

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650014

研究課題名(和文)環境に応じて酵素活性・アプター活性がスイッチングする自律的な機能性核酸の創製

研究課題名(英文)Development of intelligent ribozyme and aptamer whose activities switch on in response to environment

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

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): GGAGGAGGAGGAという配列からなるRNA(以下R12)の両端に、RNA酵素の二つのサブユニットを連結した。低いカリウムイオン濃度においては、R12は伸びた構造をとる為にサブユニットは離れ、酵素活性は無かった。生理的なカリウムイオン濃度においては、R12は4重鎖構造を形成してコンパクトになり、サブユニットは近接して酵素活性が生じた。RNA酵素に対する相補鎖を導入する事で、オフとオンの差を格段に大きくする事に成功した。細胞への応用を見据え、核酸をヒト細胞に導入し、核酸由来のNMRシグナルを直接観測する事を試みた。その結果、ヒト細胞中の核酸のシグナルを観測する事に世界で初めて成功した。

研究成果の概要(英文): Two subunits of ribozyme were joined to each end of rGGAGGAGGAGGA(R12). Under low potassium conditions, R12 takes on an extended structure and thus two subunits are located separately, resulting in no enzymatic activity. Under physiological potassium concentrations, R12 forms a compact quadruplex and thus two subunits are closely located, resulting in exertion of the enzymatic activity. By introducing the complementary strand to ribozyme, the ratio of the activity with/without potassium ions was drastically improved. We also succeeded to directly observe NMR signals of nucleic acids in human cells for the first time.

研究分野：構造生命科学

キーワード：RNA酵素 カリウムイオン In cell NMR 立体構造 4重鎖

### 1. 研究開始当初の背景

RNA 酵素は基質を切断する等の様々な酵素活性を有している。これらの活性は細胞内で発揮されれば有用であるが、細胞外で発揮されるとむしろ有害で副作用を引き起こしてしまう事がある。我々は R12 が、カリウムイオン濃度に感応してドラステックな構造変化を起こす事を世界で初めて見出した (Nucleic Acids Res., 2009)。またカリウムイオン濃度は、細胞内 (140 mM) と細胞外 (数 mM) とで大きく異なる事が知られている。そこで R12 の両端に RNA 酵素のサブユニットを連結した分子を創製すれば、R12 の大きな構造変化により、細胞外では活性がオフで副作用を引き起こさず、一方ひとたび細胞内に入れば活性がオンになり望まれる活性を発揮するのではないかと思いついた。

### 2. 研究の目的

カリウムイオン濃度に依存した R12 の大きな構造変化を活用する事で、カリウムイオン濃度を感知して、酵素活性がオフからオンに自律的にスイッチングする分子を創製する事を目的とした (図 1)。この際核酸酵素に対する相補鎖を導入する事で、オフとオンの活性の違いをできる限り大きくする事を試みる。

創製した分子の細胞への将来の応用を考え、核酸をヒト細胞に導入し、核酸由来の NMR シグナルを直接観測する事も試みる。

### 3. 研究の方法

GGAGGAGGAGGA という配列からなる RNA (以下 R12) の両端に、RNA 酵素の二つのサブユニットを連結した分子を創製した。この分子の酵素活性を、低カリウムイオン濃度条件下と生理的な濃度のカリウムイオン濃度条件下で測定した。また RNA 酵素に対する相補鎖の共存下において、同様な測定を行った。

また上記の分子の細胞への将来的な応用を見据えて、核酸をヒト細胞に導入し、その NMR シグナルを直接検出する事も試みた。

### 4. 研究成果

低カリウムイオン濃度条件下においては、R12 は伸びた構造をとる為、RNA 酵素の二つのサブユニットは離れ離れとなり、Tat 捕捉活性は発揮されなかった。一方生理的なカリウムイオン濃度条件下においては、R12 は 4 重鎖構造を形成してコンパクトになり、この結果 RNA 酵素の二つのサブユニットは近接して活性構造が再構築され、RNA 切断活性を発揮するようになる事が確認できた。即ち酵素活性が、カリウムイオンによってオフからオンにスイッチングされる分子を創製する事に成功した。

低カリウムイオン濃度条件下においても、サブユニットが部分的ないしは一時的に近接する為、活性構造が部分的ないしは一時的に構築され、酵素活性が完全にはゼロにならない事が分かった。そこで RNA 酵素に対する相補鎖を系に導入して、この活性構造が構築される事を阻害した。これにより、低カリウムイオン濃度における残存酵素活性を抑制する事ができた (図 2(a))。一方生理的なカリウムイオン濃度下における酵素活性の発現は、相補鎖を導入しても変化が無い事も確認できた (図 2(b))。よって相補鎖の導入によって、オフとオンの活性の違いを格段に大きくする事に成功した。

上記のシステムの細胞への将来の応用を考え、核酸をヒト細胞に導入し、核酸由来の NMR シグナルを直接観測する事を試みた。その結果、ヒト細胞中の核酸のシグナルを観測する事に世界で初めて成功した。得られた NMR シグナルを解析した結果、核酸の種類によっては、細胞中と試験管中とで異なる構造を形成する事が示唆された。また細胞内環境を模すのに PEG がよく用いられるが、NMR シグナルの解析から、PEG を加えただけでは、細胞内の環境を十分には再現できない事も分かった。

