

# 天然型を越えた高機能化分子素材:その名はマキシザイム

## Gene discovery by novel Hybrid-Ribozymes

ジーンディスカバリー研究センター  
Gene Discovery Research Center

### Abstract

Appropriate folding of catalytic RNA is the prerequisite for the effective catalysis. We succeeded in controlling the structure of a ribozyme at will and created an allosterically controllable ribozyme, the maxizyme. The maxizymes work not only in vitro, but also in vivo including mice indicating the potential utility of this novel class of ribozyme as a gene-inactivating agent with a biosensor function. Moreover, we have also created novel hybrid enzymes that couple the site specific cleavage activity of the hammerhead ribozyme with the unwinding activity of endogenous RNA helicases. This ribozyme technology represents a powerful tool for the development of gene-inactivating reagents of both therapeutic and general importance and for the rapid identification of functional genes in the post-genome era.

### 1. リボザイムと遺伝子治療について

リボザイムとは触媒機能を持つRNA一般をさし、狭義にはRNA鎖を部位特異的に切断するRNA分子のことである。天然のハンマーヘッド型リボザイムは同一分子内で(シスに)働いているが、適当に分割することで分子間で(トランスに)働くようにも設計できる。以下、ハンマーヘッド型リボザイムを単にリボザイムと呼ぶことにする。標的遺伝子のmRNAがこのトランス化リボザイムの基質になるためにはNUX配列(N:任意の塩基、X:G以外の塩基)が必要であるが、その両脇に関しては配列を問わず、塩基対を組んでいればよい。したがってウイルス遺伝子や癌原遺伝子中のNUX配列の前後の配列と塩基対を組むような配列のリボザイムを設計することによりその遺伝子の発現を抑制することが可能となり(遺伝子治療)、機能を調べたい遺伝子を標的にすればその機能解析も可能となる(図1上)。実際このような試みが幾つかなされてきたが、実際に実を結んだのは比較的最近のことで、試験管内のリボザイム活性と細胞内でのリボザイム活性が一致しないことに研究者は悩まされ続けてきた。

最近の当研究室の研究から細胞中でリボザイムが不活性であった理由の一つが明らかになり、当初予想されていた通りリボザイムが遺伝子治療薬として応用可能であることが示された。さらに核酸の二次構造予測にもとづき標的遺伝子やリボザイム自身の

