

平成 23 年度報告書（概要）

平成 24 年度報告書（概要）

平成 25・26 年度報告書（概要）

平成 27 年度報告書（概要）

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（研究拠点を形成する研究）

長鎖 RNA の機能構造を発見するための技術基盤の開発とその応用

平成 23 年度 報告書

平成 24 年 7 月

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（研究拠点を形成する研究）
長鎖 RNA の機能構造を発見するための技術基盤の開発とその応用
平成 23 年度 報告書

本プロジェクトは、平成 23 年度より 5 年間の計画で、NMR 法を中心とした新しい解析技術を開発し、それを活用してさまざまな長鎖 RNA の機能と構造を明らかにすることをめざしている。

プロジェクトは大きく 2 つのチームから構成される（図 1）。チーム 1 では、長鎖 RNA の二次構造および立体構造を決定する手法の開発を行う。解析対象として、神経特異的な mRNA および免疫系特異的な mRNA を用い、手法の評価を行う。一方、チーム 2 では、主として RNA ウイルスのゲノム RNA を対象とし、その構造や相互作用の解析を行う。

プロジェクトのメンバーは、本学教員である河合、柴田裕史、橋本香保子、高久洋、坂本泰一、黒崎直子に加え、本学総合研究所教授である下遠野忠邦、博士研究員の大山貴子である。なお、学外の中村慎吾（Catalent Pharma Solutions）から助言を受けている。

プロジェクトでは、平成 23 年 6 月 20 日（月）にキックオフミーティングを行い、活動を開始した。その後、平成 23 年 12 月 19 日（月）に研究進捗状況の確認（第 2 回ミーティング）を行ったのち、平成 24 年 5 月 10 日（木）に第 3 回ミーティングを行った。本報告書は、第 3 回ミーティングまでの成果をまとめたものである。

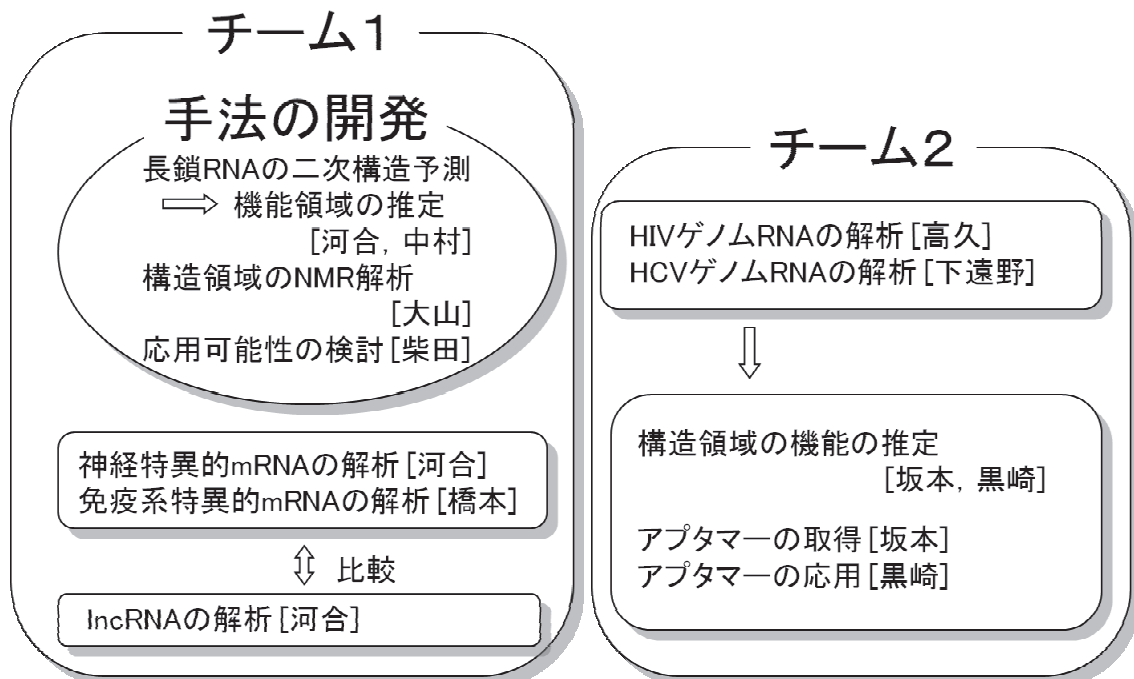


図 1 プロジェクトの構成

[プロジェクトの背景と概要]

