

RNA WORLD TECHNOLOGY: ARTIFICIAL RNA INHIBITORS AGAINST A HIGHLY ACTIVE PROTEASE

Yo Kikuchi

Division of Bioscience and Biotechnology, Department of Ecological Engineering, Toyohashi
University of Technology, Tempaku-cho, Toyohashi, Aichi 441-8580, Japan

E-mail: kikuchi@eco.tut.ac.jp

(Received October 7, 2006 Accepted October 13, 2006)

Abstract

Here, I would like to propose the term "RNA world technology". The RNA world is a hypothetical world that is believed to have been in a period of pre-biotic state. If this is true, the RNA should have various functions to lead the system in the creation of life. In the RNA world, RNAs expressed great versatility. However, not all these functions were brought into modern life. It may be impossible to find out such RNA potential from the modern organisms. "RNA world technology" is the technology that revives and utilizes the RNA functions those might have worked only in the RNA world. Therefore, RNA world technology is distinguished from usual biotechnology. In vitro selection or SELEX is an RNA world technology. Here I show our in vitro selection of subtilisin aptamer (inhibitor) as an example for RNA world technology. Versatility and plasticity of RNAs can be seen from this example. Expectation of "super SELEX" and definition of the term "RNA world" are also discussed.

Keyword:

RNA world; RNA world technology; in vitro selection; SELEX; subtilisin; non-coding RNA

ミニレビュー

RNA ワールドテクノロジー：強力プロテアーゼ阻害剤の創製を一例として

菊池 洋

豊橋技術科学大学 エコロジー工学系 生物基礎工学

〒441-8580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1

E-mail: kikuchi@eco.tut.ac.jp

1. はじめに—RNA ワールドのこと

2006 年は、「RNA ワールド」という言葉ができて丁度 20 年目に当たる。Cech らが、RNA の触媒的機能を発見し[1]、それがほとんどの科学者に十分認められてきた 1986 年、Gilbert は、生命の始まりは RNA であったという短い論説を Nature に発表し、そのタイトルが「Origin of life: The RNA world」であった[2]。それまで、生命の起原の最も悩ましい問題、「情報が先か機能が先か」、現在の生命を基にした物質的基盤に立てば、「核酸が先かタンパク質が先か」という「鶏と卵」の問題に、RNA が情報分子であり機能分子でもあるという実験的事実をもとに、「始めに RNA ありき」という説を提唱したのである。RNA のみで切れたりつながったり複製したりする世界が生命の起原の最初にあり、それから RNA がアミノ酸をリクルートし次のステップである「タンパク質—RNA ワールド」作ったというのである。生命のシステムは核酸とタンパク質の長い時間の相互作用から生まれてきたというそれまでのあまりすっきりしない説と較べると、「RNA ワールド仮説」は、いかにも起こりそうで、RNA

の触媒機能という新事実から多くの支持を得るものとなった。最初の RNA はどのようにして生成されたのかという大問題はあるものの、何よりも、RNA から生命への進化のシナリオの素過程が実証されるように作業仮説を立てられることが魅力的であった。

RNA ワールドという言葉は、Gilbert により 1986 年に初めて提唱されたが、実は、この概念は、すでに、1968 年、Orgel と Crick が遺伝暗号の起原についての論説の中で述べている[3,4]。彼らは、RNA のみからなる原始リボソームを想定し、最初のタンパク質は、このリボソームで合成されたのではないかということを書いて記している。今にして思えば、この時代に RNA の触媒機能を示唆するこの仮説を提出した彼らの洞察力に舌をまくばかりだが、当時は、魅力的ではあったものの多くの仮説の一つに過ぎないと見られていた。1980 年代初頭の Cech らの RNA の触媒的機能の発見により、この論説は脚光を浴び「RNA ワールド」という新語を生み出すことにつながったとすることができる。

2. RNA ワールドテクノロジーとは何か

さて、「RNA ワールド」についての説明が長くなったが、本稿の表題の「RNA ワールドテクノロジー」とは何だろう。簡単に言えば、RNA ワールド時代にあったであろう RNA の機能を何とか引っ張り出して、役に立つ技術を作れないかということである。RNA が進化して生命ができて上がったとすれば、RNA ワールド時代の RNA は、多様な機能をもっていたと考えられる。その中から、現在の生命につながる（都合の良かった）RNA の機能のみが選択されたと考えられる。と言うことは、多くの捨て去られた RNA の機能があったのではないかと推測できる。現代の生命にはつながらなかったが、現代の我々が見たら様々な場面で応用可能な機能があったと考えてもおかしくはないであろう。このような RNA の機能は、生命へと続く進化の中で捨て去られたので、現代の生物の中を探してもみつからない。この RNA テクノロジーは、現代の生物機能を利用しようとする「バイオテクノロジー」の範疇には入らないので、筆者は、新たに「RNA ワールドテクノロジー」と呼びたいわけである。

