

学位論文

R3C リガーゼリボザイムの Kissing-Loop を  
介した反応メカニズム解析と RNA 進化モデル

2021 年 3 月

濱地 心

# 目次

目次 .....	2
1 章. 序論 .....	4
1-1. セントラルドグマと RNA ワールド仮説	
1-2. RNA ワールドにおけるリガーゼリボザイムの重要性	
1-3. リガーゼリボザイムの種類と性能	
1-4. リガーゼリボザイムの活性部位とリガーゼタンパク質との共通点	
1-5. R3C リガーゼリボザイムに関する先行研究成果	
2 章. R3C リボザイムの 2 分子変異体の反応メカニズム解析 .....	11
2-1. R3C リボザイム先行研究結果への着目点	
2-2. 変異体の活性定量を用いたメカニズムの解析	
2-3. 5'および 3'末端の欠損/置換変異体の作製/活性定量	
2-4. Kissing-Loop 部分の置換変異体の作製/活性定量	
2-5. Kissing-Loop の欠損 (1 nt) 変異体の作製/活性定量	
2-6. Kissing-Loop の欠損 (2 nt) 変異体の作製/活性定量	
2-7. Kissing-Loop のもつ安定化エネルギーの定量化	
2-8. Kissing-Loop のもつ自由エネルギー効果と触媒活性の相関分析	
2-9. Kissing-Loop をトリガーとしたリボザイムの機能発現メカニズム仮説	
2-10. $\langle A \rangle + \langle \text{hairpin} - \Delta U \rangle$ の融合変異体の作製/活性定量	
2-11. 変異体を用いた $T_m$ 値の計測	
2-12. 変異体を用いた作用メカニズム検証における成果	
2-13. 自由エネルギーから考える $\langle A \rangle + \langle \text{hairpin} - \Delta U \rangle$ の二量体化形成	
2-14. リガーゼリボザイムの <i>in vivo</i> 環境における機能発現の可能性	
2-15. 速度論の観点でのリボザイム 2 分子反応の洞察	
2-16. 熱力学的な安定性とリボザイム活性の相関への考察	
3 章. Kissing-Loop 相互作用をトリガーとした短鎖 RNA の機能獲得モデルの構築 .....	32
3-1. 研究の目的	
3-2. tRNA の有する保存領域と先行研究	
3-3. tRNA の進化モデルの構築	
3-4. Kissing-Loop による長鎖化と機能獲得仮説の検証	
3-5. 変異体の作製	
3-6. mini-G3/U70 の Kissing-Loop 相互作用をトリガーとした二量体化の検証	

3-7. mini-G3/U70 二量体のアミノアシル化能の検証	
3-8. ミニヘリックス <sup>Ala</sup> と tRNA <sup>Ala</sup> のアミノアシル化能の比較	
3-9. FRET を用いた mini-G3/U70 のモノマー時コンフォメーションの確認	
3-10. エネルギー転移効率の理論値概算	
3-11. mini-G3/U70 の二量体の形成割合算出	
3-12. 短鎖 RNA の機能獲得モデル構築の成果	
3-13. 自由エネルギーから考える mini-G3/U70 の二量体化の割合	
3-14. 考察	
4 章. 総合考察 .....	50
4-1. 本研究の成果と意義	
4-2. RNA 間相互作用の豊富なバリエーション	
4-3. リボスイッチにおけるステムループのコンフォメーション変化の重要性	
4-4. RNA 2 分子モデルの核酸医薬設計への応用の可能性	
4-5. RNA ウイルスへの本成果の応用の可能性	
4-6. 本研究の位置づけ	
5 章. 材料と方法 .....	57
参考文献 .....	66
謝辞 .....	71

# 1章. 序論

## 1-1. セントラルドグマと RNA ワールド仮説

地球上における生命現象の発現は、「セントラルドグマ」という遺伝情報の流れに関する共通の概念に基づいている(Crick, 1958)。これは、DNA に保存された遺伝情報が RNA に転写され、それがタンパク質に翻訳されることで生命活動に必要な情報を一方向に伝達するという考え方である。生体内のあらゆる触媒反応は、アミノ酸で構成されたタンパク質酵素によってのみ制御されていると長い間考えられていた。しかし、グループ I イントロンや、RNaseP における M1 RNA による切断活性の発見により、RNA がタンパク質のように酵素活性を有することが示され、これらの RNA はリボザイムと称された(Kruger et al., 1982; Guerrier et al., 1983)。加えてセントラルドグマの核となる翻訳工程を司るリボソームの触媒活性部位がすべて RNA で構成していることがわかり(Nissen et al., 2000)、更に近年では、non-coding RNA と呼ばれる、タンパク質のコード情報を持たない特定の機能を有する RNA が数多く報告されるようになった。これら一連の RNA の機能は、タンパク質に匹敵する特異性を有するアプタマーから、様々な触媒活性まで実に多種多様である。こうした RNA の発見により、生命の起源においても「RNA 分子が現在の DNA やタンパク質の役割を担っていた」とする RNA ワールド仮説が、より現実味を伴って提唱されるようになった(Gilbert, 1986)。

## 1-2. RNA ワールドにおけるリガーゼリボザイムの重要性

RNA ワールド仮説の可能性を高めるにあたり、RNA 連結を触媒するリボザイムの存在は極めて重要である。原始地球環境下において、モンモリロナイトなどの負電荷を帯電しうる粘土の表面において、 $Mg^{2+}$ などの金属イオンを介して、20~50 ヌクレオチド (nt) の RNA を合成しえたことが既に報告されている(Ferris and Ertem, 1992, 1993; Kawamura and Ferris, 1994; Ferris, 2006) (図 1)。

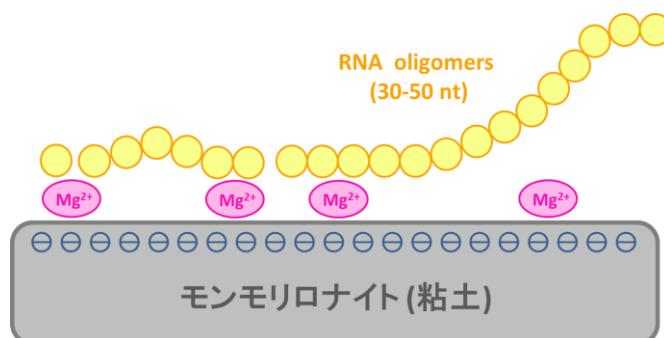


図 1. 粘土表面上での RNA 連結イメージ

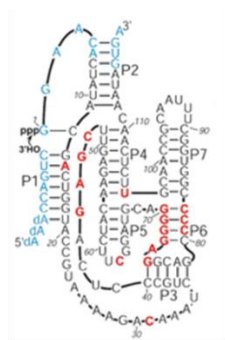


しかし、これまでに発見されているリボザイムなどの、機能を有する RNA はそのほとんどが 70~100 nt 以上であり、このことから RNA が何らかの機能を発揮するためには、然るべき長さを持ったヌクレオチドが必要である事が推測できる。そこで、粘土表面で生成した短鎖 RNA が、機能を有しうる長さまで伸長するために、RNA 同士を結合する連結反応（ライゲーション反応）が大きな役割を果たした可能性が考えられる。

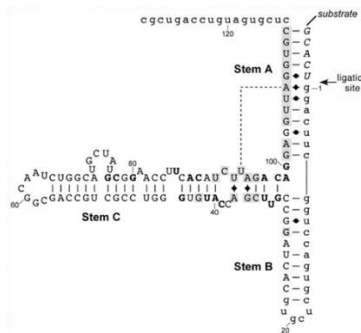
### 1-3. リガーゼリボザイムの種類と性能

既に、大きく 3 つのグループの RNA リガーゼリボザイムが分子進化工学的手法により創出されてきた。それらは、Class I リボザイム(Bergman et al., 2004)、L1 リボザイム(Robertson et al., 2007)、R3C リボザイム(Rogers and Joyce, 2001)である (図 2)。

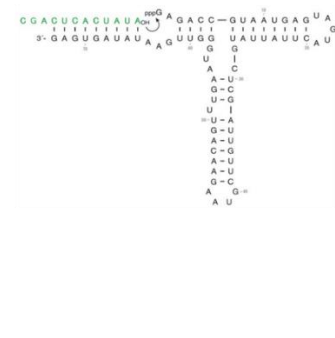
#### ○ Class I Ligase Ribozyme (119 nt)    ○ L1 Ligase Ribozyme (130 nt)    ○ R3C Ligase Ribozyme (73 nt)



Bergman et al., *RNA*, 2004.



Robertson et al., *Science*, 2007.



Rogers and Joyce, *RNA*, 2001.

図 2. 先行研究で報告されている 3 種類のリガーゼリボザイムの構造

このうち、Class I リボザイムは極めて活性が高く  $360 \text{ min}^{-1}$  と至適環境下においてはポリメラーゼなどの酵素と遜色ない性能を有する事が知られているが、その一方で、構造が複雑であり、また至適環境域が狭いことが特徴としてあげられる。これに対して、L1 リボザイムと R3C リボザイムは、Class I リボザイムに比べて活性は低い( $0.3 \text{ min}^{-1}$ )ものの、その構造は Class I リボザイムよりもシンプルである(Joyce, 2007)。特に、R3C リボザイムは 73 nt から構成され、原始地球上での RNA の進化の可能性を考える上で、一番あり得た構造体であると考えられる(Rogers and Joyce, 2001)。

## < R3C Ligase Ribozyme >

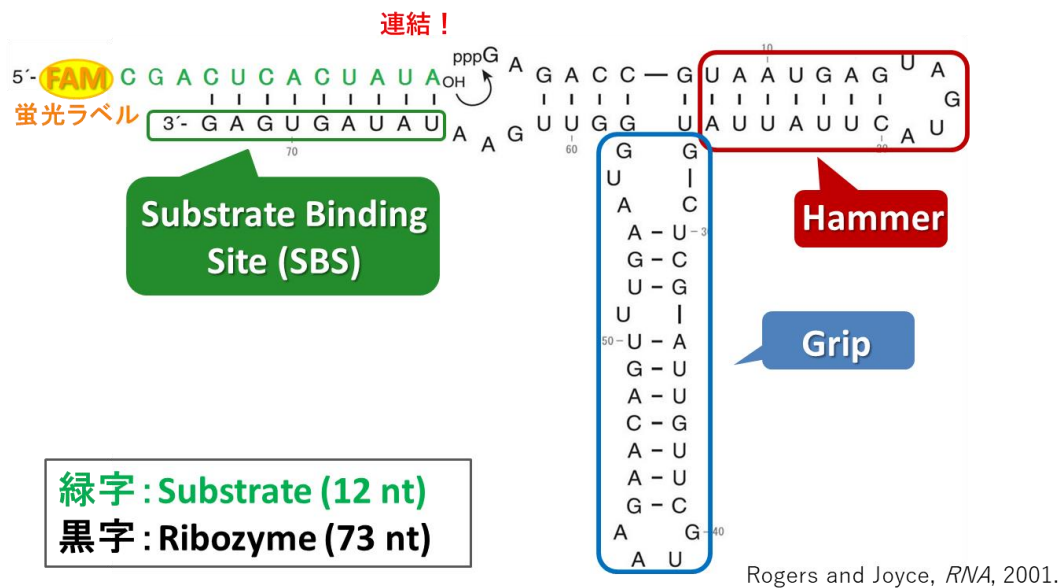


図 3. R3C リガーゼリボザイムの詳細構造

R3C リボザイムは Hammer と Grip の 2 つのステム領域を有し、また基質結合部位 (Substrate Binding Site) をプラットフォームとして基質と結合、基質 3'末端側の 3'-OH 基がリボザイム 5'側の  $\alpha$  位リン原子に求核攻撃することで、連結反応が起こる (図 3)。

この反応メカニズムは図 4 にも示す通り、基質側 3'末端の 3'-OH を H に変異させると、活性が大きく毀損することからも明らかである (Kurihara et al., 2014)。

## 反応点想定メカニズム

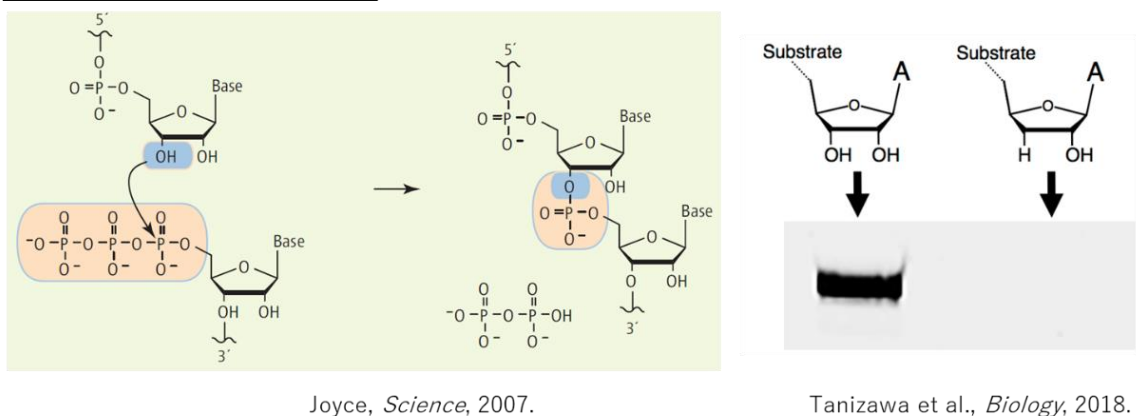


図 4. R3C リガーゼリボザイムの反応想定メカニズム

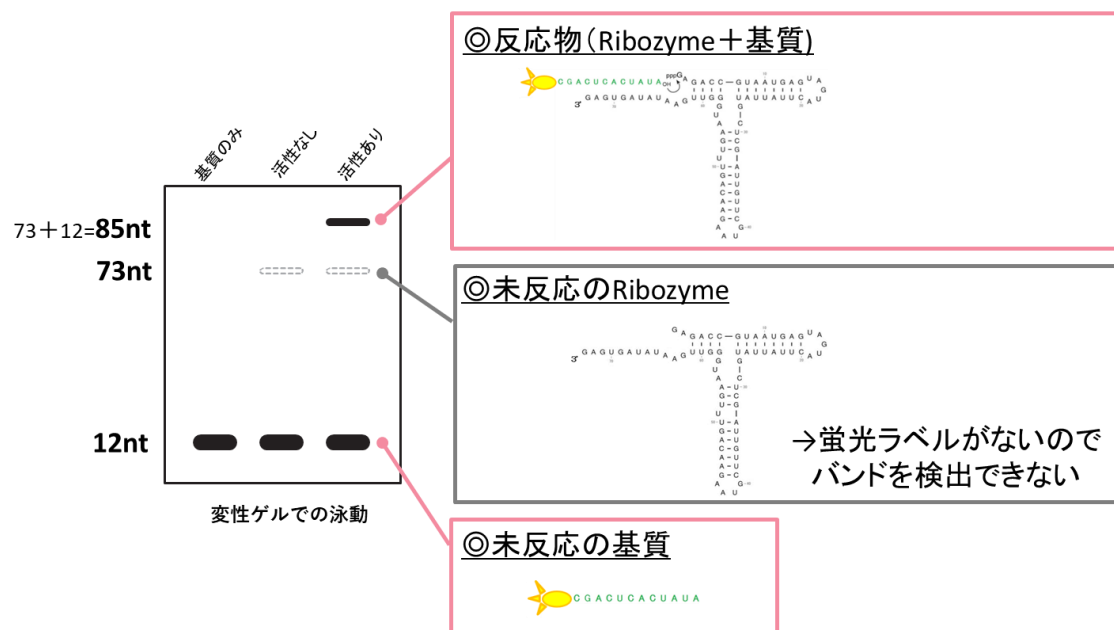
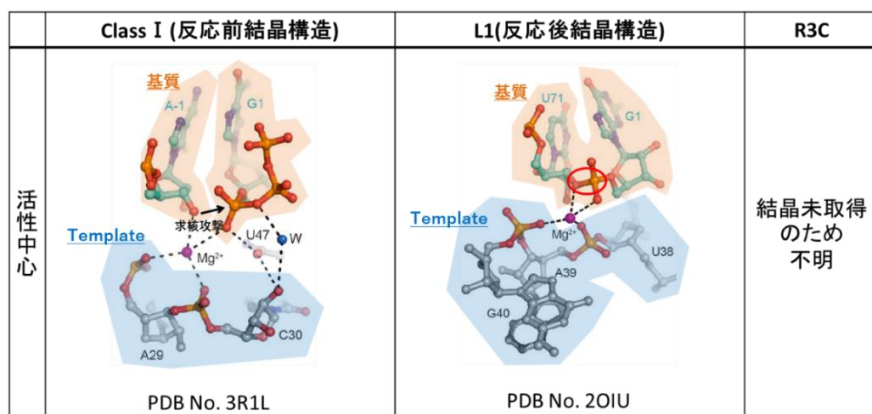


図 5. R3C リガーゼリボザイムの活性検出/定量の手法

図 5 に示すように、先行研究においては、R3C リガーゼリボザイムの活性を検出し、また定量化するために、基質に蛍光分子(6-FAM)を共有結合させたものを用いている。この基質を用いてリガーゼ反応を行った後、RNA を編成させて、電気泳動することにより、反応物のみを分離することができる。この反応物のバンドの濃淡を定量検出することで、リボザイムの触媒活性を相対的に比較することが可能になる。

#### 1-4. リガーゼリボザイムの活性部位とリガーゼタンパク質との共通点

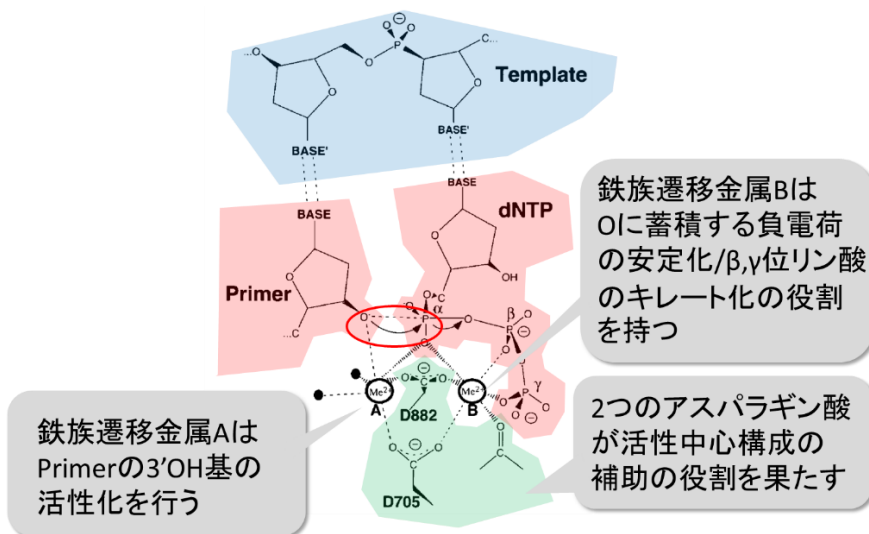
R3C リボザイム以外の Class I と L1 リボザイムはいずれも結晶構造解析により、活性部位が明らかにされている。これにより、いずれのリボザイムもリボザイム側の酸素原子が 2 つの  $Mg^{2+}$  とキレート化する事により活性中心を形成することがわかっている (図 6)。両  $Mg^{2+}$  はそれぞれ 3' 側の酸素原子の活性化と、攻撃対象となる 5' 側リン酸中の酸素原子をつり出すことで、リン原子への求核攻撃を促進していることがわかる (Scechner et al., 2009; Solvatierra et al., 2016)。



Solvaterra et al., *Science*, 2016.

図 6. リガーゼリボザイムの活性中心

この活性部位の構造はポリメラーゼなどのリガーゼ活性を有する酵素とも多くの共通点を有する。例として *Escherichia coli* の DNA ポリメラーゼ I の活性中心を示す(Steitz, 1999)。



Steitz, *The Journal of Biological Chemistry*, 1999.

図 7. *Escherichia coli* の DNA ポリメラーゼ I の活性中心

*E. coli* の DNA ポリメラーゼも活性中心として2つの金属イオンを有する。この鉄族遷移金属はそれぞれポリメラーゼ側のアルギニンによって活性点を形成し、リボザイムと同様に3'-OH基の活性化と、5'側のリン酸のキレート化の役割を果たす(図7)。

R3C リボザイムにおいては、結晶構造が解明できていないため、活性部位は不明なままだが、活性反応に  $Mg^{2+}$  を要求することから、両リボザイムと同様の活性部位を有している可能性があるといえる。

## 1-5. R3C リガーゼリボザイムに関する先行研究成果

これまでの R3C リガーゼリボザイムにおける先行研究において、全長 73 nt の R3C リボザイムを 46 nt まで縮小化する試みが行われた。しかし、この最小 R3C リボザイムは、原始地球においても存在しうる 50 nt 以下のサイズであるものの、全長 (73 nt) の活性を 100%とした場合、わずか 0.8%の活性しか有しなかった(Kurihara et al., 2014) (図 8)。

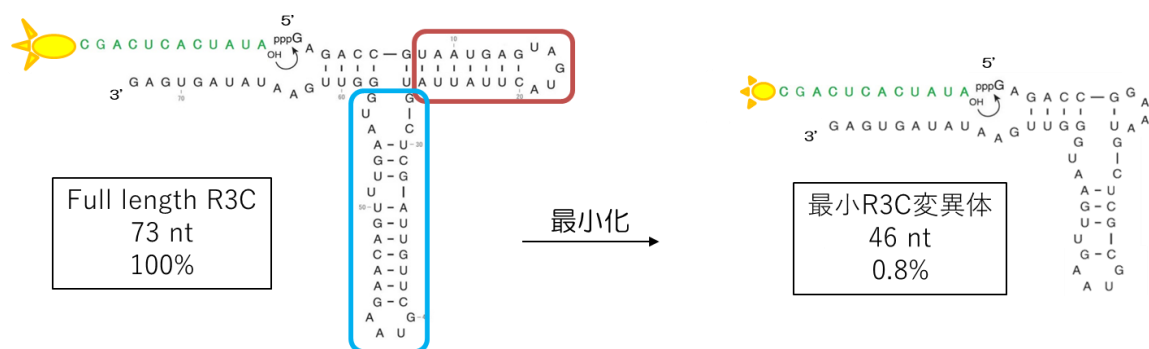


図 8. R3C リガーゼリボザイムの最小変異体

この縮小化した最小 R3C 変異体のループ部分に Kissing-Loop を形成する構造を導入した変異体<A>、<U>をそれぞれ作製し、それらを 1:1 の分子数比になるよう混合した 2 分子系を用いて、活性を定量した。すると、最小 R3C 変異体と比較して大幅な連結活性の上昇(R3C 全長比で 78%)が見られた(Tanizawa et al., 2018) (図 9)。

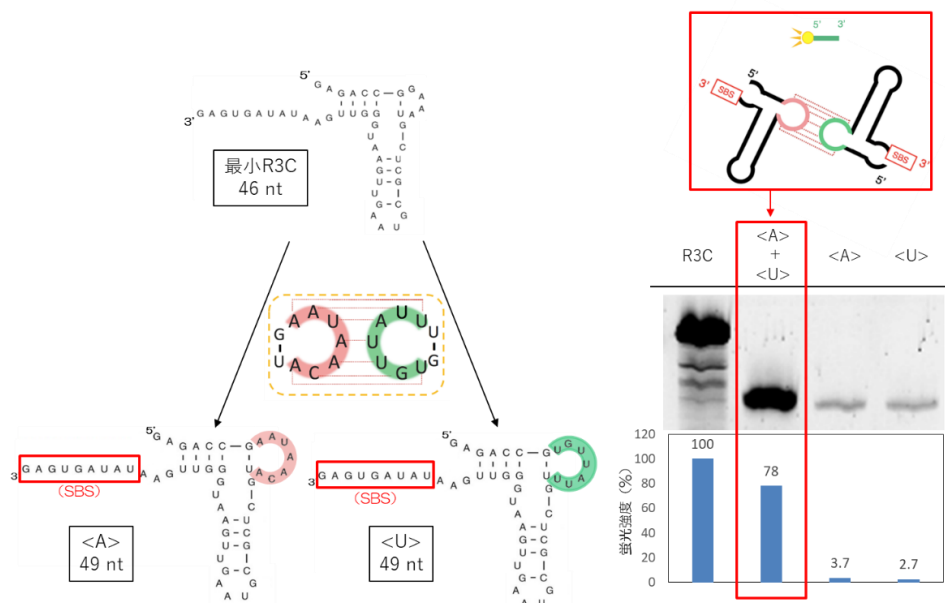


図 9. R3C リガーゼリボザイムの Kissing-Loop 変異体における活性上昇

これは2つの変異体の相補的な配列が、Kissing-Loop を介して複合体を形成することにより、何らかのコンフォメーションの変化が誘因されたためだと考えられるが、その詳細なメカニズムに関しては不明のままであった。そこでこの活性上昇のための必須要素をさらに絞り込むために、更に<A>から Grip 部分のステムを削った<hairpin-ΔA>と、<G>から Grip 部分、また Substrate Binding Site を削った<hairpin-ΔU>を作製し、以下の4ペアの2分子系でそれぞれ活性の定量を行った(Tanizawa et al., 2018) (図 10)。