本プロジェクトでは、千残基を超える長鎖 RNA について二次構造予測を行い、立体構造形成が予測される領域を推定すること、および推定した構造形成領域について主として NMR 法によって立体構造形成を確認するとともに、その立体構造を決定し、長鎖 RNA の機能との関連を明らかにする手法を開発することをめざしている。

千残基を超える長鎖 RNA の二次構造予測については、本学において開発された RNA 二次構造予測プログラムである *vsfold*¹⁻⁸⁾ を活用するとともに、武田薬品工業において開発された長鎖 RNA の二次構造可視化プログラムである *GenoPoemics*⁹⁾ を活用する。すなわち、*vsfold* によって予測した二次構造を *GenoPoemics* によって可視化するのである。図 2 は、その一例で、*HAR1F*¹⁰⁻¹¹⁾ と呼ばれる non-coding RNA について解析した結果である。図の上段と下段では、“表示レベル”を変えてあり、上段の縦方向の青いバーが比較的安定な二次構造の存在を示している。下段では、比較的安定な低い二次構造まで表示しているが、5'末端から 350~450 塩基の領域では二次構造がまったく予測されておらず、特殊な配列あるいは構造であることが示唆される。このように RNA の何カ所かで安定な構造の存在が予測されており、そのそれぞれがさらなる解析の出発点となる。本プロジェクトでは、この手法を活用し、さまざまな RNA から新しい構造領域を見出すことをめざしている。この手法の開発については、中村の協力のもと、河合が中心となって進めている。

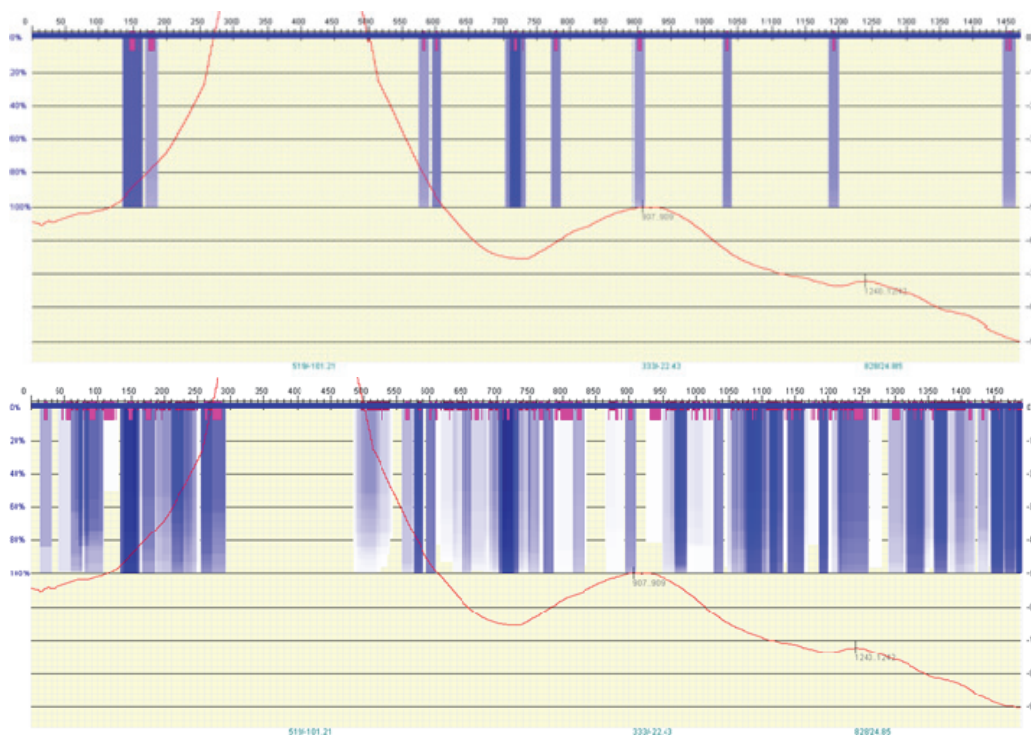


図 2 長鎖 RNA の二次構造解析の例

プロジェクトの重要な課題は、100 残基を超える RNA の立体構造を NMR によって決定する手法の開発である。この課題については、平成 20～21 年度において、JST 産学共同シーズイノベーション化事業「顕在化ステージ」として大陽日酸株式会社と共同で進めた「機能性長鎖 ncRNA の NMR 構造解析技術の顕在化」の成果を活用する。図 3 は立体構造解析の戦略を示しており、NMR の従来法による部分構造の決定 (①) と、残余双極子相互作用 (RDC) などの情報を活用した部分構造の相対配置あるいは相互作用の情報を利用した全体構造の解析 (②) を組み合わせることによって、全体構造を詳細に決定する (③) というものである。この開発は、博士研究員の大山を中心として進めている。

