

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05561

研究課題名(和文)「擬天然RNA構造デザイン」によるRNA超ナノ構造の人工集積と機能発現

研究課題名(英文) Pseudo-natural RNA structures as promising modules to construct functional RNA nanostructures with geometrical shapes

研究代表者

井川 善也 (Yoshiya, Ikawa)

富山大学・大学院理工学研究部(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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：天然由来のRNA立体構造を改変し幾何学的に集積させ、新規な集積ナノ構造の創成と機能発現を目指し次の3課題を行なった。(1)一次元RNA超構造アレイの構築、(2)二次元RNA超ナノ構造の構築、(3)異種RNAユニットのヘテロ集積による機能連携。(1)、(2)ではGIリボザイムを基盤として1次元アレイ構造、および正三角形型3量体、正方形型4量体の設計・構築、およびAFMによる直接観察、集積に依存したRNA酵素機能の発現に成功した。(3)では、RNase Pリボザイム・GIリボザイム・蛍光アプタマーを基盤として、異種の機能性RNAのヘテロ集積化に成功した。

研究成果の概要(英文)：RNA is a biopolymer that is attractive for constructing nanoscale objects with complex structures. The 3D structure of a group I (GI) ribozyme has a modular architecture, which can be separated into an activator module and a catalytic module. The fully active ribozyme can be reconstructed by assembling the two separately prepared modules through specific assembly between the two modules. Such non-covalent assembly of the two modules allows the design of 1D-array and polygonal RNA nanostructures. Through rational redesign of the parent GI ribozyme, we constructed variant GI ribozymes as unit RNAs for 1D-array oligomers and polygonal-shaped oligomers with catalytic activity. Programmed trimerization and tetramerization of the unit RNAs afforded catalytically active nano-sized RNA triangles and squares, the structures of which were directly observed by AFM. We have also succeeded in design and construction of RNA nanostructures by modular ribozymes and a fluorescent RNA aptamer.

研究分野：生体関連化学

キーワード：RNAナノテクノロジー リボザイム RNA構造 ナノ集積構造

### 1. 研究開始当初の背景

RNA分子はDNAと等価な構造形成能を有し、さらに「一本鎖」として合成(転写)され、フォールディングされ、複雑な3D構造を形成し触媒機能や分子認識等の高次機能を発揮する。他方でDNAを高分子材料として多様な幾何学的ナノ構造の構築と機能化が活発に展開されており(DNAナノテクノロジー)、RNAを素材として類似の幾何学的ナノ構造を形成する研究(RNAナノテクノロジー)も始まっていた。「天然RNA分子の3D構造」と「核酸ナノテクノロジーの手法による幾何学RNAナノ構造」はいずれも立体構造に基づくRNA機能の開拓において有望な素材や方法論であり、両者を融合しその長所同士を組み合わせれば、新規な集積RNAナノ構造とそれに基づく機能発現の可能性はさらに拡張できると期待される。しかしこの二つのRNAナノ構造を融合する研究は、全く報告例がない状況であった。そこで報告者は、天然の機能性RNAの構造-機能相関の豊富な研究実績と新規なRNA-3D構造の人工構築の実績を背景として、天然由来のRNA構造を合理的に改変して幾何学的に集積させ、集積に依存してRNA機能が発現される分子システムのデザインと解析を行なった。

### 2. 研究の目的

#### (課題1)モジュール工学による「一次元RNA超構造アレイ」の構築

単分子で高度に機能するRNA酵素(リボザイム)を一次元の超分子アレイ構造へ改変し、酵素機能を構造形成に依存して発現させる。モジュール集積型のRNA編集活性をもつ大型リボザイムを構造モジュールに分割し、「分子内」相互作用を分子「分子間」相互作用に組み替えた「擬天然構造」をモノマーとする1Dホモポリマー型のアレイ超構造を設計し、その形成をAFM観測などで実証する。超構造形成に依存した酵素活性を確認する。さらに単位リボザイムを2種に識別し、「-A-B-A-B-型」などのコポリマー型アレイ超構造の構築と機能発現も行う。

