

# 分子デザインと進化工学によるRNA構造エンジニアリング

井川 善也

## RNAの能動機能

近年、RNA（リボ核酸）は「遺伝情報の担体分子」としての受動的な役割に加えてタンパク質分子と同様に能動的な機能を担う分子であり、その能動的な機能は多彩で細胞活動のさまざまな局面で利用されている事実が解明されつつある。

これらタンパク質をコードしないRNA（ノンコーディングRNA）は生命科学のもっとも注目される研究トピックの一つであるが、それらの研究の源流は、1960-70年代に始まる「トランスファーRNAやリボソームRNA研究」、1980年代初頭に始まる「RNAの酵素機能の発見」に遡る。

こうした研究を通してRNAの能動機能を支える性質が明らかとなった。(1) RNAはタンパク質と同様に、階層的なフォールディングの過程を経て、固有の立体構造を安定に形成できる(図1上)。(2) RNAが形成する立体構造は、タンパク質と類似の生体触媒能力を発揮できる(図1上)。(3) RNAの一次配列に依存した標的核酸への結合(二重らせん形成)は遺伝情報発現の調節手段として有用である。この中で、性質(3)はRNA干渉やアンチセンス核酸などRNAテクノロジーに直接関連するが、本稿では扱わない。

## RNA能動機能のネオバイオ的開拓

RNAの能動機能を支える性質が明らかになるととも

に、核酸の潜在能力に関して以下の問いが提出された。(1) 適切に立体構造を形成したRNAは、生体触媒能力に限らず、タンパク質類似のより広い機能を発揮できないか？たとえば、抗体や受容体などが示す「精密な分子認識」はRNAを素材としても可能であるか？(2) RNAと分子構造が近い一本鎖DNAも、適切な配列を設計すれば、立体構造を形成し、タンパク質に類似した機能を発現できるのか？

この二つの問いは実験的に検証され、どちらも肯定的な結果を与えられた。第1の問いに対し、標的分子を高い選択性と親和性で認識するRNA分子(RNAアプタマー)が発見(創生)された<sup>1)</sup>。第2の問いに対しては、一本鎖DNAを素材とする進化分子工学法により、触媒機能や分子認識機能を指標として適合配列が探索され、触媒能力を持つDNA分子(デオキシリボザイム)や特定分子を精密認識するDNA分子(DNAアプタマー)が同定された(図1下)<sup>2)</sup>。

これら細胞内RNAの触媒機能の発見に触発された二つの問いは、「既存の生命システムに縛られない」という点で「ネオバイオ分子的」な問いであり、その検証から得られた「アプタマー核酸」や「機能性DNA」は第一世代の「ネオバイオ分子」といえる。当初は細胞内では未同定の(=ネオバイオ的)な機能として開拓されたRNA機能が、後に細胞内からも見いだされた例もある。上述のRNAアプタマー(RNAによる小分子の精密認識)は、1990年代に「ネオバイオ的に」創生されたが、近年、アプタマーRNAは新規な遺伝子発現制御機構であるリボスイッチRNAの主要なモジュールとして、原核細胞を中心に広く存在することが見いだされた<sup>3)</sup>。

RNAアプタマーは、主に抗体の代替候補として期待されて発展してきたため、小分子やタンパク質分子が認識の主要な標的とされた。したがって核酸を認識するアプタマーの報告は少ない。標的分子の機能阻害や検出は、核酸が標的であればアンチセンス法(相補配列による二重鎖形成)を用いても同様の効果が期待できるため、アプタマーを利用する必要性が低いであろう。

