

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26810089

研究課題名(和文) RNA/RNPナノ構造を利用した機能性分子ロボットの創製

研究課題名(英文) Functional molecular robot using RNA/RNP nanostructures

研究代表者

柴田 知範 (Shibata, Tomonori)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：80711960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、RNA-タンパク質相互作用を活用することにより、タンパク質に応答し、望みの機能を発現する機能性分子ロボットを作製した。RNAとタンパク質のみから構成される機能性分子ロボットは、細胞内でも作製することが可能であり、細胞内に発現するタンパク質に応答して細胞運命を制御できることが明らかとなった。特定の細胞でのみ働く分子ロボットの創製により、医療応用などの分野での活用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We designed and constructed RNA-protein complex-based functional molecular robots that exert desired functions in response to proteins. The functional molecular robots consisting of RNA and protein can be constructed within live cells. We demonstrated that mammalian cell fate can be controlled using functional molecular robots. Construction of a molecular robot that functions in a particular cell will be useful for medical applications.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：RNA タンパク質 核酸ナノテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

近年、生体分子の自己組織化を活用し、望みの機能と構造を有する分子デバイスの構築を目指す生体分子ロボティクス研究が注目を集めている。核酸ナノテクノロジーの進展により、生体分子を利用した機能性構造体の作製技術は、進展しているものの、環境変動に応答して構造変化を起こし、望みの機能を発現する分子ロボットの創製には、至っていない。望みの構造・機能をあわせ持つ分子ロボットの創製には、新たな分子デザインに基づいた生体分子ロボットの設計・構築が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、RNA-タンパク質相互作用によるダイナミックな構造変化に着目し、RNA-タンパク質複合体(RNP)形成による構造変化を望みの機能へと変換する RNP 複合体分子ロボットの作製を目指す。RNA とタンパク質から構成される分子ロボットは、生体外だけでなく生体内においても作製可能であり、特定の細胞中でのみ働く分子ロボットの創製により、医療応用をはじめとする多岐にわたる分野での活用が期待できる。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために以下の研究課題を設定した。

(1) RNA-タンパク質相互作用により、構造変化を引き起こす RNA/RNP ナノ構造の設計及び構築

RNA-タンパク質相互作用を活用し、タンパク質存在下において、大きく構造変化する RNA/RNP ナノ構造を設計し、構築する。RNA-タンパク質相互作用モチーフとして、タンパク質結合に伴い、RNA が 60° 曲がること知られている K-turn-L7Ae 相互作用モチーフを用い、分子モデリングを用いて目的とする RNA/RNP ナノ構造を設計する。

(2) FRET 測定及び AFM 測定による RNA/RNP ナノ構造変化の評価

設計した RNA/RNP ナノ構造の構造変化は、FRET 測定及び AFM 測定により評価する。設計した RNA ナノ構造の両末端に FRET ペアとなるドナーとアクセプターを導入した RNA を用い、タンパク質との相互作用による FRET シグナル変化を検出する。AFM 測定では、個々のナノ構造をカウントすることにより、タンパク質非存在下及び存在下におけるナノ構造の分布を調べる。

(3) 標的分子を捕捉する RNA/RNP ナノ構造の創製

(1), (2) で設計・構築した RNA/RNP ナノ構造を用いて小分子を捕捉する RNA/RNP ナノ構造の作製を行う。特定の分子を捕捉するために RNA アプタマーを用い、RNA ナノ構造とアプタマーを繋げることによりタンパク質結合による RNA の構造変化に応じてアプタマー活性が変化するナノ構造を設計・構築する。

(4) 細胞内で機能するタンパク質応答性 RNA ナノデバイスの構築

RNA-タンパク質相互作用により構造変化する RNA ナノ構造の細胞内での機能の評価する。細胞内 RNA-タンパク質相互作用を検出するために、構造変化により FRET シグナルが変化するナノ構造を作製し、標的タンパク質を発現する mRNA とナノ構造を細胞に導入し、RNA-タンパク質相互作用による FRET シグナル変化を検出する。