ペア 1. <A> + <U>

ペア 2. <A> + <hairpin-ΔU>

ペア 3. <hairpin-ΔA> + <U>

ペア 4. <hairpin-ΔA> + <hairpin-ΔU>

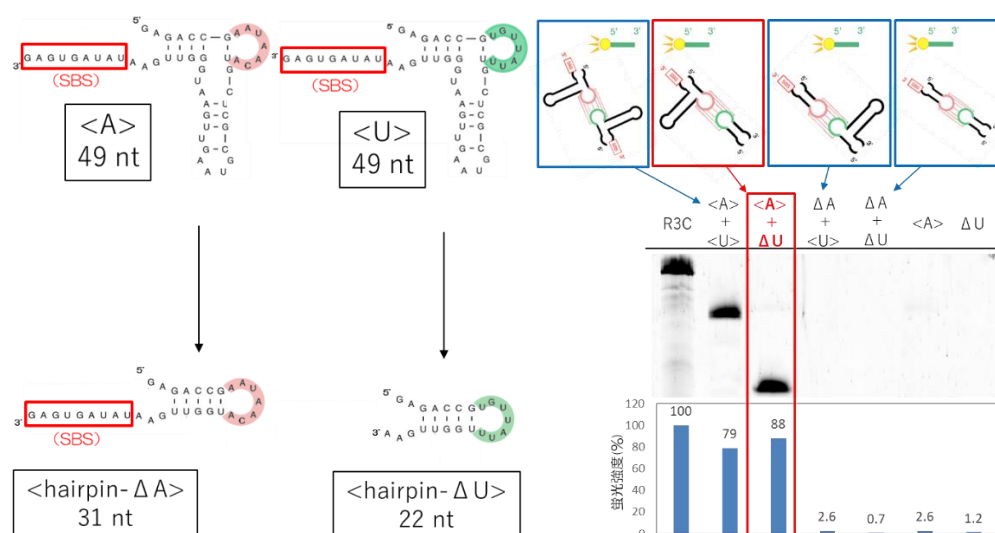


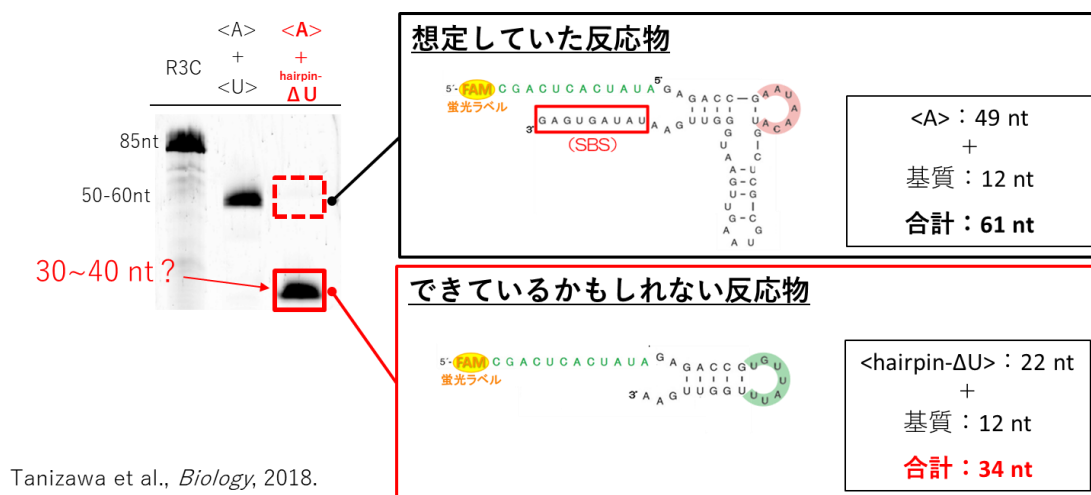
図 10. R3C リガーゼリボザイム Kissing-Loop 変異体の最小化

その結果、ペア 2. <A> + <hairpin-ΔU>のみが、<A> + <U>と比較しても活性が維持されていることが分かった (図 11)。これは<A>の Grip が活性維持のために何らか重要な役割を担っていることを示していると考察がなされている。またこの際、配列の大部分が同一の<U>と<hairpin-ΔA>のペアにおいて、なぜ活性がないのかについて、先行研究では議論がなされていない。

## 2章. R3C リボザイムの 2 分子変異体の反応メカニズム解析

### 2-1. R3C リボザイム先行研究結果への着目点

第 1 章で述べた R3C リボザイムの先行研究において、筆者は新たな着目を行った。それは、 $\langle A \rangle + \langle \text{hairpin-}\Delta U \rangle$  の 2 分子系において、想定される反応物よりも低い位置にバンドが出ているという事である。 $\langle A \rangle + \langle \text{hairpin-}\Delta U \rangle$  においては、Substrate Binding Site (SBS) は  $\langle A \rangle$  側のみに有するため、基質は SBS を介して  $\langle A \rangle$  側に結合していると考えられる。その場合の反応物は  $\langle A \rangle: 49 \text{ nt} + \text{基質}: 12 \text{ nt} = 61 \text{ nt}$  であると考えられるが、実際に反応物としてバンドが出ているのはそれより低分子側であった。そのことから基質は  $\langle \text{hairpin-}\Delta U \rangle$  に結合しているのではないかという可能性が考えられた (図 10)。



Tanizawa et al., *Biology*, 2018.

図 11. R3C リガーゼリボザイム Kissing-Loop 変異体の先行研究への着目点

しかし、その場合、SBS を持たない  $\langle \text{hairpin-}\Delta U \rangle$  がいかにして基質と結合したのか、Kissing-Loop 相互作用はその反応にどのようにかかわっているのかなどは一切不明な状態であった。そこで本研究では  $\langle A \rangle + \langle \text{hairpin-}\Delta U \rangle$  における SBS に依存しない 2 分子反応系のメカニズムの解明を目的に研究を行った。

### 2-2. 変異体の活性定量を用いたメカニズムの解析

本研究においては、アプローチとして変異体を作製し、その活性の定量化を行うことで、活性に必須な部分とそのメカニズムを特定する手法を採用した。本手法において、先行研究から重要だと思われる Kissing-Loop 部分を含む、以下の 3 つの観点を検討した変異体の作製と、活性定量を行う事とした (図 12)。



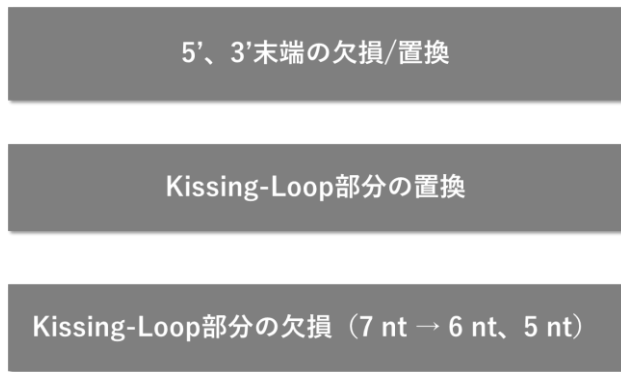


図 12. 変異体作製における 3つのアプローチ

### 2-3. 5'および 3'末端の欠損/置換変異体の作製/活性定量

活性に重要な部位の特定のために、<hairpin-ΔU>の 5'、3'末端をそれぞれ、1、2 nt 欠損させた変異体、また<A>の SBS 近傍の塩基を置換した変異体を作製し、活性の定量を行った (図 13)。

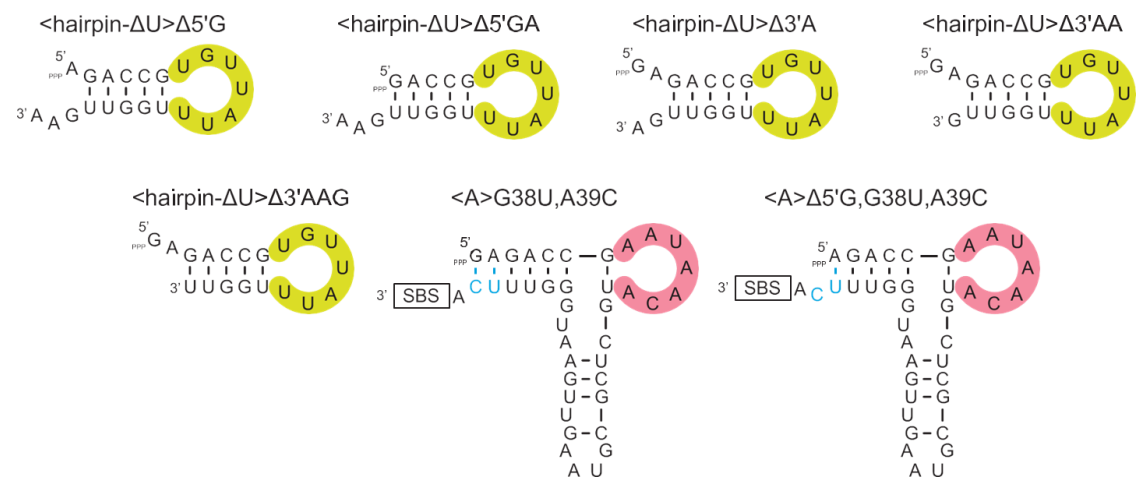


図 13. 5'、3'末端の欠損/置換変異体の構造

その結果を以下に示す。なお、活性は<A> + <hairpin-ΔU>を 100%とした際の相対値として算出を行った。結果、<hairpin-ΔU>の 5'末端欠損変異体は活性が大幅に低下した一方、3'末端の欠損変異体に大きな活性の変化は見られなかった。また<A>の SBS 近傍の塩基を置換した変異体においては、活性が大幅に低下した (図 14)。





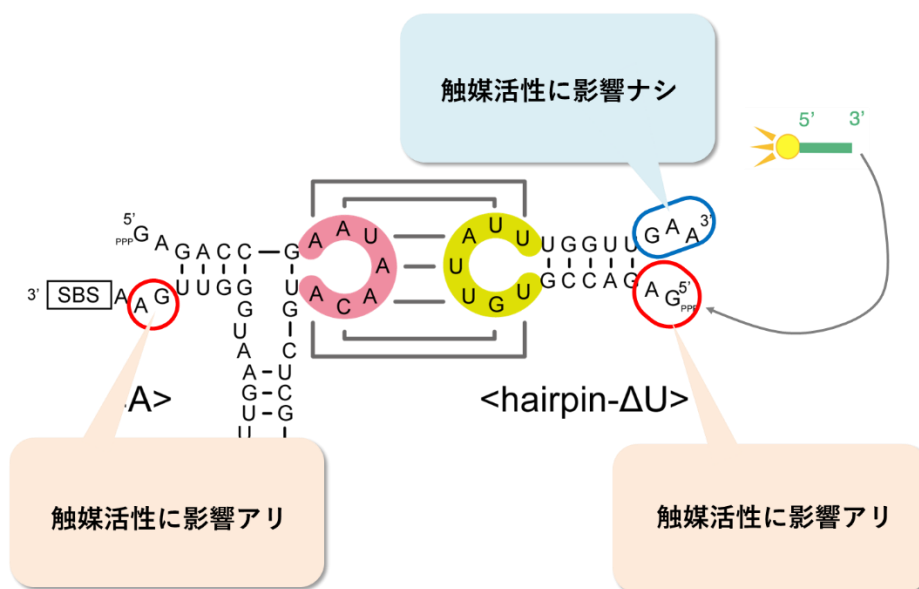


図 16. 5'、3'末端の欠損/置換変異体の結果考察

## 2-4. Kissing-Loop 部分の置換変異体の作製/活性定量

活性上昇の必須な要素である Kissing-Loop 部分の中央 3 塩基を置換した変異体を作製し活性の定量を行った (図 17)。

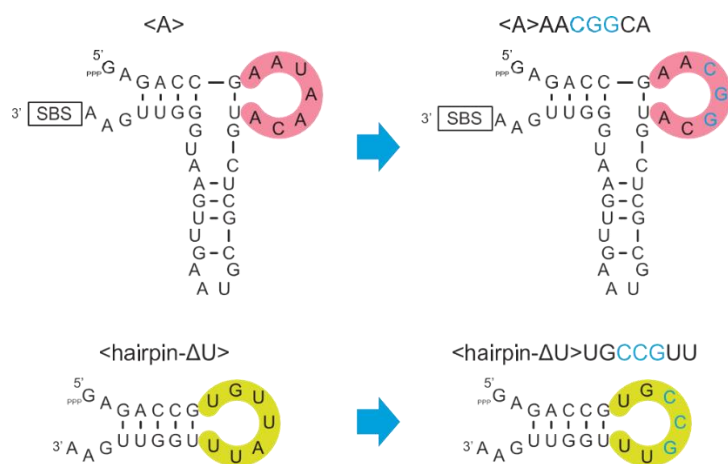


図 17. Kissing-Loop 部分の置換変異体の構造

その結果を以下に示す。なお、活性は<A> + <hairpin-ΔU>を 100%とした際の相対値として算出を行った。結果、Kissing-Loop においてペアとなる塩基対数が少なくなったものでは大幅な活性の低下が確認された。一方で当初のペアとは異なるものの、Kissing-Loop に

において、ペアの塩基対数が7塩基のままだったものでは活性が高いレベルで維持された（図18、19）。

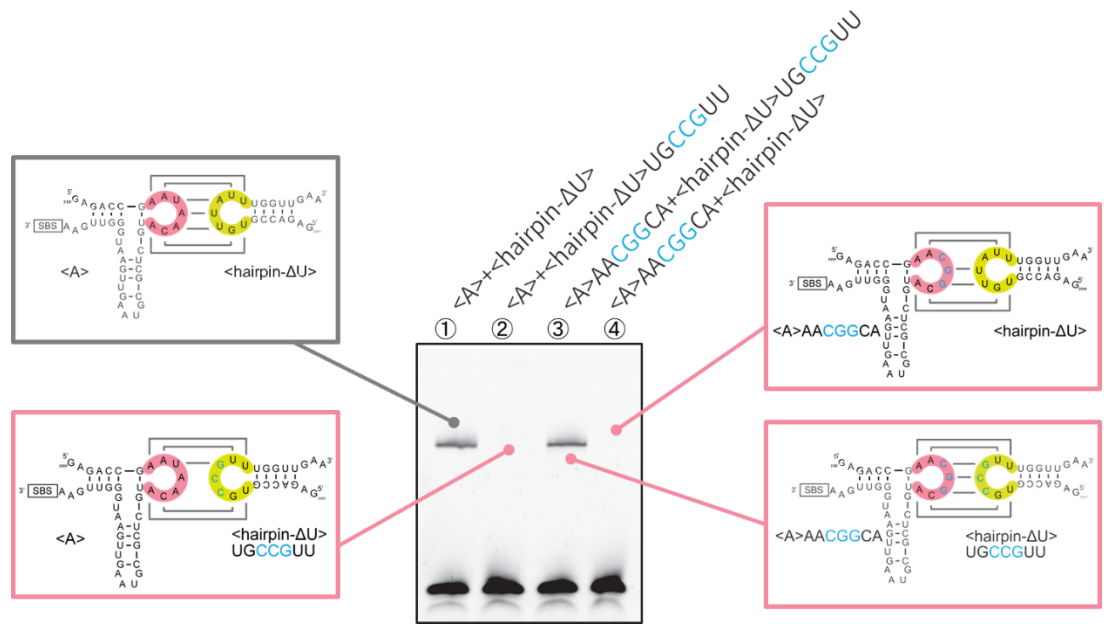


図 18. Kissing-Loop 部分の置換変異体の触媒反応結果

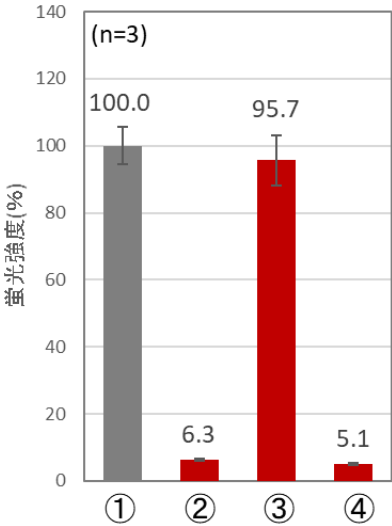


図 19. Kissing-Loop 部分の置換変異体の活性定量  
(3 回の独立した実験を行い、実験誤差を算出した。)

この結果により、Kissing-Loop のペアの塩基対数が活性に大きな影響を与えており、なおかつペアとなる塩基対の種類は活性に影響を及ぼさない事が判明した（図 20）。

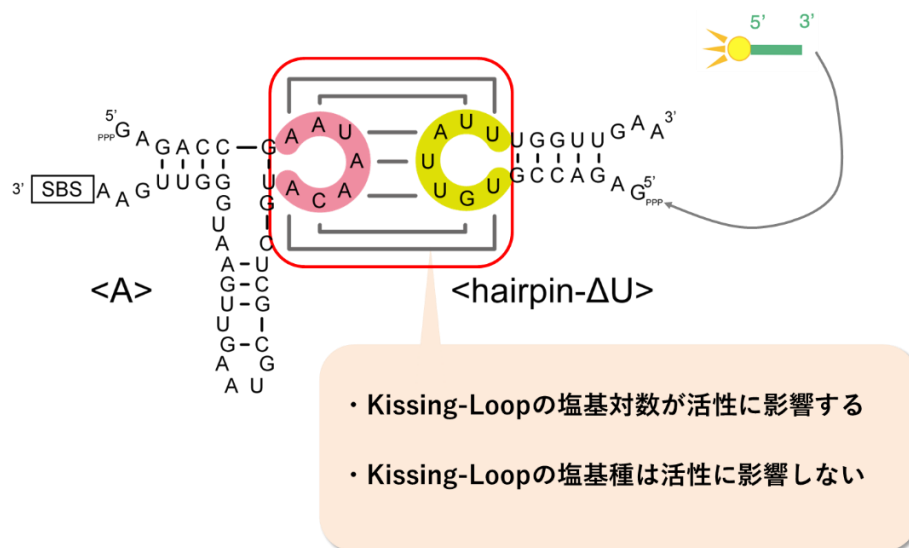


図 20. Kissing-Loop 部分の置換変異体の結果考察

## 2-5. Kissing-Loop の欠損（1 nt）変異体の作製/活性定量

更に Kissing-Loop 部分の重要性を検証するために、Kissing-Loop 部分の 5'側と 3'側をそれぞれ 1 nt ずつ欠損させた変異体を作製し活性の定量を行った（図 21）。

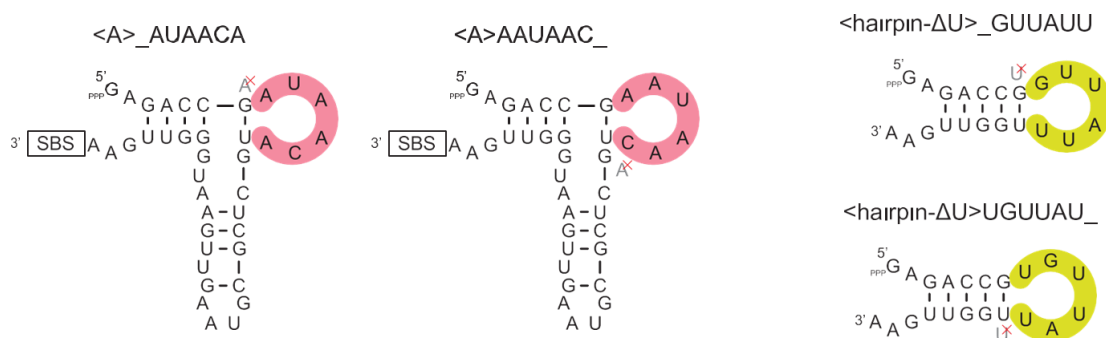


図 21. Kissing-Loop の欠損（1 nt）変異体の構造

その結果を以下に示す。なお、活性は<A> + <hairpin-ΔU>を 100%とした際の相対値として算出を行った。結果、7 塩基の Kissing-Loop ペアがあるものに比べ、6 塩基になったものでは全体的な活性の低下がみられた。また、Kissing-Loop においてペアとなる塩基対数が少なくなったものでは大幅な活性の低下が確認された（図 22、23）。

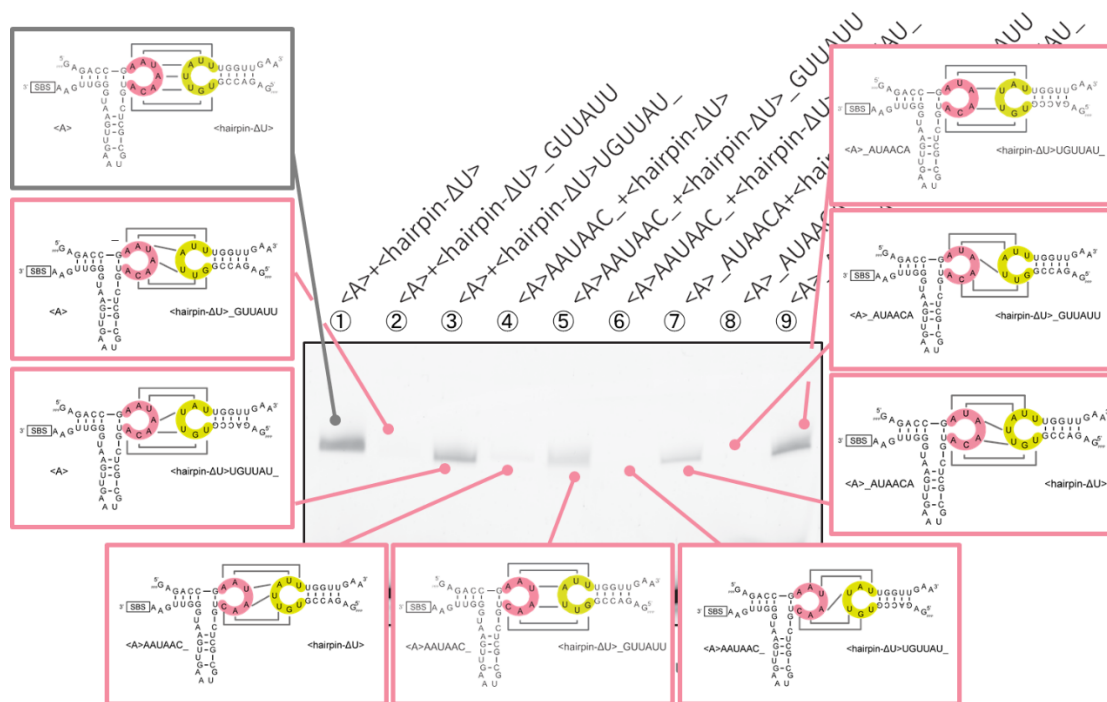


図 22. Kissing-Loop の欠損 (1 nt) 変異体の触媒反応結果

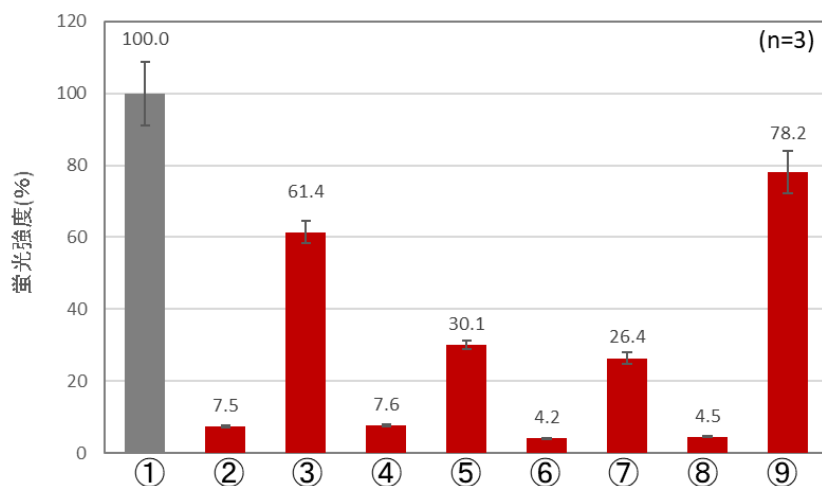


図 23. Kissing-Loop の欠損 (1 nt) 変異体の活性定量  
(3 回の独立した実験を行い、実験誤差を算出した。)

## 2-6. Kissing-Loop の欠損 (2 nt) 変異体の作製/活性定量

更に Kissing-Loop 部分の重要性を検証するために、Kissing-Loop 部分の 5'側と 3'側を 1 nt ずつ両方欠損させた 2 nt 欠損変異体を作製し活性の定量を行った (図 24)。

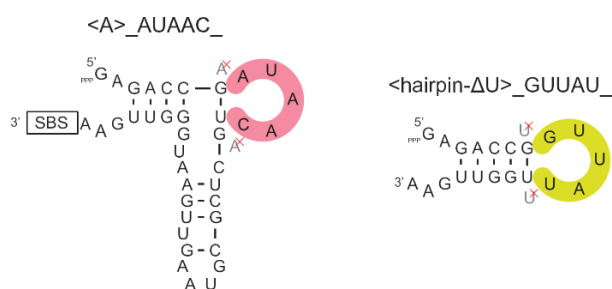


図 24. Kissing-Loop の欠損 (2 nt) 変異体の構造

結果を以下に示す。なお、活性は<A>+<hairpin-ΔU>を 100%とした際の相対値として算出を行った。結果、7 塩基の Kissing-Loop ペア、6 塩基のペアがあるものに比べ、5 塩基になったものでは更に活性が低下しているのがみられた。また、Kissing-Loop においてペアとなる塩基対数が少なくなったものでは大幅な活性の低下が確認された (図 25、26)。

