

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14678

研究課題名(和文)細胞の外と内とで蛋白質捕捉活性がオフからオンに切り替わる機能性RNAの創製

研究課題名(英文)Development of functional RNA whose activity of trapping a protein switches on/off for intra- and extracellular conditions

研究代表者

片平 正人(Katahira, Masato)

京都大学・エネルギー理工学研究所・教授

研究者番号：70211844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：カリウムイオンの有無によって構造が大きく変化するr(GGAGGAGGAGGA)分子をスイッチング素子として活用する事で、カリウムイオンを感知してHIVの病因タンパク質Tatを捕捉する活性がオンになるRNAアプタマーを創製する事に成功した。カリウムイオンの濃度の上昇・下降を繰り返すと、創製されたRNAアプタマーのTat結合活性のオンとオフが繰り返して起こる事も確認できた。また生細胞中における核酸の立体構造に関する情報を得るために、生細胞中の核酸のNMRシグナルを観測する事を試み、これに成功した。

研究成果の概要(英文)：By utilizing an r(GGAGGAGGAGGA) molecule, whose structure drastically changes in response to K<sup>+</sup>, as a switching unit, we successfully developed the RNA aptamer whose activity of trapping the Tat protein switches on in response to K<sup>+</sup>. In response to the repeat of the increase and decrease of the K<sup>+</sup> concentration, the activity repeatedly switches on and off. We also succeeded in observing NMR signals of nucleic acids in living human cells for the first time, which opened the way to explore the structures of nucleic acids in living human cells.

研究分野：構造生命科学

キーワード：RNAアプタマー Tat蛋白質 スwitchング NMR 4重鎖 カリウムイオン

1. 研究開始当初の背景

RNA アプタマーは病因タンパク質や病因低分子を捕捉して不活化する活性を有している。アプタマーの活性は細胞内で発揮されれば有用であるが、細胞外で発揮されるとむしろ有害で副作用を引き起こしてしまう事がある。申請者は RNA 分子 r(GGAGGAGGAGGA) (以下 R12) が、細胞外環境に相当する低カリウムイオン濃度 (数 mM) 下では伸びた 1 本鎖構造をとるが、細胞内環境に相当する高カリウムイオン濃度 (140 mM) 下ではコンパクトな 4 重鎖構造を形成する事を見出した (図 1) (Nucleic Acids Res., 2009, 2013 & 2014)。そこで、RNA アプタマーを 2 つのサブユニットに分割し、各々を R12 の両末端に連結した分子を創製する。創製された分子は、細胞外環境では R12 が伸びて 2 つのサブユニットが離ればなれなので、捕捉・不活化活性を示さないと考えられる。一方細胞内環境では R12 がコンパクトな 4 重鎖構造をとり、これによって 2 つのサブユニットが近接して活性構造が再形成され、捕捉・不活化活性が復活すると考えられる。即ち細胞外では活性がオフで副作用を引き起こさず、一方ひとたび細胞内に入れば活性がオンになり望まれる活性を発揮する機能性 RNA が創製できるのではないかと思いついた。

また、生細胞中における核酸の立体構造、ダイナミクス及び他の生体分子との相互作用に関する情報を得る事は現在困難であるが、ヒト生細胞中の核酸の NMR シグナル (in-cell NMR シグナル) を観測する事ができれば、このような情報を取得する事が可能となる。