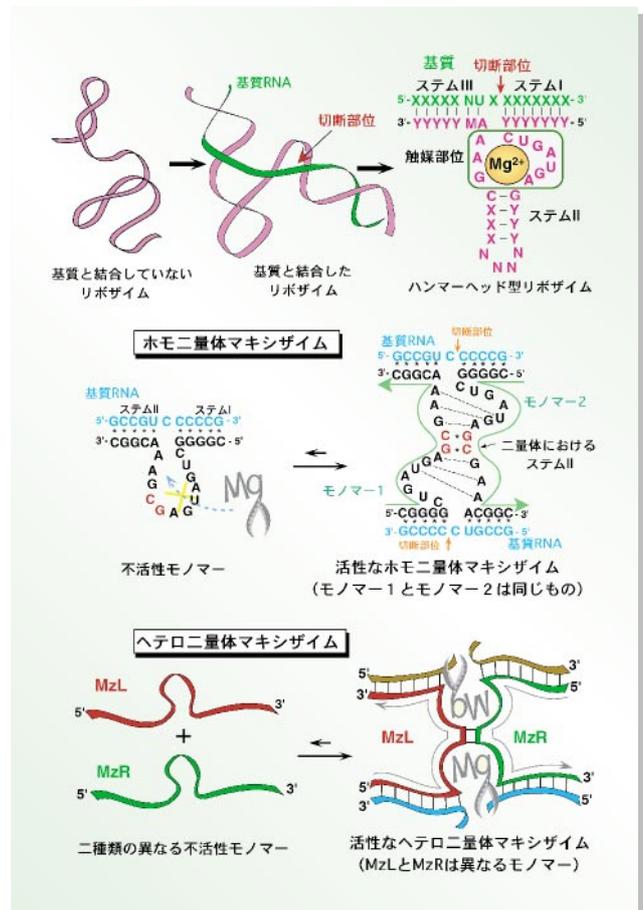


図1 RNA酵素リボザイム(上)から二量体で作用するマキシザイム(中、下)の創製

二次構造を予測し、より効率的に標的部位の選択やリボザイムの配列設計ができることが示された。すなわち、遺伝子治療という複雑な系に対して核酸の物性からのデザインが非常に有効であることが示されたわけである。本稿では、リボザイムの細胞内での活性発現に必須の条件とそのための工夫について簡単に述べた後、最近当研究室でデザインされた、細胞内でのアロステリック制御を世界で初めて可能にしたマキシザイムとタンパク質とのハイブリッド型リボザイムについて紹介する。

## 2. リボザイム発現系と配列設計

ここでは、これまで細胞内では活性をほとんど示さなかったリボザイムに、細胞内でいかにして活性をもたせたか、そのからくりについて簡単に述べる。リボザイムが個体(少なくとも培養細胞中)で機能するためには、細胞内に導入することが必要である。当研究室ではリボザイムをコードする遺伝子をプラスミドの形で導入する方法を採用した。つぎに遺伝子として導入したリボザイムを細胞内で発現させるため、低分子RNAの転写に適し、かつ転写(合成)量が高いRNAポリメラーゼIII系(pol III系)のtRNA転写系を用いた。このようにして設計されたリボザイムの細胞内活性を種々の遺伝子を標的として測定し、当初の目論見通りリボザイムに細胞内活性があることを確認した。これらのデータから一見、リボザイムの転写(合成)量をあげることが細胞内で活性を持つための最も重要な因子であるように思われた。しかしさらに詳細な解析により、細胞質に輸送されるリボザイムは有効な活性を持ち得るが、核内にとどまるリボザイムは大量に転写されても細胞内で活性を示しにくいことがわかった。このように細胞内局在がリボザイムの細胞内活性を決定する最も重要な因子の1つであり、pol III系のtRNA発現系を用いることにより局在を制御できることを示した。

次に物理化学的側面からの配列設計について述べる。リボザイムの配列設計を行う際にはリンカー配列等の自由度をもった配列に関して考慮する必要がある。そこで核酸の二次構造予測プログラムを用いて、リボザイム配列が標的遺伝子のmRNAと結合しやすい領域を標的部位として選んでいる。実際、標的遺伝子側の切断部位が強固な二重らせん構造をとっていると予想された部位に関してはリボザイムによる切断が見られないという結果がいくつも得られており、予想される二次構造とその構造から期待され

る活性の間にはかなりの相関がある。このように核酸の二次構造予測からリボザイムの配列設計がある程度可能になってきたが、完全な予測は不可能である。現時点ではある程度の試行錯誤は不可欠であるが、一定のガイドラインに沿ってリボザイム配列の最適化が可能となったことは格段の進歩である。

## 3. アロステリックリボザイム「マキシザイム」の誕生

ここで遺伝子治療の標的としたフィラデルフィア染色体転座が原因で起こる慢性骨髄性白血病(CML)について述べる。白血病はいわゆる血液の癌であり、死亡数は年間約14,000人に登る。この数は、交通事故による死亡数に匹敵する。これまでの白血病の治療は、抗癌剤を投与する化学療法が主体だった。しかし抗癌剤は、白血病細胞だけでなく正常細胞にも作用する。これによって起こる強い副作用が大きな問題となり、現行の治療法の限界となっている。また骨髄移植は近年めざましい成果を上げ治療率の向上に貢献しているものの、慢性的なドナー不足、移植可能な年齢や回数の制限などにより、特に難治性のタイプに対しては依然効果が低いのが現況である。このため白血病細胞に対する特異性および汎用性の高い、新規の治療法の開発が緊急の課題となっている。