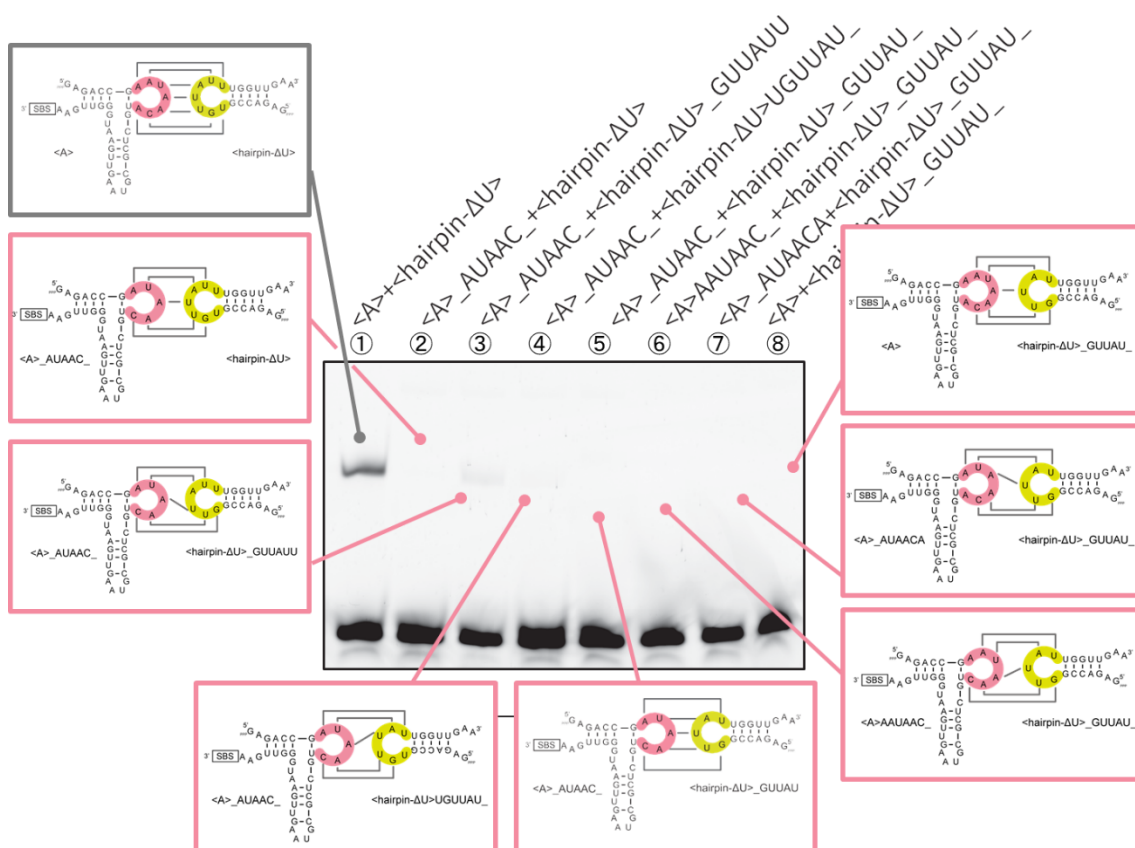


図 25. Kissing-Loop の欠損 (2 nt) 変異体の触媒反応結果  
(3 回の独立した実験を行い、実験誤差を算出した。)

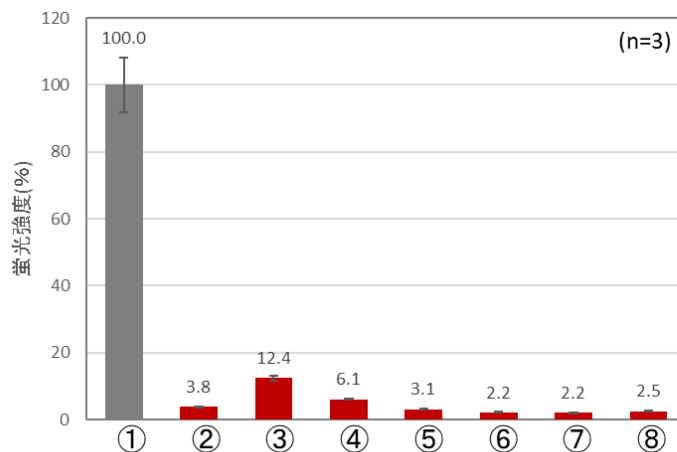


図 26. Kissing-Loop の欠損（2 nt）変異体の活性定量  
（3 回の独立した実験を行い、実験誤差を算出した。）

これにより、Kissing-Loop のペア塩基数が活性に直接的な影響を及ぼすことが判明した（図 27）。

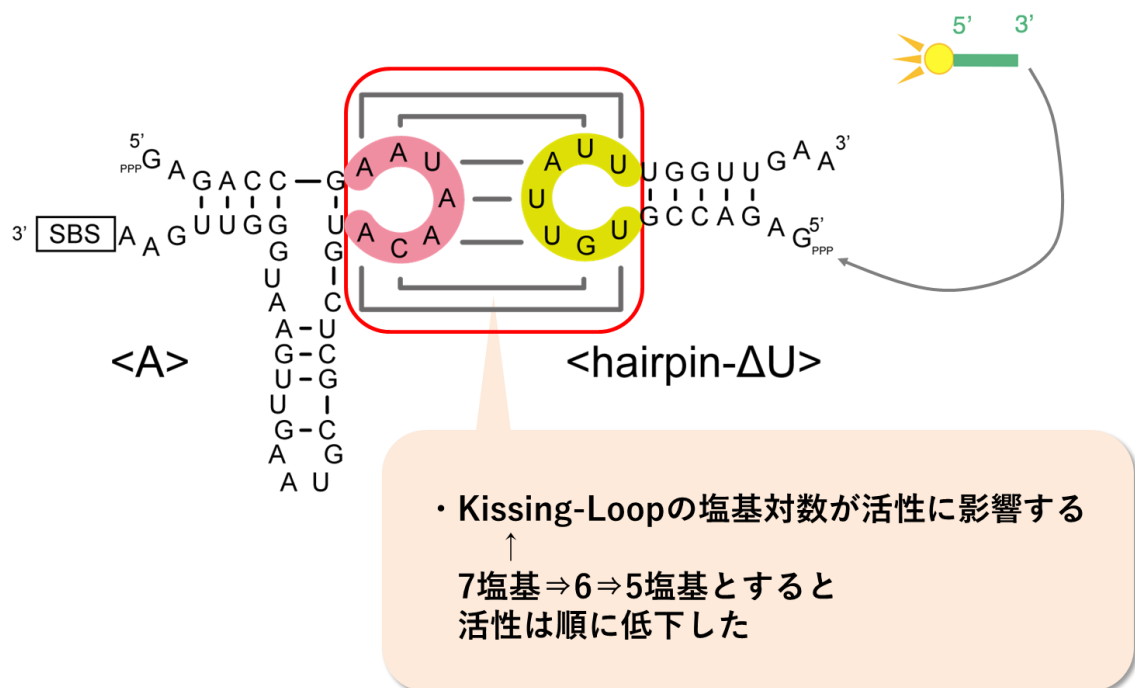


図 27. Kissing-Loop の欠損（2 nt）変異体の結果考察

## 2-7. Kissing-Loop のもつ安定化エネルギーの定量化

これらの変異体の活性定量結果から、触媒活性にとって Kissing-Loop 相互作用のもつ安定性効果がクリティカルである事が示唆された。そこでこの結果に、より定量的な解析を加えるために、Kissing-Loop の持つ熱力学的な安定性効果を自由エネルギーにより定量した。その際に 1973 年の Tinoco Jr.らの論文に記載のある RNA のベースペア並び/内部ループ/バルジループ/ヘアピンループごとの自由エネルギーの数値を参考にした(Tinoco Jr. et al., 1973) (図 28)。

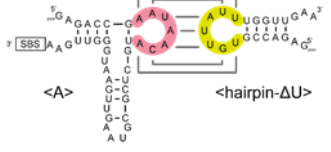
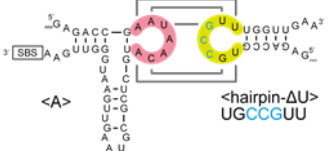
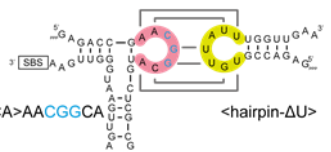
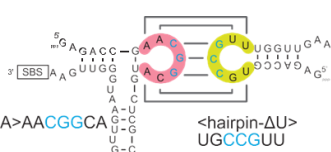
Base paired regions	$\Delta G(\text{kcalorie}) \pm 10\%$	Unbonded regions Number of bases unbonded	$\Delta G(\text{kcalorie}) \pm 1 \text{ kcalorie}$
$\begin{array}{c} \overrightarrow{\text{A}}-\overrightarrow{\text{A}}- \\ \vdots \\ \overleftarrow{\text{U}}-\overleftarrow{\text{U}}- \end{array}$	-1.2	2-6 7-20 m (> 20)	Interior loops +2 +3 +1+2 log m
$\begin{array}{c} \overrightarrow{\text{A}}-\overrightarrow{\text{U}}- \quad \overrightarrow{\text{U}}-\overrightarrow{\text{A}}- \\ \vdots \quad \quad \quad \vdots \\ \overleftarrow{\text{U}}-\overleftarrow{\text{A}}- \quad \overleftarrow{\text{A}}-\overleftarrow{\text{U}}- \end{array}$	-1.8	1 2-3 4-7 8-20 m (> 20)	Bulge loops +3 +4 +5 +6 +4+2 log m
$\begin{array}{c} \overrightarrow{\text{A}}-\overrightarrow{\text{C}}- \quad \overrightarrow{\text{C}}-\overrightarrow{\text{A}}- \quad \overrightarrow{\text{A}}-\overrightarrow{\text{G}}- \quad \overrightarrow{\text{G}}-\overrightarrow{\text{A}}- \\ \vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \\ \overleftarrow{\text{U}}-\overleftarrow{\text{G}}- \quad \overleftarrow{\text{G}}-\overleftarrow{\text{U}}- \quad \overleftarrow{\text{U}}-\overleftarrow{\text{C}}- \quad \overleftarrow{\text{C}}-\overleftarrow{\text{U}}- \end{array}$	-2.2		Hairpin loops Closed by G·C Closed by A·U
$\begin{array}{c} \overrightarrow{\text{C}}-\overrightarrow{\text{G}}- \\ \vdots \\ \overleftarrow{\text{G}}-\overleftarrow{\text{C}}- \end{array}$	-3.2	3 4-5 6-7 8-9 10-30 m (> 30)	+8 +5 +4 +5 +6 3.5+2 log m
$\begin{array}{c} \overrightarrow{\text{G}}-\overrightarrow{\text{C}}- \quad \overrightarrow{\text{C}}-\overrightarrow{\text{G}}- \\ \vdots \quad \quad \quad \vdots \\ \overleftarrow{\text{C}}-\overleftarrow{\text{G}}- \quad \overleftarrow{\text{G}}-\overleftarrow{\text{C}}- \end{array}$	-5.0		+7 +6 +7 +8 5.5+2 log m
$\begin{array}{c} \overrightarrow{\text{G}}-\overrightarrow{\text{U}}- \\ \vdots \\ \overleftarrow{\text{U}}-\overleftarrow{\text{G}}- \end{array}$	-0.3		
$\begin{array}{c} \overrightarrow{\text{G}}-\overrightarrow{\text{X}}- \quad \overrightarrow{\text{X}}-\overrightarrow{\text{G}}- \\ \vdots \quad \quad \quad \vdots \\ \overleftarrow{\text{U}}-\overleftarrow{\text{Y}}- \quad \overleftarrow{\text{Y}}-\overleftarrow{\text{U}}- \end{array}$	0		

図 27. RNA のベースペア並び/内部ループ/バルジループ/ヘアピンループごとの自由エネルギーの数値

これをもとに、それぞれの変異体ごとの Kissing-Loop 部分の持つ自由エネルギーの算出を行った。その結果を以下に示す。まず、<A>+<hairpin- $\Delta U$ >のペアのもつ Kissing-Loop 部の熱力学的安定性を算出した。結果、自由エネルギーは-10.4 kcal/mol となった。これをベースに、表 1 では Kissing-Loop の置換変異体 3 種類の Kissing-Loop 部の持つ自由エネルギーを算出した。その結果、Kissing-Loop を置換し、ペアが少なくなったものでは自由エネルギーのもつ安定性効果が低下していることが確認できた。またもともとのペアとは異なるものの、Kissing-Loop のペアを組んだケース (No. 4) では自由エネルギーのもつ安定性効果は高く、また、触媒活性も高いレベルで維持されている事が確認できた。



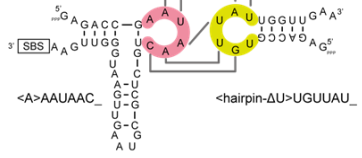
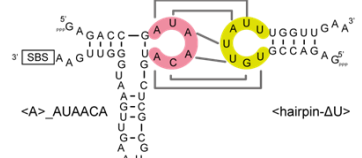
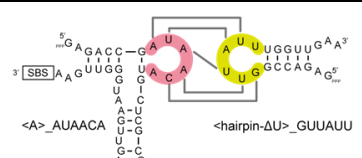
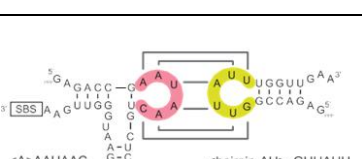
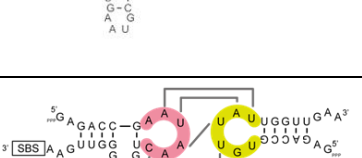
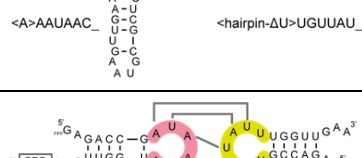
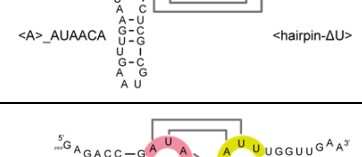
表 1. <A> + <hairpin-ΔU> と Kissing-Loop 置換変異体の活性  
/Kissing ループ配列/自由エネルギー値

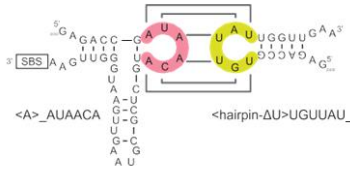
No	変異体コンポジション	触媒活性	Kissing-Loop 部分	自由エネルギー
1	 <A>                      <hairpin-ΔU>	100%	5'—U G U U A U U—3' 3'—A C A A U A A—5'	-10.4 kcal/mol
2	 <A>                      <hairpin-ΔU> UGCGUU	6.3%	5'—U G C C G U U—3' 3'—A C A A U A A—5'	-1.4 kcal/mol
3	 <A>AACGGCA                      <hairpin-ΔU>	5.1%	5'—U G U U A U U—3' 3'—A C G G C A A—5'	-1.4 kcal/mol
4	 <A>AACGGCA                      <hairpin-ΔU> UGCGUU	95.7%	5'—U G C C G U U—3' 3'—A C G G C A A—5'	-18.4 kcal/mol

つづいて Kissing-Loop を 7 nt から 6 nt にそれぞれ 1 nt 欠損させた変異体においても同様の手法で Kissing-Loop 部の熱力学的安定性を算出した。その結果を表 2 に示す。1 nt の Kissing-Loop 欠損変異体では、いずれのペアにおいても、<A> + <hairpin-ΔU> のペアと比較して、安定性効果が低下していることが自由エネルギーの値から確認できる。

また触媒活性の値と自由エネルギーの値を確認すると、自由エネルギーによる安定性効果が比較的保持できているペアでは触媒活性が高く、一方保持できていないペアでは触媒活性が低くなっていることも確認できた。

表 2. Kissing-Loop 欠損 (1 nt) 変異体の活性/Kissing ループ配列/自由エネルギー値

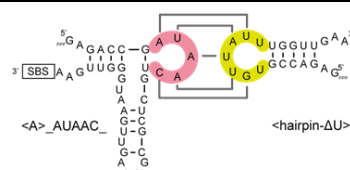
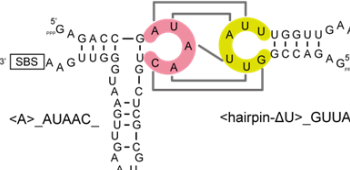
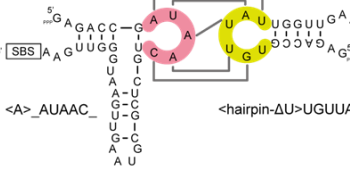
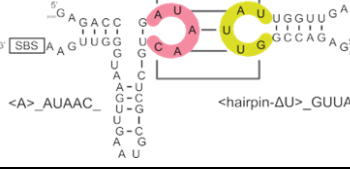
No	変異体コンポジション	触媒活性	Kissing-Loop 部分	自由エネルギー
1	 <p>5' GAGACC-G 3' UUGG-GUAU &lt;A&gt;AAUAAC_ &lt;hairpin-ΔU&gt;UGUUAU_</p>	7.5%	<p>5'—UGUUAU—3' 3'—CAAUAA—5'</p>	-5.2 kcal/mol
2	 <p>5' GAGACC-G 3' UUGG-GUAU &lt;A&gt;_AUAACA &lt;hairpin-ΔU&gt;</p>	61.4%	<p>5'—UGUUAUU—3' 3'—ACAAUA—5'</p>	-6.2 kcal/mol
3	 <p>5' GAGACC-G 3' UUGG-GUAU &lt;A&gt;_AUAACA &lt;hairpin-ΔU&gt;_GUUAUU</p>	7.6%	<p>5'—GUUAUU—3' 3'—ACAAUA—5'</p>	-5.2 kcal/mol
4	 <p>5' GAGACC-G 3' UUGG-GUAU &lt;A&gt;AAUAAC_ &lt;hairpin-ΔU&gt;_GUUAUU</p>	30.1%	<p>5'—UGUUAU—3' 3'—ACAAUA—5'</p>	-8.2 kcal/mol
5	 <p>5' GAGACC-G 3' UUGG-GUAU &lt;A&gt;AAUAAC_ &lt;hairpin-ΔU&gt;UGUUAU_</p>	4.2%	<p>5'—UGUUAU—3' 3'—CAAUAA—5'</p>	-1.0 kcal/mol
6	 <p>5' GAGACC-G 3' UUGG-GUAU &lt;A&gt;_AUAACA &lt;hairpin-ΔU&gt;</p>	26.4%	<p>5'—UGUUAUU—3' 3'—ACAAUA—5'</p>	-6.2 kcal/mol
7	 <p>5' GAGACC-G 3' UUGG-GUAU &lt;A&gt;_AUAACA &lt;hairpin-ΔU&gt;_GUUAUU</p>	4.5%	<p>5'—GUUAUU—3' 3'—ACAAUA—5'</p>	-1.0 kcal/mol

8		78.2%	5'—UGUUAU—3' 3'—ACAAUA—5'	-9.2 kcal/mol
---	---	-------	------------------------------	---------------

更に Kissing-Loop を 7 nt から 5 nt にそれぞれ 2 nt 欠損させた変異体においても同様の手法で Kissing-Loop 部の熱力学的安定性を算出した。その結果を表 3 に示す。

2 nt の Kissing-Loop 欠損変異体では、いずれのペアにおいても、<A>+<hairpin-ΔU>のペア、また 1 nt 欠損変異体の各ペアと比較して、更に安定性効果が低下していることが自由エネルギーの値から確認できる。触媒活性の値と自由エネルギーの値においても、自由エネルギーによる安定性効果が保持できていないことから、触媒活性は更に低くなっていることも確認できた。

表 3. Kissing-Loop 欠損（2 nt）変異体の活性/Kissing ループ配列/自由エネルギー値

No	変異体コンポジション	触媒活性	Kissing-Loop 部分	自由エネルギー
1		3.8%	5'—UGUUAUU—3' 3'—CAAUA—5'	-1.0 kcal/mol
2		12.4%	5'—GUUAUU—3' 3'—CAAUA—5'	-4.0 kcal/mol
3		6.1%	5'—UGUUAU—3' 3'—CAAUA—5'	-4.0 kcal/mol
4		3.1%	5'—GUUAU—3' 3'—CAAUA—5'	-7.0 kcal/mol

5	<p>5'-GAGAC-3' 3'-AUAAC-5'</p> <p>&lt;A&gt;AAUAAC_      &lt;hairpin-ΔU&gt;_GUUAU_</p>	4.2%	<p>5'- GUUAU -3' 3'- CAAUA -5'</p>	-1.0 kcal/mol
6	<p>5'-GAGAC-3' 3'-AUAACA-5'</p> <p>&lt;A&gt;_AUAACA      &lt;hairpin-ΔU&gt;_GUUAU_</p>	26.4%	<p>5'- GUUAU -3' 3'- ACAAUA -5'</p>	-6.2 kcal/mol
7	<p>5'-GAGAC-3' 3'-A-5'</p> <p>&lt;A&gt;      &lt;hairpin-ΔU&gt;_GUUAU_</p>	4.5%	<p>5'- GUUAU -3' 3'- ACAAUA -5'</p>	-1.0 kcal/mol

## 2-8. Kissing-Loop のもつ自由エネルギー効果と触媒活性の相関分析

表 1 から表 3 において算出した自由エネルギーの値と活性値の相関性について R を用いた回帰分析を行った。その結果を図 29 に示す。解析の結果、p 値が非常に 0 に近いことから、x 軸の自由エネルギーの値と y 軸の触媒活性の値は強い相関を示し、1%の有意検定をクリアしている事がわかる。更にその回帰曲線は S 字を描くシグモイド関数の式ともっともフィットすることが明らかになった。これはこの R3C リボザイムの 2 分子変異体の触媒活性が、Kissing-Loop の持つ熱力学的安定性に支配されている事を明確に示す証拠となる。

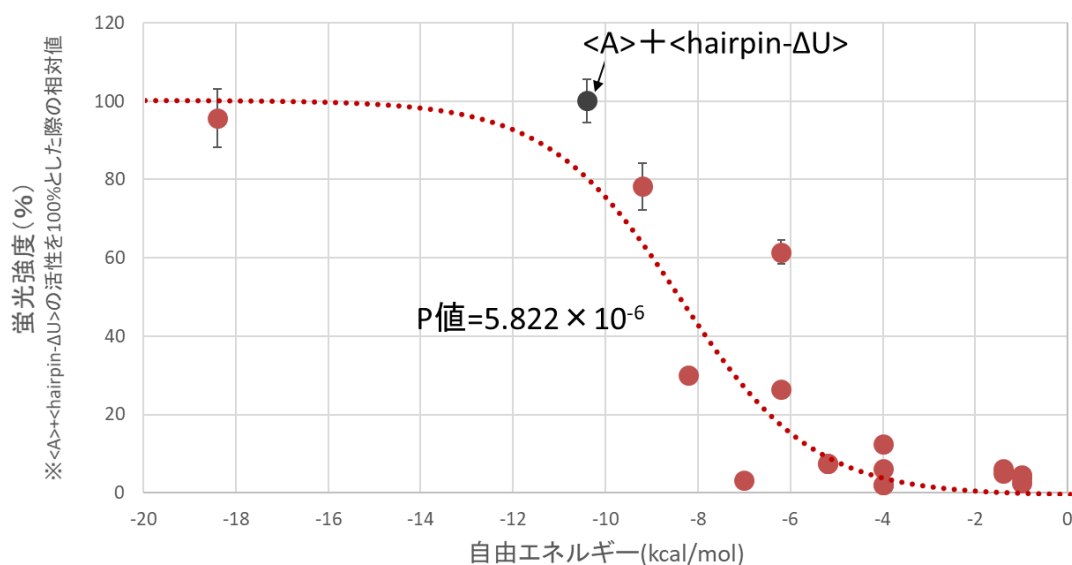


図 29. Kissing-Loop 変異体のもつ自由エネルギー効果と触媒活性の相関分析

## 2-9. Kissing-Loop をトリガーとしたリボザイムの機能発現メカニズム仮説

2-6 での結果から、R3C リボザイムの 2 分子変異体の触媒活性が、Kissing-Loop の持つ熱力学的な安定性に支配されている事が明らかになった。この結果をもとに、著者は Kissing-Loop をトリガーとして何らかのコンフォメーション変化が起きており、その変化によってはじめてリボザイムとしての機能発現が可能になっているのではないかと考え、仮説を立案した (図 30)。

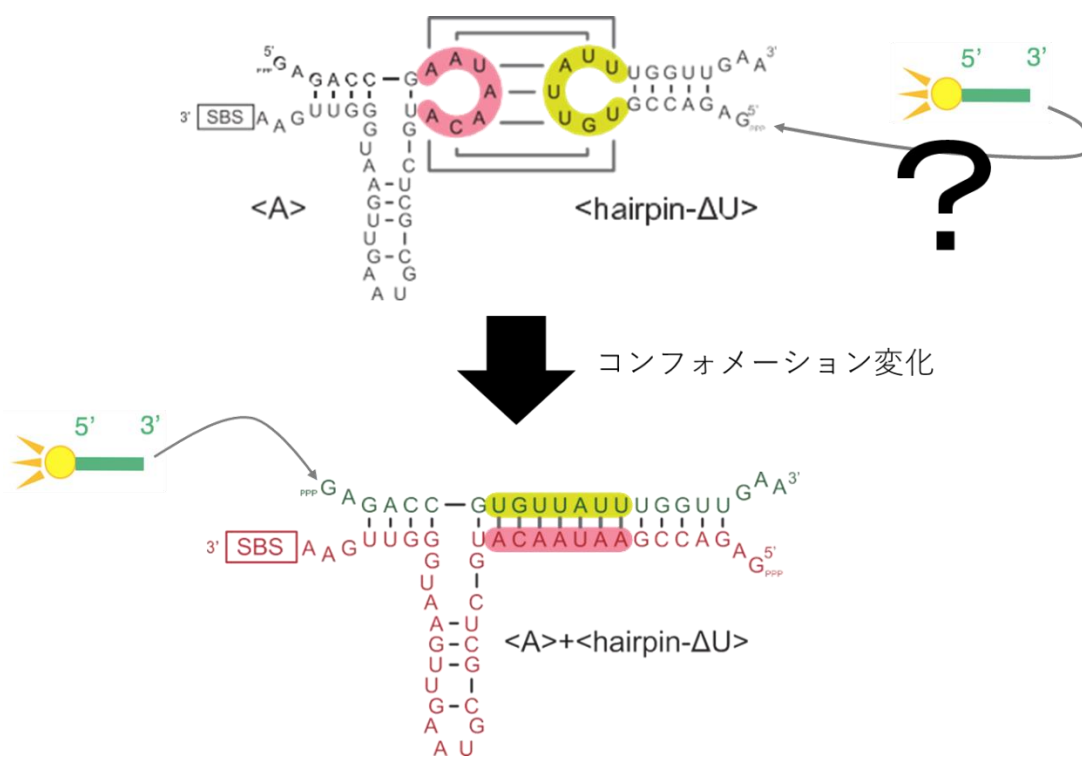


図 30. Kissing-Loop をトリガーとした機能メカニズム仮説

この仮説が正しければ、R3C リボザイムにおける機能発現は Kissing-Loop をトリガーとした二量体化によってはじめて可能になる。その為、活性を示す分子割合は二量体化した分子の割合によって決まり、Kissing-Loop のもつ安定性と活性に強い相関を示す事も必然といえる。加えて、当初理由がはっきりと判明しなかった SBS を持たない<hairpin-ΔU>への基質の連結や、<A>の SBS 周辺の塩基対が触媒活性に大きな影響を及ぼした事も、このメカニズムであればクリアに説明することが可能になる。

