

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 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23750202

研究課題名（和文） RNA の分子内接触運動の解明

研究課題名（英文） Investigation of intramolecular collision dynamics of RNA

研究代表者

鵜澤 尊規 (UZAWA TAKANORI)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・研究員

研究者番号：60554376

研究成果の概要（和文）：

多くの蛋白質や核酸が立体構造を形成する過程では、分子内の様々な相互作用が段階的に効率よく形成されており、分子内の 2 点間が衝突する運動は生体分子の複雑な構造形成における最も基礎的な過程であるといえる。特定の構造をとらないペプチド内の衝突速度はよく調べられているが、核酸内の衝突速度に関する研究はあまり進んでいない。そこで本研究では、DNA および RNA の両末端間の衝突速度の塩基依存性、鎖長依存性、温度依存性を調べることを目的とした。核酸の両末端に発光分子と消光分子を修飾し、発光寿命から発光分子と消光分子の衝突速度を測定した。20 塩基を超える DNA の場合、比較的低温条件下ではポリアデニンのコンフォメーション変化速度が両末端衝突速度に大きく寄与するものの、高温条件下ではこの寄与が消失し、ポリチミジンと同じ速度で両端が衝突するということを明らかとした。同様の測定を RNA についても行ったが、消光分子の有無で発光寿命に明確な差を観測できなかった。

研究成果の概要（英文）：

Formation of three dimensional structures of a protein and an oligonucleotide require stepwise formation of intramolecular interactions, indicating that intramolecular collision is the most essential process of 3D structure formation. Although the intraolecular collision dynamics of unstructured polypeptides have seen extensively studied, those of oligonucleotides are limited. Thus motivated, in this study I aimed to investigate the base-composition, chain-length and temperature dependences of the end-to-end collision rates for both oligonucleotides of DNA and RNA. I measured the intramolecular collision dynamics using lifetime of a luminophore modified at the end of a oligonucleotide whose the other terminal was modified with a quencher. For a DNA over 20 bases in length, conformational change of polyadenine contributes on the end-to-end collision dynamics at lower temperature. At high temperature, however, this contribution disappears and the dynamics of polyadenine corresponds to the dynamics of polythymine. A similar experiment on RNA did not exhibit clear difference of the luminophore lifetimes between with presence of the quencher and absence of the quencher.

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	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：核酸、両末端の衝突速度、ダイナミクス、ルテニウム錯体

1. 研究開始当初の背景

多くの蛋白質や核酸が立体構造を形成する過程では、分子内の様々な相互作用が段階的に効率よく形成される。この相互作用形成の過程を細かく見てみると、分子の内部で衝突が非常に多く繰り返されるなかで、最終的に分子のエネルギーが低くなる構造に落ち着いているとみなせる。このことから、生体分子の複雑な構造形成における最も基礎的な過程は、分子内の2点間が衝突する運動であるといえる。

生体関連分子の中では、特定の構造をとらないペプチド内の衝突速度はよく調べられているが、核酸内の衝突速度に関する研究はあまり進んでいない。これは、これまでは生体内の重要な反応はタンパク質が司っているとされていたことに起因すると考える。しかしながら、RNAも立体構造を形成したうえで生命活動に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。例えば、タンパク質を作成するリボソームRNAや、リボソームにアミノ酸を運搬するトランスファーRNAは生命活動に必須であり、これらはそのRNA配列特異的な構造に折り畳むことで機能している。このような重要な分子であるにもかかわらず、RNAの立体構造形成における最も基礎的な過程である、RNA分子内の2点間が衝突する運動に関する、温度依存性や鎖長依存性といった詳細な実験報告はなされていない。

2. 研究の目的

RNA分子内運動に関する詳細な実験がなされない理由の一つは、構造が似ているDNAとRNAは同じ運動性を持つと考えられていることに起因していると考えられる。しかし、これまでに構造変化におけるDNAとRNAのエンタルピーとエントロピーは異なるという報告もされており、DNAとRNAの熱力学的および速度論的パラメーターは異なっていると考えられる。これに加えて、実際に生体内で両者は全く異なる構造と機能を有しており、両者の違いがダイナミクスにある可能性は十分にある。そこで、申請者のこれまでの経験を生かして、一本鎖RNAの分子内2点間の衝突速度を調べDNAのそれと比較することを目的とした。

3. 研究の方法

まず、DNAの両末端に発光分子であるル

テニウム錯体と消光分子であるDABSYLを修飾したラベル化一本鎖DNA（ポリチミジンおよびポリアデニン）の発光寿命を測定し、両末端間の接触速度を算出した（図1）。

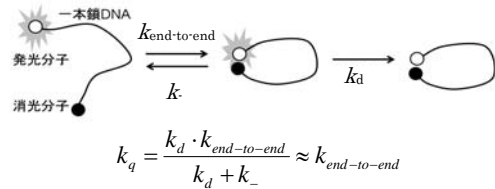


図1 両末端が衝突する速度 ($k_{\text{end-to-end}}$) は、電子移動に伴う消光過程が非常に速い場合 ($k_a \gg k$) に、発光分子の消光速度 (k_q) と等しくなる。