#### (課題2)二次元RNA超ナノ構造の構築

一次元の超分子アレイ構造の相互作用ユニットの位置を改変し「閉じた多角形」や螺旋状アレイを構築すると同時に、集積構造を利用したRNA酵素機能の発現を図る。

#### (課題3)異種RNAユニットのヘテロ集積による高次機能の連携

超ナノ構造を形成するRNAユニットとして、複数種の機能性RNAをコポリマー型に組み込みヘテロ集積超構造を構築する。超構造形成に依存してヘテロ分子の機能を連動的に発現し、個別システムを超えた機能の発現を実現する。

### 3. 研究の方法

テトラヒメナ由来のGIリボザイムはRNA切断の酵素反応を直接担うモジュール(Catモジュール)とCatモジュールを活性化するモジュール(Actモジュール)の二つのモジュールから構成される。天然型リボザイムでは、両モジュールは「分子内で会合」し、リボザイムは恒常的に活性となる。モジュール工学によりActモジュールをCatモジュールから物理的な分割が可能であり、ActモジュールRNAの添加に応じてCatモジュールRNAのリボザイム活性が発現する「二分子リボザイム(Act+Cat)」が構築できる。

(課題1) ActモジュールをCatモジュールに対し、野生型とは異なる位置に再導入した「擬天然構造(H-RNA)」を作成する。モジュール工学により適切な導入部位を選定すれば分子間でのみ相互作用でき、超分子アレイ(H-H-H-H-)を形成するモノマーの設計が可能となる。さらに超分子形成にAct/Catモジュール相互作用を用いるため、超分子1Dアレイの形成とリボザイム活性の発現が連動される。上記モジュール改変で生み出された「リボザイム超分子」ホモポリマーに対し、認識特異性の異なるAct/Catモジュール相互作用界面を用いることで、H-RNAをAとBに差別化し、2種のRNAユニット(A,B)が交互集積した「-A-B-A-B-型」のコポリマーを形成する。

(課題2) 分子モデリングにより、ActモジュールをCatモジュールに対して角度を持たせて組み込み「三角形/正方形などの幾何学型ナノ構造」を構築する。多角形構造は1Dアレイと同様に、生化学手法、AFM観察により確認する。「平面多角形」のデザインとは逆に、Act/Catモジュール間を連結する塩基対を増大(或は減少)させ、垂直軸方向のズレを意図的に導入し、多量体が平面で閉環せず垂直軸方向に螺旋状に無限進展する超分子構造についても構築し、AFM観察を行う。

(課題3) GIリボザイムに限らず天然の機能性RNAの多くはモジュール集積型の構造を有する。課題1、2では、モノマーユニットとしてはGIリボザイム一種類を素材としたが、課題3では複数種の機能性RNAをモノマーユニットとしてヘテロあるいはキメラ型の集積ナノ構造を構築し、異種素材の利用に依存した機能発現を行なう。

### 4. 研究成果

#### (課題1)モジュール工学による「一次元RNA超構造アレイ」の構築

H27年度:単分子で高度に機能するGI-RNA酵素(GI-リボザイム)を単位モノマーとした一次元の超分子アレイ構造の基本形の開発を行なった。具体的には当初の予定通りActモジュールをCatモジュール中のP6

部位に人工連結した分子をモデリングによりデザインした。さらに得られた H-RNA を実際に転写合成し、その集積挙動を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動、および集積に依存した触媒活性のアッセイにより検証・確認した。その結果、H-RNA が当初の予想通りホモポリマー構造を効率よく形成すること、またモノマー状態ではほぼ不活性なのであるが集積により酵素活性が発現する事を実験的に確認した。

