

報告 1 ～ 7

各報告の最後に研究業績が示してあります。

別刷は含まれていませんが、PubMed ID 等を記載してあります。

報告 1. 長鎖 RNA の二次構造解析と機能構造ドメインの推定手法の開発

1-1. 神経特異的 mRNA である HAR1F RNA の二次構造解析

河合剛太

ほ乳類での保存性が高く、同時に、ヒトにおいて変異が認められる領域である **Human accelerated region (HAR)** のひとつである **HAR1** から、機能未知の **non-coding RNA** が発現していることが知られており、そのひとつである **HAR1F RNA** については、特定の領域の二次構造はヒトとチンパンジーで異なっていることが報告されている。そこで、この RNA について、**vsfold/GenoPoemics (vsfold/GP)** を用いて二次構造解析を行った。図 1 はその結果を示している。GP のデフォルトパラメータで解析した結果 (図 1 左) では、ほぼ全領域にわたって二次構造形成が示されているが、比較的安定な二次構造のみを表示させると (図 1 右)、特定の領域にのみ二次構造形成が示される。図中の赤矢印は、ヒトとチンパンジーで二次構造が異なることが指摘されている領域で、この領域に比較的安定な二次構造が形成されることが示されている。

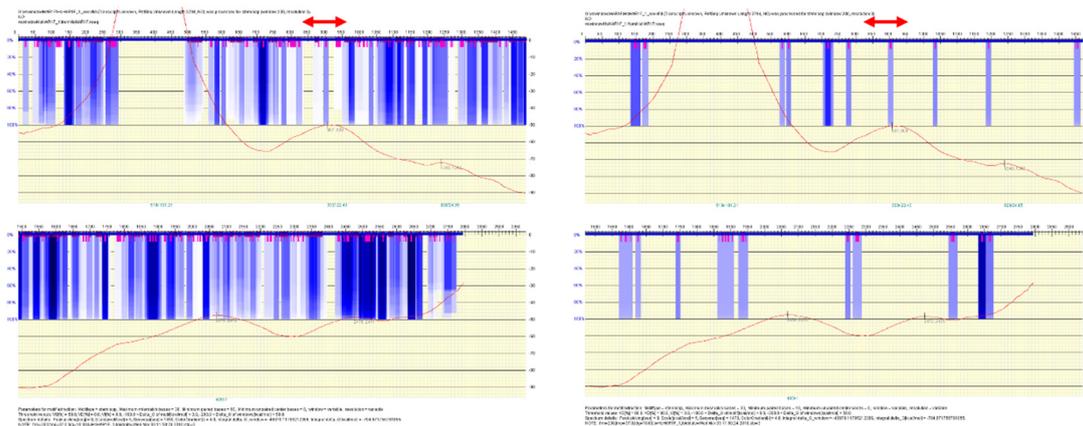


図 1. HAR1F RNA の二次構造形成領域の解析結果

GenoPoemics のパラメータ : (左) VS=50%,VD=0%, (右) VS=80%,VD=80%

図 2 は、HAR1F RNA において二次構造の形成が予測された領域について、その二次構造を **vsfold** で再度解析し、示したものである。図 2 の左側は、ヒトとチンパンジーで二次構造が異なることが指摘されている領域で、赤丸で示したステムループが図 1 で示されていた二次構造に対応するものである。図 2 の右側は、3'末端付近に存在する二次構造を示している。この二次構造は高い安定性をもつと予想されるが、その機能との関連については今後の課題である。なお、図 2 中の赤字は、シュードノット形成が予想されている残基を示している。図 1 左において、5'末端付近に全く二次構造が予測されない領域が存在するが、この領域には 224 残基の CU リピートが存在している。

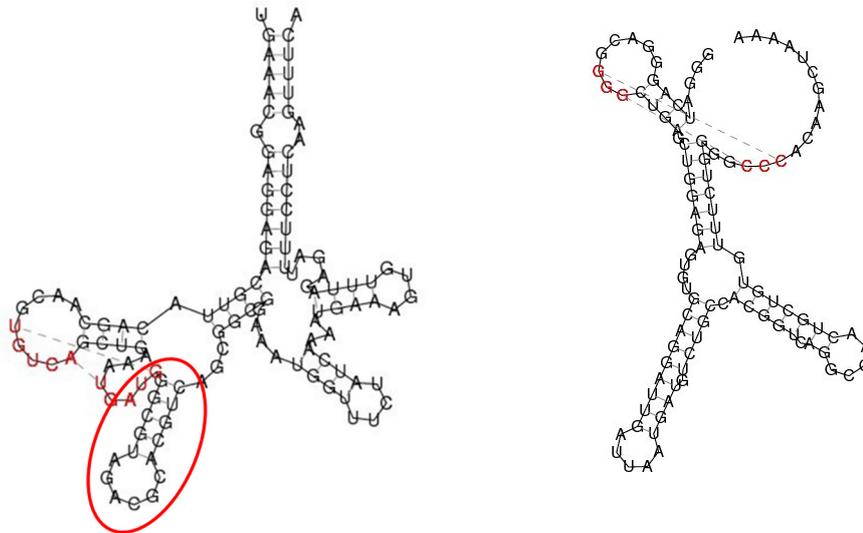


図2. HAR1F RNA に予測された二次構造の例
vsfold のパラメータ : persistence length = 7

さらに、ヒトとチンパンジーの HAR1F RNA について、それぞれ二次構造を解析し、比較した (図3)。

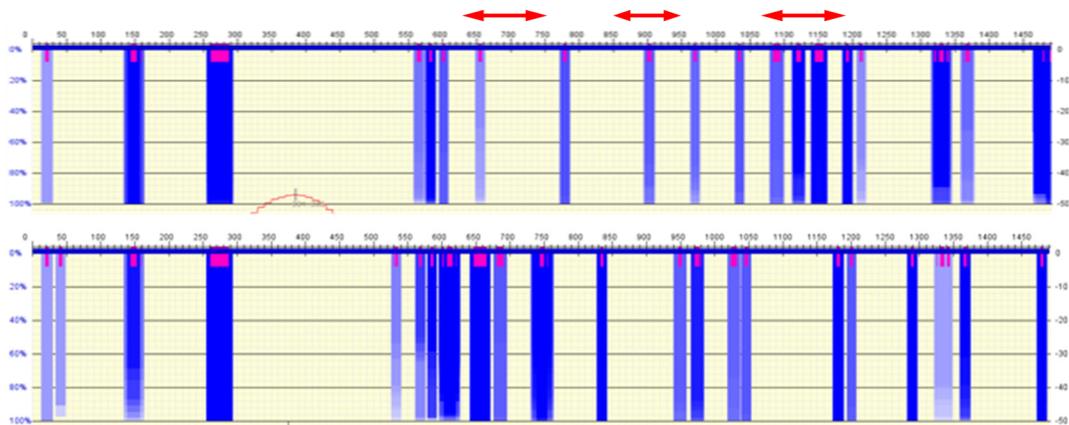


図1. HAR1F RNA の二次構造形成領域の解析結果
(上段) ヒト, (下段) チンパンジー

その結果、二次構造が大きく異なると推定される領域が3か所見出された (図中の矢印)。このうち、2番目の領域が、先に述べた二次構造が異なっているとされている領域に対応している。このように、vsfold/GP を用いることによって、長鎖 RNA の二次構造の特徴を効果的に描き出すことができることが示された。なお、この3つの領域の内、脊椎動物で保存されているのは、2番目の領域のみであり、生物学的な重要性は、おそらく2番目の領域にあると判断できる。

以上のように、GP によって二次構造の比較が効果的に行えることが示された。今後は、二次構造の差が見られた領域について、実際に NMR 法による構造解析を行い、その立体構造の違いについて明らかにしていきたい。

1-2 HCV ゲノム RNA における構造領域の機能の推定

河合剛太, 下遠野邦忠

(1) はじめに

C 型肝炎ウイルス (HCV) は慢性肝炎の原因のひとつである。感染者の 2 割は急性肝炎後にウイルスが排除される。8 割の感染者はウイルス排除が見られずに感染が持続し慢性肝炎を発症する。これらの慢性肝炎患者は肝がん発症の危険性が高い。

HCV は RNA ウイルスであり、フラビウイルス科に属する。ゲノムは約 1 万塩基からなりプラス鎖である。5' と 3' 側に非翻訳領域があり、これらの領域はゲノム複製のために必須の働きを持つシス因子である。これらの非翻訳領域に囲まれたゲノムの約 9 割を占める部分からウイルス蛋白質が産生される。翻訳は蛋白質をコードする **Open Reading Frame (ORF)** 最初のメチオニン残基から始まり、前駆体蛋白質が産生されるが、それが翻訳反応と共役して働くシグナルペプチダーゼによる分解および、ウイルスのプロテアーゼにより切断を受けて最終的に機能するウイルス蛋白質 (約 10 種類) が産生される。

10 種類のウイルス蛋白質のうち、非構造タンパク質と呼ばれる 5 種類の蛋白質 (NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) がウイルスゲノムの複製に直接関与する。従って、これらの蛋白質が発現する細胞においてはウイルスゲノム RNA が自立的に複製する。残りの蛋白質は粒子産生や、粒子の構成蛋白質として必要であるがゲノム RNA の複製には必要でない。つまり上記の 5 種類のウイルス蛋白質を発現している細胞においては、HCV ゲノム複製が自立的に起こるので、その細胞を用いてゲノム複製の機構解析や、ゲノム複製を阻害する薬剤の開発等が可能である。事実、HCV ゲノム配列と相補的な配列を持つ siRNA を導入した細胞では HCV ゲノム複製が効率よく抑制される。ウイルスゲノム複製にはウイルス蛋白質のみならず、宿主因子の働きも必要である。宿主因子はゲノム複製を正および負に制御する。そのために、ある細胞では HCV ゲノム複製が効率よく起こるが、別の細胞では複製が起こらない。そのために HCV ゲノム複製を制御する宿主因子の探索は複製の分子機構を解明するだけでなく、創薬の観点からも重要である。

(2) HCV ゲノム複製を制御する宿主因子を探索する系の開発

HCV ゲノムが自立的に複製する細胞を用いて複製を抑制する宿主要因を単離するために、図 1 に示すようなスクリーニング系を考えた。この系では、(1) HCV ゲノムが複製している細胞 (レプリコン細胞) は HSV チミジンキナーゼ (TK) を発現する。(2) そのために抗 HSV 剤のひとつであるガンシクロビル処理するとレプリコン細胞は死ぬ、(3) ウイルス複製を阻害する宿主由来の遺伝子を導入する事により、ゲノムは消失する、(4) その結果、ゲノムから産生されるウイルスプロテアーゼ依存的に活性化する転写因子の作用が阻害されるために、TK 活性が失われる、(5) 細胞をガンシクロビルで処理する事により、HCV レプリコンを持つ細胞は死滅し、レプリコンが消滅した細胞のみが増殖する、という性質を持っている。この系を用いてスクリーニングを行うために、HCV ゲノム内に TK 遺伝子を挿入した組み換え体 HCV レプリコンの作成を行い、その自立複製能を調べた。

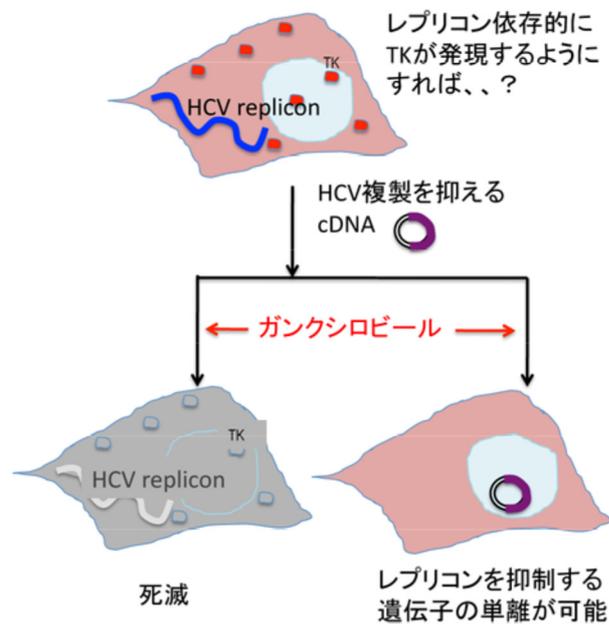


図1 HCVゲノム複製を抑制する遺伝子の単離

(3) HSV TK 遺伝子を持つ HCV レプリコン RNA の構築

図2に示すように HCV ゲノムの 5'IRES 配列の下流に HSV TK 遺伝子と neo 遺伝子が融合する形で組み込んだウイルスゲノムを構築した。

次にこのレプリコン RNA を細胞に導入して、自立複製能を調べた。TK 遺伝子が入っていないレプリコンを持つ細胞では、レプリコンが自立的に複製したのに対して、TK-neo を持つレプリコンは自立複製しなかった。

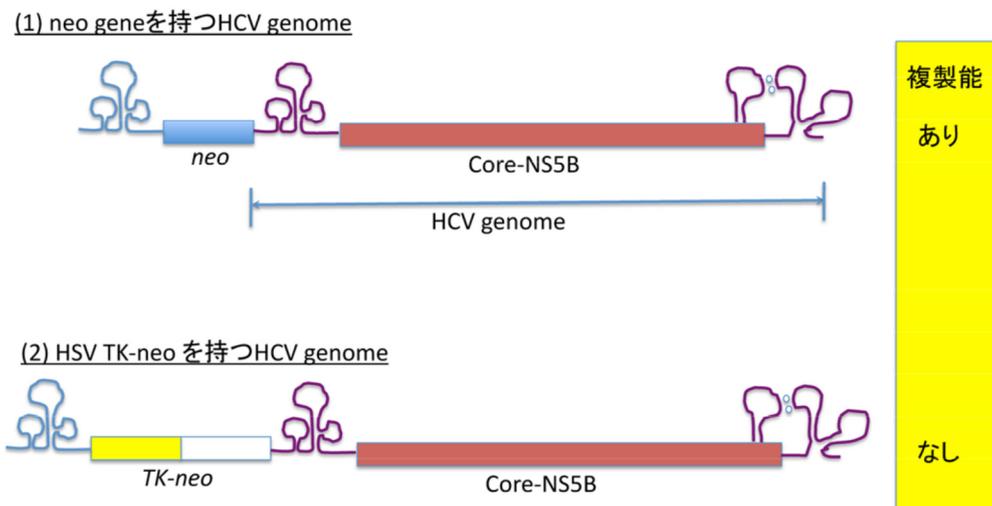


図2 選択因子を持つHCVゲノム構築とその複製活性

(4) HCV レプリコンの 3'-UTR の二次構造解析

上述の HCV レプリコンにおける HCV RNA の自己複製が阻害される現象について、本プロジェクトで開発を進めている手法を適用し、その二次構造を解析した。

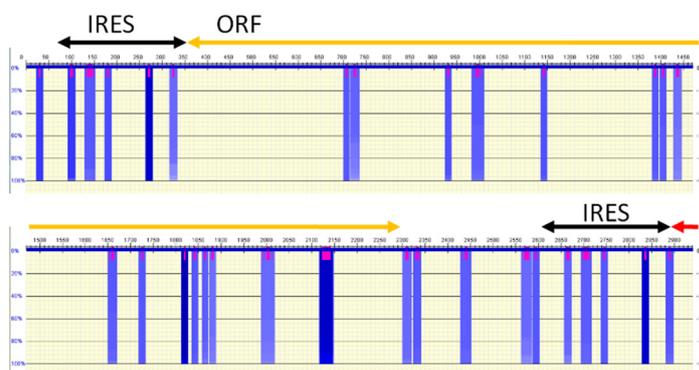


図 1. 改変した HCV RNA の二次構造解析の結果

図 1 は、vsfold および GenoPoemics によって解析した人為的改変 HCV RNA の 5' 領域の二次構造である。vsfold についてはデフォルトの条件 (persistence length = 4) で解析し、GenoPoemics については、VD=80%, VI=80% (やや厳しい条件) としてある。2 つめの IRES が本来の HCV IRES で、その上流に IRES と ORF が挿入されているものである。この HCV RNA は自己複製が阻害されており、それが挿入された領域に形成された高次構造の影響である可能性がある。図では、まず IRES 領域にいくつかの二次構造が推定されており、これらはすでに解析されている IRES の二次構造とよく一致していた。このことは本手法の有効性を示すものである。ORF 領域にいくつかの二次構造が予測されており、その例を図 2 に示した。今後、これらの構造と自己複製阻害との関連について解析する必要がある。

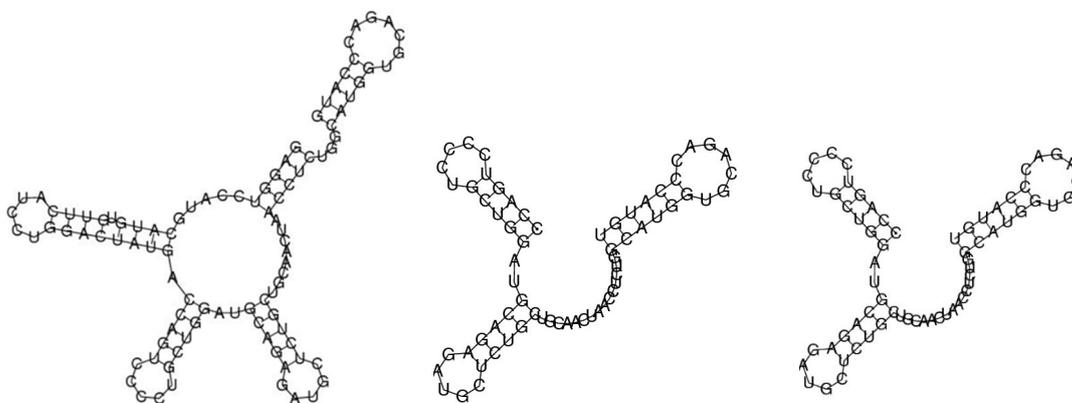


図 2. ORF 領域に推定された二次構造の例

1-3 免疫機能に関与する長鎖 non coding RNA の新規機能の検索

橋本香保子

本プロジェクトにおける課題は、プロジェクトにおいて開発する手法を用いて、免疫系で特異的に発現している mRNA の解析を行うことである。そこで、vsfold/GenoPoemics (vsfold/GP) による免疫関連 mRNA の解析を行った。

microRNA の機能の研究以降、non coding RNA の存在意義と機能に対する関心が高まり、解析技術の一般化とともに大規模トランスクリプトーム解析によって、多くの non-coding RNA (ncRNA) の存在が明らかになった。本研究は、免疫機能に関与する長鎖 non coding RNA を見出し、その機能を明らかにすることをめざしているが、本年度は、免疫機能の関与する分子の mRNA の 3'非翻訳領域 (UTR) に着目し、特徴的な構造を見出せるか、検討を行った。

免疫系の細胞において、炎症に関わる分子の mRNA の 3'非翻訳領域 (UTR) に存在する配列が、その mRNA の安定性の制御に関与していることが知られている。例えば、IL-6 mRNA の安定性の制御には、その 3'-UTR に存在する AU rich element (ARE) および stem-loop 構造が重要であることが示されている¹⁾。本年度は、免疫機能に関与する分子の mRNA について、ARE を含む 3'-UTR において特徴的な二次構造を検索し、その機能との関連を検討することを試みた。

(1) 炎症に関わる分子の 3'-UTR の vsfold/GP による二次構造解析

いくつかのサイトカインの遺伝子の発現が mRNA レベルで制御されていることが知られている。例えば、TNF など炎症に関わる分子の mRNA の 3'-UTR には、AUUUA 配列を特徴とする AU rich element (ARE) と呼ばれる領域があり、ここに Zn フィンガータンパク質が結合することによって、mRNA の分解が促進されていると考えられている。また、IL6 や IL12 の mRNA についても、同様な制御が指摘されている。そこで、これらの mRNA に着目し、特徴的な構造領域の有無を GenoPoemics で解析することを試みた。

図 1 は、vsfold および GenoPoemics によって解析したマウス TNF mRNA の二次構造である。3'-UTR の ARE 領域に相当する位置を赤で囲んである。この条件では、mRNA の全領域である程度の二次構造の形成が予測されているが、5'末端付近と 3'末端付近にそれぞれまとまった二次構造の形成が特徴的である。た

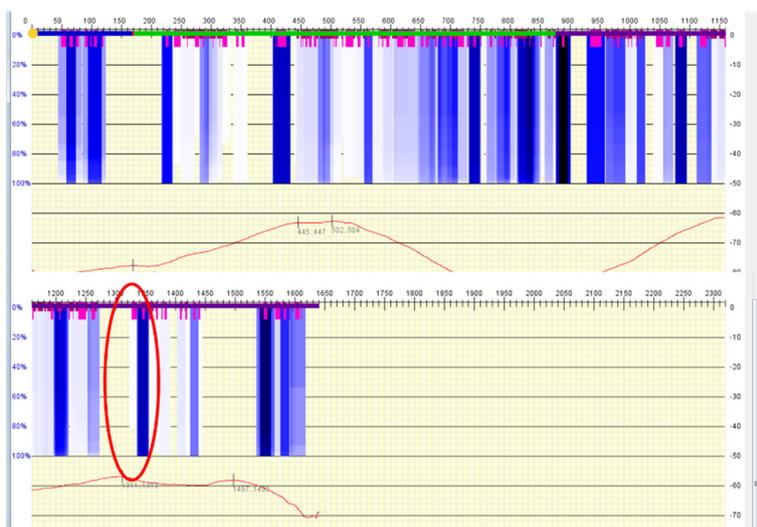


図 1. マウス TNF mRNA の二次構造解析の結果

だし、これらの機能的な意味までは解析できていない。ARE 領域に関しては、その 3'側に二次構造形成が予測されている。マウスの IL12 α の mRNA においても ARE 領域の 3'側に二次構造形成が予測されており、この構造が Zn フィンガータンパク質による認識に關与しているかどうか、検討する必要があると考えている。

