

研究課題別評価書

1. 研究課題名

インテリジェント生物素子の創製

2. 氏名

片平 正人

3. 研究のねらい

本さがけ研究では、以下の(A)と(B)の二つの課題に当初より取り組んだ。

(A)イオン濃度に依存した核酸の大きな構造変化を利用して、核酸酵素のサブユニットの集合状態のスイッチングを行う。これにより自身が置かれた環境中の特定のイオン濃度を感知して、働くべき環境においてのみ活性がオンにスイッチングされる自律的な核酸酵素の創製を目指す。

(B)4重鎖構造を形成した核酸を膜に埋め込む事で、核酸性の人工のイオンチャンネルとして機能するかもしれないというアイデアの実効性を検証する。

また研究の進展に伴って、以下の(C)と(D)の2つの課題が浮上したので、それにも取り組んだ。

(C) NMR 法を用いてロングレンジの構造情報を抽出・利用する事によって、マルチドメインからなる生体分子の溶液中における立体構造を決定する方法論の開発を行う。

(D)酵素反応を NMR 試料管内において生じさせ、反応の進行を NMR シグナルを用いてリアルタイムでモニターする事を目指す。

4. 研究成果

(A)まわりのイオン環境を感知して動作する自律的な核酸酵素の創製

d(GGAGGAGGAGGA)(以下 d(GGA)₄)

という配列からなる DNA が、カリウムイオン非存在下では1本鎖状態で伸びた構造をとるが、カリウムイオン存在下では4重鎖構造を形成してコンパクトな構造を形成する事を見出した。

酵素を2つのサブユニットに分割し、各々を d(GGA)₄ の両端に連結したものを作成する。カリウムイオン非存在下では d(GGA)₄ が伸びた構造をとるので、2つのサブユニットは離れて存在し、酵素活性は生じない。一方カリウムイオン存在下では d(GGA)₄ がコンパクトな構造をとる為、2つのサブユニットは近接し、酵素活性が生じるのではないかと考えた(図1)。酵素としては、DNA

でありながら基質 RNA を切断する活性を有する分子であるデオキシリボザイムを用いた。デオキシリボザイムを2つのサブユニットに分ける分割点の選定及び d(GGA)₄ とサブユニットの間に挿入するリンカーの数について様々試した。その結果カリウムイオン非存在下では切断活性を有しないが、カリウムイオンを添加すると切断活性を生じる分子を創製する事ができた。即ちカリウムイオンを感知して酵素活性がスイッチングする核酸酵素の創製に成功した。

次に d(GGA)₄ の RNA 版である r(GGAGGAGGAGGA)(以下 r(GGA)₄)の構造を NMR 法によって決定した。r(GGA)₄ と d(GGA)₄ とでは構造に違いが見られたが、両者における糖の化学構造の違いに基づいてそれは合理的に理解できた。一方 d(GGA)₄ と同様に r(GGA)₄ の5'端と3'端は近接している事も分かったので、r(GGA)₄ もスイッチング素子として応用できると考えられた。そこで r(GGA)₄ の両端にリボザイム(RNA でありながら酵素活性を有する分子)の2つのサブユニットを連

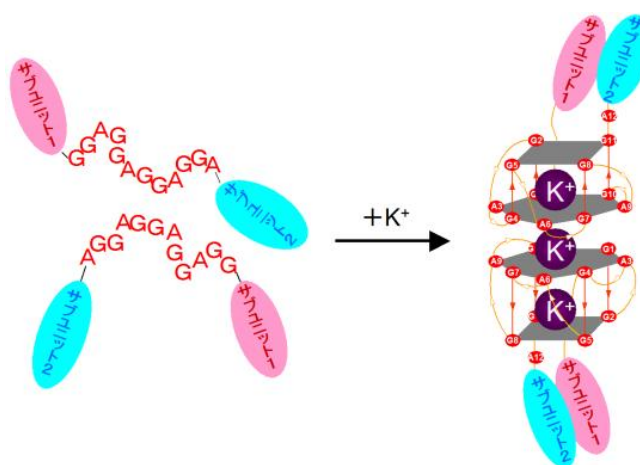


図1 活性のスイッチングの原理 (左:オフ, 右:オン)

