

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：34506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750167

研究課題名(和文) 新生RNAの合理的な構造遷移速度制御に基づく細胞内におけるRNAスイッチの機能化

研究課題名(英文) Functionalization of RNA conformational switch focusing on co-transcriptional transition of nascent RNA structure

研究代表者

遠藤 玉樹 (ENDO, Tamaki)

甲南大学・先端生命工学研究所・講師

研究者番号：90550236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新生RNAの準安定構造から最安定構造への構造推移速度を調節することにより、RNA構造スイッチとして効率的に機能化させることを目的に研究を行った。バイオセンサーへの応用を念頭に、特定の低分子化合物に応答するRNA構造スイッチを設計した。構築したRNAを転写伸長反応と共役させることにより、標的分子を濃度依存的に検出することに成功した。また、遺伝子発現の調節を念頭に、準安定な二次構造から最安定な四重鎖構造への構造遷移速度が異なるRNA配列を設計した。これらの配列を有するレポーター遺伝子を細胞内で発現させることにより、構造遷移速度の違いによる遺伝子発現調節が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we functionalized RNA conformational switch for constructing biosensors and gene regulation systems by focusing on metastable RNA structure, which is formed by co-transcriptional folding during transcription. We selected RNAs, which show conformational transition in response to neomycin, from a library consists of neomycin aptamer and TAR-RNA connected by random nucleotides sequence. Then, based on a secondary structure of the selected RNA, we rationally designed RNA conformational switch that responds to thiamine pyrophosphate (TPP). The RNA enabled detection of TPP during transcription through co-transcriptional transition of nascent RNA structure. We also designed RNAs, which transition its structure from metastable secondary structure formed by co-transcriptional folding to most stable quadruplex structure. Intracellular gene expression depended on the rate of the conformation transition.

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：転写共役構造形成 RNA 構造変化 リボスイッチ 準安定構造 最安定構造 低分子リガンド

1. 研究開始当初の背景

生命分子が有する高次な機能特性を活用し、合理的な設計に基づく高機能なナノバイオマテリアルを構築する研究領域が発展している。このような研究領域において RNA は、1. 幅広い分子種への特異的な相互作用を示す、2. 化学反応の触媒としても機能する、3. 配列変異により機能特性を改変し易い、などの面からその有用性が注目されている。また、RNA は、細胞内において DNA からの転写により継続的に産生することが可能であるため、細胞内で機能するナノバイオマテリアルへの応用が期待される。

RNA を利用したナノバイオマテリアルとして、分子認識に伴う RNA の構造変化を利用したものが多く開発されてきている。特に、RNA とタンパク質とのアロステリックな相互作用を利用したバイオセンサーの開発では、標的核酸もしくは標的分子との結合による RNA の構造変化を起点とし、タンパク質の結合を介したシグナル放出機能が制御されている。一方で、リボザイムとアプタマーとをモジュール的に組み合わせたアロステリックリボザイムなども開発され、バイオセンサーや遺伝子発現制御などへの応用が検討されている。アロステリックリボザイムでは、アプタマー領域への分子の結合が RNA の構造変化を誘起し、リボザイム領域の活性が制御される。つまり、RNA の構造変化はナノバイオマテリアルの機能調節の作用点となり得る。しかしながら、*in vitro* では RNA 構造変化を利用した機能性分子の創出が数多く報告されているのに対し、細胞内における応用例は限定的である。その理由として、細胞内環境で機能する RNA の構造スイッチを、効率的に設計・構築するための指針が不足しているためであると考えられる。