(2) 免疫細胞が産生するタンパク質の mRNA の解析

サイトカインのような分泌タンパク質や toll-like receptor (TLR) など、外界から刺激に応じ発現が一過性の膜タンパク質が免疫系細胞には多く存在し、その多くは必要に応じて発現のタイミングや量が制御されている。本年度はまず、ARE の典型的なモチーフである ATTTA 配列を含む mRNA について、その 3'-UTR に共通した二次構造が存在するかどうかについて解析を行った。

ヒトとマウスにおけるサイトカインおよび TLR の mRNA をデータベースで検索し、3'-UTR に ARE が存在することを確認した。得られた mRNA について GP システムによって解析し、二次構造形成領域を探索した。次に、二次構造形成が予測された領域について vsfold を用いて二次構造を再度予測した。さらに、予測された二次構造の mRNA 間での類似性について検討した。

National Center for Biotechnology Information (NCBI) から入手した塩基配列をもとに ARE を探したところ、分泌タンパク質であるサイトカインの mRNA の多くには ARE が存在した (図 1)。これらの配列を GP システムで解析し、二次構造が集中する領域を検索した (図 2)。

GP システムでの結果を踏まえ、vsfold を用いて二次構造を解析したところ、複数の mRNA において、ARE に近接してループ構造の形成が予測された (図 3)。

マウスのサイトカイン mRNA を検索した結果、IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 および IL-13 のいずれの mRNA の 3'-UTR において

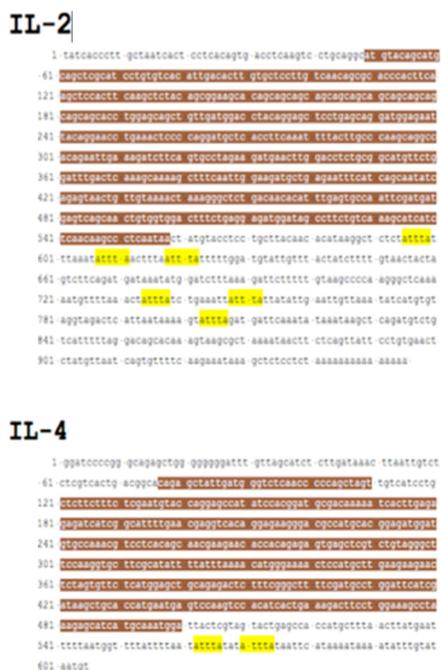


図 1. マウス由来サイトカイン mRNA の例

ORF を反転文字で示してある。黄色は ARE を示す。

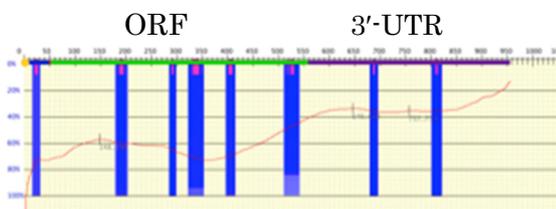
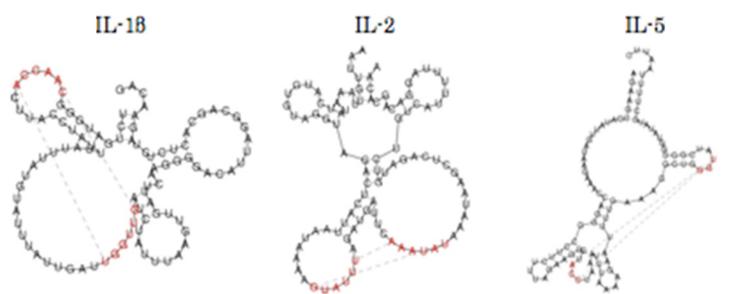


図 2. GP システムでのマウス IL-2 mRNA の解析結果。

横方向に mRNA の全領域が示されており、緑が ORF、赤紫が 3'-UTR をしめす。縦方向の青いバーは二次構造の存在を示す。

も複数の ARE が存在した。次に、ARE を含む周辺の配列の二次構造を予測したところ、特に、マウスの IL-6, IL-10, IL-12 および IL-13 において、二次構造の形成が予測された。一方、ヒトの IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 および IL13 において、二次構造の形成が予測された。これらの予測された二次構造について、比較検討を行っているが、今のところ明確な共通性は見出されていない。

これまでの解析で推定された二次構造のパターンに共通性があるかどうか、また、共通性が見出された場合にそれらに機能的な関連があるかどうか、検討する必要がある。また、さらに対象となる mRNA を拡大して解析し、免疫系特有のパターンを見いだしたい。



れた二次構造の例。

赤字はシュードノット構造の形成を示す。

これらの mRNA の量の経時変化を実験的に解析し、構造との関連を検討することをめざし、未成熟の T 細胞から、抗原刺激を受けて分化・成熟する細胞を誘導し、そこから総 RNA 遺伝子を抽出し、cDNA に変換後、塩基配列の解析を行うことを計画している。この解析からは、新たな長鎖 non-coding RNA が見出される可能性もある。

引用文献

- 1) Paschoud, S., Dogar, A. M., Kuntz, C., Grisoni-Neupert, B., Richman, L., and Kühn, L. C., Destabilization of Interleukin-6 mRNA Requires a Putative RNA Stem-Loop Structure, an AU-Rich Element, and the RNA-Binding Protein AUF1 *Mol. cell. biol.*, **26**, 8228–8241 (2006).

1-4. APOBEC1 との相互作用に必要なインターロイキン 8 mRNA 3'-UTR の構造要素 橋本香保子, 河合剛太

国立国際医療研究センターの清水裕子博士および下遠野邦忠博士らは、mRNA 編集酵素である APOBEC1 が、インターロイキン 8 (IL8) の mRNA の 3'-UTR の AU-rich element (ARE) と相互作用することを見出している¹⁾。そこで、APOBEC1 の認識に必要な構造要素の解明をめざし、IL8 mRNA の二次構造の解析を進めている。

図 1 は、IL8 mRNA 全長について、vsfold/GP システムによって二次構造解析を行った結果である。GP のパラメータは VS, VD, VI のいずれも 80% としてあり、安定な二次構造 (ステムループ) のみが表示されている。図中の緑色の部分が ORF を示しており、これに対して 3'-UTR が非常に長いことが分かる。また、図中の赤枠は ARE が集中している領域を示している。

図 2 は、3'-UTR についての解析結果で、GP のパラメータは VS=50%, VD, VI=0% (デフォルト値) としてある。赤枠は図 1 と同様に ARE が集中している領域を示しており、安定ではないが二次構造の形成が予測されている。

今後は、ARE 領域に形成が推定される二次構造の NMR 解析を含め、清水博士および下遠野博士と連携しながら、APOBEC1 との相互作用様式を明らかにすることをめざし、3'-UTR の構造解析を進める予定である。

引用文献

1. Shimizu, Y. et al., *J. Biol. Chem.* **289**, 26226-26238 (2014).

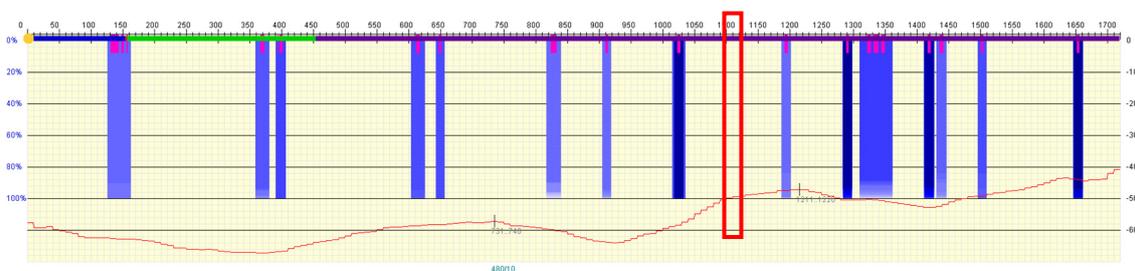


図 1 IL8 mRNA 全長の解析結果

1-5. 翻訳エンハンサー活性を有する *OsMac* 遺伝子群 5'UTR の構造解析

河合剛太

平成25年度より新しい共同研究として、植物由来 mRNA を対象とした構造解析に着手した。この解析は、東京理科大学基礎工学部の島田浩章博士との共同研究である。

イネの *OsMac* 遺伝子群 (*OsMac1*, *OsMac2*, *OsMac3*) の mRNA は長い 5'非翻訳領域 (5'UTR) をもち、これが下流の open reading frame (ORF) の翻訳量を 10~20 倍に促進することが、島田博士らによって発見されている^{1,2)}。これまでに島田博士らによって、5'UTR の二次構造が予測され、いくつかのステムループが翻訳促進に関与することが推定されている。共同研究を開始するにあたり、まず、vsfold/GP システムによって *OsMac1* および *OsMac3* の 5'UTR の二次構造解析を行った。

[*OsMac1* 5'UTR]

OsMac1 遺伝子からは、選択的スプライシングによって3種類の mRNA が合成されるが、このうち 5'UTR がもっとも長い mRNA が効率良く翻訳されることが知られており¹⁾、今回はこのもっとも長い配列について二次構造予測を行った。

図1はその結果で、図中の赤枠は効率良く翻訳される mRNA にのみ含まれる領域を示している。150 残基目付近および 480 残基目のあたりに安定なヘアピンが予測されたが (図の下段)、赤枠の位置には安定なステムループは予測されなかった。なお、この UTR において、赤枠の 5'側はピリミジンに富む配列となっており、特に 5'末端から 140nt の範囲には安定な二次構造がほとんど予測されていない。

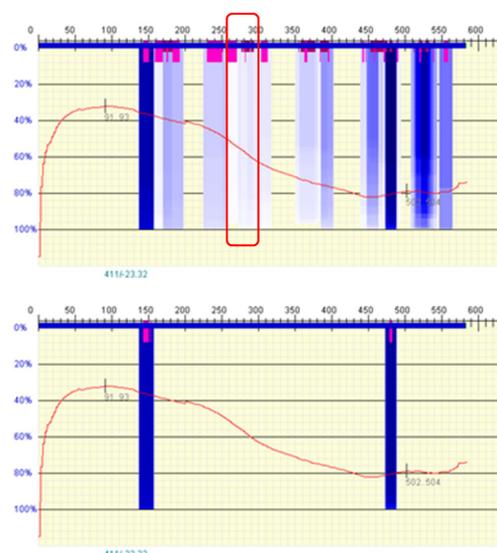


図1. *OsMac1* 5'UTR の解析結果

上段: VS 50%, VD 0%, VI 0%

下段: VS 80%, VD 80%, VI 80%

[*OsMac3* 5'UTR]

イネにおいて、*OsMac1* と相同性を示す遺伝子が3つ見出されている。このうち *OsMac2* と *OsMac3* において 5'UTR が翻訳の促進を示すことがわかっており、なかでも *OsMac3* がもっとも高い促進能を示している²⁾。そこで、*OsMac3* の 5'UTR についても vsfold/GP による解析を行った。

図2は、その結果を示している。110 残基目および135 残基目に比較的安定な二次構造が予測された。なお、この配列においても、5'末端から100 残基程度は、比較的ピリミジンに富んでいる。

OsMac1 と *OsMac3* の 5'UTR は、長さは異なるものの、5'末端側にピリミジンに富む領域を持ち、翻訳を促進するという共通の性質をもつ。すでに *OsMac3* の 5'UTR に由来する RNA 断片についての NMR 解析をスタートさせており、今後、これらの二次構造あるいは立体構造を比較することによって、翻訳促進に関与する機能構造を明らかにしたいと考えている。

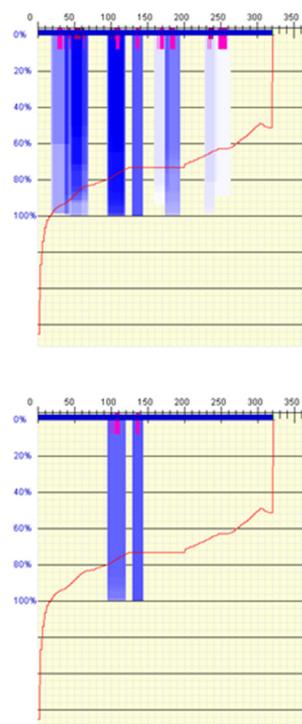


図2. *OsMac3* 5'UTR の解析結果
上段： VS 50%, VD 0%, VI 0%
下段： VS 80%, VD 80%, VI 80%

引用文献

- 1) Aoki, H. et al., *Plant Biotechnology* **31**, 221-228, 2014.
- 2) Teramura, H. et al., *Plant Biotechnology* **29**, 43-49, 2012.

業績リスト

発表論文

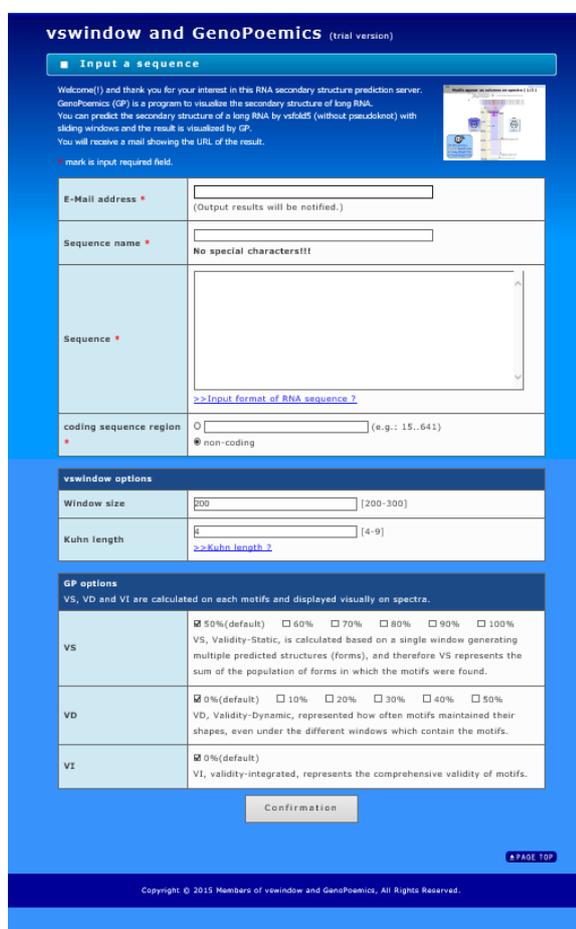
1. A new entropy model for RNA: part V, Incorporating the Flory-Huggins model in structure prediction and folding, Dawson, W. and Kawai, G., Journal of Nucleic Acids Investigation, in press. <http://dx.doi.org/10.4081/jnai.2015.2657>
2. A new entropy model for RNA: part IV, The minimum free energy and the thermodynamically most-probable folding pathway, Dawson, W. and Kawai, G., Journal of Nucleic Acids Investigation, in press. <http://dx.doi.org/10.4081/jnai.2015.2653>
3. A new entropy model for RNA: part III, Is the folding free energy landscape of RNA funnel shaped?, Dawson, W., Takai, T., Ito, I., Shimizu, K. and Kawai, G., Journal of Nucleic Acids Investigation **5**, 2652 (2014). <http://dx.doi.org/10.4081/jnai.2014.2652>
4. A new entropy model for RNA: part II, persistence-related entropic contributions to RNA secondary structure free energy calculation, Dawson, W., Yamamoto, K., Shimizu, K. and Kawai, G., Journal of Nucleic Acids Investigation **4**, e2 (2013). <http://dx.doi.org/10.4081/jnai.2013.2651>
5. A new entropy model for RNA: part I, a critique of the standard Jacobson-Stockmayer model applied to multiple cross links, Dawson, W., Yamamoto, K. and Kawai, G., Journal of Nucleic Acids Investigation **3**, e3 (2012). <http://dx.doi.org/10.4081/jnai.2012.2650>

学会発表

1. 中村慎吾, 宇遠道尊, 河合剛太, 二次構造予測に基づく長鎖 RNA の立体構造形成領域の推定, 第 15 回 RNA ミーティング, 2013 年 7 月, 松山

Web ページ

<http://www.rna.it-chiba.ac.jp/~vswindow/>



報告 2. 長鎖 RNA に見出された構造領域の構造解析およびそのための手法の開発

2-1 LINE RNA と逆転写酵素の認識特異性の決定要因

河合剛太

NMR 法による長鎖 RNA の構造解析手法の開発の一環として、散在性核内反復配列 (LINE) の逆転写酵素認識部位と考えられている RNA 領域について、逆転写酵素認識メカニズムを明らかにすることを目的とし、立体構造解析を進めている。この研究は、東京工業大学の梶川正樹博士らとの共同研究として進めている。

既にウナギの LINE RNA (UnaL2) の逆転写酵素結合部位のステムループの立体構造を決定しており、ウナギの LINE 逆転写酵素の認識において G8 が重要であり、U10 がその構造を支えていることを示した^{1,2)}。そこで、本研究ではウナギの逆転写酵素認識部位と高い類似性を持つゼブラフィッシュに着目した。ゼブラフィッシュには UnaL2 と極めて類似した ZfL2-2 と、少し差異のある ZfL2-1 がある³⁾。塩基配列の比較から、図 1 に示すように、ZfL2-1 では、UnaL2/ZfL2-2 における U10 の位置にステムループが挿入されており、G8 に対応する位置は A10 となっている。

[逆転写酵素認識部位の立体構造解析]

ZfL2-1 のステムループの立体構造を決定したところ、図 2 に示すように、A10 が内部ループ側を向いており、基本的には UnaL2/ZfL2-2 の G8 と似た構造となっていることが分かった。また、UnaL2/ZfL2-2 の U10 に相当する位置にステム 2 が位置していることが分かった。したがって、ZfL2-1 と UnaL2/ZfL2-2 において、逆転写酵素との相互作用が類似している可能性が示唆された。なお、決定した構造の座標等は、PDB および BMRB に登録した (PDB ID: 2RVO, BMRB ID: 11607)。

ZfL2-1 においても A10 が逆転写酵素による認識特異性に関与しているかどうかを調べるため、この残基を G 残基に変えた RNA (ZfL2-1-G10) を調製し、NMR スペクトルの解析を行った。その結果、基本的な構造は ZfL2-1 と同じであることが分かった。

[RNA 認識モチーフとの相互作用解析]

共同研究者の梶川博士らによって、ゼブラフィッシュ由来の LINE の逆転写酵素において RNA の特異的な認識に関与している領域が明らかにされた⁴⁾。そこで、その領域に対応す

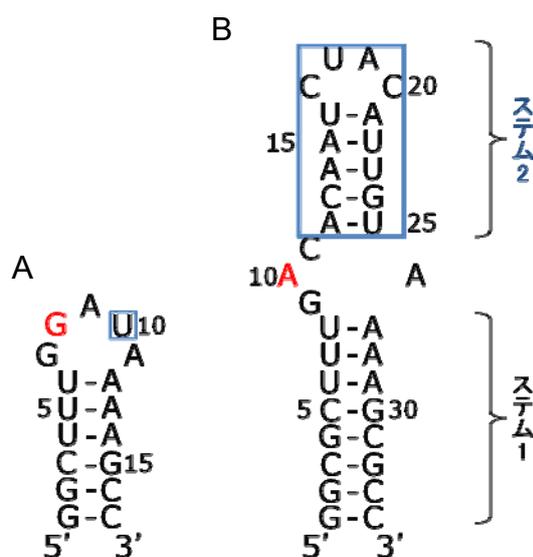


図 1. UnaL2/ZfL2-2 (A) および ZfL2-1 (B) の逆転写酵素認識部位

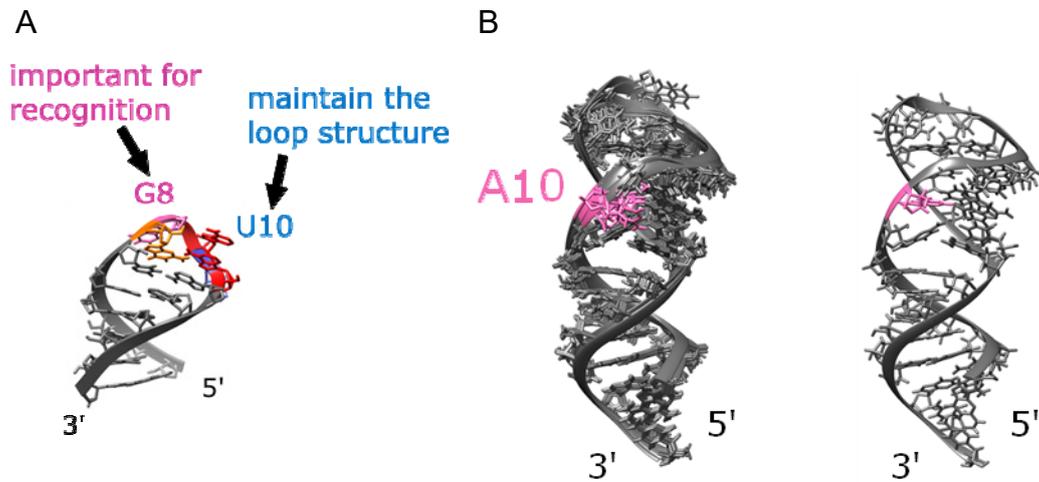


図2. UnaL2/ZfL2-2 (A) および ZfL2-1 (B) の逆転写酵素認識部位の立体構造

るペプチドと UnaL2/ZfL2-2 および ZfL2-1 との相互作用解析を行った。

ペプチドについては、安定同位体標識された試料を調製することが必要なため、SUMO タグを付加して無細胞タンパク質合成系を利用して調製し、タグ切断後に精製する方法を開発した。これは、安定同位体標識化合物のメーカーである大陽日酸株式会社と共同で、理化学研究所NMR施設の産学連携無償利用課題として実施した(外部利用課題 13-700-007, 14-700-012)。このペプチドを用いて、RNA との相互作用をゲルシフト法で解析したところ、ZfL2-2 に由来するペプチド (RRM-2-2) は、ZfL2-1 とはほとんど相互作用しないが、ZfL2-1-G10 とは複合体のバンドを示すことがわかった。逆に、RRM-2-2 は UnaL2/ZfL2-2 とは相互作用するが、G8 を A8 に変えると相互作用が弱くなることがわかった。