3. 現細胞にはない RNA 型サチライシン阻害剤の創製

1990年に発表された *in vitro* selection[5] や SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) [6]と 言われる手法でアプタマーなどを取ることは、立派な「RNA ワールドテクノロジー」である。ここでは、筆者らの研究室で取られたサチライシンアプタマーについて紹介したい [7]。サチライシンは枯草菌の生産する菌体外プロテアーゼである [8,9]。工業的にもよく利用されており、洗剤などの洗浄力強化にも利用されているように、その酵素活性と安定性は、非常に高い。このような強力プロテアーゼに立ち向かい活性を阻害するような能力がか弱く見える RNA にあるのだろうか。このような単純な疑問からサチライシンアプタマーの創製を試みた。

SELEX を始めるには、まずランダム配列をもつ核酸集団の調製をしなければならない。筆者らは、Figure 1 に示すように、まず R-

5、R-100、R-3 と名付けた 3 種の DNA を DNA 合成機により合成した。R-100 は、3'側 (Figure 1 の左側) から 17 塩基の T7 プロモーター配列、18 塩基の既知配列 (5'-known sequence = 5'KS)、47 塩基のランダム配列、5'末端に 18 塩基の既知配列 (3'-known sequence = 3'KS) をもち、100 塩基の長さである。R-100 の 3'側を 5'KS、5'側を 3'KS と呼ぶのは、R-100 を鋳型としてできる RNA を中心に考えているからである (Figure 1 の RNA sequence 参照)。この R-100 に R-5 をハイブリダイズさせ、T7 プロモーターと 5'KS 部分を二重鎖とした。これにより、この部分が T7 RNA ポリメラーゼで認識され、試験管内転写によりランダム配列をもつ RNA の集団を合成できる。合成される RNA は、5'GGGCGAAUUU...

(5'KS) から始まり、5'KS-ランダム-3'KS という配列をもつはずである (Figure 1 の RNA sequence)。筆者らの使った DNA 量から、この集団には 1 兆種類の異なった RNA 分子が存在すると計算される。このランダム配列 (1 兆種類) の中にサチライシンに結合する能力をもつものが存在することを期待しているわけである。次に Figure 2 に示すように、この RNA 集団をサチライシンを固定化したカラムに流し入れる。その後カラムを緩衝液により徹底的に洗浄しサチライシンに結合能力のない RNA を洗い流す。結合能力をもつ RNA は、カラムに留まっており、それはサチライシン溶液にて溶出する。固定化サチライシンよりも溶液中のサチライシンのほうにより高い親和性を有する RNA があれば、溶出されてくるはずである。ここに溶出された RNA は 3'KS に相補的なオリゴ DNA (Figure 1 の R-3) をプライマーとして逆転写酵素 (Reverse transcriptase = RT) により、まず一本鎖 DNA に変換され、さらに T7 プロモーター-5'KS という配列をもつオリゴ DNA (Figure 1 の R-5) を加え、ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction = PCR) (両方あわせて RT-PCR という) により二本鎖 DNA として増幅される。この DNA は次の世代の RNA のための鋳型となる。そして、一回目と同様に試験管

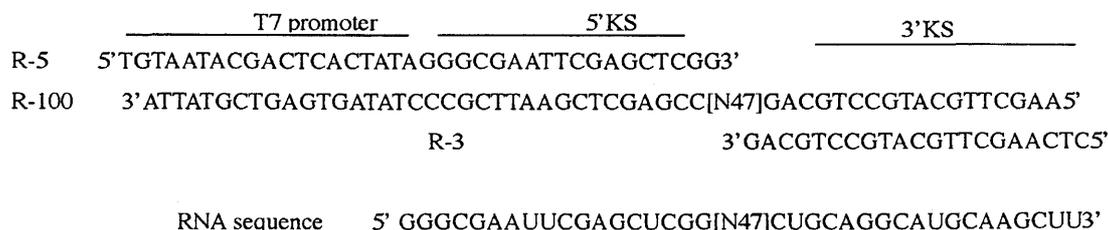


Figure 1. The template DNA for the preparation of the initial random RNA population and the primer DNAs. Partially double-stranded DNA consisting of R-5 and R-100 was used as template for preparation of the initial random RNA population using T7 RNA polymerase. The synthesized RNAs are shown at the bottom (RNA sequence). Selected RNAs were reverse-transcribed using R-3 as a primer, then the cDNAs prepared were amplified using R-5 and R-3 by the polymerase chain reaction. N47, randomized region of 47 bases.

