

論文の内容の要旨

論文題目 RNA ポリメラーゼの転写活性を制御する RNA デバイス の開発と応用

氏 名 森 祐介

【背景・目的】

自然界において、細胞内・細胞間現象は、DNA 配列や転写装置、翻訳装置等の核酸性及びタンパク性因子といった生体分子の相互作用によって規定されており、それらは生体分子で構成された回路とみなすことができる。他方、2000 年頃から生体分子を新規に設計したり組み合わせたりして、生命現象を再現し、その理解を深めることや、人間にとって有用な機能を持つ生体システムを創出することを狙いとした、人工的な遺伝子回路の構築と解析が盛んになさるようになってきた。しかしながら、回路を構成する生体分子は、主に既知のタンパク性転写因子とその調節配列に限られており、回路を構成する因子のバラエティー不足がこれまで指摘されてきた。こうした問題の解決のため、近年自然界において幅広く遺伝子発現に関与することが知られるようになり、人工的な制御系にも応用される RNA を回路の構成因子として用いる試みがなされている。タンパク質による遺伝子発現制御に対し、RNA による制御には翻訳反応が不必要であるため、迅速な制御が期待できるという利点がある。さらに、アンチセンス RNA により人工 RNA の活性を打ち消すことができうる点も優れた特徴である。また RNA は、二次構造予測が可能であることや、予測に基づいた改変が比較的容易であることに加え、簡便に調製できることから、制御因子開発における素材として適していると言えよう。

本研究では、遺伝子発現を制御する人工的な RNA を創製し、人工遺伝子回路の構成因子に資する、発現制御のツールの開発を目的とする。制御の標的として、生化学的・構造学的な解析が詳細になされ、基礎研究から応用まで幅広く利用されている T7 RNA ポリメラーゼ (RNAP) と、

その類似の酵素である SP6 RNAP に着目し、これらの転写活性を制御する RNA デバイスの開発を試みた。

RNA デバイスの開発に際しては、まず、試験管内分子進化法によって RNAP に対し、高い特異性と親和性を持って結合する RNA アプタマーを人工的に取得して、この中から RNAP に対して転写阻害能を示す RNA のスクリーニングを行った。RNAP の転写活性を阻害する RNA アプタマーと、それと二本鎖を形成してアプタマーの阻害能を解除するアンチセンス RNA を組み合わせることで、転写反応の負の制御やその解除が可能な RNA デバイスを構築することが可能であり、本 RNA デバイスは人工遺伝子発現システムの新たな制御因子として非常に有用であると考えられる。

【方法・結果】

1) 抗T7 RNAPアプタマーの取得と解析

T7 RNAP の転写反応を阻害する RNA アプタマーを取得するために、T7 RNAP を標的として SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) 法を実施した。T7 RNAP を用いた *in vitro* 転写反応系を用いて、転写阻害能を持つ RNA アプタマーのスクリーニングを行った結果、阻害能を有する RNA アプタマーが 4 クローン得られた。これらは SP6 RNAP の転写活性は阻害せず、T7 RNAP を得意的に阻害した。このうち、最も高い活性を示した T06 (71 mer) を以降の解析に用いた。T06 の阻害能及び T7 RNAP に対する結合親和性を評価したところ、半数阻害濃度 (IC50) は 9.2 ± 3.8 nM、解離定数 (Kd) は 12.7 ± 2.0 nM であった。

アプタマーの阻害能に重要な領域を特定するため、両末端から塩基を欠損させた短小化変異体を作製、解析した。その結果、T06 の 5' 側から 23 塩基、3' 側から 10 塩基欠損させた T06-Mini (38 mer) が T06 と同程度の阻害能を示し、アプタマーの機能に十分な領域であることが明らかとなった。さらに、T06-Mini の阻害能に特に重要な塩基配列と、構造に関する知見を得るため、T06-Mini の配列を基に変異導入した RNA プールを出発点として、再度 SELEX (変異導入 SELEX) を実施し、変異体の取得を試みた。その結果、T06-Mini と同程度の阻害能を示す変異体が多数得られ、二次構造の解明には至らなかったものの、これらの配列の比較解析により、阻害能に重要な塩基が明らかとなった。

T06 の阻害機序を明らかにするため、プルダウンアッセイと転写ストールアッセイを行い、「プロモーターの認識」と「伸長」の段階がアプタマーの作用を受けるかを検証した。

まず、プルダウンアッセイにより、T06 が T7 RNAP による T7 プロモーターの認識の段階に与える影響を評価した結果、T06 存在下では、非存在下と比較して、T7 RNAP に結合した T7 プロモーター量が減少した。このことから、T06 は T7 RNAP と T7 プロモーターとの結合を競合的に阻害することが示された。