①の従来法による RNA の構造解析については、本学の河合および坂本によって、すでに多くの実績があるが、本プロジェクトではさらに、安定同位体標識法を活用したスペクトルの単純化、および自動解析システムの開発により、構造決定の効率の向上を進める。

②については、主として RDC による解析を活用するが、Pseudo-contact shift (PCS) や Paramagnetic relaxation enhancement (PRE) を利用する方法も検討する。

さらに本プロジェクトでは、これらの手法をウイルス RNA に適用し、新たな機能構造領域を見出す (高久, 下遠野) とともに、それに対するアプタマーを取得し (坂本)、機能解析に利用する (黒崎) こと、あるいは、機能領域とタンパク質あるいはアプタマー等の相互作用を解析する効率的な手法を開発すること (柴田) も計画している。

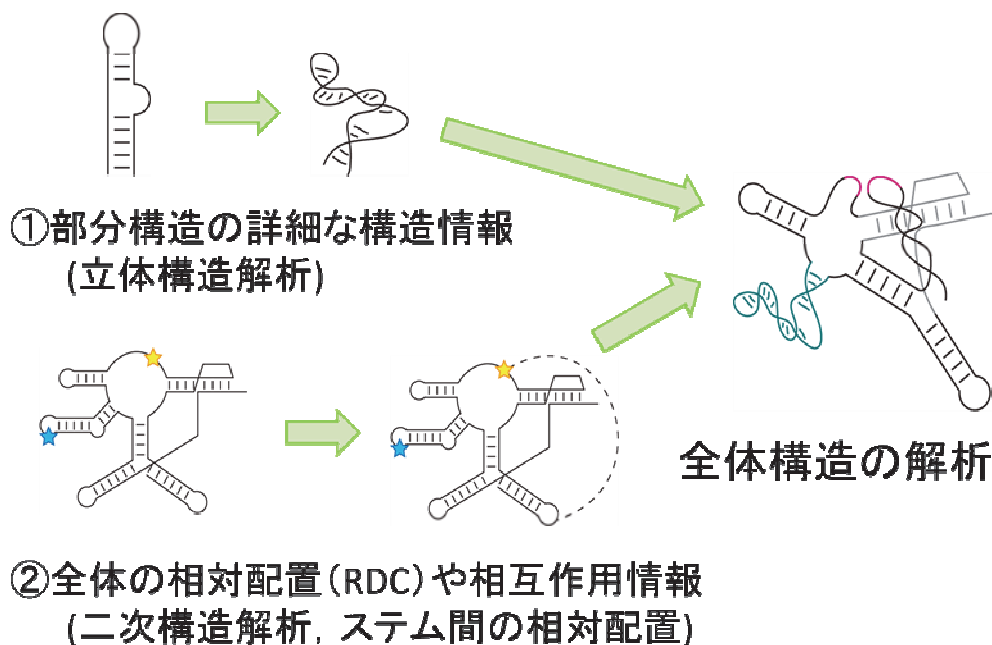


図 3 100 残基を超える RNA の立体構造解析

参考文献

(vsfold)

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.
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.
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, in press.
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, in press.
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, in press.
6. Modeling the Chain Entropy of Biopolymers: Unifying Two Different Random Walk Models under One Framework, Dawson, W., Kawai, G., *J. Comput. Sci. Syst. Biol.* **2**, 1-23 (2009).
7. Prediction of RNA Pseudoknots Using Heuristic Modeling with Mapping and Sequential Folding, Dawson, W., Fujiwara, K., Kawai, G., *PLoS ONE* **2**, e905 (2007).
8. A method for finding optimal RNA secondary structures using a new entropy model (vsfold), Dawson, W., Fujiwara, K., Futamura, Y., Yamamoto, K. and Kawai, G., *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **25**, 171-189 (2006).

(GenoPoemics)

9. A Novel Virtual Spectrometry: Visualized Regulatory Motifs on *ADM*, *rPolb* and *CD83* mRNAs in Human-friendly Manners, Nakamura, S., *J. Biochem.* **146**, 251-261 (2009).

(HAR1)

10. An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans, Pollard, K. S. et al., *Nature* **443**, 167-172 (2006).
11. Distinctive structures between chimpanzee and human in a brain noncoding RNA, Beniaminov, A., Westhof, E. and Krol, A. *RNA* **14**, 1270-1275 (2008).