さらに、ZfL2-1 と RRM2-2 の相互作用を NMR 法において解析したところ、RRM2-2 を加えることによって、ZfL2-1 のイミノプロトンシグナルは大きくは変化しないが、ZfL2-1-G10 においては、複合体に由来すると予想される新しいシグナルが観測された (図 3)。現在、安定同位体標識されたペプチドを用いて、相互作用の詳細な解析を進めている。

以上のことから、逆転写酵素による ZfL2-1 および ZfL2-2 の識別に A10 および G8 が重要であることが明らかとなった。今後、この 1 塩基の識別機構の構造基盤を明らかにしたい。また、UnaL2/ZfL2-2 において、G8 がループの外側に引き出されて認識されていること、およびそのメカニズムについても NMR 法によって明らかにしたい。

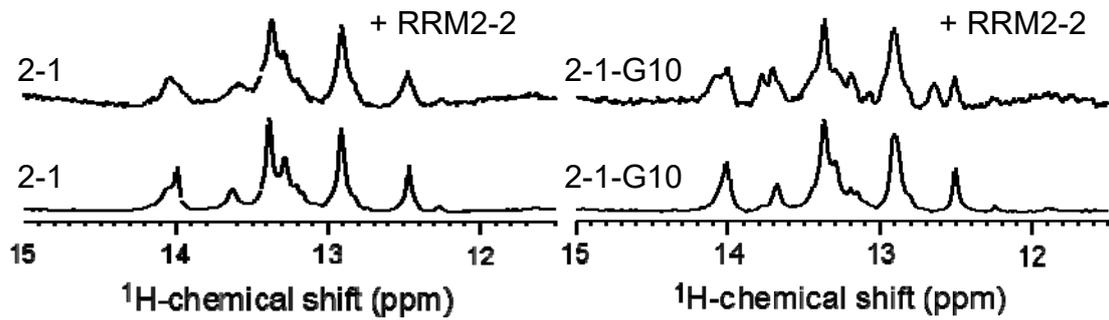


図3. 逆転写酵素由来ペプチド (RRM) と RNA との相互作用 (NMR スペクトル)

引用文献

1. Baba S. et al., *RNA* **10**, 1380–1387, 2004.
2. Nomura Y. et al., *Nucleic Acids Res.* **34**, 5184–5193, 2006.
3. Kajikawa et al., *Mol. Biol. Evol.* **22**, 673–682, 2004.
4. Hayashi Y. et al., *Nucleic Acids Res.* **42**, 10605–10617, 2014.

C 型肝炎ウイルス (HCV) のゲノム RNA において、いくつかの分子内相互作用が、その複製や翻訳に重要であることが示されている¹⁾。図 1 は、3'末端付近で見出されている 2 つの分子内相互作用を示している。本プロジェクトでは、NS5B タンパク質の遺伝子領域に存在するステムループである 5B SL3.2 と 3'-UTR の X region に存在する X-tail SL2 との相互作用 (相互作用 A : 赤字)^{2,3)}、および、5B のステムループとその上流との相互作用 (相互作用 B : 青字) に着目し⁴⁾、NMR 法による解析を進めた

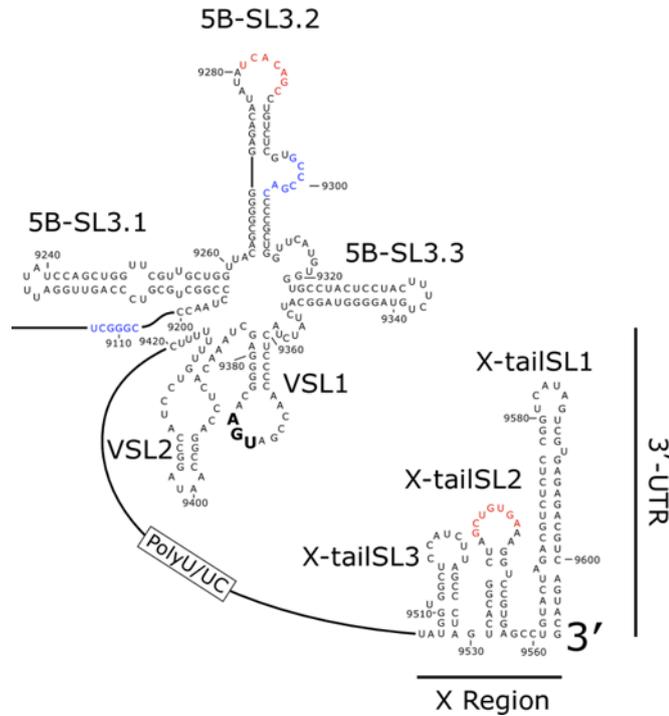


図 1. HCV ゲノム RNA の 3'末端付近における分子内相互作用

相互作用 A : 解析のための配列のデザイン

5B SL3.2 と X-tail SL2 は、ループに存在する 7 塩基の相補的な配列によって相互作用すると考えられている。そこで、それらのループを含むステムループをそれぞれデザインした (図 2)。

デザインした RNA 間の相互作用をゲルシフト法によって確認したところ、 Mg^{2+} 存在下において、複合体の形成が確認された。すなわち Mg^{2+} がキッキングループ相互作用を安定化することがわかった。さらにこの複合体の NMR スペクトルを測定したところ、 Mg^{2+} 非存在下においても分子間の塩基対が形成されていることが明らかとなった。

相互作用 A : NMR スペクトルの解析

5BSL27 と XSL28 のそれぞれの NMR スペクトルと複合体の NMR スペクトルを比較したところ、単体のスペクトルの和と複合体のスペクトルがほぼ一致することが分かった。一方、すでに述べたようにイミノプロトンシグナルの解析から、分子間の塩基対が形成されていることが確認できている。したがって、複合体形成によってそれぞれのステムループの構造は大きくは変化しな

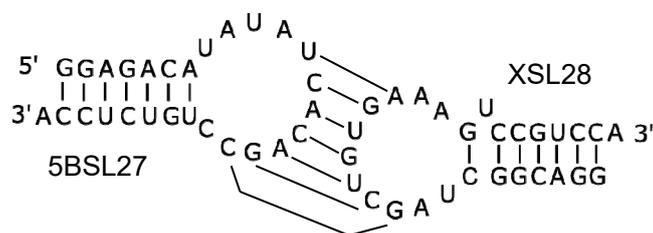


図 2. NMR 解析用の 5BSL27 と XSL28

いことが分かった。

NMR シグナルの帰属のために、A と C あるいは G と U を $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 安定同位体標識 RNA を転写合成し、それらを一つずつ含む 4 種類の複合体を調製した。図 3 は、4 種類の試料を用いて測定した NOESY スペクトルを重ねたものである。

複合体の NMR スペクトルの解析から、相補的なループの部分については、一組の弱いシグナルが観測されており、このマイナーなシグナルとメジャーなシグナルの間に交換シグナルが観測されていることがわかった。すなわち、単体の構造をある程度保持したメジャーな複合体とそれとは構造の異なるマイナーの構造が存在し、それらが互いに交換していることがわかった。今回は、メジャーな複合体について立体構造解析を進めた。

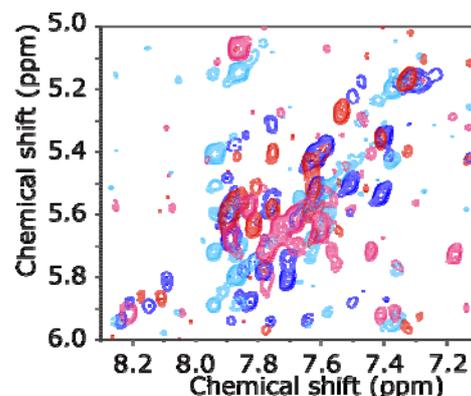


図 4. 5BSL27 と XSL28 の複合体の NOESY スペクトル

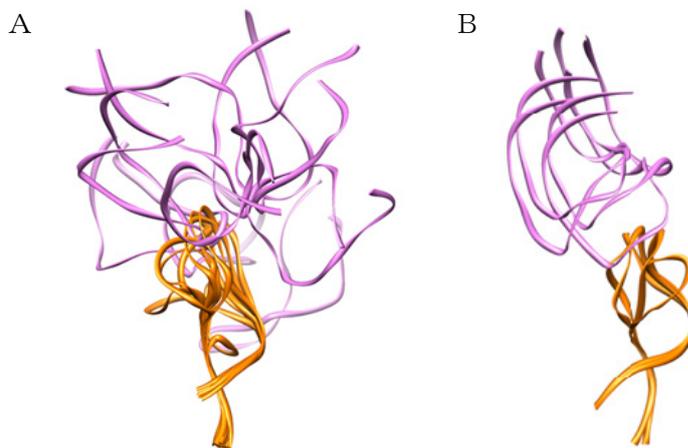


図 5. 5BSL27 と XSL28 の複合体の立体構造計算の結果
A : RDC 無, B : RDC 有. オレンジ : 5BSL27, 紫 : XSL28.
いずれも 5BSL27 のステム部分で重ね合わせてある。

相互作用 A : 立体構造解析

まず、NOE に基づく距離情報を中心とした従来法による拘束条件を用いて立体構造計算を行った (図 5 A)。5BSL27 と XSL28 のそれぞれのステムループについては構造計算がある程度は収束してはいたが、キッキングループ周辺の拘束条件が少ないこともあり、ステムループ間の位置関係は決定できなかった。次に RDC に由来する大局的な構造情報 (各塩基の向きの情報) を導入して構造計算を行ったところ、ステムループ間の位置関係が限定された。図 5 B は、互いに良く似た構造となったことを示している。

このように、RDC 情報が RNA の立体構造解析において重要であることが示された。現在、さらに RDC 情報を収集し、立体構造計算を進めているところである。

相互作用 B : 解析のための配列のデザイン

5B の SL3.2 は、バルジループにおいて相互作用すると考えられているため、図 2 のような 46 残基の RNA (5B-SL3.2) を解析用の配列とした。一方、上流側の配列は一本鎖と予想されているため、11 残基の RNA としてデザインした。

デザインした RNA 間の相互作用をゲルシフト法によって確認したところ、5 mM Mg^{2+} 存在下において、複合体の形成が確認された (図 3)。すなわち Mg^{2+} がこの相互作用を安定化することがわかった。

相互作用 B : NMR スペクトルの解析

次に、NMR 法による解析を行った (図 4)。5B-SS において、単独でイミノプロトンシグナルが観測された。これは 5B-SS がホモ二量体を形成していることによると考えており、現在その同定を進めている。5B-SL3.2 については、イミノプロトンシグナルの解析から予測どおりの二次構造が形成されていることが示唆されている。

これらの RNA をモル比 1:1 で混合したところ、解析からスペクトルを測定したところ、 Mg^{2+} 非存在下においても分子間の塩基対が形成されていることが明らかとなった。5B-SL3.2 と 5B-SS のそれぞれの NMR スペクトルと複合体の NMR スペクトルを比較したところ、イミノプロトンシグナルに変化が観測された。これらは、複合体形成による構造変化および分子間塩基対の形成を反映していると考えている。5B-SL3.2 のシグナルについては変化していないものもあることから、推定どおり、バルジループで相互作用していると考えられる。また、5B-SS 単体で形成されていた構造は解消していると思われる。

これらのことから、5B-SL3.2 と 5B-SS は Mg^{2+} 非存在下において複合体を形成し、 Mg^{2+} によってこれが安定化されることがわかった。現在、複合体の立体構造の決定をめざし、NMR シグナルの解析を進めている。

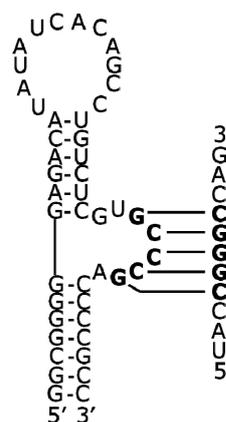


図 2. NMR 解析用の 5B-SL3.2 (左) および 5B-SS (右)

5B-SL3.2	-	+	+
5B-SS	+	-	+

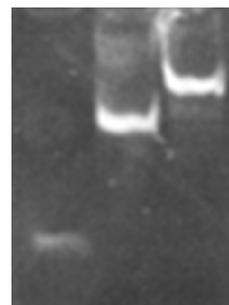


図 3 5B-SL3.2 と 5B-SS の相互作用 (ゲルシフト)

なお、これまで進めていた 5B SL3.2 と X-tail SL2 の複合体の構造解析については、現在精密および論文投稿の準備を進めている。

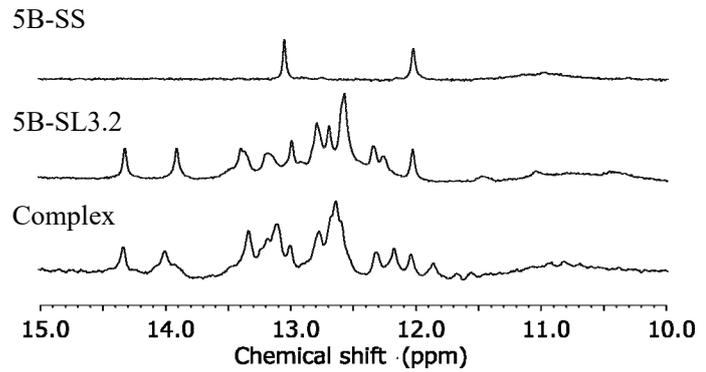


図4 5B-SL3.2 と 5B-SS の相互作用 (NMR)
Mg²⁺非存在下, 288 K.

引用文献

- 1) Shetty, S. et al., *Nucleic Acids Res.* **41**, 2526-2540, 2013.
- 2) Diviney, S. et al., *J. Virol.* **82**, 9008-9022, 2008.

2-3. NMR 法による長鎖 RNA の構造解析手法の開発

大山貴子, 河合剛太

本プロジェクトにおける課題は NMR を用いた 100 残基程度の機能性 RNA の立体構造解析手法の開発である。近年, miRNA や snoRNA, さらには mRNA 様の長鎖 RNA の非翻訳領域など, タンパク質に翻訳されない RNA (non-coding RNA, ncRNA) が細胞内において転写や翻訳制御に重要な役割を担っているという報告が数多くなされている。これらの ncRNA は 20 残基程度から数千残基にわたり, その作用機構は配列や鎖長に応じて様々である。また, mRNA の非翻訳領域にも特定の構造を形成し, その機能を制御している領域がいくつも見つまっている。一般に, 生体高分子の立体構造と機能には密接な相関があり, 立体構造解析は生体高分子の作用機構解明のために必須である。

これまでの RNA の立体構造解析の多くは, 機能性 RNA の一部のヘアピンを切り出して行われており, 実際に機能を果たす RNA の部分構造であることが多い。このため, これまでは, 部分構造を組み合わせることで全体の機能を類推する研究が多数であった。そこで本プロジェクトにおいて私は, 特定の立体構造を形成する 100nt から 300nt 程度の長さの機能性 RNA 領域を推定し, さらにその立体構造を, 機能構造を断片化することなく NMR 法によって解析する手法を開発し, 機能と構造の相関を解明することを目的とした。

(1) HCV IRES の解析

100 塩基程度の機能性 RNA のモデルとして, HCV 由来の IRES を選んだ。HCV 由来の IRES の二次構造については詳細に解析されており, 各ステムの立体構造も報告されている。したがって, 立体構造を形成している部位を探索するモデルとして適している。また, IRES の 40S リボソーム結合部位に含まれ翻訳開始に特に重要な役割を果たすコア領域 (IIIe, IIIf, IV) は, その活性に Mg^{2+} が必須であるが, Mg^{2+} が配位した活性型の構造は明らかになっていない。コア領域はその鎖長が約 100 塩基であり, これまでの NMR による RNA の立体構造解析手法では構造決定が困難な鎖長であった。そこで, 長鎖 RNA の立体構造解析手法の開発にはコア領域を用い, また同時に IRES の翻訳開始メカニズムの解明もめざすこととした。

長鎖 RNA の立体構造解析を行うためには, 他の生体高分子の立体構造解析と同様に適切な解析配列の選択が重要である。そのため, ①長鎖 RNA 上の二次構造形成部位の予測と, ②その部位の二次構造を的確に予測することは長鎖 RNA の立体構造決定において重要なステップである。本プロジェクトでは, 二次構造の予測には vsfold5 を用い, ①の解析に GenoPoemics を用いることにした。IRES を含む HCV ゲノムの一部 (約 1500 塩基) を GenoPoemics により解析した

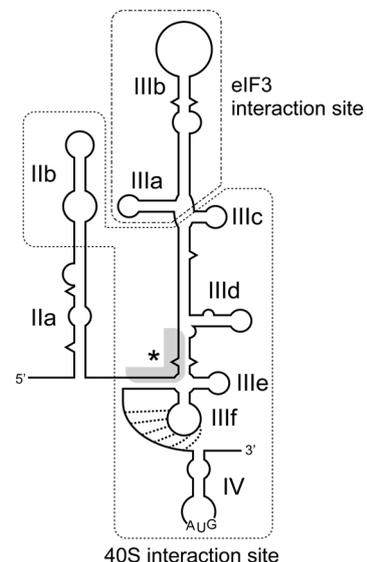


図1 HCV IRES の模式図

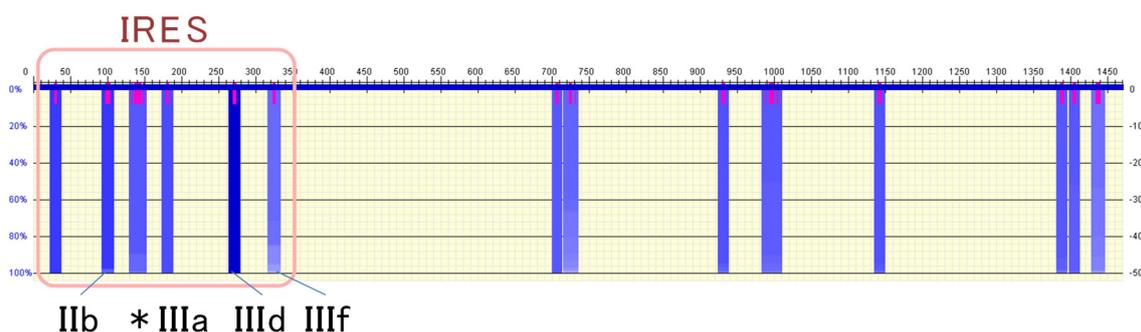


図2 GenoPoemicsによるIRESを含むゲノムの解析結果

結果, 図2に示したとおり, IRES 部位に構造形成部位があることが予測された. 得られた構造形成部位は IRES のステムと良く一致していた. さらに, vsfold5 で IRES 部位 (約 280 塩基) の二次構造予測を行ったところ, 図3に示す通り, IRES の二次構造と良く一致していた.

次に, IRES のコア領域に相当する 91 塩基の RNA について, 91 塩基全長 (Core91) と 2 種のコア領域部断片 (Core52: ステム IIIe-IIIf 部位, Core24: ステム IV 部位, 図4) を調製し, その NMR スペクトルを測定した. その結果, Core91 は Core52 と Core24 のそれぞれのイミノプロトンシグナルの重ね合わせとほぼ一致した (図5A). このことから, Core52 と Core24 は Core91 の部分構造であることが示唆された. また, コア領域はその活性に Mg^{2+} が必須である. そこで, Core52 について Mg^{2+}

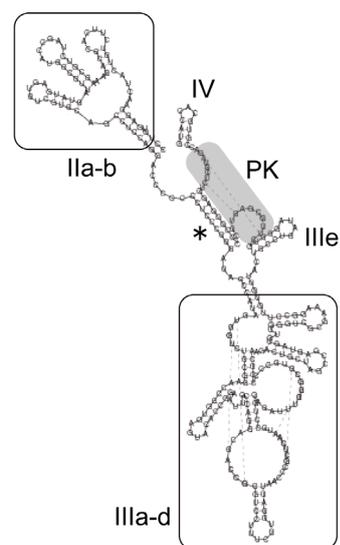


図3 vsfold5によるIRESの二次構造予測

の添加実験を行った. その結果, IRES コア領域は Mg^{2+} の添加の有無により, イミノプロトン領域のスペクトルの化学シフト値が変化することが分かった (図5B). このことから, コア領域は活性型 (Mg^{2+} 結合型) と不活性型で立体構造が異なることが示唆される.

