



Studies on creation of intracellularly active ribozymes

著者	中山 麻紀子
内容記述	Thesis (Ph. D. in Science)--University of Tsukuba, (B), no. 2309, 2007.7.25 Includes bibliographical references (leaves 57-70)
発行年	2007
URL	http://hdl.handle.net/2241/105646

氏名(本籍)	なか やま はま だ まきこ 中 山 (浜 田) 麻紀子 (千葉県)		
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	博 乙 第 2309 号		
学位授与年月日	平成 19 年 7 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on Creation of Intracellular Active Ribozymes (細胞内高活性型リボザイムの創出に関する研究)		
主 査	筑波大学教授 (連携大学院)	農学博士	地 神 芳 文
副 査	筑波大学教授 (連携大学院)	薬学博士	西 川 諭
副 査	筑波大学教授	博士 (医学)	千 葉 智 樹
副 査	筑波大学准教授	理学博士	吉 村 建二郎

論 文 の 内 容 の 要 旨

リボザイムとは酵素活性を持つ RNA の総称であり、マグネシウムイオンなどの 2 価金属イオン存在下において特定の RNA の塩基配列を認識し切断する活性をもつ。この性質を利用しリボザイムを抗ウイルス剤や特定遺伝子の発現阻害剤として役立てることが期待されているが、その際、細胞内でリボザイムの切断活性が保持されることが重要である。しかしリボザイムの切断活性や安定性は細胞内の環境に大きく依存するため、細胞内での活性が試験管内での活性に比べて低下してしまう問題点がある。この問題を克服するため、本研究では、細胞内で高切断活性を保持するリボザイムを創出する 2 つの方法を検討した。(1) 細胞 (大腸菌) を用いてランダムに塩基配列が組み合わされた配列群から切断活性分子を選抜するシステムの構築, (2) 人工改変型リボザイムであるヘテロダイマー型ミニザイムを改良した結合型マキシザイムの設計および細胞内での切断活性とその特異性の評価, である。

(1) ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) を選択マーカーとして、大腸菌を用いて活性型リボザイムを選抜するシステムの構築を試みた。当初、DHFR 遺伝子の 5' 側にリボザイム配列を組み込んだスクリーニングシステムのモデル系を検討したが、リボザイムの活性に因らず DHFR 遺伝子の転写や翻訳に影響を及ぼす配列が選択されることが懸念された。そこで新たなモデル系として、DHFR 遺伝子の 3' 側にリボザイム配列を組み込んだ系を設計した。系が正しく機能することを確認するため、既知の活性型もしくは不活性型リボザイム配列を組み込んだベクターを作製した。作製した 2 種類のベクターを 1:1 の割合で混合し大腸菌に導入したところ、活性型が約 89% 選択されたモデルシステムが機能することを確認した。また 5' 側にリボザイムを組み込んだ場合と、3' 側にリボザイムを組み込んだ場合とでリボザイム切断効率を比較した。原核生物では転写と翻訳がほぼ同時に起こるため、mRNA はポリソームを形成する。このため 3' 側にリボザイムを組み込んだ場合その切断効率が下がることが懸念されたが、5' 側に組み込んだ場合とほぼ同じ効率で標的配列を切断することを確認した。従って、ポリソーム形成は 3' 側のリボザイムの切断効率に影響しないことが示唆された。

(2) ヘテロダイマー型ミニザイム (=マキシザイム) は、配列の異なるミニザイム (=リボザイムを小型

化したもの) 2分子がヘテロダイマー構造をとることで切断活性を示す。また2箇所の基質結合部位をもつことより、異なる標的配列を認識し切断する様に設計できる。慢性骨髄性白血病の原因遺伝子である BCR-ABL キメラ mRNA を特異的に切断する様に設計されたマキシザイムは、2箇所の結合部位のうち一方は BCR-ABL mRNA の連結配列を認識するセンサーとして働き、他方は ABL mRNA 中の標的配列を切断するように設計されており、連結配列が存在する時のみ構造変化をおこし RNA を切断するアロステリック酵素である。マキシザイムの活性化にはヘテロダイマー化が必須であるが、その際ホモダイマーなどの不活性型も同時に生じることが高活性への律速の一つとなっていた。そこでヘテロダイマー型ミニザイムの構成分子となっている2分子をリンカーでつなぎ1分子にした結合型マキシザイムを設計した。しかし単純にリンカーで繋いだのみでは、ヘテロダイマー型と同様な特異的活性を示さなかった。そこで結合型マキシザイムが標的 mRNA に結合する際、適切な構造を保つようリンカー配列中に標的 mRNA 配列中のアンチセンス配列を挿入して再設計した。界面活性剤である CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) を加えた試験管内反応条件で活性評価したところ、ヘテロダイマー型と同様な特異的活性を示した。そこで結合型マキシザイムの細胞内での有用性を検討するため、RNA polymeraseIII が認識する tRNA^{val} プロモーターの下流に結合型マキシザイムを組み込んだ発現ベクターを作製した。また切断活性を評価するため、標的配列である BCR-ABL の一部とルシフェラーゼとの融合タンパクを発現するベクター (BCR-ABL-Luc ベクター) を、また、特異性を評価するため、正常型 ABL の一部とルシフェラーゼとの融合タンパクを発現するベクター (ABL-Luc ベクター) を、構築した。BCR-ABL-Luc ベクターと結合型マキシザイム発現ベクターを HeLa 細胞に共発現させた場合にはルシフェラーゼ活性が抑制され、ABL-Luc ベクターと結合型マキシザイム発現ベクターを共発現させた場合には抑制されなかった。従って、再設計した結合型マキシザイムは細胞内で特異性を保持し目的配列を切断することが示された。また、結合型マキシザイムはその安定な発現系でも特異的な切断活性を示した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究で再構築した細胞 (大腸菌) を用いて活性型リボザイムを選抜するシステムは、細胞内環境に最も適した活性分子を選抜できる利点があり、新規高活性型リボザイム創出の一助になる。また本研究で作製・評価した結合型マキシザイムは、挿入したアンチセンス配列が細胞内で目的の構造を維持するモジュレーターとしての働きにより特異性を保持する新規な RNA 分子であり、細胞内高活性型リボザイム創出の一例を示すことができた。また結合型マキシザイムは、ダイマー型に比べて、1分子であることやプロモーターが1つのため細胞内での発現量の調節が容易なことから、遺伝子治療などへの応用にも有利であると考えられる。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。