これまで、RNA の構造変化を利用した機能性分子は、ほとんどが RNA の最安定構造に焦点が当てられて設計が進められてきた。つまり、分子間相互作用や環境の変化により最安定となる RNA 構造を変化させ、RNA の構造遷移を介してアウトプット機能の調節につなげるような設計となっていた。しかしながら、細胞内では、RNA の転写は 5'末端から順に反応が進行し、転写後の新生 RNA は co-transcriptional folding という形で構造形成が進む。そのため、転写途中に速度論的に有利な準安定構造が形成された場合、設計した RNA の構造スイッチは、最安定構造を形成する前に分解されてしまい、設計通りの機能を果たすことができないことも考えられる。つまり、これまでの熱安定性に焦点を当てた設計ではなく、転写反応に伴う RNA の co-transcriptional folding に着目し、速度論的に有利な RNA 構造に焦点を当てることで、細胞内で効率良く機能する RNA の構造スイッチを構築できるのではないかと期待される。

2. 研究の目的

本研究では、新生 RNA の速度論的に有利な準安定構造に着目し、この準安定構造から最安定構造への構造推移の速度を調節する。さらには、機能性 RNA の構造遷移速度を制御することにより、特定のリガンドを検出するためのバイオセンサーの構築や、細胞内における遺伝子発現調節を試みる。

3. 研究の方法

(1) RNA 構造スイッチの獲得

特定の分子に应答して構造変化を起こす RNA を構築するために、抗生物質の一種であるネオマイシンに結合する RNA アプタマー (neo-ap) を 5'側に配置し、ウイルス由来の Tat ペプチドに結合する TAR-RNA を 3'側に配置した RNA を設計した。neo-ap と TAR-RNA との間には 15 塩基分のランダムな塩基配列を挿入し、RNA ライブラリを構築した。そして、我々が以前に確立した手法により、ネオマイシン存在下でのみ Tat ペプチドと結合する RNA をセレクションした。具体的には、まず、ネオマイシン非存在下において Tat ペプチドと結合してしまう RNA を、Tat ペプチドを固定化した磁性ビーズに結合させて取り除いた (ネガティブセレクション)。次に、残った RNA にネオマイシンを添加し、ネオマイシン存在下でのみ Tat ペプチドに結合する RNA を、Tat ペプチドを固定化した磁性ビーズで回収した (ポジティブセレクション)。この過程を繰り返すことにより、ネオマイシンに应答して RNA 構造変化を示し、Tat ペプチドに結合する RNA 構造スイッチを獲得した (図 1)。さらに、得られた RNA 配列の塩基配列を解析し、RNA 構造スイッチとして機能する RNA の二次構造予測を行った。

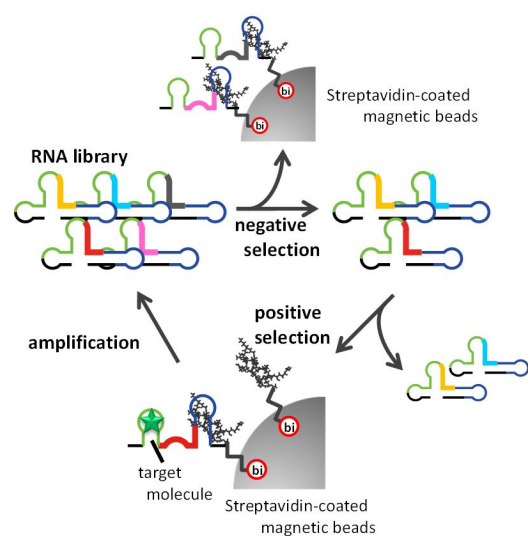


図 1 RNA 構造スイッチのセレクション過程
ネガティブセレクションとポジティブセレクションを繰り返すことで、特定の分子に应答して Tat ペプチドに結合する RNA を濃縮する。