従来科学者達は何が原因で白血病が引き起こされるのか、その研究にも努めてきた。白血病の中で非常に頻度の高い慢性骨髄性白血病(CML)の場合、遺伝子の異常であるフィラデルフィア染色体相互転座が起こり、本来は正常な遺伝子であるBCRとABLという2つの遺伝子が途中で融合したBCR-ABLキメラmRNAができる。この癌遺伝子からの遺伝情報は、メッセンジャーRNAに伝達され、そこから最終的に細胞の増殖を促進する、異常なチロシンキナーゼというタンパク質が産生され、細胞の癌化が生じる。白血病の原因となるBCR-ABL mRNAを標的とした従来のリボザイムは、これまでに諸外国で幾例も設計されてきたが、特異性が低く白血病細胞だけに作用させる事が出来なかった。これは従来型リボザイムのBCR-ABL mRNAに対する認識能力に限界があるためで、BCR-ABL mRNAを切断しようとする、正常な細胞内に存在する、傷つけてはならない正常なBCR mRNAやABL mRNAをも切断してしまうからであった。

我々はリボザイムを小型化する研究の過程から、二量体で機能する新規のRNAモチーフを発見した。一般に小型化リボザイム(ミニザイム)は活性が著し

く低いという消極的な印象があったため、我々が構築した二量体を形成して機能するこの新規な高活性小型化リボザイムを他のものと区別して、マキシザイム[ maxizyme; minimized; 小型化の、active; 非常に高活性な、x-shaped; (X型の) 二量体を形成して機能する、intelligent ribozyme; 賢い(アロステリック制御可能な)リボザイム ]と名付けた(図1)。我々が創製した二量体で機能するマキシザイムを用いると、二つの基質結合領域を活かして、片方の基質結合領域で悪性の癌遺伝子(BCR-ABL mRNA)を認識し(センサー機能)、もう片方で効率の良い切断配列を切断(分子はさみ)するように構築することが可能である(図2)。つまり、マキシザイムを用いて、白血病細胞にのみ存在する悪性のメッセンジャーRNA(BCR-ABL mRNA)を破壊して、白血病細胞のみに細胞死を誘導する治療法が考案された。

#### 4. マキシザイムによる遺伝子治療の可能性

上述したように、世界で初めて開発された日本独

自の新しい機能分子であるマキシザイムは、リボザイムと同様に遺伝子を切断する機能を持っているが、それに加えて独自のセンサー機能(アロステリック制御機能)を併せ持つ。マキシザイムは白血病細胞内では、悪性の指標であるBCR-ABL mRNAを認識して、活性型の構造をとる。一方、マキシザイムは正常な遺伝子を認識すると、不活性型の構造に自らを変化させる(図2)。リボザイムはそれ自体では遺伝子を切断する機能はなく、活性に必須となる金属イオンをうまく捕らえることができれば、切断機能を獲得する。マキシザイムはこの性質を巧みに利用して設計されており、悪性遺伝子が存在する時のみ、金属イオンを捕らえることのできる活性型の構造を形成する。それ以外の如何なる条件下においても、マキシザイムは金属イオンを捕らえるポケットができないため不活性型の構造をとる。つまり、マキシザイムは正常の細胞内に導入されても何の悪さもしないため、従来のリボザイムと比較しても副作用の心配が全くない。