次に、T06 が転写伸長段階の T7 RNAP に与える影響を評価した。ここでは内部に T ストレッチを含む DNA を鋳型とし、UTP を抜いて転写を開始すると途中で転写がストールするが、UTP の添加により転写が再開し、全長の転写産物が合成される。UTP の添加前に T06 を加え、その後の転写伸長が阻害されるかどうかを検証した。その結果、T06 の有無で転写産物の長さや合成量に差は認められず、T06 は伸長段階には作用しないことが示唆された。

2) 抗SP6 RNAPアプタマーの取得と解析

SP6 RNAP の転写反応を阻害する RNA アプタマーを取得するため、SP6 RNAP を標的とした SELEX 法を実施し、スクリーニングを行った。その結果、SP6 RNAP 特異的に転写活性を阻害する RNA アプタマーが 4 クローン取得された。このうち最も強い転写阻害能を示した S05 (69 mer) の IC₅₀ は 2.3±0.7 nM、S05 と SP6 RNAP との K_d は 3.2±0.5 nM であった。

S05 の二次構造を予測すると、5' 端と 3' 端でステム (ステム 1) を、3' 側でステムループ (ステム 2、ループ 2) を形成し、二つのステムに挟まれた大きなループ構造 (ループ 1) を有することが示唆された。阻害能に寄与する構造を同定するため、塩基対形成は維持されるようにステム 1 あるいはステム 2 の塩基を置換した変異体と、ループ 2 の塩基を置換した変異体を作製し、解析したところ、いずれも阻害能を維持していた。他方、ステム 1 あるいはステム 2 が破壊される変異体では阻害能が完全に、または一部失われた。これらの結果から、ステム 1 及びステム 2 の存在が、阻害能に重要であること、ループ 2 の配列や長さは阻害能にほぼ影響を及ぼさないことが示唆された。さらに、変異導入 SELEX を実施し変異体の取得を試みた結果、S05 と同程度の阻害能を示す変異体が 29 クローン得られた。これらの配列を比較解析すると、保存された塩基が 37 塩基存在し、ループ 1、ステム 1、ステム 2 を構成する塩基に多く位置していたことから、ループ 1 に含まれる塩基配列や、ステム 1 とステム 2 がステム構造を形成することが、阻害能に重要であることが示唆された。

3) フィードバック回路の構築

RNAP の転写活性を阻害する RNA アプタマーとアンチセンス RNA を組み合わせ、転写反応の負の制御やその解除が可能な RNA デバイスを構築することを試みた。まず、アンチセンス RNA のアプタマーへの影響を検証した結果、T06、S05 いずれもアンチセンス RNA の共存下では、アプタマーの阻害能が打ち消されることが確認された。

続いて、T06 やアンチセンス RNA (antiT06) を用いてフィードバック回路を構築し、これらが人工的な遺伝子回路の構成因子として応用可能であるか検証を行った。まずは、T7 RNAP と T7 プロモーター制御化の T06 DNA を組み合わせ、ネガティブフィードバック回路の構築を試みた。この回路では、T7 RNAP で T06 を合成し、生じた T06 によって次第に T7 RNAP による転写が阻害されることを見込んだ。実験の結果、反応開始直後から転写速度の減少が認められ、RNA の生化学的性質に基づいて実施したシミュレーションの結果と概ね一致した。次に、T7 RNAP と T06、T7 プロモーター制御下の antiT06 を組み合わせ、ポジティブフィードバック回路の構築を試みた。この回路は、反応開始前にあらかじめ適量の T06 を存在させた状態で、T7 RNAP によって antiT06 を合成させ、生じた antiT06 と T06 が二本鎖を形成することで遊離の T7 RNAP が増加し、次第に転写量が増大していくというものである。実験の結果、反応時間に伴って転写速度が増大していった。

【結論・展望】

本研究では、遺伝子発現を制御する RNA に着目し、*in vitro* ならびに *in vivo* において、遺伝

子発現システムに広く用いられる T7 RNAP あるいは SP6 RNAP の活性を阻害する RNA アプターを取得した。合成生物学の分野において、T7 RNAP 及び SP6 RNAP は人工的な遺伝子回路の構成因子として重要視されている転写酵素である。また、RNA を遺伝子発現制御因子として用いることの有用性から、近年、人工的な RNA を回路・カスケードに応用する例は増加傾向にある。しかしながら、実際に制御因子として用いることのできる RNA 分子種は非常に限られており、今後の開発が望まれているところである。今回開発された RNA デバイスは、簡単なフィードバック回路にも適用できたことから、人工的な遺伝子回路に新たな制御機構を付加するのに有用なツールとして強く期待される。