(2) co-transcriptional folding を利用した RNA 構造スイッチの制御

(1)で獲得したネオマイシンに应答する RNA 構造スイッチの二次構造を基に、その他の分子にも应答する RNA 構造スイッチを構築した。

RNA 構造スイッチの設計

天然のリボスイッチに由来する RNA 配列を利用し、チアミンピロリン酸 (TPP) に結合するアプタマー (TPP-ap) を 5' 側、TAR-RNA を 3' 側に配置した RNA (TPP-TAR) を設計した (図 2a)。この RNA は、TPP-ap の 3' 側領域と TAR-RNA の 5' 側領域が安定な二次構造を形成するように設計してある。そのため、TPP 非存在下で RNA が転写された場合、co-transcriptional folding により RNA 二次構造が形成され、下流に転写されてくる TAR-RNA が正しく構造を形成されないと予測される (図 2b、上)。一方で、TPP 存在下で RNA が転写された場合には、5' 側で最初に転写される TPP-ap が co-transcriptional に TPP と結合し、その構造が安定化される。その結果、下流の RNA 二次構造の形成が阻害され、さらに下流に存在する TAR-RNA が正しく構造を形成する (図 2b、下)。つまり、co-transcriptional folding を利用した TPP 应答型の RNA 構造スイッチとして機能すると予測される。

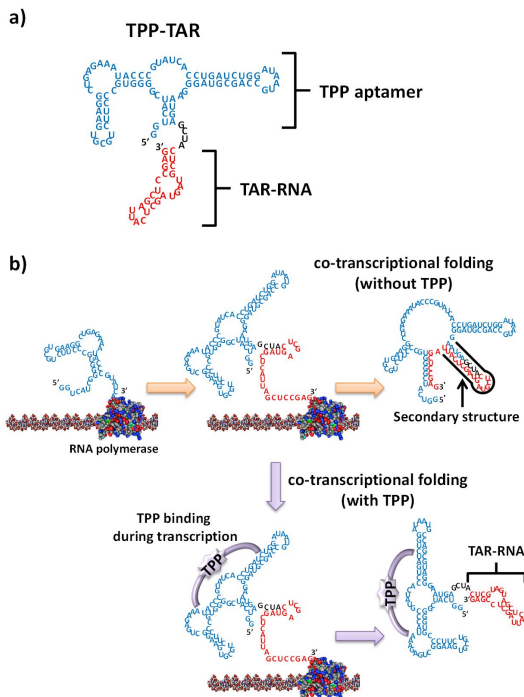


図 2 co-transcriptional folding を利用した RNA 構造スイッチ

a) 設計した TPP-TAR の塩基配列。 b) 転写反応途中に新生 RNA と TPP が結合することで、転写後の RNA 構造が変化する。

RNA 構造スイッチの評価

co-transcriptional folding によって形成される TPP-TAR の構造を、TPP の結合によって制御することができるかどうかを確認

した。T7 プロモーター配列の下流に TPP-TAR の配列を有する DNA テンプレートを作製し、TPP の非存在下、および存在下に転写反応を行った。転写反応溶液中に、TAR-RNA に結合して蛍光シグナルを変化させる TAMRA 標識された Tat ペプチド (TMR-Tat) を混合し、転写反応に伴う経時的な蛍光シグナル変化を検出した。比較として、転写後に精製した TPP-TAR を用いて、TPP 存在下での RNA 構造変化も評価した。

(3) co-transcriptional folding を利用した細胞内遺伝子発現調節

転写後 RNA の準安定な RNA 二次構造から最安定な四重鎖構造への構造遷移速度に着目し、細胞内での遺伝子発現調節を試みた。

RNA 四重鎖構造スイッチの設計

我々は以前に、大腸菌の mRNA 配列を探索し、5 つの遺伝子において mRNA の翻訳領域中に四重鎖構造を形成しうる配列があることを見出した。また、これらの配列が四重鎖構造を形成すると、翻訳伸長反応が停滞することを *in vitro* 実験で明らかにしている。その中でも、EutE の遺伝子に由来する配列は、四重鎖構造を形成しうるグアニンに富んだ配列の 5' 側に、二次構造を形成し得る配列が重なっている (図 3a、wild type)。そのため、転写反応直後には二次構造が優先的に形成され、その後、時間経過と共に四重鎖構造へと遷移していくことが予測される (図 3b)。そこで、翻訳されるアミノ酸の配列は変えずに、二次構造に存在する塩基対が崩れるような変異配列を設計した (図 3a)。変異により二次構造が不安定化した配列では、転写反応後の四重鎖構造への遷移速度が速くなり、細胞内での遺伝子発現に対する影響が大きくなると予測される。

