

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310161

研究課題名(和文)RNAモジュール工学によるリボスイッチ(RNAスイッチ)の機能解析と高次人工制御

研究課題名(英文)Modular RNA engineering of RNA molecular switches (riboswitches)

研究代表者

井川 善也 (IKAWA, YOSHIYA)

富山大学・理工学研究部(理学)・教授

研究者番号：70281087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円、(間接経費) 3,240,000円

研究成果の概要(和文)：リボスイッチは低分子化合物と特異的に結合し翻訳や転写を調節し、原核生物では遺伝子発現制御の主要な機構の一つである。本研究では天然リボスイッチの機能構造解析と人工改変を目的として次の3課題の研究を行った。(1)「リボスイッチの構造-機能相関の解明、(2)人工リボスイッチ/アプタマーの創製、(3)天然リボスイッチの人工高次制御。(1)ではRNA構造で汎用されるGNRA/レセプターモジュールの新しい役割を同定し、(2)ではGAACループを認識する新規アプタマー創製に成功した。(3)では天然c-di-GMPリボスイッチを改変し、第二のリガンドによる高次制御が可能なRNAの設計に成功した。

研究成果の概要(英文)：Riboswitches are attractive not only as drug targets for novel antibiotics but also as modular tools for controlling gene expression. Riboswitches frequently have GNRA loop/receptor interaction modules in their aptamer modules. In this study, the functional importance of the GAAA loop-receptor interaction in the c-diGMP riboswitch was examined. A series of variant c-diGMP riboswitches with mutations in the GAAA loop/receptor interaction were assayed for their switching abilities. These analyses strongly suggested that the GAAA loop/receptor interaction does not simply establish the RNA 3D structure but docking of P2 GAAA loop rigidifies the P3 element. This mechanism was applied to design an artificial riboswitch bearing a theophylline aptamer module in P3 the structural rigidity of which could be modulated by the small molecule theophylline. We also generated a new class of aptamer module that specifically recognizes a GAAC RNA tetraloop by employing in vitro directed evolution.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：リボスイッチ RNA モジュール工学 ケミカルバイオロジー リボザイム シンセティック・バイオロジー 合成生物学

1. 研究開始当初の背景

バクテリアの遺伝子発現制御機構は分子生物学の黎明期から研究されているが、2002年、Ron Breaker らにより「RNA を分子スイッチとする新たな制御機構の存在」が報告された。「リボスイッチ」と命名された RNA スイッチは mRNA の部分配列として存在し、低分子化合物と特異的に結合し翻訳や転写を調節する。制御タンパク質が不明な遺伝子の多くがリボスイッチで制御され、リボスイッチが遺伝子発現制御の普遍的機構であると認識されつつあり、同時に RNA ベースの新しい遺伝子制御ツールとして注目されつつあった。以上の重要性から RNA 分野の重要課題として欧米では活発に行われていた一方、日本で天然リボスイッチを扱った研究は極めて少ない状況であった。以上の状況のもと、報告者が従来培った天然 RNA 酵素の機能構造解析と人工改変の技術を天然リボスイッチに適用し、その機能構造解析と人工改変を行った。

2. 研究の目的

(課題1)「構造モジュール」を単位とするリボスイッチの構造-機能相関の解明

近年同定されたモジュール構造を有すると考えられる c-di-GMP リボスイッチについて、機能-構造相関の解明を行う。機能発現の鍵となる構造モジュール「GNRA ループ-レセプター相互作用」を基点にリボスイッチの構造-機能相関を解明する。

(課題2) RNA モジュール工学による人工リボスイッチ/アプタマーの創製

「GNRA ループ-レセプター相互作用」を有する天然リボスイッチは、申請者が開発した「RNA モジュール工学」で創製した「人工 RNA 構造体」と類似した立体構造を有する。この知見を基盤に「人工 RNA 構造体」を骨格として、分子認識ユニットを組み込めば、人工リボスイッチあるいは人工アプタマーの効率的創製が期待される。人工リボザイム創製に開発した「分子デザインと進化学の融合法によるモジュール工学」を展開し人工アプタマーの創製を行う。