アデノシン残基 (A), ウリジン残基 (U) をそれぞれ $^{13}C, ^{15}N$ 同位体標識した 2 種類の部分標識コア領域試料を用いた ^{15}N HMQC, ^{13}C SQC スペクトルから A, U の非交換性プロトンシグナルと AU および GU 塩基対のイミノプロトンシグナルを判別した. さらに, 不活性型 (Mg^{2+} 非存在下) の Core91 の NOESY スペクトルにおいて, A H2 シグナルから U imino シグナルに強い NOE が複数観測された (図4B). これらの強い NOE は AU 対形成によって A H2 と U imino 間が $\sim 3\text{\AA}$ となるため観測されたものと推測される. 3つのコンストラクトの NOESY スペクトルとの比較から, 図4Bに示す通りの暫定的な帰属を行った. U89-A283 (図4A i) のクロスピークは Core91 と Core52 で, U298-A310 (図4A vii) は Core91 と Core24 でそれぞれ化学シフトの一致したクロスピークが観測されたことから推定した. A250-U259 (図4A iv) は Core91 でのみクロスピークが観測され, なおかつ, G99-U249 対のイミノプロトンとクロスピークが生じることからそれぞれ推定した. GU 塩基対と隣接する AU 塩基対は予想される構造中で A250-U259 塩基対のみが該当する. このことから, 2価金属イオン (Mg^{2+}) 非存在下 (不活性型) でも A250-U259 塩基対が形成さ

れることが示唆された。活性型のコア領域については 2 次元 NOESY スペクトルにおいてシグナルの著しい線幅増加が見られたため、現在、測定条件の検討を行っている。今年度以降は活性型コア領域の NMR スペクトルの改善(測定条件の検討, TROSY-HSQC の測定)を試みる。さらに、安定ニトロキソラジカルをもつ非天然核酸を導入した試料を調製し、常磁性緩和を利用した $\sim 25\text{\AA}$ の距離情報の取得を試みる予定である。また、RDC の

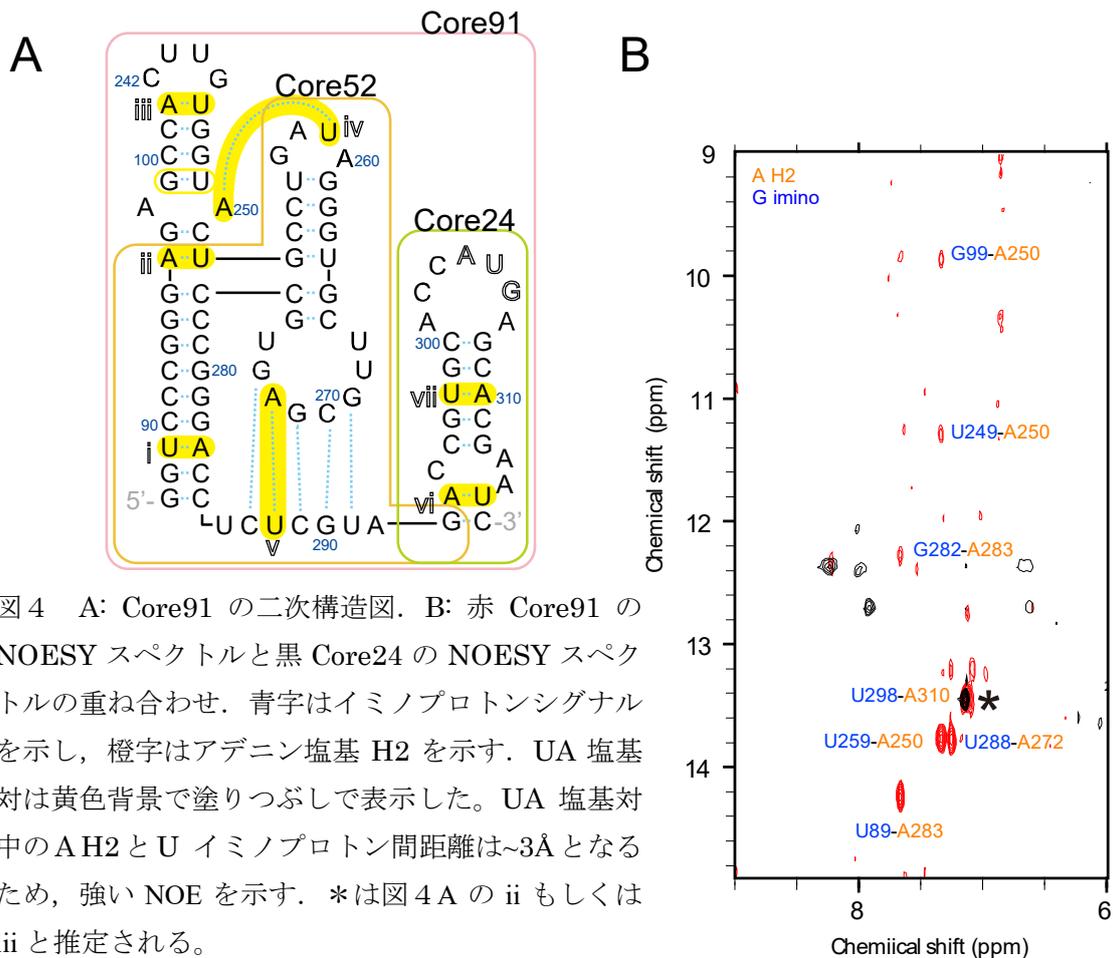


図4 A: Core91 の二次構造図. B: 赤 Core91 の NOESY スペクトルと黒 Core24 の NOESY スペクトルの重ね合わせ. 青字はイミノプロトンシグナルを示し, 橙字はアデニン塩基 H2 を示す. UA 塩基対は黄色背景で塗りつぶして表示した. UA 塩基対中の AH2 と U イミノプロトン間距離は $\sim 3\text{\AA}$ となるため, 強い NOE を示す. * は図 4A の ii もしくは iii と推定される.

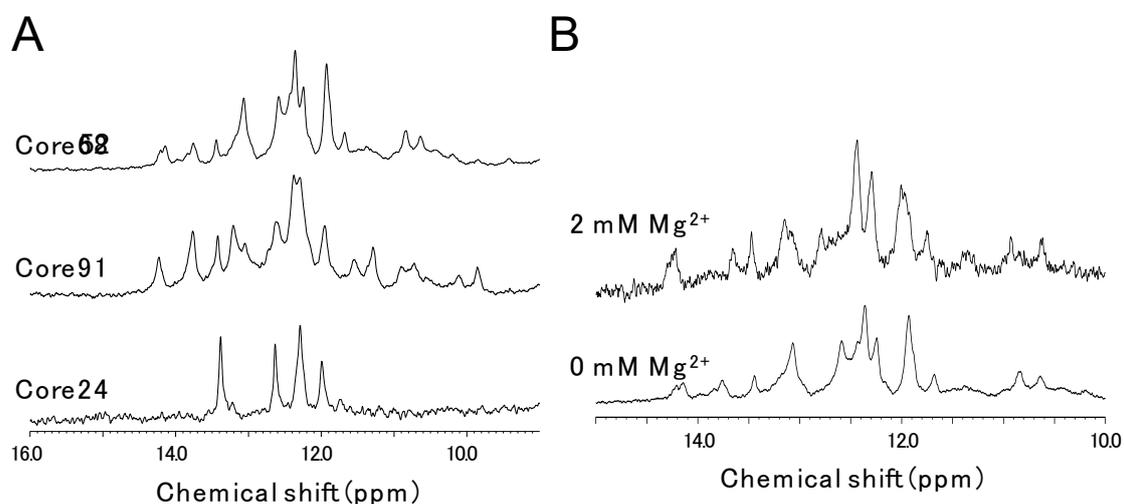


図5 A: Core91, Core52, Core24 の 1D ^1H -NMR スペクトルのイミノプロトン領域. B: Mg^{2+} の添加による Core52 イミノプロトンシグナルの化学シフト変化.

測定も試みる予定である。これらの測定と解析の完了後、従来の NOESY ベースの構造決定手法に常磁性緩和および RDC を加えた構造解析を行い、X 線結晶構造解析により示された不活性型の IRES コア領域の構造との詳細な比較を行い、IRES コア領域の活性型の構造解析と機能—構造相関の解析を行う。

(2) 高度好熱菌由来リボスイッチの解析

100 残基程度の機能性 RNA のモデルとして *Thermus thermophilus* HB8 において発見されたリボスイッチを解析対象とした。この配列は、*Thermus thermophilus* HB8 のマイクロアレイ解析によって、特定の栄養状態の時にこの領域の下流に存在する TPP 生合成系の 7 つの遺伝子の転写量が増大することから発見したもので、これまでに

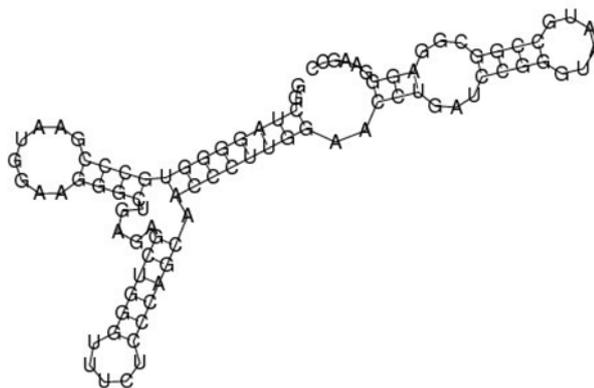


図1 リボスイッチの二次構造

知られているコンセンサス配列との比較から、TPP リボスイッチであると推定した。これまで、さまざまなリボスイッチについて、X 線結晶構造解析によってリガンド分子との複合体の立体構造解析がなされているが、リガンド未結合の状態での立体構造ははまだ決定されていない。そこで本研究では、100 残基程度からなる RNA の立体構造解析のみでなく、リガンドの bound/unbound によるリボスイッチの立体構造変化の詳細な解析を試みている。さらに、100 塩基を超える RNA の構造解析に有用と考えられる常磁性プローブの導入を、人工塩基対システムを利用して実現し、その NMR スペクトルの測定を行った。

図1は、二次構造予測プログラム vsfold5 で予測された TPP リボスイッチの二次構造である。この予測結果に基づき、NMR 法

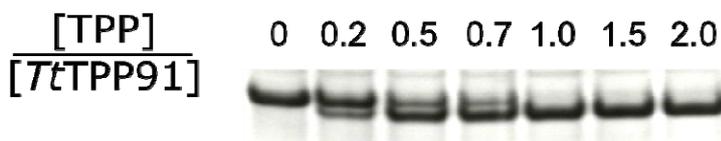


図2 TPP リボスイッチと TPP との電気泳動法による相互作用解析

による構造解析のための 91 残基の RNA (*Tt*TPP91) をデザインした。次に、*Thermus thermophilus* HB8 のゲノム DNA より *Tt*TPP91 に対応する DNA 断片をクローニングし、それをテンプレートとして RNA を酵素合成した。得られた *Tt*TPP91 について、Mg²⁺存在下でゲルシフト解析を行ったところ、リガンドの添加に伴い、*Tt*TPP91 のみの場合よりも泳動度の高い新たなバンドが検出された(図2)。このことからリガンドの結合により、*Tt*TPP91 に構造変化が起こり、リガンドを結合していない状態よりもコンパクトな構造になることが示唆された。

より詳細な構造変化の解析のため、NMR 法によって *Tt*TPP91 の TPP 滴定実験を行った。その結果を図 3 に示す。TPP の添加量の増加にともない、イミノプロトンが観測される領域に複合体由来と考えられる新たなシグナルが観測された。また、一部のシグナルは TPP の添加にともない消失した。[TPP]/[*Tt*TPP91]<1 のとき RNA 単体と TPP-RNA 複合体由来の両方のシグナルが同時に観測されたことから、TPP との交換速度は NMR のタイムスケールよりも遅いことが分かった。また、*Tt*TPP91 に対し TPP を 1 等量添加したところで化学シフト変化が終了したことから、*Tt*TPP91 と TPP は 1 対 1 で複合体を形成していることが示唆された。また、TPP 非存在下と結合時を比較して、結合状態でイミノプロトンシグナルの数が増加していることから、TPP の結合によって、複数の新たな水素結合が形成されることが示唆された。したがって、この RNA は、100 残基程度の RNA の構造解析のターゲットとして適していることがわかった。

図 4 は、*Tt*TPP91 と TPP 複合体の NOESY スペクトルである。青色で示したクロスピークは、*Tt*TPP91 と TPP の分子間 NOE を、また、オレンジ色は TPP の分子内 NOE を示している。多くの分子間 NOE が観測されていることから、TPP が RNA によって厳密に認識されていることが推定できる。また、NOESY スペクトル上で正の強い分子内 NOE クロスピーク観測されていることから TPP の運動が分子量の大きい RNA に束縛されていることが示されている。

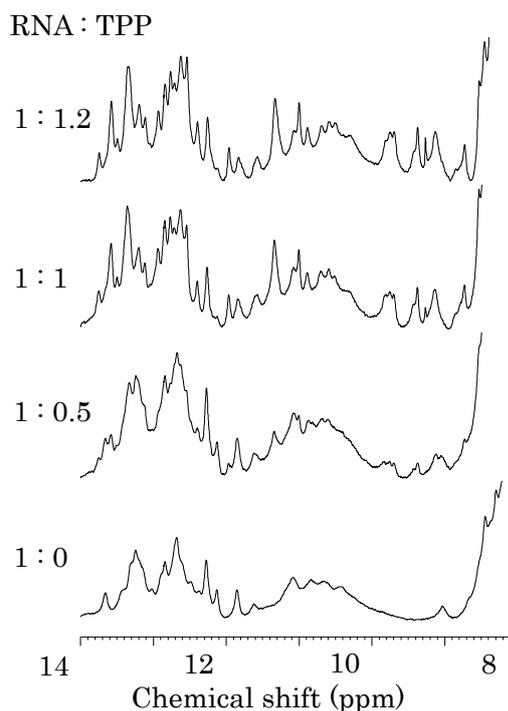


図 3 *Tt*TPP91 と TPP との NMR 法による相互作用解析

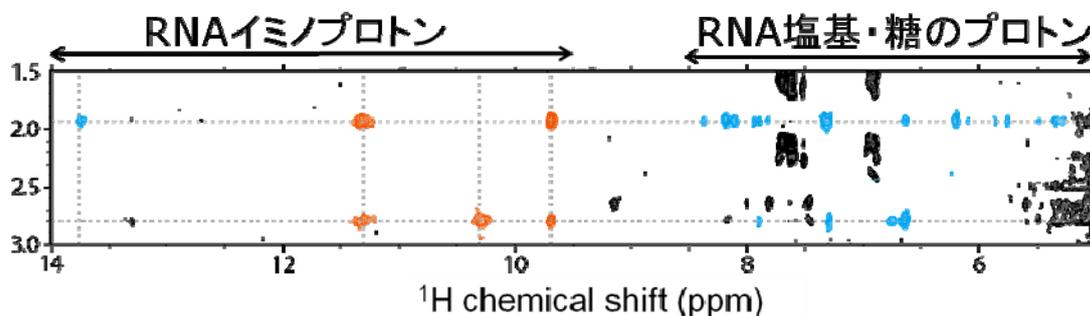


図 4 *Tt*TPP91 と TPP の複合体の NOESY スペクトル
青色は分子間 NOE. オレンジ色は TPP の分子内 NOE.

*Tt*TPP91 の立体構造および相互作用の解析を効率よく行うために、理化学研究所の平尾一郎博士と共同研究で、人工塩基対を利用した転写反応を行い、常磁性タグを特定の残基に導入した。この方法は、これまでに例のない画期的なものである。得られた常磁性タグ付き *Tt*TPP91 と TPP との複合体の NMR スペクトルを図 5 に示した。常磁性タグの存在によっていくつかのシグナルの強度が減少しており、常磁性タグの近くに位置していることがわかる。なお、9.1 ppm 付近にある遊離の TPP のシグナルは常磁性タグの影響を受けていないことがわかる。

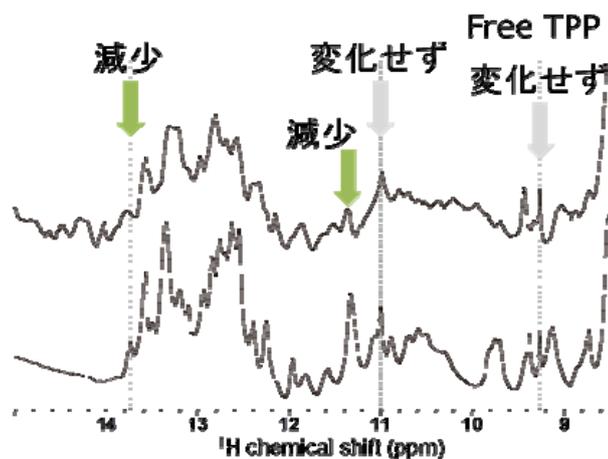


図 5 残基特異的に導入した常磁性タグによる NMR スペクトルの変化
上段：常磁性タグあり．下段：タグ無し．

現在、*Tt*TPP91 の NMR シグナルの帰属を行うため、位置特異的な安定同位体標識導入を進めている。超高分解能の分光計の利用と組み合わせることによって、この RNA のシグナルの効率よく解析し、立体構造が決定できることを示したいと考えている。

J-motif RNA は、本プロジェクトのメンバーである中村慎吾博士によって、BDNF, SCRT1, GAS7, CADM1, GSK3B, および RHOB という神経系の分化に関連した遺伝子の mRNA に見出された特徴的な配列に由来する RNA である。この配列は、通常の二次構造予測プログラムでは、二次構造形成が全く予測されないが、中村博士らは、I-motif に似た構造が形成される可能性を指摘している。図3は、PDB に登録されている I-motif RNA (四量体) の構造と、それに基づいて作成した J-motif RNA (単量体) のモデル構造である。vsfold と GenoPoemics を用いた解析において全く二次構造が予測されない領域が、実は構造を形成するという特殊な例ではあるが、実際に特定の立体構造を形成しているかを NMR 法によって解析することとした。

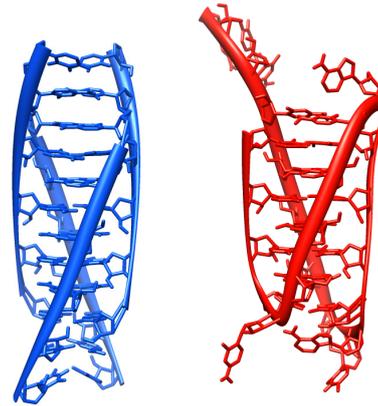


図3. I-motif (左, PDB 1I9K) の構造と J-motif (右) のモデル構造

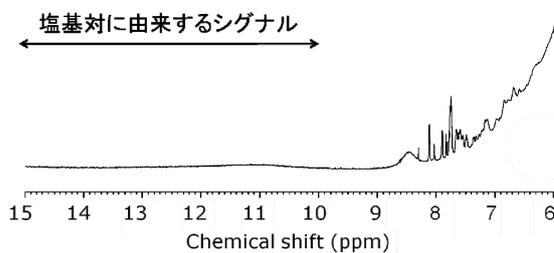


図4. J-motif RNA の NMR スペクトル
軽水中, 283 K

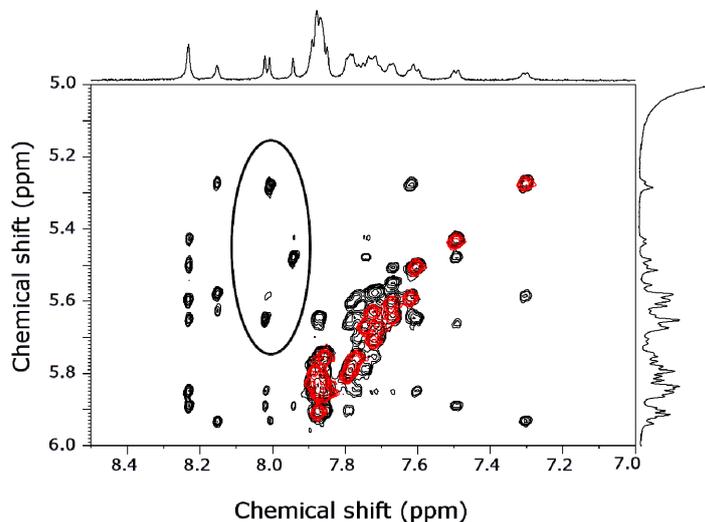


図5. J-motif RNA の NOESY スペクトル
重水中, 283 K

図4は、J-motif RNA の軽水中における NMR スペクトルを示している。RNA がワトソン・クリック塩基対による通常のステム構造を形成している場合には、15-10 ppm 付近に塩基対に由来するイミノプロトンシグナルが観測されるはずであるが、J-motif RNA に関しては少なくともシャープなシグナルは全く観測され