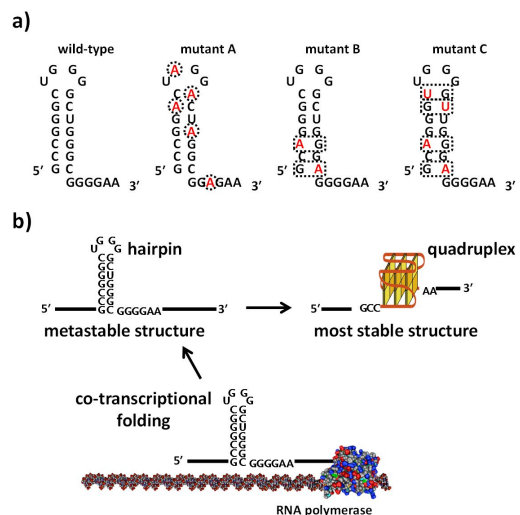


図 3 co-transcriptional folding による二次構造から四重鎖構造への構造遷移

a) 本研究で使用した EutE mRNA 由来の四重鎖構造形成配列、およびその変異配列。 b) 転写反応の進行に伴う準安定な RNA 二次構造から最安定な四重鎖構造への構造遷移の概念図。

co-transcriptional folding による準安定な二次構造形成の確認

EutE の遺伝子に由来する配列、およびその変異配列が、転写反応後に準安定な二次構造から四重鎖構造への構造遷移を示すのかどうかを検討した。EutE の遺伝子に由来する配列、およびその変異配列を翻訳領域中に挿入し、その下流に Renilla Luciferase をコードしたレポーター遺伝子を作製した。そして、*in vitro* にて転写反応を行った。転写反応終了後に、四重鎖構造に対する蛍光プローブとして働く N-methyl mesoporphyrin (NMM)を混合し、その蛍光シグナルから四重鎖構造が形成されているかどうかの確認を行った。

細胞内での遺伝子発現調節

にて作製したレポーター遺伝子を有するプラスミドを構築した。作製したプラスミドを細胞内に導入し、遺伝子発現への影響を評価した。

4. 研究成果

(1)ネオマイシンに反応する RNA 構造スイッチ

図 1 に示すセレクションを行い、ネオマイシンに反応して Tat ペプチドに結合するようになった RNA の塩基配列を解析した。その結果、元々ランダムであった配列領域に、特徴的な塩基配列が濃縮されていることが確認された。得られた RNA の典型的な配列の二次構造予測を行うと、濃縮されてきた塩基配列と TAR-RNA の配列の一部が安定な塩基対を形成することで、天然の TAR-RNA 構造が形成されないことが分かった。また、最安定な二次構造と、同じ RNA の配列が neo-ap と TAR-RNA の双方の構造を形成した二次構造の熱安定性の差 ($\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$) は、7.9 kcal mol⁻¹ となることが予測された。つまり、ネオマイシンが存在しない時には最安定構造が有意に安定であり、TAR-RNA 領域が Tat ペプチドと結合できない状態となっている。一方で、ネオマイシンの存在下では、neo-ap 領域とネオマイシンとの相互作用エネルギーが RNA 構造変化を誘起し、TAR-RNA 領域と Tat ペプチドとの結合親和性が增大すると考えられる (図 4)。

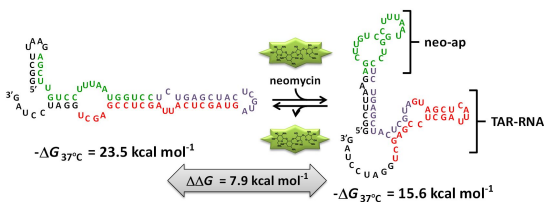


図 4 ネオマイシン応答型の RNA 構造スイッチ。ネオマイシンと neo-ap との相互作用エネルギーが RNA 構造変化を誘起し、TAR-RNA の構造が形成される。