結し、活性のスイッチングが生じるのかを検証した。その結果、カリウムイオン非存在下では RNA を切断する活性が弱い、カリウムイオン存在下では切断活性が強まる分子を創製する事ができた。即ち r(GGA)₄ をスイッチング素子とした酵素活性のスイッチングにも成功した。

細胞外におけるカリウムイオンの濃度は低く、一方細胞内におけるカリウムイオン濃度は高い。従って本法によって創製された分子は、細胞外においては無用な活性を発現せず、従って副作用を引き起こす事がなく、一方働くべき場である細胞内においては、必要とされる活性を発現すると期待される。働くべき環境を感知して活性を発現する自律的な分子の創製に向けた道筋が、本研究によって得られた。

(B)核酸性人工イオンチャネルの創製

4重鎖構造中においてイオンがトラップされている様子は、タンパク質性のイオンチャネルにおいてイオンがトラップされている様子と酷似している事に気づいた。そしてそれならば4重鎖核酸が、核酸性のイオンチャネルとして動作するのではないかと思いついた。リポソームに4重鎖核酸を組み込み、核酸を通じたイオンの流れの有無を以下の2つの方法によって検証した。()細胞に匹敵する大きさであるジャイアントリポソームを調製し、リポソーム内に特定のイオンとその蛍光指示薬を内封した。これを蛍光顕微鏡で時間を追って観察する事で、核酸を通じたイオンの流れの有無を検証した。()外液に比べてカリウムイオン濃度と pH が高い溶液を、蛍光性 pH 指示薬と共にリポソーム

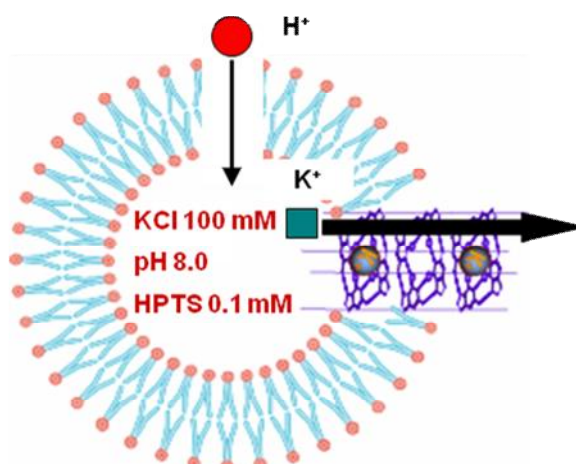


図2 核酸4重鎖がイオンチャネルとして動作するかの検証法

に内封する。ここにプロトンイオンを添加する。核酸を通じた内側から外側へのカリウムイオンの流出とそれに共役した外側から内側へのプロトンの流入が生じれば、内液の pH が低下すると予想される(図 2)。蛍光強度を時間を追って測定する事で、核酸を通じたイオンの流れの有無を検証した。()、()いずれの方法においても、核酸を通じたイオンの流れを示唆する結果が得られた。本研究によって、「核酸によってイオンチャネルを創製する」という独創的なアイデアの実現の可能性が実験的に示され、アイデアの実現に向けた基盤が得られた。

(C)ロングレンジの構造情報を用いたマルチドメインからなる生体分子の構造決定

自律的な核酸酵素を上記の方法によって創製する際、酵素をどの位置で2つのサブユニットに分割するのが問題となる。これまでは様々な位置で分割してそこにスイッチング素子を導入し、できた分子の活性を逐一調べながら試行錯誤で分割点を決定してきた。もし核酸酵素の立体構造に関する情報が得られれば、それに基づいて分割点を合理的に決定する事が可能となる。しかし核酸酵素は通常マルチドメインから成っている。NMR 法によるこれまでの構造決定においては、NOE から求められる上限 5 程度の距離情報が用いられるが、これでは各ドメインの相対配置を決める事はできず、よって核酸酵素の立体構造を決定する事は不可能であった。そこでマルチドメインの生体分子の溶液中における立体構造を決定する方法論の確立が必要となる。そこで2つのドメインからなる Musashi タンパク質とその標的 RNA の複合体をモデルケースとして、この様な方法論の確立を目指した。