(課題3) RNA モジュール工学による天然リボスイッチの人工高次制御

「RNA モジュール工学」を駆使し、天然リボスイッチに対し、本来のシグナルに加え、小分子やペプチド等「第二のシグナル」に応答する機能モジュールを組み込み、二つあるいはそれ以上の入力シグナル (リガンド) によって制御される人工 RNA スイッチを構築する。

3. 研究の方法

(課題1) c-di-GMP リボスイッチの GNRA ループ-レセプターのユニットを相互作用強度の異なるユニットで系統的に置き換えた変異体スイッチの翻訳制御効率を宿主細胞として大腸菌を用い、lacZ 遺伝子をレポータ

ーとした系により測定する。この実験は GNRA ループ-レセプターの相互作用の強さと翻訳制御の効率の関係について重要な基礎データを与える。

さらに、同モジュールを起点とするアプタマーユニット、さらにその 5'および 3'側の領域を含んだリボスイッチ全領域 (計約 200 塩基) について二次構造予測による構造ドメインの推定を行い、そのドメイン構造の予測の適否と機能的役割を、系統的な欠失変異体解析により検証する。さらにリボスイッチによる遺伝子発現制御が転写段階か翻訳段階のいずれであるかを検証するため、リアルタイム PCR による lacZ 遺伝子 mRNA の定量を行う。

(課題2) 申請者らが人工リボザイム創製に開発した人工 RNA 構造体を利用し、進化分子工学法でリガンド結合モジュールを創製し、リボスイッチのコア部分となる人工アプタマーを創製する。対象とするリガンドとしては、有機小分子と小型の RNA 構造モジュールを標的とする。進化分子工学法でアプタマーモジュールの創製に成功した場合は、選別された RNA 配列の解析と構造解析、特異性や親和性を含めた分子認識能力の評価を行う。

(課題3)

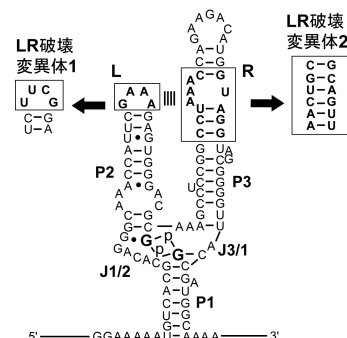
「GNRA ループ-レセプター相互作用」モジュールを有する c-diGMP リボスイッチを基盤に、同ユニットを「小分子認識モジュール (アプタマーモジュール)」で交換し、本来のシグナル分子 (c-diGMP) に加え、アプタマーのリガンド分子を「第二のシグナル」として遺伝子スイッチが二つの信号で制御されるリボスイッチをモジュール工学により構築する。(課題1) のアッセイ系を利用し、リボスイッチ機能が「c-diGMP」と「第二のリガンド」の双方に依存する「AND 型」の入力信号依存性を検証する。

4. 研究成果

(課題1)「構造モジュール」を単位とするリボスイッチの構造-機能相関の解明

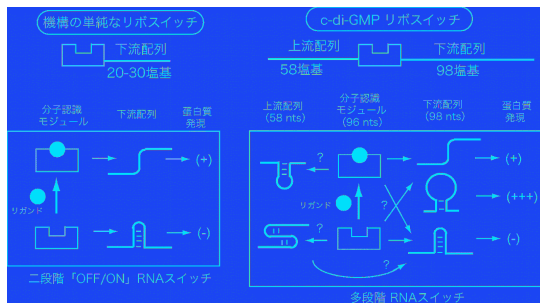
(成果1) c-di-GMP リボスイッチには、P2 の GAAA ループと P3 のレセプターモチーフ間に LR 相互作用が形成される (図)。一般に LR 相互作用の寄与を調べるため破壊変異を導入する場合、ループ部位とレセプター部位のいずれに変異

