

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657072

研究課題名（和文） 核酸で構成された人工イオンチャネルの創製

研究課題名（英文） Development of ion-channel composed of nucleic acids

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

研究成果の概要（和文）：グアニン塩基に富む核酸が形成する4重鎖構造は、タンパク質性のイオンチャネルと類似した構造を有している。ジャイアントリポソームに4重鎖核酸を埋め込み、リポソーム内のカリウムイオン濃度を蛍光指示薬で追跡した。また4重鎖核酸とプトロンイオノフォアをカップルさせたリポソームを調製し、リポソーム内のpHを蛍光指示薬で追跡した。両実験から4重鎖核酸がチャネルとして機能している可能性が示唆された。また4重鎖核酸の活用という観点から派生・発展した項目として、同核酸の抗プリオン活性とその構造学的基盤の解明、及び同核酸を核酸酵素のスイッチング素子として活用する事に成功した。

研究成果の概要（英文）：The structure of a DNA/RNA quadruplex resembles that of an ion-channel. We tested if the quadruplex functions as an ion-channel. The quadruplex was embedded into liposome and a flow of ions was examined using fluorescent indicators. The results suggested that the quadruplex could function as an ion-channel. We also succeeded to elucidate the structural basis of the quadruplex as an anti-prion agent. The quadruplex was also utilized to switch the activity of a ribozyme.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物学・構造生物化学

キーワード：核酸、イオンチャネル、アプタマー、4重鎖、プリオン、リボザイム

1. 研究開始当初の背景

片平等は d(GGAGGAGGAGGA) 及び r(GGAGGAGGAGGA) が、カリウムイオン非存在下では1本鎖の伸びた状態にあるが、カリウムイオンを添加すると4重鎖を形成してコンパクトな状態になる事を世界で初めて見出した (J. Mol. Biol., 2001; J. Mol. Biol., 2002; J. Biol. Chem., 2003; Nucleic Acids Res., 2009)。また申請者はこれ以外にも、ヒトのテロメアDNAが形成する特異な4重鎖核酸構造等も決定してきた (FEBS, 2007)。4重鎖構造中では、カリウム

イオン等がグアニン塩基のカルボニル酸素との配位結合を介してキレートされている (図1左)。この姿が、タンパク質性のイオンチャネルにおいてイオンがアミノ酸残基との結合を介してキレートされているのと酷似している事に気付いた。そして4重鎖核酸を膜に埋め込めば、核酸性のイオンチャネルとして動作するのではないかと思いついた (図1右)。核酸でイオンチャネルを創製しようという試みは、これが世界初のものである。

2. 研究の目的

グアニン塩基に富む配列からなる核酸 (DNA 及び RNA) は、生理的な濃度のカリウムイオン等の存在下で、4重鎖構造を形成する。この4重鎖構造は、イオンの結合という観点から見ると、タンパク質性のイオンチャンネルと類似した分子構造を有している。そこで本研究では、4重鎖構造を形成した核酸を膜に埋め込む事で、核酸で構成された人工のイオンチャンネルを創製する事を目指す。

3. 研究の方法

4重鎖核酸をリポソームに組み込み、この核酸を介したイオンの流出が生じるのかを、以下の2つの検出系によって独立に検証する。

(1) 第一の検出系では、ジャイアントリポソーム内にカリウムイオンと蛍光性のイオン指示薬を封入する。リポソームの2重膜に組み込まれた核酸4重鎖がイオンチャンネルとして機能すれば、イオンが流出してリポソーム内部の蛍光強度の減少が観測されるはずである。これを蛍光顕微鏡で調べる。

(2) 第二の検出系では、通常型リポソームの内液のカリウムイオン及びpHを、外液より高くしたものを調製する。ここにプロトンイオノフォアを添加すると、リポソームの2重膜に組み込まれた核酸4重鎖がイオンチャンネルとして機能すれば、カリウムイオンの流出とプロトンの流入がカップルして生じ、内液のpHが下がるはずである(図2)。蛍光性のpH指示薬を内液に封入しておき、蛍光分光器を用いてこのようなpH変化が生じるのかを調べる。

4. 研究成果

(1) カリウムイオン、カルシウムイオン等をキレートする事で4重鎖構造を形成する事が確認されている3種類の核酸を調製した。またリン脂質にコレステロールを少量加えたものを真空引きによってフィルム化し、その後水和する事によって、ジャイアントリポソームを調製した。そして水和の際に4重鎖核酸を共存させる事で、4重鎖核酸をジャイアントリポソームの2重膜に組み込む事を行った。ジャイアントリポソーム内にはカリウムイオンとその蛍光指示薬を封入した。蛍光顕微鏡でジャイアントリポソームの内部を、時間を追って観察したところ、リポソーム内部の蛍光強度の減少が観測された。これより4重鎖核酸がチャンネルとして機能して、イオンの流出が生じた事が示唆された。

