

論文の内容の要旨

論文題名 タンパク質間相互作用を制御する核酸分子および非天然型塩基をもつ核酸分子の創製

氏名 平尾（木本） 路子

遺伝情報分子である核酸は、生体内で遺伝情報を塩基配列の形で記録するだけでなく、核酸・核酸間、ならびに、核酸・タンパク質間相互作用を介して遺伝情報を複製・伝達することができる。また、核酸は二本鎖構造以外にも多様な高次構造を形成して、生体分子を特異的に認識する機能や核酸分子の切断反応・連結反応等を触媒する酵素としての機能も発揮する。近年確立された *in vitro* セレクション法により、新しい機能をもつ核酸分子がこれまでも多数報告され、人工的に得られた核酸分子を生体分子間相互作用の人為的制御分子として活用することも可能となってきた。

その制御の対象となる相互作用の一つに、細胞情報伝達におけるタンパク質間相互作用がある。数多くのタンパク質間相互作用によって統合された細胞情報伝達経路において、特定の相互作用のみを人為的に制御することは、特定経路の役割解明につながり、非常に入り組んだ複雑な伝達機構を理解するのに役立つ。そこで本研究では、タンパク質間相互作用を制御する新規核酸分子の創製を目的とし、細胞の増殖・分化を制御する分子スイッチとして機能している Ras タンパク質とその標的タンパク質の一つである Raf-1 キナーゼの相互作用を制御する新規 RNA 分子の創製に取り組んだ(第1部)。

一方、核酸分子による遺伝情報の複製・伝達を可能としているのは、排他的な塩基対形成(A・T/U, C・G)のルールであり、「遺伝情報分子」としての特性の多くは塩基の性質に起因している。しかし、20種類のアミノ酸からなるタンパク質に比べて、天然の核酸には4種類の塩基(2種類の塩基対)しかないという事実は、

核酸分子の化学的・物理的多様性に限界を与えている。もし、既存の塩基対に加えて新たな非天然型塩基対が創製できれば、複製・転写・翻訳のすべての過程における遺伝情報の拡張に直接つながり、また、新規機能性核酸分子の開発への道も開ける。さらに、核酸合成酵素による非天然型塩基対の核酸分子への導入の解析は、今まで天然型塩基だけではわからなかった核酸合成酵素の基質認識機構や核酸合成の機構に関する新たな知見を得ることも可能とする。そこで本研究では、非天然型塩基が位置選択的に導入された核酸分子の創製を目的とし、既存の塩基対に加えて新たな人工塩基対を組み込み、核酸合成酵素を用いて非天然型塩基を核酸分子へ導入する手法の開発を行った(第II部)。

第I部 タンパク質間相互作用を制御する核酸分子の創製

細胞情報伝達における Raf-1・Ras 相互作用を選択的に制御する新規 RNA 分子を創製するため、*in vitro* セレクション法により Raf-1 の Ras 結合ドメイン(RBD)に特異的に結合する RNA(アプタマー)を単離した。60 残基のランダム配列を含む RNA プールから得られたアプタマーは、Raf-1 RBD と Ras の相互作用を阻害することがわかり、ターゲットとして Raf-1 RBD を用いた本手法が妥当であることが示された。しかし、このアプタマーの阻害能は弱く、Ras に対して大過剰の RNA が阻害に必要となった。そこでセレクション法を一部改良し、新たにデザインした 45 残基のランダム配列を含む RNA プールから、さらに阻害能の高い二種類のアプタマー(9A, 9B)が得られた(図 1)。阻害能の高かった 9A は、Ras および Raf-1 を発現させた Sf9 細胞の膜画分および HEK293 細胞の細胞質画分を用いた無細胞系で、Ras による Raf-1 の活性化を強く阻害し(図 2)、人為的制御分子として機能することがわかった。

また、9A は、Raf-1 のアイソザイムである B-Raf の RBD に結合するにも関わらず、B-Raf RBD と Ras の相互作用は阻害せず、Raf-1・Ras 相互作用に対する阻害が特異的であることがわかった(図 1)。そして、RNase による限定分解と化学修飾による RNA の二次構造解析と 9A を切り詰めた RNA バリエーションでの解析結果から、9A はシュドノット構造を形成することが示唆された(図 3)。また、化学修飾を用いたフットプリント法により Raf-1 RBD と相互作用する 9A の領域を調べた結果、特定のループ部分が Raf-1 RBD との結合表面に位置することが示唆された(図 3)。