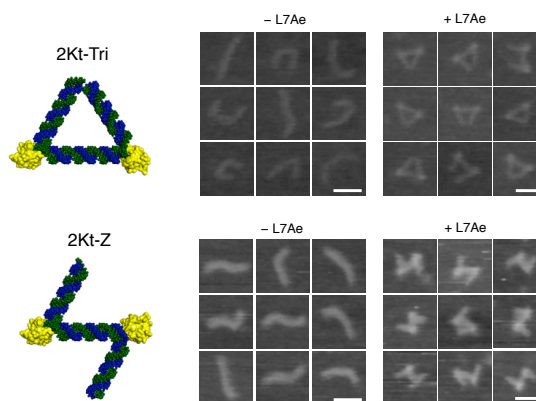
(5) タンパク質駆動型 RNA ナノデバイスによる細胞運命制御

RNA-タンパク質相互作用により、タンパク質の局在をコントロールし、細胞内シグナルを制御する。オリゴマー化により細胞死を誘導するタンパク質を RNA-タンパク質相互作用により RNA 上に集積させるために、タンパク質結合モチーフを多数有する RNA ナノ構造を設計・構築する。RNA 結合タンパク質に細胞死誘導タンパク質を融合させたタンパク質の mRNA を作製し、タンパク質結合モチーフを多数持つ RNA ナノ構造とともに細胞に導入することにより細胞死活性を評価する。

4. 研究成果

(1), (2) RNA-タンパク質相互作用により、構造変化を引き起こす RNA/RNP ナノ構造の構築

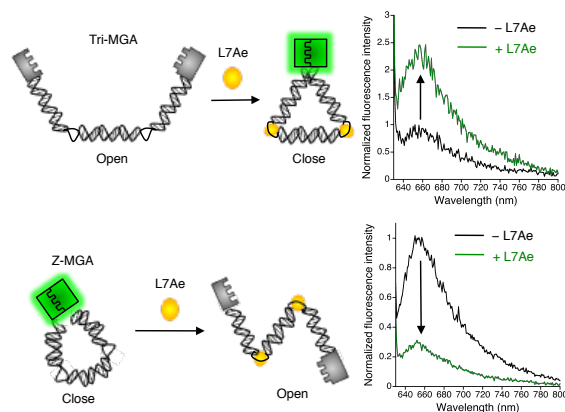
RNA-タンパク質相互作用により構造変化する RNA ナノ構造として、2つの K-turn モチーフを RNA 二重鎖で繋げた RNA ナノ構造を設計した。RNA 二重鎖の塩基数を変えることにタンパク質結合時に三角形(2Kt-Tri)及び Z 型(2Kt-Z)の RNA ナノ構造を設計・構築した。RNA-タンパク質相互作用による RNA ナノ構造の構造変化を評価するために AFM 測定を行った。2Kt-Tri 及び 2Kt-Z の RNA ナノ構造は、タンパク質非存在下では、わずかに湾曲した棒状の構造であったが、タンパク質存在下においては、二つの L7Ae タンパク質が結合した設計した通りの三角形及び Z 型の RNP ナノ構造が観測された。