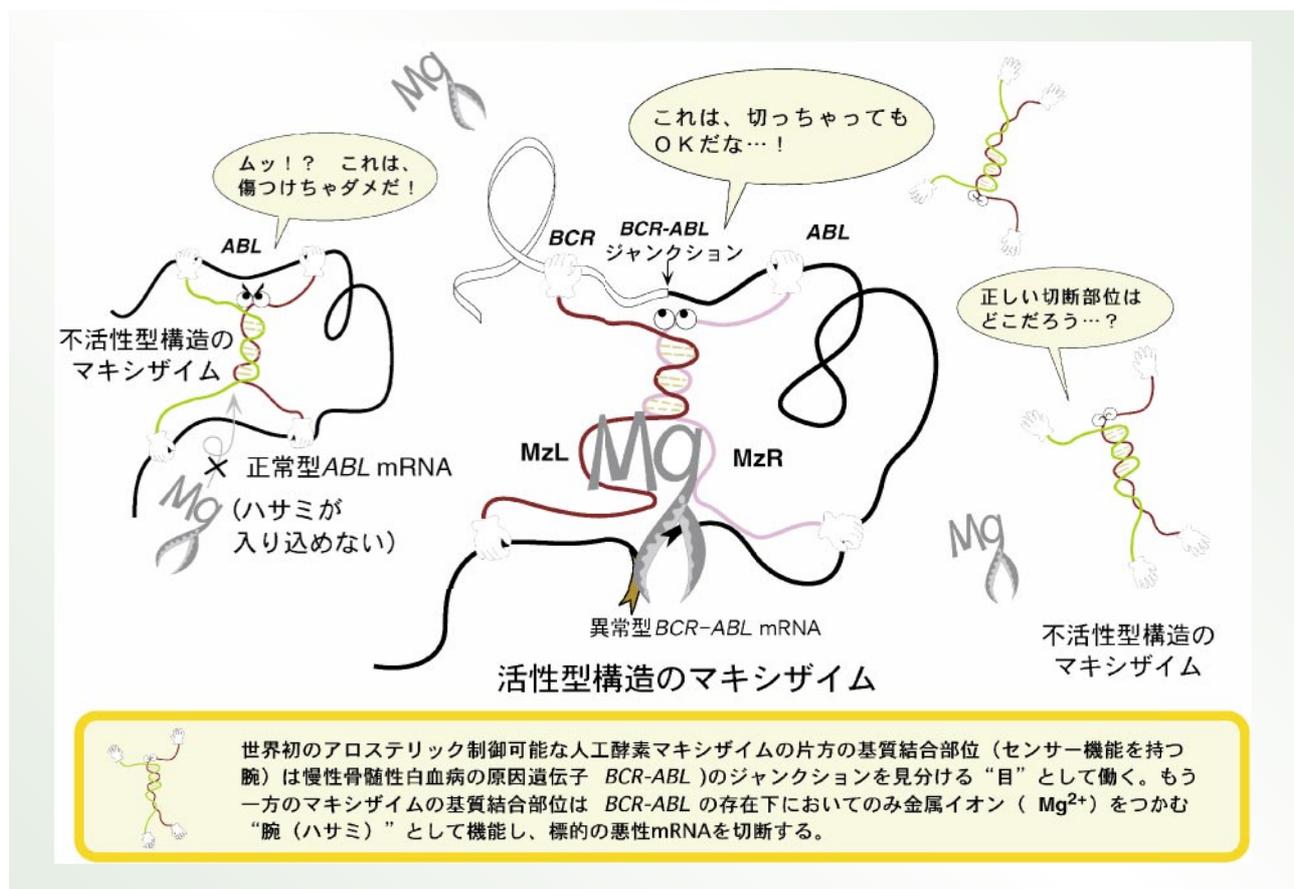


図2 悪性遺伝子を特異的に切断するマキシザイム

この新しいマキシザイムを細胞内に導入したところ、予測通りに白血病細胞だけを非常に有効に死滅させ、正常細胞には影響を与えなかった。さらに白血病モデルマウスを使った動物実験でも、病気の進行をほぼ完全に抑制できている(図3)。また、従来の抗癌剤に耐性を示す白血病細胞の増殖を抑制することにも成功している。繰り返すが、この新しい治療法の特徴的な点は、白血病細胞の中の悪性の癌遺伝子に対してだけ作用するので、根本的な遺伝子治療ができ、またその副作用が無い事である。これまでの治療法では、治癒に至った場合でも、強い副作用により患者のクオリティオブライフが妨げられる例も多かった。発癌の分子機構に着目して、特異性を高めた今回の新規治療法は、単に治癒だけでなく、クオリティオブライフの向上も目指した革新的なものである。現在の段階では、実際の臨床応用までには、細胞内に高率に導入する方法の開発など、いくつかの解決すべき点はあるものの、将来的には白血病治療法の中心となる可能性を秘めた画期的なものといえる。