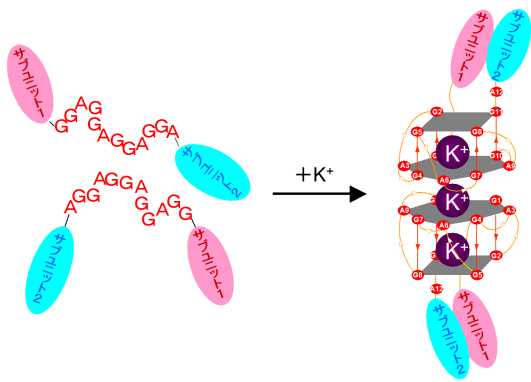
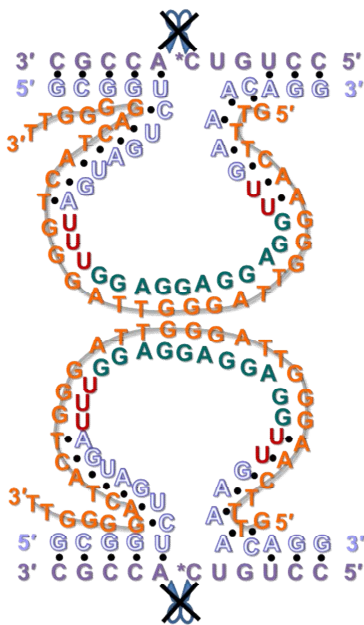


図 1 カリウムイオンに依存した GGAGGAGGAGGA(以下 R12)の大きな構造変化を利用した RNA 酵素の活性のスイッチングの概念図.

(左) カリウムイオン濃度が低い時には、R12 は伸びた 1 本鎖構造をとる。この為核酸 RNA 酵素のサブユニット 1 と 2 は離ればなれとなり、活性はオフとなる。(右)カリウムイオン濃度が高い時には、R12 はコンパクトな 4 重鎖構造を形成する。この為サブユニット 1 と 2 は近接して活性構造が再構築され、活性が復活してオンになる。

(a)



(b)

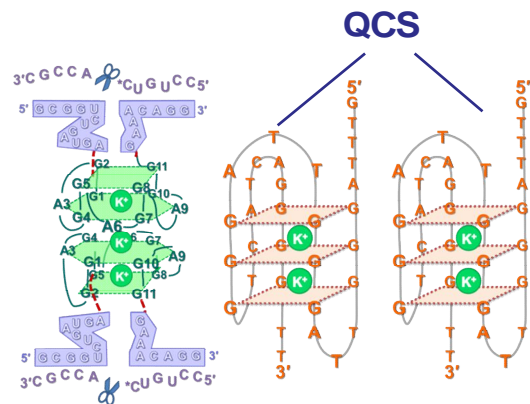


図 2 相補鎖を導入する事によるオン/オフのスイッチングの先鋭化. (a) 低カリウムイオン濃度においては、相補鎖が 2 重鎖を形成する為に活性構造の形成は生じず、残存活性は抑制される。(b)生理的なカリウムイオン濃度では、相補鎖は 4 重鎖を形成するので 2 重鎖は開裂し、これにより活性構造が形成され酵素活性を発揮する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yamaoki, Y., Nagata, T., Mashima, T. and Katahira, M. (2015) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 468, 27-31. "K<sup>+</sup>-responsive off-to-on switching of hammerhead ribozyme through dual G-quadruplex formation requiring no heating and cooling treatment" 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.173

Yamaoki, Y., Mashima, T., Nagata, T. and Katahira, M. (2015) *Chem. Commun.*, 51, 5898-5901. "Boosting of activity enhancement of K<sup>+</sup>-responsive quadruplex hammerhead ribozyme" 査読有 DOI: 10.1039/c5cc00961h

〔学会発表〕(計 5 件)

片平正人、Development of intelligent ribozyme/aptamer that sense K<sup>+</sup> and

switch on their activities、第53回日本生物物理学会年会、2015年09月13日~2015年09月15日、金沢大学(金沢市)

山置佑大, 真嶋司, 永田崇, 片平正人、カリウムイオンを認識して活性がスイッチングする Tat 結合 RNA アプタマーおよびハンマーヘッドリボザイムの創製、第9回バイオ関連化学シンポジウム、2015.9.10-12、熊本大(熊本)

Katahira, M., Real-time monitoring of enzymatic reaction and switching of ribozyme/aptamer activities through sensing of K+, The 6th Asia-Pacific NMR Symposium, 2015年08月13日~2015年08月16日, 香港(中国)

Katahira, M., Switching the activity of functional RNA in response to K+ and quantitative NMR, The 11th Japan-Korea Bilateral Symposium on Biological NMR, 2014年12月19日~2014年12月19日、大阪大学(吹田市)

山置佑大, 真嶋司, 永田崇, 片平正人, カリウムイオンを感知して自らの活性をスイッチングする Tat 捕捉アプタマーおよびリボザイムの創製, 第16回日本RNA学会年会, 2014.7-23-25, ウィンク愛知(名古屋市)

[その他]

ホームページ:

<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

### (2) 研究協力者

永田 崇(NAGATA Takashi)

京都大学・エネルギー理工学研究所・准教授

研究者番号: 10415250

真嶋 司(MASHIMA Tsukasa)

京都大学・エネルギー理工学研究所・助教  
研究者番号: 20707426

山置 佑大(YAMAOKI Yuudai)

京都大学・エネルギー理工学研究所・博士  
研究員

研究者番号: 00778095