H28 年度：生化学解析で確認した H-RNA のホモオリゴマー構造を原子力間顕微鏡 (AFM) による直接観察を行ない、集積構造の確認に成功した。H-RNA で用いた Act/Cat 間の相互作用モチーフを、互いに直交する (干渉しない) 2 組のモチーフへと差別化し、単独では集積しないが、共存すると「-A-B-A-B-型」のコポリマーを形成する単位リボザイム A, B を開発した。設計通りの集積挙動を確認すると共に、A, B それぞれに異なる RNA 基質を認識できるユニットを組み込み、コポリマー形成に応じて、二種類の基質 RNA 切断能力が同時に発現する機能を実現した。

H29 年度：H27~28 年度に開発した H-RNA を基盤とする、ホモオリゴマーとコポリマーの集積挙動をより詳細に解析するために、2 量体~4 量体をそれぞれ選択的に形成するモノマーユニットの開発を行ない、それぞれのユニット数のオリゴマーが選択的に集積することを実験的に確認した。H-RNA とは分子デザインが大きく異なるモノマーユニットを開発しホモオリゴマー化により二例目の「一次元 RNA 超構造アレイ」創成にも成功した。

以上、課題 1 については、当初の予想を超えた種類の一次元ナノ集積構造の構築に成功し、主要な構造については十分な生化学および AFM 解析を行なう事ができた。

### (課題 2) 二次元 RNA 超ナノ構造の構築

H27 年度：多角形型ホモオリゴマーを形成しうるモノマー-RNA の分子デザインとして Act モジュールを Cat モジュールの P6 部位に人工連結した L-RNA を設計した。転写合成した L-RNA をホモ集積させて集積挙動を検討した結果、主としてホモ 3 量化により正三角形型集積体を、一部はホモ 4 量化により正方形型集積体を形成することが確認された。それぞれの構造は AFM 観察によっても確認された。

H28 年度：単位モノマー間の相互作用界面の分子認識を差別化し、3 種のモノマーの閉環によるヘテロ三角形、および 2 種のモノマーが 2 分子ずつ交互に集積して閉環したヘテロ正方形を、それぞれ効率的かつ選択的に集積させることに成功した。これらの構造の確認は AFM 観察に寄っても成功した。ヘテロ集積構造の形成に依存して単位リボザイムユニットが活性化し、ユニット毎に異なる

基質を選択的に切断する機能の付与を行ない、三角形型ヘテロ三量体では、3 つのリボザイムユニットが 3 種の異なる基質を集積に依存して切断させることに成功した。さらにヘテロ三量体については会合状態の段階的な集積/解離過程の解析にも成功した。

H29 年度：H27~28 年度に構築した正三角形および正方形の集積構造を与えるユニット RNA の分子デザインに改変を加え、四角形の辺の長さが異なる平行四辺形型のヘテロ集積体やホモ 5 量化による正五角形型集積体の構築に成功し、AFM による構造の直接確認も行なった。さらに連結ユニットのリンカーを増大および減少させることでらせんの方向が反対のらせん構造を選択的に構築する事にも成功し、それぞれの構造を AFM で確認した。

以上、課題 2 についても、当初の予定を超えた多彩な形状の創出とその制御、および機能発現に成功した。

### (課題 3) 異種 RNA ユニットのヘテロ集積による高次機能の連携

H28 年度：ヘテロ集積型の超ナノ構造を形成する RNA ユニットとして、RNaseP リボザイムが有望であることを見いだした。S ドメインと C ドメインの二つの構造モジュールに分割し二分子リボザイムとして再構成できることを確認した。大腸菌と高熱菌の異種 RNaseP を用い、S/C ドメインによる再構成を行なった所、同種リボザイムの再構成よりも、高熱菌 S ドメインと大腸菌 C ドメインのヘテロ集積がより高活性なりボザイム (キメラ型 RNaseP) を形成することを見いだした。

H29 年度：高熱菌 S ドメインと大腸菌 C ドメインを人工的に連結し、RNaseP リボザイムの構造をキメラ型で一次元集積する分子デザインを行なった。その集積挙動を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により検討し、集積構造を確認し、集積依存的な活性発現にも成功した。