研究プロジェクト・メンバー

工学部・教授	河合剛太	長鎖 RNA の構造解析手法の開発, および研究代表者
工学部・教授	高久 洋	HIV ゲノム RNA における構造領域の機能の推定
工学部・教授	黒崎直子	HIV ゲノム RNA における機能構造領域の応用
工学部・准教授	橋本香保子	免疫系における mRNA の構造と機能の解析
工学部・准教授	坂本泰一	ウイルスゲノム RNA の構造領域の解析およびアプタマーの取得
工学部・助教	柴田裕史	長鎖 RNA の相互作用の解析および応用可能性の検討
附属総合研究所・教授	下遠野邦忠	HCV ゲノム RNA における構造領域の機能の推定
博士研究員	大山貴子	NMR 法による長鎖 RNA の構造解析手法の開発

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（研究拠点を形成する研究）

長鎖 RNA の機能構造を発見するための技術基盤の開発とその応用

平成 24 年度 報告書

平成 25 年 7 月

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（研究拠点を形成する研究）
長鎖 RNA の機能構造を発見するための技術基盤の開発とその応用
平成 24 年度 報告書

本プロジェクトは、平成 23 年度より 5 年間の計画で、NMR 法を中心とした新しい解析技術を開発し、それを活用してさまざまな長鎖 RNA の機能と構造を明らかにすることをめざしている。

平成 23 年度から基本的なプロジェクトの構成に変更はないが、メンバーについて若干の変更があった（図 1）。チーム 1 では、博士研究員の大山貴子が平成 25 年 3 月で理化学研究所に異動となった。大山の担当していた課題（構造領域の NMR 解析）については、河合が引き継いでいる。また、チーム 2 では、本学総合研究所教授である下遠野忠邦が平成 24 年 10 月に学外に異動となったが、実質的に前回報告書以降はメンバーとしての活動は行っていない。下遠野が担当していた課題（HCV ゲノム RNA の構造解析）についても、河合が引き継いでいる。

第 3 回ミーティング（平成 24 年 5 月 10 日）までの研究成果を平成 23 年度報告書としてまとめた。その後、プロジェクトでは、平成 25 年 3 月 7 日に第 4 回ミーティングを行い、平成 25 年 6 月 17 日に公開シンポジウムを開催した。本報告書は公開シンポジウムまでの成果をまとめたものである。

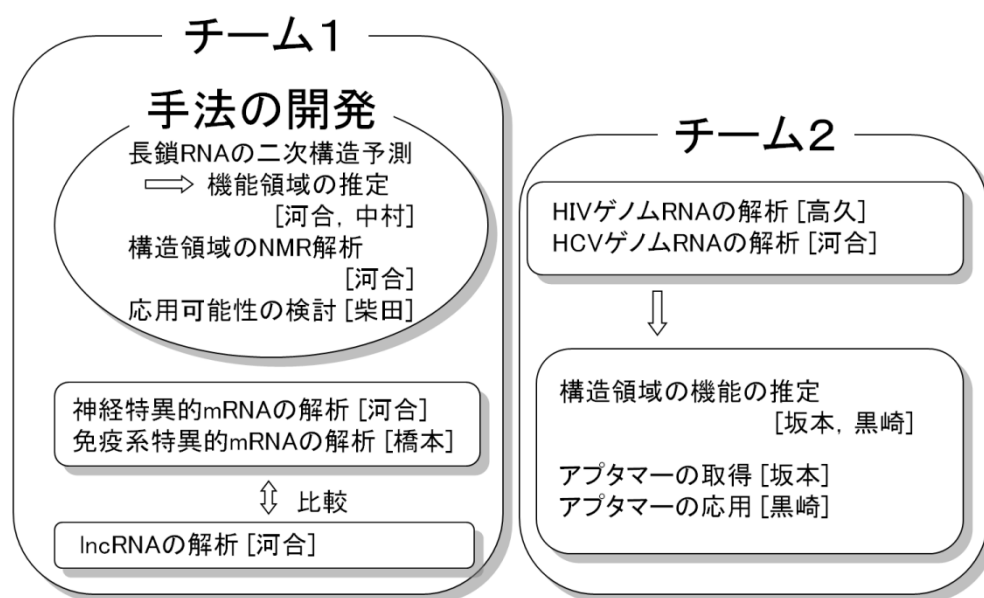


図 1 プロジェクトの構成（平成 25 年度）

[研究成果の概要]