<hairpin-ΔU>の 5'末端へは<A>の 3'末端の SBS への基質の結合をプラットフォームに近接効果によって連結が行われ、また、その SBS 近傍の塩基はこの際の近接効果に大きな影響を及ぼすことから、置換によって活性に大きな影響を与えたと推測できる。

## 2-10. <A> + <hairpin-ΔU>の融合変異体の作製/活性定量

2-8 で立案した仮説を検証するために、<A>の 5'末端と<hairpin-ΔU>の 3'末端を接続した融合変異体を作製し、活性の定量を行った (図 31)。その結果を以下に示す。仮説が正しいければ、これにより<A> + <hairpin-ΔU>は二量体化し機能を発現する事が予測される。

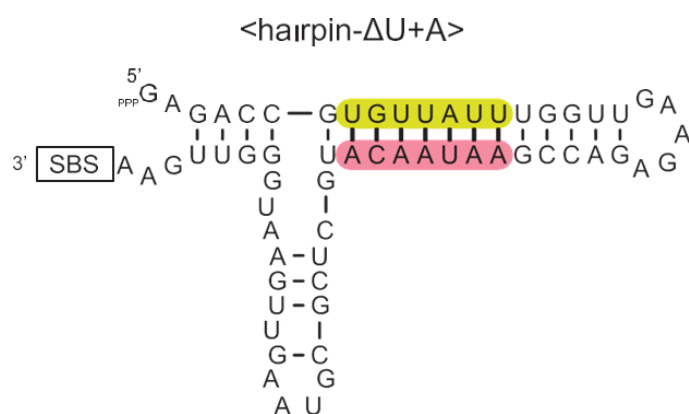


図 31. <A> + <hairpin-ΔU>の融合変異体の構造

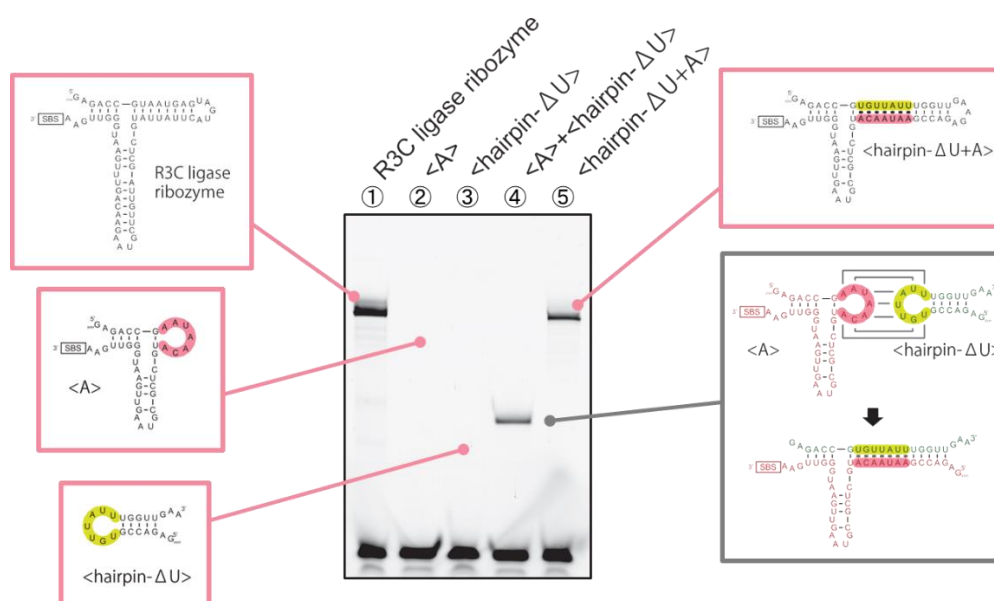


図 32. <A> + <hairpin-ΔU>の融合変異体の触媒反応結果

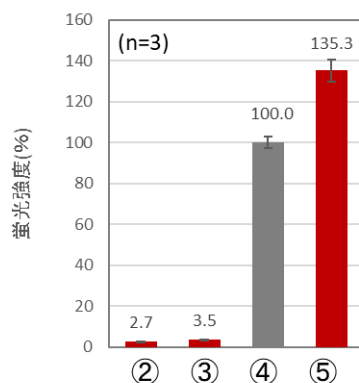


図 33. <A>+<hairpin-ΔU>の融合変異体の活性定量  
(3 回の独立した実験を行い、実験誤差を算出した。)

この結果により、<hairpin-ΔU+A>変異体は 2 分子変異体系と遜色ない活性を示すことが確認できた (図 32、33)。これは立案したメカニズム仮説が正しいことを強力に示唆するものである。

さらに、このメカニズムが支持されたことで、先行研究の結果にも新たな考察を加えることが可能になる。具体的には、<A>+<hairpin-ΔU>では活性が維持された一方で、ほとんど配列の変わらない<U>+<hairpin-ΔA>では活性がほとんどなかった結果に関して、1 つの可能性として、相補鎖を取らない SBS が両分子にあることにより、SBS 起因でのハイブリダイズが起こり、適切な二量体化、コンフォメーション変化が起きなかったのではないかと考えられる。

## 2-11. 変異体を用いた Tm 値の計測

メカニズム仮説を熱力学的な観点からも確かめるために、R3C 2 分子系における変異体を用いて Tm 値の測定を行った。表 4 にその結果を示す。結果、<A>や<hairpin-ΔU>単独の存在時に比べ、<A>+<hairpin-ΔU>の二量体形成時には、Tm 測定値が 4-5°C 上昇することが分かった。これは二量体の構造が、モノマー時に比べ、熱力学的に安定であることを示し、自発的に二量体化が進み、かつ逆反応がほとんど起こらない可能性を示唆する。更に融合変異体においては熱力学的な安定性は更に向上し、R3C をも上回るという結果を得た。この結果によって、Tm 値の観点からも 2 分子変異体のメカニズム仮説を裏付ける証拠を得ることができた。



表 4. R3C 変異体の T<sub>m</sub> 値

	<A>	<hairpin-ΔU>	<A> + <hairpin-ΔU>	R3C	融合変異体
T <sub>m</sub> 値(°C)	56.03	53.78	60.97	63.54	71.68

## 2-12. 変異体を用いた作用メカニズム検証における成果

本検証において、R3C 2 分子系が、Kissing-Loop をトリガーとして二量体を形成し、コンフォメーションを変化させることで機能発現に至る一連の作用機序メカニズムを解明できた (図 34)。この結果は、原始的な環境でも存在しうる 50nt 以内の短鎖の RNA 同士が Kissing-Loop の相互作用を介して、二量体化し、疑似的な長鎖 RNA として機能を発現する事を示す例であるといえる。

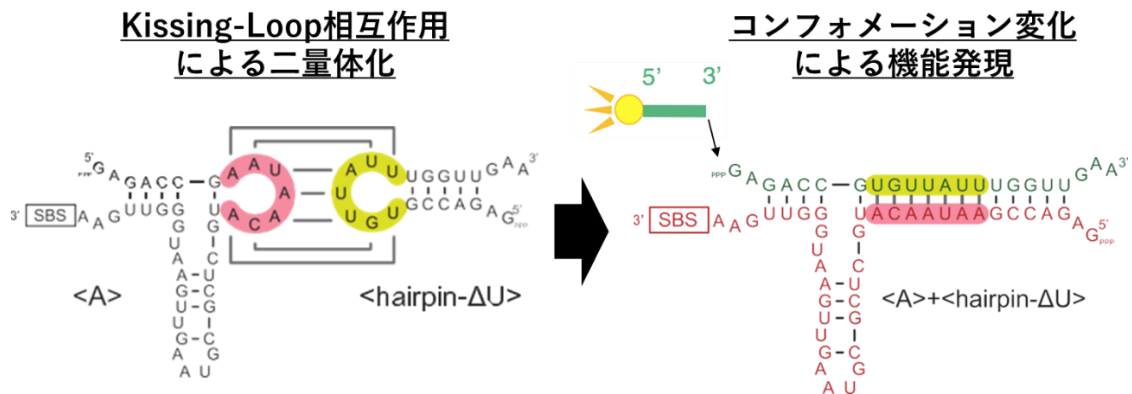


図 34. <A> + <hairpin-ΔU> の 2 分子反応メカニズム

## 2-13. 自由エネルギーから考える<A> + <hairpin-ΔU>の二量体化形成

本検証において、Kissing-Loop をトリガーに二量体を形成するためには<A>と<hairpin-ΔU>の両 RNA がモノマー時に取っている構造を壊す必要がある。そこで、今回の系において、自由エネルギーの観点から、モノマー維持/二量体化の Driving Force の比較を行った (図 35)。今回の系においては、<A>と<hairpin-ΔU>のステム部の構造が持つ自由エネルギーをモノマー維持の Driving-Force となり、Kissing-Loop の持つ自由エネルギーが二量体形成の Driving Force であると捉える事ができる。なお、<A>のグリップ部分については影響が未知数であり、現時点で定量化できないことから、1 塩基のバルジとして試算を行っ



た。その結果、 $\langle A \rangle$ 、 $\langle \text{hairpin-}\Delta U \rangle$ の両ステムの持つ自由エネルギーよりも、Kissing-Loop部の自由エネルギーの持つ安定性効果が上だった。

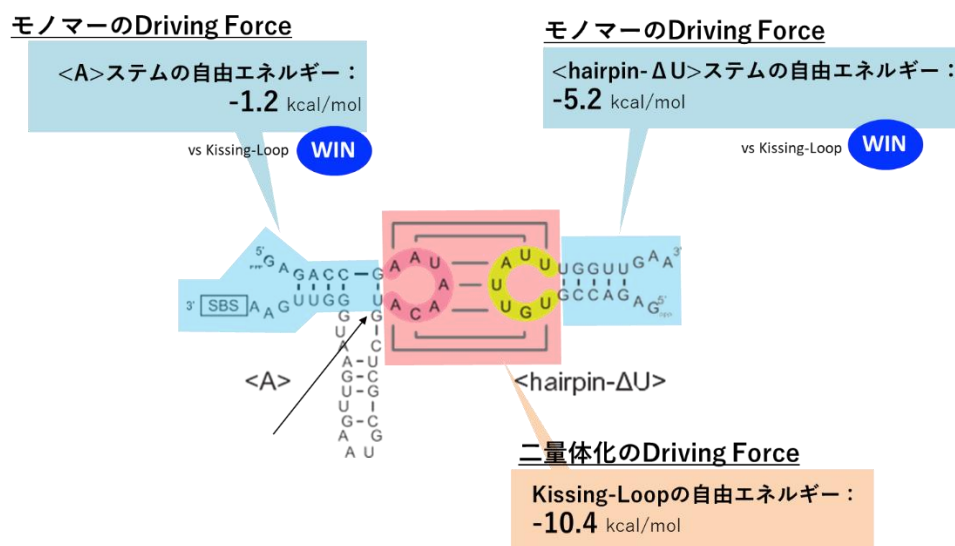


図 35. 自由エネルギーから見るモノマー維持/二量体化形成の Driving Force

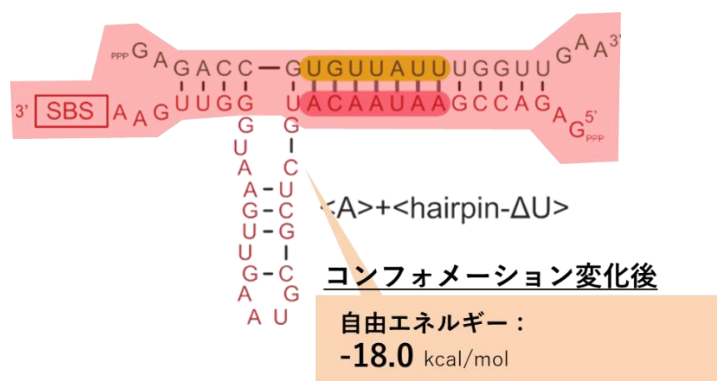


図 36. コンフォメーション変化後のステムの持つ自由エネルギー

更に二量体化後、コンフォメーション変化後の状態についても一部自由エネルギーの算出を行った（図 36）。その結果、 $\langle A \rangle$ や $\langle \text{hairpin-}\Delta U \rangle$ のもつ自由エネルギーを上回る安定性効果を有することが確認できた。この結果からも、Kissing-Loop をトリガーに、二量体化とコンフォメーション変化が自発的に推進する事を裏付けることができた。

## 2-14. リガーゼリボザイムの *in vivo* 環境における機能発現の可能性

この章では R3C をはじめとするリガーゼリボザイムが生体内でも同様の活性を有しうるかについて考察を行う。まず鍵となるのは、生体内における  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度である。前述した

ように Class I、L1 リガーゼリボザイムは活性部位の構築のために  $Mg^{2+}$  の配位が必要となる。R3C においても、活性部位への  $Mg^{2+}$  の寄与は判明していないものの、終濃度 15 mM で活性を持つことが明らかになっており、本研究でもこの濃度での反応を行っている。これらの事実から、リガーゼリボザイムにおいて、一定以上の  $Mg^{2+}$  存在環境は、活性に必須と考えることができる。一方で、生体内の  $Mg^{2+}$  は、例えば人体において、全体の 50% 以上が骨に封入されていることがわかっており、それ以外の部位ではばらつきはあるものの、筋肉、脳、腎臓では 10 mM 程度、血清中には 1 mM 程度となっている(糸川, 1994)。これらの結果から、生体内における 10 mM 以上の  $Mg^{2+}$  存在領域では、リガーゼリボザイムが活性を有する環境を提供することができる可能性がある。

続いて、必要となる RNA 濃度について考察する。R3C リボザイムにおいては、リボザイムの終濃度が  $5\mu M$  に基質  $50\mu M$  添加して反応を行っている。生体内でも様々な non coding RNA が機能していることが近年次々と発見されているが、これらはいずれもリガーゼリボザイム反応条件とほぼ同等の  $1\sim 50\mu M$  程度で機能していることがわかっている。最後に反応時 pH だが、R3C リボザイムにおいては、pH 8.5 の Tris-HCl バッファーで反応を行っている。一方で人体や、ほぼすべての動物において、細胞内 pH は 7.0 程度、血液が pH 7.4 程度で厳密に保たれている事が知られている(飯野, 2001)。リガーゼリボザイムの pH 7.0~7.5 領域での機能発現の可否においては、追加で検討が必要な要素といえる。

上記を踏まえた際に、追加での検討要素はあるものの、リガーゼリボザイムは生体内でも機能を発現できるポテンシャルを有すると考えることができる。

## 2-15. 速度論の観点でのリボザイム 2 分子反応の洞察

速度論の側面から、今回のリボザイム 2 分子反応に新たな洞察を加えることができる。まず、今回のメカニズム解析において、後述にも示すように各リボザイム分子を終濃度  $5\mu M$  ずつになるように調整して反応を行っている。これは、変異体毎の活性を比較するために、全実験において統一条件とした。しかし、これが 1 対 1 のモル分子比率でない場合、二量体の形成量に変化が生じる可能性がある。更に、2 分子系の反応に Kissing-Loop と相補的な短鎖の RNA を加え、3 分子での反応とした場合、Kissing-Loop と相補的な短鎖の RNA は競合阻害剤としての役割を果たすことも考えることができる。既に生体の microRNA がタンパク質に結合することで阻害反応を示す事(Zhao et al., 2015)や、RNAi などの相補的な RNA に結合し触媒活性を持つ RNA (Elbashi et al., 2001)は報告されている事から、上述の反応は十分考えられる仮説であると考えられる。

## 2-16. 熱力学的な安定性とリボザイム活性の相関への考察

回帰分析による  $p$  値の小ささからも、R3C の 2 分子変異体の機能発現は、Kissing-Loop の持つ熱力学的な安定性に大きく依存していることが示唆された。これは一連の二量体化/コンフォメーション変化/機能発現の各フェーズにおいて、二量体化の部分がもっとも律速であることを示すものでもある。同時に、Kissing-Loop 部の熱力学的な安定性と、触媒機能の両者が、線形回帰ではなく、S 字のシグモイド関数に高い相関を示したという事実は、本実験の条件において、Kissing-Loop のもつ安定性が  $-8 \sim -10$  kcal/mol の領域で、二量体を形成する RNA の割合が大きく変動する事を示すものでもある。これは同時に、本触媒の機能は基質だけでなく、触媒側の RNA の濃度にも一定の相関を示す可能性もあると理解できる。具体的には、本実験の条件である  $5 \mu\text{M}$  よりも、より触媒 RNA の濃度の高い条件において、Kissing-Loop の持つ熱力学的な安定性がより小さくとも、機能を発現し、一方で触媒 RNA が薄い条件では Kissing-Loop の持つ熱力学的な安定性がより高いことが機能発現の必須条件として求められる可能性を有する。



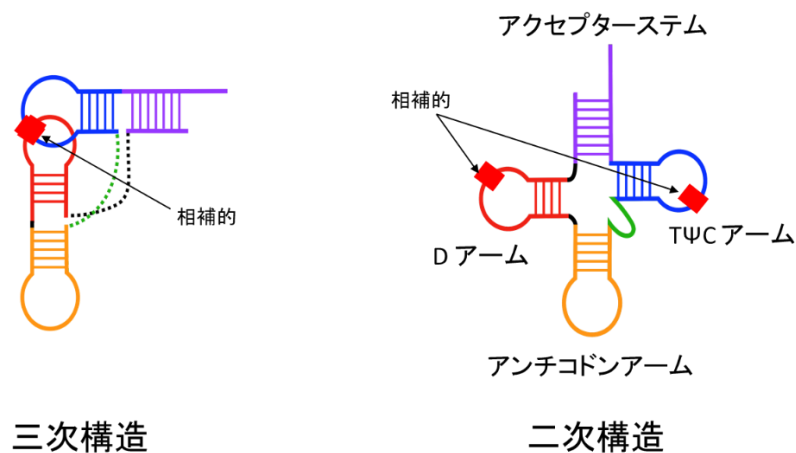


図 38. tRNA の二次元/三次元構造と保存領域

加えて、tRNA は種によって 70-90 nt まで様々な長さを取ることが知られているが、いずれの種でもアクセプターステムと T $\psi$ C アームの長さは共通である事が知られている (Simsek, 1973)。アクセプターステムと T $\psi$ C アームで構成されるステムは一般にミニヘリックスと呼ばれ (Schimmel et al., 1993; Schimmel and Ribas de Pouplana, 1995; Tamura, 2015) (図 39)、様々な種類のミニヘリックスが、単独で aaRS に認識され、被アミノアシル化能を有する事が報告されている (Francklyn et al., 1992; Frugier et al., 1994; Saks and Sampson, 1996)。このような状況証拠により、tRNA の進化の過程としてアクセプターステムと T $\psi$ C アーム部を切り取った RNA であるミニヘリックスが初期に存在したのではという説が提唱されている (Arutaki et al., 2020)。

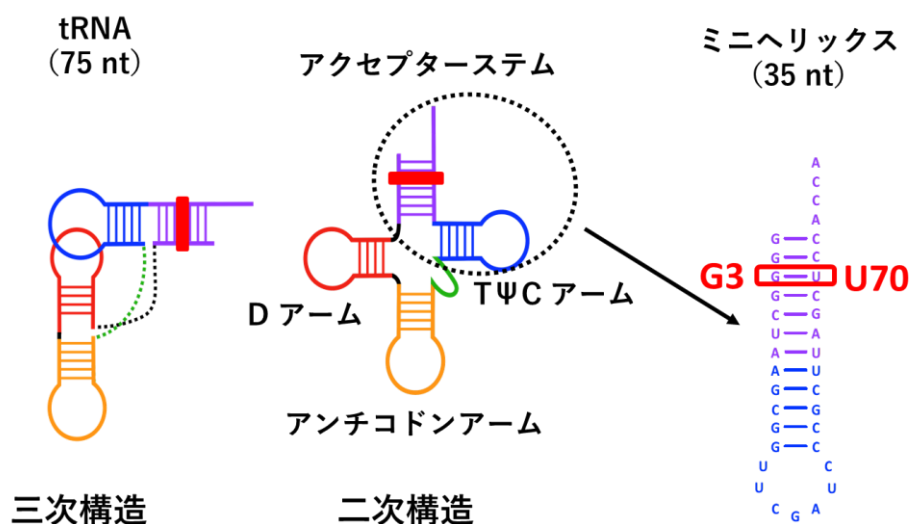


図 39. tRNA とミニヘリックスの二次元構造

実際にアラニン特異的 tRNA (tRNA<sup>Ala</sup>) において、tRNA ではなくミニヘリックスだけでも、アラニル tRNA 合成酵素 (AlaRS) は特徴的なウォブル塩基対である G3:U70 を認識し、アラニンの付与を行うことが知られている (Hou and Schimmel, 1988; McClain and Foss, 1988; Mueller et al., 1999) (図 40)。

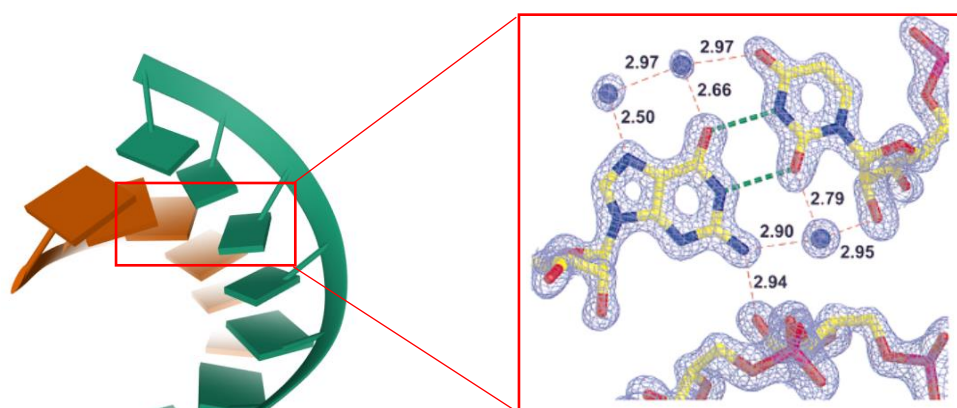


図 40. *E. coli* tRNA<sup>Ala</sup> アクセプターステム部の G3:U70 ウォブル塩基対 (PDB ID: 434D)

aaRS の認識部位がアンチコドン部分ではなく、アクセプターステムに存在するという事実は、原始環境においてミニヘリックスが原始 tRNA として作用していたことを示唆する重要な状況証拠でもある (Arutaki et al., 2020) (図 41)。

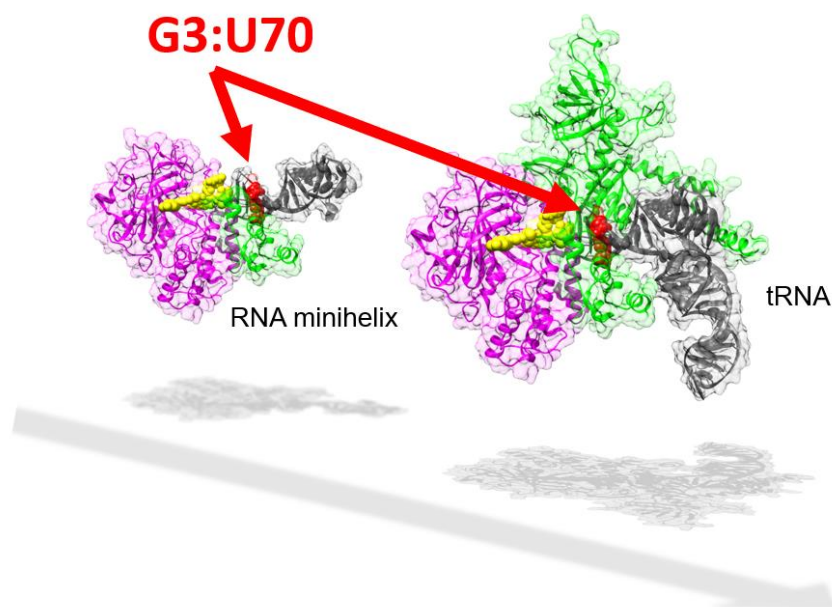


図 41. ミニヘリックスから tRNA への進化モデル  
(提供：安藤格士博士 (東京理科大学電子応用工学科))

