

138. RLRs による核酸認識機構の 1 分子可視化解析

鈴木 勇輝

Key words : RLR, RIG-I, DNA origami,
原子間力顕微鏡, 1 分子解析

京都大学 大学院理学研究科 化学専攻
生物化学教室

緒 言

生体分子はリガンド結合, 構造変化, 多量体化などさまざまな動的現象をともなって, その生理機能を発揮する. ウイルス感染細胞内におけるインターフェロン (IFN) 誘導に必須な役割を担う細胞内ウイルス RNA センサー RIG-I 様受容体 (RIG-I-like receptor: RLR) は, 基質 RNA 特異的なシグナル伝達能を示すことが知られている. DExD/H ボックス型 RNA ヘリカーゼドメインを持つ RIG-I¹⁾ は様々な末端構造を持つ二本鎖 RNA (double-stranded RNA: dsRNA) と ATP 非依存的に結合する²⁾. このうち 3' 突出末端を持つ dsRNA は RIG-I のヘリカーゼ活性により解かれるが, 平滑末端および 5' 突出末端構造を持つ dsRNA は解かれない. さらに興味深いことに, RIG-I に解かれない dsRNA のみが IFN 産生シグナルを誘発することが明らかとなっている³⁾. すなわち, RIG-I のヘリカーゼ活性とシグナル伝達能は逆相関する. しかし, dsRNA の末端構造に対応して RIG-I にどのような構造変化がもたらされ, その機能の使い分けがなされているのかは明確ではない. そこで, 本研究では RIG-I-RNA 複合体の機能-構造相関の解明を目的とし, DNA origami 法⁴⁾ に基づく試料調製法と液中原子間力顕微鏡 (AFM) によるナノスケールイメージングを利用した RNA-タンパク質複合体の 1 分子可視化解析システムの構築を目指した.

方法、結果および考察

1. DNA ナノ構造体への基質 RNA 鎖の導入

基質 RNA として, 60 bp の二本鎖領域と 48 nt および 16 nt の一本鎖突出構造を持つ RNA 鎖をデザインした. 48 nt の突出末端が 3' (AB 鎖) または 5' (CD 鎖) になるよう二種類の鎖を用意し, これらの RNA 鎖を我々の研究室でデザインした 40 nm × 40 nm の空間を持つ DNA origami 構造体 (DNA フレーム)⁷⁻⁹⁾ に導入することで, RIG-I と RNA の複合体構造を観察するための足場を構築した (図 1). この際, RNA 鎖両端の 16 nt の一本鎖領域は DNA フレームへの結合に利用される. また, DNA フレームの一端には欠損部があり, これを方向性のマーカーとして利用することで, 内部に導入した二本の RNA 鎖を区別することが可能となっている. DNA フレームは材料となる scaffold 一本鎖 DNA (single-stranded DNA: ssDNA, M13mp18, 7,249 nt) と構造にあわせて配列設計した相補的な staple ssDNA (多くは 32 nt) の溶液を混合し, $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 85°C から 15°C へアニールすることで, 90% 以上の収率で得られた. 続いてこの DNA フレームに対し AB 鎖と CD 鎖を混合し, $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 40°C から 15°C へとアニールすることで, 二本の RNA 鎖が橋架けされた DNA フレーム構造を約 87% の収率で得た.

