

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24310163

研究課題名(和文) RNA分子の細胞内構造プローブ法開発と細胞質スプライシング機構解析

研究課題名(英文) Structural probing of RNA molecules with in-cell NMR

研究代表者

田中 好幸 (TANAKA, Yoshiyuki)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：70333797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：In-cell NMRは細胞内の生体分子の構造と挙動を解析できる優れた手法である。しかし核酸分子への応用はなされていなかった。そこで本研究では、in-cell NMR分光法で細胞内に存在する核酸分子(特にRNA分子)の構造及び細胞内プロセス過程をプローブする手法の開発をおこなう。まずRNA局所構造プローブのための長鎖RNA分子の汎用的な部位特異的標識法を開発した。また実際に、核酸分子のin-cell NMR測定に向けて、核酸分子の細胞内導入法について種々検討を行った。その結果、電気穿孔法により核酸分子が細胞内導入できることが解ったことに加え、導入した核酸分子のプロセス過程の観測を達成した。

研究成果の概要(英文)：In-cell NMR has been rarely applied to nucleic acids. In order to apply in-cell NMR into nucleic acids, there are several issues. 1) There has been no appropriate site-specific labeling technique of long RNA molecules. 2) There was no established method for introducing nucleic acids into cells. Therefore, at first, Tanaka (principal investigator: PI) developed a site-specific labeling technique of RNA molecules by using a recently discovered primer-extension ability of RNA polymerases. Interestingly, by using the derived labeled RNA molecule (HAC1 mRNA), PI identified that conserved C883 and G888 residues were base-paired within a loop. Then, in collaboration with grant team members, a method for introducing RNA molecules into cells was established by using an electroporation technique. It should be also mentioned that chemical reactions occurred to the introduced molecule was detected by using appropriate ¹⁹F-labeling tag. Thus, the team accomplished main purposes of this project.

研究分野：構造生物化学

キーワード：生体分子計測 NMR 安定同位体標識 バイオプローブ 細胞内化学反応

1. 研究開始当初の背景

NMR 分光法は生体高分子の一原子からシグナルを抽出できる優れた分光法である。しかし RNA 分子の安定同位体標識技術の未整備により、RNA 分子の局所構造情報を選択的に抽出する手法が存在しなかった。その点を解決するため申請者は、巨大 RNA 分子の特定の 1~数残基を標識する手法を開発した (*Nucleic Acids Res.*, 40, e7 (2012); 図 1)。本手法を in-cell NMR と組み合わせると、生きた細胞内における RNA 分子のプロセス過程の観測、局所的な RNA 二次構造・三次元構造を決定可能となる。

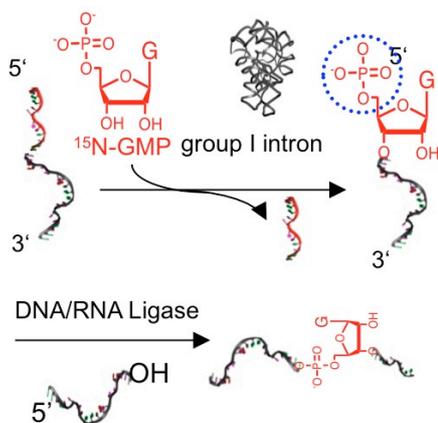


図 1 長鎖 RNA 分子部位特異的標識法

なお RNA 分子の部位特異的安定同位体標識は研究代表者が行ってきた化学合成 (*JACS*, 129, 244-245 (2007); *JACS*, 124, 4595-4601 (2002)) が主流であったが、生化学者および構造生物学者には敷居の高い手法であった。また方法論的にも、短鎖 RNA 分子にしか適用できない難点があった。なお長鎖 RNA 分子にも適用可能な方法として、大槻先生や研究代表者の酵素法 (Ohtsuki et al., *FEBS Lett.*, 514, 37-43 (2002); Tanaka et al., *Nucleic Acids Res.*, 40, e7 (2012)) があるが、汎用されるには至っていない。また研究代表者が開発した手法はグアノシン残基の標識にしか使用できなかった。従って、生物学系研究者にも実施できる生化学的な手法で汎用性の高い長鎖 RNA 分子の部位特異的安定同位体標識法が望まれていた。