### 3-3. tRNA の進化モデルの構築

これらの先行研究結果と第2章での成果をもとに、著者は tRNA が進化の初期段階において、機能を有しない RNA 同士が Kissing-Loop によって疑似的に長鎖化し、この RNA 同士が連結することでミニヘリックスの形を形成した可能性を想定した。同時に存在することによって初めて機能を有しうる RNA のサイズに到達し、原始のアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) の認識部位を構築することでアミノアシル化をされる能力を獲得したのではないかと考えた。さらに同サイズのステムループが Kissing-Loop で二量体化することで現在の tRNA の元となる形を形成したとする仮説を構築した。この際に Kissing-Loop に相互作用は疑似的な長鎖化により、RNA が能力を獲得する長さとなるというメリットだけでなく、コンフォメーション変化により RNA の塩基対のバリエーションを増やすというメリットも供給する (図 42)。

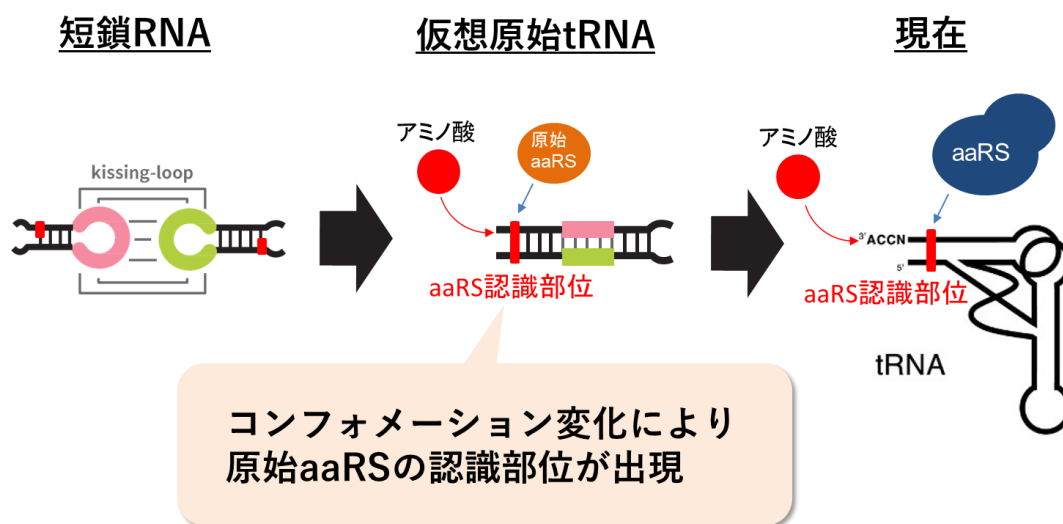


図 42. Kissing-Loop をトリガーとした tRNA の進化モデル

### 3-4. Kissing-Loop による長鎖化と機能獲得仮説の検証

本仮説の実現可能性を検証するために、mini-G3 と mini-U70 の2種の RNA を構築した。互いの RNA はループ部で Kissing-Loop 相互作用を形成しうる形となっており、単独では G3:U70 を持たないものの、二量体化しコンフォメーション変化をした場合のみ G3:U70 様配列を組みうる形とした。これにより原始環境下でも存在しえた短鎖 RNA が二量体化によりコンフォメーション変化を起こす。このようにして疑似的に長鎖化することで G3:U70 様配列を形成し AlaRS による認識部位に進化したのではないかとこの仮説の実現性を検証することができる考えた (図 43)。

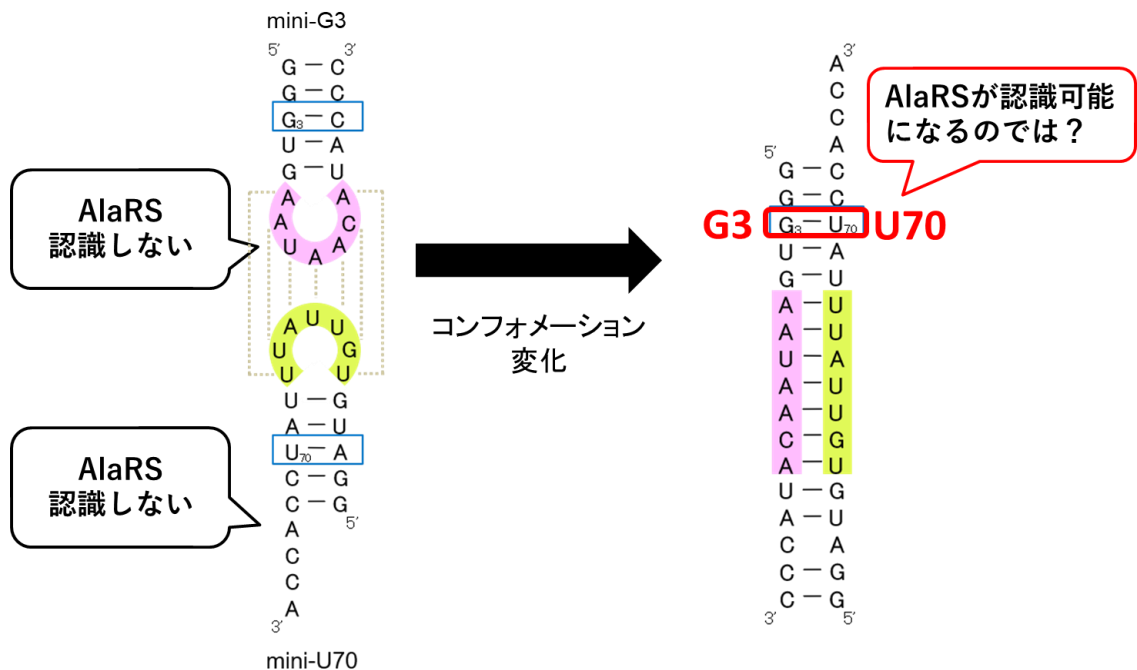


図 43. mini-G3、mini-U70 の構造と二量体構造

### 3-5. 変異体の作製

3-4 における仮説を検証するために、mini-U70 において二種類の変異体を作製した。一種は mini-U70 の U を C へ換えたものであり、もう一種は mini-U70 のループ部を mini-G3 と相補鎖を組まないような形へ変異させたものである。これにより、mini-C70 が mini-G3 と二量体を組んだ場合は、G3:U70 ではなく G3:C70 が現れることとなり、mini-U70-ACAAUAA を使用した場合は、お互いの RNA は Kissing-Loop をトリガーとした二量体は組みえないものとなる (図 44)。



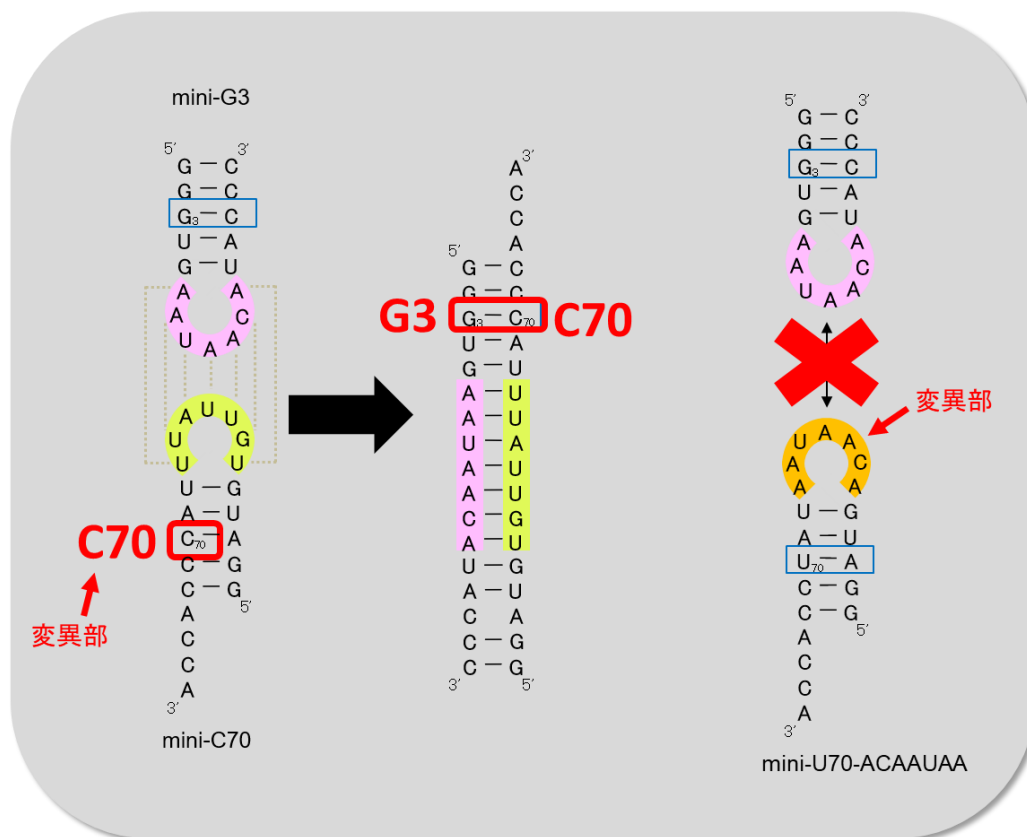


図 44. mini-C3、mini-U70-ACAAUAA の構造

### 3-6. mini-G3/U70 の Kissing-Loop 相互作用をトリガーとした二量体化の検証

まずはそれぞれの RNA が Kissing-Loop をトリガーとして二量体を形成するの否かの検証を行った。その結果を図 45 に示す。Native-PAGE での電気泳動時のバンドシフトによって、mini-G3 と U70 が単体では二量体化しないものの、同時に存在した際には二量体を形成することが示唆されている。さらに mini-U70 の代わりに mini-C70 と mini-G3 が同時に存在する場合にもバンドシフトが起こり、さらに mini-U70-ACAAUAA と mini-G3 のペアではバンドシフトが起こらなかった事実から、この二量体化は Kissing-Loop によって起こっていることも同時に示唆された。なお、本結果におけるコントロールの取得は行っていない。その理由として、Native-PAGE は分子のサイズや形状によってもバンド位置が異なりコントロールとの比較が難しい事、また系内にトルイジンブルーによって染色される化合物は RNA 以外に存在せず、結果の再現性も良好である事、これら 2 点において図 45 のバンドシフトが mini-G3/U70 由来である事は自明と考えられる事が上げられる。

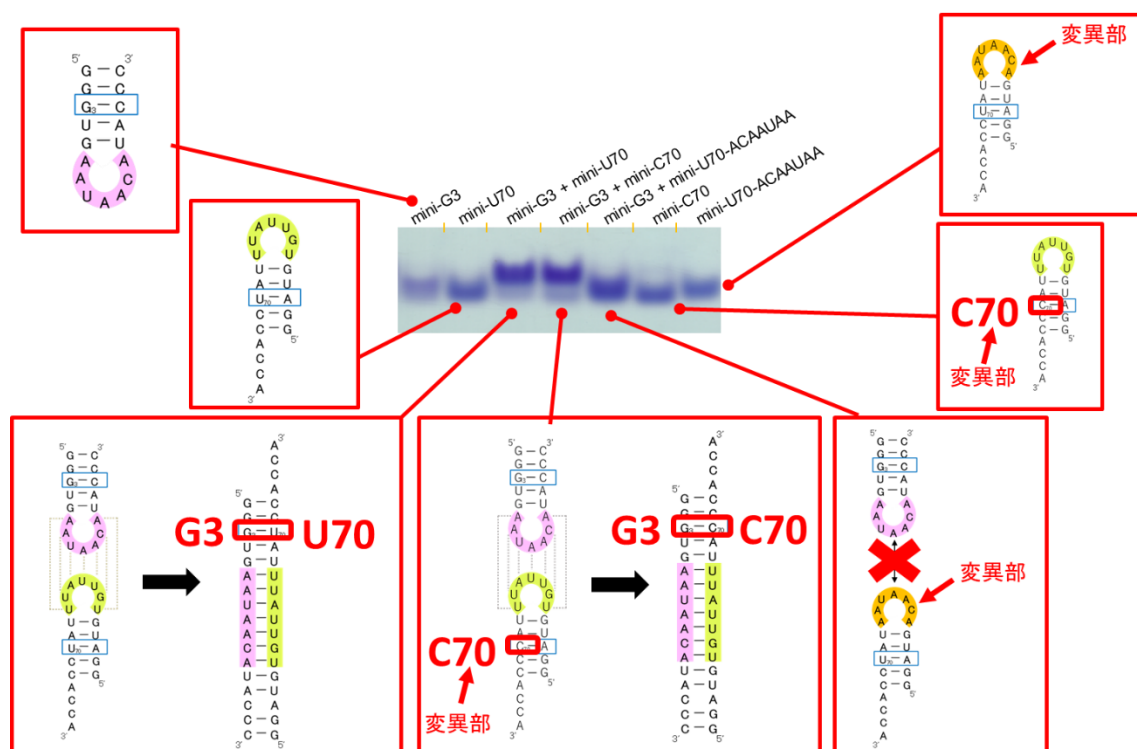
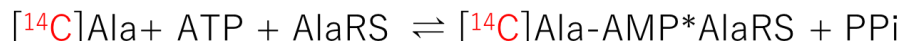


図 45. mini-G3、-U70、-C3、-U70-ACAAUAA を用いた  
Native-PAGE での電気泳動結果

### 3-7. mini-G3/U70 二量体のアミノアシル化能の検証

続いて、mini-G3/U70 の二量体が、AlaRS によって認識されアミノアシル化を受けることができるのか検証を行った。アミノアシル化は以下の二段階反応で進むことが分かっている。今回は  $^{14}\text{C}$  ラベルされた L-アラニン(132.0 mCi/mmol、Moravek, Inc., Brea 製)を用い、シンチレーションカウンターを用いることで二段階目の反応で生成する反応物の定量化を行った (図 46)。

## 1. Alanineの活性化(Ala-AMPの合成)



## 2. 活性化アミノ酸のtRNAへの転移

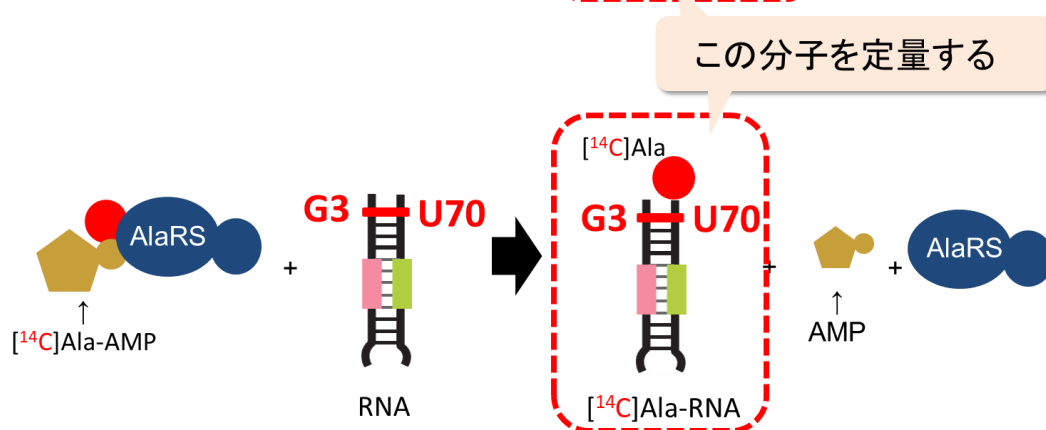


図 46. RNA へのアミノアシル化反応と本実験で定量する分子

また AlaRS には *E. coli* の AlaRS442N を用いた。これは全長の AlaRS から、校正ドメインと多量体化ドメインを削ったものであり、現時点で機能が確認されている最小化変異体である (図 47)。

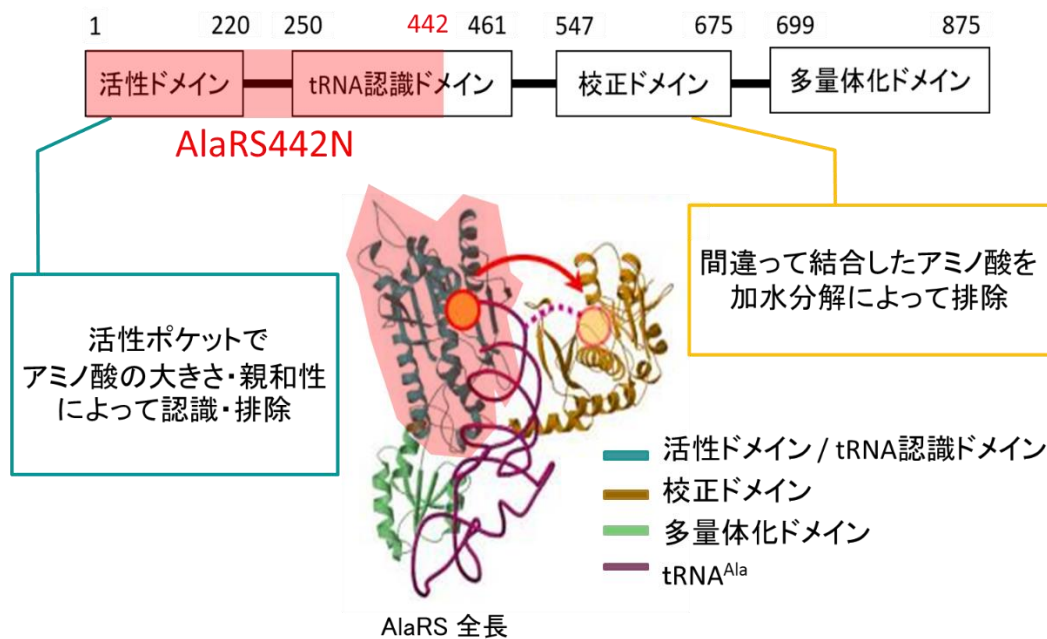


図 47. *E. coli* AlaRS442N の結晶構造

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/Topics/2005-2/AlaX.html>

これらを用いてアミノアシル化能力を検証した結果、mini-G3/U70 のペアでは AlaRS によるアミノアシル化が起こった。一方で、mini-G3/C70 のペアではアミノアシル化は確認できなかった。更に mini-G3/U70-ACAAUAA のペアでも同様にアミノアシル化は起こらなかった (図 48)。この結果と 3-6. Native-PAGE での結果を踏まえると、AlaRS は mini-G3/U70 が Kissing-Loop をトリガーとして二量体化によって構築する G3:U70 のペアを認識し、アミノアシル化反応が進んでいることがわかる。

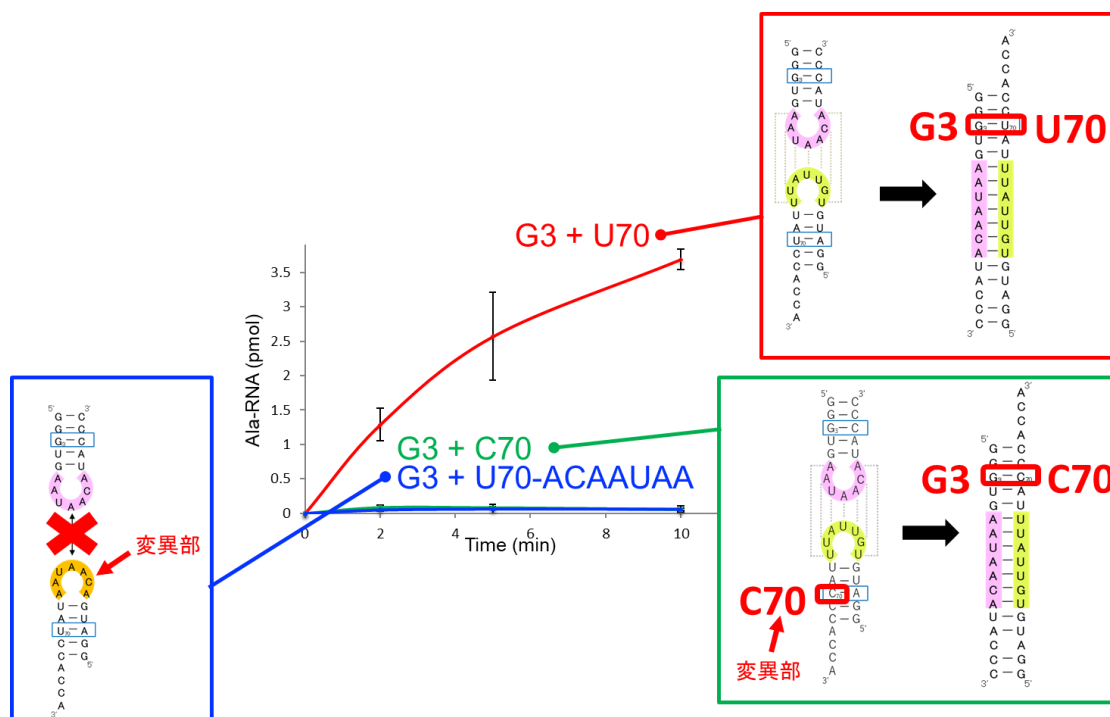


図 48. AlaRS442N による mini-G3、-U70、-C3、-U70-ACAAUAA のアミノアシル化反応の結果  
(3 回の独立した実験を行い、実験誤差を算出した。)

### 3-8. ミニヘリックス<sup>Ala</sup>と tRNA<sup>Ala</sup>のアミノアシル化能の比較

更に G3+U70 のアミノアシル化が、*E. coli* の tRNA<sup>Ala</sup> と比較してどれくらいのアミノアシル化活性を有するのか、同様に AlaRS442N を使い、mini-G3/U70 のペアと tRNA それぞれで測定を行った。その結果、タイムコース上の同時刻での測定点同士の比較では tRNA<sup>Ala</sup> と AlaRS442N のペアと比較しておよそ 1/5 程度の活性がある事が明らかになった (図 49)。一方で、本比較のみでは、mini-G3/U70 の二量体化の割合が考慮されていないため、mini-G3/U70 が、tRNA<sup>Ala</sup> の G3:U70 のペアと比べて純粋に 1/5 の認識能しか有していないかどうかは未確定である。3-10 にて後述する FRET 解析での結果では mini-

G3/U70 の約 60%程度が二量体化を形成しているということがわかっているため、この結果を考慮すると、認識能は 1/2~1/3 程度ではないかと考察することが可能である。

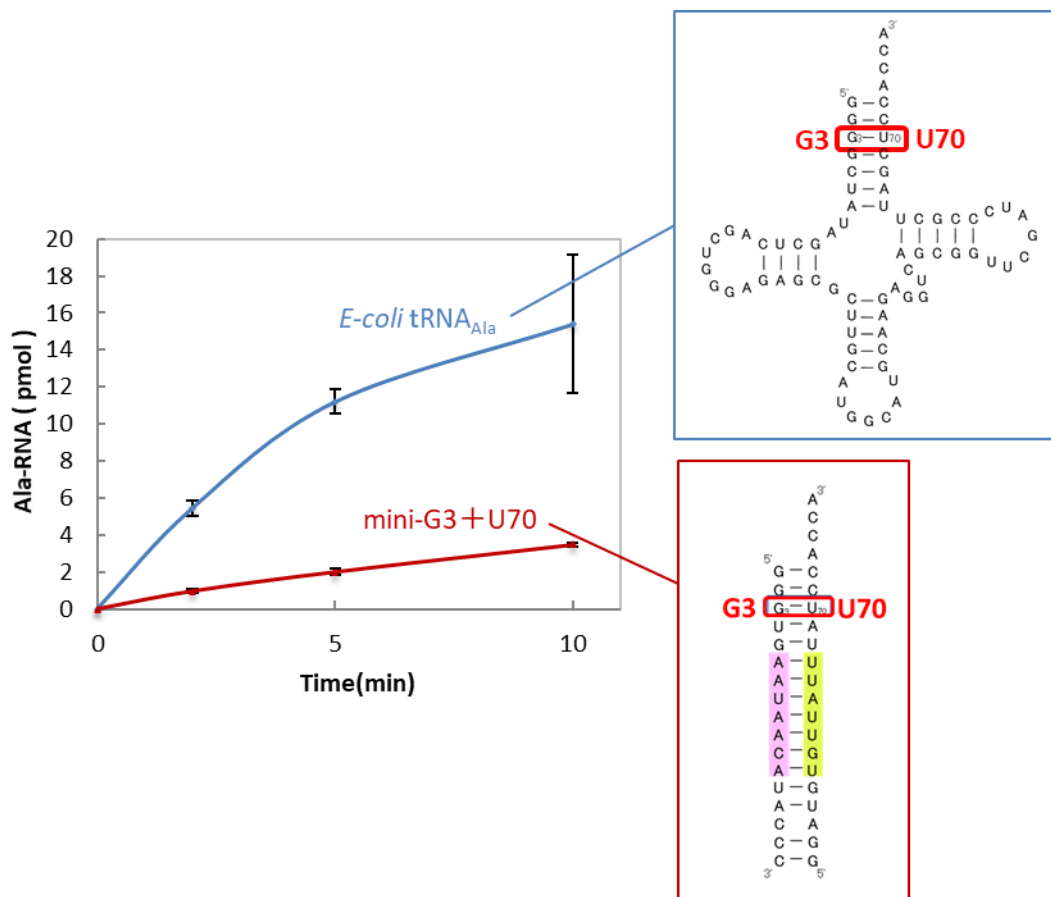


図 49. AlaRS442N による mini-G3/U70 と tRNA<sup>Ala</sup> の  
アミノアシル化反応の比較  
(3 回の独立した実験を行い、実験誤差を算出した。)

### 3-9. FRET を用いた mini-G3/U70 のモノマー時コンフォメーションの確認

Kissing-Loop をトリガーとしてコンフォメーション変化を起こしているという仮説を立証するために、RNA のモノマー時コンフォメーションの確認を行った。モノマー時に mini-G3/U70 がヘアピン構造を組んでいなければ、2 種の RNA が相補的な部分でハイブリダイゼーションを起こしている事となり、Kissing-Loop 相互作用をトリガーにしているとは言えない (図 50)。