(2) co-transcriptional folding を利用した TPP の検出

ネオマイシンに反応する RNA 構造スイッチの二次構造を基に、図 2a に示す TPP-TAR を設計した。ここでは、転写反応後に TPP-TAR と TPP とが結合して RNA 構造が変化してしまわないように、最安定構造と、TPP-ap および TAR-RNA の双方が形成された構造との $\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$ を 14.3 kcal mol⁻¹ とした。特に、TPP-ap と TAR-RNA との間に安定な二次構造が形成されるように設計し、転写反応後の二次構造の解離が起こらないようにした。

まず、転写反応後に精製した TPP-TAR を用いて、TPP に反応した RNA の構造変化が起こるかどうかを確認した。ネオマイシン存在下で TPP-TAR と TMR-Tat を混合し、その後の蛍光シグナル変化を 25°C で経時的に検出した。その結果、1 時間以上たっても蛍光シグナルに変化は見られなかった (図 5a)。このことは、TPP-TAR の最安定構造が安定であり、25°C 一定の条件では RNA 構造変化が起こらないことを示している。

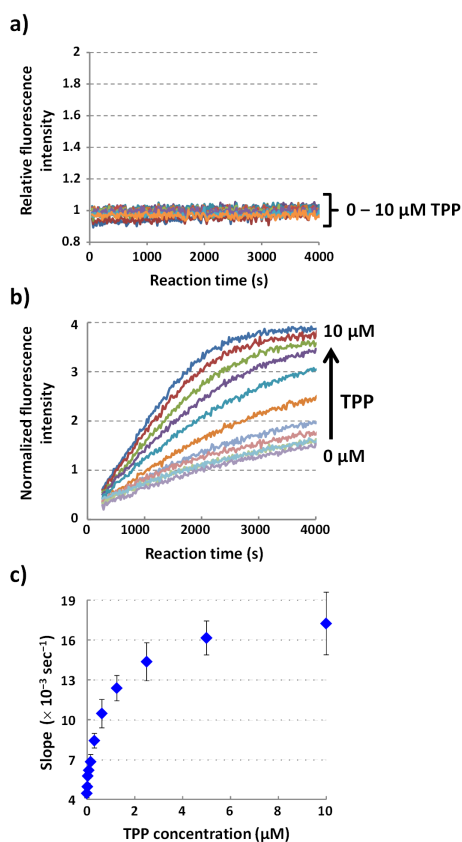


図 5 co-transcriptional folding を利用した TPP の蛍光検出

a, b) 転写後に精製した TPP-TAR (a)、もしくは転写伸長反応途中の TPP-TAR (b) と TPP との相互作用による RNA 構造変化を、RNA の構造変化後に形成される TAR-RNA に結合する TMR-Tat の蛍光シグナル変化から評価した。c) 転写伸長反応と共に得られる蛍光シグナル変化(b)での 200–1000 秒における傾きを TPP の濃度に対してプロットした。

そこで次に、co-transcriptional folding により、TPP に応答した RNA 構造変化が起こるかどうかを確認した。TPP および TMR-Tat 存在下で TPP-TAR の転写反応を開始し、25°C における経時的な蛍光シグナル変化を検出した。その結果、TPP の濃度に依存して経時的な蛍光シグナルの上昇度合いが大きくなることが確認された (図 5b)。つまり、転写されてきた TPP-ap 領域と TPP とが co-transcriptional に結合することで TPP-ap の構造が安定化され、予想通り、下流の TAR-RNA の構造も co-transcriptional folding により形成されたと考えられる (図 2b、下)。この結果は、転写後の RNA では起こらなかった RNA の構造スイッチを、転写反応と共役させることで機能化させることができたことを示している。また、転写反応初期段階における蛍光シグナル上昇の傾きを TPP 濃度に対してプロットすると、50 nM の TPP でも有意な傾きの変化を確認することができた (図 5c)。つまり、co-transcriptional folding に基づいた RNA の構造スイッチを、本研究の目的の 1 つである特定分子を検出するためのバイオセンサーに活かすことに成功した。