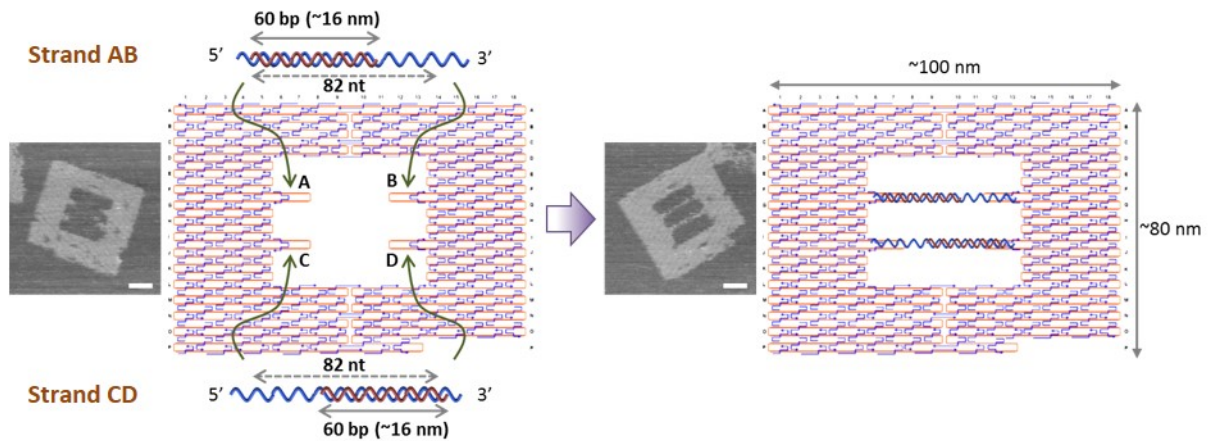


図1. RNA鎖のデザインとDNA origami構造体（DNAフレーム）への導入。
Scale bar: 25 nm.

2. RIG-I-RNA複合体の形成と観察

二本のRNA鎖（AB鎖とCD鎖）を導入したDNAフレームとRIG-I分子とをATP非存在下でインキュベートし、得られた複合体構造を液中AFMにより観察した。AB鎖およびCD鎖へのRIG-I結合の頻度をそれぞれ解析したところ、ともに約8%程度であった。ところが、RNA上に観察された構造を比較すると、AB鎖では3'突出末端の根元付近に枝分かれ様の構造が見られるのに対し、CD鎖ではC-D間の中心付近によりコンパクトな複合体がつくられるという傾向が見られた（図2）。加えて、ヘアピン型RNAを用いた電気泳動移動度シフト解析により、複合体形成における突出末端の影響を比較した場合、3'突出末端を有する方が5'突出末端を有する場合に比べRIG-I-RNA複合体の移動度が下がることから、RIG-Iは基質RNA鎖の末端構造に依存して異なる複合体構造をとると考えられる。現在、これらの複合体構造と機能との関連を明らかにするため、DNAフレーム内でのヘリカーゼ活性の評価、およびRNA結合能やATP加水分解能に変異を加えたタンパク質を利用した検討を行っている。

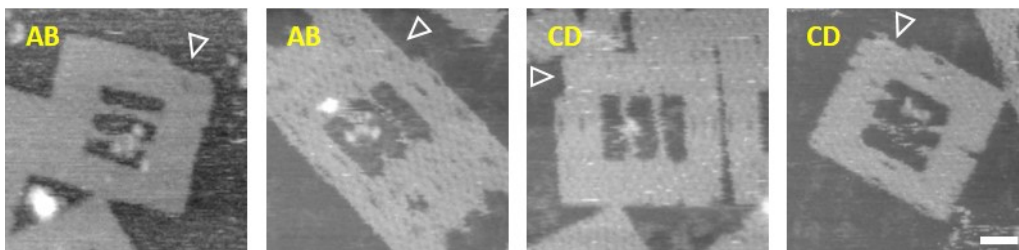


図2. DNAフレーム内におけるRNA鎖とRIG-I複合体のAFM観察。

DNAフレームの欠損部（白三角印）の位置から、AB鎖およびCD鎖の判別が可能である。Scale bar: 25 nm.

3. RIG-I分子の溶液中高速AFM観察

RNA非結合状態のRIG-Iの構造と振る舞いを理解するために、RIG-I分子の高速AFM観察を行った。精製したRIG-I分子を緩衝溶液中で観察したところ、大きな構造に細かいひも状のリンカーを介して小さな球状ドメインが繋がったような構造が多数観察された（図3A）。さらに、このリンカー部がクネクネと動いたり伸縮することで、球状の構造が大きな構造から離れたり近づいたりするという動的な挙動が観察された（図3B）。X線結晶解析の結果¹⁰を踏まえると、この球状構造はヘリカーゼドメインのアミノ酸リンカー領域に繋がれたC末端側ドメイン（CTD）と推測される（図3C, D）。今後、RIG-Iの動的構造特性と機能との相関をより詳細に解析することを目指して、ATP加水分解能を欠損した変異体や常時IFN活性化能を示す変異体の高速AFM観察および動態解析を予定している。