次に核酸分子の in-cell NMR においては

Lukáš Trantírek 博士の研究例があるのみで (Trantírek et al., *JACS*, 131, 15761-15768 (2009))、ほとんど未開拓の領域であった。また in-cell NMR の研究が構造や相互作用研究に用いられてきたが、細胞内の生体分子のプロセス過程 (化学反応) に着目した研究も非常に少ない状況にあった。従って、核酸分子の in-cell NMR 測定に向けた各種方法論開発 (細胞内導入法の検討等) が求められていた。さらに、細胞内における生体分子の化学変換過程の観測への展開という新しい基軸を打ち立てることにより、生命現象の新たなビジョンが開けると期待される状況であった。

2. 研究の目的

上述の状況を踏まえて本研究では、(1) RNA の部位特異的標識法の改良、(2) in-cell NMR 分光法による細胞内での RNA 分子構造及びプロセス過程をプローブする手法の開発をおこなった。

3. 研究の方法

(1) 長鎖 RNA 分子の部位特異的標識法

局所構造観測の対象の長鎖 RNA 分子として、スプライソソーム非依存的 (細胞質) スプライシングを受ける HAC1 mRNA を選択した。本細胞質スプライシングは以下に示す小胞体ストレス IRE1 経路の中のイベントである (図 2)。

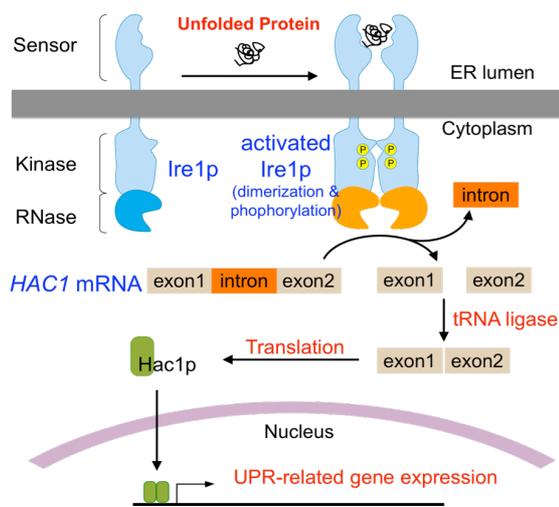


図 2 酵母 UPR シグナル経路

小胞体内に異常蛋白質が蓄積すると、ストレス応答として **Unfolded Protein**

Response (UPR) シグナルが活性化され、異常蛋白質の巻き戻し/分解等が引き起こされる。酵母では Ire1p が異常蛋白質を検出すると、転写因子 HAC1 mRNA 前駆体のイントロン両端 (2カ所) が、Ire1p RNase ドメインにより切断される (図 2, 3)。tRNA リガーゼによる mRNA 連結を経て生じた成熟型 mRNA からは Hac1p が発現し、下流の UPR 関連蛋白質発現が誘導される (図 2)。以上のように、HAC1 mRNA は生物学的に興味深い分子であるため、本研究課題における解析対象とした。

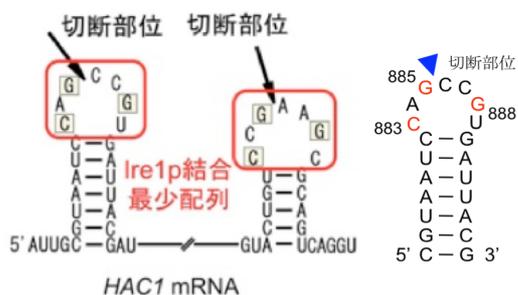


図 3 酵母 UPR シグナル経路

なお HAC1 mRNA の二次構造は図 3 のように予測されており、細胞質スプライシングにより切断を受ける部位はループ配列内に存在する。また Ire1p を含む IRE1 蛋白質によって切断を受けるループ配列には 5' CNGNNGN 3' という保存配列が存在する。従ってこのステムループ配列の三次元構造を明らかにすることが細胞質スプライシングの機構の理解に不可欠である。従って、HAC1 mRNA の 5'側のステムループ配列を最初の局所観測用サンプルとして選択した (図 3 右)。