(3) 四重鎖構造の形成速度変化による細胞内遺伝子発現調節

図 3 で設計した変異配列を有するレポーター遺伝子を *in vitro* で転写し、転写後の mRNA が RNA 四重鎖構造を形成しているかどうかを NMM の蛍光シグナルで評価した (図 6a)。その結果、wild type の配列、および四重鎖構造を形成しないように 4 カ所のグアニン塩基に変異を加えた mutant-A の配列を有する mRNA では、mRNA を含まないサンプルと同程度の蛍光シグナルであった。一方で、co-transcriptional folding によって形成されると予測される二次構造を不安定化するように変異を加えた mutant-B、および mutant-C の配列を含む mRNA では、有意に強い蛍光シグナルが確認された。つまり、wild-type の mRNA は、転写反応後には四重鎖構造を形成していないことが確認された。そこで、転写された mRNA を一度 70°C まで加温してリフォールディングを行い、その後 NMM と混合して蛍光シグナルを評価した (図 6b)。その結果、リフォールディングした mRNA では NMM の蛍光シグナルが有意に上昇した。このことは、wild type の塩基配列の場合、co-transcriptional folding によって形成される準安定な RNA 二次構造が、最安定な四重鎖構造の形成を抑制していることを示している。さらに、転写反応溶液に NMM を混合し、反応時間の経過に伴う蛍光シグナルの増大を評価した結果、二次構造の不安定化度合いが高いほど蛍光シグナルの上昇速度が速いことが確認され、準安定な二次構造から最安定な四重鎖構造への構造遷移速度を調節できることも見出している。

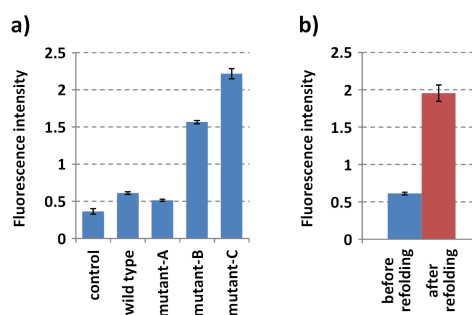


図 6 co-transcriptional folding による RNA 四重鎖構造の形成

a) 転写後の mRNA と NMM を混合し、蛍光シグナルから四重鎖構造の形成を確認した。b) リフォールディング前後における wild-type の mRNA を NMM と混合し、四重鎖構造の形成を確認した。

塩基配列に変異を加えることで、準安定な二次構造から最安定な四重鎖構造への構造遷移速度を調節できることが示されたため、細胞内における遺伝子発現への影響を評価した。細胞内にレポーター遺伝子を含むプラスミドを導入し、遺伝子発現量を評価した。この時、レポータータンパク質である Renilla Luciferase の相対発現量を、mRNA の相対転写量で補正することで、四重鎖構造形成による翻訳反応への影響のみを評価した。その結果、四重鎖構造を形成できない mutant-A、最安定構造としては四重鎖構造を形成するが構造遷移速度は遅い wild type、四重鎖構造への構造遷移速度が 2 番目に早い mutant-B、四重鎖構造への構造遷移速度が最も早い mutant-C の順で、翻訳反応の抑制効果が強くなっていくことが示された。mRNA が転写され、転写後に形成される準安定な二次構造から最安定な四重鎖構造へ遷移するまでの速度が、細胞内での翻訳反応に対して大きな影響を及ぼしていると考えられる。このことは、co-transcriptional folding により形成される準安定な RNA 二次構造の安定性を調節することにより、細胞内における四重鎖構造の形成を介した翻訳反応への影響を変化させることができることを示している。つまり、本研究の目的の 1 つである、co-transcriptional folding による mRNA の構造形成を細胞内での遺伝子発現調節の一例を示すことができた。