なかった。このことは二次構造予測の結果と対応している。しかしながら、図5に示したように、重水中の NOESY スペクトルでは、3つの A 残基の H2 から非常に強い NOE が観測され (図中の丸内)、これまでの解析から、これらのシグナルは配列上隣り合う残基との NOE ではないことが分かっている。したがって、これらの NOE は、特徴的な構造の形成を示唆し

ている。なお、図3のモデルでは、U-C塩基対の形成を想定しているが、この塩基対において、イミノプロトンが観測されるかどうかはわからない。また、モデルにおいてA残基は分子の端に位置しており、詳細なコンホメーションは不明のため、H2からの強いNOEの由来も推定できていない。

今後は化学合成法によって、J2 RNAの特定の位置を安定同位体で標識したRNA試料などを活用してJ-motif RNAのNMRシグナルを帰属し、その立体構造を決定することによって、J-motif RNAの機能について検討するとともに、結果としてGP/vsfoldシステムの有用性を示したい。

業績リスト

発表論文（予定含む）

1. Otsu, M., Norose, N., Arai, N., Terao, R., Kajikawa, M., Okada, N. and Kawai, G., Solution structure of a reverse transcriptase recognition site of a LINE RNA from zebrafish（投稿準備中）

それ以外の発表論文

1. Okui, S., Ushida, C., Kiyosawa, H., and Kawai, G., Sequence and structure analysis of a mirror tRNA located upstream of the cytochrome oxidase I mRNA in mouse mitochondria, *J. Biochem.* **159**, 341-350 (2016). PMID: 26519737
2. Kanagawa, M., Baba, S., Watanabe, Y., Nakagawa, N., Ebihara, A., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Sampei, G., and Kawai, G., Crystal structures and ligand binding of PurM proteins from *Thermus thermophilus* and *Geobacillus kaustophilus*, *J. Biochem.* **159**, 313-321 (2016). PMID: 26515187
3. Masuda, T., Sato, Y., Huang, Y.-L., Koi, S., Takahata, T., Hasegawa, A., Kawai, G., and Kannagi, M., Fate of HIV-1 cDNA intermediates during reverse transcription is dictated by transcription initiation site of virus genomic RNA, *Scientific Reports* **5**, 17680, (2015) PMID: 26631448
4. Kiyosawa, H., Okumura, A., Okui, S., Ushida, C., and Kawai, G., Secondary structure-based analysis of mouse brain small RNA sequences obtained by using next-generation sequencing, *Genomics* **106**, 122-128 (2015). PMID: 26003051
5. Tsukimoto, A., Sugiyama, R., Abe, M., Nishitsuji, H., Shimizu, Y., Shimotohno, K., Kawai, G. and Takaku, H., A new role for PGA1 in inhibiting hepatitis C virus-IRES-mediated translation by targeting viral translation factors, *Antiviral Res.* **117**, 1-9 (2015). PMID: 25666760
6. Okui, S. and Kawai, G., In NMR tube transcription for rapid screening of RNA conformation. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids* **34**, 103-113 (2015). PMID: 25621704
7. Shibata, H., Shinozaki, R., Ogura, T., Sakai, H., Abe, M., Kawai, G., and Hashimoto, K., Fabrication and BSA adsorption/desorption properties of titania/silica composite films modified with silane coupling agents., *J Oleo Sci.* **63**, 1077-1083 (2014). PMID: 25213446
8. Zhang, F., Hoque, M. M., Jiang, J., Suzuki, K., Tsunoda, M., Takeda, Y., Ito, Y., Kawai, G., Tanaka, H., Takénaka, A., The Characteristic Structure of Anti-HIV Actinohivin in Complex with Three HMTG D1 Chains of HIV-gp120, *Chembiochem* **15**, 2766-2773 (2014). PMID: 25403811
9. Hashi, Y., Kawai, G. and Kotani, S., Microtubule-associated protein (MAP) 4 interacts with microtubules in an intrinsically disordered manner, *Biosci Biotechnol Biochem.* **78**, 1864-1870, (2014). PMID: 25052097
10. Sampei, G., Kanagawa, M., Baba, S., Shimasaki, T., Taka, H., Mitsui, S., Fujiwara, S., Yanagida,

- Y., Kusano, M., Suzuki, S., Terao, K., Kawai, H., Fukai, Y., Nakagawa, N., Ebihara, A., Kuramitsu, S., Yokoyama, S. and Kawai, G., Structures and reaction mechanisms of the two related enzymes, PurN and PurU, *J. Biochem.* **154**, 569–579 (2013). PMID: 24108189
11. Nomura, Y., Tanaka, Y., Fukunaga, J., Fujiwara, K., Chiba M., Iibuchi, H., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kawai, G., Kozu, T. and Sakamoto, T., Solution structure of a DNA mimicking motif of an RNA aptamer against transcription factor AML1 Runt domain, *J. Biochem.* **154**, 513-519 (2013). [JB 論文賞] PMID: 23997091
 12. Fukunaga, J., Nomura, Y., Tanaka, Y., Amano, R., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kawai, G., Sakamoto, T. and Kozu, T., The Runt domain of AML1 (RUNX1) binds a sequence-conserved RNA motif that mimics a DNA element, *RNA* **19**, 927-936 (2013). PMID: 23709277
 13. Hatano, A., Okada, M. and Kawai, G., Solution structure of S-DNA formed by covalent base pairing involving a disulfide bond, *Org. Biomol. Chem.*, **10**, 7327-7333 (2012). PMID: 22875009
 14. Suzuki, S., Yanai, H., Kanagawa, M., Tamura, S., Watanabe, Y., Fuse, K., Baba, S., Sampei, G. and Kawai, G., Crystal Structure of *N*-formylglycinamide ribonucleotide amidotransferase II (PurL) from *Thermus thermophilus* HB8, *Acta Cryst.* **F 68**, 14-19 (2012). PMID: 22232163
 15. Someya, T., Baba, S., Fujimoto, M., Kawai, G., Kumasaka, T. and Nakamura, K., Crystal structure of Hfq from *Bacillus subtilis* in complex with SELEX-derived RNA aptamer: insight into RNA-binding properties of bacterial Hfq, *Nucl. Acids Res.* **40**, 1856-1867 (2012). PMID: 22053080

学会発表（本プロジェクトに関係するもの）

1. 大津舞菜, 梶川正樹, 河合剛太, LINE RNA の特異性を決定するステムループとペプチドとの相互作用解析, 第 54 回 NMR 討論会 (日本核磁気共鳴学会年会), 2015 年 11 月, 千葉
2. 藤田舜介, 大山貴子, 染谷龍彦, 木本路子, 平尾一郎, 河合剛太, 人工塩基対を利用した RNA へのスピンラベルの導入と NMR 法による相互作用解析への応用, 第 54 回 NMR 討論会 (日本核磁気共鳴学会年会), 2015 年 11 月, 千葉
3. 大津舞菜, 梶川正樹, 河合剛太, LINE RNA を特異的に認識するペプチドの構造解析, BMB2015, 2015 年, 神戸
4. 片平智子, 松永美穂, 大友裕貴, Pratima Chaudhuri, 河合剛太, HCV ゲノム RNA の NS5B タンパク質コード領域における RNA-RNA 相互作用の解析, BMB2015, 2015 年, 神戸
5. 大津舞菜, 梶川正樹, 河合剛太, LINE RNA と逆転写酵素の特異的な相互作用の解析, 第 17 回 RNA ミーティング, 2015 年, 札幌
6. 大津舞菜, 梶川正樹, 河合剛太, "LINE RNA と逆転写酵素の認識特異性の決定要因", 第 53 回 NMR 討論会 (日本核磁気共鳴学会年会), 2014 年 11 月, 大阪
7. 大友裕貴, Pratima Chaudhuri, 河合剛太, "HCV ゲノム RNA における NS5B タン

- パク質コード領域の SL3.2 とその 200 残基上流の一本鎖領域との相互作用の解析”, 第 53 回 NMR 討論会 (日本核磁気共鳴学会年会), 2014 年 11 月, 大阪
8. Maina Otsu, Nao Norose, Nao Arai, Ryou Terao, Masaki Kajikawa, Norihiro Okada, and Gota Kawai, “Structures of reverse transcriptase recognition sites of LINE RNA”, 26th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Aug. 24-29, 2014, Dallas, Texas, USA.
 9. 大友裕貴, 下地真理子, 齊藤裕之, 千勝大輔, 河合剛太, HCV ゲノム RNA における分子内 RNA-RNA 相互作用の解析, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月, 神戸
 10. 片平智子, 奥村健介, 中村慎吾, 河合剛太, 神経特異的 mRNA における構造形成領域の立体構造解析, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月, 神戸
 11. 大津舞菜, 野呂瀬直, 新井直, 寺尾亮, 梶川正樹, 岡田典弘, 河合剛太, LINE RNA 逆転写酵素認識部位の立体構造と機能, 第 52 回 NMR 討論会 (日本核磁気共鳴学会年会), 2013 年 11 月, 金沢
 12. 大津舞菜, 野呂瀬直, 新井直, 寺尾亮, 梶川正樹, 岡田典弘, 河合剛太, “LINE RNA 逆転写酵素認識部位の立体構造解析”, 第 15 回 RNA ミーティング, 2013 年 7 月, 松山
 13. Yuki Otomo, Mariko Shimoji, Hiroyuki Saito, Daisuke Chikatsu, Gota Kawai, "NMR analysis of RNA-RNA interactions necessary for RNA replication of HCV genome", 第 39 回国際核酸化学シンポジウム, 2012 年 11 月, 名古屋.
 14. 大山貴子, 河合剛太, “100 残基を超える機能性 RNA の NMR 法による立体構造解析” 第 51 回 NMR 討論会 (日本核磁気共鳴学会年会), 2012 年 11 月, 名古屋
 15. 大山貴子, 河合剛太, “NMR による鎖長 100 残基を超える機能性 RNA の立体構造解析手法の開発” 第 14 回 RNA ミーティング, 2012 年 7 月, 仙台
 16. 大山貴子, 河合剛太, “Structural analysis of functional RNA longer than 100 nt by using NMR”, 第 51 回 NMR 討論会 (日本核磁気共鳴学会年会), 2011 年 11 月, 横浜
 17. 大山貴子, 河合剛太, “長鎖 RNA の機能構造を発見するための技術基盤の開発”, 第 10 回新しい RNA/RNP を見つける会, 2011 年 9 月, 沖縄

報告 3. HIVゲノムRNAにおける構造領域の機能の推定

高久洋

HIVゲノムRNAにおける構造領域を特定し、その機能を推定することをめざし、以下の解析を行った。

- 1) T細胞内miRNAによるHIV-1の複製制御
- 2) HEXM1-7SKsnRNA-P-TEFb複合体はHIV-1Tatの活性を制御する

また、HCVゲノムRNAについての解析も行った。

- 3) 宿主内因子, Prostaglandin A₁(PGA₁) によるHCV-IRES依存的翻訳阻害

本解析によって見出されたウイルスのゲノムRNAの領域の二次構造あるいは立体構造を解析することは、ゲノムRNAの機能解析およびRNAウイルスに対する新しい抑制機構の開発につながると期待できる。

3-1 T細胞内miRNAによるHiv-1の複製制御

Human Immunodeficiency Virus type 1(HIV-1)は約 9,700 塩基からなる RNA をゲノムとしてもつレトロウイルスであり、感染時、また宿主細胞のゲノムに組み込まれたプロウイルスの状態から産生された mRNA や、次世代のゲノムとなる完全長の RNA は当然細胞内 miRNA の標的になると予想される。HIV-1 複製に細胞内 miRNA はどのような影響を及ぼすのか、実際に標的となるであろう部位を同定し、miRNA の抑制効果を解除させるために変異を導入したウイルスの解析を行った。また、HIV-1 はウイルス複製を負に制御する細胞内 miRNA の機能を相殺する機能を有していると考えられることから、モデル系を構築して検討を行った。

(1) HIV-1 ゲノム RNA を標的とする miRNA の探索

データベースに登録されている miRNA が HIV-1 を標的とするかの検討を行うため、miRNA と HIV-1 との対合を塩基配列の相補性から試みた。その際、miRNA はその 5' 端の 2 塩基から 8 塩基目までで標的 RNA を識別するとの報告や、同種でも、あるいは異種の miRNA であっても、多数の miRNA の被標的配列が隣接して存在する RNA は 1 箇所の被標的配列を持つ RNA よりも強く発現の抑制が観察されるとの報告を配慮した。これらの条件にあった部分配列を PCR による増幅、または合成したオリゴヌクレオチドのアニーリングを行い、psiCHECKTM-2 ベクター内のウミシイタケ遺伝子下流の 3'非翻訳領域へと挿入を行った。psiCHECKTM-2 ベクターにはホタルルシフェラーゼ遺伝子も組み込まれているので、細胞内に導入した際に、形質導入のコントロールとした。T 細胞由来で HIV-1 感染性の M4C8 細胞と Jurkat E6 cells に、HIV-1 の部分配列を含むベクターを形質導入し、ホタルルシフェラーゼ値に対するウミシイタケルシフ

フェラーゼ値の比活性から、細胞内でウミシイタケルシフェラーゼの活性に抑制的な影響を持つ配列を多数同定した。その結果、*pol* 領域、*env-nef* 領域において確認された抑制配列は、未だ確認されていない新たな機能を担う配列と示唆されたことから、更なる検討を行った。抑制効果を解除するように変異を導入したウイルスでは、ウイルスタンパク質の増加と共に、産生されるウイルス量の増加が期待される。しかし、これらの複数箇所に変異を導入したウイルスの産生量は減少する結果が得られた。これらの結果から、miRNAの抑制配列がウイルスゲノムのパッケージングとウイルスタンパク質の発現効率のバランスを担っている可能性が示唆され、HIV-1ウイルスがmiRNA interferenceに適応し、これを利用している可能性が示唆された。

(2) 標的部位の変異による抑制解除の解析

つぎに、*pol*領域、*env-nef*領域において確認された抑制はmiRNAによる抑制効果か否かを確認するため、miRNAによる抑制効果を解除するように*pol*領域および*env-nef*領域に部位特異的変異を導入したウイルスを作製した。部位特異的変異体はアミノ酸配列には影響を与えなうように構築した。変異体を用いてウイルスの標的遺伝子部位に抑制効果の解除を検討したところ、TからAへの1塩基変異あるいはCTからTAへの2塩基変異体で高い抑制解除効果が認められ、その結果としてAU量が増加した。これらの変異体はAUに富んだ配列中に連続した点変異として知られている。従ってこの領域の抑制効果はINS/CRS効果と関連性があることが示唆された。

以上の結果より*pol*領域、*env-nef*領域において確認された抑制配列に対し、その抑制配列に変異を導入することで抑制の解除が確認されたことから宿主内miRNAによるHIV-1複製制御であることが示唆された。

(3) 見出したmiRNAによる抑制機構の解析

RNAによるHIV-1複製制御にはDroshaが深く関わっていることから、DroshaをsiRNAでknock-downすることでmiRNAによるHIV-1複製制御機能を明らかにすることを検討した。実際に二種類のDrosha-siRNA-1, 2を構築した。特にDrosha-siRNA-2は、off-targetを伴わないThermo ScientificのON-TARGETplus SMARTpool siRNAs, and Human RNASENを用いた。その結果、両Drosha-siRNA-1, 2とも約99%の効率で標的とするDroshaをknock-downする事が出来た。さらにDroshaをknock-downしたJurkat細胞系に*pol*領域および*env-nef*領域を標的としたpsiCHECKTM-2を導入し、そのluciferase活性を測定した。その結果、両Drosha-siRNA-1, 2 knock-down細胞でmiRNAによるluciferase活性は減少した。以上の結果より当研究で見出されたmiRNAは実際にmiRNAの機能として要求されるDroshaを必須としていることから、HIV-1を標的としたmiRNAであることが示唆された。

見出されたmiRNAが実際に、HIV-1を標的としたmiRNAであることが示唆されたことから、さらにRNA-IPでAgp2と標的mRNAとの相互作用を検証する事でmiRNA機構を詳細にする事を試みた。miRNAの機能を発揮するには細胞質内P-bodyでAgp2/標的mRNA/miRNAが複合体を形成する事が要求される。そこでRNA-IPでAgp2と標的mRNA (psiCHECKTM-2-NL4-3)の複合体形成を確認した。その結果、我々が作製

したpsiCHECKTM-2-NL-4-3/RNAとAgpo2が免疫沈降する事が認められた。この結果から当研究で見出されたmiRNAはHIV-1を標的としたmiRNAであることがより明白となった。

以上の結果よりmiRNAによるHIV-1複製制御にはDrosha およびAgpo2が深く関わっていることからDrosha knock-downの系、RNA-IPでAgpo2と標的mRNAとの相互作用およびpol領域、env-nef領域において同定された抑制配列に対し複数箇所に変異を導入したウイルスを作製してHIV-1複製制御の解除を検証した結果から、当研究で見出されたmiRNAはHIV-1を標的とした宿主内miRNAである事が確認された。

HIV-1を標的にしたmiRNAの探索例は既に報告されているが標的とするHIV-1mRNAとシード配列との結合から予測した結果が大半である。本研究では標的HIV-1mRNAの部分的配列をpsiCHECKTM-2に導入してその抑制領域を明らかにしている。また、miRNAによるHIV-1複製制御にはDroshaやAgpo2が深く関わっていることから、これらの宿主分子との相互作用を解析、さらには標的遺伝子に変異を導入して、その抑制機能をも検討するなど、分子生物学的手法を用いて解析している。しかしながらTable 1で予測したmiRNAが実際にその機能を発揮しているかはmiRNA発現レンチウイルスベクターを構築してHIV-1感染細胞での解析が必須である。

3-2 HEXM1-7SK snRNA-P-TEFb複合体は HIV-1 Tatの活性を制御する

HEXIM1は最近転写伸長反応の阻害装置として注目されている。HEXIM1はP-TEFb (CDK9とcyclin T1複合体)と7SK核内低分子RNAを介して結合し、CDK9によるRNA polymerase IIのリン酸化を抑制する。一方、HIV-1 TatはHIV-1 TAR RNAを介してP-TEFbと直接結合し、Pol II-CTDのリン酸化を促進することが知られている。さらに、HEXIM1が7SK核内低分子RNAに結合する領域は、HIV-1 TatがHIV-1 TAR RNAに結合する領域と相同性が高い。そこで本研究ではTat, HEXIM1とHIV-1 TARおよび7SK snRNAとの相互作用を検討することで、HEXIM1またはHEXIM1-7SK snRNA-P-TEFb複合体による HIV-1 TatのLTR転写活性制御機構の解明を目的とした。

(1) TatおよびHEXIM1とHIV-1 TARおよび7SK snRNAとの相互作用

実際にTatおよびHEXIM1タンパク質が標的となるHIV-1 TAR又は7SK snRNAとの相互作用をin vitroの系で確認するため、pGEX-TacctとpQE-HEXIM1の発現系の作製とその発現を確認した。さらに、HEXIM1および7SKsnRNA過剰発現系でのHIV-1 TatのLTR転写活性制御を検討するために、T細胞系での発現系、pNFLAG-HEXIM1およびplenti-β tat-v5を構築した。はじめに、293T細胞へpNFLAG-HEXIM1, pNFLAG-BOS (empty), pLTR-luc, plenti-β tat-v5, pCMV Renillaを導入した。その後回収したライセートを用いてdual-Luciferase assayを行った。その結果、HEXIM1の濃度依存的にLTRの活性が減少した。また、一過性のpNL4-3-lucでもHEXIM1の濃度依存的にLTRの活性が減少が確認できた。これらの結果からHEXIM1がHIV-1 tatの活性を抑制しているものと示唆された。

(2) 7SK snRNAの役割

HEXIM1はP-TEFb, 7SK snRNAと複合体を形成しHIV-LTR転写活性を制御すると報告されている. そこで7SK snRNA によるHIV-LTR転写活性への影響を検討する為に siRNA で7SK snRNAを knock downした293T細胞系を構築し, その後この系に pLTR-lucを導入し, dual-luciferase assayを行った. その結果, HIV-LTR転写活性制御において7SK snRNAをsiRNAで knock downさせてもHIV-LTR転写活性には影響しないことが示唆された. さらに, 上記の系に HIV-1 tatの活性制御因子である pNFLAG-HEXIM1を添加したところ, HIV-LTR転写活性制御はHEXIM1の濃度依存的に制御された. このことから293T細胞を7SK snRNA-siRNAで処理してもHIV-LTR転写活性には影響を与えないことが明らかになった. したがって, HEXIM1と7SK snRNAの間には相互作用が無いと考えられる. よってHIV-LTR転写活性制御にはHEXIM1の発現が重要であることが示唆された.

7SK snRNA-knock-downの系で 7sk snRNA は直接HIV-LTR転写活性へは影響を及ぼさない事が示唆された事から, つぎに7SK snRNA によるHIV-LTR転写活性への影響を明らかにするため7SK snRNA過剰発現系を作製した. 293T細胞にpOcta-1-7sk snRNAを導入し, dual-luciferase assayを行った. その結果HIV-LTR転写活性には影響しないことが示唆された. さらに, この系にpNFLAG-HEXIM1を添加したところ, HIV-LTR転写活性制御はHEXIM1の濃度依存的に起こる事が明らかとなった.