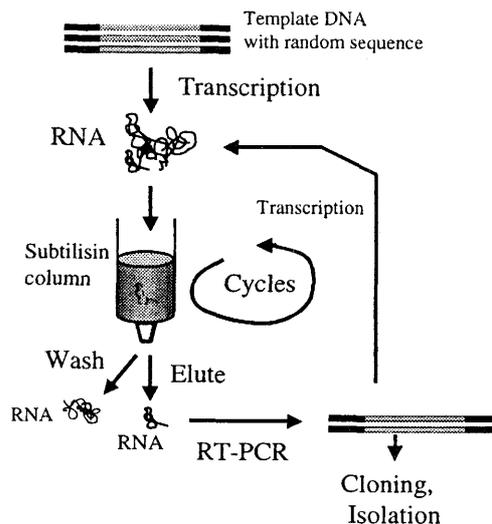


Figure 2. Selection procedure for RNA aptamers to subtilisin. Selection was performed using the column containing immobilized subtilisin. After eight rounds of selection, RNAs were cloned for isolation of each molecule.

内転写により第二世代の RNA を合成し、同様のカラム操作で選択を繰り返す。すなわち、少し手助けをしながら、多量の子供を作らせ、その子供達の中からサチライシン結合能を持つものだけを選択するというのである。これを 8 回繰り返す、この第 8 世代の DNA を大腸菌にクローニングし、得られた各配列を精製した。

クローニングにより得られたプラスミドから、それぞれの RNA を試験管内転写で得、サチライシンの酵素活性に及ぼすこれらの RNA アプタマーの影響を調べた。上述の筆者らの方法では、結合能のみで RNA を選択しているため、必ずしもすべてが酵素活性阻害能を持っているとは限らない。確かに、結合能は有するものの阻害能のない多くの RNA も得られた。一つ一つのクローンの阻害能を調べ、いくつかの阻害能を持つクローンが確認された。そのうち最も強い阻害を示すもの (RNA-1 という) は、サチライシン活性を 75% 阻害した。Figure 3 にその結果を示す。サチライシンは、塩基性タンパク質のため、酸である RNA とはもともと若干の非特異的親和性があり、Figure 3 に示すように 0 世代のランダム RNA や市販の酵母 RNA でも若干の阻害が見られた。しかし、選択された RNA-1 は、明らかに有意な阻害能を示した (Figure 3)。従って、筆者らはここに RNA からなるサチライシン阻害剤を人工的に初めて創製したと言える。

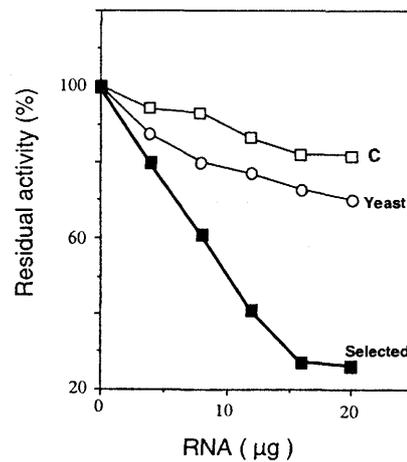


Figure 3. Inhibitory effects of RNAs on subtilisin activity. Subtilisin was assayed using a chromogenic small peptide substrate. Selected, selected RNA-1. C, non-selected (random) RNA. Yeast, yeast RNAs.

