

The development of intelligent ribozyme and RNA aptamer whose activities switch on in response to K^+ via quadruplex formation (Digest)

K^+ に応答して活性を自律的にスイッチングする インテリジェントリボザイムおよび RNA アプタマーの開発 (要約)

Yudai Yamaoki (山置 佑大)

<序論>

グアニンに富んだ配列をもつ DNA や RNA は通常ワトソン-クリック型の水素結合とは異なる、非ワトソン-クリック型の水素結合からなる四重鎖構造を形成することが知られている。四重鎖構造はその生物学的、工学的な重要性から注目が集まっている。これまでに r(GGAGGAGGAGGA) という配列から成る RNA (R12) が K^+ 存在下でのみコンパクトな四重鎖構造を形成することが見出され、この R12 の構造変化を利用することで機能性 RNA の活性を K^+ 依存的に制御する試みが成された。GGA 繰り返し配列を用いた K^+ 応答性機能性 RNA のプロトタイプとしてハンマーヘッドリボザイム配列の一部を R11 配列 (R12 配列の末端アデニンを 1 つ欠損させた配列であり、R12 同様四重鎖を形成する) へと置換した四重鎖ハンマーヘッドリボザイム (QHR: Quadruplex Hammerhead Ribozyme) が設計された。 K^+ 存在下でのみ QHR の R11 配列が四重鎖を形成し、R11 配列に隣接するリボザイムサブユニットが適切な位置に配置される。これによりリボザイムの活性構造が再構築され、 K^+ 依存的に高い活性を発揮する。生体内において細胞外と細胞内の K^+ 濃度はそれぞれ約 3-5 mM および 100-150 mM であることが知られている。そのため K^+ 応答性機能性 RNA は細胞内外の K^+ 濃度の違いを感知して自らの活性を制御可能な全く新しい機能性 RNA と成り得る。しかしながら QHR は K^+ 非存在下であっても無視できない残存活性を示しており、 K^+ による明確な活性の切り替えが困難であった。四重鎖なしであっても QHR が部分的または過渡的に活性構造を形成してしまうことが残存活性の原因として考えられ、その抑制が大きな課題であった。本研究ではこの残存活性の抑制および K^+ による明確な活性のオン/オフが可能な機能性 RNA の開発と四重鎖構造を利用した本ストラテジーをリボザイム以外の機能性 RNA へと拡張することを目的とした。

<split-Quadruplex Hammerhead Ribozyme (spQHR)の開発>

QHR の残存活性を抑制するために、まず QHR を 2 本のストランドに分割したスプリット型四重鎖ハンマーヘッドリボザイム (spQHR: split-Quadruplex Hammerhead Ribozyme) を開発した。spQHR は 2 つのリボザイムサブユニットが 2 本のストランド上にそれぞれ位置する。このため K^+ 非存在下における部分的または過渡的なリボザイムサブユニットの近接が抑制され、残存活性を大幅に抑制することに成功した。一方で、spQHR は K^+ 存在下において分

子間で四重鎖を形成し活性化したが、その活性はオリジナル QHR に比べ大幅に低下するという課題が残った。

<Complementary Strand (CS) システムの開発>

残存活性の抑制と K^+ 存在下での高い活性を両立させるためにオリジナル QHR に相補鎖核酸(CS: Complementary Strand)を導入した。 K^+ 非存在下では QHR が CS と不活性型である二重鎖構造を形成するが、 K^+ 存在下では CS が QHR から解離し、QHR は活性型である四重鎖構造を形成した。CS 配列の最適化により、 K^+ 非存在下における残存活性の抑制と K^+ 存在下における高活性の発揮を両立させた。この結果、 K^+ 存在下と非存在下における活性の比(活性化効率)をそれまでの 2.3 から 21 まで向上させることに成功した。

<Quadruplex-forming Complementary Strand (QCS) システムの開発>

CS 導入により QHR の活性化効率の向上を果たした一方で、CS 存在下では活性化のために K^+ 添加後に一度加熱して冷却するアニーリング処理が必要であるという新たな課題が生じた。これは過渡的に QHR から解離した CS がすぐに QHR に再結合し、 K^+ 存在下であっても QHR を二重鎖にトラップしてしまうことが原因と考えられた。そこで CS 配列内に多数の連続したグアニン残基を組み込み、四重鎖形成相補鎖(QCS: Quadruplex-forming Complementary Strand)とした。 K^+ 非存在下では QHR と QCS は CS の場合と同様、不活性な二重鎖を形成し、残存活性を抑制した。一方、 K^+ 存在下では QHR のみでなく QCS も四重鎖を形成する。これにより QCS を四重鎖構造にトラップすることで解離した QCS と QHR の再結合を抑制した。この結果、QHR の活性化が妨げられることがなくなり、アニーリングなしで低残存活性、高活性化効率を実現した。さらに QHR と相補鎖の二重鎖が K^+ に応じて四重鎖へと構造転移することを CD および NMR 法を用いて検証し、そのスペクトル変化から意図したとおりの設計に成功していることを示した。また、生体内において細胞外と細胞内の K^+ 濃度がそれぞれ約 3-5 mM および 100-150 mM であることに着目すると、QCS システムにおいて QHR のスイッチングは生体内の K^+ 濃度域で起こることも示した。一方で、生体内、特に細胞外において多量に存在している Na^+ では QCS システムの活性化は起こらないことも示した。これらは細胞内外における活性のスイッチングに適した性質である。

K^+ 依存的に標的 RNA を切断する QHR-QCS システムを利用することでドラッグデリバリーシステム(DDS)の構築への貢献が期待される。これまでに膜タンパク質を標的とする RNA アプタマーが膜タンパク質との結合後にエンドサイトーシスによって細胞内部に取り込まれることを利用し、siRNA などのドラッグとこれらのアプタマーとのキメラ分子を細胞内に輸送する DDS が報告されている。ここでさらにこのキメラ分子に QHR を組み込んだ三者複合体とすることで、細胞内に取り込まれたときにのみドラッグである siRNA をキャリアーであるアプタマーから切り離して放出することが可能になると期待される。これによりキャリアーアプタマーの存在によってドラッグの活性が阻害されることを気にせず、よ

り自由度の高い DDS 設計が可能になると期待される。

<K⁺応答性 RNA アプタマーの開発>

さらに、R11 の四重鎖形成を利用して K⁺依存的に活性を制御する手法を RNA アプタマーの標的分子捕捉活性のスイッチングへと拡張することを試みた。HIV ウイルスの増殖因子として知られる病原性タンパク質を捕捉する RNA アプタマーを 2 つのサブユニットに分割し、これらのサブユニットを R11 の両末端にそれぞれ連結することで K⁺応答性 RNA アプタマーを設計し、その標的捕捉活性と K⁺の関係を検証した。

今後、培養細胞を用いることで細胞内外における活性のアッセイおよび細胞内外における機能性 RNA の構造変化に関する情報の取得を目指す。さらに、K⁺応答性を付与する本手法は機能性 RNA だけでなく、デオキシリボザイムや DNA アプタマー、さらには化学修飾を加えた RNA や PNA、LNA などにも適用できることが期待できる。特に修飾核酸は核酸分解酵素による分解を受けにくいことが知られており、生細胞系に用いる分子ツールの開発において有用な手法となると期待される。