以上の結果から, HIVLTR転写活性を抑制するにはHEXIM1が要求されるが, 7SK snRNAはP-TEFbとHEXIM1と複合体を形成するがHIV-LTR転写活性には直接影響しないことが明らかになった.

(3) 7SK snRNP複合体の役割

Larp7は7SK snRNP複合体形成に対して7SK snRNAを安定化する宿主因子である. また, BCDIN3は7SK snRNA methylphosphate capping enzyme (MePCE)に対して不可欠で, 7SK snRNAの安定化に寄与する. そこで, 両Larp7とBCDIN3因子をsiRNAで knock-downしHIV-1-LTR転写活性に与える影響を検討した. その結果, 7SK snRNPに不可欠な両因子を knock-downしてもHIV-1-LTR転写活性には影響を与えることなかった. HEXIM1 は7SK snRNA を介しP-TEFbと結合し, この複合体形成により, Cdk9 によるRNAポリメラーゼIIのC末端リン酸化はHEXIM1により抑制され, 転写伸張反応が低下する. しかし, 本研究の結果から, 7SK snRNPはHIVの遺伝子転写の抑制には関わっていないことが示唆された.

HIV-1-LTR転写活性の抑制にはHEXIM1の過剰発現が必須である. 一方, 7SK snRNA は HIV-1-LTR 転写活性化には重要でないことが示唆された. 従って, HIV-1-LTR転写活性制御機構としてはTatとHEXIM1の結合は起こっていないことから, TAR-RNAにHEXIM1が直接結合してTatの機能を阻害していると考えられる. 7SK RNAとTAR-RNA はHEXIM1が結合することのできる領域を有すると共に, HEXIM1 と tatの核酸結合領域のホモロジーは同じである. したがって, HEXIM1が過剰発現することでTAR-RNAに直接結合してTatの機能を阻害したと考えられる.

3-3 宿主内因子, Prostaglandin A₁(PGA₁) によるHCV-IRES依存的翻訳阻害

日本における肝癌の70%はHCV感染が原因である。C型慢性肝炎は放置すると肝硬変になり肝癌を発症する。そのため抗ウイルス薬が奏功し、HCVが駆除されると発癌が抑制されるため治療薬の開発が行われてきた。特にPeg-INF+RBV併用療法、直接作用型抗ウイルス薬(HCV蛋白質のいずれかの活性をピンポイントに阻害することで増殖を止める、プロテイン阻害剤)がHCV駆除率は73%と格段の進歩を遂げた。

プロテイン阻害剤のHCV駆除率は高いが、薬剤の副作用、あるいは薬剤耐性HCVの発生と蔓延による治療効果の低減を考えると新たな医療法の開発が切望される。HCVの増殖・複製は宿主因子由来たんぱく質により正または負に制御されている。既存の抗ウイルス剤はウイルスに直接作用する抗ウイルス薬であるが爲に、薬剤耐性HCVが発生する。そこで、宿主内因子がHCVの増殖・複製を制御することができれば、最良の治療法となる。宿主内因子、Cyclopentenone prostanoidsファミリーのProstaglandin A₁(PGA₁)は、炎症、腎機能と流動調節や血液凝固と血小板凝集等、生体内のいたるところに存在して生理活性を有する物質である。HIV-1などのウイルス感染時においては宿主防御因子APOBEC3Gの発現を高めHCVの増殖・複製を制御する事が我々のグループが報告している。(発表論文: Sugiyama R, Antiviral Res. 2013;99(3):307-311)。そこで、本研究ではC型肝炎ウイルス複製制御に係わるPGA₁の機能解析を目的とした。

PGA₁の抗HCV活性を確認するため、HCV full genome replicon細胞であるNNC#2細胞とJFH-1感染Huh7.5細胞を用いた。その結果、濃度依存的にHCVの複製を抑制し、この際のEC₅₀は5.89 μ M。さらに、PGA₁の長期抗HCV活性を確認したところ細胞毒性も伴うこともなく高い抗HCV活性を示すとが確認された。

PGA₁によるHCV-IRES依存的翻訳阻害機構を解明するために、pHCV IRES-Luc(F)およびpSV40/Luc-R, pSV40/Luc-Fを用いた。その結果、HCV IRES-ルシフェラーゼ活性の減少が確認できたが、また、Cap依存的ルシフェラーゼ活性においては、PGA₁による影響は確認できなかった。これらの結果から、PGA₁はCap依存的翻訳阻害を伴うことなくHCV-IRES依存的翻訳阻害を誘導していることが分かった。

PGA₁による40S ribosome subunit とeIF3 subunitへの影響。HCVはタンパク質を翻訳するため通常のCap依存的におこる翻訳ではなく、自身のHCV RNAにHCV internal ribosome entry site (IRES)という二次構造を有しており、IRESに40S ribosome subunit, eIF3など翻訳開始因子が結合することでウイルスタンパク質の翻訳を開始させる。まず、13種類存在するeIF3のサブユニット中で翻訳に必須で、コアサブユニットでありHCV IRESと相互作用するeIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3h, eIF3i, eIF3j, eIF3と40S ribosome subunit(rpS3,rS6)に注目した。このサブユニットをについてPGA₁による影響がないか検討したところ、Ribosomal protein S3/S6 (rpS3/S6), eIF3a, eIF3c, eIF3h, eIF3k因子において、PGA₁濃度依存的に減少傾向を示した。しかし、Huh7細胞ではこれら6因子の減少は認められなかった。以上の事から、HCV replicon細胞中でPGA₁と上記6因子が相互作用している可能性があるという事が考えられる。

PGA₁がHCVの翻訳制御に強く係っていることが示唆されたので、PGA₁によるHCVの翻訳制御機構をより明らかにするため、Huh-7細胞およびNNC#2細胞をBiotin化PGA₁で処理しプルダウンアッセイを行った。その結果、PGA₁で処理した際の6因子の相互作用が確認できたが、その他の3因子の相互作用が認められなかった。また、Huh7細胞ではPGA₁と40S ribosome subunitおよびeIF3との結合は起こらなかった。

本実験でNNC#2細胞とHuh-7細胞との違いは、HCV replicon RNAおよび、HCVのウイルスタンパク質を細胞内に有しているかいないかである。また、ウイルスタンパク質はHCV replicon RNAから翻訳されることや、eIF3が翻訳開始因子でありHCV IRESに直接結合する事を考慮すると、HCV RNAの有無でPGA₁とeIF3/40Sが相互作用するのではないかという事が考えられる。そこで、NNC#2細胞をRNase Aで処理したのち、Biotin化PGA₁で処理しプルダウンアッセイを行った。非RNase A処理細胞ではPGA₁とeIF3/40Sとの相互作用が確認できたが、RNase A処理細胞ではこの相互作用は認められなかった。すなわち、NNC#2細胞をRNase Aで処理することでHCV IRES RNAの発現を抑制したことによりPGA₁/eIF3/40S/HCV IRES RNA複合体形成が阻害された。

以上の結果よりPGA₁はHCV IRES RNAが存在する細胞でeIF3/40Ssubunitと結合しPGA₁/eIF3/40Ssubunit/HCV IRES RNA複合体を形成することでHCV-IRES依存的翻訳を阻害することが示唆された。

発表論文

本研究に関連した論文

1. Nishitsuji H, Sawada L, Sugiyama R, Takaku H. ZNF10 inhibits HIV-1 LTR activity through interaction with NF- κ B and Sp1 binding motifs. *FEBS Lett*. 2015 Jul 8;589(15):2019-25. PMID: 26096782
2. Tsukimoto A, Sugiyama R, Abe M, Nishitsuji H, Shimizu Y, Shimotohno K, Kawai G, Takaku H. A new role for PGA1 in inhibiting hepatitis C virus-IRES-mediated translation by targeting viral translation factors. *Antiviral Res*. 2015 May;117:1-9. PMID: 25666760
3. Sugiyama K, Ebinuma H, Nakamoto N, Sakasegawa N, Murakami Y, Chu PS, Usui S, Ishibashi Y, Wakayama Y, Taniki N, Murata H, Saito Y, Fukasawa M, Saito K, Yamagishi Y, Wakita T, Takaku H, Hibi T, Saito H, Kanai T. Prominent steatosis with hypermetabolism of the cell line permissive for years of infection with hepatitis C virus. *PLoS One*. 2014 Apr 9;9(4):e94460. PMID: 24718268
4. Shimizu Y, Nishitsuji H, Marusawa H, Ujino S, Takaku H, Shimotohno K. The RNA-editing enzyme APOBEC1 requires heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q isoform 6 for efficient interaction with interleukin-8 mRNA. *J Biol Chem*. 2014 Sep 19;289(38):26226-38. PMID: 25100733
5. Kato K, Senoki T, Takaku H. Inhibition of HIV-1 replication by RNA with a microRNA-like Function. *Int JMol Med*. 2013;31(1):252-8.
6. Sugiyama R, Abe M, Nishitsuji H, Murakami Y, Takeuchi H, Takaku H. Induction of heat-shock protein70 by prostaglandin A1 inhibits HIV-1 Vif-mediated degradation of APOBEC3G. *Antiviral Res*. 2013;99(3):307-11. PMID: 23831493
7. Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokine mediated by the cross Talk between hepatocytes and stellate cells. *J Virol*. 2013;87(14):8169-78. PMID: 23678168
8. Noguchi K, Ishibashi K, Miyokawa K, Hokari M, Kanno T, Hirano T, Yamamoto N, Takaku H. HIV-1 suppressive sequences are modulated by Rev transport of unspliced RNA and are required for efficient HIV-1 production. *PLoS One*. 2012;7(12):e51393. PMID: 23251516
9. Nishitsuji H, Abe M, Sawada R, Takaku H. ZBRK1 represses HIV-1 LTR-mediated transcription. *FEBS Lett*. 2012 Oct 19;586(20):3562-8. PMID: 22975076
10. Ujino S, Nishitsuji H, Sugiyama R, Suzuki H, Hishiki T, Sugiyama K, Shimotohno K, Takaku H. The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: a necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Virus Res*. 2012 Jan;163(1):390-5. PMID: 22016036

11. Nishitsuji H, Yokoyama M, Sato H, Yamauchi S, Takaku H. Identification of amino acid residues in HIV-1 reverse transcriptase that are critical for the proteolytic processing of Gag-Pol precursors. *FEBS Lett.* 2011 Nov 4;585(21):3372-7. PMID: 22004763
12. Sugiyama R, Naganuma H, Nishitsuji H, Takaku H. Human immunodeficiency virus-1 Nef suppresses Hsp70-mediated Tat activation. *FEBS Lett.* 2011 Nov 4;585(21):3367-71. PMID: 21970979
13. Noguchi K, Ishitu Y, Takaku H. Evaluating target silencing by short hairpin RNA mediated by the group I intron in cultured mammalian cells. *BMC Biotechnol.* 2011 Jul 25;11:79. PMID: 21781346
14. Sugiyama R, Nishitsuji H, Furukawa A, Katahira M, Habu Y, Takeuchi H, Ryo A, Takaku H. Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G. *J Biol Chem.* 2011 Mar 25;286(12):10051-7. PMID: 21228271

1. 背景

後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスである HIV (Human Immunodeficiency Virus) は主に血液や粘膜を介して感染し、その後、数年から十数年の潜伏期を経て AIDS を発症する。国内の HIV 感染者数は未だ増加傾向にあり、治療法の開発は急務である。現在治療法として用いられている多剤併用療法は、HIV 陽性患者の予後をこれまでより飛躍的に向上させたがウイルスを体内から排除することはできない。よって宿主細胞に組み込まれたウイルス遺伝子の発現を如何に制御するかが新たな治療薬の課題である。

これまでにウイルス遺伝子に直接作用することができる核酸分子の研究がいくつもなされ、その例として、siRNA や shRNA, アンチセンスオリゴ, アプタマー等がある。これらは標的遺伝子に特異的に結合できる小分子であり、高い特異性を持つが免疫原性は示さないことから副作用も起こりにくいと考えられており、医療への応用が期待される。

2. 本研究の概要および目的

核酸分子の特異性を利用して遺伝子の発現を制御する技術は、遺伝子の機能解析や様々な疾患に対する病因遺伝子の発現抑制などへの応用が可能である。

HIV の場合は、この技術を利用してウイルスの構造遺伝子や調節遺伝子ならびにアクセサリ遺伝子など様々な領域の遺伝子を標的とすることが可能なことから、多くの研究者によりアンチセンス法や RNAi 法を用いたウイルス遺伝子の発現抑制効果についての報告がされている。これまでの研究によりウイルス遺伝子の発現を抑制する為には、標的部位の選定が極めて重要であることが明らかとなっている。

本研究では HIV-1 遺伝子の特徴の一つであるゲノムの両端に存在する LTR (Long Terminal Repeat) 領域中の UTR (Untranslated Region) 領域に着目した。LTR 領域は、R 領域、U5 領域および U3 領域で構成されており、タンパク質に翻訳されない UTR 領域を含んでいる。この領域は遺伝子発現に重要な機能 (エンハンサー、プロモーター、転写開始、転写終結やポリアデニル化シグナルなど) に関与している。5' 側 UTR 領域には上流から順に TAR, Poly A, PBS, DIS, SD, PSI 領域が開始コドンの手前に隣接しており、これらの部位を標的とした核酸分子による抗ウイルス活性の報告も近年増えている。当研究室でも、PSI 領域および DIS 領域を標的としたアンチセンス核酸がウイルス遺伝子の発現を抑制することを確認している。

そこで本研究ではまず、ウイルス遺伝子の発現を制御する際に最も有効な標的部位を探索することを目的として DIS 領域に加え、新たにウイルス遺伝子のスプライシング機構に関与するドナーサイトとアクセプターサイトのうち、4 つの部位 (D1, D4, A3, A7 部位) を標的とした核酸分子によるウイルス遺伝子の発現抑制効果を検討した。つぎに、最も強い抗ウイルス活性が確認された DIS 領域を標的とした shRNA 発現ベクターの構築し、抗ウイルス活性を検討した。さらに TAR 領域のアプタマーを分担研究者 (坂本) が作製し、そ

的とした S 修飾オリゴを用いたアンチセンス法による検討をしたところ、約 93%レポーター遺伝子の発現を抑制した (Fig. 2).

さらに、RT-PCR 法を用いてスプライシングにより生成する *tat* 遺伝子を含む mRNA とスプライシングされずに生成する *gag* 遺伝子を含む mRNA を検出した。その結果、DIS 領域または D1 部位を標的とした S 修飾オリゴは、両者共に *gag* 遺伝子を含む mRNA の発現量を減少させた。またスプライシングによって生じる *tat* 遺伝子の発現を確認したところ、両サンプルとも *tat* 遺伝子の発現はみられなかった。このことから、DIS 領域または

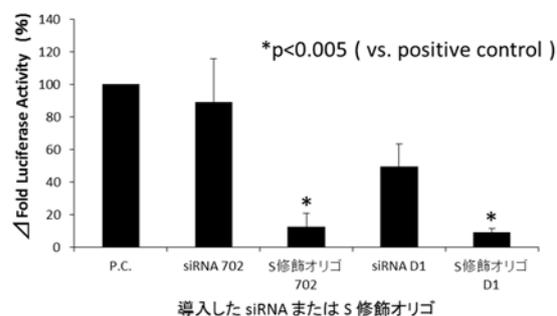


Fig.2 HIV-1 発現抑制効果

D1 部位を標的とした S 修飾オリゴは、両者共にスプライシング機構の阻害効果を作用機序の 1 つとして有している可能性が示唆された。DIS 領域を標的とした S 修飾オリゴでもスプライシング機構の阻害がみられた理由としては、標的部位の三次構造が関与していることが考えられる。非翻訳領域中に存在する DIS 領域付近は複雑な三次構造を形成しており、これによりシュードノット様構造が各ステムの方向性を規定している可能性が 2012 年に Sakuragi らにより報告されている。S 修飾オリゴが細胞内で標的となる RNA に結合すると、RNase H を誘導することが知られていることから、これにより標的配列の分解が引き起こされるが、ここでは DIS 領域の分解が隣接する SD 領域にも影響を与えていた可能性が考えられる。HIV-1 が感染性ウイルスの機能を有する上で必要な遺伝子およびタンパク質の多様性は、スプライシング機構が正常に機能することが必須である。この機構の阻害を遺伝子レベルで行うことは、ウイルスにとって重要な *gag*, *pol*, *env* や *tat*, *rev* などの翻訳領域を直接標的とするよりも変異ウイルスに対応でき、またこれらの機能性 mRNA の成熟を根本から阻害できることから、より有効にウイルス遺伝子の発現を阻害することができると考えられる。

つぎに DIS を標的とした抗 HIV-1 遺伝子発現ベクターの構築し、HIV-1 遺伝子の抑制効果を検討した結果、Mock と比較して shRNA 発現ベクターである pSV2-U6-DIS/sh-antisense では 42%、pSV2-U6-DIS/sh-sense では 54%、HIV-1 の DIS と同様の配列をもつオリゴヌクレオチド発現ベクターである pSV2-U6-DIS/senseoligo では約 34%ルシフェラーゼ活性を抑制したことから、これらのベクターは、HIV-1 の遺伝子発現を抑制したと考えられる (Fig.3).

また、リポフェクション法にてホスホロチオエート型のオリゴヌクレオチドを細胞に導入したところ、導入2日後に50%の導入効率を得られる実験条件を確立した。しかし、同じ実験方法で非修飾型オリゴヌクレオチドを試験したところ、導入効率は10%以下であった。そこで非修飾型のアプタマーを細胞導入するために Nucleofector による遺伝子導入法に変更した。レポーター遺伝子を用いた前実験では、ほぼ100%の細胞に目的の遺伝子を導入することが出来ることを確認したが、アプタマーを導入した細胞の抗ウイルス活性は認められなかった。

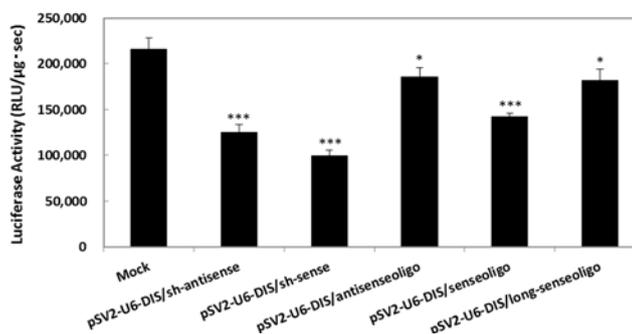


Fig.3 抗 HIV-1 遺伝子発現ベクターによる抗 HIV-1 活性

5. まとめ

HIV-1 遺伝子の DIS 領域と共に D1 領域を標的とした核酸分子は強い抗ウイルス効果を有したことから、これらの領域がウイルス遺伝子の発現にとって重要であることが示唆された。この他にも TAR 領域のアプタマーの抗ウイルス活性について検討したが、同領域の合成核酸と同程度の抗ウイルス活性を確認することは出来なかった。

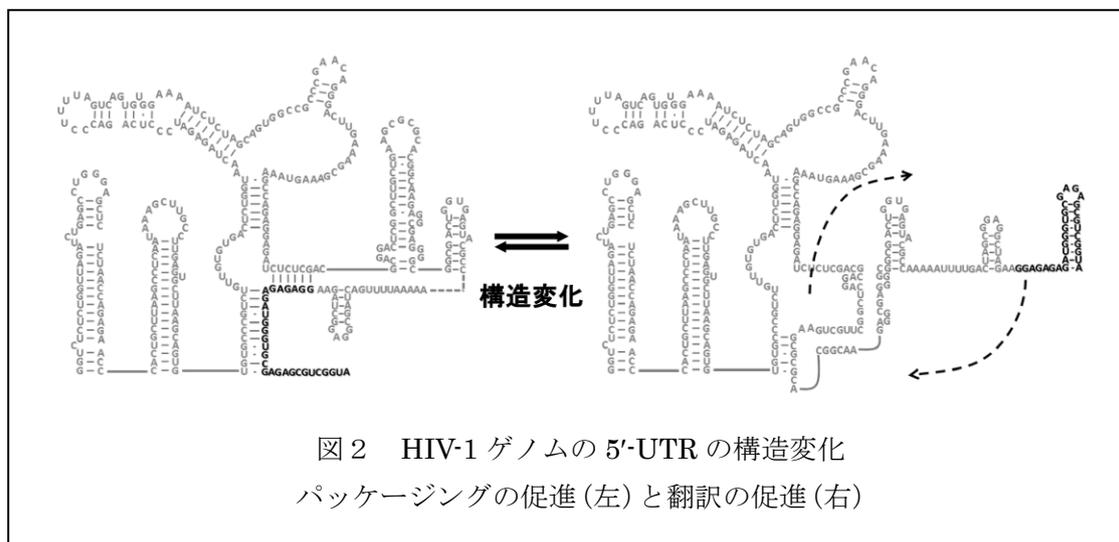
本研究で用いたアプタマーは、抗ウイルス活性を有することが認められなかったが、HIV-1 遺伝子発現を制御する領域については絞り込みをすることが出来たので、アプタマー不活性の原因を解明し、抗ウイルス活性を最大限に増強させることができれば HIV-1 治療戦略の選択肢を拡張するツールとして期待できると考える。

業績リスト

学会発表

- 1) 黒田 彬仁, 黒崎 直子, HIV-1 DIS を標的とした抗 HIV-1 遺伝子発現ベクターによる HIV-1 の転写抑制効果(Transcription inhibitory effect of HIV-1 by anti-HIV-1 gene expression vectors against HIV-1 DIS), 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年, 11 月.
- 2) 石井 暢, 黒崎 直子, 高久 洋 : HIV-1 非翻訳領域に対する核酸分子はウイルス遺伝子の発現を抑制する (Nucleic acid inhibits viral gene expression in untranslated regions of HIV-1), 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012 年 12 月.