S-S 結合を介してタンパク質中のシステイン残基と MTSL を結合して、NO ラジカルを導入した。ラジカル電子による常磁性緩和促進(PRE)に基づいて、上限 30 程度の距離情報が抽出できた。また複合体をポリアクリルアミドゲルによって弱く配向させ、残余双極子結合(RDC)を測定した。複合体中の NH ないしは CH ベクトルがある共通のフレーム(配向テンソル)に対してどの様な角度をなしているのかが、RDC から分かる。従ってこれも原理的にロングレンジの構造情報である。これ

らの情報に基づいて複合体の構造決定を行なった。その結果、十分な精度でマルチドメインからなる生体分子の立体構造を決定できる事が分かった(図 3)。

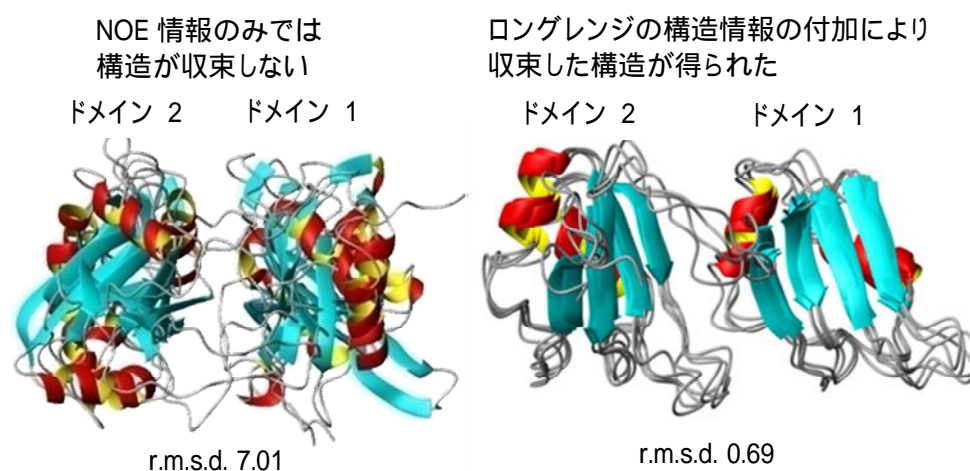


図 3 ロングレンジの構造情報を用いたマルチドメイン分子の構造決定

(D)NMR シグナルを用いた酵素反応のリアルタイムモニタリング

上述した核酸酵素の活性は、ポリアクリルアミド電気泳動等の生化学的手法によって、検出している。しかし空間分解能が十分ではなく、また複数の部位において反応が生じた場合、それを追跡する事が不可能である。そこで酵素反応を NMR 試料管内で生じさせ、それを NMR シグナルを用いてモニターする事を試みた。モデルケースとして、抗 HIV 活性を有する宿主タンパク質である APOBEC3G が標的 1 本鎖 DNA(HIV のマイナス鎖 DNA)の中のシチジンをデアミネーションしてウリジンに変換する酵素反応を取り上げた。