平成24年度においては、引き続き各課題について研究を進めた。

河合と大山は、NMR法による長鎖RNAの構造解析手法の開発として、昨年度までに進めたHCVのIRESの構造解析に加え、新しく高度好熱菌由来TPPリボスイッチの解析に着手した。電気泳動法およびNMR法によって、デザインした91残基のRNAがチアミンニリン酸(TPP)と相互作用することを明らかにした。さらに、理化学研究所の平尾博士のグループとの共同研究により、人工塩基対システムを利用してRNAの特定の場所に常磁性タグを導入し、そのNMRスペクトルを測定した。このような手法は世界的にも類が無い。河合は、HCVゲノムRNAにおけるRNA-RNA相互作用の解析を進めるとともに、東京工業大学の梶川博士との共同研究として、ゼブラフィッシュ由来LINEの逆転写酵素認識部位のRNAステムループの構造解析にも着手している。さらに、イネのmRNAの5'-UTRに新たな機能を見出している東京理科大学の島田博士との共同研究も新たにスタートさせたところである。なお、梶川博士および島田博士には、平成25年6月に開催した公開シンポジウムにおいて、それぞれの研究について紹介していただいた。

河合と橋本は、それぞれ神経特異的および免疫特異的な長鎖RNAに関する解析を進めた。神経特異的なRNAに関しては、平成23年度に引き続き、JモチーフおよびHAR1F RNAの解析を進めている。また、免疫特異的なRNAについては、サイトカイン等のmRNAの3'-UTRに存在するARE配列に着目した解析を進めた。

RNAとRNAあるいはRNAとタンパク質の相互作用を簡便に解析する手法の開発をめざし、柴田はQCM法においてセンサーの金表面にRNAを簡便に吸着させる方法の開発を着実に進めている。

高久、坂本および黒崎は、長鎖RNAの機能構造を解析し、その応用を検討する研究を進めている。高久は、HIV-1に関連した多くの研究成果を上げており、その成果の一部(7SL RNAおよびHEXIM1)について、坂本がその応用可能性を検討している。坂本は、HCVゲノムRNAについてもアプタマーの取得を進めている。一方、黒崎は、坂本が作成するRNAアプタマーの応用を念頭に、HIV-1ゲノムRNAのさまざまな部位に対するsiRNAの効果などの解析を進めた。

平成25年6月に公開シンポジウムを行い、河合、柴田、高久および坂本が、これまでの研究成果を発表した。

このようにプロジェクトは順調に進んでおり、今後、大きな展開が期待できると考えている。なお、今後の課題として、これまでの成果を投稿論文として公表していく必要があると考えている。

[外部評価委員のコメントに対する対応]

平成23年度の成果報告書に対して、外部評価委員より重要なコメントを頂いた。これらについては、メンバーがそれぞれ対応しているが、以下にその主なものについて述べる。

コメント1

RNA-タンパク質相互作用解析の計画が具体的でない。QCMによる測定技術の改良は、こうした解析を見越したものか？

ご指摘の通り、QCMによる測定技術の改良は、RNA-タンパク質相互作用のスクリーニング手法の開発をめざして進めています。なお、相互作用解析という点では、河合と大山がTPPリボスイッチについてNMR法による相互作用解析を行っており、RNA-タンパク質相互作用解析についてもNMR法をもっとも重要な手法として位置付けています。

コメント2

RNaseマッピングやケミカルプロービングのような生化学的手法によるデータと本プロジェクトによるバイオインフォマティクスによる構造予測データ、さらにNMR測定データはどの程度合致するものなのでしょうか？

昨年度報告書で大山が示したように、HCV IRESの例では、主要のステムループのほとんどが、GPの解析によって明確に示されています。さらにNMR解析によっても予測されたステムループ構造が確認されており、この例においては、本プロジェクトによる解析結果はこれまでのさまざまな生化学的データと一致していると言えます。近年、長鎖RNAの構造解析は、例えばK.M. WeeksによるSHAPE法の開発などによって加速されています。これらの解析結果との比較を今後進めていきたいと考えています。

コメント3, 4

現在NMRによって構造解析されているRNA構造が、どのような生体制御機能を司っているのかについて検証する研究計画が明確でない。

機能的RNA配列の構造決定を共同研究によって積極的に推進すべきではないでしょうか？

大変重要なご指摘だと考えます。これまで構造解析の方法論の開発を中心にターゲットを選んできましたが、解析の結果として得られる構造の生化学的あるいは生物学的な機能が明確にならなければ、解析の意義が無いこととなります。そこで、新たに2つの共同研

究をスタートさせ、これによって構造と機能の関係に迫りたいと考えました。一つは、レトロトランスポゾンである LINE に関する共同研究で、逆転写酵素が自身の mRNA をどのように認識して逆転写反応を開始するかという問題です。もう一つは、イネの mRNA の 5'-UTR に存在する翻訳調節領域の構造解析で、そのメカニズムの解明を目標としています。LINE RNA の解析については、すでにある程度の進展があり、学会発表を予定しています。イネの mRNA の解析は、平成 25 年度の重要な課題と位置付けています。