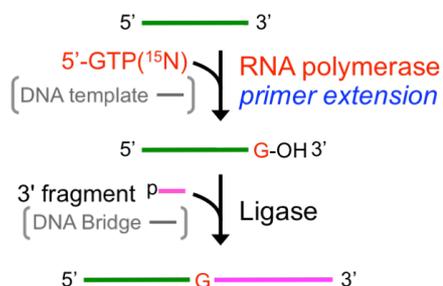


図 4 RNA 部位特異的標識法の新法

なお長鎖 RNA 分子の部位特異的標識法には改良が必要であった。そこで新たな

標識法の開発が求められる。今回、RNA polymerase について見いだされたプライマー伸長反応を利用して一残基のみを標識することを計画した (図 4)。そこでループ中の保存配列を個々に標識することを計画した (図 5)。



図 5 NMR 測定配列と標識部位

(2) 核酸分子の in-cell NMR 手法開発

In-cell NMR において一番のボトルネックとなっている「核酸分子の細胞内導入」について以下の 2 つの方法を検討した。

- ① リポソームと細胞の電気融合法
- ② 電気穿孔(エレクトロポレーション)法

4. 研究成果

(1) 長鎖 RNA 分子の部位特異的標識法

RNA polymerase のプライマー伸長能を利用した RNA 分子の一残基標識を G888 残基について実行したところ、当初の目論見通り一残基標識体が作製できた。¹⁵N 核編集スペクトルにおいて、一残基分のシグナルのみ観測されている (図 6)。即ち、新規の長鎖 RNA 分子部位特異的標識法が開発できた。

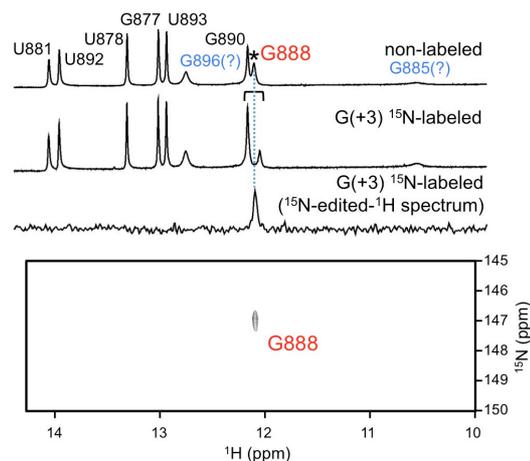


図 6 C883 残基標識体の ¹⁵N 編集 NMR スペクトル

C883 残基標識体も調製したところ、標識シトシンのアミノプロトンのみが観測された (図 7)。シトシン導入にも成功し、

本法の汎用性を示すデータである。このように、長鎖 RNA 分子の部位特異的標識法の改良を達成した（本データの生物学的意義については後述）。

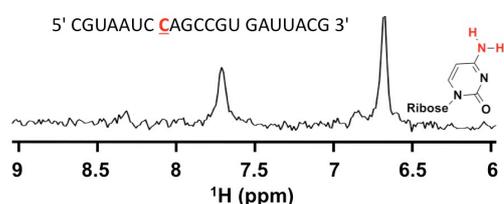


図 7 C(-3)残基標識体の ^{15}N 編集 NMR スペクトル

(2) 核酸分子の *in-cell* NMR 手法開発

① リポソームと細胞の電気融合法

野村慎一郎博士（東北大）はリポソーム中に封入した核酸分子を電気刺激を用いた細胞との融合により細胞内導入することに成功している (*PLOS ONE*, 9, e106853 (2014))。そこで野村博士の協力を得て蛍光標識した核酸分子の導入を試みた。その結果、細胞中に核酸分子が導入されたことが確認できた。

② 電気穿孔(エレクトロポレーション)法

電気融合法を超える手法として電気穿孔法の進捗が著しい。そこで電気穿孔法についても検討を行った。導入する核酸分子として、トリフルオロチミジン (5 位が CF_3 基となったチミジン) を用いて、電気穿孔法による細胞導入を行い、そのまま *in-cell* NMR まで測定した (図 8)。

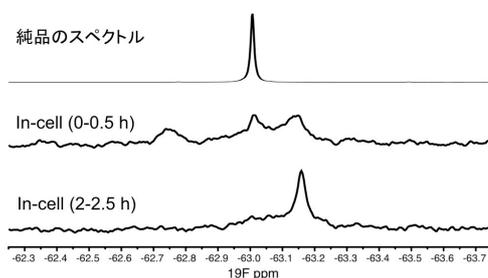


図 8 *In-cell* NMR スペクトル

図 8 からわかるように電気穿孔法による細胞導入により核酸分子の *in-cell* NMR スペクトルの取得に成功した。このことから、電気穿孔法が核酸分子の細胞内導入手法として有効であることが判った。さらに