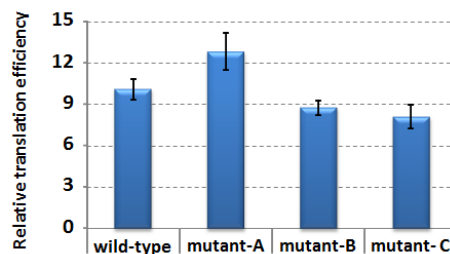


図 7 四重鎖構造による翻訳反応効率への影響。タンパク質発現量を細胞内 mRNA 量で補正した相対値を翻訳効率として示す。

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 8件)

T. Endoh and N. Sugimoto, Aptamer-based universal fluorometric sensors based on allosteric modulation of RNA-peptide interactions, **ChemMedChem**, in press (2014), 査読有

T. Endoh and N. Sugimoto, Unusual -1 ribosomal frameshift caused by stable RNA G-quadruplex in open reading frame, **Anal. Chem.**, **85**, 11435-11439 (2013), 査読有

doi: 10.1021/ac402497x

T. Endoh, Y. Kawasaki and N. Sugimoto, Translational halt during elongation caused by G-quadruplex formed by mRNA, **Methods**, **64**, 73-78 (2013), 査読有

doi: 10.1016/j.ymeth.2013.05.026.

T. Endoh, Y. Kawasaki and N. Sugimoto, Stability of RNA quadruplex in open reading frame determines proteolysis of human estrogen receptor α , **Nucleic Acids Res.**, **41**, 6222-31 (2013), 査読有

doi: 10.1093/nar/gkt286

遠藤玉樹、杉本直己、[開発事例]「RNAとタンパク質で発光する分子センサーの開発」、工業材料(日刊工業新聞社), 61, 12, pp22-25 (2013)、査読無

T. Endoh, Y. Kawasaki and N. Sugimoto, Suppression of gene expression by G-quadruplexes in open reading frames depends on G-quadruplex stability, **Angew. Chem. Int. Ed.**, **52**, 5522-6 (2013), 査読有

doi: 10.1002/anie.201300058

T. Endoh and N. Sugimoto, Selection of RNAs for constructing "Lighting-UP" biomolecular switches in response to specific small molecules, **PLoS ONE**, **8**, e60222 (2013), 査読有

doi: 10.1371/journal.pone.0060222

V. Kumar, T. Endoh, K. Murakami, and N. Sugimoto, Dehydration from conserved stem regions is fundamental for ligand-dependent conformational transition of the adenine-specific riboswitch, **Chem. Commun.** **48**, 9693-95 (2012), 査読有

doi: 10.1039/c2cc34506d

[学会発表](計 5件)

遠藤玉樹、杉本直己、生命分子の挙動に及ぼす分子環境の効果(49) 転写途中に形成される準安定な RNA 二次構造に

よる RNA 四重鎖構造を介した翻訳抑制への影響、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 3 月、愛知県、名古屋

T. Endoh and N. Sugimoto, Regulation of ribosomal frameshift by RNA interacting ligand in cells, The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2013 年 11 月、神奈川県、横浜市

遠藤玉樹、杉本直己、新生 RNA の転写共役フォールディングを利用した RNA 構造スイッチの設計、第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、2013 年 9 月、愛知県、名古屋市

遠藤玉樹、川崎悠、杉本直己、翻訳領域中の RNA 四重鎖による翻訳伸長反応の抑制とタンパク質分解挙動への影響、第 15 回日本 RNA 学会年会、2013 年 7 月、愛媛県、松山市

遠藤玉樹、杉本直己、RNA の構造変化および熱安定性予測に基づく蛍光・発光リボスイッチの設計、第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、2012 年 9 月、北海道、札幌市

[図書](計 1件)

遠藤玉樹、杉本直己、化学同人、細胞内核酸化学 (CSJ カレントレビュー ここまで進んだバイオセンシング・イメージング 1 分子から細胞、脳まで) 2012 年、232 頁 (pp86-91)

6. 研究組織

(1)研究代表者

遠藤玉樹 (ENDO TAMAKI)

甲南大学・先端生命工学研究所・講師

研究者番号：90550236