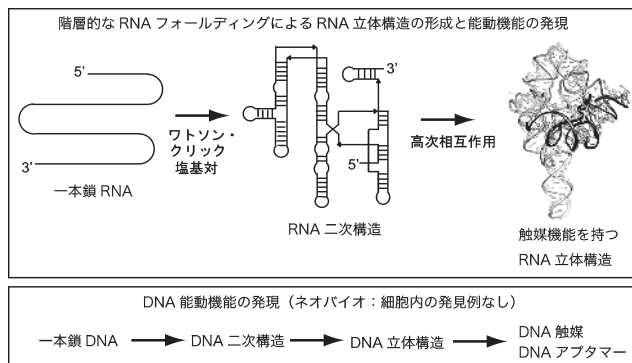


図1. 核酸ポリマーの階層的フォールディングを介した機能発現

## RNA立体構造とRNA分子認識

RNAがリボソームRNAに代表される大型で複雑な

「立体構造」を形成する場合、その構造を保持するため多数の相互作用が形成される。タンパク質分子の立体構造と同様に、大型のRNA構造は、より小さなRNA構造をモジュールとして集積し、さらにモジュール間の適切な会合が「高次RNA-RNA相互作用」により保持されている<sup>4)</sup>。これらのRNA-RNA相互作用は、RNAが複雑な立体構造を正しく形成し安定に保持するために必要な選択性と親和性を有する。立体構造の形成ではワトソン-クリック塩基対に加えて高次相互作用も重要な寄与をする(図1)。これらの高次相互作用は、RNA構造の形成のために進化した「標的RNA構造とRNAアプタマーのペア」であるが、RNA構造生物学の分野では「RNAリガンドとRNAレセプター」と呼ばれている。

大型RNAの立体構造を支える高次RNA-RNA相互作用(RNAリガンドとRNAレセプター)のなかで、もっとも広く存在し、また研究も進んでいるのが、GNRA四塩基ループ(Nは任意の塩基、Rはプリン)・リガンドとそのレセプター・モチーフである(図2)<sup>5)</sup>。GNRAテトラループは第一・第四部位の塩基間で形成される非ワトソンクリック型G-A塩基対を中核とした共通の立体構造に基づく安定なループを形成し、RNA立体構造中に広く存在する。とりわけ大型のRNA構造体では、GNRAループが一次・二次構造上では離れた位置の4~12程度の塩基が形成する「モチーフ構造」と特異的に相互作用し、立体構造形成の“かなめ”となる場合が多い。

数種のGNRAループ/レセプター相互作用はそれらの立体構造から、堅固でコンパクトなGNRAループを「鍵」、より塩基数の大きいレセプターを「鍵穴」とした分子認識ペアと理解できる。詳細は他に譲るが、RNA

構造やその機能が進化する過程で、GNRAループに対するレセプターは、基本的な分子認識の機構を維持しながら、堅固なレセプターによる「鍵と鍵穴」タイプと、比較的柔軟なレセプターによる「誘導適合」タイプに分化し(図2)、その差に対応して機能面の特性(ループ構造との親和性、第二・第三部位の塩基(G-N-R-A)の識別能など)も変化する(図2)<sup>5)</sup>。

### ネオバイオ型GNRAレセプター

NとRの組合せにより8種の可能なGNRAループに対し、細胞内RNAから同定されたレセプターのほとんどはGAAAループをリガンドとする(図2)。これら天然のレセプターの解析と並行して、「天然から未同定の認識特異性」を示すレセプターや、GNRA以外のループ構造を認識するレセプターを探索する「ネオバイオ」的アプローチの研究が報告されている<sup>6,7)</sup>。これらの非天然(ネオバイオ型)モチーフの創生は進化工学法により行われ、特定のループを標的として十数から数十塩基のランダム配列を探索し、期待する結合特性を有する配列が同定されている<sup>6,7)</sup>。

進化工学法で取得された「ネオバイオ型」レセプターの解析から、細胞から同定されたレセプターの解析のみでは得られない知見が得られている。人工創生された「ネオバイオ型」レセプターと標的GNRAループの認識能力を*in vitro*で評価すると、結合親和性とループ配列の選択性の両面で、天然から同定されたレセプターと同等かそれ以上の性能を示す。さらに「GNRAループ/人工レセプター」ペアを用い、天然のRNA構造を支える「GNRAループ/天然型レセプター」ペアをモジュール的に置換した場合も、人工ペア導入変異体は*in vitro*では野生型に劣らない性能を示す場合が多い<sup>7)</sup>。したがって、細胞内のRNA構造から同定されるGNRAループ/レセプターだけでなく、天然のRNA-RNA相互作用では使われないGNRA配列や非GNRA型のループ構造をリガンドとして「ネオバイオ型」レセプターを創生し、リボザイムやリボスイッチの性能をサポートできることが示された。