4. 単純に取ったアプタマーも分子を識別できる

この RNA-1 は、分子識別能力をもっていることも明らかになった。サチライシンと活性部位がよく似ており、同じセリンプロテアーゼに分類されるトリプシンとキモトリプシンに対してこの RNA-1 はほとんど阻害効果を示さないことから (Figure 4)、RNA-1 は、サチライシンだけを特異的に認識していると言える。選択の操作の中で、特異性を高める操作を特に加えたわけではないにも関わらず、このような特異性を獲得できることは、大変興味深い。一般にこの程度の特異性ならば、不要な結合能を排除するような特別な操作 (counter SELEX と呼ばれる操作等) を

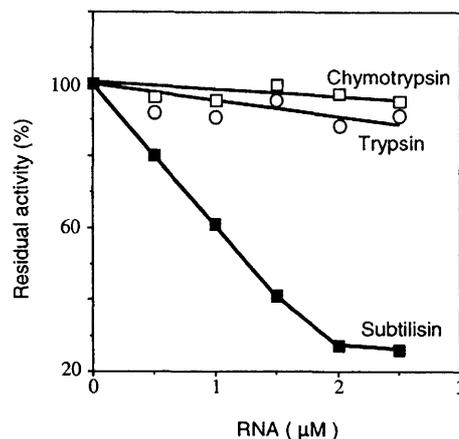


Figure 4. Effect of RNA-1 on proteolytic activities of various serine protease. RNA-1 (0-2.5 µM) was added to the reaction mixture for subtilisin, trypsin and chymotrypsin.

しなくとも単純な SELEX で簡単に得られるものと思われる。この特異性から、RNA-1 は、セリンプロテアーゼが共通にもつ活性部位 (セリン-ヒスチジン-アスパラギン酸からなり catalytic triad と呼ばれる) に結合するわけではなく、サチライシンに特異的な部位 (基質結合部位など) に結合し阻害しているものと推測された。このことは、酵素反応速度論的解析からも支持された。すなわち、Figure 5 に示すように RNA-1 は、拮抗阻害剤であり (阻害定数 $K_i = 2.5 \mu\text{M}$)、基質結合部位への結合能を有し、基質の結合を阻害していると考えられる。サチライシンは、その立体構造が明らかになっており、基質結合部位は二つの壁に囲まれた溝になっている。その溝の片方の端に catalytic triad が位置している。RNA-1 は、基質が入るはずのこの溝を基質と奪い合いをすることで阻害していると推測される。Figure 6 に RNA-1 の塩基配列と推定二次構造を示す。詳しい説明は省略するが、いくつかの実験から Figure 6 の塩基番号 30 から 34 (AACAC) の部分が基質結合部位に入り込むものと考えられている。

5. さらなる RNA ワールドテクノロジーへ

筆者らは、一種のモデルとして、サチライシンの RNA アプタマーの創製を行ったが、ここに得られたアプタマーも酵素の安定化剤やタンパク質分解のスイッチとして利用できる可能性がある。サチライシンは、タンパク質分解酵素であり自身もタンパク質であるため、溶液とした時お互いを食い合い自己分解してしまう。そのような溶液にこの RNA-1

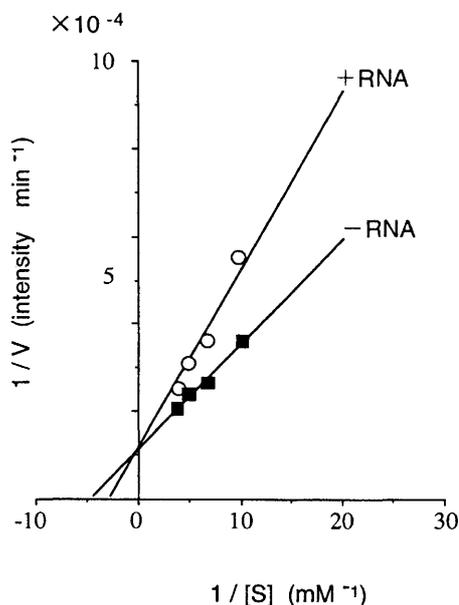


Figure 5. Lineweaver-Burk plot of subtilisin reaction with RNA-1 inhibitor. The inhibition was competitive.

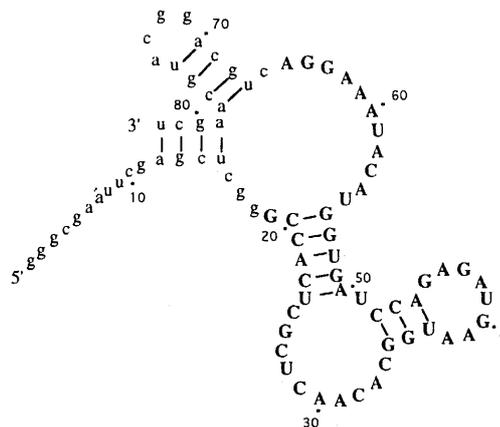


Figure 6. Computer-generated secondary structure of RNA-1. Lower case letters show primer binding (known) sequences. Selected sequence was shown by upper case letters.