興味深いことに、スペクトルが経時変化することが判り、核酸化合物の細胞内化学変換過程の観測にも成功した。併せてフッ素 (^{19}F) が構造プローブとして適していることも解った。このように、核酸分子の細胞内導入法を確立するとともに、導入分子の細胞内化学変換の過程まで観測するという当初の目的を達成できた。

(3) 生物学的意義

RNA 分子の部位特異的標識法開発に用いられた HAC1 mRNA の NMR スペクトルは、細胞質スプライシングを受けるための構造要件についての重要な知見も与えてくれる。図 6 において G888 由来と帰属されたイミノプロトンは、過去の実験で帰属がついていなかったものであり、本実験により初めて帰属された。さらに重要なこととして、本イミノプロトンの化学シフト値はループ内の G888 残基が Watson-Crick 型塩基対を形成していることを示している。塩基対の相手としてもっとも可能性が高いのは C883 残基である。この C883 残基由来のアミノプロトンのシグナルを見ると (図 7)、こちらの化学シフト値もアミノ基が Watson-Crick 型塩基対を形成していることを指示している。

即ち、スプライシング部位のループ配列はループ内で、保存残基の C883 と G888 が Watson-Crick 型塩基対を形成していることが明らかとなった。これは、C883 と G888 が保存されている理由が、ループ内で塩基対を組むためであることを示しており、その三次元構造が Ire1p によって認識されていると考えられる。

(4) 総括

このように当初の目的通り、長鎖 RNA 分子の部位特異的標識法を開発し、核酸分子の *in-cell* NMR スペクトル取得、及び、その化学変換過程の観測を達成した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18/20 件)

- (1) Hiroshi Abe*, Naoko Abe, Aya Shibata, Keiji Ito, Yoshiyuki Tanaka, Mika Ito,

