

## 平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

◆ 記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		SUGA HIROAKI					
①研究代表者氏名		菅 裕明		②所属研究機関・部局・職		東京大学・先端科学技術研究センター・教授	
③研究課題名	和文	脂肪酸生合成リボザイムとRNA生命体の創成					
	英文	Ribozymes for fatty acid biosynthesis and generation of an RNA life form					
④研究経費		平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	平成20年度	総合計
18年度以降は内約額 金額単位：千円		19,800	16,600	16,600	16,600	16,600	86,200
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
菅 裕明	東京大学・先端科学技術研究センター・教授	生命化学・生物有機化学		研究代表者:本研究の総括運営責任者および研究協力者・学生の研究技術指導			
村上 裕	東京大学・先端科学技術研究センター・助手	生命化学・生物有機化学		研究分担者:セレクションシステムの構築と研究協力者・学生の研究技術指導			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>この研究申請書は、新規人工リボザイムを創製することで、生命と生体触媒の起源を実験的に検証する基礎研究を主目的とする。リボザイムとは、触媒活性をもつリボ核酸、すなわちRNA触媒のことである。リボザイムは、もともとRNA切断機能を持つ触媒（その多くは自己切断触媒）として生体内で1980年初頭に発見された。この発見により、それまで「触媒機能は蛋白質酵素特有」と考えられていた概念を覆すことになった。この発見はまた、それまで概念的にDNAと蛋白質に分離していた遺伝情報保持と触媒の両機能が、RNAという単一分子でまかなえることを示す結果となった。これにより、初期生命体がRNAにより構成されることで、「生命の起源」を説明できるかもしれないという大胆な仮説が立てられた。この仮説を「RNAワールドの仮説」と呼ぶ。では、RNAは本当に生命体を構成するための触媒機能を持ちうるのだろうか。この疑問はまた、RNAは蛋白質進化以前の触媒、すなわち、生体触媒の起源であるか否かの疑問とも言い換えられる。</p> <p>生命体を構成するためには、生命進化に必要な様々な反応に対応できる触媒機能をRNAが持つ必要がある。残念ながら、天然ではRNA切断作用を持つリボザイムしか発見されていない。このため、数十億年の蛋白質進化で淘汰されてしまったであろうRNAの触媒機能を実験的に検証する必要性があった。そこで、近年、そのようなリボザイムを人工的に進化させる試みがなされ、その触媒機能はRNA切断に限らないことが明らかとなった。しかし一方で、人工進化で単離されたリボザイムの大半は簡単なモデル反応を促進する自己修飾型触媒である。たとえば、アミノ酸、脂肪酸といった生命進化に必要な有機化合物の生合成機能を持ったリボザイムの例はなく、マルチターンオーバーをする触媒型リボザイムですら数例しかない。すなわち、RNAは簡単なモデル反応は触媒できても、生命進化に必要な困難かつ複雑な反応を触媒できる活性種の進化は起こりえない、という疑問は拭えない。この点は、これまでの実験結果の説得力に乏しい部分である。</p> <p>本研究では、有機化学的なアプローチを試験管内RNA分子進化法により積極的に取り入れることで、RNAが潜在的にもつ触媒能力を最大限に引き出すことに挑む。特に、実際に現存する触媒系に迫るリボザイムを人工進化させることで、RNA生命体の創成に一歩でも近づき、さらにはそれらリボザイムの工学的応用を探索する。</p>							

⑦これまでの研究経 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

本研究計画では、具体的な目標の一つとして、脂肪酸生合成リボザイムの創製を計画した。また、本研究の長期目標である RNA 生命体の創成とその技術的応用の一環として、上記の新規リボザイムの創製に加え、これまで研究代表者が継続しているアミノアシル化リボザイムの基盤研究も本研究計画内で推進してきた。

(1) 脂肪酸生合成リボザイムの創製

本研究計画では、脂肪酸生合成に必要な4つの酵素機能をもつリボザイムを創製する目標を立てた。具体的には、①チオラーゼリボザイム (Step1、活性種T)、②3-ケトアシル CoA 還元酵素リボザイム (Step2、活性種K)、③3-ヒドロキシアシル CoA デヒドラターゼリボザイム (Step3、活性種H)、④エノイル CoA 還元酵素リボザイム (Step4、活性種E) である (図1B)。

