

RNAの世界へようこそ

兒島 孝明

“RNA ワールド仮説”，読者の皆様も一度は耳にされたことがあるかと思う。自己複製系を有するRNAが太古の昔において主役であり，その後進化の過程で遺伝情報保持の役割はDNAへ，酵素活性の役割はタンパク質へと推移していったとされる仮説である。この仮説の歴史は意外に古く，1960年代後半にはDNA二重螺旋構造発見で有名なCrickが，原始生命機構はタンパク質を介さずRNAのみから成っていたのではないかと，そして最初の酵素は複製機能を有するRNAだったのではないかと，といういわばRNAワールド仮説の原型について言及している¹⁾。その後1981年，Cechらによって織毛虫 *Tetrahymena* から自己スプライシングを行うRNAが発見された²⁾。このRNA酵素，リボザイムの発見によりRNAが遺伝情報と酵素活性の両方を保持するということが確認された。そしてこの衝撃的な研究発表の数年後，Gilbertによって“RNAワールド”という用語が創出されるに至る³⁾。以降，現在でもさまざまな形でこの仮説に対する検証がなされているが，この仮説を完全に立証するためには克服すべき問題がまだまだ山積みのようなのである。しかしながら，生命の起源を説明するもっとも有力な説の一つに依然変わりはないようである。

さて，その克服すべき問題の一つとして，この仮説においてRNAの複製およびRNA遺伝子の発現にはRNA伸張活性が必要不可欠にも関わらず，この活性を有するリボザイムは自然界においてまだ発見されていないという点が挙げられる（あるいは進化の過程で消失してしまったのだろうか？）。しかしながら，リボザイムは人工的に試験管中でも作製することが可能である。そしてこれまでにランダムなRNA配列からさまざまな機能を保持するリボザイムが獲得されている。リガーゼ活性を有するリボザイムを土台とした分子進化的手法によって獲得されたリボザイムR18はRNA伸張活性を有するリボザイムの代表格である⁴⁾。とはいえこのR18，伸張できる塩基数が最長14塩基と，その昔ありとあらゆるRNAを自由自在に複製していたとはお世辞にもいえないような低活性しか有していなかった。が，昨年この停滞ムードを一変させるようなスゴい報告がWochnerらによってなされた⁵⁾。

Wochnerらはまずcompartmentalized bead-tagging (CBT) というRNA伸張活性を保持するリボザイムをハイスループットに選択できる手法の開発に成功した。このCBT法では，油相中の微小液滴内で転写，ライゲーション共役反応，ついでプライマー伸張反応をすべてマイクロビーズ上で行う。この伸張されたRNAに蛍光標識を施し，蛍光強度に応じた粒子選別手法，fluorescent

cell activated sorting (FACS) を用いることにより伸張活性の高いリボザイム遺伝子を迅速に取得できる。WochnerらはこのCBT法と上記R18に変異を導入したライブラリーを用いてRNA伸張活性を保持するリボザイムのスクリーニングを行い，優良クローンC19を獲得した。しかしながら，このクローンは鋳型が長いとその伸張活性が著しく低下してしまったため，このC19に対してさらに鋳型結合部位周辺に改良を施し，より伸張活性が強化されたtC19の獲得に成功した。このtC19，今回用いた鋳型では最高95 ntもの伸張活性が確認された。

ところが，このtC19は特定の配列の鋳型でしかその高い活性を示さず，汎用性に欠けているようであった。つまり，RNAワールドで十二分に活躍するにはまだまだ役者不足，ということのようだった。そこでWochnerらはRNA伸張活性を保持するリボザイムの試験管内進化を再度，別路線で試みた。R18を土台としたライブラリーと二種類の異なる鋳型を用いてCBTセレクションをし，鋳型の汎用性が高いクローンの選抜および改変を行った。その結果，4カ所の変異を保持するクローンZにおいて，鋳型配列特異性の低減が確認された。そして仕上げに上記tC19にこの4カ所の変異を導入することにより，高い伸張活性と鋳型の汎用性を兼ね備えたtC19Zの構築に成功した。このtC19Z，RNAを選択的に切断する活性を保持するリボザイム，ハンマーヘッドリボザイム全長を軽々と活性型で合成することができた。つまり，リボザイムがリボザイムによって合成されるということが示されたことになる。また，RNAワールド仮説においてRNA複製時におけるエラー頻度の低さも重要になるのだが，このtC19ZはR18よりも高い忠実性を示した。

試験管内で人工的に創製したという条件付きではあるが，これだけ凄いRNA伸張活性を有するリボザイムの存在が実証された。無論，これで“RNAワールド仮説”が即“仮説”でなくなる訳ではない。気の遠くなるような遠い昔，原始の海でいったい何が起こったのか？ ちょっと想像するだけでもワクワクしてくるのはきっと本稿筆者だけではないはずだ。

- 1) Crick, F. H.: *J. Mol. Biol.*, **38**, 367 (1968).
- 2) Cech, T. R et al.: *Cell*, **27**, 487 (1981).
- 3) Gilbert, W.: *Nature*, **319**, 618 (1986).
- 4) Johnston, W. K. et al.: *Science*, **292**, 1319 (2001).
- 5) Wochner, A. et al.: *Science*, **332**, 209 (2011).