

105 機能性リボザイムの *in vivo* でのスクリーニングシステムの開発

(筑波大学・応生、工技院・生命研) ○多比良 和誠、小熊 徹彦

【目的】 RNA酵素であるリボザイムを抗ウイルス剤や、遺伝子治療に応用しようといった考えはリボザイム発見当初から取り上げられていた。リボザイムは一般的な酵素とは異なり、蛋白質を必要とせず RNAだけで酵素活性を示すという特徴を有するが、これが画期的治療法の開発を期待させると同時に、RNAだけからなる酵素故に、酵素としての不安定性や活性の低さといった問題が残る。現在までのところ、動物細胞ではHIVやHSV、植物細胞ではTMVやCMVをターゲットとし、ある程度の抗ウイルス性が示されているが、既存の抗ウイルス剤に変わるほどの効果は認められていない。我々は、DHFR遺伝子を選択マーカーとした *in vivo* でのスクリーニングシステムを用いて、リボザイムの活性中心にランダムな変異を導入し、この変異人工リボザイムの中から、高機能リボザイムを選択し、活性に重要と考えられる全く未知の配列を探求しようと考えている。すなわち本研究では 従来、存在しなかった高機能リボザイムの構築、選択、そしてその解析を目的としており、これによって遺伝子治療などといった場面でのリボザイムの利用が飛躍的に向上するものと考えている。

【方法及び結果】 まずリボザイムとDHFR遺伝子を連結した発現ベクターを構築する。ここでリボザイムの標的部位はDHFR遺伝子の開始コドンと、この5'上流に位置する偽開始コドンとの間に設定しておく。活性型のリボザイムによって切断された一次転写産物は切断後は偽開始コドンのすぐ上流に設けられたSD(Shine-Dalgarno)因子の支配から開放されて、弱いながらもDHFRタンパクが作り出される。一方、不活性型リボザイムが連結された一次転写産物は、強力なSD因子の支配のもとに偽開始コドンからの翻訳が優先し、フレームシフトによってDHFRはほとんど産生されない。こうしてリボザイム活性の差は、培地中の抗DHFR剤であるTMP(trimethoprim)に対する耐性の差として検出できる。例えば適当量のTMP(50 μ g/ml)を含む培地中では活性型リボザイムクローンは生育できるが、不活性型ではできなくなる。ここでリボザイムの活性部位にランダムな変異を導入し、より高濃度のTMP中で生育できるようなクローンをスクリーニングし、それらのリボザイム活性を検討する。またこの場合の活性は即細胞内の活性なので、*in vivo*の実験結果として評価できる。

A novel screening system for construction and selection of active ribozymes using DHFR (Dihydrofolate Reductase) gene as selection marker.

○Kazunari Taira, Tetsuhiko Koguma, (Applied Biochem., Tsukuba Univ.)

【Key Words】 ribozyme, dihydrofolate reductase, trimethoprim, frame-shift