触媒機能を持つリボザイムの人工進化の成功の鍵を握るのは、綿密に計画された実験戦略である。すなわち、活性種を非活性種からいかに物理的に識別し、捕獲・分離するかが最も重要である。さらに、その手法はリスクが低く、できるだけシンプルであることが好ましい。①チオラーゼリボザイムの進化では、アセチルCoAに相当するアナログを化学合成し、それを5'末端にチオリン酸を有するRNAライブラリ (RNA(P)、Pはpoolの頭文字) と反応させ連結させる計画を立てた (図1A)。続いてアセチルCoAと反応させると (図1B、step1)、目的の縮合反応を触媒する活性種上だけに、β-ケトエステルが生成することになる。これをピオチンヒドラジドと反応させることで、β-ケト基を選択的にヒドラゾン化し、活性RNAをピオチンで標識する (図1b、ピオチン標識1)。まず図1aで示したアセチルCoAアナログを化学合成し、RNA(P)に反応させた。その結果、RNA(P)のチオリン酸がアセチルCoAのアセチル基を求核攻撃してしまい、一部アセチル基で修飾されたRNA(P)が生成することが確認された。そこで、アセチルCoAアナログのチオエステルをエステルに変更することで、この副反応を抑制し、目的のRNAライブラリの合成を達成した (図1A、変更を赤で表示)。さらにセレクション戦略の要となるβ-ケトエステルの選択的ピオチン化についても、生成物にあたるβ-ケトエステルをもったCoAアナログを合成しRNA(P)に連結し、その条件を検討した (図1B、ピオチン標識1)。その結果、NaCNBH<sub>3</sub>存在下でピオチンヒドラジドを反応させると、ほぼ定量的にピオチン標識が可能な条件を確立できた (図1B、変更を赤で表示)。この条件はそのまま実験計画②でも適用された。さらに、③と④の実験計画においても上記と同様の計画修正を適用させた上で、セレクション戦略の条件検討を図り (図1B、ピオチン標識2)、実際のリボザイム試験管内進化に向けた予備実験を平成16年度内に完了させた。結果としてマイナーな計画修正はあったものの、ほぼ計画通りの実験が進んだといえる。

平成17年度には、以上の予備実験を基に、セレクションを開始した。本計画では、①-④の全ての実験に対し、40塩基と70塩基のランダム配列からなる2つのRNAプールを作成し、実験に用いた。現在、試験管内進化実験が進行中で、結果として報告できるところまでには至っていない (試験管内進化実験の先天的特徴として、活性種が濃縮されて、同定されるまではその正否がはっきりしないためである)。しかし、実験が先行している①および②については、活性種の濃縮兆候が現れており、現在コントロール実験を含めて様々な確認を急いでいるところである。本研究では、目的のリボザイムが単離、機能解析を終えるまで論文作成はできないため、現在までにこの研究関連では論文投稿までは至っていない。