6 から 25 塩基までの鎖長のポリアデニンおよびポリチミジンにおいて鎖長依存性と温度依存性を調べた。その結果、20 塩基では 57 度、25 塩基では 50 度以下では、ポリアデニンのコンフォメーション変化速度が両末端衝突速度に大きく寄与するものの、これよりも高温条件下ではこの寄与が消失し、ポリチミジンと同じ速度で両端が衝突することが明らかとなった（図2）。この結果は Biophys J 誌に掲載予定である。

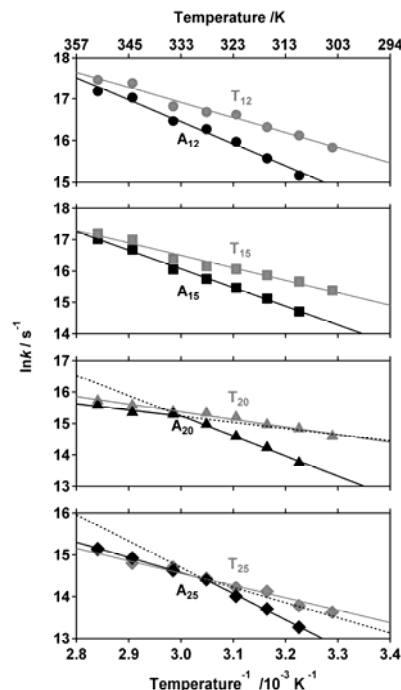


図2 ポリアデニンDNAの方がポリチミジンDNAよりも両末端の衝突速度は遅いが、鎖長が長く、温度が高くなると両者の違いが無くなる。

同様の測定を RNA についても行う際、ルテニウム錯体と DABSYL の RNA への直接修飾が困難であったため、ルテニウム錯体修飾 DNA と DABSYL 修飾 DNA を RNA の両末端にそれぞれハイブリダイズさせてルテニウム錯体の発光寿命を調べた。しかし、DABSYL 修飾 DNA の有無でルテニウム錯体の発光寿命に明確な差が観測されなかった。これはルテニウム錯体もしくは DABSYL が DNA/RNA の二本鎖に対して親和性を持ち、ルテニウム錯体もしくは DABSYL が衝突できないような状況になっていることを示唆していた。

そこで RNA に対するルテニウム錯体および DABSYL の親和性を逆手にとり、進化分子工学を用いてルテニウム錯体および DABSYL に結合する RNA を選び出した。具体的には、 10^{13} 種類の RNA 配列の集団の中から、ルテニウム錯体に結合する RNA を釣り上げるといった操作を行った。その結果、 100nM の K_d でルテニウム錯体に結合する RNA 配列を探し出すことに成功した (図 3)。更に DABSYL と同等の消光分子であるメチルビオロゲン (MV) に対して親和性を持つと考えられる RNA 配列の選出にも成功している。今後、これらの配列を両末端にもつ RNA を使うことで、修飾なしに RNA の運動を調べられると考える。

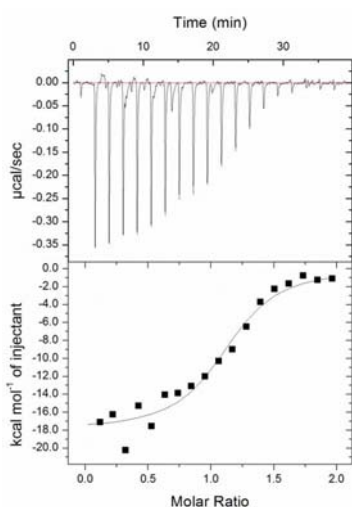


図 3 等温滴定熱測定によって、ルテニウム錯体と結合する RNA の K_d を 100nM と見積もった。

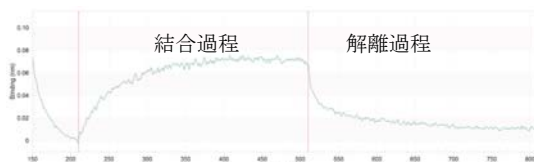


図 4 MV を固定化し、RNA との結合と解離を観測した。結合と解離の速度から K_d は $700\mu\text{M}$ 程度と予想できた。

4. 研究成果

DNA の運動性における核酸依存性および温度依存性を明らかとし、Biophys J 誌に掲載予定である。また、RNA の運動性におけるこれらの依存性を調べるために、ルテニウム錯体結合 RNA および MV 結合 RNA の選出に成功している。今後本研究を進めることにより、RNA の運動を詳細に調べられると期待でき、RNA の構造形成の解明への第一歩となるだけではなく、RNA 医療等の産業にも波及すると考える。

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 1 件)

① Takanori Uzawa, Takashi Isoshima, Yoshihiro Ito, Koichiro Ishimori, Dmitrii E. Makarov, and Kevin W Plaxco, “Electrostatic and Base Stacking Effects Define the End-to-end Collision Dynamics of Single-stranded DNA”, Biophys.J., in press (2013) 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

① 鶴澤 尊規, Thoa TRAN, 伊藤 嘉浩
「ルテニウム錯体に結合する RNA アプタマーの選出」 光合成領域会議 2012 年 12 月 17 日 東京工業大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.riken.jp/nano-med.eng.lab/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鵜澤 尊規 (UZAWA TAKANORI)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学

研究室・研究員

研究者番号：60554376

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし