



研究ノート

ハイブリッド化による人工RNA制限酵素の創製

金谷 茂 則*

Construction of an artificial RNA restriction enzyme with hybrid engineering technique.

Key Words : ribonuclease H, hybrid, restriction enzyme, specificity, protein engineering

1. はじめに

ハイブリッド化は、異なる性質をもつ2分子以上の高分子化合物を化学的物理的に連結することにより、それぞれの化合物のもつ欠点を補うと同時にそれらの長所を生かすハイブリッド分子を構築する技術である。従ってこの技術は、高い分子認識能や触媒能(酵素の場合)の故に多岐にわたる産業分野において利用されている蛋白質の応用範囲を広げる上で極めて有効である。何故なら、蛋白質は生体内の温和な条件からかけ離れた条件下では充分機能を発揮できないという大きな制約をうけているが、化学的及び構造的安定性が高くしかも自在に成型できる合成高分子とハイブリッドを形成することにより、そのような制約から解放されると期待されるからである。もちろん、ハイブリッド化により蛋白質の基質特異性を改変したり、蛋白質に新機能を賦与したりすることも可能である。本稿においては、人工RNA制限酵素の開発を目的として行ったハイブリッドRNaseHの研究

について紹介する。

2. RNA制限酵素の有用性

これまでに500種類以上のDNA制限酵素がいろいろな細菌から単離されているのに対して、RNA制限酵素はまだ天然から単離されていない。リボザイムとよばれるRNA分子はRNAを配列特異的に切断するが、その低い触媒能の故にRNA制限酵素として働くとは考えにくい。また、RNAの高次構造を認識してそれを特定の位置で切断するRNAプロセッシング酵素は必ずしも配列特異的にRNAを切断するわけではない。RNAは、DNAから蛋白質へと遺伝情報を伝えるだけでなく、それ自身多様な構造をとったり修飾をうけたりすることによりいろいろな機能を果たすことから、最近その研究が重要視されている。従って、RNA制限酵素の開発は、RNAの構造や機能の研究を活性化し、さらなる分子生物学の隆盛をもたらすと期待される。

3. 人工RNA制限酵素開発の戦略

RNA制限酵素が天然に存在しない理由は、生物にとってRNAを配列特異的に切断する必要がないためというよりはむしろRNAが様々な構造をとるためと考えた方がよい。酵素は一般に基質の高次構造を認識するので、ワトソン-クリック型の安定した規則正しい二重らせん構造をとるDNAを配列特異的に切断することはできても、基本的には一本鎖で存在するもの

* Shigenori KANAYA
1950年1月22日生
1979年東北大学大学院理学研究科
化学第二学科博士課程修了
現在、大阪大学大学院工学研究科、
物質・生命工学専攻、極限生命工
学講座、教授、理学博士、蛋白質工
学
TEL 06-877-5111
FAX 06-879-7936
E-Mail kanaya@chem.eng.
osaka-u.ac.jp



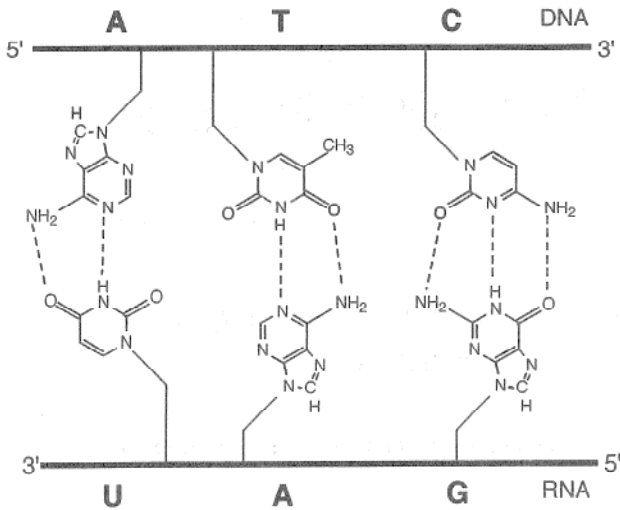


図1 DNA/RNA ヘテロ二本鎖における相補的塩基対

の高次構造を形成したりしなかったりするRNAを配列特異的に切断することはできないと考えられる。従って、RNAを配列特異的に切断するためには、酵素が基質を一次元的に認識できるように工夫する必要がある。

DNAやRNAのような核酸の配列を認識する上で最も確実で簡単な方法は、相補的な配列をもつ核酸(相補鎖)と二本鎖を作らせる方法である(図1)。相補鎖の方を放射性物質や蛍光性物質で標識しておけば二本鎖が形成されたか否かを検出することができる。もしも、放射性物質や蛍光性物質のかわりにRNA分解物質を相補鎖につないでおけば、そのハイブリッド分子はRNAを配列特異的に切断すると期待され