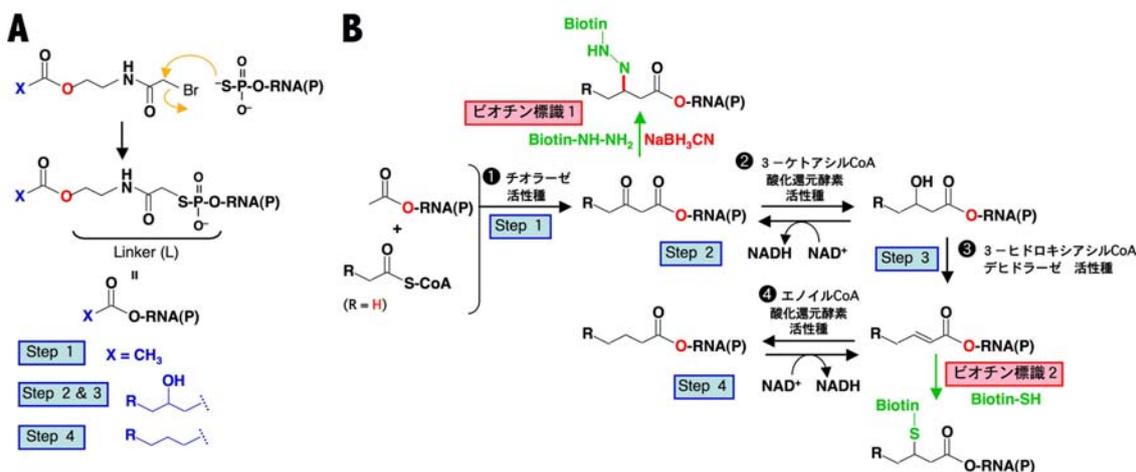


図1 脂肪酸生合成リボザイム：(a)人工進化実験戦略とこれまでの成果および修正（修正は赤字で表示）(b)推進している進化実験

(2) 多目的 tRNA アミノアシル化リボザイムの創製とその技術応用

研究代表者および分担者が、本研究が開始される以前から引き続き推進してきたアミノアシル化リボザイムの集大成ともいえるリボザイムが、本研究計画を通して完成した。本成果は既に論文としてまとめられ、Nature Methods 5月号に掲載が決定している。この新規リボザイムはその技術応用性が極めて高く、その詳細については「特記事項」にて記述する。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

上記の多目的 tRNA アミノアシル化リボザイムの創製の成功は、その技術的応用性の高さから、多くの学問的インパクトの高い基礎研究へと進展できる可能性が極めて高い。まず、フレキシザイムと命名されたこの人工リボザイムの特徴を説明したい。

フレキシザイムとは、菅らが開発した人工リボザイムであり、任意の tRNA に任意のアミノ酸 (天然、非天然に限らず) を、自在にアシル化できる RNA 触媒である (図2A)。このリボザイムは、完全なランダム配列の RNA から試験管内分子進化学の技術を駆使して単離され、さらにエンジニアリングを施した究極のリボザイムをフレキシザイムと名付けた。また、アガロース上に固定化したフレキシザイム (フレキシレジジン) は、20回以上再使用することが可能で、経済的にも優れている (図2A)。これらの技術を総称して、フレキシザイム技術と呼ぶ。このフレキシザイム技術の優位性を最大限に生かし、それを以下に述べる「遺伝暗号リプログラミング」の新概念と組み合わせることで、通常の翻訳系では合成困難な非天然型ペプチドの簡便な合成を可能にしている。

遺伝暗号のリプログラミングとは、既存コドンに対し天然アミノ酸の代わりに非天然型アミノ酸を人為的に割りあてることで、これにより複数種 (例えば、5種コドンボックスを非天然型アミノ酸に割りあて、残る15種のコドンボックスを天然アミノ酸に割りあてる: 図2C参考)、理論的には20種以上の非天然型アミノ酸を含むポリペプチドを翻訳系で合成可能となる。PURE system (大腸菌の翻訳系に存在する因子を精製して再構成した無細胞翻訳系) を通常の翻訳系として用いる場合は、翻訳に必要なリボソームや翻訳因子・酵素、さらに天然アミノ酸と tRNA を加える必要がある (図2B)。すなわち、これらのいずれかの構成要素、例えば天然アミノ酸を加えなければ、翻訳は通常通りには走らない。この特性を利用し、系内に限られた種類の天然アミノ酸のみを加える。これら添加されたアミノ酸に対応するコドンは翻訳で使われペプチドに組み込まれるが、逆に、加えなかったアミノ酸のコドンは使用されていないため「空きコドン」になったことになる (図2Cでは、黒字で示した Met, Gln, Lys, Glu のみを加え、グレー字で示したアミノ酸のコドンを「空きコドン」とした)。この「空きコドン」に対し、非天然型アミノ酸を対応させる。前述したように、フレキシザイムは様々な非天然型アミノ酸を任意の tRNA に対し自在にアシル化できる。したがって、この「空きコドン」に相補的なアンチコドンをもった tRNA にフレキシザイム技術を用いて非天然型アミノ酸をアシル化し、翻訳系内に添加すれば、mRNA 上の「空きコドン」は対応する非天然型アミノ酸としてペプチドに組み込まれる。

この技術によって合成される非天然型ペプチドの特筆すべき点は、以下の2点に集約される。⑦ペプチドに導入できる非天然型アミノ酸の種類、数は任意であり、またその制限も少ない。⑧合成される非天然型ペプチドの配列は、mRNA に暗号化されている (実際には DNA を加え、翻訳系内で転写を行っているため、DNA 上に暗号化されている)。これにより、その配列を必要に応じて PCR で増幅できる。またこれは、たとえ表現型である非天然型ペプチドの配列が既知でなくとも、その遺伝型である DNA から配列を読み取ることができることを意味する。

