

脂肪酸生合成リボザイムとRNA生命体の創成

Generation of ribozymes that catalyze fatty acid biosynthesis

菅 裕明 (Hiroaki Suga)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授



研究の概要

本研究は、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複雑且つ洗練された人工リボザイムを創成することに挑んだ。具体的には、脂肪酸生合成に関わる酸化還元リボザイムと tRNA アシル化リボザイムの創製を試み、その応用としてそれらのリボザイムを用いて遺伝暗号リプログラミング技術を開発した。

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：リボザイム、RNA 触媒、分子進化、特殊ペプチド

1. 研究開始当初の背景

「RNA ワールド」の仮説が提唱され、既に20年以上の歴史があった。天然で見つかる RNA 酵素いわゆるリボザイムは、生命が誕生する程の多様性に富んだ触媒機能は発見されていない。それは進化によって、そういった機能が既に蛋白質酵素に置き換えられた、すなわち淘汰されたからかもしれない。そういった酵素を人工的に試験管内で進化することができるのであろうか？これが本研究の命題である。

2. 研究の目的

本研究は、試験管内 RNA 分子進化法を駆使し、複雑且つ洗練された人工リボザイムを創製することに挑んだ。具体的な目標として、脂肪酸合成に関わるリボザイムの創製および tRNA アシル化を触媒する実用的なリボザイムの創製を挙げた。さらに、後者のリボザイムについては、それを応用した遺伝暗号リプログラミング技術を開発することで、翻訳系を使った特殊ペプチドプログラム合成の達成を目指した。

3. 研究の方法

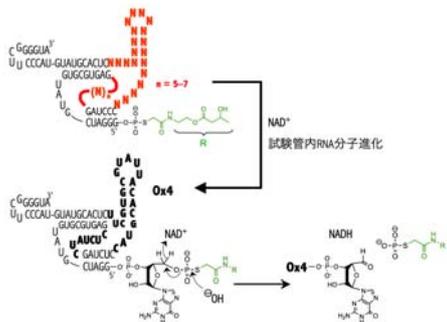
本研究では、研究組織を3グループに分けた。研究代表者の総括のもと、①脂肪酸合成リボザイム創製チーム、②フレキシザイム創製チーム、③遺伝暗号リプログラミングチームから構成させた。①脂肪酸合成リボザイム創製チームは、ランダム配列を有する RNA プールの5'末端にアセチル基あるいは3-ヒドロキシブチレート(以下3-HB)基を修飾し、それぞ

れアセチル CoA あるいは NDA+存在下、クライゼン縮合及び酸化反応を触媒する RNA 分子を試験管内分子進化法を用いて同定することを試みた。②フレキシザイム創製チームは、申請者らが既に創製したフレキシザイム、tRNA アシル化触媒、をさらに高機能化するための分子進化を推進した。③遺伝暗号リプログラミングチームは、フレキシザイムを用いて遺伝暗号を改変、その技術の応用として天然物ライクな特殊ペプチドの合成に挑んだ。

4. 研究の主な成果

①脂肪酸合成リボザイム創製：本来の計画では、脂肪酸生合成に関与する4種類のリボザイム創製を目指す計画であったが、精力的な実験検討を行ったにもかかわらず、残念ながらそのようなリボザイムの創製には至らなかった。しかし、その課程で5'末端のリン酸基を脱離しながらグアノシン5'位の酸化を NAD+依存的に行い、5'-アルデヒドに変換するリボザイム **0x4** (次ページ図) の創製に至った。これまで2段階反応の協奏的還元反応を触媒するリボザイムの単離は世界初で、その触媒機構は注目に値する。

②フレキシザイム創製：本研究では、現在までに創製されたフレキシザイムの機能の向上を目指し、2種類の新規フレキシザイム誘導体を創製した。以下限られたスペースで詳細を述べることはできないため、その機能のみを報告する。①低 Mg²⁺濃度で機能するフレキシザイム：既存の dFx に新たなアクセサリードメイン