「ネオバイオ型」レセプターは*in vitro*条件では天然型レセプターに遜色ない性能を示す場合が多いが、*in vivo*またはそれに近い条件では、RNA機能をサポートできないケースも報告されており<sup>7,8)</sup>、その原因として、レセプター・モチーフの塩基組成やループサイズが指摘されている<sup>8)</sup>。細胞から同定されるレセプターの二次構造はAとUに富む場合が多い(図2)のに対し、「ネオバイオ型」レセプターでは塩基の偏りがなく相対的にGとC

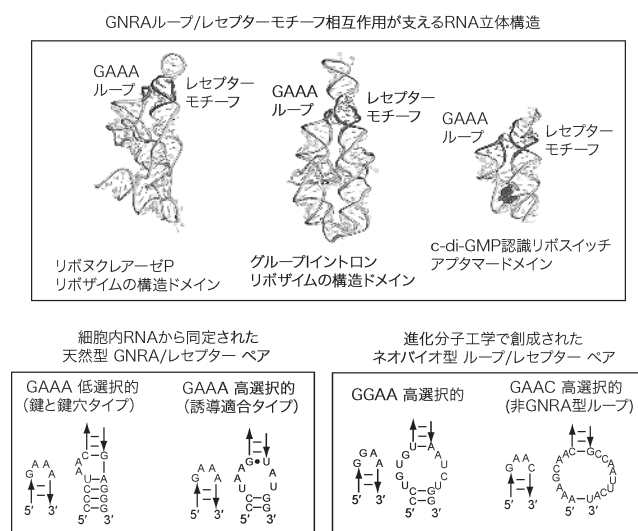


図2. RNA立体構造を支える代表的な高次RNA-RNA相互作用

の含有率が高く、ループ部位も大きい場合が多い(図2)。 *In vitro*で機能性RNA(リボスイッチやリボザイム)の部分のみを用いて機能解析する場合、レセプター部のGC含量やループサイズは顕著な悪影響を与えない場合が多い。しかし細胞内でリボスイッチやリボザイムがさらに長いmRNAの一部として存在する場合、GC含量が高くループ部も大きいレセプター配列は、長鎖RNAの他領域と相互作用し、間違っただ次構造の形成(ミスフォールディング)を誘発し、正常なRNA機能を阻害する危険性が高いことが指摘されている。反対に天然のレセプター・モチーフは、細胞内に固有の選択圧(長大なRNA配列中で他の領域と対合する危険性)を生き抜いた配列だと考えられる。GNRAループの認識能力が「ネオバイオ型」に比べ弱いモチーフも存在するのは、細胞内条件に適合するための代償であろう(図2)。

進化工法で生まれた「ネオバイオ型」レセプターは、機能性RNA部分の能力のみを指標に選択された結果、ループ配列に対する認識性能そのものは天然モチーフよりも優れたレセプターや、細胞ではリガンドに使われないループ配列を認識するレセプターも取得できる。他方で「ネオバイオ型」モチーフ(GCに富むモチーフや大きなループ構造を持つモチーフ)を細胞内で利用する場合、ミスフォールディングの誘発因子となる可能性が相対的に高い。したがって「ネオバイオ型」RNA-RNA相互作用モチーフをRNA分子パーツとして利用する場合には細胞内での利用を指向する合成生物学よりも、*in vitro*での利用を前提とするバイオナノテクノロジー分野が適している。

### ネオバイオRNAナノテクノロジー

近年進展が著しいナノテクノロジー分野に「DNAオリガミ」がある<sup>9)</sup>。DNAを素材として幾何学的なナノ構造を自在に組み上げる方法論の確立によって多彩な二次元および三次元のDNAナノ構造体が報告されており、今後多くの方面での応用が期待されている。DNAオリガミの方法論をRNA分子に応用した「RNAオリガミ」<sup>10)</sup>も報告される一方、天然RNA構造の構築原理を利用してRNA構造を集積する試み<sup>11)</sup>、さらに両者の長所を組み合わせた分子デザインも考案されている<sup>12)</sup>。