を導入しても LR 相互作用は破壊されるため、二つの変異は類似した効果 (構造形成能力の低下に伴う機能低下) を示す。しかしこのリボスイッチの



場合、*in vivo* および *in vitro* の変異体解析の結果、LR 相互作用を破壊する変異の効果は GAAA ループとレセプターで異なることが明らかとなった。P2 GAAA ループを相互作用できない UUCG ループで置換した変異体 1、および P3 レセプターモチーフを塩基対で置換した変異体 2 を作成した結果、変異体 1 では明確な機能低下が観察される一方、変異体 2 ではリボスイッチの機能はほとんど変化しなかった。一連の検証実験から、c-di-GMP リボスイッチのスイッチ能力は「レセプター部位を含んだ P3 領域の堅固性」に依存することが示された。

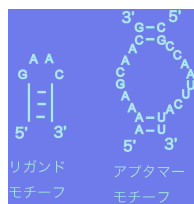
(成果 2) アプタマー部位 (リガンド結合領域) に加えて 5' および 3' 側の領域を含んだリボスイッチ全領域 (計約 200 塩基) について二次構造予測による構造ドメインの推定を行い、アプタマー部位、5' 領域、3' 領域の欠失変異体を複数作成した。



そのなかでアプタマー部位のリガンド結合領域を破壊したにも関わらず、野生型に比べレポータ蛋白質の発現が 3-5 倍向上 (ハイパースイッチ ON) した変異体(+++)が複数得られた。一方で分子認識モジュールのリガンド結合型構造 (+) を保存したにも関わらず、遺伝子発現は顕著に減少 (スイッチ OFF) した変異体 (-) も得られた。以上の結果は c-di-GMP リボスイッチが、単純な「OFF/ON 二段階(+/-)スイッチ」でなく、分子認識モジュールの構造変化を引き金としつつ「多段階スイッチ」として機能することを強く示唆している。さらに以上の変異体について、リアルタイム PCR によって mRNA 量を比較した結果、c-di-GMP リボスイッチは翻訳段階での制御を行っている事が強く示唆された。

(課題 2) RNA モジュール工学による人工リボスイッチ/アプタマーの創製

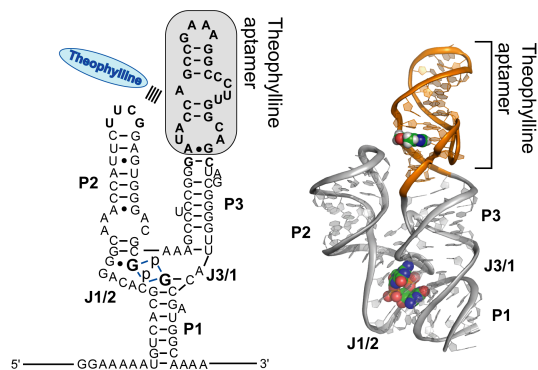
人工リボスイッチの標的として選択した複数のターゲット分子について進化分子工学によるアプタマー創製を試みた。その結果、GAAC ループモチーフを高い特異性と親和性で認識する RNA アプタマーモチーフの取得に成功した。GAAC ループは比較的近年 (2008 年) に同定された RNA 末端ループモチーフであり、同ループを認識するアプタマーモチーフは天然 RNA の解析からは報告されていない。従って、今回進化分子工学で得られたアプ



タマーモチーフは天然型/人工型を含めて GAAC ループに対する最初のアプタマーモジュールである。RNA ループモチーフに対するアプタマーモチーフは「GNRA/レセプター相互作用」モジュールとして c-di-GMP リボスイッチを含む様々な機能性 RNA の構造形成に見いだされる。今回創製に成功した「RNA ループ/アプタマー」の相互作用の特異性と親和性を各種の生化学手法で *in vitro* 解析した結果、その特性は「GNRA/レセプター相互作用」モジュールに匹敵することが明らかとなった。さらにリガンド (Guanosine) 依存型リボザイムに人工モジュールを組み込んだ場合も、本来の GNRA/レセプターモジュールの機能を *in vitro* の酵素活性測定条件下では完全に代替できることを明らかにした。しかし人工リボスイッチとしての作動場所である *in vivo* (大腸菌内) では、人工モジュールを組み込んだリボザイムの酵素活性は野生型に比べて顕著に低かった。これは RNA モジュールの細胞内作動を実現する上で、細胞内部での複雑な環境下でも構造形成が可能とするには、転写と共役したフォールディング特性も含めた人工進化が必要であることを示唆する結果である。