コメント 5

miRNA による HIV 複製制御についてですが、標的配列の変異によって観察されているウィルス産生の減少効果が本当に miRNA に由来するものなのか、多面的に検証する必要があると思いました。

高久先生の報告書をご参照ください。

コメント 6

SELEX によって取得されたアプタマーについては、アプタマー自体の構造解析による RNA 機能構造の抽出という観点も視野に入れてらっしゃるのでしょうか？ もしそうでないとする、NMR 解析とアプタマーとを結ぶところが、不明確な気がしました。

坂本先生の報告書をご参照ください。

コメント 7

J-motif RNA について、標識位置や部位特異的標識を行うことにより、信号の帰属や NOE の観測データを増やすことによって、立体構造構築が可能になってくると考えられる。

J2 RNA については、化学合成法によって位置特異的に安定同位体標識した RNA を調製いたしました。NMR スペクトルの測定はこの報告書に間に合いませんでしたが、確実に帰属が進むと考えております。また、これまで解析していた J2 RNA とは少し配列の異なる J1 RNA についても解析を始めております。これらの情報を総合することによって、J-motif RNA の実態に迫れると考えています。

コメント 8

HCV 由来の IRES について、活性型と不活性型の局所的な立体構造の違いを明らかにし

ていくことが必要。特に金属が関与している活性型の構造決定には、常磁性シフトを利用した長距離核間距離や、残余双極子相互作用の配向情報を収集する必要がある。

NMR 法による解析に関して、重要なご指摘と考えます。残余双極子相互作用の利用については以前から進めており、今回、HCV RNA の解析において実際に利用し、その有用性を確認しました。また、理化学研究所の平尾博士との共同研究により、世界で初めて、転写合成によって常磁性タグを RNA に特異的に導入することに成功しました。今後は、これらの手法を、IRES を含めたさまざまな RNA に応用していく予定です。

研究プロジェクト・メンバー（平成25年度）

工学部・教授	河合剛太	長鎖 RNA の構造解析手法の開発， NMR 法による長鎖 RNA の構造解析手法の開発， HCV ゲノム RNA における構造領域の機能の推定 ,および研究代表者
工学部・教授	高久 洋	HIV ゲノム RNA における構造領域の機能の推定
工学部・教授	黒崎直子	HIV ゲノム RNA における機能構造領域の応用
工学部・准教授	橋本香保子	免疫系における mRNA の構造と機能の解析
工学部・准教授	坂本泰一	ウイルスゲノム RNA の構造領域の解析およびアプタマーの取得
工学部・助教	柴田裕史	長鎖 RNA の相互作用の解析および応用可能性の検討

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（研究拠点を形成する研究）

長鎖 RNA の機能構造を発見するための技術基盤の開発とその応用

平成 25・26 年度 報告書

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（研究拠点を形成する研究）
長鎖 RNA の機能構造を発見するための技術基盤の開発とその応用
平成 25・26 年度 報告書

本プロジェクトは、平成 23 年度より 5 年間の計画で、NMR 法を中心とした新しい解析技術を開発し、それを活用してさまざまな長鎖 RNA の機能と構造を明らかにすることをめざしている。平成 25 年度には、6 月 17 日に公開シンポジウムを行い、その後、9 月末に中間報告書を文部科学省に提出した。平成 26 年 5 月 13 日付で中間評価の評価票が届き、2 名の評価委員による総合所見は A および B という結果であった。

平成 23 年度から基本的なプロジェクトの構成に大きな変更はなく、メンバーについては平成 24 年度に若干の変更があったが、25 年度では変化はない。なお、平成 26 年度において、X 線結晶構造解析を担当する根本直樹が参加し、千葉工業大学附属総合研究所の客員研究員である竹中章郎と協力して RNA の X 線結晶構造解析をスタートさせた。これは中間評価におけるコメントに対応したものである。

公開シンポジウム（平成 25 年 6 月 17 日）までの研究成果は平成 24 年度報告書としてまとめてある。平成 26 年 9 月 13 日にメンバーによる第 5 回ミーティングを行った。本報告書は、公開シンポジウム以降、平成 26 年秋までの研究成果をまとめたものである。