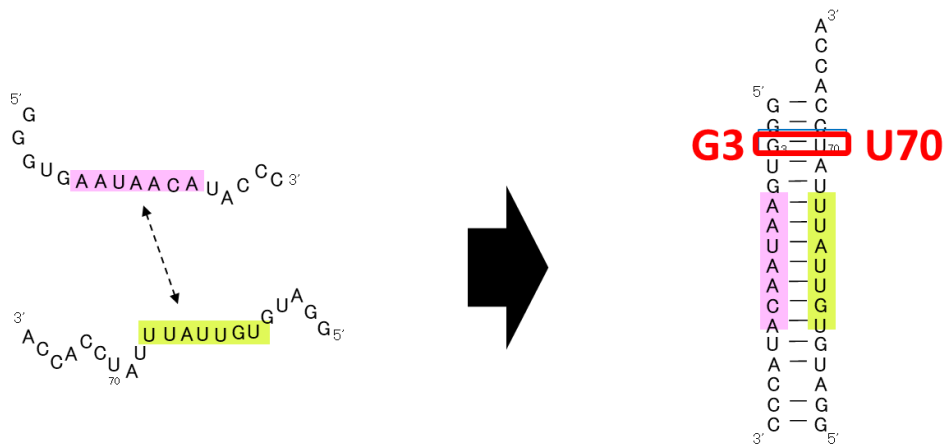


図 50. Kissing-Loop をトリガーとしない RNA の二量体形成イメージ図

そこで RNA のコンフォメーションを FRET(Fluoresceine resonance energy transfer)を用いて検証した。FRET とは、蛍光波長と吸収波長にそれぞれ同波長のレンジを有する 2 種類の蛍光団を用いて RNA をラベル化し、蛍光団間の近接状況を検証する手法である (図 51)。本研究では 6-FAM と DABCYL をそれぞれ用いた。以下に示すように 6-FAM は 494 nm で励起され、521 nm の蛍光を発することで知られている。一方、DABCYL は 521 nm の蛍光を吸収し、消光させることができる (図 52)。今回は、6-FAM を 5'末端の  $\alpha$  リン原子に、DABCYL を 3'末端の 3'-OH 基に、それぞれリンカーを介して共有結合させ、RNA への蛍光ラベル化を行った。

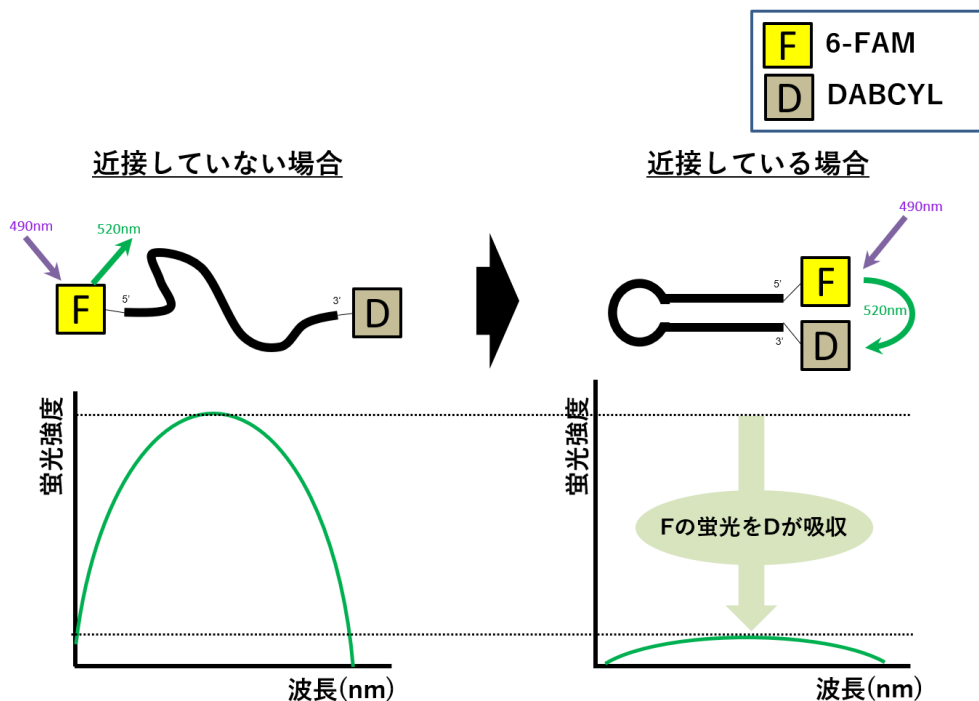


図 51. FRET 法のコンセプト

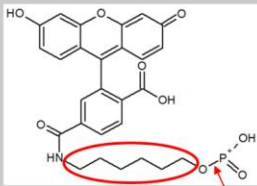
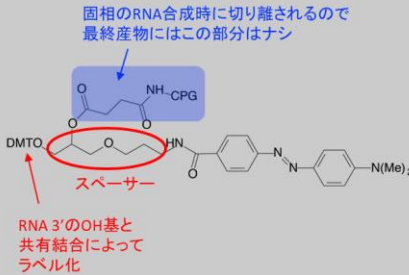
	6-FAM	DABCYL
化合物		
正式名前	FAM (6-Carboxyfluorescein)	DABCYL acid [4-((4-(Dimethylamino)phenyl)azo)benzoic acid]
励起波長	494nm	—
蛍光波長	521nm	—
吸収波長	—	520nm

図 52. 6-FAM と DABCYL の構造と励起/蛍光/吸収波長

具体的には以下 4 種類の蛍光団でラベル化された RNA を用いて検証を行った (図 51)。

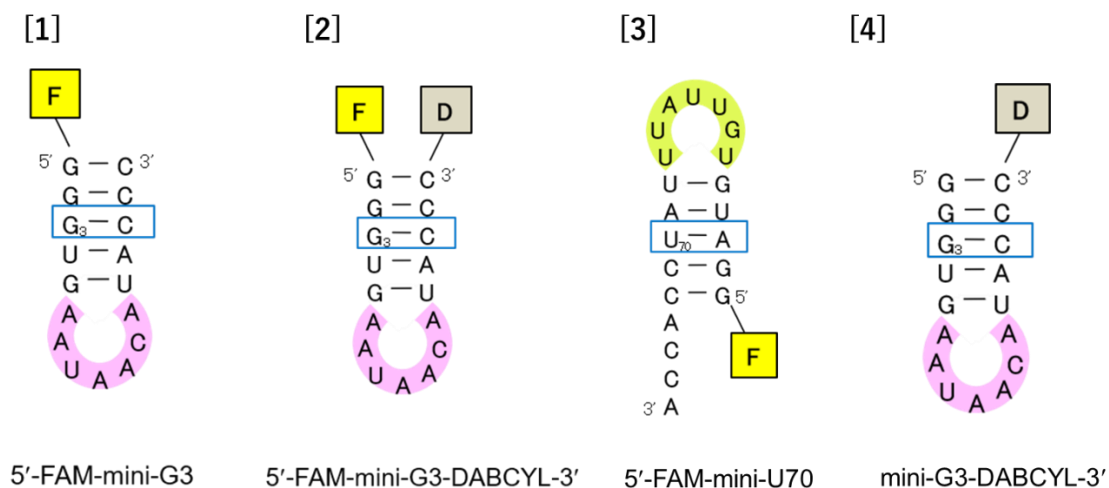


図 53. 6-FAM、DABCYL でラベル化した RNA

結果を以下に示す。まずは図 53 の[1]と[2]を用いて検証を行った。この結果と Native-PAGE による、mini-G3 が単独で二量体化をしないと両方の結果により、mini-G3 はモノマー存在時に 5'末端と 3'末端が近接している、すなわちほぼ 100%ヘアピン構造を形成している事が確認できた (図 54)。

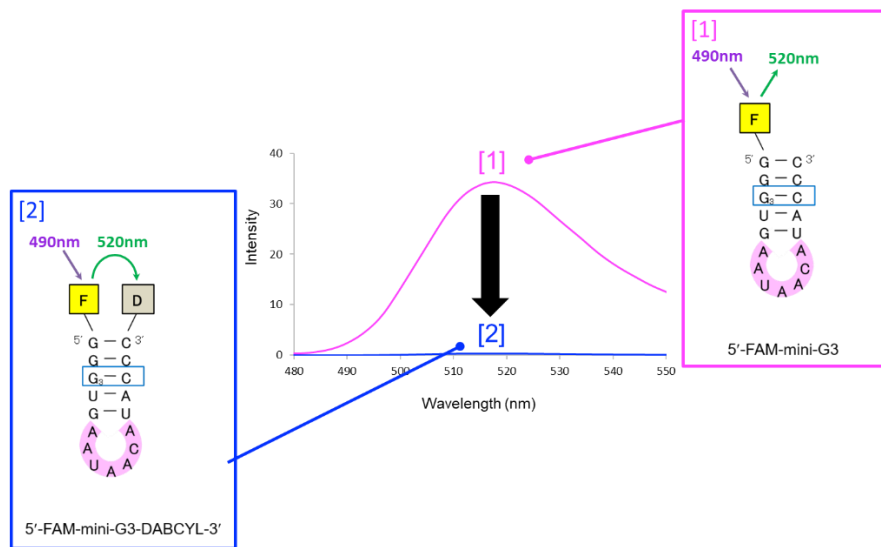


図 54. FRET 結果（１）

さらに、図 53 の[3]と[4]を用いた結果を図 55 に示す。[3]と比較して[3]+[4]での蛍光強度が低下している結果は、mini-G3/U70 は両者が存在する際に二量体を形成し、G3 の 3' 末端と U70 の 5'末端が近接していることに由来するものであると理解することができる。

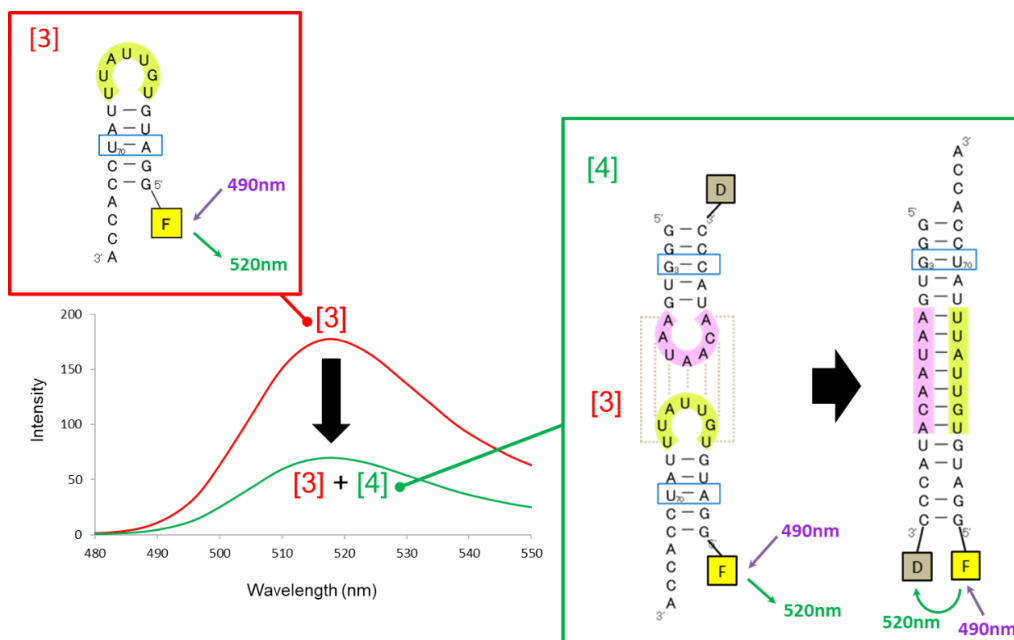


図 55. FRET 結果（２）



### 3-10. エネルギー転移効率の理論値概算

FRET においては、蛍光間の距離が、エネルギーの転移に最も影響を与えることが知られており、これは本実験系において、蛍光団のラベル化位置と、蛍光団のリンカーの長さ取りこれは以下の式で定義されることが知られている (Patterson et al., 2000)。なお、フォレスター距離はエネルギー転移効率が 50%となる距離であり、蛍光団毎に固有の値を有している (図 56)。

$$E = \frac{k_{FRET}}{k_f + k_{FRET} + k_{nr}} = \left[ 1 + \left( \frac{r}{R_0} \right)^6 \right]^{-1}$$

$r$  : ドナー/アクセプター間の距離(nm)

$R_0$  : フォレスター距離

図 56. 蛍光団間のエネルギー転移効率の算出式

上式を用いるために、まずは  $r$ :ドナー/アクセプター間の距離の算出を行った。なおリンカー部分はフレキシブルになっている事が予想されたため、一定の仮説を置いて算出を実施した (図 57)。

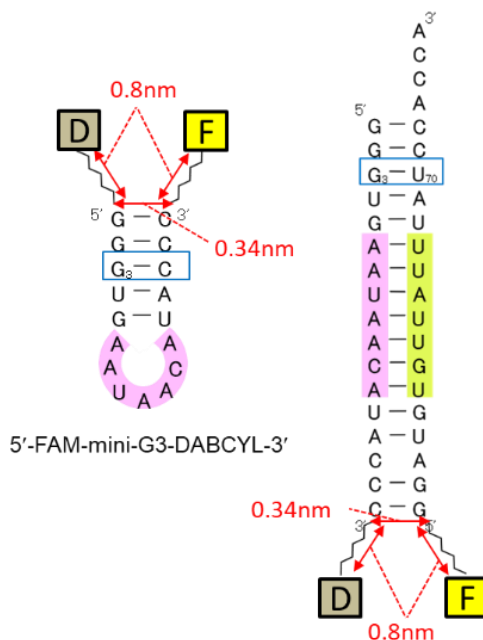


図 57. 蛍光ラベル化 RNA の蛍光団間の距離の概算

まず、図 53 の[2]においては、塩基対間の距離は 0.34 nm であり、6-FAM、DABCYL の両蛍光団を共有結合でつなぐリンカー部位は 0.8 nm であると算出ができる。ここで、両リンカーが外側に 30° 傾いているという仮説を置くと、蛍光団間の想定距離は 1.14 nm と算出ができる。続いて、図 53 の[3]+[4]の二量体においても同様の計算ができ、蛍光団間の想定距離は同じく 1.14 nm と算出できる。この数字を用いて、図 56 の計算式をもとにエネルギー変換効率を算出した。また、6-FAM/DABCYL のフォレスター距離は 3 nm を用いた。結果、想定されるエネルギー変換効率は 99.7%となった。これは両分子において、6-FAM から発せられる傾向はほぼ 100%が DABCYL によって消光されることを示している。

### 3-11. mini-G3/U70 の二量体の形成割合算出

3-10 における転移割合をもとにすると、1 分子/2 分子共に転移でのロスはほとんどないと言え、これは蛍光強度の差が純粋にコンフォメーションを表しているということも示唆している。そこで、図 51 の[3]と[4]において蛍光強度のデマンド値の比較を行った。結果を図 58 に示す。この結果により FRET の実験系においては、約 60%が二量体化により消光状態となり、残り 40%が二量体とならずモノマー状態で存在することが示唆された。

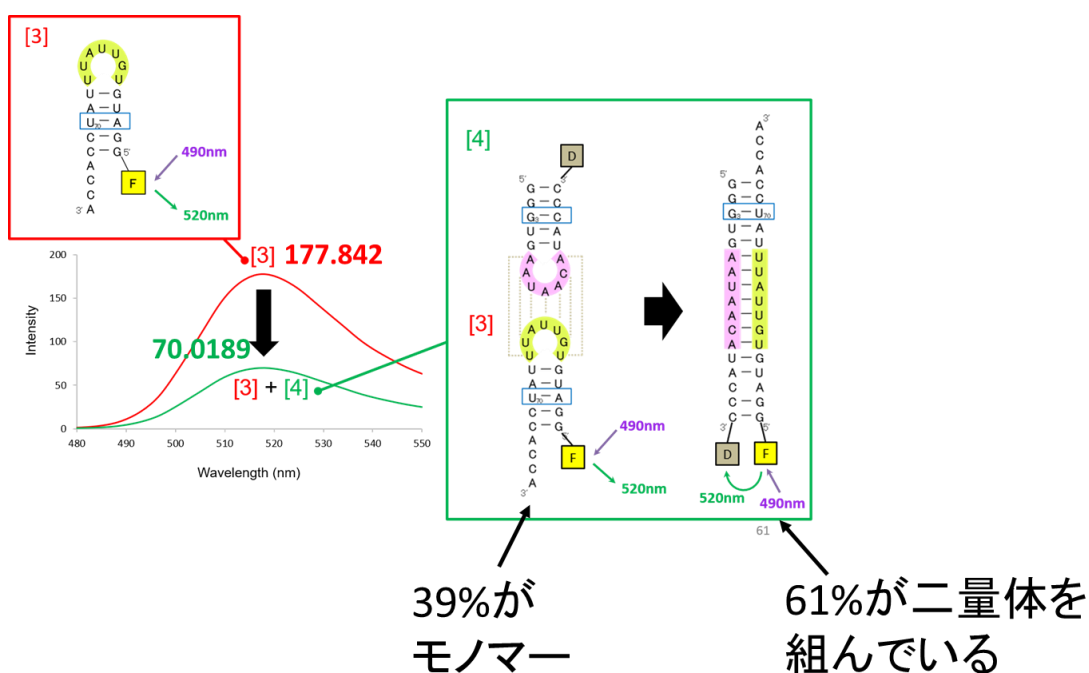


図 58. mini-G3/U70 の二量体形成割合の算出結果

### 3-12. 短鎖 RNA の機能獲得モデル構築の成果

本検証において、機能を有しない短鎖の RNA が、Kissing-Loop 相互作用をトリガーしたコンフォメーション変化によって、aaRS の認識によるアミノアシル化という機能を獲得する一連のモデルを構築することに成功した。これは原始環境において、RNA が Kissing-Loop 相互作用を使って、疑似的に長鎖化し、機能を獲得していったという tRNA の新たな進化モデルの可能性を示すものでもあるといえる（図 59）。

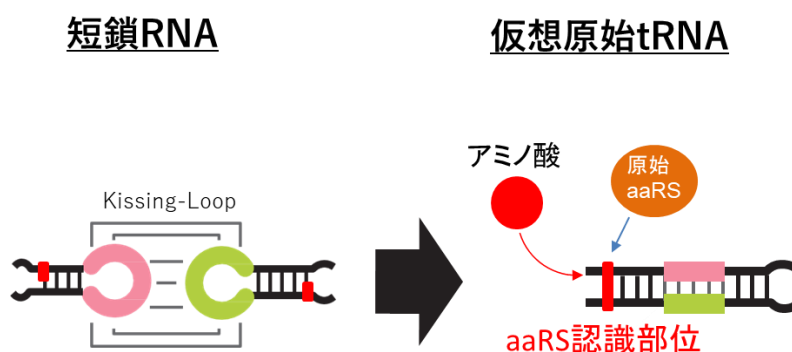


図 59. Kissing-Loop をトリガーにした RNA の進化モデル

### 3-13. 自由エネルギーから考える mini-G3/U70 の二量体化の割合

本検証において、Kissing-Loop をトリガーに二量体を形成するためには両 RNA がモノマー時に取っている構造を壊す必要がある。そこで、今回の系において、自由エネルギーの観点から、モノマー維持/二量体化の Driving Force の比較を行った。その結果を図 60 に示す。今回の系においては、mini-G3/U70 のステム部の構造が持つ自由エネルギーをモノマー維持の Driving-Force となり、Kissing-Loop の持つ自由エネルギーが二量体形成の Driving Force であると捉える事ができる。結果、mini-G3 のステムは Kissing-Loop 部の自由エネルギーを上回る安定性効果を持っていたが、U70 のステムは逆に Kissing-Loop 部の自由エネルギーの持つ安定性効果が上だった。この結果は二量体化の形成割合が 61%だったという結果とも符合する。

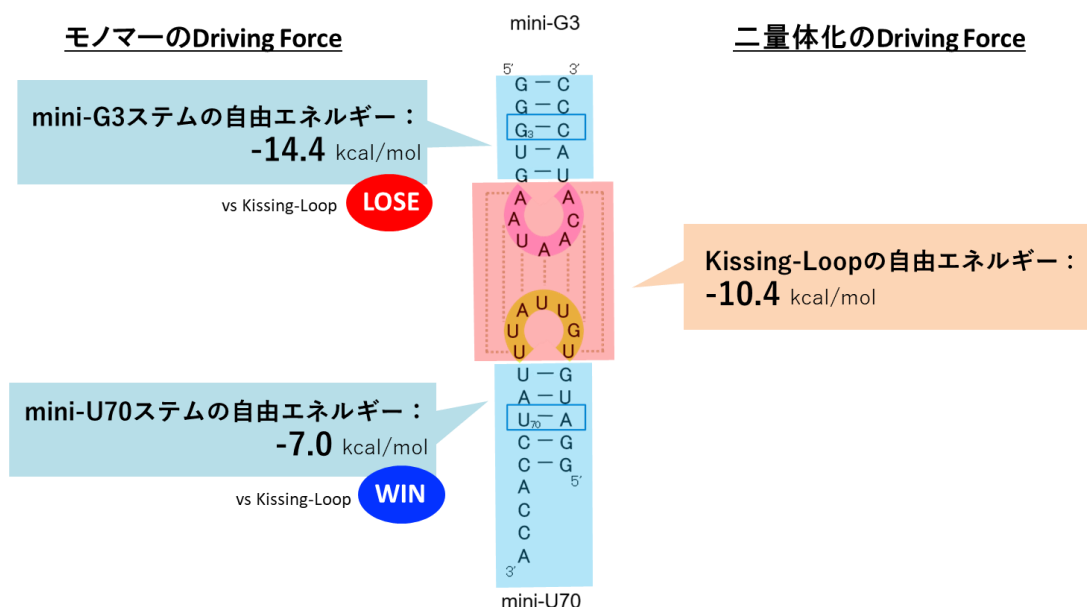


図 60. 自由エネルギーから見るモノマー維持/二量体化形成の Driving Force

### 3-14. 考察

第2章、第3章の検証において、Kissing-Loop をトリガーにモノマー時の構造を壊して、二量体を形成するメカニズムが明らかになった。この際の自由エネルギーの試算についてここでは更なる考察を加えたい。一般に、結果が成功か失敗かのいずれかである事象を独立に  $n$  回繰り返した際の分布は二項分布(binomial distribution)を取る事が知られている。今回の二量体の形成においても、 $x$  軸に「モノマー時の両 RNA の構造の持つ自由エネルギーの平均値と、二量体化形成のトリガーとなる Kissing-Loop 部の自由エネルギーの差」、 $y$  軸に「二量体の形成割合」の統計値は以下のような二項分布を取るのではないかと予想することができる。例えば、第2章の<A>、<hairpin- $\Delta U$ >のもつステム部の自由エネルギーの平均値と、Kissing-Loop 部の自由エネルギーとの差は-7.2 kcal/mol であり、第3章の mini-G3,U70 のステム部の自由エネルギーの平均値と、Kissing-Loop 部の自由エネルギーとの差は-0.2 kcal/mol となるので、これらはそれぞれ図 61 のような位置に存在すると仮定することができる。

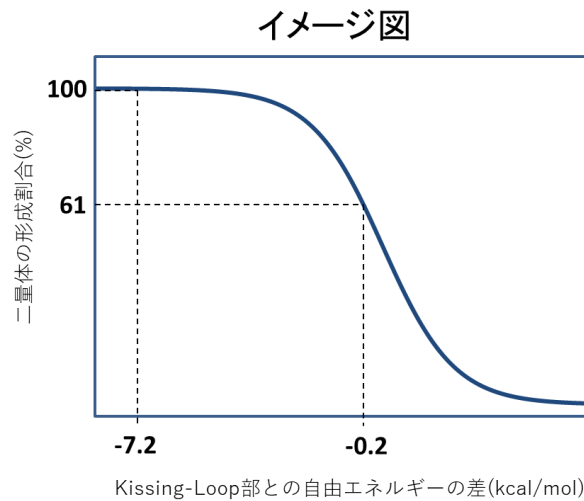


図 61. 自由エネルギーの差分と二量体形成の相関イメージ

これはまた第 2 章の Kissing-Loop 変異体のもつ自由エネルギー値と触媒活性の相関分析が、シグモイド曲線以外には及ばないながら、二項分布関数にも非常に低い  $p$  値=0.00015 を示し、1%の有意性をクリアする相関となった事からも、自由エネルギーと二量体形成、それに伴い、機能発現の 3 パラメータは密接に相関し、ボトルネックは自由エネルギーの差を Driving Force とした二量体の形成であるという考えが非常に有力であると考えられる (図 62)。

```
> plot(df)
> fit2 = glm(formula = df$V2 ~ ., family = quasibinomial, data = df)
> x = seq(-20,0,0.01)
> y2 = predict(fit2,list(V1 = x),type="response")
> lines(x,y2)
> summary(fit2)
```

Call:  
glm(formula = df\$V2 ~ ., family = quasibinomial, data = df)

Deviance Residuals:  
Min 1Q Median 3Q Max  
-0.78241 -0.27633 0.04236 0.15952 0.75923

Coefficients:  
Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)  
(Intercept) -4.4982 0.7851 -5.729 2.46e-05 \*\*\*  
V1 -0.5518 0.1137 -4.851 0.00015 \*\*\*  
---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for quasibinomial family taken to be 0.1503829)

Null deviance: 10.7842 on 18 degrees of freedom  
Residual deviance: 2.5666 on 17 degrees of freedom  
AIC: NA