この遺伝暗号リプログラミングの応用として、非天然型ペプチド、もしくはそれをランダム配列にしたライブラリーの合成が考えられる。この技術を応用すれば、配列をデザインした、もしくはランダム化した mRNA を鋳型として、非天然型ペプチドもしくはライブラリーが簡便に翻訳合成できる。これまでのペプチド翻訳合成の概念を一新するばかりでなく、薬剤探索など様々な応用に繋がる可能性がある。これは、人工創製されたリボザイムの特徴を最大限に生かし、実用可能な新技術開発に至った例である。

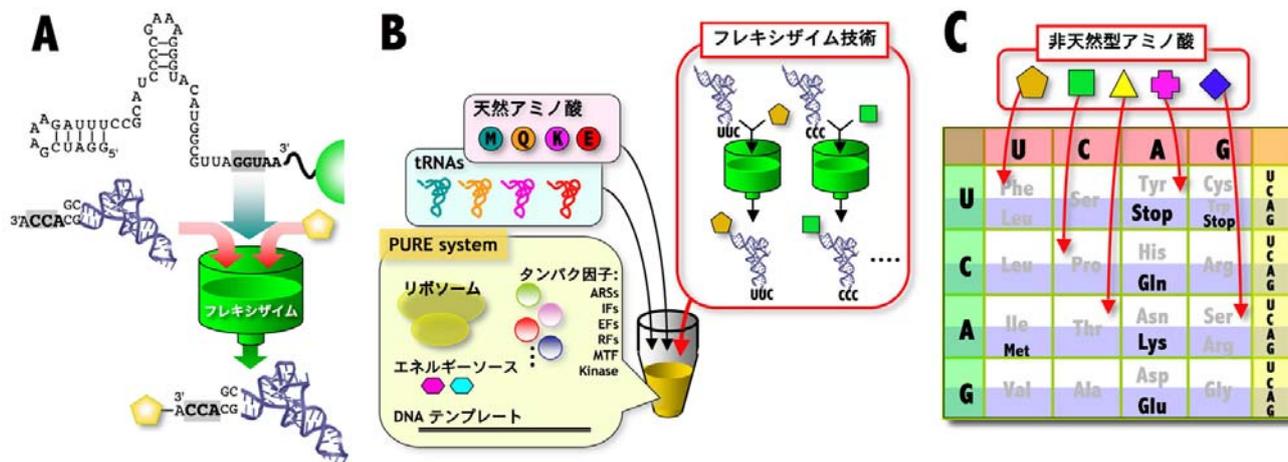


図2 アシル化リボザイムの技術応用: (A) 固定化フレキシザイム (B) PURE system とフレキシザイム技術の融合 (C) 遺伝暗号リプログラミング

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

学術誌発表論文

著者名	論文標題		
Hiroshi Murakami, Atsushi Ohta, Hiroshi Ashigai, <u>Hiroaki Suga</u>	A highly flexible tRNA acylation system for nonnatural polypeptide synthesis		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
○ Nature Methods	5月号掲載予定	2   0   0   6	In press

本論文は「特記事項」にて記した人工リボザイムの創製とその非天然型ペプチド合成への応用について報告した論文である。本論文は、tRNAアシル化リボザイムの集大成として位置づけられるばかりでなく、汎用性の高い技術として応用・実用化への大きな一歩である。特に「遺伝暗号リプログラミング」の概念を本技術と組み合わせることで、従来の煩雑な手法を簡潔な技術へと押し上げた論文として、査読レフェリーから高い評価を得た。

著者名	論文標題		
Dimitrios Kourouklis, Hiroshi Murakami, <u>Hiroaki Suga</u>	Programmable ribozymes for mischarging tRNA with nonnatural amino acids and their applications to translation		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
○ Methods	36(3)	2   0   0   5	239-244

本論文は、上記の集大成リボザイムの出発点となった旧リボザイムを用いて、蛋白質へフェニルアラニン類似体を位置特異的に導入する技術について、その方法論をまとめた論文である。

著者名	論文標題		
<u>菅 裕明</u>	人工リボザイムでRNAワールドの検証に挑む		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
○ 現代化学	6月号	2   0   0   5	44-50

このレビューでは、人工進化を駆使することでリボザイムを創製し、RNA生命体の存在を検証することの科学的重要性と面白さを説いた。特に、本研究課題に関連しているアシル化リボザイムとレドックスリボザイムについて解説を行っている。