(2) 次に通常サイズのリポソームにカリウムイオン及び外液より高いpHの水溶液を封入し、ここにプロトンイオノフォアを添加

した。4重鎖核酸がイオンチャンネルとして機能すれば、リポソーム内外の濃度の差に起因して、カリウムイオンの流出とプロトンの流入が同時に生じ、リポソーム内のpHは下がるはずである(図2)。リポソームに蛍光性pH指示薬(HPTS)も封入する事で、上記の現象を蛍光強度の変化として、蛍光分光器で検出した。その結果予想した通りのpHの低下が観測された。即ちこの系によっても、4重鎖核酸がイオンチャンネルとして機能する事が強く示唆された。

(3) 4重鎖核酸の活用という観点から派生・発展した項目として、4重鎖核酸の抗プリオン活性とその構造学的基盤を解明する事に成功した。

(4) 同観点から派生・発展した項目として、4重鎖核酸を核酸酵素(リボザイム)のスイッチング素子として活用する事にも成功した。

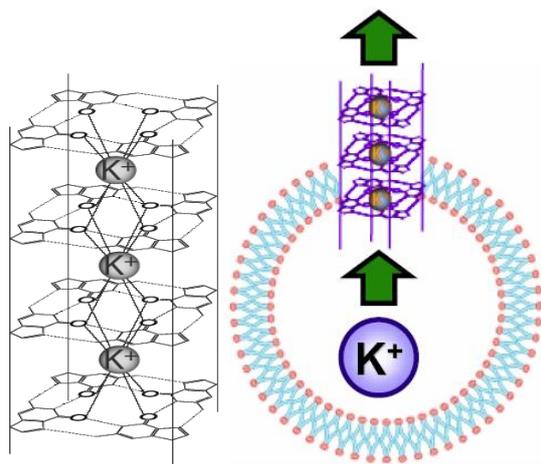


図1 (左)核酸の4重鎖構造. カリウムイオンが、上下計8個のグアニン塩基のカルボニル酸素との配位結合によってキレートされている. そして中央部において、カリウムイオンが複数個連なっている. (右)核酸4重鎖を膜に組み込み、イオンチャンネルとしての応用する模式図.

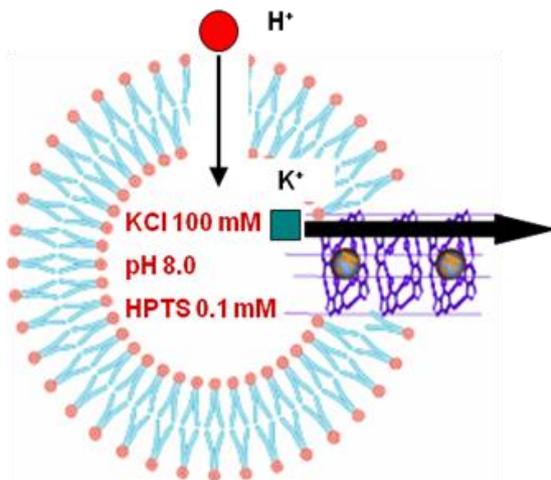


図2 4重鎖核酸がイオンチャネルとして動作するかの検証法. リボソーム内のカリウムイオン濃度を外液より高く、一方プロトン濃度は外液より低くしておく. ここにプロトンイオノフォア(丸で表記)を添加すると、もし4重鎖核酸がカリウムイオンチャネルとして機能するならば、カリウムイオンの流出とプロトンの流入がカップルして生じるはずである. 蛍光性 pH 指示薬 HPTS の蛍光強度を測定する事で、この現象が実際に生じるのかを調べる.