さらに蛍光 RNA とリボザイムを複合化したヘテロ機能構造 RNA の構築にも成功し、リボザイム機能を蛍光 RNA の機能発現依存的にモニタリングできる系を開発した。リボザイム機能と蛍光 RNA 機能の連携作動の細胞様環境下 (細胞抽出液)、および複数の GI-リボザイムの反応を大腸菌内で連携して行なう系の作動にも成功した。

以上、課題 3 については、当初に予定したヘテロ集積体と異種機能の連携作動に成功した。

以上をまとめ、当初予定した 3 つの課題は、いずれも順調に進行し、総合的には当初の予想を超える成果を達成できた。

## 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 11 件)

- 1) Gulshan, Mst. A., Rahman Md. M., Matsumura, S., Higuchi, T., Umezawa, N., & **Ikawa, Y.** Biogenic triamine and tetraamine activate core catalytic ability of Tetrahymena group I ribozyme in the absence of its large activator module. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 594-600 (2018) 査読あり
- 2) Inuzuka, S., Kakizawa, H., Nishimura, K., Naito, T., Miyazaki, K., Furuta, H., Matsumura, S., & **Ikawa, Y.** Recognition of cyclic-di-GMP by a riboswitch conducts translational repression through masking the ribosome-binding site distant from the aptamer domain. *Genes to Cells*, **23**, 435-447 (2018) 査読あり
- 3) Rahman Md. M., Matsumura, S., & **Ikawa, Y.** Artificial RNA motifs expand the programmable assembly between RNA modules of a bimolecular ribozyme leading to application to RNA nanostructure design. *Biology*, **6**, pii: E37 (2017) 査読あり
- 4) Tanaka, T., Hirata, Y., Tominaga, Y., **Furuta, H.**, Matsumura, S., & **Ikawa, Y.** Heterodimerization of group I ribozymes enabling exon recombination through a pair of cooperative trans-splicing reactions. *ChemBioChem.*, **18**, 1659-1667 (2017) 査読あり
- 5) Tanaka, T., **Ikawa, Y.**, & Matsumura, S. Rational engineering of a modular group I ribozyme to control its activity by self-dimerization. *Methods in Molecular Biology* (RNA Nanostructures), **1632**, 325-340 (2017) 査読あり
- 6) Oi, H., Fujita, D., Suzuki, Y., Sugiyama, H., Endo, M., Matsumura, S., & **Ikawa, Y.** Programmable formation of catalytic RNA triangles and squares by assembling modular RNA enzymes. *J. Biochem.*, **161**, 451-462 (2017) 査読あり
- 7) Furukawa, A., Tanaka, T., **Furuta, H.**, Matsumura, S., & **Ikawa, Y.** Use of a fluorescent aptamer RNA as an exonic sequence to analyze self-splicing ability of a group I intron from structured RNAs. *Biology*, **5**, pii: E43 (2016) 査読あり
- 8) Tanaka, T., Matsumura, S., **Furuta, H.**, & **Ikawa, Y.** Tecto-GIRz: engineered group I ribozymes the catalytic ability of which can be

controlled by self-dimerization. *ChemBioChem.*, **17**, 1448-1455 (2016) 査読あり

- 9) **Ikawa, Y.**, Katsumata, S., Sakashita, R., Sato, S., Takenaka, S., & **Furuta, H.** Water-soluble porphyrinoids as G-quadruplex binders and telomerase inhibitors. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **20**, 1041-1048 (2016) 査読あり
- 10) Inuzuka, S., Matsumura, S., & **Ikawa, Y.** Optimization of RNA-based c-di-GMP fluorescent sensors through tuning their structural modules. *J. Biosci. Bioeng.*, **122**, 183-187 (2016) 査読あり
- 11) Furukawa, A., Maejima, T., Matsumura, S., & **Ikawa, Y.** Characterization of an RNA receptor motif that recognizes a GCGA tetraloop. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **80**, 1386-1389 (2016) 査読あり

[学会発表] (計 23 件)