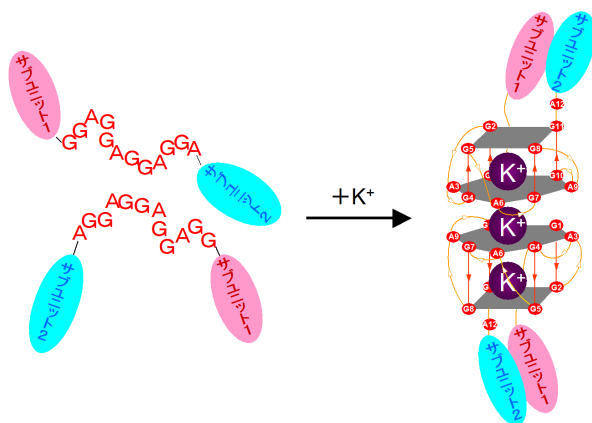


図 1 細胞の内と外における活性のスイッチング。(左) 細胞外ではカリウムイオン濃度が低く、12 残基の核酸 GGAGGAGGAGGA (以下 R12) は伸びた 1 本鎖構造をとる。この為 RNA アプタマーのサブユニット 1 と 2 は離ればなれとなり、蛋白質を捕捉する活性はオフとなる。(右) 細胞内ではカリウムイオン濃度が高く、R12 はコンパクトな 4 重鎖構造を形成する。これに伴いサブユニット 1 と 2 が近接するようになる為、活性構造が再形成され、蛋白質を捕捉する活性がオンになると期待される。

2. 研究の目的

我々は以前、HIV の病因タンパク質である Tat を捕捉する RNA アプタマーを創製する事に成功した。そこでこの RNA アプタマーを 2 つのサブユニットに分割し、各々を R12 の両末端に連結する事で、上記のアイデアを検証する事とした。即ち細胞内外のカリウムイオン濃度の差を感知して、アプタマー活性がオン/オフする機能性 RNA を創製する事を、目的とした。

またヒト生細胞中における核酸の NMR シグナル (in-cell NMR シグナル) を観測する方法論を、世界で初めて確立する事も目的とした。

3. 研究の方法

我々はこれまでに HIV の病因タンパク質である Tat を高い親和性で捕捉して不活化する RNA 分子 (RNA アプタマー) (図 2a 左) を取得し、その構造 - 機能相関を解析した実績を有している。この RNA アプタマーを 2 つのサブユニットに分割し、各々を R11 (R12 において、4 重鎖形成に関与しない末端の A 残基を削除した 11 残基からなる RNA) の両端に結合した分子を創製する (図 2a 右)。その際適切な個数 (2-3 残基) のウラシルリンカーを間に挿入する。なおリンカーの存在によりオフからオンへの切り替わりが円滑になる事が、予備的な実験から分かっていた。

Tat タンパク質の内から、本来の標的である TAR RNA 及び RNA アプタマーとの結合に関与する部位を切り出した Tat ペプチド (16 残基) の両端に、FRET のドナー分子 (D: FAM) とアクセプター分子 (A: TAMRA) を連結した分子を調製する。このペプチドは単独ではコンタクトクエンチングを起こし、FRET を生じない (図 2b 左)。

カリウムイオン非存在下では R11 が伸びた構造をとるので、RNA アプタマーの 2 つのサブユニットは離れ離れとなり、活性なアプタマー構造は形成されない。従って Tat ペプチドは捕捉されずに単独で存在する事となり、コンタクトクエンチングを起こし、FRET を生じない (図 2b 左)。カリウムイオン存在下では R11 がコンパクトな 4 重鎖構造を形成し、それに伴い RNA アプタマーの 2 つのサブユニットが近接するようになり、活性なアプタマー構造が再形成されると期待される。この場合 Tat ペプチドは捕捉され、その際にドナーとアクセプターが一定の距離離れる為にコンタクトクエンチングが解消され、FRET が観測されるようになると考えられる (図 2b 右)。この系を用いて、カリウムイオン濃度を感知してアプタマー活性がスイッチングする機能性 RNA の創製に成功したかを検証した。

in-cell NMR シグナルを観測する為に、毒素タンパク質 SLO によって開けた孔を利用して、ヒト HeLa 細胞に DNA 及び RNA を導入した。この細胞の NMR スペクトルを測定して、in-cell NMR シグナルが観測できるのかを検