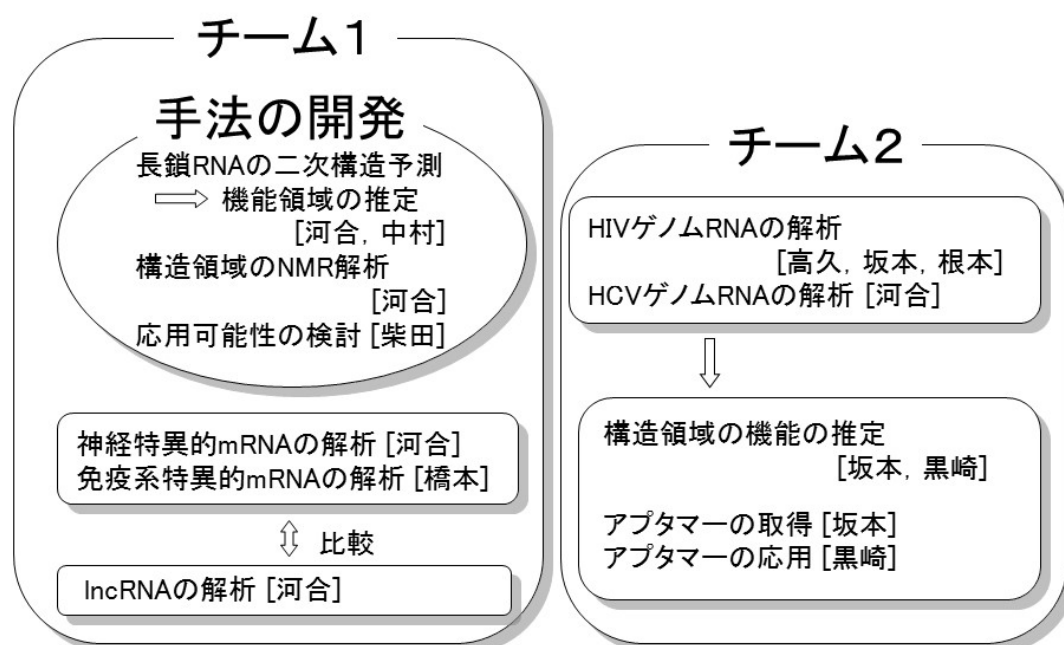


図1 プロジェクトの構成（平成 26 年度）

[研究成果の概要]

平成25年度6月の以降においても、引き続き各課題について研究を進めた。

河合はこの期間において、ゼブラフィッシュ由来 LINE の逆転写酵素認識部位の RNA ステムループの構造解析および HCV ゲノム RNA における RNA-RNA 相互作用の解析を重点的に進めた。逆転写酵素認識部位 RNA の解析については、その立体構造を NMR 法によって決定し、逆転写酵素の認識に重要であると予想されている残基が溶媒に露出した構造であることを明らかにした。さらに、逆転写酵素の RNA 認識モチーフに相当するペプチドを調製し、ゲルシフト法による相互作用解析を進めている（報告1A）。また、HCV ゲノム RNA の分子内 RNA-RNA 相互作用についても、ゲルシフト法および NMR 法においてその存在を実証した（報告1B）。これらについては、プロジェクトの最終年度にかけて、NMR 法による相互作用解析を集中的に行い、論文発表まで進める計画である。また、昨年度まで進めてきた HCV の IRES および高度好熱菌由来 TPP リボスイッチに関する構造解析については、人工塩基対システムを利用して導入した常磁性タグによる常時性緩和促進 (PRE) の解析を含め、論文作成中である。さらに、公開シンポジウムにおいて東京理科大学の島田博士にご紹介いただいたイネの mRNA の翻訳促進活性をもつ 5'-UTR についての共同研究もスタートさせた（報告1C）。昨年度まで行った神経特異的な長鎖 RNA の解析についても vsfold/GP システムによる解析を中心に、論文発表を予定している。

河合と橋本は中村と協力して、免疫特異的な長鎖 RNA に関する解析として、mRNA 編集因子である APOBEC1 とインターロイキン8との相互作用の解析に着手した（報告2）。この相互作用は、国立国際医療研究センターの下遠野博士および清水博士によって発見されたものである。なお、下遠野博士は、プロジェクトの発足時のメンバーである。現在、ARE 配列の繰り返し領域の重要性について検討しており、ターゲットを絞り込んだ上で、立体構造解析および相互作用解析を行いたいと考えている。

柴田による金表面に RNA を簡便に吸着させる方法の開発は着実に進んでおり（報告3）、プロジェクト終盤では、RNA と RNA あるいは RNA とタンパク質の相互作用解析に実際に応用することができると考えている。