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5件)

下記の(2)は査読なし、それ以外は査読あり

(1) Mashima, T., Nishikawa, F., Kamatari, Y., Fujiwara, H., Saimura, M., Nagata, T., Kodaki, T., Nishikawa, S., Kuwata, K. and Katahira, M. (2013) *Nucleic Acids Res.*, 41, 1355-1362. "Anti-prion ctivity of an RNA aptamer and its structural basis"
DOI: 10.1093/nar/gks1132

(2) 片平正人, 実験医学, 羊土社, Vol. 31, pp. 68-74 (2013) "リボスイッチ及び抗プリオン活性を示すRNA アプタマーの動作メカニズム"
<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/>

(3) Nagata, T., Sakurai, Y., Hara, Y., Mashima, T., Kodaki, T. and Katahira, M. (2012) *FEBS J.*, 279, 1456-1463. "Intelligent ribozyme that switches its activity in response to K⁺ through quadruplex formation"
DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08538.x

(4) Ohyama, T., Nagata, T., Tsuda, K., Kobayashi, N., Imai, T., Okano, H., Yamazaki, T. and Katahira, M. (2012) *Nucleic Acids Res.*, 40, 3218-3231. "Structure of Musashil in a complex with target RNA: The role of aromatic stacking interactions"

DOI: 10.1093/nar/gkr1139

(5) Nakano, S., Mashima, T., Matsugami, A., Inoue, M., Katahira, M. and Morii, T. (2011) *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 4567-4579. "Structural aspects for the recognition of ATP by ribonucleopeptide receptors"

DOI: 10.1021/ja110725d

[学会発表] (計8件)

(1) Y. Yamaoki, T. Mashima, Y. Sakurai, Y. Hara, T. Kodaki, T. Nagata, M. Katahira, 第35回日本分子生物学会年会, Creation of Nov1 Ribozyme whose Activity Switches on in Response to K⁺ via Quadruples Formation, 2012.12.12, 福岡国際会議場 (福岡市)

(2) Y. Yamaoki, T. Mashima, Y. Sakurai, Y. Hara, T. Nagata, M. Katahira, The 39th Internationaional Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Development of intelligent ribozyme whose activity switches on in response to K⁺ via quadruplex formation, 2012.11.16, 名古屋大学 (名古屋市)

(3) T. Mashima, F. Nishikawa, Y. Kamatari, H. Fujiwara, T. Nagata, T. Kodaki, S. Nishikawa, K. Kuwata, M. Katahira, The 39th Internationaional Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Strctural analysisi of RNA aptamer in complex with prion protein, and its anti-prion activity, 2012. 11.15, 名古屋大学 (名古屋市)

(4) Mashima. T., Furukawa, A., Sugase, K., Fujiwara, H., Nishikawa, F., Morishita, R., Ryo, A., Kamatari, Y., Nagata, T., Nishkawa, S., Kuwata, K. and Katahira, M. (2012) XXV International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 'Anti-prion activity and its structural basis of RNA aptamer, and sliding-direction-dependent deaminase activity of anti-HIV enzyme', 2012.8.21, Lyon (France)

(5) 山置雄大, 真嶋司, 櫻井佑, 原ゆかり, 永田崇, 片平正人, 第14回日本RNA学会年

会, カリウムイオン濃度を感知して活性がオンになるインテリジェントリボザイムの創製, 2012. 7. 19, 東北大学 (仙台市)

(6) A. Furukawa, T. Mashima, K. Sugase, H. Fujiwara, T. Nagata, R. Morishita, A. Ryo, F. Nishikawa, S. Nishikawa, Y. Kamatari, K. Kuwata, M. Katahira, Korea-Japan Bilateral NMR Symposium, Sliding-direction-dependent activity of anti-HIV enzyme, and structural basis of anti-prion activity of RNA aptamer, 2012. 3. 16, 北海道大学 (札幌市)

(7) T. Nagata, Y. Sakurai, Y. Hara, T. Mashima, M. Katahira, The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, r(GGA)₄ chimeric ribozyme switches its activity in response to K⁺ via quadruplex formation, 2011. 11. 11, 北海道大学 (札幌市)

(8) T. Mashima, H. Fujiwara, T. Koshida, M. Saimura, M. Imamura, T. Yokoyama, F. Nishikawa, S. Nishikawa, M. Katahira, RNA2011 SIXTEEN ANNUAL MEETING OF THE RNA SOCIETY, Structural basis of the high affinity of the RNA aptamer against prion protein, 2011. 6. 15, 京都国際会議場 (京都市)

[図書] (計2件)

(1) Katahira, M. and Mashima, T. (2013) Encyclopedia of Biophysics, pp. 1763-1772, "Introduction to Nucleic Acids NMR", Springer.

(2) 片平正人、日本化学会編・CSJ カレントレビュー “核酸化学のニュートレンドーDNA・RNAの新たな可能性を開く”(分担)、化学同人、Vol. 6、pp. 36-40 (2011) “論文にみる最重要概念と革新実験データ”

[その他]

ホームページ等

<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