わっていることが示唆されており、注目されている。5'-UTR は、Trans Activation Responsive 領域 (TAR), polyadenylation site (polyA), Primer Binding Site (PBS), Dimerization Initiation Site (DIS), major Splicing Donor (SD), Packaging signal (Ψ)および開始コドンを含み、HIV ゲノムの二量体化、転写制御、翻訳制御など、HIV が増殖するために重要な領域となっている。そこで、これらの機能ドメインの立体構造が研究されてきている。さらに、Summers らのグループによって、HIV ゲノムの 5'-UTR の NMR 解析が行われ、ゲノムのパッケージングとタンパク質合成が 5'-UTR の立体構造変化によって制御されていることが示された (図2) (Lu K. *et al.* 2011, *Science*)。このように、HIV の 5'-UTR の立体構造が遺伝子発現の制御において非常に重要であることが報告されているが、その立体構造は明らかにされていない。



そこで本研究では、SELEX 法と NMR 法を用いて、HIV ゲノムの 5'-UTR の立体構造情報を得ることを試みることにした。アプタマーは標的分子の立体構造を認識して結合するので、得られるアプタマーの構造を解析することにより、標的分子の構造情報が得られると考えた。アプタマーは、5'-UTR の分子表面と塩基対形成によって相互作用すると考えられ、塩基対を形成した領域のトポロジーから 5'-UTR の全体構造をモデリングできる可能性がある。これまで SELEX 法を立体構造解析に利用した報告はなく、新しい試みであると考えている。

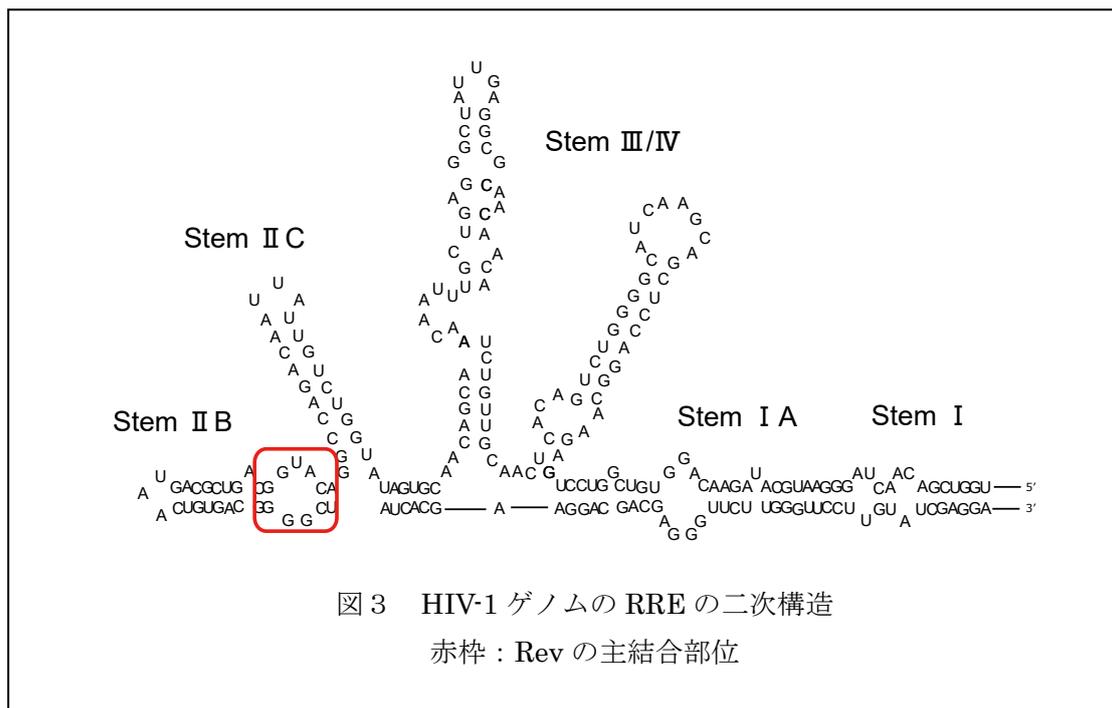
さらに、得られたアプタマーは HIV 遺伝子の発現やウイルス粒子のパッケージングを阻害すると考えられるので、抗 HIV 薬として期待することができる。現在使われている抗 HIV 薬は、HIV ゲノムの変異による薬剤耐性が問題となっているが、本研究のアプタマーの場合、5'-UTR の広い範囲を標的とするので、変異によって耐性ができる可能性は低く、特異性も高いことが期待できる。

また、TAR には Tat タンパク質が結合して、HIV ゲノムの転写反応を促進することが知られており、NMR 法により TAR と Tat の複合体の立体構造も明らかになっている。一方、宿主には TAR の Tat 結合部位と類似した配列を持つ 7SK RNA とそこに結合する HEXIM1 タ

ンパク質があることが知られている。TAR と Tat の結合と 7SK RNA と HEXIM1 の結合は、それぞれ競合し、7SK RNA および HEXIM1 は TAR と Tat の結合による転写促進を阻害することが示唆されている。本研究では、これらの RNA とタンパク質の相互作用についても明らかにすることを目的とした。

また、HIV のゲノム RNA の Rev Responsive Element (RRE) と Rev の相互作用は、核内で転写された HIV ゲノムの核外輸送を担っていることが知られている (図 3)。Rev の Arginine Rich Motif (ARM) が RRE を認識して特異的に結合することが、NMR 法により明らかとなっている。近年、RRE に複数の Rev が協同的に結合することが明らかとなっているが、その複合体の全体構造や結合メカニズムは明らかになっていない。

一方、American University of Beirut (AUB) の Smith 博士らは、ARM と RNA の相互作用について研究を行っていたが、その相互作用に重要なアミノ酸の一箇所に変異を導入すると結合能を失うが (R35G および N40V)、二箇所に変異を導入した変異体 (GV) には野生型と同等の RRE 結合活性があることを明らかにした。本研究では、この二重変異体と RRE の相互作用についても解析を試みた。



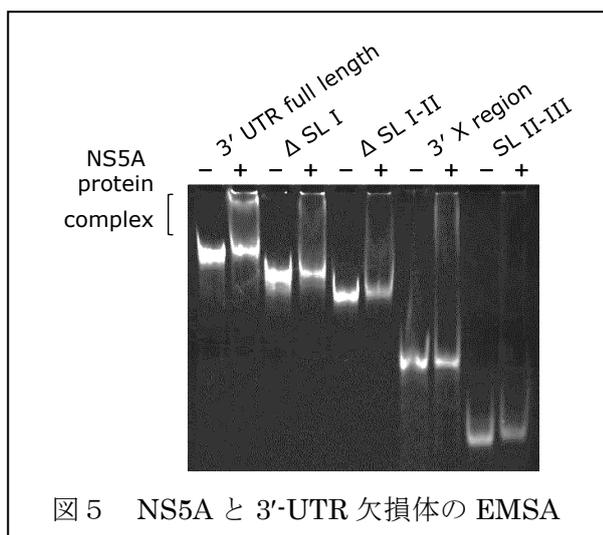
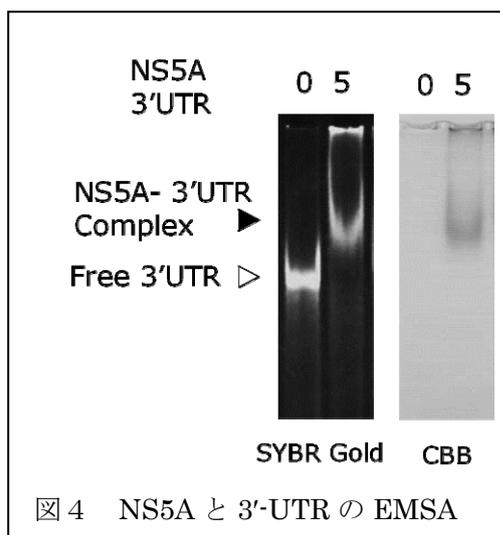
研究成果

(1) HCV ゲノムの解析およびアプタマーの取得

大腸菌を用いて、His タグを付加した NS5A を大量発現した。さらに、調製した NS5A を用いて SELEX を行ったが、アプタマーを得ることができなかった。塩濃度を検討したり、polyU を含むランダム配列を用いて SELEX を行ってみるなど、様々な条件を検討したが、アプタマーの取得には至らなかった。

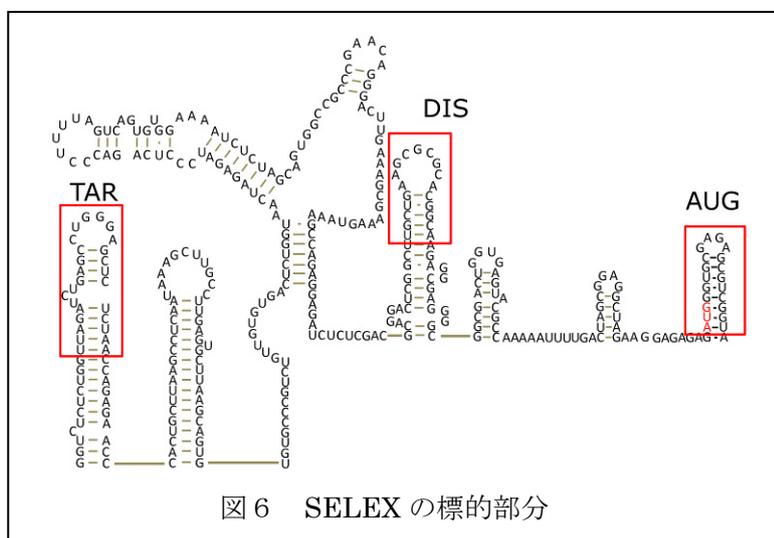
一方、調製した NS5A が HCV ゲノムの 3'-UTR に結合することを確認した (図4)。さらに、3'-UTR の欠損変異体を用いて相互作用解析を行ったところ、3' X region の SL I および SL II を削った変異体 (Δ SL I-II) および 3' X region のみの変異体 (3' X region) でも NS5A と結合するが、3' X region の SLI を削った変異体 (SL II-III) では、NS5A との親和性が低くなることが示唆された (図5)。

しかし、NS5A タンパク質が短期間で沈殿してしまう不安定なタンパク質であるため、アプタマーを取得するには NS5A タンパク質の構造の安定化が必要であると考えている。



(2) HIV ゲノムの解析およびアプタマーの取得

本研究は、5'-UTR を標的としてアプタマーを取得する計画であったが、より容易にアプタマーを取得できると予想される部分構造を標的として SELEX を行なった。具体的には、TAR, DIS, 開始コドン AUG を含むヘアピンを標的として SELEX を行なった (図6)。



①TAR を標的としたアプタマーの取得

TAR を標的としたアプタマーの取得はすでに報告されているが、同様に SELEX 実験を行い、SELEX の方法のチェックを行った。8 ラウンドの SELEX の後、アプタマー候補の配列を解析したところ、既に報告されているアプタマー配列 (赤い部分) を含んでいる RNA の他に、赤で示した配列とは異なる部分で TAR と相互作用することが期待される配列 (青い部分) も見つかった (図 7)。新しいアプタマー候補 t2 および t19 は、TAR と相補的な配列を 2 箇所含むことから、TAR に対して多点的に相互作用することを期待して、EMSA による相互作用解析を行った。しかし、すでに報告されているアプタマー (t01) より強い結合を示すものは無かった。

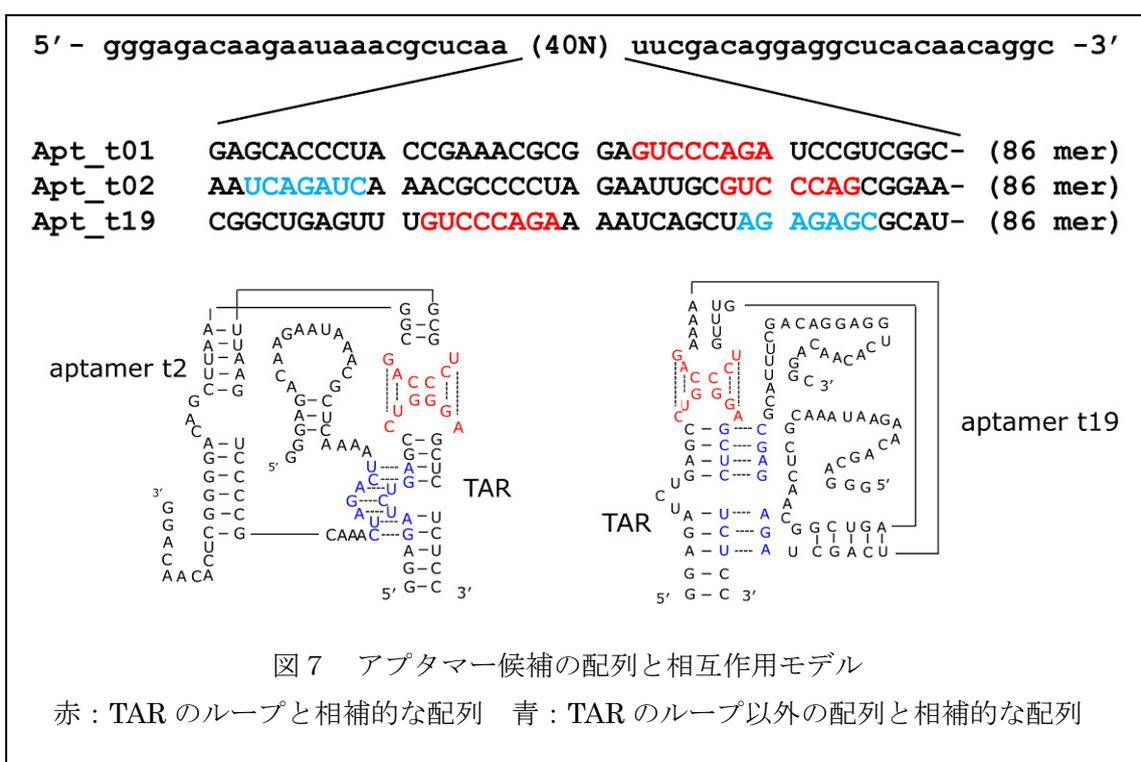
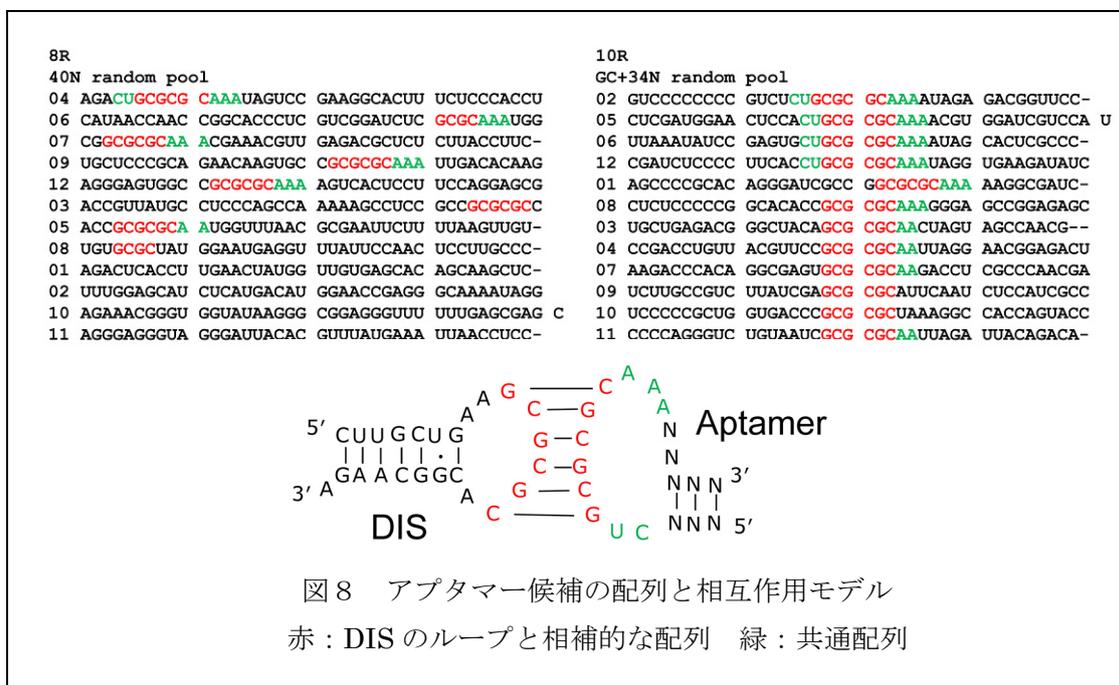


図 7 アプタマー候補の配列と相互作用モデル

②DIS を標的としたアプタマーの取得

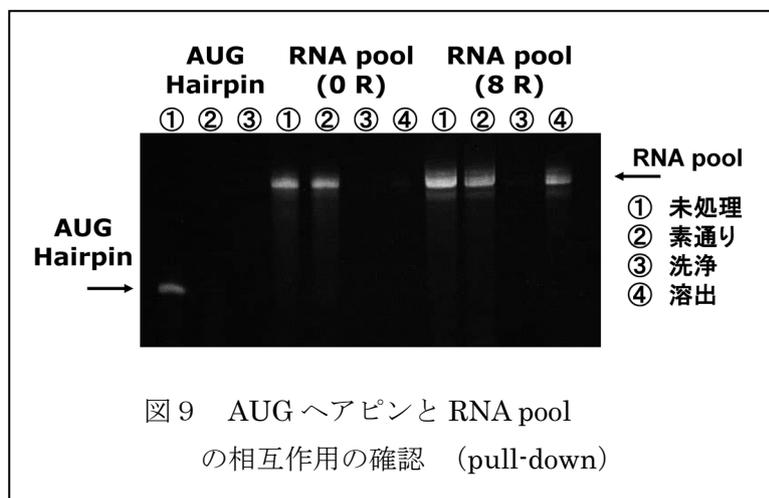
次に TAR のアプタマーを取得した方法を用いて、DIS を標的とした SELEX 実験を行った。DIS を標的とした SELEX では、DIS のループ部分に相補的な GCGCGC 配列を含むライブラリと含まないライブラリを用いて選別を行なった。40 残基のランダム配列 (GCGCGC 配列を含まないライブラリ) から 8 ラウンドの選別を行なったところ、DIS のループ部分に相補的な配列 GCGCGC が濃縮されてきていることが明らかになった (図 8)。さらに、GCGCGC の下流には AAA の配列が多いことが明らかとなった。一方、GCGCGC を含むライブラリから 10 ラウンドの選別を行なったところ、GCGCGC の下流には AAA 配列が多く、上流には CU 配列が多いことが明らかとなった。二つのプールから、同様な配列が濃縮されてきていることから、アプタマー配列の濃縮に成功していると考えている。DIS と同じ配列は得られなかったが、図 7 のような相互作用によって、アプタマー候補は DIS より強く結合することが期待できる。現在、DIS とアプタマーの結合力について、SPR

法などを用いて解析を行っている。



③開始コドン AUG を含むヘアピン部分を標的としたアプタマーの取得

開始コドン AUG を含むヘアピン部分を標的とした SELEX では、pull down 法により 8 ラウンド後の RNA プールと標的 RNA の結合を確認できた (図9)。そこで配列解析を行ったが、配列の収束度が高くなかった。現在、選抜条件を厳しくして、さらに SELEX の実験を進めている。

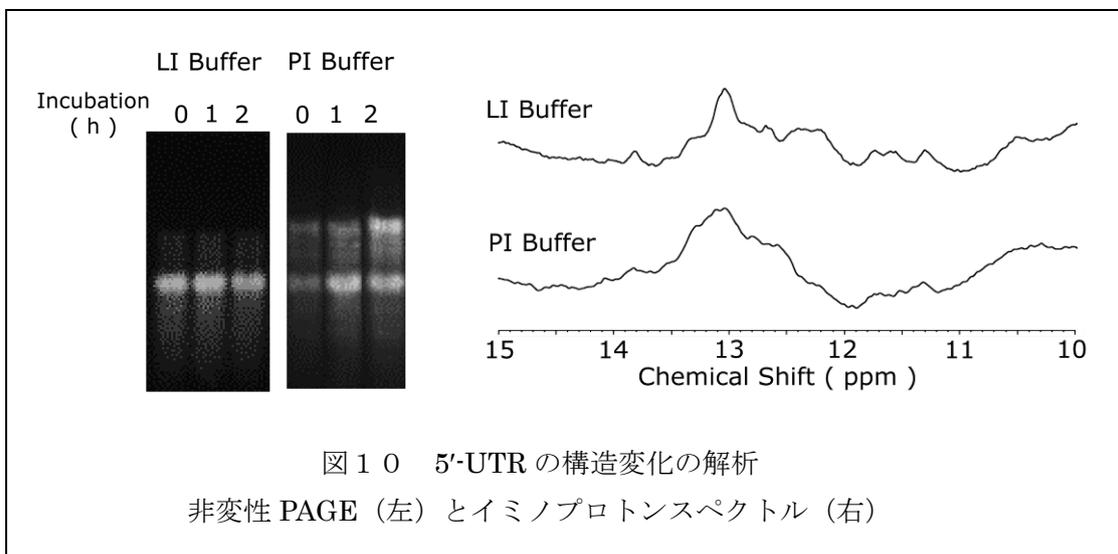


④5'-UTR を標的としたアプタマーの取得

357 残基の 5'-UTR (Summers, M.らのグループが NMR 解析した配列) を大量に調製した。現在、この 5'-UTR を樹脂に固定化し、SELEX 実験を行うことを検討している。