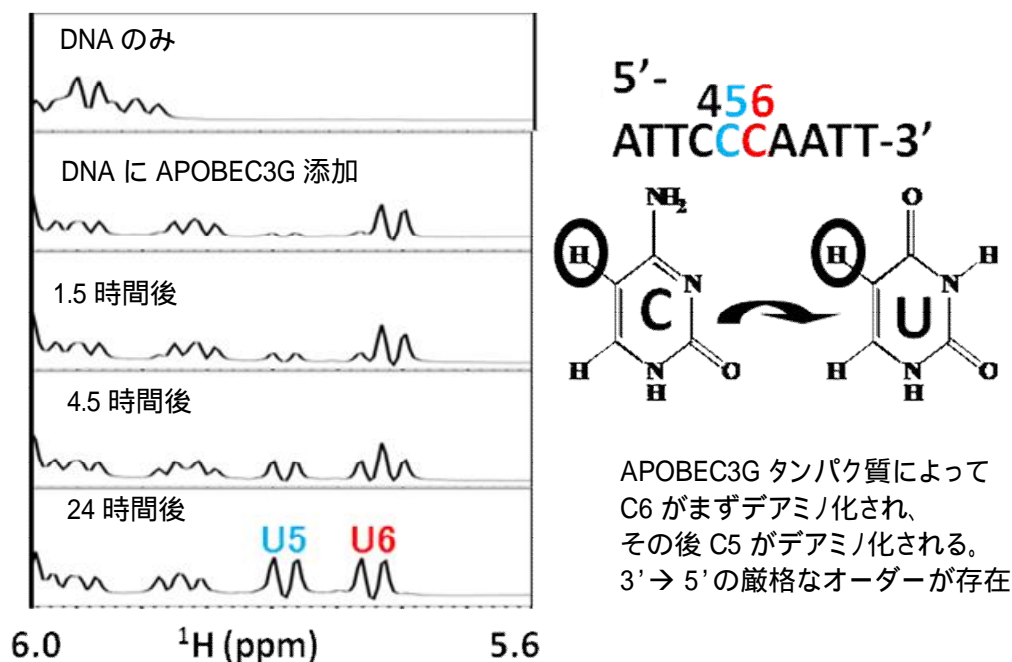


図 4 NMR シグナルを用いた酵素反応のリアルタイムモニタリング

ウリジン(及びシチジン)の 5 位の水素及び炭素のシグナルをモニターする事で、デアミネーション反応をリアルタイムでモニタリングできる事を見出した。APOBEC3G は、シチジンが複数個連続した配列を標的とする。シチジンが3つ連続している場合、3' 端に位置するシチジンが早い段階でデアミネーションされ、その後かなり遅れて中央に位置するシチジンがデアミネーションされる事が、今回分かった。5' 端に位置するシチジンは全くデアミネーションされない事も分かった。この様にデアミネーションは、3' 5' の厳密な順番をもって進行する事が分かった(図 4)。APOBEC3G は、DNA 上を 3' 5' の方向にスライディングしながらデアミネーション反応を行なう事が提唱されているが、今回得られた結果はこれと関係があると考えられる。本法は生化学的手法に比べて高い空間分解能を有する。また複数の部位における反応を同時に、しかもリアルタイムでモニターする事ができる。本法は APOBEC3G によるデアミネーション反応の解析はもとより、今後様々なタンパク質及び核酸酵素の酵素反応のメカニズムの解明に応用する事ができる。

5. 自己評価

研究の開始当初には、(A)と(B)の 2 つの課題の達成を目標とした。(A)に関しては、d(GGA)₁₂ と DNA 酵素の組み合わせ及び r(GGA)₁₂ と RNA 酵素の組み合わせにより、カリウムイオン濃度を感知して活性がスイッチングする分子を創製する事に成功し、目標を達成できた。(B)に関しては、核酸がイオンの運び手として機能することを示唆する結果を複数の独立した検出系から得、このアイデアの実効性を実験的に示す事に成功し、目標を達成できた。

また研究の進展に伴い(C)と(D)の 2 つの新たな課題が浮上しこれらにも取り組んだ結果、当初は想定していなかった成果が各々の課題から得られた。

6. 研究総括の見解

イオン環境を感知して動作する自律的な核酸酵素及び核酸性イオンチャネルの創製を目指して研究を行い、カリウムイオンの有無による核酸酵素の活性のスイッチングに成功した。また核酸を介したイオンの流出を示唆する結果を得た。さらにロングレンジの構造情報を用いたマルチドメイン分子の構造決定を行い、NMR シグナルを用いた酵素反応のリアルタイムモニタリングにも成功した。研究者が自ら見出した核酸シーケンスに特有の機能を見出し、その機構を解明した研究は評価できるが、さらに新しい機能性核酸の設計と合成を期待する。

7. 研究成果リスト

A . さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)発表

- 1) Gopinath, S.C.B., Matsugami, A., Katahira, M. and Kumar, P. K. R. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, 4874-4881. "Human vault-associated non-coding RNAs bind to mitoxantrone, a chemotherapeutic compound"
- 2) Matsugami, M., Xu, Y., Noguchi, Y., Sugiyama, H. and Katahira, M. (2007) *FEBS J.*, **274**, 3545-3556. "Structure of human telomeric DNA under physiological ionic conditions stabilized by proper incorporation of 8-bromoguanosines, as determined by NMR"
- 3) Matsugami, A., Ohyama, T., Inada, M., Inoue, N., Minakawa, N., Matsuda, A., Katahira, M. (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, 1805-1812. "Unexpected A-form formation of 4'-thioDNA in solution, revealed by NMR, and the implications as to the mechanism of nuclease-resistance"
- 4) Nagata, T., Takada, Y., Ono, A., Nagata, K., Konishi, Y., Nukina, T., Ono, M., Matsugami, A., Furukawa, A., Fujimoto, N., Fukuda, H., Nakagama, H. and Katahira, M. (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, 6816-6824. "Elucidation of the mode of interaction in the UPI-telomerase RNA-telomeric DNA ternary complex which serves to recruit telomerase to telomeric DNA and to enhance the telomerase activity"
- 5) Furukawa, A., Nagata, T., Matsugami, A., Habu, Y., Sugiyama, R., Hayashi, F., Yokoyama, S., Takaku, H. and Katahira, M. (2009) *EMBO J.*, in press. "Structure, interaction, and real-time monitoring of the enzymatic reaction of wild-type APOBEC3G"