単位ユニットとなるRNA構造を集積し、大きなナノ構造体をつくるアプローチとして、筆者らは“天然RNA構造のモジュール性を活かした方法論”を開拓している<sup>13)</sup>。細胞内にはタンパク質が規則正しく集積し、幾何学的なナノ構造体を形成する例がいくつか見られる。たとえばDNAポリメラーゼIIIのサブユニット(DNAク

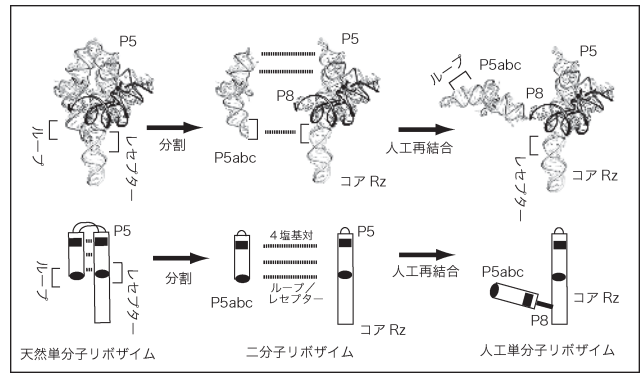


図3. グループIリボザイムのモジュール集積構造・分割・人工再結合

ランプ)は六角形の環状多量体をつくり、中央の空孔にDNAを貫通させることでポリメラーゼの脱落を防いで高い伸長反応を実現する。さらに立体的(多面体や球体)で大型の集積構造はウイルス・キャプシドに見られる。いずれの場合も非幾何学的な構造のタンパク質が単位ユニットとなり、規則正しく集積して形成される。

筆者らは、RNAの切断反応を触媒するグループIリボザイムを集積させた「リボザイム・ナノ集積体」をデザインした。グループIリボザイムは大小二つの構造モジュール(コアRzとP5abcモジュール)に物理的に分割でき、さらに二つのモジュールRNAは分子間で会合する(図3)。分子会合した二分子型リボザイムは、元の単分子リボザイムとほぼ遜色ない酵素活性を示す。コアRzとP5abcモジュールの会合はGNRAループ/レセプターの相互作用を含む数種のRNA-RNA相互作用で支えられ、両モジュール間の会合は選択的かつ強固な相互作用を行う界面での分子認識に依存する。

筆者らは分割されたコアRzとP5abcモジュールを野生型とは異なる部位で人工的に再連結し、両モジュール間の強い会合によりホモ多量体を形成できることを確認した(図4)。さらに再連結部位とリンカー長を調整すれば、多量体が閉環し環状多量体を形成することを示した。現在のデザインでは主に環状三量体(正三角形のナノ構造)が得られるが、少量の環状四量体(正方形のナノ構造)も同時に生成する。この結果から、RNAの立体構造は一定の柔軟さを有することを示している。

ホモ多量化で生成する環状三量体と環状四量体を作り分けるために、コアRzとP5abcモジュール間の相互作用界面の改変を試みた(図4)。界面を構成する主要な二つの相互作用であるGNRAループ/レセプター相互作用と四塩基の塩基対合に対し、それぞれ第二の相互作用ペアを準備すれば、コアRzとP5abcモジュール間に「2 ×

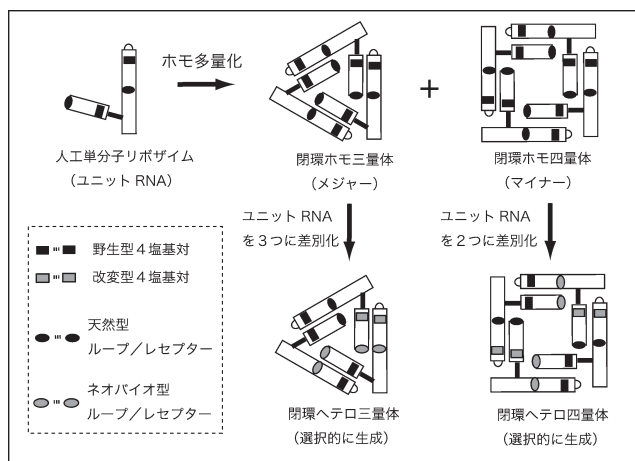


図4. 人工単分子リボザイムの多量化とその制御

2 = 4種類」の異なる認識特異性の相互作用界面を準備できる。ここで第二のGNRAループ/レセプター相互作用として、細胞内ではレセプターが未同定なGGAAループを認識する「ネオバイオ型」レセプター（図2）を用いた。