る。RNA分解物質としてはDNA/RNAヘテロ二本鎖のRNA鎖のみを分解するリボヌクレアーゼH(RNaseH)が適している。何故なら、DNAオリゴマーと連結したハイブリッドRNaseHは、ヘテロ二本鎖形成領域内でのみRNAを切断するので高い選択性を示すし、RNAの切断に伴うヘテロ二本鎖の不安定化によりDNAオリゴマーがRNA切断物から容易に解離するのでターンオーバーするからである(図2)。

4. ハイブリッドRNaseHの構築

RNaseHは生物界に広く存在しているが、構造と機能に関して最もよく研究されている大腸菌RNaseHI¹⁾を選択した。一方、連結用DNAオリゴマーとしては、GTCATCTCCという配列をもつ9量体DNAを用いた。DNAと酵素の連結は、適当なスペーサーを介して5'末端にマレイミド基を導入した9量体DNAと、分子表面の適切な位置に遊離のチオール基が1分子だけ露出するように改変したRNaseHI変異体を混合することによりおこなった²⁾。この時、両者はS-スクシミド結合を介して連結されるが、この結合は酵素が働く温和な条件下安定である。9量体DNAを連結する部位(Cys導入部位)やスペーサーの長さは、大腸菌RNaseHIと基質の複合体モデルに基づいて設計した。

5. ハイブリッドRNaseHの機能

9量体DNAを連結したハイブリッドRNaseHは、連結したDNAに相補的なGGAGAUGACという配列をもつ9量体RNAを5番目のAと6番目のUの間一箇所で切断した(図3)²⁾。RNaseHとDNAオリゴマーを連結しなくても、まずRNAとDNAオリゴマーを混ぜておいてからRNaseHを加えることによりRNAが配列特異的に切断されることはすでに知られている³⁾。しかし、9量体のDNA/RNAヘテロ二本鎖を未修飾のRNaseHIで切断した場合RNAは二箇所で切断されたので(図3)、ハイブリッドRNaseHIは切断特異性において未修飾RNaseHIより優れている。おそらく、DNAと酵素を連結したために両者間の相互作用が制限され、

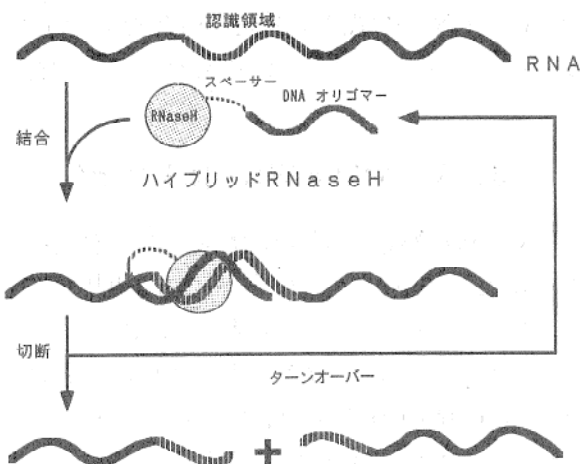


図2 ハイブリッドRNaseHによるRNA切断様式の模式図

6. おわりに

ハイブリッドRNaseHにおいてはDNA部分が基質認識を、RNaseH部分が触媒作用を司る。従って、連結するDNAオリゴマーのサイズや配列を変えることにより、どのような種類の配列特異的RNA分解酵素であっても創り出すことが可能である。このような人工RNA制限酵素は、RNAの構造や機能を調べる上で有用であるだけでなく、細胞内の特定のmRNAを除去する上でも有用であることが示唆されている⁸⁾。しかし、ハイブリッドRNaseHをRNA制限酵素として利用する上で解決しなければならない問題もいくつかある。例えば、RNAが高次構造を形成してしまうと、ハイブリッドRNaseHはRNAを切断しにくくなる。この問題は、ハイブリッドRNaseHのRNaseH部分を耐熱化したものに置き換えれば解決されるかもしれない。何故なら、高温ではRNAは高次構造を形成することができないからである。また、認識配列の長さをもっと減らす必要がある。9塩基長の配列の出現頻度はかなり低いため、RNAを断片化したりするためには6-7塩基長の配列を認識できるように工夫しなければならない。将来これらの問題が解決され、ハイブリッドRNaseHが実用化されることを期待している。

