必要となる。そのような観点から散弾銃型リボザイム発現ユニット(図3)が多比良らにより考案された<sup>7,8,9)</sup>。この発現ユニットの特徴はユニットを複数個繰り返すことで遺伝子発現量を増加できること、また異なるターゲットに対するリボザイムを同時に発現できることである。ウイルスRNAの一ヶ所だけを狙ったリボザイムは最初は効果があっても、ウイルス遺伝子の変異により次第にエスケープの現象の起こることが知られているので、このように同時に複数ヶ所を攻撃できるシステムは特にHIV-1RNAのように複製の過程で変異の起き易いウイルスに対してこれから重要な手法となるであろう。

#### 5. リボザイムエンジニアリング

リボザイムの触媒反応はもっぱらRNA鎖の切断反応であること、およびその活性がタンパ

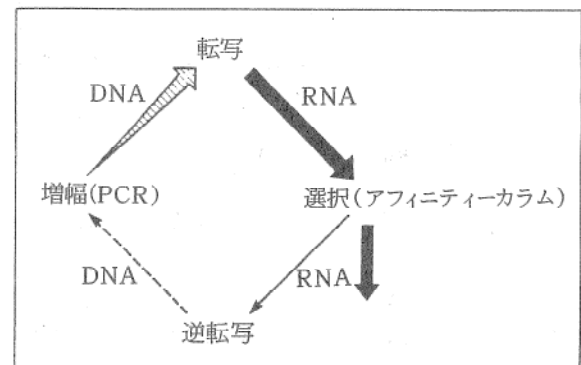


図4 分子進化を利用した新しい機能性核酸のスクリーニングシステム

ク質酵素に比べ低いこと( $kcat/K_m$ 値で比較すると決して低くないのであるが)がリボザイムの応用研究が一般的にならない要因であったが、最近、“分子進化”を模した実験システムが考案され、従来のリボザイムを改良したり、新しい反応を触媒するリボザイムを創り出すことが可能になってきた。この方法の概念は図4のように多数の変異体(ランダムな配列を持った核酸分子の集合)の中から目的に合う分子だけを選択し、増幅(Polymerase Chain Reaction; PCR)しさらにまた変異を導入するサイクルを繰り返す、最終的に最も目的に適った分子を得る方法である<sup>10,11,12)</sup>。現在ではリボザイムだけでなく、種々のリガンドやタンパク質に特異的に結合する核酸分子の創製にも応用されている。我々も前述のHDVリボザイムの機能上必須の残基を固定するため、図5の右側のストラテジーを用いた<sup>13)</sup>。1)機能上重要と予想される領域にランダムに変異をいれ、2)T7RNAポリメラーゼで転写する。3)活性ある分子は自己切断し、5'側が除かれるが、変異により活性を失った分子では除かれずに残る。4)リバーストランスクリプターゼで鋳型DNAを合成し、5)切れ残った分子のみをPCR法で増幅する。

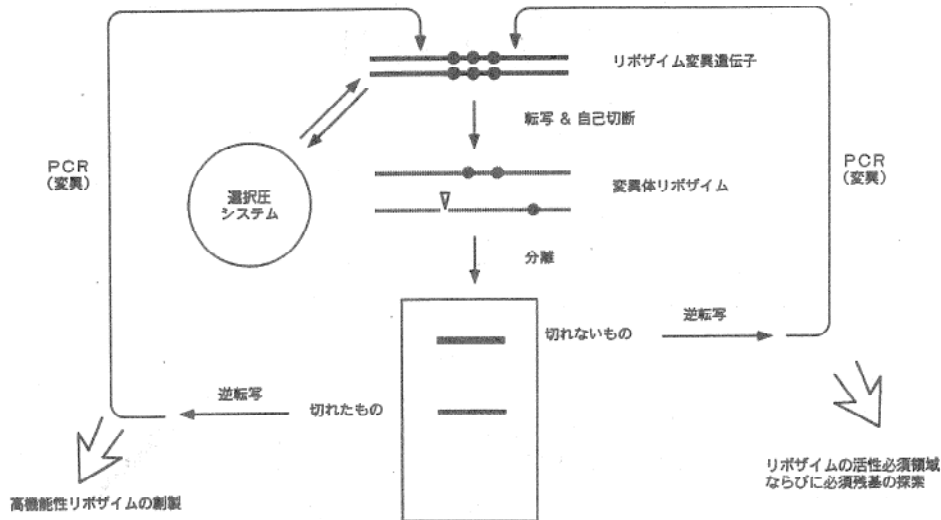


図5 リボザイムエンジニアリングの概念図

このサイクルを繰り返していくつかの重要な残基を明らかにできた。一方、右側のサイクルを回すことで、より活性の高いリボザイムをスクリーニングするシステムになる。

### 6. おわりに

ごく最近では、mRNA 前駆体のスプライシングや遺伝子にない情報が mRNA 上で新たに編集される RNA エディティング、そしてタンパク質生合成の場であるリボゾームもその反応の本体は rRNA が担っている知見が集まってきた。“RNA の機能” は今後もますます興味深い話題を提供してくれるであろう。

### 参考文献

- 1) Suh, Y.-A., Kumar, P. K. R., Nishikawa, F., Kayano, E., Nakai, S., Odai, O., Uesugi, S., Taira, K. & Nishikawa, S. (1992) *Nucleic Acids Res.*, **20**, 747-753.
- 2) Kumar, P. K. R., Suh, Y.-A., Miyashiro, H., Nishikawa, F., Kawakami, J., Taira, K. & Nishikawa, S. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 3919-3924.
- 3) Kumar, P. K. R., Suh, Y.-A., Taira, K. & Nishikawa, S. (1993) *FASEB J.*, **7**, 124-129.
- 4) Shimayama, T., Sawata, S., Komiya, M., Takagi, Y., Tanaka, Y., Wada, A., Sugimoto, N., Rossi, J., Nishikawa, F., Nishikawa, S. & Taira, K. (1992) *Nucleic Acids Symposium Series No.27* 17-18.
- 5) Taylor, N. R., Kaplan, B. E., Swiderski, P., Li, H. & Rossi, J. J. (1992) *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4559-4565.
- 6) Hendry, P., McCall, M. J., Santiago, F. S. & Jennings, P. A. (1992) *Nucleic Acids Res.*, **20**, 5737-5741.
- 7) Taira, K., Nakagawa, K., Nishikawa, S. & Furukawa, K. (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5125-5130.
- 8) Yuyama, N., Ohkawa, J., Inokuchi, Y., Shirai, M., Sato, A., Nishikawa, S. & Taira, K. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **186**, 1271-1279.
- 9) Ohkawa, J. Yuyama, N. & Taira, K. (1992) *Nucleic Acids Symposium Series No.27*, 15-16.
- 10) Joyce, G. F. (1989) *Gene* **82**, 83-87.
- 11) Ellington, A. D. & Szostak, J. W. (1990) *Nature*, **346**, 818-822
- 12) Tuerk, C. & Gold, L. (1990) *Science*, **249**, 505-510.
- 13) Kawakami, J. Kumar, P. K. R., Suh, Y.-A., Nishikawa, F., Kawakami, K., Taira, K., Ohtsuka, E. & Nishikawa, S. (submitted)