を加えれば酵素は安定に保たれると考えられる。酵素活性を発揮させたいときは、RNA を分解するリボヌクレアーゼを加えればサチライシン活性が復活すると考えられる。リボヌクレアーゼは、RNA アプタマーを分解後、活性回復したサチライシンによって分解されてしまうので、その後またサチライシンの活性を抑えたいときは再び RNA アプタマーを加えその阻害機能を発揮させることができるであろう。すなわち、以上の RNA アプタマー-リボヌクレアーゼ系は、反応のオン・オフを行える分子スイッチとして利用できる可能性がある。

以上のことは、SELEX により、生物にはない (厳密には、今のところ見いだされていない) 新しい分子間相互作用 (この場合サチライシン-RNA 間相互作用) を創製でき、それがさらなるテクノロジーとして発展できることを示している。SELEX は、確かにバイオテクノロジーを超える技術として有効であることが期待される。ここで得られた RNA の新しい機能は、かつて RNA ワールド時代にはそこそこあった RNA の機能かもしれない。生命誕生以降は、不要のものとなり捨て去られたが、今、この SELEX により蘇ったのかもしれない。RNA ワールド時代の遺物であるにせよ、そうでないにせよ RNA の潜在的能力は大いに魅力的である。このような観点から、まだ手がかりはないが SELEX を超えるまったく新しい RNA 創製法も未来技術として今後開発されることが期待される。

6. おわりに-再び「RNA ワールド」あれこれ

近年、現細胞内でタンパク質をコードしない RNA (ノンコーディング RNA) が遺伝子発現調節に大きな役割を果たしていることが明らかになってきた[10]。ヒトゲノムの 98% ほどは、特に何もコードしていないと思われるが、そのほとんどが転写されノンコー

ディング RNA として遺伝子発現調節に関与しているらしいことが明らかにされつつある。この新しく明らかになった RNA が活躍する世界を研究者によっては「RNA ワールド」と呼ぶ場合がある。このイノベティブな世界をこう呼ぶのも悪くはないが、「RNA ワールド」という言葉は、もともとは上述のように生命の起原に関係している言葉であることを意識していただきたいと筆者は考えている。もっとも、現在の細胞内の RNA に見いだされた様々な新機能は、生命の起原において様々な機能をもっていたであろう RNA の世界を彷彿とさせるようにも思える。RNA ワールド時代の目ぼしい機能は、実は、ほとんど現細胞の中に取り入れられており、我々はそれをまだ解明できないでいるのかもしれない。生命の起原の「RNA ワールド」と現細胞の「RNA ワールド」との間に奇しくも共通性があるかもしれない、きちんと意味をわきまえて使いましょうという警告が、意味をなさなくなるのなら、RNA 信奉者の筆者としては、これはこれでまたうれしいことではある。

文献

1. Cech, T. R., Zaug, P. J. and Grabowski, P. J. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of tetrahymena: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence, *Cell* 27, 487-496 (1981).
2. Gilbert, W. Origin of life: The RNA world, *Nature* 319, 618 (1986).
3. Crick, F. H. C. The origin of the genetic code, *J. Mol. Biol.* 38, 367-379 (1968).
4. Orgel L. E. Evolution of the genetic apparatus, *J. Mol. Biol.* 38, 381-393 (1968).
5. Ellington, A. D. and Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature* 346, 818-822 (1990).
6. Tuerk, C. and Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to Bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science* 249, 505-510 (1990).
7. Takeno, H., Yamamoto, S., Tanaka, T., Sakano, Y. and Kikuchi, Y. Selection of an RNA molecule that specifically inhibits the protease activity of subtilisin, *J. Biochem.* 125, 1115-1119 (1999).
8. Kraut, J. Subtilisin: X-ray structure. in *The Enzyme* (Boyer, P. D., ed.) Vol. 3, pp. 547-560, Academic Press, New York and London, 1971.
9. Markland, Jr., F. S. and Smith, E. L. Subtilisin: Primary structure, chemical and physical properties. in *The Enzyme* (Boyer, P. D., ed.) Vol. 3, pp. 561-608, Academic Press, New York and London, 1971.
10. Pang, K. C., Stephen S., Engström P. G., Tajul-Arifin, K., Chen, W., Wahlestedt, C., Lenhard, B., Hayashizaki, Y. and Mattick, J. S. RNAdb—a comprehensive mammalian noncoding RNA database, *Nucleic Acids Res.* 33, D125-D130 (2005)