## 5. おわりに

以上述べてきたように、我々は細胞内で核酸の物性にもとづきリボザイムをデザインし、ほぼねらい通りに標的RNAを切断することができるようにまで来ている。"Rational drug design"という言葉がささやかれるようになって久しいが、リボザイムをもちいた遺伝子治療の系ほど物理化学的性質にもとづいた薬物設計が可能な系はめずらしい。

現在、ベンチャー企業から公的機関までの多くの組織が、ポストゲノム時代を念頭に置いた遺伝子探索プロジェクトを進行させている。しかしそのほとんどはシーケンズプロジェクトによって得られたDNAの塩基配列からコンピューター上で機能予測をするか、DNAマイクロアレイやプロテインチップなどによる遺伝子発現パターンの解析やタンパク質間相互作用の試験管内での体系的な評価に基づくものである。我々は、標的RNAの高次構造に左右されずに機能できるタンパク質との人工ハイブリッド型リボザイムを最近開発した<sup>15)</sup>。現在、このハイブリッド型

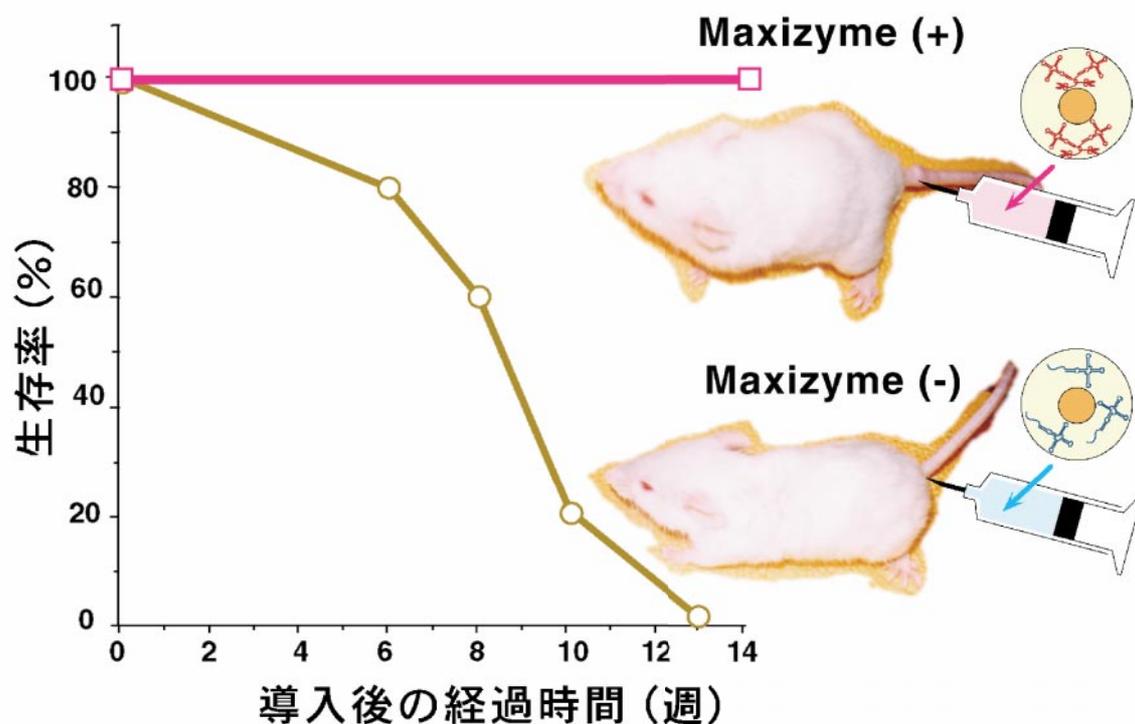


図3 マキシザイムによる異常白血病細胞の破壊

リボザイムを用いて、実際の細胞内での機能に基づいて遺伝子を探査するシステム(ジーンディスカバリーシステム)を構築しようとしている。他機関で行われているような方法では実際に細胞内で予想通りの機能を示していない可能性が高く、それを確認するためのノックアウト生物の作成も大変な時間と経費がかかる。我々のシステムの場合、少なくとも着目する表現型変化に何らかの影響を与えているのは確実な遺伝子の中から探査を行うことになるので、経費や時間の大幅な短縮が見込まれる。しかも遺伝子ノックアウトによる生体内での確認においても、再びリボザイムを活用することができるのが利点である。この勢いでリボザイムの基礎ならびに応用研究が進展し続ければ、リボザイムが医薬品、さらには生命科学における研究のツールとして日常的に使われる日もそう遠くはないと断言できる。