(3) 標的分子を捕捉する RNA/RNP ナノ構造の創製

タンパク質を検知することにより、標的分子を捕捉する RNA/RNP ナノ構造を構築するため

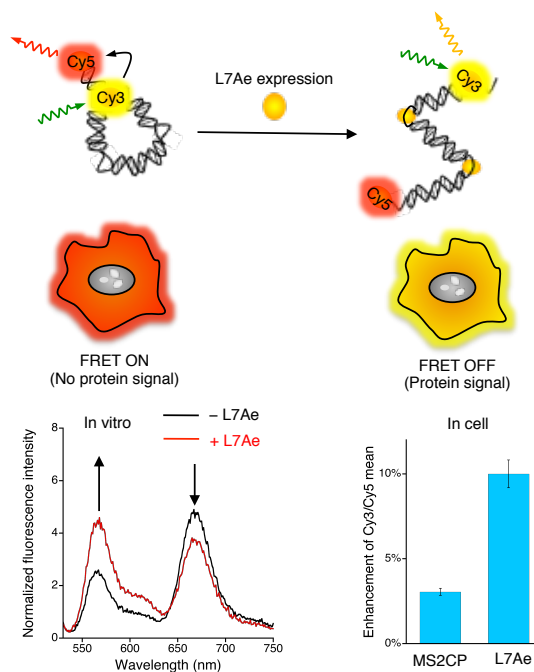
に、2Kt-Tri 及び 2Kt-Z にマラカイトグリーンアプタマー (MGA) を繋げた Tri-MGA 及び Tri-Z を作製した。Tri-MGA は、タンパク質非存在下においては、アプタマー活性を示さず、L7Ae タンパク質が結合するとアプタマー活性を示すように設計した。一方、Z-MGA は、タンパク質非存在下においては、アプタマー活性を示すが、タンパク質の結合に伴い、アプタマーの構造変化が起こり、失活するように設計した。マラカイトグリーン (MG) は、アプタマーに結合すると蛍光を発するため蛍光測定を行うことによりアプタマー活性を評価した。2Kt-Tri は、タンパク質の結合に伴い、MG の蛍光増加が観測された。一方、2Kt-Z においては、タンパク質の結合により顕著な蛍光減少が観測された。したがって、タンパク質を検知し、標的の小分子を捕捉、放出する RNA/RNP ナノ構造を開発することに成功した。



(4) 細胞内で機能するタンパク質応答性 RNA ナノデバイスの構築

細胞内でタンパク質を検知し、構造変化を引き起こす RNA/RNP ナノ構造を設計・構築した。細胞内での RNA-タンパク質相互作用による構造変化を検出するために、RNA ナノ構造の両末端に FRET ペアとなる 2 種類の蛍光色素として Cy3, Cy5 を導入した RNA ナノ構造を設計・構築した。具体的には、タンパク質非存在下においては、RNA は二重鎖形成により、FRET を引き起こす環状構造を取っているが、タンパク質の結合に伴い、RNA 二重鎖の解離が起こり、FRET が解消される。In vitro において RNA-タンパク質相互作用による構造変化にตอบสนองして FRET シグナルが変化するかどうかを調べたところ、タンパク質の結合に伴い、FRET シグナルが変化することが明らかとなった。次に、細胞内でのタンパク質にตอบสนองした構造変化を検出するために、RNA ナノ構造と RNA 結合タンパク質をコードする mRNA を細胞内に導入し、フローサイトメトリーによる解析を行ったところ、コントロール RNA 結合タンパク質 (MS2CP) 発現細胞よりも、L7Ae 発現細胞において FRET シグナルの変化が観測された。したがって細胞内のタンパク質にตอบสนองし、構造変化を引き起こす RNA/RNP