著者名	論文標題		
木賀大輔、 <u>菅 裕明</u>	合成生物学・その概念と未来		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
バイオニクス・オーム社	3月号	2   0   0   6	28-33

著者名	論文標題		
村上 裕、 <u>菅 裕明</u> 、平尾一郎	セントラルドグマをつくりかえる		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
バイオニクス・オーム社	3月号	2   0   0   6	34-39

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

著者名	論文標題		
築地真也、菅 裕明、長棟輝行	細胞内情報をあやつる		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
バイオニクス・オーム社	3月号	2006	46-51

上記の連続3編の特集レビューでは、「合成生物学」という新領域・概念から、菅が中心となって4編のレビューからなる特集を組んだ。特に村上・菅・平尾が執筆した内容は、本研究計画に直接関連したトピックスを取り上げている。他の執筆内容も多かれ少なかれ、本研究に「合成生物学」という視点から関連がある。

国際会議・学会等における発表

平成16年度

2004 International Conference on Aminoacyl-tRNA Synthetases (Kim、濡木、横山、菅の共同オーガナイズ)：平成16年7月4～9日、韓国ソウル国立大学、講演タイトル「Aminoacyl-tRNA Synthetase Ribozymes: The Origin of Aminoacylation Catalysts」

北海道大学21世紀COE「ナノとバイオ」国際若手研究者ネットワークシンポジウム：平成16年8月26日、北海道大学、講演タイトル「Artificial Ribozymes」

米国ニューヨーク大学 (NYU)：平成16年9月24日、Department of Chemistryの講演依頼で渡米、講演タイトル「Artificial ribozymes for the genetic code reprogramming」

東北大学21世紀COE「大分子複雑系未踏化学」第2回シンポジウム：平成16年11月22～23日、東北大学、「Artificial Ribozymes: The Evolution Origin of Biological Catalysts and Applications to Biotechnology」

第28回日本分子生物学会、ワークショップ「RNA Biotechnology」（菅・井川の共同オーガナイズ、英語講演）：平成16年12月8日、神戸ポートピアホテル、講演タイトル「Artificial Ribozymes for the Genetic Code Reprogramming」

第1回 Japanese-German Frontier of Science (JSPS-フンボルト財団共催)：平成17年1月28～30日、独マインツ、講演タイトル「Artificial Ribozymes: The Evolution Origin of Biological Catalysts」

平成17年度

米国コロラド大学ボルダー校：平成17年4月20日、Department of Chemistry and Biochemistryでの講演依頼で渡米、講演タイトル「Artificial Ribozymes for the Genetic Code Reprogramming」

International Symposium of Origin of Life and Astrobiology 2005 (ISOLAB2005)：平成17年6月27日～7月7日、朱鷺メッセ 新潟コンヴェンションセンター、講演タイトル「Artificial Evolution of RNA Catalysts -Filling a gap between RNA world and the next world-」

Gordon Research Conference Combinatorial Chemistry：平成17年8月21～26日、米国 ProctorAcademy, Andover, New Hampshire、講演タイトル「Discovery of RNA Catalysts Using Artificial Evolution and Its Infinite Potential」

第28回日本分子生物学会、ワークショップ「機能性核酸のフロンティア」（菅・林の共同オーガナイズ）：平成17年12月8日、福岡ドーム・シーホークホテル、講演タイトル「機能性核酸のフロンティア」

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

第28回日本分子生物学会、ワークショップ「Synthetic Biology: 構成論的アプローチによる生体分子・システムの解析」（村上・斉藤の共同オーガナイズ）：平成17年12月10日、福岡ドーム・シーホークホテル、講演タイトル「人工リボザイムの進化と遺伝暗号改変への応用」（研究分担者・村上裕が講演）

PacifiChem 2005、シンポジウム「Functional Nucleic Acids」（Li、菅、杉本の共同オーガナイズ）：平成17年15～17日、米国ホノルル、ハワイ、講演タイトル「Artificial Ribozymes for the Genetic Code Reprogramming」

日本化学会第86回春期年会、産学連携BICSシンポジウム「生命化学と次世代技術は創薬、医療を変えられるか」（BICSと菅の共同オーガナイズ）：平成18年3月28日、日本大学理工学部船橋キャンパス、講演タイトル1「化学と生物学の接点から生まれる創薬戦略」（基調講演）、講演タイトル2「非天然型ペプチドライブラリーの翻訳合成・新創薬シーズ創製に向けて」