<参考文献>

- 1) Kuwabara, T., Warashina, M., Orita, M., Koseki, S., Ohkawa, J., and Taira, K. Formation of a catalytically active dimer by tRNAVal-driven short ribozymes. *Nature Biotechnology*, 16, 961-965 (1998).
- 2) Zhou, D.-M. and Taira, K. The hydrolysis of RNA: from theoretical calculations to ribozyme-mediated cleavage of RNA. *Chem. Rev.*, 98, 991-1026 (1998).
- 3) Kawasaki, H., Eckner, R., Yao, T.-P., Taira, K., Chiu, R., Livingston, D. M., and Yokoyama, K. K., Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature*, 393, 284-289 (1998).
- 4) Kuwabara, T., Warashina, M., Tanabe, T., Tani, K., Asano, S., and Taira, K. A novel allosterically trans-activated ribozyme, the maxizyme, with exceptional specificity in vitro and in vivo. *Mol. Cell* 2, 617-627 (1998).
- 5) Koseki, S., Tanabe, T., Tani, K., Asano, S., Shiota, T., Nagai, Y., Shimada, T., Ohkawa, J., and Taira, K. Factors governing the activity in vivo of ribozymes transcribed by RNA polymerase III. *J. Virol.* 73, 1868-1877 (1999).
- 6) Kuwabara, T., Warashina, M., Nakayama, A., Ohkawa, J., and Taira, K. tRNAVal-heterodimeric maxizymes with high potential as gene-inactivating agent: simultaneous cleavage at two sites in HIV-1 tat mRNA in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1886-1891 (1999).
- 7) Warashina, M., Kuwabara, T., Nakamatsu, Y., and Taira, K. Extremely high and specific activity of DNA enzymes in cells with a Philadelphia chromosome. *Chem. Biol.*, 6, 237-250 (1999).
- 8) Tanabe, T., Kuwabara, T., Warashina, M., Tani, K., Taira, K., and Asano, S. Oncogene inactivation in a mouse model: Tissue invasion by leukaemic cells is stalled by loading them with a designer ribozyme. *Nature*, 406, 473-474 (2000).
- 9) Ohkawa, J. and Taira, K. Control of the functional activity of an antisense RNA by a tetracycline-responsive derivative of the human U6 snRNA promoter. *Hum. Gene Ther.*, 11, 577-585 (2000).
- 10) Kuwabara, T., Warashina, M., and Taira, K., Allosterically controllable maxizyme cleave mRNA with high efficiency and specificity. *Trends Biotechnol.*, 18, 462-468 (2000).
- 11) Kuwabara, T., Warashina, M., and Taira, K. Allosterically controllable ribozymes with biosensor functions. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4, 669-677 (2000).
- 12) Warashina, M., Takagi, Y., Stec, W. J., and Taira, K. Differences among mechanisms of ribozyme-catalyzed reactions. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11, 354-362 (2000).
- 13) Warashina, M., Kuwabara, T., and Taira, K. Working at the cutting edge: the creation of allosteric ribozymes. *Structure*, 8, R207-R212 (2000).
- 14) Kato, Y., Kuwabara, T., Warashina, M., Toda, H. and Taira, K. Relationships between the activities in vitro and in vivo of various kinds of ribozyme and their intracellular localization in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, in press (2001).
- 15) Warashina, M., Kuwabara, T., Kato, Y., Sano, M., and Taira, K. RNA-protein hybrid ribozymes that efficiently cleave any mRNA independently of the structure of the target RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press (2001).