(課題 3) RNA モジュール工学による天然リボスイッチの人工高次制御

課題 1 の成果から、c-di-GMP リボスイッチにおける P3 レセプターモチーフと P2 GAAA ループ間の相互作用 (LR 相互作用) は「アプタマーの構造変化による隣接する機能ユニットの制御」におけるアプタマーと標的リガンドの関係と類似していることが明らかとなった。つまり P2 GAAA ループは内在性リガンドとして振る舞い、P3 レセプターモチーフへの結合によりレセプターに隣接する部位の構造に正の効果を与えられられる。従って c-di-GMP リボスイッチの LR 相互作用の役割はアプタマーと小分子リガンドによって置換できる可能性が考えられる。実際に P3 レセプターをテオフィリンアプタマーで置き換え、P2 GAAA ループの役割を小分子リガンド (テオフィリン) で代替した改変型リボスイッチは、テオフィリン添加によって遺伝子発現が 1.3 倍向上した。



野生型や LR 相互作用の破壊変異体に対し

てテオフィリンは阻害作用を示す事を考慮すると、改変型リボスイッチではテオフィリンの結合に伴うアダプター部位の構造変化により、P3 領域の堅固性が向上したと考えられる。この実験におけるテオフィリンリガンドによる性能制御の変化値はまた不十分であるが、モジュール型天然リボスイッチを多成分制御ロジックゲート型リボスイッチへ合理的に改変する上での重要な成果である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1) K. Yamashita, N. Kashiwagi, H. Furuta & **Y. Ikawa**. Turnover ability of a designed RNA acting as a template for chemical peptide ligation. *Biosci. Biotech. Biochem.* **75**, 2021-2024 (2011), 査読あり

2) **Y. Ikawa**, S. Touden & H. Furuta
N-fused porphyrin with pyridinium side-arms: A new class of aromatic ligand with DNA-binding ability. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 8068-8078 (2011), 査読あり

3) Y. Fujita, T. Tanaka, H. Furuta, & **Y. Ikawa**
Functional roles of a tetraloop/receptor interacting module in a cyclic-di-GMP riboswitch. *J. Biosci. Bioeng.* **113**, 141-145 (2012), 査読あり

4) K. Yamashita, T. Tanaka, H. Furuta & **Y. Ikawa**
TectoRNP: self-assembling RNAs with peptide-recognition motifs as templates for chemical peptide ligation.
TectoRNP: self-assembling RNAs with peptide-recognition motifs as templates for chemical peptide ligation. *J. Pep. Sci.* **18**, 635-642 (2012), 査読あり

5) T. Tanaka, H. Furuta & **Y. Ikawa**
A two-piece derivative of a group I intron RNA as a platform for designing self-assembling RNA templates to promote peptide ligation. *J. Nucleic Acids* vol. 2012, Article ID 305867, 10 pages, doi:10.1155/2012/305867 (2012), 査読あり

6) N. Isomoto, Y. Maeda, T. Tanaka, H. Furuta & **Y. Ikawa**
Fixation and accumulation of thermotolerant catalytic competence of a pair of ligase ribozymes through complex formation and cross ligation. *J. Mol. Evol.* **76**, 48-58 (2013), 査読あり

7) J. Ishikawa, H. Furuta, & **Y. Ikawa**
An *in vitro* selected RNA receptor for the GAAC loop: modular receptor for non-GNRA-type tetraloop. *Nucleic Acids Res.* **41**, 3748-3759 (2013), 査読あり