- Hisao Saneyoshi, Satoshi Shuto, and Yoshihiro Ito, Structure Formation and Catalytic Activity of DNA Dissolved in Organic Solvents. *Angewandte Chemie International Edition*, 51, 6475-6479 (2012). (審査有)
- (2) Tomomi Uchiyama, Takashi Miura, Hideo Takeuchi, Takenori Dairaku, Tomoyuki Komuro, Takuya Kawamura, Yoshinori Kondo, Ladislav Benda, Vladimír Sychrovský*, Petr Bouř, Itaru Okamoto*, Akira Ono and Yoshiyuki Tanaka*, Raman spectroscopic detection of the T-Hg^{II}-T base pair and the ionic characteristics of mercury. *Nucleic Acids Research*, 40, 5766-5774 (2012). (審査有)
- (3) Ladislav Benda, Michal Straka, Vladimír Sychrovský, Petr Bouř*, Yoshiyuki Tanaka, Detection of Mercury-TpT Dinucleotide Binding by the Raman Spectra. A Computational Study. *Journal of Physical Chemistry A*, 116, 8313-8320 (2012). (審査有)
- (4) Hidetaka Torigoe*, Itaru Okamoto, Takenori Dairaku, Yoshiyuki Tanaka, Akira Ono, T. Kozasa, Thermodynamic and structural properties of the specific binding between Ag⁺ ion and C:C mismatched base pair in duplex DNA to form C-Ag-C metal-mediated base pair. *Biochimie*, 94, 2431-2440 (2012). (審査有)
- (5) Jakub Šebera, Lukáš Trantírek, Yoshiyuki Tanaka, and Vladimír Sychrovský*, Pyramidalization of the Glycosidic Nitrogen Provides the Way for Efficient Cleavage of the N-glycosidic Bond of 8-OxoG with the hOGG1 DNA Repair Protein. *Journal of Physical Chemistry B*, 116, 12535-12544 (2012). (審査有)
- (6) Jakub Šebera, Jaroslav Burda, Michal Straka, Akira Ono, Chojiro Kojima, Yoshiyuki Tanaka, Vladimír Sychrovský*, Formation of the T-Hg^{II}-T Metal-Mediated DNA Base Pair; Proposal and Theoretical Calculation of the Reaction Pathway. *Chemistry - A European Journal*, 19, 9884-9894 (2013). (審査有)
- (7) Hiroshi Yamaguchi, Jakub Šebera, Jiro Kondo, Shuji Oda, Tomoyuki Komuro, Takuya Kawamura, Takenori Dairaku, Yoshinori Kondo, Itaru Okamoto, Akira Ono, Jaroslav V. Burda, Chojiro Kojima, Vladimír Sychrovský*, Yoshiyuki Tanaka*, The structure of metallo-DNA with consecutive T-Hg^{II}-T base-pairs explains positive entropy for the metallo-base-pair formation. *Nucleic Acids Research*, 42, 4094-4099 (2014). (審査有)
- (8) Jiro Kondo*, Tom Yamada, Chika Hirose, Itaru Okamoto, Yoshiyuki Tanaka, Akira Ono, Crystal structure of metallo-DNA duplex containing consecutive Watson-Crick-like T-Hg(II)-T base pairs. *Angewandte Chemie International Edition*, 53, 2385-2388 (2014). (審査有)
- (9) Irena Kratochvílová*, Martin Golan, Martin Vala, Miroslava Špérová, Martin Weiter, Ondřej Páv*, Jakub Šebera, Ivan Rosenberg, Vladimír Sychrovský, Yoshiyuki Tanaka and F. Matthias Bickelhaupt, Theoretical and experimental study of charge transfer through DNA: impact of mercury mediated T-Hg-T base pair. *Journal of Physical Chemistry B*, 118, 5374-5381 (2014). (審査有)
- (10) Jakub Šebera, Lukáš Trantírek, Jiří Fukal, Yoshiyuki Tanaka and Vladimír Sychrovský* Mechanism of base excision with the hOGG1 DNA repair enzyme. *Chemické Listy*, 108, 364-367 (2014).
- (11) Mituhiro Kuriyama, Kaichiro Haruta, Takenori Dairaku, Takuya Kawamura, Shoko Kikkawa, Kiyofumi Inamoto, Hirokazu Tsukamoto, Yoshinori Kondo, Hidetaka Torigoe, Itaru Okamoto, Akira Ono, Eugene H. Morita*, and Yoshiyuki Tanaka* Hg²⁺-trapping Beads: Hg²⁺-specific Recognition through Thymine-Hg(II)-Thymine Base Pairing. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 62, 709-712 (2014). (審査有)
- (12) Mituhiro Kuriyama, Yoshinori Kondo, and Yoshiyuki Tanaka* Pseudoknot interaction-mediated activation of type I hammerhead ribozyme: A new class of gene-therapeutic agents. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 33, 466-480 (2014). (審査有)
- (13) Jakub Šebera, Lukáš Trantírek, Yoshiyuki Tanaka, Radim Nencka, Jiří Fukal, Vladimír Sychrovský*, The activation of N-glycosidic bond cleavage operated by base-excision repair enzyme hOGG1; theoretical study of the role of Lys 249 residue in activation of G, OxoG and FapyG. *RSC Advances*, 4, 44043-44051 (2014). (審査有)
- (14) Takenori Dairaku,[#] Kyoko Furuita,[#] Hajime Sato,[#] Jakub Šebera,[#] Daichi Yamanaka, Hiroyuki Otaki, Shoko Kikkawa, Yoshinori Kondo, Ritsuko Katahira, F. Matthias Bickelhaupt, Céilia Fonseca Guerra, Akira Ono, Vladimír Sychrovský*, Chojiro Kojima*, and Yoshiyuki Tanaka*, Direct Detection of

the Mercury–Nitrogen Bond in the Thymine–Hg^{II}–Thymine Base-pair with ¹⁹⁹Hg NMR Spectroscopy. *Chemical Communications*, 51, 8488-8491 (2015). (審査有)

