

哺乳類で生まれたリボザイム？ : CPEB3 リボザイム

リボザイム(ribozyme)、すなわち RNA 酵素の発見は RNA ワールド仮説を生むきっかけとなった。そのことから得てして全てのリボザイムは RNA ワールドからの生き残りのように思われているが、どうも最近になって誕生したリボザイムも少なからず存在しているようだ。

リボザイムの触媒する反応は基本的にはエステル転移反応 (transesterification) であり、リボースの 2'-OH と 3'-OH との環状化を経て RNA を切断する反応が最も多い。リボザイムの多様性については、良い総説 (Doudna and Cech 2002) があるので参照してもらいたい。Salehi-Ashtiani らはヒトゲノム中から自己の RNA 切断反応を触媒するリボザイムを網羅的に探索した (Salehi-Ashtiani et al. 2006)。まず彼らは、ヒトゲノムから 150nt 程度のライブラリーを作成し、両端に PCR のプライマーとなる配列を付加した。ついでライブラリーを一本鎖に解離し両端を結合して環状 DNA としたのち、二本鎖とした。これを鋳型にしてローリングサークル型の転写を行い、同じ 150nt ほどの単位が繰り返された RNA を合成させた。もし、この中に自己切断能を持ったリボザイムが含まれていれば、より長い単位からなる RNA と一緒に、1 単位や数単位からなる RNA が生成されることになる。よってこの中から 2 量体 (2 単位) に相当する 400nt 程度の RNA をポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) で精製すると、自己切断能を持つ RNA が持たない RNA に比べて多く含まれるはずである。これを逆転写し、再び環状化し、繰り返すことで自己切断能を持つ RNA が次第に濃縮される。12 回目には自己切断能を持つ RNA がライブラリーの多数派になり、4 種類のリボザイムが得られた。それぞれ、嗅覚受容体 OR4K15、インシュリン様成長因子受容体 IGF1R、non-LTR レトロトランスポゾン LINE1、そして cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 3 (CPEB3) の内部配列であった。彼らは CPEB3 を用いて詳細にその活性を解析した。

CPEB3 リボザイムは CPEB3 のイントロン中に、エクソンから数 kb 離れて存在し、その配列は有袋類を含む哺乳類で高度に保存されていた。このリボザイムの活性に必要な領域は最終的に 81nt にまで絞り込むことができた。逆に周辺の配列を長めにとっても活性を阻害するようなことは見られなかった。従って CPEB3 リボザイムはこの 81nt のみで機能していると考えられる。ポリヌクレオチドキナーゼ処理の後電気泳動することで、切断された 5' 側の断片の 3' 末端は 2'-OH と 3'-OH とがリン酸基を共有して環状につながっており、3' 側の断片の 5' 末端は OH 基が露出する構造を取っていることがわかった。すなわち、CPEB3 リボザイムの活性はリボザイムによく見られる 2'-3' cyclic phosphate を形成するエステル転移反応であることが示唆された。エステル転移反応はハンマーヘッド

ド型、D型肝炎ウイルス（HDV）型、ヘアピン型、そして Varkud satellite（VS）型のリボザイムが触媒することが知られている。

CPEB3 リボザイムは2価の金属イオンを必要とし、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} の存在下では活性を示したが、 Co^{2+} では活性が弱く、 Co^{3+} hexamine や Li^+ の存在下では全く活性を示さなかった。とりわけ1価の金属イオン Li^+ の存在下で活性を示さないのは、ハンマーヘッド、ヘアピン、Varkud satellite のリボザイムが活性を示すのと対照的であり、HDV リボザイムと似た特徴である。pHによる影響を受けにくい点も HDV リボザイムと共通する。実際、塩基配列上は CPEB3 リボザイムと HDV リボザイムとの間に類似性は認められないものの、二次構造ではよく類似した構造を取ることが予想された。哺乳類間で見られる配列の相違も、塩基置換を導入した場合の活性の変化も、CPEB3 リボザイムが HDV リボザイムとほぼ同じ構造を取ることが支持する結果となった。

一方、興味深いことに CPEB3 リボザイムでは、HDV リボザイムが塩基対を持つ位置に塩基対を持たない箇所があり、塩基対を持つように塩基置換すると活性が10倍近くに上昇することが示された。このような活性を損なうような構造が哺乳類全般で保存されているという事実は、CPEB3 リボザイムがあまり強い活性を持つと不利であることを示唆している。Salehi-Ashtiani らは、これを CPEB3 の転写中には CPEB3 リボザイムが mRNA を切断しないようにするための適応であると考えている。残念ながら CPEB3 リボザイムの機能については何も記述されていない。

以上の結果は、HDV リボザイムと CPEB3 リボザイムとが同じファミリーに属し、同じ配列から進化してきたことを示唆している。HDV はヒトからしか見つかっておらず、ヒト B 型肝炎ウイルス HBV の非存在下では増殖できない。すなわち、HDV の誕生は比較的新しい時代であることが想定される。一方、CPEB3 リボザイムは少なくとも有袋類と有胎盤類の共通祖先では存在していた。ここから、Salehi-Ashtiani らは HDV リボザイムは CPEB3 リボザイムから進化したと推定している。更には、CPEB3 リボザイムが哺乳類でしか見つからないことから、このリボザイムが最近になって触媒活性を獲得したのではないかと考えている。本当に哺乳類でしか HDV 型のリボザイムが存在しないかどうかはまだ議論の余地がある。しかし、タンパク質のある世界でもリボザイムが進化し続けていることは確からしい。

Doudna JA, Cech TR.

The chemical repertoire of natural ribozymes.

Nature. 2002 Jul 11;418(6894):222-8. Review.

Salehi-Ashtiani K, Luptak A, Litovchick A, Szostak JW.

A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene.

Science. 2006 Sep 22;313(5794):1788-92.

2006/12/05

小島 健司 著

禁 無断複写転載