(2) 学会発表

【国際】

- 1) Matsugami, A., Miyanoiri, Y., Tochio, H., Tamura, Y., Kudo, M., Uesugi, S., Misono, T., Kumar, P., Imai, T., Okano, H. and Katahira, M. (2005) The 1st Asia-Pacific NMR symposium. “Recognition mechanism of the target by RNA aptamer and Musashi protein, studied with the aid of residue specific labeling, ¹³C-detection and RDCs”
- 2) Ohya, T., Tsuchibayashi, H., Matsugami, A., Miyanoiri, Y., Niyada, E., Nagata, T. and Katahira, M. (2006). XXII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems. “Structures of telomere DNA in K⁺ solution, Musashi in complex with RNA, and wild and mutant (phosphorylation-mimicking) DNA-binding proteins, GT-1”
- 3) Miyoshi, T., Matsugami, A., Nomura, S., Akiyoshi, K. and Katahira M. (2008) International Conference on Membrane Interface, “Attempt to construct the ion channel composed of nucleic acids”
- 4) Ohya, T., Nagata, T., Furukawa, A., Sugiyama, T., Mashima, T., Yamazaki, T., Katahira, M. (2008) XXIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, “Structural analysis of Musashi-RNA complex with paramagnetic effects”
- 5) Matsugami, A., Mashima, T., Nishikawa, F., Murakami, K., Nishikawa, S., Noda K., Yokoyama, T. and Katahira M. (2008) Joint Symposium of "18th International Roundtable on Nucleoside, Nucleotides and Nucleic Acids" and "35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry", “Structural analysis of r(GGA)₄ found in RNA aptamer for prion protein”

(3) 招待講演

【国際】

- 1) Katahira, M. (2005) The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, “Unique quadruplex structures and unfolding of quadruplexes by proteins”
- 2) Ohya, T., Tsuchibayashi, H., Matsugami, A., Miyanoiri, Y., Niyada, E., Nagata, T. and Katahira, M. (2006) The Switzerland-Japan Symposium on Structural Biology 2006, “Structures of Musashi in Complex with RNA, Wild and Mutant (Phosphorylation-Mimicking) DNA-Binding Proteins, GT-1, and Telomere DNA in K⁺ Solution”
- 3) Tsuchibayashi, H., Ohya, T., Matsugami, A., Miyanoiri, Y., Niyada, E., Nagata, T. and Katahira, M. (2006) 4th Japan-Taiwan NMR Symposium, “Investigations of functional RNA/DNA and RNA/DNA-binding proteins”
- 4) Ohya, T., Furukawa, A., Matsugami, A., Mashima, T., Nagata, T. and Katahira, M. (2008) Korea-Japan Symposium on Biological NMR, “Structure determination of a multi-domain protein by the use of PRE and RDC, and the unexpected A-form structure of 4'-thioDNA exhibiting nuclease-resistance”
- 5) Ohya, T., Matsugami, A., Furukawa, A., Mashima, T., Sugiyama, T., Nagata, T. and Katahira, M. (2008) XXIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, “Structures and interactions of 4'-thioDNA and RNA/DNA-binding proteins”

【国内】

- 1) 片平正人、二矢田絵美、原ゆかり、松上明正(2009)第82回日本細菌学会総会、イオン環境を感知して作動する核酸酵素創製の試み

B. その他の主な成果

(1) 論文(原著論文)発表

- 1) Fukuda, H., Katahira, M., Tanaka, E., Enokizono, Y., Tsuchiya, N., Higuchi, K., Nagao, M., and Nakagama, H. (2005) *Genes Cells*, 10, 953-962. “Unfolding of higher DNA structures formed by the d(CG₃) triplet repeat by UP1 protein”