環状三量体に対して三つの相互作用界面を割り振りモノマーRNAを設計した。溶液中で会合させたところ、期待どおり三量体構造の高効率な生成が確認できた（図4）。選択的に環状4量体を生成する手法として、互いに直交性を示す2組の相互作用界面を用い2種のモノマーRNAをデザインした。二つのモノマーRNAが共存すれば交互に集積するため、環状化の際は偶数の多角形しか生成できない（図4）。2種のモノマーRNAを当量混合させると、ホモ多量化の場合とは異なりAFM観察では正方形の構造が多数観察されたが、三角形の構造は確認できなかった。以上の結果から、3種および2種の相互作用界面を利用すれば、環状3量体および環状4量体をそれぞれ選択的に形成できることが示された。コアRzの複雑な立体構造をさらに活用し、P5abcモジュールの挿入部位と相互作用界面の特異性を組み合わせれば、三角形や正方形以外の多角形、立体のRNA集積ナノ構造などの構築も可能であろう。

さらにコアRzとP5abcモジュールを分子集積のユニットとして用いることで、両モジュールの会合に依存してコアRzの酵素活性の制御も可能となる。適切な条件下では、コアRz単独では活性がほぼ完全に抑制されるのに対してP5abcモジュールが会合すると高い触媒活性が

誘導される。つまりグループIリボザイムを素材として、分子集積に連動して酵素活性が発現するナノRNA構造体を構築できる。筆者らは実際に多角形構造の形成に依存して基質RNA切断活性が誘導されることも確認した。

### おわりに

モジュール集積型RNA酵素を分割・再構成してRNAナノ集積構造を作成する場合、細胞内由来のRNA相互作用モチーフのみでは構造制御を可能とする分子認識の多様性を十分確保できない。進化分子工学によって創生されたネオバイオ型のGNRAループ/レセプター相互作用を駆逐することで、環状3量体と環状4量体をそれぞれ効率的に集積することが可能となった。現在のところグループIリボザイムを素材としてモジュール再構成を行なっているが、異なる酵素活性を持つリボザイムやアダプター分子を利用したヘテロ集積構造を構築できれば、集積に依存して複数の機能が連携して発現されるRNAナノ構造体も構築できる。ここで紹介したRNAナノ構造エンジニアリングのさらなる展開には、ネオバイオ型のRNA相互作用モチーフのコレクションを増大させると同時に、人工の塩基対や非リボース糖部分の利用など、進化分子工学を適応可能な非天然型核酸分子<sup>14)</sup>を組み込むことも、今後の魅力的な課題である。

### 文 献

- 1) Ellington, A. D. and Szostak, J. W.: *Nature*, **346**, 818 (1990).
- 2) Breaker, R. R. and Joyce, G. F.: *Chem. Biol.*, **1**, 223 (1994).
- 3) Winkler, W. *et al.*: *Nature*, **419**, 952 (2002).
- 4) Butcher, S. E. and Pyle, A. M.: *Acc. Chem. Res.*, **44**, 1302 (2011).
- 5) Ishikawa, J. *et al.*: *Methods*, **54**, 226 (2011).
- 6) Geary, C. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **36**, 1138 (2008).
- 7) Ishikawa, J. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3748 (2013).
- 8) Afonin, K. A. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **40**, 2168 (2012).
- 9) Rothmund, P. W. K.: *Nature*, **440**, 297 (2006).
- 10) Endo, M. *et al.*: *Chem. Eur. J.*, **20**, 15330 (2014).
- 11) Li, H. *et al.*: *Nano Today*, **10**, 631 (2015).
- 12) Geary, C. *et al.*: *Science*, **345**, 799 (2014).
- 13) Tanaka, T. *et al.*: *ChemBioChem*, published online, doi: 10.1002/cbic.201600190 (2016).
- 14) Pinheiro, V. B. and Holliger, P.: *Trends Biotechnol.*, **32**, 321 (2014).