

Modular engineering and rational redesign of Tetrahymena group I ribozyme

田中, 貴大

<https://hdl.handle.net/2324/1806979>

出版情報 : Kyushu University, 2016, 博士 (工学), 課程博士
バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)



KYUSHU UNIVERSITY

(様式 2)

氏 名 : 田中 貴大

論 文 名 : Modular engineering and rational redesign of *Tetrahymena* group I ribozyme (*Tetrahymena* グループ I リボザイムのモジュール工学と合理的再設計)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

RNA は、DNA の遺伝情報の複製だけでなく、アプタマーやリボザイムのようにタンパク質類似の機能を持つ生体高分子である。特に 200 塩基以上からなる大型リボザイムは、tRNA プロセシング等の重要な生体反応を行う。また、RNA は DNA 類似の化学構造のため、Watson-Crick 塩基対による分子設計も容易である。そのため、ナノ構造体や生体分子ツールに有望な素材である。しかし、RNA 構造体の分子設計において機能付加や高度化、大型化はあまり実現されておらず、大型リボザイムの機能と構造はナノ構造体には全く利用されていない。また、分子サイズや安定性等のいわば「静的」性質の構造体の報告がある一方、リボザイムやリボスイッチの複合体形成や構造変化に伴う自身の大きな活性変化の様ないわば「動的」な性質を持つ RNA 構造体の報告例はほとんどない。この「動的」性質を組込み可能な分子設計技術を開発できれば、RNA の材料としての更なる応用展開が期待できる。

RNA の 3 次構造は、2 重鎖と「RNA モチーフ」と呼ばれる特定の構造を形成する保存された配列の組み合わせにより形成される。この性質を利用し、コンピュータ上の分子モデリングを用いて 2 重鎖と RNA モチーフの組み合わせで分子設計を行う「RNA モジュール工学」と呼ばれる分子設計技術がある。一方、大型リボザイムは自己折り畳み・自己集合可能なドメイン構造を持ち、分割された不活性なドメイン構造は自己集合により活性なリボザイム構造を回復させる。そのため、このドメイン構造を「拡張した RNA モチーフ」と見なし、RNA モジュール工学的に利用することで、「静的」と「動的」の 2 つの性質を持つ RNA 構造体とそれに基づく分子ツールの開発を試みた。本学位論文の主眼は、以下の 2 点に分けられる。1 点目は、大型リボザイムのドメイン構造が「拡張した RNA モチーフ」として取り扱い可能であるかの検証である。互いに相互作用を行うドメイン構造の構造基盤としての特性と、ドメイン間相互作用の選択性改変について検証した。2 点目は、「拡張した RNA モチーフ」を用いて大型リボザイムが行うスプライシング反応の制御を行う分子ツールの開発である。RNA モジュール工学に基づく分子設計で、協調的なスプライシング制御リボザイムの構築を試みた。各章の詳細を以下に示す。

本学位論文の 1 章では、RNA 酵素反応とその構造、特に *Tetrahymena* 由来のグループ I リボザイムの P5/ΔP5 ドメインの構造や、触媒反応の基本的な特性に関して要約した。RNA モジュール工学による RNA ナノテクノロジーや RNA ツールの研究例を例示した。

2 章では、P5/ΔP5 のドメイン上に、2 つの構造体を近接させる基盤モチーフと見なせるか検証した。P5/ΔP5 の各領域に 2 重鎖とループ・内部ループ構造から成るペプチド認識モジュール (PRM) が近接するように導入した鉄型 RNA を作成し、連結反応のために末端を活性化した認識ペプチドを導入した際の連結効率から、P5/ΔP5 の基盤構造としての性能を評価した。鉄型 RNA は、ペプチ

ド連結を促進したことから P5/ΔP5 は基盤構造として働き構造を形成していることを確認した。

3 章では、P5/ΔP5 の両ドメイン間の 3 つの相互作用のうち、RNA モチーフであるが配列特性が不明な kissing loop(P14)の特性を調べた。以前の報告を基にした配列設計指針により、新規 P14 配列を設計した。この新規 P14 配列と loop-receptor モチーフ(LR)を組み合わせた P5/ΔP5 変異体は、野生型に対して直交する相互作用を示した。このことから、P14 と LR の組み合わせで、P5/ΔP5 の自己集合を制御できる事が示された。

4、5 章では、2、3 章の結果を踏まえ、*Tetrahymena* グループ I リボザイムを基に 2 つの RNA 鎮間のスプライシングを協調的に制御する新規システムの構築を試みた。5 章では、P5 と ΔP5 を RNA モチーフとして扱うことで、RNA モジュール工学的に *Tetrahymena* グループ I リボザイム 2 量体を設計した。この 2 量化リボザイムは、P5/ΔP5 よりも高い会合効率を示し、単独では不活性なリボザイムが構造形成依存的に活性を回復することで協調的な分子内スプライシングシステムとなった。4 章は、5 章と並行して分子間スプライシング反応であるトランススプライシングの制御を試みた。1-3 章を踏まえ、グループ I リボザイムのコア領域である P4-P6 領域及び P3-P7 領域のモジュール性に着目し、2 量体形成に基づくトランススプライシングの制御を試みた。

6 章では、これら結果を踏まえた今後の展開を含め総括を行った。