- 2) Matsugami, A., Tani, K., Ouhashi, K., Uesugi, S., Morita, M., Ohyama, T. and Katahira M. (2006) *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 25, 417-425. "Structural property of DNA that migrates faster in gel electrophoresis, as deduced by CD spectroscopy"
- 3) Nakagama, H., Higuchi, K., Tanaka, E., Tsuchiya, N., Nakashima, K., Katahira, M. and Fukuda, H. (2006) *Mutat. Res.*, 598, 120-131. "Molecular mechanism for maintenance of G-rich short tandem repeats capable of adopting G4 DNA structures"
- 4) Sannohe, Y., Sato, K., Matsugami, A., Shinohara, K., Mashimo, T., Katahira, M. and Sugiyama, H. (2009) *Bioorg. Medici. Chem.* in press. "The orientation of the ends of G-quadruplex structures investigated using end-extended oligonucleotides"
- 5) Nishikawa, F., Murakami, K., Matsugami, A., Katahira, M. and Nishikawa, S. (2009) *Oligonucleotides*, in press. "Structural studies of an RNA aptamer containing GGA repeats under ionic conditions using microchip electrophoresis, circular dichroism and 1D-NMR"

(2) 学会発表

【国際】

- 1) Yohei Miyanoiri, Satoshi Saitoh, Hiroyuki Miyashita, Hisanori Kobayashi, Seiichi Uesugi, Takao Imai, Hideyuki Okano and Masato Katahira (2005). The 1st Asia-Pacific NMR symposium. "Structure and mode of interaction with RNA of mouse neural protein, Musashi1"
- 2) Miyanoiri, Y., Saitoh, S., Miyashita, H., Kobayashi, H., Imai, T., Uesugi, S., Okano, H. and Katahira, M. (2005) The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies. "Structure and mode of interaction with RNA of mouse Musashi1 protein"
- 3) Nagata, T., Ohyama, T., Noto, K., Niyada, E., Miyanoiri, Y., Imai, T., Okano, H., Hiratsuka, K., Katahira, M. (2007) International Workshop on Perspectives on Stable Isotope Aided NMR Methods for Protein Structural Analysis, "Structural studies on transcriptional and post-transcriptional gene regulation by NMR"
- 4) Ohyama, T., Furukawa, A., Mashima, T., Sugiyama, T., Ohgura, S., Yamazaki, T., Imai, T., Okano, H., Nagata, T. and Katahira, M. (2008) Joint Symposium of "18th International Roundtable on Nucleoside, Nucleotides and Nucleic Acids" and "35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry", "Structural analysis of Musashi-RNA complex on the basis of long-range structural information"
- 5) Furukawa, A., Nagata, T., Habu, Y., Sugiyama, R., Hayashi, F., Yokoyama, S., Takaku, H. and Katahira, M. (2008) Joint Symposium of "18th International Roundtable on Nucleoside, Nucleotides and Nucleic Acids" and "35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry", "NMR assignments and the identification of the secondary structure of the anti-retroviral cytidine deaminase"

(3) 招待講演

【国際】

- 1) Katahira, M. (2005) The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, "Structure of hnRNP D complexed with telomere DNA, unfolding of quadruplex, and discrimination of intra- and intermolecular hydrogen bonds"
- 2) Ohyama, T., Tsuchibayashi, H., Matsugami, A., Miyanoiri, Y., Niyada, E., Enokizono, Y., Nagata, T. and Katahira, M. (2006) Korea-Japan Bilateral Symposium on Biological NMR, "Wild and mutant (phosphorylation-mimicking) GT-1 structures, hnRNP D-telomere DNA complex structure, and Musashi structure complexed with RNA"
- 3) Matsugami, A., Ohyama, T., Ono, A., Ono, M., Nagata, T. and Katahira, M. (2007) International Workshop on Perspectives on Stable Isotope Aided NMR Methods for Protein Structural Analysis, "The structure of human telomeric DNA and the interactions of hnRNP A1/hnRNP D proteins with telomeric DNA"
- 4) Katahira, M. (2008) Yokohama NMR International Symposium -Drug Discovery and Design by NMR-, "Structural analyses of proteins and nucleic acids related to telomere elongation, neural differentiation, prion, and anti-retroviral process"