Number of Fisher Scoring iterations: 6

図 62. 第 2 章の相関分析における二項分布曲線での回帰分析結果

## 総合考察

### 4-1. 本研究の成果と意義

現在見つかっている単独で機能を発現する non-coding RNA は短いものでも 100 nt 前後の長さを有している。また一方で、アイゲンによるハイパーサイクル理論において、誤りを訂正するメカニズムなしで自己複製が行われるためには、ヌクレオチド長は 100 より小さいことが必要であると主張されている(Eigen and Schuster, 1977)。この両方の状況証拠からも原始地球上で、RNA が機能を発現し、それが校正メカニズムなしに複製されうるには 100 nt 前後の RNA がカギになる可能性が考えられる。しかしながら、これまでに粘土表面など原始地球でも起こりえる環境下で確認がなされている RNA の長鎖化現象は 20~50 nt 程度(Ferris and Ertem, 1992, 1993; Kawamura and Ferris, 1994; Ferris, 2006)であり、機能発現しうる RNA の長さと、原始地球上で生成しえた RNA の長さには大きなギャップが存在した。

本研究では、まず第2章において、具体的な R3C リボザイムの 2 分子変異体を題材に、短鎖の RNA が Kissing-Loop 相互作用をトリガーにしてダイナミックにコンフォメーションを変化させ、疑似的な長鎖 RNA となって、機能発現に至る具体的な事例の存在を明らかにした。さらに第3章では、別の短い RNA を用い、Kissing-Loop をトリガーとした二量体化/機能獲得までの現象を再現することに成功した。この成果は、この現象が R3C リボザイムの 2 分子変異体だけに限ったものではなく、非常に汎用性のあるメカニズムであることを示すものである。これらの成果は、いずれもこれまでギャップが存在した RNA の長鎖と機能発現への壁に、『20~50 nt の短鎖 RNA が RNA 間の相互作用によって二量体化し、疑似的に長鎖 RNA となって機能を発現した』という新たな RNA ワールド拡大と進化の可能性を提示するものである (図 63)。

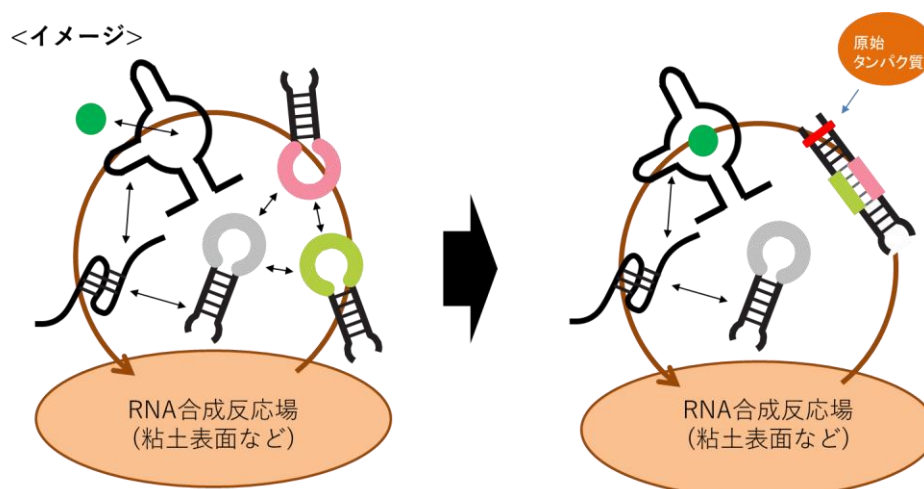


図 63. 原始環境における短鎖 RNA 間相互作用と RNA ワールドの拡大モデル図

## 4-2. RNA 間相互作用の豊富なバリエーション

4-1 にも述べたように、本研究の最大の成果は、短鎖 RNA が Kissing-loop をトリガーにコンフォメーションを変化させ機能を発現する可能性を示したことにある。しかし、RNA 間の相互作用は Kissing-Loop だけではない。以下に示すように RNA は様々な形態で相互作用が可能であり、この二次構造のモチーフのバリエーションの豊かさは DNA やタンパク質にはない固有の特徴であるといえる。本研究で取り扱った Kissing-Loop を事例にとると長い相補鎖を有する対となる短鎖の RNA が出現する可能性は小さい割合である事が考えられる。例えば、第 2 章で取り扱ったように、Kissing-Loop として 7 nt がペアとなる RNA がランダムな RNA 合成の中から生まれる確率は 279936 分の 1 にもなる。これがステム部分も相補的な RNA ということも考慮するとその可能性も天文学的なものとなるだろう。

しかしながら、RNA はその柔軟性によって、図 64 に示すようなさまざまな形の相互作用を可能にする (Taylor and Sobczak, 2020)。著者はこの柔軟性という RNA 特有の物性値こそが原始地球において、ランダムな短鎖 RNA の合成の中から、様々な相互作用を起こす RNA の確率を上げ、その結果として機能を有した RNA を生み出し、RNA ワールドとして拡大、進化をしていくことができた大きな要因だったのではないかと考えている。

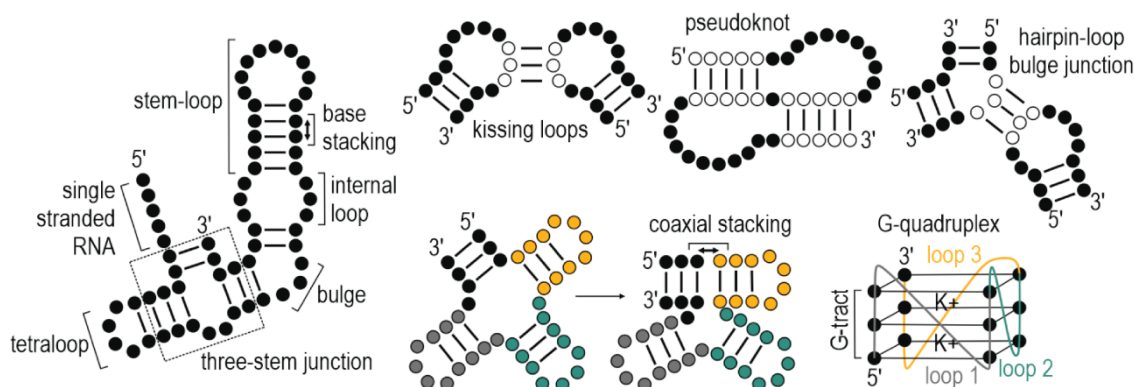


図 64. RNA の二次構造モチーフのバリエーション  
(Taylor and Sobczak, 2020 より引用)

## 4-3. リボスイッチにおけるステムループのコンフォメーション変化の重要性

本研究で扱った RNA の機能発現におけるコンフォメーション変化の重要性は、著者の修士論文の研究テーマであったグリシンリボスイッチにおいても共通の現象として確認することができる。リボスイッチとは、mRNA の 5'非翻訳領域に存在するスイッチ機能を有する non-coding RNA の一種である。リボスイッチは特定の物質と選択的に結合するアプタマー部の下流に制御部を持つが、機能のコアとなる ON/OFF 制御はステムループのコンフォメ



ーション変化により行っている事がわかっている (Mironov et al., 2002 ; Nahvi et al., 2002) (図 65)。

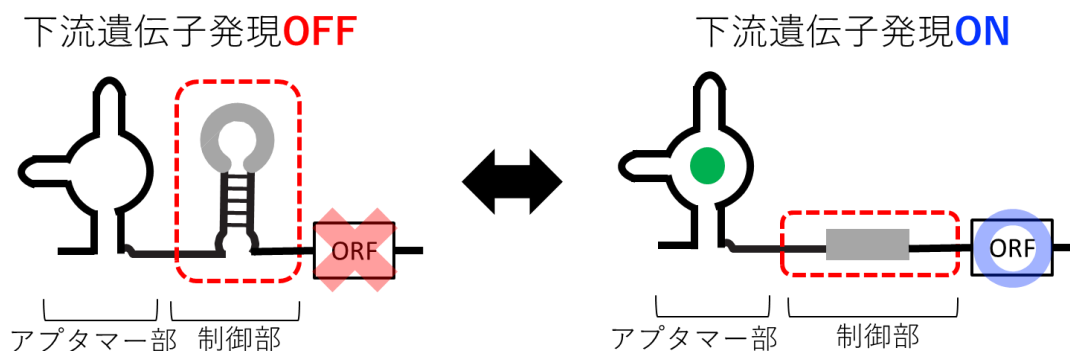


図 65. リボスイッチの機能メカニズム

リボスイッチは近年、特にバクテリアにおいて生命活動に必須の役割を果たしていることが分かってきており、バクテリアでは実に全遺伝子の 4% 近くをリボスイッチによって調節しているともいわれている (Breaker, 2011)。このような状況証拠からもリボスイッチが生命誕生の初期段階において、スイッチとして必須の機能を果たした可能性が指摘されている (Corbino et al., 2005)。

著者は、2004 年に発見された枯草菌のグリシンリボスイッチ (Mandal et al., 2004) において、アプタマー部をもたない変異体が、制御部のみでも外部の自由水の大小を調整することで下流遺伝子の発現調整能を発現することを発見、また本現象が外部の自由水の大小がステムループ構造の安定性に影響を及ぼすことに由来することを突き止めた (Hamachi et al., 2013)。

この発見はリボスイッチ創出期の存在形態のひとつを提示するものであると同時に、原始環境において、RNA ワールドの機能に RNA のコンフォメーション変化が大きな役割を担っていた可能性を示唆するものである。

更に、この発見は生体内での RNA の二次構造形成と機能発現に対しても、一石を投じるものと捉える事ができる。生態環境ではタンパク質などの高分子が高濃度で溶存している事が知られており、大腸菌の細胞質中の高分子濃度は 300-400 g/l にもなるといわれている (Miyoshi and Sugimoto, 2008)。このような環境は高分子こみあい、または分子クラウディング環境と総称されるが、大きな特徴として、*in vitro* 環境下に比べ、自由水が極端に少なくなることが知られている (Nakano et al., 2004)。これまでにこの低自由水環境下において、DNA リガーゼや FtsZ タンパク質などの活性向上 (Zimmerman et al., 1983; 1993)、またパーキンソン病の原因タンパク質であるシヌクレインなどの会合や、線維化が促進されることが報告されている (Minton, 2001; Eilis and Minton, 2003)。RNA においても分子クラウディング環境下でハンマーヘッドリボザイムの性能が向上することが既に確認されてい



る (Karimata et al., 2006)。本発見は、低自由水環境下においてグリシンリボイッチのもつステムループ部が、グリシンの存在の有無に依らず二次構造を形成し、結果リボスイッチの機能に影響を及ぼすことを示したものである。

これはリボスイッチという non-coding RNA におけるステムループの重要性を示すものであるとともに、ステムループの安定性が外部の環境によって容易に変わりうるという RNA のもつフレキシビリティをも同時に示した結果であると捉えることができる。

#### 4-4. RNA 2 分子モデルの核酸医薬設計への応用の可能性

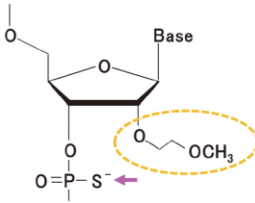
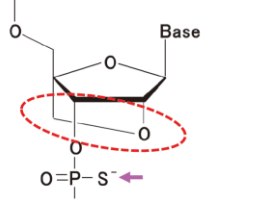
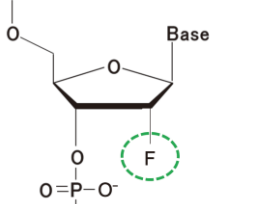
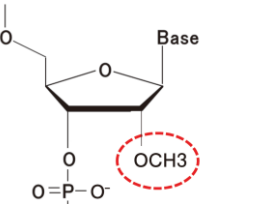
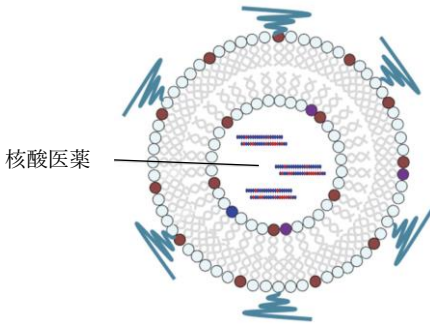
本研究で得られた成果は、そのコンセプトを近年存在感が高まる核酸医薬の設計に応用する事も考えることができる。核酸医薬とは、近年創薬標的の枯渇が問題となる製薬業界において、タンパク質を標的とする従来の医薬品とは異なり、RNA のレベルで薬理活性を得ようとする創薬の新規モダリティの事である。

核酸医薬は従来のバイオ医薬とは異なり、RNA やタンパク質をターゲットにできるという大きなメリットの他に、抗体などに比べて多量合成がシンプルで比較的安価であるというメリットを有する。このようなメリットも、核酸医薬品は最近まで「原理的には魅力的だが、実際に医薬品にすえるのは難しい」という認識が根強かった。しかしながら、遺伝子疾患を対象とする複数の核酸医薬品において、劇的な治療効果が確認できたことから、その認識はいまや「アンメットメディカルニーズに対応しうる、実現可能なモダリティ」へと変化しつつある。実際に現在までに様々な核酸医薬品が開発され、使用が始まっている。

一方で、核酸医薬品には、そのすべてに共通する大きなデメリットも残存する。それは生体内での分解速度が速いという事である。既承認の核酸医薬品においても、このデメリットを克服するべく、様々な試みが行われてきた。その対策は表 5 に示す通り、大きく 2 つに分類される (井上, 2019)。

表 5. 核酸医薬品における生体内での分解速度調節のアプローチ

対策	内容
核酸修飾への修飾による 難分解性の付与	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 核酸の 2'末端や 3'末端に修飾を行うことで、分解速度を遅くする → 2'-MOE や 2'4'-BNA/LNA 2'-F や 2'-OMe などがあげられる</li> </ul>

	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  <p><b>2'-MOE</b> (糖部2位の修飾)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><b>2',4'-BNA/LNA</b> (糖部2,4位の架橋型修飾)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p><b>2'-F</b> (糖部2位の修飾)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><b>2'-OMe</b> (糖部2位の修飾)</p> </div> </div>
<p>DDS による核酸医薬品の保護</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>核酸医薬を Drug Delivery System により分解されづらい状態で幹部への局所投与を行う</li> <li>具体的には以下が既に実用化済              リポソーム (Patisiran)              コンジュゲート (Fitusiran, Inclisiran, Givosiran)</li> </ul> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  </div>

しかしながら、両対策をもってしても薬効の確保と副作用の抑制という 2 つのパラメータのバランスが難しいというのが現時点の実情といえる。これは難分解性を付与した核酸医薬品であっても抗体医薬と比べると RNA の分解速度が速く、どうしても投与量が増える傾向にあり、これによって薬効の確保と同時に副作用も増大してしまうからである。また DDS においては、投与の量は抑えられるものの、幹部の近くで DDS の分解が起こり、初

期バーストと呼ばれる薬効成分の急激な放出、これによる副作用の顕在化が指摘されている(菊池, 2014)。

このような現状を鑑みた際に、著者は、本成果が核酸医薬品設計への新たな可能性を示すことができると考えている。具体的には、核酸医薬となる薬効分子を2分子に分け、それぞれが Kissing-Loop などの相互作用により二量体化、二量体形成時にのみ薬理活性部位を形成できるように設計できたとする。このような核酸医薬品を設計できれば、一方を一定量投与した上で、他方分子の投与量によって薬理活性を調整できる。また、Kissing-Loop 部を改変した RNA のバリエーションを複数用意することにより、より細かく患者に合わせて薬効と副作用を調整することができる可能性があると考えている (図 66)。

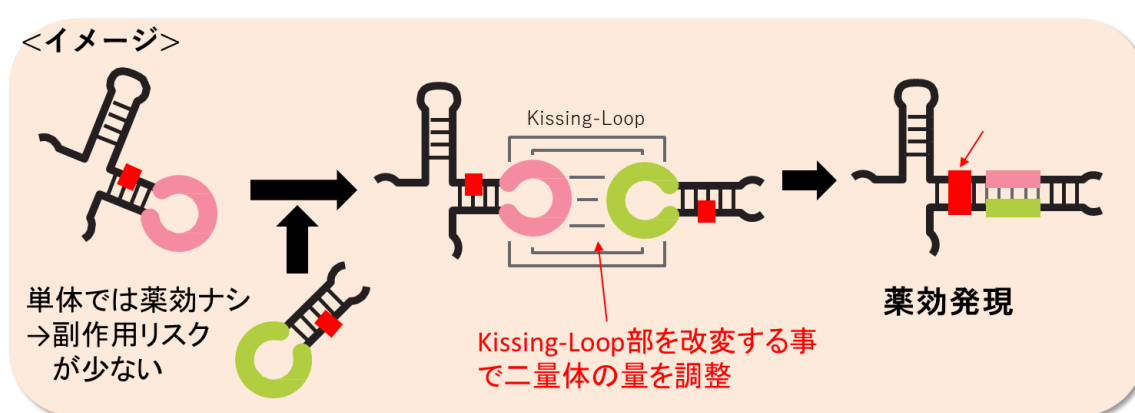


図 66. 核酸医薬品における 2 分子モデル適用のイメージ図

#### 4-5. RNA ウイルスへの本成果の応用の可能性

また本研究で得られた成果は、SARS-CoV-2 や HIV などに代表される RNA ウイルスにも適用も可能になりうると著者は考えている。例えば HIV-1 ウイルスでは、感染後の逆転写反応や、転写後の二量体化などの各フェーズにおいて、Kissing-Loop が決定的な役割を果たしていることが近年分かってきている (Skripkin et al., 1994; Laughrea and Jette, 1994, 1996; Takahashi et al., 2000; Brunel et al., 2002; Dubois et al., 2018) (図 67)。

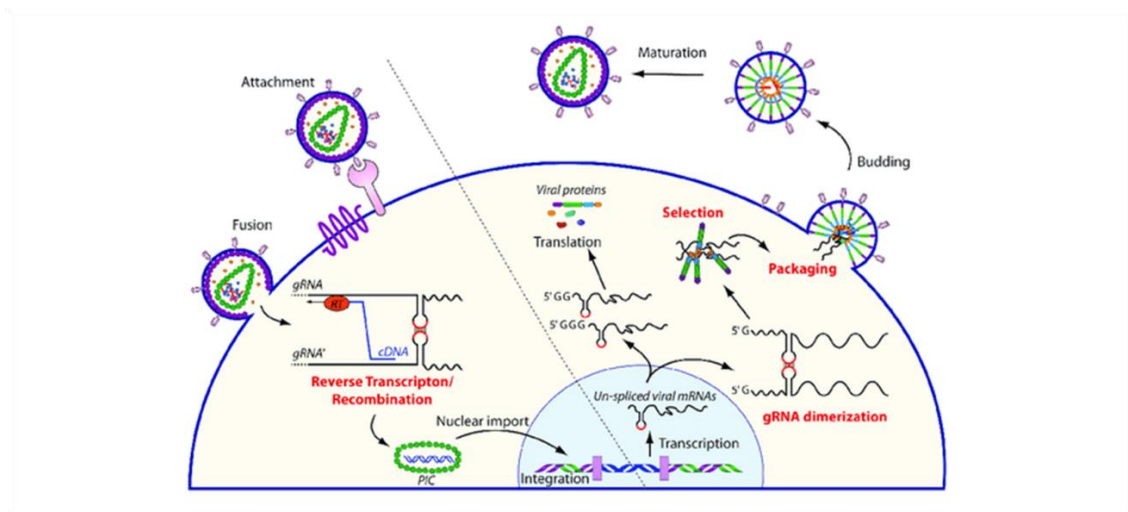


図 67. HIV-1 RNA ウイルスの感染メカニズム  
(Dubois et al., 2018 より引用)

このようなメカニズムに対して、Kissing-Loop 相互作用を阻害するようなアンチセンス鎖を有した核酸医薬品の開発は今後十分考えられる。また、宿主の複製システムの利用は HIV-1 のみならず、すべての RNA ウイルスに共通のメカニズムである。SARS-CoV-2 においては、自らが複製に関わる酵素をコードしており、感染後すぐにウイルス RNA から複製酵素が合成され、その後その酵素によって RNA の複製が行われる事が判明している (Hackbart et al., 2020)。一方で二重鎖を認識して切り離しの能力を有する EndoU もコードしており、これは自らの RNAの中から、ステム構造を有した dsRNA のみを切り取って、宿主の持つ免疫反応を逃れるためのデコイを作っているという説も唱えられている (Masters, 2006; Deng et al., 2018)。いまだ感染メカニズムの全貌は明らかではないものの、もしこれが真実であれば、SARS-CoV-2 の免疫系への対処において、ステム構造が決定的な役割を担っている可能性もあり、これは、今後決定的な抗ウイルス薬を開発するにあたっての明確なターゲットとなりうるとも考えることができる。

#### 4-6. 本研究の位置づけ

以上の考察から、本研究の成果は非常のベーシックであり、かつ広範囲に利用できる成果である事が言える。既存報告の優位性という観点において、まずは HIV の宿主への感染過程の研究において、似通ったメカニズムは報告されているものの、同様のメカニズムを持った Ribozyme の報告は未だなされていない。更に前述の通り、核酸医薬においても、2 分子系を用いた開発報告はない。これらの背景は本研究が既存報告にはない、新規の成果であることを示すものであり、新たな観点での様々な分野での利用を期待させるものであるといえる。

## 5 章. 材料と方法

### 鋳型 DNA の準備

すべてのライゲーション反応で使用したリボザイム (RNA) は、オリゴ DNA (ユーロフインゲノミクス社製) を鋳型とした T7 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* での転写物を用いた。オリゴ DNA の 5'末端側には T7 プロモーター領域を付加した。それぞれのオリゴ DNA の配列とそれぞれのプライマーを表 6~8、図 68 に示した。

### PCR による DNA の増幅

まず、表 6 に示した鋳型 DNA とプライマーの組み合わせで PCR 溶液を調製した。鋳型 DNA はすべて 1  $\mu$ M、プライマーはすべて 100  $\mu$ M に調整してそれぞれ 1  $\mu$ l ずつ使用し、10 $\times$ PCR Buffer (タカラバイオ社) 10  $\mu$ l、dNTP mixture (2.5 mM each) 8  $\mu$ l、MilliQ 水 78.5  $\mu$ l、Taq DNA polymerase (タカラバイオ社) 0.5  $\mu$ l の Total 100  $\mu$ l の PCR 溶液を調製した。次に、Thermal cycler (ASTEC 社 PC320) にて 95°C で 15 sec、55°C で 30 sec、72°C で 30 sec、PCR 反応を 30 サイクル行い、72°C で 3 min インキュベートした (表 9)。PCR 増幅確認のため、PCR 後サンプル溶液 100  $\mu$ l の中から 5  $\mu$ l 取り、10 $\times$ loading dye 1  $\mu$ l を添加して 1.5% アガロースゲルで電気泳動を行った。PCR 後サンプル溶液の残り 95  $\mu$ l にはエタノール沈殿を行い、PCR 産物を沈殿させて回収した。

表 6. 変異体の増幅に使用した鋳型 DNA/プライマーリスト

No	名前	template DNA	PrimerF	PrimerR
1	R3C 全長	pTAC-1-R3C template	pTAC419F	R3CreverseR/Hprimer
2	<A> WT	R3Cw/o-H,AATAACA,d9-34,G-C template	Universal primer	R3creverseR/Hprimer
3	<hairpin- $\Delta$ U> WT	Loop-MH,TGTTATT-d-sub	Universal primer	Loop-MH,R-primer-d-sub-2
4	<hairpin- $\Delta$ U> $\Delta$ 5'G	Loop-MH,TGTTATT-1-d-sub	Universal primer2	Loop-MH,R-primer-d-sub-2
5	<hairpin- $\Delta$ U> $\Delta$ 3'A	Loop-MH,TGTTATT-d-sub	Universal primer	Loop-MH,R-1-primer-d-sub-2
6	<hairpin- $\Delta$ U> $\Delta$ 3'AA	Loop-MH,TGTTATT-d-sub	Universal primer	Loop-MH,R-2-primer-d-sub
7	<hairpin- $\Delta$ U> $\Delta$ 3'AAG	Loop-MH,TGTTATT-d-sub	Universal primer	Loop-MH,R-3-primer-d-sub
8	<hairpin- $\Delta$ U> $\Delta$ 5'GA	<hairpin-delU>-del5'GA-template	Universal primer2	<hairpin-delU>-del5'GA-R-p
9	<A>UCA-SBS	<A>-UCA-SBS template	Universal primer	<A>-UCA-SBS-R-primer
10	<A> $\Delta$ 5'G(G38U,A39C)	<A>-UCA-SBS template	Universal primer2	<A>-UCA-SBS-R-primer
11	<A>AACGGCA	<A>-AACGGCA-template	Universal primer	R3creverseR/Hprimer
12	<hairpin- $\Delta$ U>UGCCGUU	Loop-MH,TGCCGTT-d-sub	Universal primer	Loop-MH,R-prim-TGCCGTT-d-sub
13	<A>AAUAAC	<A>-AAUAAC-template	Universal primer	R3creverseR/Hprimer

14	<A>AUAACA	<A>-AUAACA-template	Universal primer	R3creverseR/Hprimer
15	<hairpin- Δ U>UGUUAU	<hairpin-delU>-UGUUAU-template	Universal primer	<hairpin-delU>-UGUUAU-R-primer
16	<hairpin- Δ U>GUUAAU	<hairpin-delU>-GUUAAU-template	Universal primer	<hairpin-delU>-GUUAAU-R-primer
17	<A>AUAAC	<A>-AUAAC-template	Universal primer	R3creverseR/Hprimer
18	<hairpin- Δ U>GUUAAU	<hairpin-delU>-GUUAAU-template	Universal primer	<hairpin-delU>-GUUAAU-R-primer
19	<hairpin- Δ U+A>	<R3C-hairpin-dU-A>	Universal primer	R3creverseR/Hprimer