5'-UTR の NMR 解析も行っている。はじめに、5'-UTR は、低イオン濃度 (LI Buffer) ではモノマーとなるが、生理的条件 (PI Buffer) ではダイマーになることが知られており、アガロースゲル電気泳動法を用いて 5'-UTR の構造変化を確認した (図10)。さらに、イミノプロトンスペクトルを測定し、LI Buffer と PI Buffer では構造変化が起きていること

を確認した。今後は、アプタマーと 5'-UTR の相互作用を解析する計画である。



⑤TAR と Tat タンパク質および 7SK RNA と HEXIM1 タンパク質の相互作用の解析

TAR RNA, 7SK RNA, Tat タンパク質および HEXIM1 タンパク質について、それぞれ調製を行った。SPR 法により、それぞれの解離定数を調べたところ、TAR と Tat の K_d は 494 nM, 7SK と HEXIM1 の K_d は 46.2 nM, TAR と HEXIM1 の K_d は 114 nM, 7SK と Tat の K_d は 648 nM であった。以上のことから、7SK RNA と HEXIM1 タンパク質のいずれかが過剰にある場合に TAR RNA と Tat タンパク質の相互作用を阻害する可能性があることが示唆された。

⑥Rev 変異体と RRE の相互作用の解析

ITC 法により RRE 領域と Rev ペプチド変異体 GV の相互作用について解析したところ、R35G および N40V の変異体は RRE と結合しないが、GV は野生型の約半分の結合力を示すことがわかった (図 1 1)。さらに NMR 法を用いて相互作用解析を行ったところ、野生型の Rev と同様に RRE の内部ループに結合していることが示唆された。



現在、安定同位体により標識した試料を調製し、複合体の立体構造解析を試みている。

業績リスト

発表論文（予定含む）

1. Kohda, M., Amano, R. and Sakamoto, T., Selection of RNA aptamer against dimerization initiation site of HIV-1 genome (投稿準備中)
2. Ohuchi, S.J., Sagawa, F., Sakamoto, T., Inoue, T., Altering the orientation of a fused protein to the RNA-binding ribosomal protein L7Ae and its derivatives through circular permutation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **466**, 388-392 (2015). PMID:26362187
3. Ohuchi, S.J., Sagawa, F., Sakamoto, T., Inoue, T., A trifunctional, triangular RNA-protein complex, *FEBS Lett.* **589**, 2424-2428 (2015). PMID: 26183207
4. Iwashita, S., Suzuki, T., Yasuda, T., Nakashima, K., Sakamoto, T., Kohno, T., Takahashi, I., Kobayashi, T., Ohono-Iwashita, Y., Imajoh-Oomi, S., Song, Si-Y., Dohmae, N., Mammalian Bcnt/Cfdp1, a potential epigenetic factor characterized by an acidic stretch in the disordered N-terminal and S250 phosphorylation in the conserved C-terminal regions, *Biosci. Rep.* **35**, e00228 (2015). PMID: 26182435
5. Kakimoto, Y., Fujinuma, A., Sakamoto, T., Kikuchi, Y., Umekage S., Evidence for RNA template-directed elongation induced by binding T7 RNA polymerase, *AIP Conf. Proc.*, **1649**, 116 (2015).
6. 坂本泰一, 河合剛太, 自然界の翻訳制御リボスイッチ, *細胞工学*, **34**, 778-782 (2015).
7. 天野亮, 高田健多, 坂本泰一, NMR による RNA の構造変化の解析, *分光研究*, **64**, 411-412 (2015).
8. 野村祐介, 坂本泰一, RNA アプタマーの立体構造と創薬, タンパク質結晶の最前線 (杉山成 監修) 230-237, シーエムシー出版 (2013).
9. Sakamoto, T., Translational Control by cis RNA Elements, Bacteria, Encyclopedia of Systems Biology, Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.-H., and Yokota, H., eds, 2285-2288, Springer (2013)
10. Nomura, Y., Tanaka, Y., Fukunaga, J., Fujiwara, K., Chiba, M., Iibuchi, I., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kawai, G., Kozu, T., and Sakamoto, T., Solution structure of a DNA mimicking motif of an RNA aptamer against transcription factor AML1 Runt domain. *J. Biochem.* **154**, 513-519, 2013. PMID: 23997091 (JB 論文賞)
11. Fukunaga J., Nomura Y., Tanaka Y., Amano R., Tanaka T., Nakamura Y., Kawai G., Sakamoto T., Kozu T., The Runt domain of AML1 (RUNX1) binds a sequence-conserved RNA motif that mimics a DNA element, *RNA*, **19**, 927-936 (2013) . PMID: 23709277

学会発表（本プロジェクトに関するもの）

1. 幸田美彩子, 天野亮, 平井翔, 坂本泰一, HIV-1 ゲノムの 5'-UTR を標的とした RNA aptamer, BMB2015, 2015 年 12 月, 神戸
2. 武田有未, 天野亮, 高田健多, Colin A. Smith, 坂本泰一, HIV-1 ゲノムの RRE と Rev 変異体の相互作用の解析, 第 54 回 NMR 討論会, 2015 年 11 月, 千葉
3. 天野亮, 高田健多, 武田有未, Colin A. Smith, 坂本泰一, HIV-1 RRE RNA と Rev 変異体の相互作用の解析, 第 17 回 RNA ミーティング, 2015 年 7 月, 札幌
4. Yuya Ishii, Hiroshi Takaku, Masami Kusunoki, Taiichi Sakamoto, Analysis of RNA Recognition by HCV NS5A protein, The 41th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2014 年 11 月, 北九州
5. 石井裕也, 高久洋, 楠木正巳, 坂本泰一, HCV の NS5A タンパク質に結合するアプタマーの取得と解析, 第 4 回 CSJ 化学フェスタ, 2014 年 10 月, 船堀
6. 幸田美彩子, 天野亮, 星野啓治, 坂本泰一, HIV-1 の DIS に結合する RNA アプタマーの取得, 平成 26 年度日本生化学会関東支部例会, 2014 年 6 月, 茨城
7. 石井裕也, 楠木正巳, 坂本泰一, HCV の NS5A タンパク質に結合する RNA 配列の探索, 平成 25 年度日本生化学会関東支部例会, 2013 年 6 月, 山梨

報告 6. 長鎖 RNA の相互作用の解析および応用可能性の検討

柴田裕史

本プロジェクトにおける課題は、長鎖 RNA の相互作用の解明を行うための QCM を用いた解析方法の開発および長鎖 RNA を用いた新規な応用分野の開拓について検討を行うことである。本プロジェクト発足前から行っている研究を発展させることで、以下の成果を得た。

6-1 長鎖 RNA の相互作用の解明を行うための QCM を用いた解析方法の開発

本プロジェクトにおいて、RNA-RNA、タンパク質相互作用を解析する新規な手法として、金センサー上に RNA を固定化することが可能な自己組織化膜を形成することで、ビオチン化などの煩雑な過程を必要としない QCM 測定を実現するための基盤技術を開発することとした。本プロジェクトにおいて、種々の官能基を有するチオール誘導体を用いた、金基板上における自己組織化膜が形成された QCM センサーの調製に成功し、サケ白子由来の DNA を用いた固定化技術を開発するに至った。特に、末端にアミノ基およびカルボキシル基を有するチオール誘導体により修飾された QCM センサーを用いることで、効率的に DNA が固定化されることを見出した。さらに、プロジェクトにおける目標である RNA を用いた固定化について検討を行った。RNA には坂本教授により、構造および相互作用が明らかとされている Apt1-S を用いた。その結果、アミノ基を末端に有するチオール誘導体により修飾された QCM センサーを用いることで、Apt1-S が固定化されることを見出した。

6-2 酸化チタンを用いた光照射による生体分子の吸脱着制御

これまで、様々な末端官能基を有するシランカップリング剤で修飾されたガラスからなるキャピラリーを用いることで、アミノ酸の分離が行えることが報告されている。そこで、1項で開発を試みている技術を活用し、DNA や RNA の光照射による分離、回収が可能な薄膜の創製について検討を行うこととした。様々な末端官能基を有するシランカップリング剤を用いて表面修飾を行った酸化チタンを用いることで、酸化チタンの光誘起超親水化現象に基づいた、光による BSA の吸脱着制御に成功した。また、同様にシランカップリング剤で修飾した酸化チタンを用いた、光照射による表面の濡れ性の制御が可能な薄膜についても調製を行い、光照射により回収することが可能な繊維芽細胞のシートを調製するに至った。得られた細胞シートには、まだ、わずかに死細胞は存在するものの、シランカップリング剤による酸化チタン薄膜の表面被覆面積を変化させることで、死細胞の数は抑制することができることを見出した。これは、本薄膜を DNA や RNA の分離に応用した際に、これらの生体分子に大きなダメージを与えないことを示唆している。

業績リスト

発表論文（予定含）

1. Hirobumi Shibata, Ryota Shinozaki, Taku Ogura, Hideki Sakai, Masahiko Abe, Gota Kawai, Kazuaki Hashimoto “Fabrication and BSA Adsorption/Desorption Properties of Titania/Silica Composite Films Modified with Silane Coupling Agents” *Journal of Oleo Science*, 63, 1077-1083, 2014
2. Hisashi Kawasaki, Shinnosuke Tozawa, Takashi Matani, Toshihiro Hayashi, Satoshi Watanabe, Hirobumi Shibata, Mutsuyoshi Matsumoto “Triggered J-aggregation in Mixed Langmuir-Blodgett Films of Amphiphilic Spiropyran Having a Methoxy Group at 5' Position and an Azobenzene Derivative” *Journal of Oleo Science*, 63, 691-700, 2014
3. Hirobumi Shibata, Taku Ogura, Keishi Nishio, Hideki Sakai, Masahiko Abe, Kazuaki Hashimoto, Mutsuyoshi Matsumoto “Facile Synthesis of Mesoporous Gold Particles Using Silica as a Binder Through a Solvent Evaporation Process” *Transactions of Materials Research Society of Japan*, 38, 221-223, 2013
4. Kenichiro Oka, Hirobumi Shibata, Satoshi Watanabe, Kenichi Sakai, Masahiko Abe, Mutsuyoshi Matsumoto “Structures of Langmuir-Gibbs Films Consisting of Long-Chain Fatty Acid and Water-Soluble Surfactants” *Journal of Oleo Science*, 62, 681-693, 2013

学会発表

1. 柴田裕史 「両親媒性分子を用いた無機材料の機能化」 第 33 回高分子学会千葉地域活動若手セミナー 2016 年 3 月 (依頼講演)
2. 柴田裕史 「両親媒性分子が創造する新たな光触媒の世界」 信州コロイド&界面科学研究会 2015 年 (第 1 回) 研究討論会 2015 年 10 月 (特別講演)
3. 柴昇汰, 根本惇平, 山根悠佑, 天野亮, 坂本泰一, 橋本和明, 柴田裕史 「自己組織化膜を用いた生体分子の固定化」 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会 2015 年 11 月
4. Hirobumi Shibata “Fabrication of Cell Sheets Using Titania / Silica Composite Films” Energy Materials Nanotechnology Meeting on Photocatalysis November 2015 (Invited Lecture)
5. Shota Shiba, Ryo Amano, Taiichi Sakamoto, Gota Kawai, Kazuaki Hashimoto, Hirobumi Shibata “Immobilization of DNA and RNA on QCM sensors modified with self-assembled monolayer of thiol derivatives” The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015) December 2015
6. 篠崎亮太, 柴田裕史, 酒井秀樹, 阿部正彦, 河合剛太, 橋本和明 「チタニア/シリカ複合薄膜を用いた細胞シートの調製」 日本セラミックス協会第 26 回秋季シンポジウム 2013 年 9 月
7. Ryota Shinozaki, Hirobumi Shibata, Hideki Sakai, Masahiko Abe, Gota Kawai,

- Kazuaki Hashimoto "Preparation of cell sheets using titania / silica composite films as a scaffold material" 85th JSCM Anniversary Conference October 2013
8. Ryota Shinozaki, Hirobumi Shibata, Hideki Sakai, Masahiko Abe, Gota Kawai, Kazuaki Hashimoto "Adsorption / Desorption Behavior of BSA on TiO₂ / SiO₂ composite films under UV light irradiation" International Symposium on Inorganic and Environmental Materials 2013 (ISIEM 2013) October 2013
 9. 山根悠佑, 柴田裕史, 河合剛太, 橋本和明 「自己組織化膜による生体分子の固定化技術の開発」 2013 年度材料技術研究協会討論会 2013 年 12 月
 10. Hirobumi Shibata, Yusuke Yamane, Gota Kawai, Kazuaki Hashimoto "Immobilization of Biomolecules on Quartz Crystal Microbalance Sensor Modified with Self-Assembled Monolayer" The 15th IUMRS-International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014) August 2014
 11. 柴田裕史, 篠崎亮太, 小倉卓, 酒井秀樹, 阿部正彦, 河合剛太, 橋本和明 「シランカップリング剤で修飾されたチタニア／シリカ複合薄膜を用いた細胞シートの調製」 日本油化学会第 53 回年会 2014 年 9 月
 12. Hirobumi Shibata, Ryota Shinozaki, Hideki Sakai, Masahiko Abe, Gota Kawai, Kazuaki Hashimoto "BSA adsorption/desorption property of TiO₂/SiO₂ composite films modified with silane coupling agents having amino groups" World Congress on Oleo Science (WCOS 2012) October 2012
 13. 篠崎亮太, 柴田裕史, 酒井秀樹, 阿部正彦, 河合剛太, 橋本和明 「チタニア／シリカ複合薄膜の調製および細胞シート調製への応用」 2012 年度材料技術研究協会討論会 2012 年 12 月
 14. 山根悠佑, 柴田裕史, 河合剛太, 橋本和明 「QCM による SAM-生体分子間の相互作用測定」 2012 年度材料技術研究協会討論会 2012 年 12 月

受賞：2 件

1. 2012 年度材料技術研究協会討論会 口頭講演賞 「チタニア／シリカ複合薄膜の調製および細胞シート調製への応用」
2. 2012 年度材料技術研究協会討論会 ゴールドポスター賞 「QCM による SAM-生体分子間の相互作用測定」

報告 7. 長鎖 RNA の X 線結晶構造解析

根本直樹・坂本泰一

はじめに

本プロジェクトでは、NMR を用いた立体構造解析を主としておこなっているが、分子量の大きな生体高分子の立体構造は、X線結晶構造解析が有効な解析法となり得る。そこで本研究では、HIV-1 のゲノム RNA の一部を X 線結晶構造解析することを試みた。

HIV-1 のゲノム RNA の 5'-UTR は、立体構造が変化することによって、その下流にある遺伝子の翻訳を促す状態と、ウイルスゲノムがパッケージングされる状態とが制御されると報告されている¹⁾。パッケージングの状態では、

5'-UTR の Dimerization Initiation site (DIS) を介して二量体化するとされており (図 1)、この状態の立体構造を明らかにできれば、HIV-1 粒子形成阻害剤の開発につながると期待される。そこで本研究は、HIV-1 の 5'-UTR の立体構造を X 線結晶構造解析によって明らかにすることを目的として行った。

研究成果

HIV-1 の 5'-UTR の 357mer を T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写法によって調製し、ゲル精製によって 17 mg, 150 μ mol を得た。4.6 mg/mL の濃度に調製し、600 種類以上の条件で結晶化をおこなった。目的とする RNA 結晶は得られていないが、図 2 (a) ~ (d) で示すような小粒が、10 種類以上の結晶化条件で確認された。そのうち 3 つの条件は良く似ており、高濃度のポリエチレングリコール 4000 または 8000 と、硫酸リチウムまたは硫酸の組合せであった。これらの濃度を少しずつ変えた条件で二次スクリーニングを行ったが、小粒ではなく油滴状の小胞が認められ、結晶ではないことが示唆された。また、図 2 (e), (f) で示すような結晶が 2 つの条件で得られた。しかし、いずれも結晶化条件から塩である可能性が高いと考えられた。回折実験をおこなったが、RNA 結晶由来の回折点は得られなかった。

今後も引き続き、回折実験が行える良質な結晶を得るため、目的 RNA の結晶化スクリー

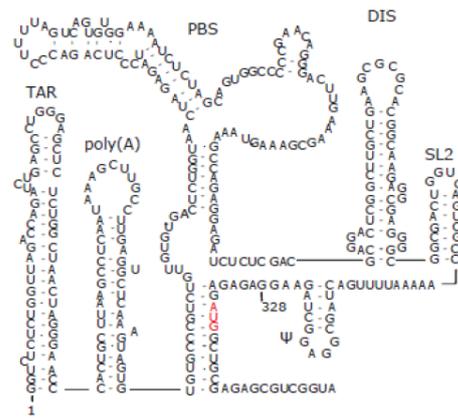


図 1. HIV-1 ゲノム RNA 5'-UTR の二量体化時の二次構造

ニングを行う予定である。Mg²⁺は、5'-UTR の二量体化を促進することが明らかとなっているので、Mg²⁺存在下で結晶化条件を検討する。また、Tat タンパク質あるいはヌクレオキヤプシドタンパク質を加えて、結晶化を試みる予定である。

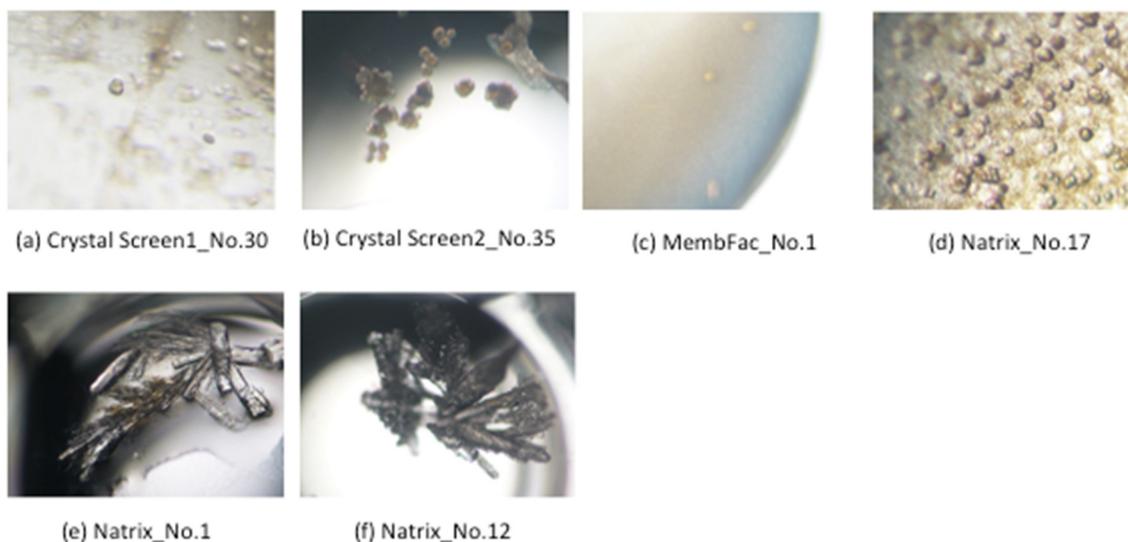


図2 結晶化スクリーニングの結果

結晶化条件は、(a) CS1_No.30 (30%PEG8000, 0.2 M 硫安), 4.6 mg/mL RNA 試料, (b) CS2_No.35 (0.1M HEPES pH7.5, 70%MPD), (c) MembFac_No.1 (0.1 M 酢酸ナトリウム pH4.6, 0.1M NaCl, 12%MPD), (d) Natrix_No.17 (0.05M カコジル酸ナトリウム pH6.0, 0.2M KCl, 0.01M CaCl₂, 10%PEG4000), (e) Natrix_No.1 (0.05 M MES pH5.6, 0.01 M MgCl₂, 1.8 M LiSO₄) (f) Natrix_No.12 (0.05M カコジル酸ナトリウム pH6.0, 0.01 M MgSO₄, 1.8 M LiSO₄)。RNA 試料の濃度は、(a), (b), (d) は、4.6 mg/mL, (c), (e), (f) は、1.2 mg/mL。

参考文献

1) K. Lu, X. Heng, L. Garyu, S. Monti, E. L. Garcia, S. Kharytonchyk, B. Dorjsuren, G. Kulandaivel, S. Jones, A. Hiremath, S. S. Divakaruni, C. LaCotti, S. Barton, D. Tumillo, A. Hosic, K. Edme, S. Albrecht, A. Telesnitsky, and M. F. Summers. NMR detection of structures in the HIV-1 5'-leader RNA that regulate genome packaging. *Science*, **334**, 242-245 (2011).

業績リスト

関連する発表論文および学会発表 共になし