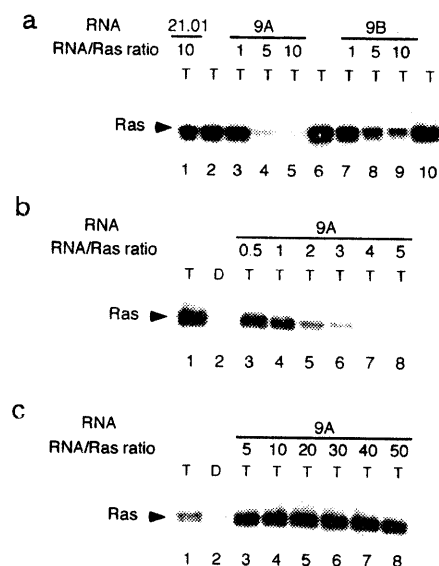


図 1. Raf-1 RBD(aとb)または B-Raf RBD(c)と Rasの結合に対する各アプタマーの阻害効果。

樹脂に固定化したGST-RBDに、Rasと種々の濃度のRNAを混合し、RBDと結合して樹脂と共沈したRasを抗Ras抗体で検出した。21.01は60残基のランダム配列を含むRNAプールから、9Aと9Bは45残基のランダム配列を含むRNAプールから、それぞれ単離されたアプタマー。

T: GTP γ S結合型Ras, D:GDP結合型Ras.

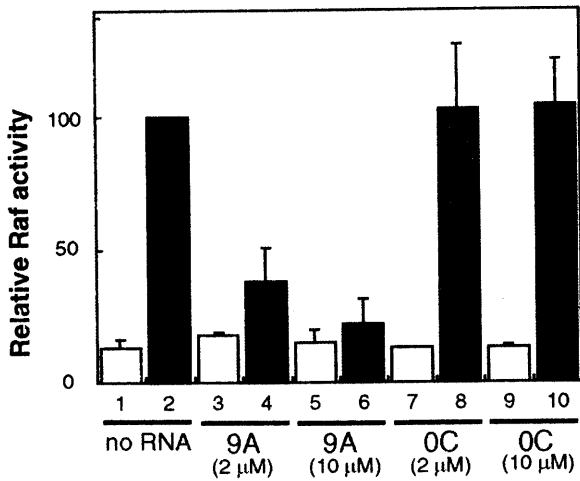


図2. 無細胞系でのRasによるRaf-1活性化はアプタマーの存在下で阻害される。

OC: Raf-1RBDに結合しないRNA(コントロール)

白棒: Raf-1を発現させたHEK293細胞の細胞質画分のみの場合。
 黒棒: Raf-1を発現させたHEK293細胞の細胞質画分とRasを発現させたSf9細胞の膜画分をインキュベートした場合。

第II部 非天然型塩基をもつ核酸分子の創製

天然型塩基のAとT, GとCは水素結合を介して互いに排他的な塩基対を形成する。この水素結合が塩基対に重要であることは、これまで当然のように思われていた。ところが、水素結合をなくした疎水性塩基対が大腸菌由来DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメント(KF)によってDNA中に取り込まれることが、最近アメリカのグループから報告された。そこで本研究では、新しい塩基対をデザインするための基礎となる概念をつくるために、まず最初に、核酸合成酵素の取り込みにおける塩基対間の水素結合の重要性を調べた。非天然型塩基 6-メトキシプリン(M), シュードイソシトシン(PIC), 2-アミノプリン(AP)と天然型塩基の組み合わせによる、いろいろな数の水素結合をもつ人工塩基対を用いて、KFによる取り込み反応の速度論的解析を行った。その結果、水素結合の数が多いほど人工塩基対の取り込み効率が高いこと、しかし、対合する塩基同士の形が完全にフィットした(シェイプフィッティングした)場合には、水素結合の数が一つぐらい違うだけでは取り込み効率の差が小さいことがわかった。この結果は、水素結合が塩基対形成に重要であるが、水素結合の数の違いだけで塩基対に選択性を持たせることは難しいことを示していた。

そこで、天然型塩基対と異なる水素結合様式をもち、さらに立体障害によって天然型塩基との対合を排除できるような塩基対を創出することにした。そして、プリンの6位にかさ高い置換基を導入した2-アミノ-6-ジメチルアミノプリン(x)と2-アミノ-6-チエニルプリン(s), そしてそのかさ高い置換基に相補する部位に水素原子をもったピリドン-2-オン(y)をデザインし(図4), このx・y, s・y塩基対形成をKFによるDNA中への取り込み効率により調べた。その結果、鋳型中のxに対するyの取り込みは低い選択性しか示さなかったが、sに対するyの取り込みの選択性は高く、効率も良いことがわかった。