証した。

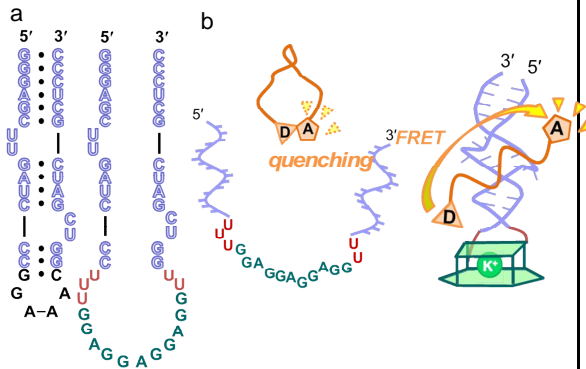


図 2 カリウムイオンを感知して捕捉活性がオフからオンになる機能性 RNA 分子の創製 (a)(左)Tat タンパク質を捕捉するオリジナルの RNA アプタマー。2 箇所の白抜き部分がサブユニット 1 及び 2。(右)サブユニット 1 と 2 を、R12(R11)の両端に U リンカーを介して連結した分子。(b)(左)カリウムイオン非存在下では R11 が伸びた構造をとるので、活性なアプタマー構造は形成されない。この場合 Tat ペプチドは捕捉されずに単独で存在し、コンタクトクエンチングの為に FRET を生じない。(右)カリウムイオン存在下では R11 がコンパクトな 4 重鎖構造を形成し、これによってサブユニット 1 と 2 は近接し、活性なアプタマー構造が形成されるようになる。この為 Tat ペプチドは捕捉され、ドナー (D) とアクセプター (A) 間で FRET を生じる。

#### 4. 研究成果

創製した RNA 分子は、カリウムイオン非存在下においては、Tat タンパク質(ペプチド)を捕捉するアプタマー活性を示さないが、カリウムイオン存在下では、Tat を捕捉しアプタマー活性を示す事が分かった(図 3)。

またカリウムイオン濃度を繰り返し増減させると、創製した RNA 分子のアプタマー活性もこれに応じて繰り返しオン/オフする事も確認できた(図 4)。即ち、細胞の外と内におけるカリウムイオン濃度の差を感知して、Tat タンパク質を捕捉するアプタマー活性が繰り返しオン/オフする機能性 RNA の創製に成功した。

毒素タンパク質 SLO を用いて DNA 及び RNA を導入した HeLa 細胞の NMR スペクトルを測定したところ、導入した核酸由来の NMR シグナルを観測する事ができた(図 5)。ヒト生細胞中における核酸の in-cell NMR シグナルが観測できたのは、これが世界で初めてである。観測されたスペクトルから、導入された RNA がヒト細胞中において、試験管内で形成するのと同じステム-ループ構造を形成している事が分かった。

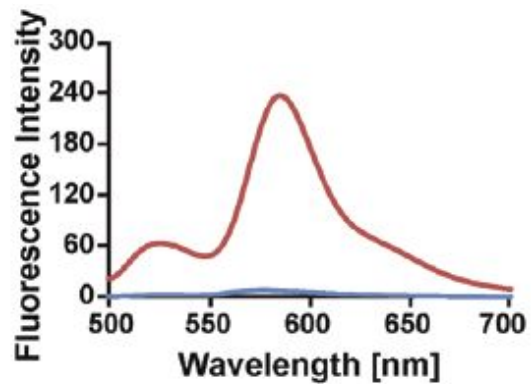


図 3 創製した RNA 分子のカリウムイオンの存在に依存した Tat タンパク質捕捉活性。カリウムイオン非存在下では、創製した RNA 分子は Tat タンパク質(ペプチド)を捕捉する活性を有さない為、コンタクトクエンチングによって蛍光は観測されない(X 軸にほぼ沿った下部の曲線)。カリウムイオン存在下では、創製した RNA 分子は Tat タンパク質(ペプチド)を捕捉する活性を有するようになる為、ペプチドは伸びた構造を形成し、FRET 由来の蛍光を生じる(上部の曲線)。