- (15) Takenori Dairaku, Kyoko Furuita, Hajime Sato, Yoshinori Kondo, Chojiro Kojima, Akira Ono and Yoshiyuki Tanaka,* Exploring a DNA sequence for the three-dimensional structure determination of a silver(I)-mediated C-C base pair in a DNA duplex by ¹H NMR spectroscopy. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 34, 877-900 (2015). (審査有)
- (16) Jiro Kondo*, Yoshinari Tada, Takenori Dairaku, Hisao Saneyoshi, Itaru Okamoto, Yoshiyuki Tanaka, Akira Ono, High-resolution crystal structure of Ag^I-RNA hybrid duplex containing Watson-Crick-like C-Ag^I-C metallo-base pairs. *Angewandte Chemie International Edition*, 54, 13323-13326 (2015). (審査有)
- (17) Yoshiyuki Tanaka,* Jiro Kondo, Vladimír Sychrovský, Jakub Šebera, Takenori Dairaku, Hisao Saneyoshi, Hidehito Urata, Hidetaka Torigoe and Akira Ono,* Structures, physicochemical properties, and applications of T–Hg^{II}–T, C–Ag^I–C, and other metallo-base-pairs. *Chemical Communications*, 51, 17343-17360 (2015). (審査有)
- (18) Martin Dračinský, Michal Šála, Blanka Klepetářová, Jakub Šebera, Jirí Fukal, Veronika Holečková, Yoshiyuki Tanaka, Radim Nencka, and Vladimír Sychrovský,* Benchmark Theoretical and Experimental Study on ¹⁵N NMR Shifts of Oxidatively Damaged Guanine, *The Journal of Physical Chemistry B*, 120, 915-925 (2016). (審査有)

その他審査付き論文 2 件

〔学会発表〕 (計 8/21 件)

- (1) 田中好幸, 他 4 名, 小胞体ストレスセンサー Ire1p により細胞質スプライシングを受ける HAC1 mRNA の構造解析, 第 39 回 生体分子科学討論会 (口頭発表), 2012 年 6 月 9 日, 仙台
- (2) 田中好幸, 他 4 名, 高分子量機能性 RNA の局所構造・状態解析のため部位特異的標識法, 第 51 回 NMR 討論会 (口頭発表), 2012 年 11 月 10 日, 名古屋
- (3) 田中好幸, 他 6 名, Site-specific labeling techniques of RNA molecules for structural and mechanistic studies with NMR spectroscopy, 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際会議・口頭発表), 2012 年 11 月

17 日, 名古屋

- (4) 田中好幸, 化学シフト値・結合定数 *J* (金属錯体の配位化学・構造化学) (講習会講師), 日本分光学会 NMR 部会 2013 年 NMR 講習会, 2013 年 10 月 16 日, 名古屋
- (5) 田中好幸, 児嶋長次郎, 小野晶, 他 10 名, 水銀イオンの T-T ミスマッチ塩基対に対する親和性の構造化学的要因 (口頭発表), 第 39 回 生体分子科学討論会, 2013 年 6 月 7-8 日, 大阪
- (6) 田中好幸, 児嶋長次郎, 小野晶, 他 9 名, Structure of Ag(I)-mediated C-C base pair determined by hetero-nuclear NMR spectroscopy (国際会議・口頭発表), 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2013 年 11 月 13-15 日, 横浜
- (7) 田中好幸, NMR spectroscopic studies on metallo-base-pair in DNA duplex, (国際会議・招待講演), 12th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC-12), 2014 年 8 月 24~28 日, チューリッヒ (スイス)
- (8) 田中好幸, 多核 NMR 分光法による機能性核酸分子の局所観測および *J* 値・化学シフト値による状態解析, (研究会講師), 第 15 回若手 NMR 研究会, 2014 年 7 月 12 日, 千葉県長生郡長柄町
その他 13 件

〔図書〕 (計 1 件)

- (1) Hidetaka Torigoe*, Yoshiyuki Tanaka, Akira Ono, Mercury and DNA, In Robert H. Kretsinger, Vladimir N. Uversky, Eugene A. Permyakov Eds., "Encyclopedia of Metalloproteins", pp. 1324-1332, Springer, New York (2013).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 好幸 (TANAKA, Yoshiyuki)
徳島文理大学・薬学部・教授
研究者番号：70333797

(2) 研究分担者

児嶋 長次郎 (KOJIMA, Chojiro)
横浜国立大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：50333563

(3) 連携研究者

朽尾 豪人 (TOCHIO, Hidehito)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：70336593

小野 晶 (ONO, Akira)
神奈川大学・工学部・教授
研究者番号：10183253