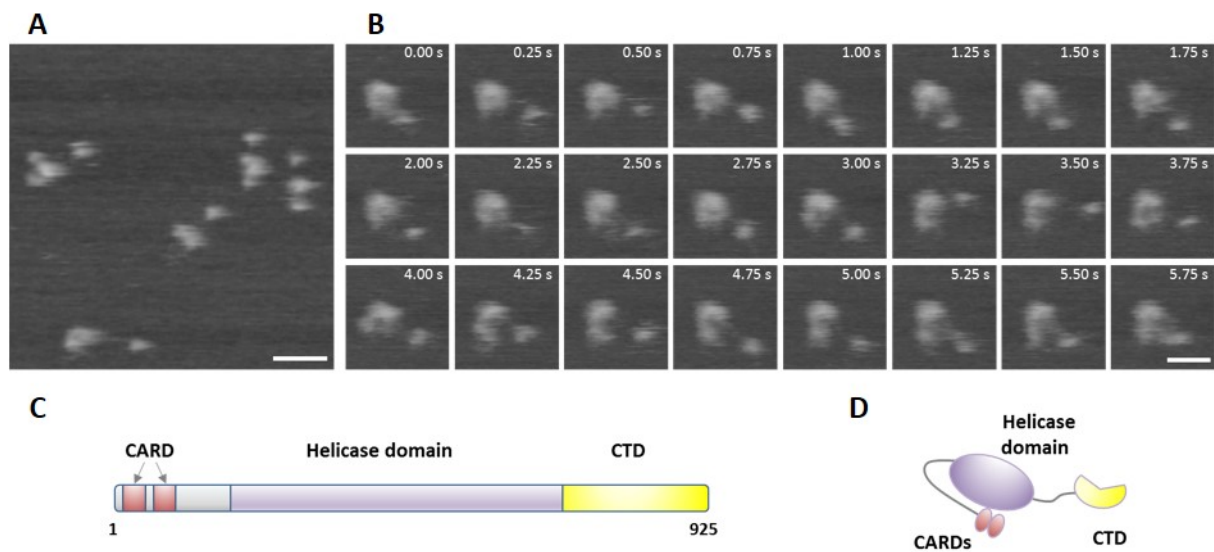


図3. RIG-Iの1分子観察.

A) 溶液中 AFM 像. Scale bar: 25 nm. B) RIG-I の1分子の高速液中 AFM 像. イメージング速度は 250 ms/frame. Scale bar: 25 nm. C) RIG-I のドメイン構造. RIG-I は N 末端領域に IFN 産生シグナルの伝達に必要な caspase recruitment domain (CARD) を2つ有し, 中間領域に RNA ヘリカーゼドメインを持つ. RNA は C 末端ドメイン (CTD) によって認識されると考えられている. D) AFM 像から推測される溶液中における RIG-I 分子の構造.

共同研究者

本研究の共同研究者は, 京都大学大学院理学研究科の杉山 弘, 京都大学物質-細胞統合システム拠点の遠藤政幸, 京都大学ウイルス研究所の藤田尚志および加藤博己である. 最後に, 本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします.

文 献

- 1) Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. & Fujita, T. : The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.*, **5** : 730-737, 2004.
- 2) Takahashi, K., Yoneyama, M., Nishihori, T., Hirai, R., Kumeta, H., Narita, R., Gale, M., Jr., Inagaki, F. & Fujita, T. : Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol. Cell*, **29** : 428-440, 2008.
- 3) Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F. & Reis e Sousa, C. : RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*, **314** : 997-1001, 2006.
- 4) Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C. S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T. & Akira, S. : Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, **441** : 101-105, 2006.
- 5) Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., Endres, S. & Hartmann, G. : 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*, **314** : 994-997, 2006.
- 6) Rothmund, P. W. : Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, **440** : 297-302, 2006.
- 7) Suzuki, Y., Endo, M., Katsuda, Y., Ou, K., Hidaka, K. & Sugiyama, H. : DNA origami based visualization system for studying site-specific recombination events. *J. Am. Chem. Soc.*, **136** : 211-218, 2014.
- 8) Suzuki, Y., Endo, M., Canas, C., Ayora, S., Alonso, J. C., Sugiyama, H. & Takeyasu, K. : Direct analysis of Holliday junction resolving enzyme in a DNA origami nanostructure. *Nucleic Acids Res.*, **42** : 7421-7428, 2014.

- 9) Endo, M., Katsuda, Y., Hidaka, K. & Sugiyama, H. : Regulation of DNA methylation using different tensions of double strands constructed in a defined DNA nanostructure. *J. Am. Chem. Soc.*, **132** : 1592-1597, 2010.
- 10) Luo, D., Ding, S. C., Vela, A., Kohlway, A., Lindenbach, B. D. & Pyle, A. M. : Structural insights into RNA recognition by RIG-I. *Cell*, **147** : 409-422, 2011.