表 7. 鋳型 DNA のオリゴ配列

No.	Template 名	オリゴ配列
1	pTAC-1-R3C template	CGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGC TTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCG GGTGTGCGGGCTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGACCATATGC GGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATATTACTACAGGCCTTCGCCATTTCAG GCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAA AGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTG TAAACGACGGCCAGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGA TCTCGAGGCCAGATCTCCAGTGAATTCTAATACGACTCACTATAGAGACCGTAATGAGTAGTAC TTATTATGCTCGATTGTTGTAAGAACAGTTTGAATGGGTGAATATAGTGAGAATTGTGGATC CGCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTG TGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCT GGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCAGTC GGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGCGGTTTGGC TATTGGGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGCTGCGGCG AGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGA AAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGCCGCGTTGCTGGCG TTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGC GAAACCGACAGGACTATAAAGATACGAGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCC TGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCT TTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGGTAGGTGCTGCTCCAAGCTGGGCTGT GTGCACGAACCCCCGTTACGCGGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCA ACCCGGTAAGACAGCTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA GGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAAC AGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGA TCCGGCAAAACAAACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCA GAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGA

		AAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAA ATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAA TGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGAC TCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGAT ACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGC CGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAA GCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCG TGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTTC CCAACGATCAAGGCGAGT TACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGA AGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCA TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTG TATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAG AACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCG CTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACGATCTTCAGCATCTTTTACTTT CACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGC GACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTT ATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGC ACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACTATAA AAATAGGCGTATCAGAGGCCCTTTCGTC
2	R3Cw/o-H,AATAACA,d9-34,G-C template	CCAGTGAATTCTAATACGACTCACTATAGAGACCGAATAACATGCTCGCGTAAGTTGAATGGGT TGAATATAGTGAG
3	Loop-MH,TGTTATT-d-sub	CAGTGAATTCTAATACGACTCACTATAGAGACCGTGTATTGTTGAA
4	Loop-MH,TGTTATT-1-d-sub	CAGTGAATTCTAATACGACTCACTATAAGACCGTGTATTGTTGAA
5	<hairpin-delU>-del5'GA-template	CAGTGAATTCTAATACGACTCACTATAGACCGTGTATTGTTGAA
6	<A>-UCA-SBS template	ATTCTAATACGACTCACTATAGAGACCGAATAACATGCTCGCGTAAGTTGAATGGGTTTATATA GTGAG
7	<A>-AACGGCA-template	CAGTGAATTCTAATACGACTCACTATAGAGACCGTGCCGTTTGGTTGAA
8	Loop-MH,TGCCGTT-d-sub	AATTCTAATAATACGACTCACTATAGAGACCGAATAACTGCTCGCGTAAGTTGAATGGGTTGAA TATAGTGAG
9	<A>-AAUAAC-template	AATTCTAATAATACGACTCACTATAGAGACCGATAACATGCTCGCGTAAGTTGAATGGGTTGAA TATAGTGAG
10	<A>-AUAACA-template	CAGTGAATTCTAATACGACTCACTATAGAGACCGTGTATTGTTGAA
11	<hairpin-delU>-UGUUUU-template	CAGTGAATTCTAATACGACTCACTATAGAGACCGGTTATTGTTGAA
12	<hairpin-delU>-GUUUUU-template	CAGTGAATTCTAATACGACTCACTATAGAGACCGGTTATTGTTGAA
13	<A>-AUAAC-template	CAGTGAATTCTAATACGACTCACTATAGAGACCGGTTATTGTTGAA

14	<hairpin-delU>-GUUUAU-template	CAGTGAATTCTAATACGACTCACTATAGAGACCGTTATTGGTTGAA
15	<R3C-hairpin-dU-A>	GAATTCTAATACGACTCACTATAGAGACCGTGTATTGGTTGAAGAGACCGAATAACATGCTC GCGTAAGTTGAATGGGTTGAATATAGTGAG

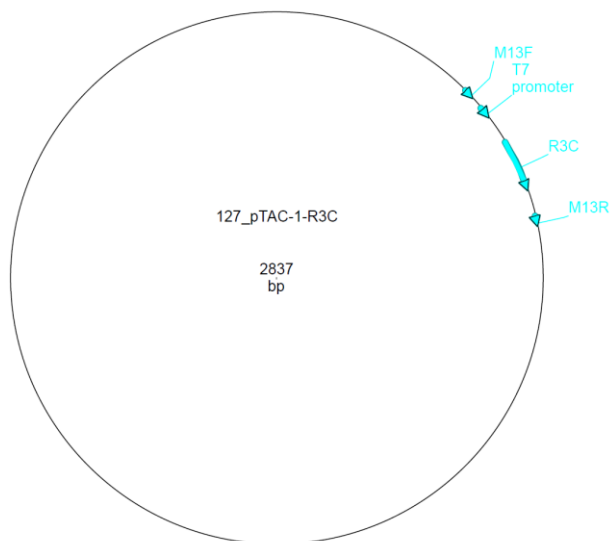


図 68. pTAC-1-R3C template の概要図

表 8. プライマーF/R のオリゴ配列

No,	Primer F/R 名	オリゴ配列
1	pTAC419F	CCAGTGAATTCTAATACGACTCACTATAG
2	Universal primer	CCAGTGAATTCTAATACGACTCACTATAG
3	R3CreverseR/Hprimer	CTCACTATATTCAACCCATTCAAAC
4	Loop-MH,R-primer-d-sub-2	TTCAACCAAATAACACGGTCTC
5	Loop-MH,R-1-primer-d-sub-2	TCAACCAAATAACACGGTCTC
6	Loop-MH,R-2-primer-d-sub	CAACCAAATAACACG
7	Loop-MH,R-3-primer-d-sub	AACCAAATAACACGG
8	<hairpin-delU>-del5'GA-R-p	TTCAACCAAATAACACGGTC
9	<A>-UCA-SBS-R-primer	CTCACTATATGAAACCCATTC
10	Loop-MH,R-prim-TGCCGTT-d-sub	TTCAACCAAACGGCACGGTC
11	<hairpin-delU>-UGUUAU-R-primer	TTCAACCAAATAACACGGTCTC
12	<hairpin-delU>-GUUAUU-R-primer	TTCAACCAAATAACCGGTCTC
13	<hairpin-delU>-GUUAU-R-primer	TTCAACCAAATAACCGGTCTC



表 9. PCR 反応条件

試薬	$\mu$ l
1 $\mu$ M Template	1
100 $\mu$ M Forward primer	1
100 $\mu$ M Reverse primer	1
10 $\times$ PCR Buffer	10
dNTP (2.5 mM each)	8
MilliQ 水	78.5
Taq DNA polymerase	0.5
Total	100
↓	
95°C 1 min	
↓	
95°C 15 sec	
55°C 30 sec      30 cycle	
72°C 30 sec	
↓	
72°C 3 min	

#### 転写と精製

上記の方法で得られた PCR 産物は MilliQ 水 150  $\mu$ l で溶かし、そこに 10 $\times$ T7 Buffer (40 mM Tris-HCl (pH 7.5)、6 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM spermidine) 30  $\mu$ l、100 mM DTT 30  $\mu$ l、NTP (25 mM each) 60  $\mu$ l、T7 RNA polymerase (Albert Einstein College of Medicine の Subray S. Hedge 博士より提供していただいた pT-911Q プラスミドを *E. coli* BL21-Codon Plus(DE3)-RIL strain (Stratagene) 内で発現し、精製回収したもの) 30  $\mu$ l を添加して total 300  $\mu$ l にし、42°C で 3 h インキュベートした (表 10)。その後、エタノール沈殿を行い、転写産物に MilliQ 水 150  $\mu$ l、BPB 含有の 2 $\times$ Urea dye を等量加え、60°C で 10 min denature し、7 M Urea 入り 12% PAGE ゲルで分離した。目的の RNA のバンドを切り出した後、MilliQ 水 450  $\mu$ l、3 M NaOAc (pH 5.2) 50  $\mu$ l を加え、3 h と一晩ロータリーミキサーにセットし、ゲルから RNA を溶出させた。溶出した RNA は遠心分離し、その溶液のみ回収して完全にゲルを取り除いた。最後に、エタノール沈殿で回収した後、Nano Photometer (IMPLEN 社) で濃度を測定した。

表 10. 転写反応条件

試薬	$\mu\text{l}$
PCR product (dry)	-
10× T7 Buffer	30
NTP (25 mM each)	60
100 mM DTT	30
MilliQ 水	150
T7 RNA polymerase	30
Total	300

↓

42°C 3 h

ライゲーション反応

サンプル溶液中に R3C リガーゼリボザイムまたは RNA の終濃度が  $5\ \mu\text{M}$  となるように添加し、さらに終濃度が 15 mM  $\text{MgCl}_2$  (RNase free)、50 mM Tris-HCl (pH 8.5) になるように混合し、37°C で 5 min インキュベートした。この際、2 分子系の反応においては、各 RNA を  $5\ \mu\text{M}$  となるように添加した。そして、終濃度  $5\ \mu\text{M}$  になるよう 6-FAM ラベルされた基質を添加し、Total 15  $\mu\text{l}$  として 23°C で一晩 (18.5 h) 静置した。なお基質は日本バイオサービス社にて合成したものである。その後 BPB 含有の 2×Urea dye を等量の 15  $\mu\text{l}$  加え、60°C で 10 min denature 後、7 M Urea 入り 12% PAGE で分離した。バンドの蛍光は Typhoon FLA 7000 (GE ヘルスケア・ジャパン社) にて可視化し、Image Quant TL 解析ソフトにてバンドの蛍光強度の定量を行った。

表 11. ライゲーション反応条件

5 $\mu\text{M}$ RNA (リボザイム)
15 mM $\text{MgCl}_2$
50 mM Tris-HCl (pH 8.5)
↓ incubate (37°C, 5 min)
50 $\mu\text{M}$ [FAM]RNA 基質 (12 nt)
Total 15 $\mu\text{l}$
↓
ライゲーション反応 (23°C, 18.5 h)
↓
ライゲーション確認泳動 (7 M Urea 12% PAGE)

## ロジスティック回帰分析

得られた変異体ごとの触媒活性値と、算出した自由エネルギーの回帰分析を、精度が高いといわれる統計解析用のオープン言語である R(R 4.0.3 for windows)を用いて行った。なおコーディングの際の GUI は R studio(RStudio Desktop 1.3.1093)を用いて行った。なお R はオープン言語であるため、その定義と開発者の情報を以下に示す。

定義：A language and environment for statistical computing.

開発チーム：R Core Team .

住所：Vienna, Austria.

年次：2020

URL：https://www.R-project.org/.

図 67 に解析時のインプットコードと結果を示す。

```
> df = read.table(pipe("pbpaste"))
> names(df) <- c("en", "fi") #en:energy, fi:fluorescence intensity
> df$fi <- df$fi/max(df$fi) #fiの最大値でfiの各値で割り算
> plot(df)
> sig <- nls(fi~SSlogis(en,a,b,c),data=df)
#シグモイド曲線で回帰(nlsは非線形回帰の関数、SSlogisがシグモイド曲線の関数)
> ysig = predict(sig,list(en = x),type="response")
> lines(x,ysig)
> sig
Nonlinear regression model
model: fi ~ SSlogis(en, a, b, c)
data: df
a b c
1.010 -8.449 -1.427
residual sum-of-squares: 0.8611

Number of iterations to convergence: 11
Achieved convergence tolerance: 5.822e-06
> summary(sig)
Formula: fi ~ SSlogis(en, a, b, c)

Parameters:
Estimate Std. Error value Pr(>|t|)
a 1.01028 0.07076 14.278 < 2e-16 ***
b -8.44860 0.33541 -25.189 < 2e-16 ***
c -1.42687 0.20629 -6.917 5.62e-09 ***
---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
Residual standard error: 0.1263 on 54 degrees of freedom
```

図 67. 回帰分析のインプットコード

## Native PAGE による RNA 間相互作用の確認

2つの分子間に相互作用が働くかを調べるために、mini-G3、-U70、-C3、-U70-ACAAUAAの4種のRNAを用い、Native PAGEによる電気泳動を行った。反応条件は通常のライゲーション反応(表11)とほとんど変わらないが、基質は加えなかった(表12)。Native PAGEは、まずRNAを混合してから23°Cで18.5 h静置した後に、8% PAGEで4°C、15 mA、4.5

h の条件で電気泳動を行い、0.04%のトルイジンブルーで染色をした(Hamachi et al., 2013; Tanizawa et al., 2018)。

表 12. Native PAGE の条件

5 $\mu$ M RNA (リボザイム)
15 mM $MgCl_2$
50 mM Tris-HCl (pH 8.5)
↓ incubate (37°C, 5 min)
MilliQ 水
Total 15 $\mu$ l

#### アミノアシル化反応アッセイ

アミノアシル化反応は以下に示す。以下混合液を 1.5 ml チューブで混合し、37°Cで昇温、その後 AlaRS442N を加えて、シンチレーションカウンターを用いて 2、5、10 min でそれぞれ測定した。なお、使用した $[^{14}C]$ -L-Alanine の比活性は 132.0 mCi/mmol であり、測定機器のメーカーは Moravek, Inc 製のものを使用した(Schreier and Schimmel, 1972)。

表 13. アミノアシル化反応の条件

50 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)
30mM KCl
2mM dithiothreitol
2mM ATP
Pure water
10 $\mu$ M $[^{14}C]$ -L-Alanine
15 $\mu$ M RNA
↓ 混合し 37°Cに昇温
6.15 $\mu$ M AlaRS442N 添加
↓ 2,5,10min で反応
5% trichloroacetic acid で wash

#### FRET (Fluorescence resonance energy transfer)

FRET に条件を以下に示す。以下の濃度の要請を合計 50  $\mu$  l の溶液に調整後、37°Cで 5 min の incubate を行い、その後 4°C 5 min を経て FP6200 スペクトロフルオロメーター(Jasco 社製)を用いて測定を行った(Mergny, 1999; Mergny and Maurizot, 2001; Umehara et al., 2012; Hamachi et al., 2013)。

表 14. FRET の条件

5 $\mu$ M RNA	
15 mM MgCl <sub>2</sub>	
50 mM Tris-HCl (pH 8.5)	
total	50 $\mu$ l
↓	
(37°C 5 min⇒4°C 5 min)	

#### UV melting

T<sub>m</sub> 値測定条件を以下に示す。以下の濃度の要請を合計 120  $\mu$  l の溶液に調整後、37°C で 5 min の incubate を行い、その後、分光光度計 JASCO V-730 BIO (Jasco 社製) を用いて温度を 10°C から 98°C まで変えながら、260 nm の検出を行った。なお、測定頻度は 1°C 毎とし、温度の上昇速度は 1°C/min で 5 sec 以上温度が計測温度  $\pm$  0.1°C の範囲で安定した事を確認したのちに計測条件とした。

表 15. T<sub>m</sub> 値測定条件

5 $\mu$ M RNA	
15 mM MgCl <sub>2</sub>	
50 mM Tris-HCl (pH 8.5)	
total	120 $\mu$ l
↓	
(37°C 5 min⇒4°C 5 min)	

## 参考文献

- Arutaki M., Kurihara R., Matsuoka T., Inami A., Tokunaga K., Ohno T., Takahashi H., Takano H., Ando T., Mutsuro-Aoki H., Umehara T and Tamura K. (2020) G:U-independent RNA minihelix aminoacylation by Nanoarchaeum equitans alanyl-tRNA synthetase: An insight into the evolution of aminoacyl-tRNA synthetase. *J. Mol. Evol.* 88, 501–509.
- Bergman H.N., Lau C.N., Lehnert V., Westhof E., Bartel P.D. (2004) The three dimensional architecture of the class I ligase ribozyme. *RNA* 10, 176–184.
- Breaker R.R. (2011) Prospects for Riboswitch Discovery and Analysis. *Mol. Cell* 43, 867–879.
- Brunel C., Marquet R., Romby P., Ehresmann C. (2002) RNA loop-loop interactions as dynamic functional motifs. *Biochimie* 84, 925–944.
- Corbino A.K., Barrick E.J., Lim J., Weiz R., Tucker J B., Puskasz I., Mandal M., Rudnick D.N., Breaker R.R. (2005) Evidence for a second class of *S*-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in alpha-proteobacteria. *Genome Biol.* 6, R70.
- Crick F.H.C. (1958) On Protein Synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 12, 138–163.
- Deng X., Baker S.C. (2018) An “Old” protein with a new story: Coronavirus endoribonuclease is important for evading host antiviral defenses. *Virology* 517, 157–163.
- Dubois N., Marquet R., Pallart J.C., Bernacchi S. (2018) Retroviral RNA Dimerization: From Structure to Functions. *frontiers in Microbiology* 9, 527.
- Eigen M. and Schuster P. (1977) A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle. *Naturwissenschaften* 64, 541–565.
- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494–498.
- Ellis R.J., Minton A.P. (2003) Join the crowd. *Nature* 424, 27–28.
- Ferris J.P., Ertem G. (1992) Oligomerization of ribonucleotides on montmorillonite: reaction of the 50 -phosphorimidazolid of adenosine. *Science* 257, 1387–1389.
- Ferris J.P., Ertem G. (1993) Montmorillonite catalysis of RNA oligomer formation in aqueous solution. A model for the prebiotic formation of RNA. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 11270–11275.
- Ferris J.P. (2006) Montmorillonite-catalysed formation of RNA oligomers: The possible role of catalysis in the origins of life. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361, 1777–1786.
- Francklyn C., Shi J.P., Schimmel P. (1992) Overlapping nucleotide determinants for specific aminoacylation of RNA microhelices. *Science* 255, 1121–1125.

- Frugier M., Florentz C., Giege R. (1994) Efficient aminoacylation of resected RNA helices by class II aspartyl-tRNA synthetase dependent on a single nucleotide. *EMBO J.* 13, 2218–2226.
- Guerrier T.C., Gardiner K., Marsh T., Pace N. and Altman S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35, 849–857.
- Gilbert W. (1986) Origin of life : the RNA world. *Nature* 319, 618.
- Hackbart M., Deng X., Baker S.C. (2020) Coronavirus endoribonuclease targets viral polyuridine sequences to evade activating host sensors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117, 8094–8103.
- Hou Y.M., Schimmel P. (1988) A simple structural feature is a major determinant of the identity of a transfer RNA. *Nature* 333, 140–145.
- Joyce F.G., (2007) A glimpse of biology's first enzyme. *Science* 315, 1507–1508.
- Karimata H., Nakano S., Sugimoto N. (2006) The role of cosolutes on the hammerhead ribozyme activity. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 50, 81–82.
- Kawamura K., Ferris J.P. (1994) Kinetic and mechanistic analysis of dinucleotide and oligonucleotide formation from the 5'-phosphorimidazolid of adenosine on Na<sup>+</sup>-montmorillonite. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 7564–7572.
- Kim H.S., Quigley J.G., Suddath L.F., McPherson A., Sneden D., Kim J.J., Weinzierl J., Rich A. (1973) Three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA: folding of the polynucleotide chain. *Science* 179, 285–288.
- Kurihara E., Uchida S. Umehara T. and Tamura K. (2014) Development of a functionally minimized mutant of the R3C ligase ribozyme offers insight into the plausibility of the RNA world hypothesis. *Biology* 29, 452–465.
- Kruger K., Grabowski P.J., Zaug A.J., Sands J., Gottschling D.E., Cech T.R. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* 31, 147–157.
- Laughrea M., Jette L. (1994) A 19-nucleotide sequence upstream of the 5' major splice donor is part of the dimerization domain of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Biochemistry* 33, 13464–13474.
- Laughrea M., Jette L. (1996) Kissing-loop model of HIV-1 genome dimerization: HIV-1 RNAs can assume alternative dimeric forms, and all sequences upstream or downstream of hairpin 248-271 are dispensable for dimer formation. *Biochemistry* 35, 1589–1598.
- Mandal M., Lee M., Barrick J.E., Weinberg Z., Emission G.M., Ruzzo W.L., Breaker R.R. (2004) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science* 306, 275–279.
- Masters P.S. (2006) The Molecular Biology of Coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66, 193–292.

- McClain W.H., Foss K. (1988) Changing the identity of a tRNA by introducing a G-U wobble pair near the 3' acceptor end. *Science* 240, 793–796.
- Mergny J.L. (1999) Fluorescence energy transfer as a probe for tetraplex formation: the i-motif. *Biochemistry* 38, 1573–1581.
- Mergny J.L., Maurizot J.C. (2001) Fluorescence resonance energy transfer as a probe for G-quartet formation by a telomeric repeat. *Chembiochem* 2, 124–132.
- Minton A.P. (2001) The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *J. Biol. Chem.* 276, 10577–10580.
- Mironov A.S., Gusarov I., Rafikov R., Lopez L.E., Shatalin K., Kreneva R.A., Perumov D.A., Nudler E. (2002) Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* 111, 747–756.
- Miyoshi, D., Sugimoto, N. (2008) Molecular crowding effects on structure and stability of DNA. *Biochimie* 90, 1040–1051.
- Mueller U., Schubel H., Sprinzl M., Heinemann U. (1999) Crystal structure of acceptor stem of tRNA<sup>Ala</sup> from *Escherichia coli* shows unique G • U wobble base pair at 1.16 Å resolution. *RNA* 5, 670–677.
- Nahvi A., Sudarsan N., Ebert M.S., Zou X., Brown K.L., Breaker R.R. (2002) Genetic Control by a metabolite binding mRNA. *Chem. Biol.* 9, 1043.
- Nakano S., Kariata H., Ohmichi T., Kawakami N., Sugimoto N. (2004) The effect of molecular crowding with nucleotide length and cosolute structure on DNA duplex stability. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 14330–14331.
- Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P.B., Steitz T.A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920–930.
- Patterson G.H., Piston D.W., & Barisas B.G. (2000) Förster distances between green fluorescent protein pairs. *Analytical Biochemistry* 284, 438–440.
- Robertson P.M., Scott G.W. (2007) The structural basis of ribozyme-catalyzed RNA assembly. *Science* 315, 1549–1553.
- Rogers J. and Joyce G.F. (2001) The effect of cytidine on the structure and function of an RNA ligase ribozyme. *RNA* 7, 395–404.
- Salvatierra P.A., Turek W.K., Steuerwald U., Hobartner C., Pena V. (2016) Crystal structure of a DNA catalyst. *Nature* 529, 231–234.
- Saks M.E., Sampson J.R. (1996) Variant minihelix RNAs reveal sequence-specific recognition of the helical tRNA<sup>Ser</sup> acceptor stem by *E. coli* seryl-tRNA synthetase. *EMBO J.* 15, 2843–2849.



- Scehner M.D., Grant A.R., Bagby C.S., Koddobskaya Y., Piccirilli A.J., Bartel P.D. (2009) Crystal structure of the catalytic core of an RNA-polymerase ribozyme. *Science* 326, 1271–1275.
- Schimmel P., Giege R., Moras D., Yokoyama S. (1993) An operational RNA code for amino acids and possible relationship to genetic code. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8763–8768.
- Schimmel P., Ribas de Pouplana L. (1995) Transfer RNA: from minihelix to genetic code. *Cell* 81, 983–986.
- Schreier A.A., Schimmel P.R. (1972) Transfer ribonucleic acid synthetase catalyzed deacylation of aminoacyl transfer ribonucleic acid in the absence of adenosine monophosphate and pyrophosphate. *Biochemistry* 11, 1582–1589.
- Simsek M., Ziegenmeyer J., Heckman J., Rajbhandary L.U. (1973) Absence of the sequence G-T-psi-C-G(A)-in several eukaryotic cytoplasmic initiator transfer RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1041–1045.
- Skipkin E., Paillart J.C., Marquet R., Ehresmann B., Ehresmann C. (1994) Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4945–4949.
- Steitz A.T. (1999) DNA polymerases: Structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274, 17395–17398.
- Takahashi K.I., Baba S., Chattopadhyay P., Koyanagi Y., Yamamoto N., Takaku H., Kawai G. (2000) Structural requirement for the two-step dimerization of human immunodeficiency virus type 1 genome. *RNA* 6, 96–102.
- Tamura K. (2015) Origins and early evolution of the tRNA molecule. *Life* 5, 1687–1699.
- Tanizawa K., Uchida S., Kurihara E., Umehara T. and Tamura K. (2018) The kiss switch bings inactive R3C ligase ribozyme back to life. *Biology* 7, 7.
- Taylor K., Sobczak K. (2020) Intrinsic regulatory role of RNA structural arrangement in alternative splicing control. *International Journal of Molecular Science* 21, 5161.
- Tinoco I.Jr., Borer N.P., Dengler B., Levine D M., Uhlenbeck C.O., Crothers M.D. (1973) Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nature New Biol.* 246, 40–41.
- Umehara T., Kitagawa T., Nakazawa Y., Yoshino H., Nemoto R., Tamura K. (2012) RNA tetraplex as a primordial peptide synthesis scaffold. *Biosystems* 109, 145–150.
- Zhao F.T., Zhou Yun., Zhou Y.X., Yang Q., Song L., Jiang X.J., Jia Z.S. (2015) Competitive binding between miR-122 and p68 onto hepatitis C viral RNA. *Med Sci Monit* 21, 980–986.

- Zimmerman S.B., Minton A.P. (1993) Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22, 27–65.
- Zimmerman S.B., Pfeiffer B.H. (1983) Macromolecular crowding allows blunt-end ligation by DNA ligases from rat liver or Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5852–5856.
- 飯野 靖彦 (2001) 酸塩基平衡 *日腎会誌* 43, 621–630.
- 糸川 嘉則 (1994) カルシウム, マグネシウムの生体内での挙動 *Inorganic Materials* 252, 420–426.
- 井上 貴雄 (2019) 核酸医薬品の開発動向と規制整備の現状 *Pharma Tech Japan* 35, 7–19.
- 菊池 寛 (2014) 企業の観点から見た DDS 技術の将来展望 *Drug Delivery System* 29, 51–63.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、日々親身にご指導賜りました田村浩二教授、現場レベルでの細やかな実験指導やディスカッションに協力いただいた榎原琢哉助教、無津呂裕美助教、そして田村研究室の皆様、ここに心からの感謝の意を表します。