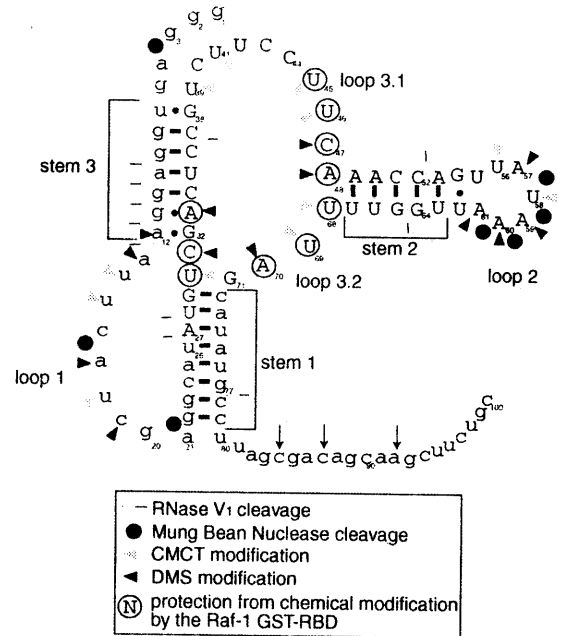


図3. RNA 9Aの二次構造予測。

45残基のランダム配列部分を大文字で示した。81-100残基部分を削ったRNAバリエーションでも、RBDに結合して、Ras・Raf相互作用を阻害する。非天然型塩基5lyの導入部位とした部分を矢印(↓)で示した。

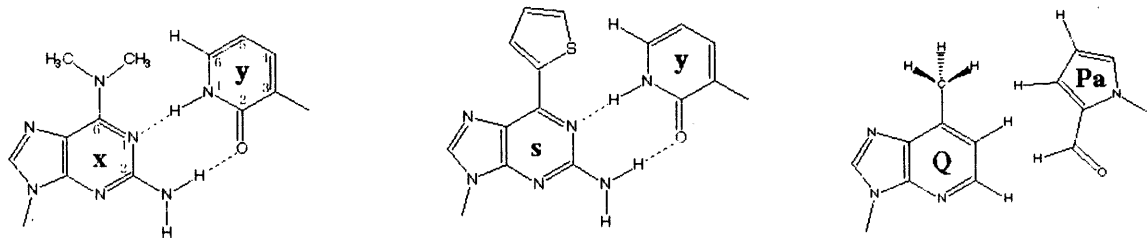


図4. 非天然型塩基対: $x \cdot y$ と $s \cdot y$ と $Q \cdot Pa$

また RNA 転写においては, x や s を含む DNA を鋳型として T7RNA ポリメラーゼを用いた転写反応により, y を高い選択性で位置選択的に導入できることが示された. そこで本研究では, $s \cdot y$ 塩基対を用いて, 5 位に置換基を導入した y の誘導体を RNA 中に位置選択的に導入し, 新たな機能をもつ RNA の創製に取り組んだ. 5 位にヨウ素原子をもつ 5-ヨード-ピリドン-2-オン(5ly)は, ハロゲン置換基をもつピリミジン誘導体と同様の光反応性が期待され, RNA 間相互作用, タンパク質・RNA 間相互作用の解析等に有用であると考えられる. そこで, 本研究で単離された anti-(Raf-1)アプタマー(RNA9A)に 5ly を位置選択的に導入して, ターゲットタンパク質(Raf-1 RBD)の存在下で架橋反応を行い, この非天然型塩基の有用性を調べた. RNA9A 中の 5ly の導入部位として, RNA の高次構造の変化やピリミジンダイマー等の形成を出来る限り避けるため, RBD との相互作用に重要でないといわれている 3'末端側の領域のうち, プリン塩基に挟まれた C84, C87, A92 を選んだ(図 3). そして, それぞれの位置に 5ly が選択的に導入された各 RNA と N 末端に GST を融合させた Raf-1 RBD (GST-RBD)の存在下で光照射による架橋反応を行った. その結果, 84 又は 87 残基に 5ly を含む RNA は, 架橋反応により RNA 同士の二量体を形成することがわかった. GST タンパク質は溶液中で二量体を形成することから, GST-RBD も溶液中で二量体を形成し, RNA 9A が Raf-1 RBD に結合して 5ly を含む配列部分がうまく近接したときに, RNA 分子間の架橋反応が進行したと考えられる. この結果は, 5ly が RNA 間相互作用の解析に利用できることを示唆している.

さらに本研究では, 水素結合をもたない A の類似体である疎水性塩基, 9-メチル-1-H イミダゾ[(4,5-b)ピリジン(Q)に対して, 塩基の形をフィットさせた 5 員環のピロール-2-アルデヒド(Pa)をデザインした(図 4). そして, ピリミジンのケト基の代わりにアルデヒド基を持った塩基 Pa と Q の非天然型塩基対が, KF 及び AMV 逆転写合成酵素によって認識されて DNA 中に取り込まれるかを調べた. その結果, 鋳型中の Q に対して Pa が, また逆に鋳型中の Pa に対して Q が, それぞれ相補的に効率よく取り込まれることがわかった. そして, $Q \cdot Pa$ 塩基対が形成されて取り込まれた後も, 効率よく伸長反応が進行することが明らかとなった. この結果から, Pa が酵素との相互作用に必要な要素やシェイプフィッティングの要素を満たしていることや疎水性の 5 員環の塩基も酵素の基質となることがわかり, 今後の新規塩基対開発に有用な知見を得ることができた.