- 1) **Yoshiya Ikawa**  
Programmable formation of catalytic RNA triangles and squares by assembling modular RNA enzymes.  
Gordon Research Conference on RNA Nanotechnology (2017年1月22日～1月27日) Ventura, California, USA
- 2) Ara Mst. Gulshan, Shigeyoshi Matsumura, **Yoshiya Ikawa**  
Effects of polyamines on the catalytic properties of a mutant *Tetrahymena* ribozyme lacking its large peripheral element.  
第19回日本RNA学会年会 (2017年7月19日～21日) 富山国際会議場
- 3) Motiar Md. Rahman, Takahiro Tanaka, Hiroki Oi, Shigeyoshi Matsumura, **Yoshiya Ikawa**  
Expanding the RNA-RNA interaction interface in the *Tetrahymena* group I ribozyme and its application to RNA-nanostructure design.  
第19回日本RNA学会年会 (2017年7月19日～21日) 富山国際会議場
- 4) Sohanur Md. Rahman, Junya Ishikawa, Hiroyuki Furuta, Luc Jaeger, Shigeyoshi Matsumura, **Yoshiya Ikawa**  
Adaptor modules for T-loop\_PK RNA motif that enable us to apply the motif as a new assembly unit for RNA nanostructure design  
第19回日本RNA学会年会 (2017年7月19日～21日) 富山国際会議場
- 5) 能澤友梨, 萩原恵, 青山理紗子, 松村茂祥, **井川善也**  
改変型RNase Pによるナノ構造体形成および触媒機能の解析

第19回日本RNA学会年会(2017年7月19日~21日) 富山国際会議場

6) 大井宏紀, Yu Kai, 杉山弘, 遠藤政幸, 松村茂祥, 井川善也

三角形型リボザイム三量体を集積ユニットとしたRNAナノ構造の拡張  
第11回バイオ関連化学シンポジウム(2017年9月7日~9日) 東京大学弥生キャンパス

7) 大井宏紀, Yu Kai, 杉山弘, 遠藤政幸, 松村茂祥, 井川善也

RNAモジュール工学によるリボザイムの高密度集積  
「細胞を創る」研究会 10.0(2017年10月19日~20日) 京都教育文化センター

8) Yoshiya Ikawa, Saki Inuzuka, Hitoshi Kakizawa, Kei-ichiro Nishimura, Hiroyuki Furuta, Shigeyoshi Matsumura

Recognition of c-di-GMP by a riboswitch represses translation through masking the SD element distant from the aptamer domain  
The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry(2017年11月14日~16日) 東京理科大学 葛飾キャンパス

9) 大井宏紀, Yu Kai, 杉山弘, 遠藤政幸, 松村茂祥, 井川善也

リボザイム閉環三量体によるナノ三角形をユニットとしたRNAナノ構造の拡張  
ConBio2017 生命科学系学会合同年次大会(2017年12月6日~12月9日) 神戸ポートアイランド

10) Takahiro Tanaka, Shigeyoshi Matsumura, Hiroyuki Furuta, Yoshiya Ikawa

Tecto-GIRz: engineered group I ribozyme the catalytic ability of which can be controlled by self-dimerization. RNA 2016, The 21st Annual Meeting of the RNA Society(2016年6月28日~7月2日) 京都国際会議場

11) 大井宏紀, 藤田大介, 鈴木勇輝, 杉山弘, 遠藤政幸, 松村茂祥, 井川善也

モジュール改変型リボザイムの人工集積によるRNAナノ構造の集積と機能制御  
第10回バイオ関連化学シンポジウム(2016年9月7日~9日) 石川県金沢市 石川県立音楽堂

12) 能澤友梨, 萩原恵, 松村茂祥, 井川善也

RNA構造モジュールの1次元ナノ集積を目指したRNase Pリボザイムの分割と再構築  
第10回バイオ関連化学シンポジウム(2016年9月7日~9日) 石川県立音楽堂