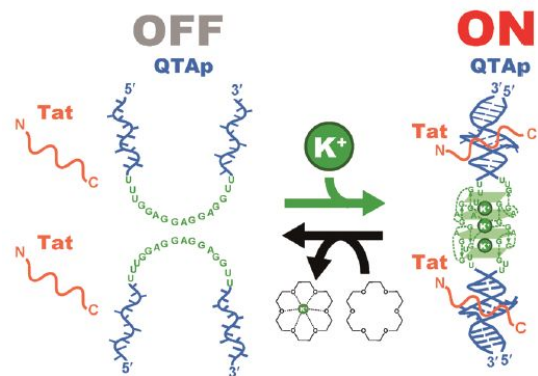


図 4 カリウムイオン濃度の増減による RNA アプタマーの活性の連続的なオン/オフ。カリウムイオン濃度が上昇すると、創製した RNA アプタマーが Tat タンパク質(ペプチド)を捕捉する活性がオンになる(左図から右図へ移行)。キレート化合物によってカリウムイオン濃度が減少すると、Tat を捕捉する活性はオフになる(右図から左図)。このオン/オフはカリウムイオン濃度の増減によって繰り返し生じる事も確認された。

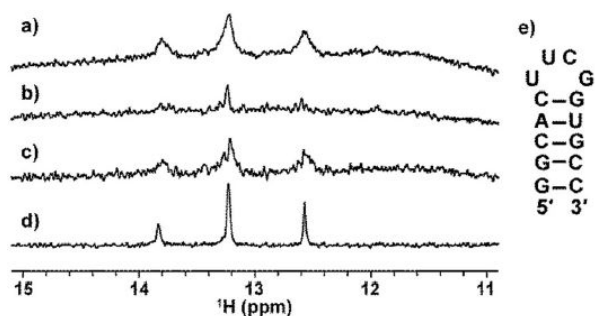


図 5 ヒト細胞中における核酸の NMR シグナルの初観測. a) RNA を導入したヒト細胞の NMR スペクトル. b) 細胞外液のスペクトル. c) a) から b) を差し引いた差スペクトル. d) 試験管内におけるスペクトル. e) 導入した RNA の配列と 2 次構造.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yamaoki, Y., Nagata, T., Mashima, T. and Katahira, M., Development of an RNA aptamer that acquires binding capacity against HIV-1 Tat protein via G-quadruplex formation in response to potassium ions, Chem. Commun., 査読有, 53, 2017, 7056-7059. DOI: 10.1039/c7cc03312e

Yamaoki, Y., Kiyoshi, A., Miyake, M., Kano, F., Murata, M., Nagata, T. and Katahira, M., The first successful observation of in-cell NMR signals of DNA and RNA in living human cells, Phys. Chem. Chem. Phys., 査読有, 20, 2018, 2982-2985. DOI: 10.1039/c7cp05188c

〔学会発表〕(計 2 件)

Yamaoki, Y., Mashima, T., Nagata, T. and Katahira, M., Invention of RNA aptamer and ribozyme whose activities switch on in response to K<sup>+</sup> via G-quadruples formation, 6th International Meeting on Quadruplex Nucleic Acids, 2017, Prague, Czech Republic.

山置佑大、清石彩華、三宅雅之、加納ふみ、村田昌之、永田崇、片平正人、In-cell NMR 法によるヒト細胞内 DNA および RNA の観測、第 56 回 NMR 討論会、2017、首都大(八王子)。

〔図書〕(計 1 件)

Masato Katahira and Tsukasa Mashima, Springer, Encyclopedia of Biophysics 2nd Edition, Introduction to Nucleic Acids NMR 2018, in press.

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/bio/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

片平 正人 (KATAHIRA, Masato)  
京都大学・エネルギー理工学研究所・  
教授

研究者番号: 70211844

##### (2) 研究協力者

永田 崇 (NAGATA, Takashi)  
京都大学・エネルギー理工学研究所・  
准教授

研究者番号: 10415250

山置 佑大 (YAMAOKI, Yudai)

京都大学・エネルギー理工学研究所・  
博士研究員

研究者番号: 00778095