8) **Y. Ikawa**, S. Touden, S. Katsumata, & H. Furuta, Colorimetric/fluorogenic detection of thiols by N-fused porphyrin in water. *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 6501-6505 (2013), 査読あり

9) T. Tanaka, H. Furuta, & **Y. Ikawa**
RNA 立体構造のボトムアップ構築とリボザイム・リボスイッチの人工改変, *Antisense*, **16**, 13-23 (2012), 査読なし

10) J. Ishikawa, H. Furuta, & **Y. Ikawa**
RNA Tectonics (tectoRNA) for RNA nanostructure design and its application in synthetic biology, *WIREs RNA*, **4**, 651-664 (2013), 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

1) Construction of a peptide ligation system based on a bimolecular derivative of the Tetrahymena group I intron.

田中貴大・古田弘幸・井川善也
第 16 回日本 RNA 学会、京都、2011 年 6 月

2) In vitro selection and characterization of a receptor for GAAC loop. 石川隼也・古田弘幸・井川善也、第 16 回日本 RNA 学会、京都、2011 年 6 月

3) 二分子型グループ I イントロンを基盤としたペプチド連結システム、田中貴大・古田弘幸・井川善也、第 48 回化学関連支部合同九州大会、北九州、2011 年 7 月

4) An RNA-assisted peptide ligation system based on a bimolecular derivative of the Tetrahymena group I intron. 田中貴大・古田弘幸・井川善也、The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC 2011)、北海道 2011 年 11 月

5) AUCG ループを認識する人工 RNA レセプターの進化工学的創製、富永雄人・古田弘幸・井川善也、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡 2012 年 12 月

6) 二分子型グループ I イントロンを用いた自己組織型ペプチド連結の鑄型 RNA、田中貴大、古田弘幸、井川善也、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡 2012 年 12 月

7) Formation of a catalytic supramolecular RNA 1D-array through self-assembly of an engineered group I intron RNA enzyme, Narumi Uehara, Hiroyuki Furuta, Yoshiya Ikawa, RNA 2013 The 18th Annual Meeting of RNA society, スイス、2013 年 6 月

8) Self-dimerizing group I ribozymes as a new class of modular units for RNA synthetic biology, Takahiro Tanaka, Hiroyuki Furuta, Yoshiya

Ikawa, RNA 2013 The 18th Annual Meeting of RNA society, スイス, 2013年6月

9) c-di-GMP 応答型リボスイッチの発現調節機構の解明, 西村圭一郎、古田弘幸、井川善也, 第50回化学関連支部合同九州大会, 北九州, 2013年7月

10) c-di-GMP 応答型リボスイッチの発現プラットフォームの機能解析, 西村圭一郎、古田弘幸、井川善也

〔図書〕(計 4件)

1) 井川善也

モジュール工学と進化学による RNA 触媒の人工創製、日本化学会編「CSJ カレントレビュー6 核酸化学のニュードレンド」(化学同人) p93-100 (2011)

2) 井川善也

グループ I イントロン研究の新たな潮流：機能構造と分子進化、「生命分子を統合する RNA-その秘められた役割と制御機構-」(実験医学増刊、羊土社)、p75-82 (2013)

3) T. Tanaka, H. Furuta & **Y. Ikawa**

Natural selection and structural polymorphism of RNA 3D structures involving GNRA loops and their receptor motifs, in RNA Nanotechnology and Therapeutics (ed. Guo, P., CRC press), p109-120 (2013)

4) 井川善也

in vitro 進化分子工学による人工 RNA 触媒の創製およびその機能解析と応用利用、「進化分子工学—高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発—」(NTS 出版)、p355-367 (2013)

〔その他〕

HP : <http://www3.u-toyama.ac.jp/orgsyn3/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井川 善也 (IKAWA YOSHIYA)

富山大学・大学院理工学研究部 (理学)・教授

研究者番号 : 70281087

(2) 連携研究者

古田 弘幸 (HIROYUKI FURUTA)

九州大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号 : 40244157