13) 清岡隆司, 松村茂祥, 井川善也

二量型スプライシング・リボザイムをユニット単位とした一次元RNAナノ集積構造

第10回バイオ関連化学シンポジウム(2016年9月7日~9日) 石川県立音楽堂

14) Yoshiya Ikawa

RNA as a promising biopolymer to generate neobiological structures and functions  
第68回日本生物工学会2016年大会(2016年9月28日~30日) 富山国際会議場・ANAクラウンプラザホテル富山

15) 大井宏紀, 藤田大介, 鈴木勇輝, 杉山弘, 遠藤政幸, 松村茂祥, 井川善也

グループIリボザイムの集積制御によるRNAナノ構造の選択的形成と活性評価  
第68回日本生物工学会2016年大会(2016年9月28日~30日) 富山国際会議場・ANAクラウンプラザホテル富山

16) 前島昂弥, 松村茂祥, 井川善也

GCGAループを認識する新規なRNAモチーフ: リボザイム活性を指標とした機能評価  
Japanese San Francisco Bay Area Seminar, 第15回BAS年次合同セミナー(2016年10月22日) UCSF, Mission Bay Campus, Genentech Hall, San Francisco, CA, USA

17) 清岡隆司, 松村茂祥, 井川善也

二分子型スプライシング・リボザイムを基盤としたシグナル増幅 RNA デバイスの構築  
第17回日本RNA学会年会(2015年7月15日~17日) ホテルライフオーソ札幌

18) 松村茂祥, 藤田大介, 大井宏紀, 鈴木勇輝, 杉山弘, 遠藤政幸, 井川善也

グループIリボザイムを基盤とした2次元RNAナノ構造体の構築とその酵素活性の制御  
第17回日本RNA学会年会(2015年7月15日~17日) ホテルライフオーソ札幌

19) 大井宏紀, 藤田大介, 鈴木勇輝, 杉山弘, 遠藤政幸, 松村茂祥, 井川善也

モジュール型リボザイムの集積制御によるRNA正多角形を選択的形成とAFM観察  
第9回バイオ関連化学シンポジウム(2015年9月10日~9月12日) 熊本大学工学部 黒髪南キャンパス

20) 田中貴大, 平田悠介, 富永雄人, 古田弘幸, 井川善也

キメラ二量型リボザイムによる協調型トランス・スプライシング・システム  
第9回バイオ関連化学シンポジウム(2015年9月10日~9月12日) 熊本大学工学部 黒髪南キャンパス

21) Daisuke Fujita, Hiroki Oi, Yuki Suzuki, Hiroshi Sugiyama, Masayuki Endo, Shigeyoshi Matsumura, Yoshiya Ikawa

Programmable formation of catalytic 2D RNA nanostructures by assembling modular RNA

enzymes. The 42nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (2015年9月23日～25日) 兵庫県姫路市 あいめっせホール

22) Ryuji Kiyooka, Shigeyoshi Matsumura, Yoshiya Ikawa

Construction of an RNA device based on a splicing ribozyme for amplification of input-signals.

Pacificchem 2015, The international Chemical Congress of Pacific Basin Societies (2015年12月15日～20日) アメリカ、ハワイ州ホノルル Hawaii Convention Center

23) Shigeyoshi Matsumura, Narumi Uehara, Daisuke Fujita, Hiroyuki Furuta, Yoshiya Ikawa  
Programmable formation of catalytic 1D and 2D RNA nanostructures by assembling group I ribozyme. Pacificchem 2015, The international Chemical Congress of Pacific Basin Societies (2015年12月15日～20日) アメリカ、ハワイ州ホノルル Hawaii Convention Center

[図書] (計 2 件)

1) Ikawa, Y. & Matsumura, S. Engineered group I ribozymes as RNA-based modular tools to control gene expression. Applied RNA Bioscience (Springer), Chapter 13, p203-p220 (2018)

2) Matsumura, S., & Ikawa, Y. リボザイムの研究動向と安全性評価, 先端医療技術の実用化と開発戦略 (技術科学協会) 1章8節, p.61-p.65 (2017)

[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