を付加することで、翻訳系内の10mM程度のMg²⁺でもアシル化機能をもつフレキシザイムの創製に成功した。このフレキシザイムは無細胞翻訳系と共役させることで、翻訳系内で特殊アミノ酸をペプチド鎖に導入させることに成功した(論文作成中)。現在は、このフレキシザイムを細胞内で機能させるための研究を継続推進中。②高水溶性脱離基を有するアミノ酸基質に選択活性性をもつフレキシザイム：dFxおよびeFxはそれぞれ3,5-ジニトロベンジルアルコール基(DBE)および4-クロロベンジルチオール基(CBT)を認識し様々な側鎖を有するアミノ酸を高効率でtRNAにチャージする機能をもつが、唯一現在問題となっているのは、脂溶性の高い基質を用いた際に基質が反応水溶液に溶解せず、反応が進行しない場合である。そこで、脱離基に水溶性を高める官能基を導入した脱離基(ABT)をデザイン・合成し、dFxの誘導体aFxを創製した(論文掲載済み)。

③遺伝暗号リプログラミング

本研究は、フレキシザイムシステム(dFxとeFx)を駆使し、普遍遺伝暗号を初期化・改変(リプログラミング)する技術を開発、それを応用して様々な特殊ペプチドの翻訳合成法を開発した。本技術の特筆すべき点は、天然物として単離される非蛋白質製アミノ酸を含むペプチドの構造的特徴を抽出した特殊ペプチドをリプログラミングされた遺伝暗号に沿ってmRNA上の配列から合成できる点にある。本技術の開発に伴い、ペプチドの環状化を非還元結合で達成する技術やペプチド主鎖骨格にN-メチル基やアルキル基、さらには探索技術も含めた汎用性の高い技術も合わせて開発した。その成果として2007年12月~2009年4月のわずか1年半あまりで、18報に及ぶ原著論文を発表している(全ての論文で基盤Sへの謝辞あり)。この研究はさらなる応用面での進展が期待され、研究代表者の研究室で現在も継続して推進している。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

本成果で得られた技術は、世界の競合する同領域研究者の多くに認知されることとなった。特に、フレキシザイムを用いた遺伝暗号リプログラミング技術は、他の競合技術では達せし得なかった多くの特殊アミノ酸をペプチド鎖に組み込むことができ、世界の競合者からもその使用を依頼されている。この技術が大きなインパクトを与えたかを如実に物語る事実である。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

"Ribosomal synthesis of dehydrobutyrine- and methylanthionine-containing peptides" Y. Goto, K. Iwasaki, K. Torikai, H. Murakami and **H. Suga***, *Chemical Communication*, in press (2009).

"A flexizyme that selectively charges amino acids activated with a water-friendly leaving group" N. Niwa, Y. Yamagishi, H. Murakami, **H. Suga***, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letter*, in press (2009).

"Translation initiation with initiator tRNA charged with exotic peptides" Y. Goto, **H. Suga***, *Journal of American Chemical Society* 131, 5040-5041 (2009).

"Bases in the anticodons loop of tRNA^{Ala}_{GCC} prevent misreading" H. Murakami, A. Ohta, **H. Suga***, *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 353-358 (2009).

"Ribosomal synthesis of polypeptoids and peptoid-peptide hybrids" T. Kawakami, H. Murakami, **H. Suga*** *Journal of American Chemical Society* 130, 16861-16863 (2008).

"Combinatorial lysine modifications of histone H3 tails under the reprogrammed genetic code suggest crosstalk between epigenetic markers upon HP1 chromo domain binding" T.-J. Kang, S. Yuzawa, **H. Suga*** *Chemistry & Biology* 15, 1166-1174 (2008).

"Polymerization of α -hydroxy acids by ribosomes" A. Ohta, H. Murakami, **H. Suga*** *ChemBioChem* in press (2008).

"Structural basis of specific tRNA aminoacylation by a small in vitro selected ribozyme" H. Xiao, H. Murakami, **H. Suga**, A. R. Ferre-D'Amare* *Nature* 454, 358-361 (2008).

"Ribosomal synthesis of bicyclic peptides with two orthogonal inter-sidechain reactions" Y. Sako, J. Morimoto, H. Murakami, **H. Suga*** *Journal of American Chemical Society* 130, 7932-7934 (2008).

ホームページ

<http://www.cbl.rcast.u-tokyo.ac.jp/>