謝 辞

本稿に執筆の機会を与えて下さいました大阪大学工学部の今中忠行教授に感謝します。なお、本研究は、筆者が蛋白工学研究所在籍時に北海道大学薬学部大塚研究室と共同で行ったものです。ご協力頂いた方々にこの場をお借りして深く感謝致します。

文 献

- 1) 金谷茂則：蛋白質・核酸・酵素, 39, 1121-1132 (1994)
- 2) Kanaya, S., Nakai, C., Konishi, A., Inoue, H., Ohtsuka, E., & Ikehara, M: *J. Biol. Chem.*, 267, 8492-8498 (1992)
- 3) Donis-Keller, H: *Nucleic Acids Res.*, 7, 179-192 (1979)

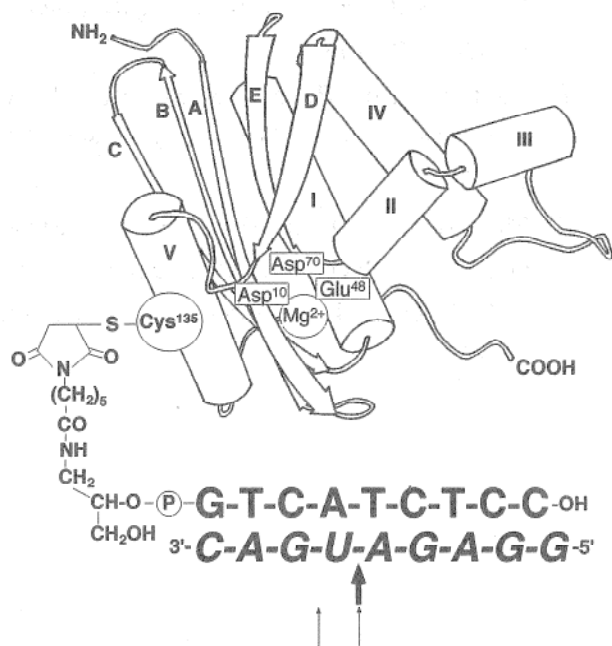


図3 ハイブリッドRNaseHの構造とRNAの切断位置
大腸菌RNaseHI部分は、遊離のチオール基が135位にのみ存在するように、13, 63及び133番目のシステインをすべてアラニンに、135番目のグルタミン酸をシステインに置換してある。10番目と70番目のアスパラギン酸及び48番目のグルタミン酸は触媒活性中心を構成する。9量体DNA部分とヘテロ二本鎖を形成するRNAを斜体文字で示した。また、太い矢印はハイブリッドRNaseHによるRNAの切断位置を示し、細い矢印は9量体DNA/RNAヘテロ二本鎖を未修飾RNaseHIで切断した時のRNAの切断位置を示す。

その結果としてRNAは限定された位置でのみ切断されたものと思われる。さらに、ハイブリッドRNaseHの認識配列を含む530塩基からなるRNAも、その領域内のAとUの間で特異的に切断された⁴⁾。ハイブリッドRNaseHは、基質となるRNAがモル比で20倍量以上存在してもほぼ完全に分解してしまうのでターンオーバーすることも明らかである。以上の結果は、ハイブリッドRNaseHが人工RNA制限酵素として機能することを示している。これまでのところ、最適なDNAオリゴマーの鎖長とスペーサーの長さはそれぞれ8量体⁵⁾と27Å⁶⁾であることが報告されている。なお、RNaseHのかわりにRNaseAを用いたハイブリッド酵素もRNAを配列特異的に切断するが⁷⁾、ハイブリッドRNaseAはほとんどターンオーバーせず切断特異性も低いので、RNA制限酵素としてはハイブリッドRNaseHの方が機能的にまさっている。

- 4) Nakai, C., Konishi, A., Komatsu, Y., Inoue, H., Ohtsuka, E., & Kanaya, S : *FEBS Lett.*, **339**, 67-72 (1994)
- 5) Kanaya, E., Uchiyama, Y., Ohtsuka, E., Ueno, Y., Ikehara, M., & Kanaya, S : *FEBS Lett.*, **354**, 227-231 (1994)
- 6) Uchiyama, Y., Inoue, H., Ohtsuka, E., Nakai, C., Kanaya, S., Ueno, Y., & Ikehara, M : *Bioconjugate Chem.*, **5**, 327-332 (1994)
- 7) Zuckermann, R. N., & Schultz, P. G : *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 6592-6594 (1988)
- 8) Ma, W. P., Hamilton, S. E., Stowell, J. G., Byrn, S. R., Davisson, V. J : *Bioorg. Med. Chem.*, **2**, 169-179 (1994)