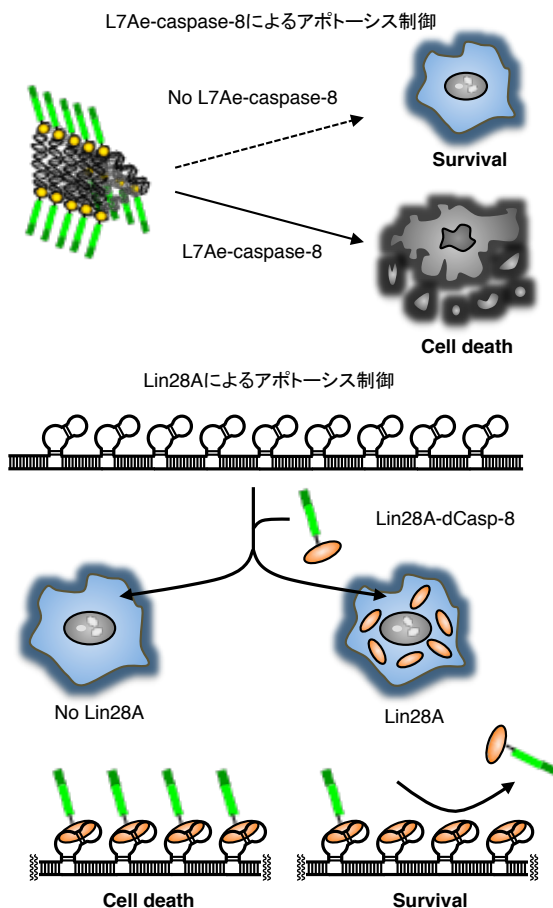
ナノ構造の構築に成功した。



(5) タンパク質駆動型 RNA ナノデバイスによる細胞運命制御

RNA/RNP ナノ構造を利用して、細胞運命制御可能な RNA ナノデバイスを創製するために、RNA-タンパク質相互作用によりアポトーシスを誘導する RNA/RNP ナノ構造を設計・構築し、RNP ナノ構造形成によるアポトーシス誘導を検討した。

RNA ナノ構造として、L7Ae タンパク質結合モチーフである K-turn モチーフを 14 個含む RNA ナノ構造を設計・作製した。RNA タンパク質相互作用によりアポトーシスを誘導するタンパク質として caspase-8 に L7Ae を融合させた L7Ae-caspase-8 を設計した。この RNA/RNP ナノ構造は、RNA ナノ構造と L7Ae-caspase-8 の RNP 複合体形成により、RNA ナノ構造上に多数の L7Ae-caspase-8 が集積することにより caspase-8 が活性化し、アポトーシス誘導が引き起こされる。RNA ナノ構造と L7Ae-caspase-8 をコードする mRNA を細胞内に導入することにより、タンパク質の RNA への結合にตอบสนองして細胞死が誘導されることが明らかとなった。また L7Ae とは異なるタンパク質として Lin28A にตอบสนองしてアポトーシスを制御する系を構築した。具体的には、Lin28A 結合モチーフを 9 個導入した RNA ナノ構造と Lin28A に caspase-8 を融合した Lin28A-caspase-8 を作製し、Lin28A の有無により、アポトーシス誘導制御が可能であるか検証した。Lin28A 存在下においては、Lin28A-caspase-8 と RNA ナノ構造の複合体形成が阻害されることにより細胞死が抑制されることが明らかとなった。したがって、RNA/RNP ナノ構造を利用して細胞内シグナルにตอบสนองした細胞運命制御を可能とする機能性分子ロボットを構築できることを実証した。



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 1 件)

(1) Tomonori Shibata, Yuki Suzuki, Hiroshi Sugiyama, Masayuki Endo, Hirohide Saito “Folding RNA-protein complex into designed nanostructures. *Methods Mol. Biol.* 2015, 1316, 169-179.

[学会発表] (計 4 件)

(1) Tomonori Shibata, Kenzo Fujimoto, Yuki Suzuki, Hiroshi Sugiyama, Masayuki Endo, Masahiro Takinoue, Hirohide Saito “Photo-regulation of RNA-protein-based nanostructures” Spetember 22-26, 2014 Kyoto University (Kyoto, JAPAN)

(2) Tomonori Shibata, Yuki Suzuki, Hiroshi Sugiyama, Masayuki Endo, Hirohide Saito “RNA-protein nanomachiines for controlling both RNA structures and functions” November 5-7, 2014 Kitakyushu International Conference Center (kitakyuushu, JAPAN)

(3) 柴田知範、鈴木勇輝、杉山弘、遠藤政幸、齊藤博英 「タンパク質応答性 RNA ナノマシン」 2015年7月15-17 ホテルライフオー ト札幌 (北海道札幌市)

(4) Tomonori Shibata, Yuki Suzuki, Hiroshi Sugiyama, Masayuki Endo, Hirohide

Saito “Synthetic RNA-protein nanomachines that function in vitro and in live cell” September 23-25, 2015 Egret Himeji (Himeji, JAPAN)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 知範 (SHIBATA, Tomonori)
大阪大学・産業科学研究所・特任助教
研究者番号：80711960

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()