高久、坂本および黒崎は、長鎖 RNA の機能構造を解析し、その応用を検討する研究を進めている。高久は、昨年度までに続き、HIV-1 に関連した多くの研究成果を上げた（報告4）。高久は平成25年度で定年退職しており、研究そのものは区切りとなったが、論文の作成は続けている。坂本は、HIV および HCV のゲノム RNA について、アプタマーの取得を進めている（報告5）。一方、黒崎は、坂本が作成する RNA アプタマーの応用を念頭に、HIV-1 ゲノム RNA のさまざまな部位に対する siRNA の効果の解析およびアプタマーの導入方法の検証を進めた（報告6）。また、坂本と根本は、HIV ゲノム RNA の 5'-UTR をターゲットに X線結晶構造解析に着手した（報告7）。

このようにプロジェクトは順調に進んでおり、プロジェクトの終盤では、それぞれの課題において具体的な成果が期待できると考えている。

[外部評価委員のコメントに対する対応]

平成23年度報告書に続き、平成24年度の成果報告書に対しても、外部評価委員より重要なコメントを頂いた。これらについては、メンバーがそれぞれ対応しているが、以下にその主なものについて述べる。

コメント1

[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)]

TyTPP91のTPPの滴定実験について、図3の滴定NMRスペクトルにおいて、まずRNA単体、RNA-TPP複合体、TPP単体由来のシグナルが区別して見えているのでしょうか。図からはその点がはっきりしません。

TPPの添加によって、消失するシグナルと新しく登場し増加するシグナルがあります。これらは、それぞれRNA単体およびRNA-TPP複合体のシグナルとなります。また、TPPを過剰に加えることにより、TPP単体のシグナルも観測されます。モル比で1:1のスペクトルは、RNA-TPP複合体のシグナルのみが観測されていると考えています。

図3の領域では、イミノ基およびアミノ基のプロトンシグナルが観測されており、ほとんどがRNA由来です。TPPの添加によってこれらのシグナルがシャープになっていることから、TPPと複合体を形成することによって、立体構造が固定されることが示唆されます。

コメント2

一部のシグナルがTPPの添加に伴い消失したとありますが、この消失したシグナルの由来は何でしょうか。

消失したのか、シフトが変化したのかは明確にすることは今後の課題となっていますが、消失するとすれば、TPPの結合により二次構造が変化し、塩基対が解離したことによって、イミノプロトンシグナルが観測されなくなったことが原因となります。

コメント3

RNA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、1対1で複合体を形成していることが示唆されたとありますが、その前に交換速度はNMRタイムスケールより遅いことが分かった記述されています。この場合、化学シフトは変化せず複合体由来の信号強度の増加が1等量添加で終了するようには見えないのでしょうか。

ご指摘ありがとうございます。「化学シフト変化」ではなく「スペクトルの変化」とすべきでした。結合は十分に強く交換速度が遅いことから、基本的に、単体のシグナルと複合体のシグナルは別々に観測されます。

コメント4

常磁性タグの導入は複合体の立体構造決定に大変有用な方法であると評価できます。常磁性にも緩和にきく試薬や、シフトにきく試薬がありますので、常磁性イオンを選択することにより、さらに情報量を増やすことができるのではないかと思います。

ご指摘ありがとうございます。ぜひ取り組んでみたいと考えております。

コメント5

[HCV ゲノム RNA における構造領域の立体構造解析 (河合剛太)]

Mg^{2+} 存在下において、複合体の形成が確認されたと記述されていますが、 Mg^{2+} 非存在下でも分子間の塩基対が形成されていることが明らかになったと記述されています。この結果は、 Mg^{2+} が複合体形成に必須なのではなく、複合体を形成する相互作用を安定化する働きがあるということでしょうか。

ご指摘のとおりで、 Mg^{2+} が複合体の構造を安定化すると考えています。電気泳動の際には、 Mg^{2+} によって安定化されていないと分離してしまい、複合体のバンドが観測されないと考えています。

コメント6

単体のスペクトルの和と複合体のスペクトルはほぼ一致することが分かったと記述してあります。またイミノプロトンシグナルの解析から分子間の塩基対形成が確認できているとあります。塩基対形成は水素結合の形成を意味しますが、化学シフトの変化はないのでしょうか。

イミノプロトンシグナルについては、塩基対を形成していないと（溶媒との交換によって）観測されないため、化学シフトの変化を追跡できません。CH プロトンについては、水素結合している原子から離れているため、化学シフトの変化は小さいと考えています。

コメント7

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分かったと記述されています。このマイナーな構造の寿命とメジャーに対する量比はどの程度なのでしょうか。

たいへん重要なお指摘だと考えます。マイナーなシグナルは強度が弱く、NOESYを測定した際に、交換ピークが存在したことからその存在がわかりました。この交換ピークの強度を解析することによって、寿命と量比が推定できる可能性がありますので、今後の検討課題としたいと思います。

コメント 8

[LINE RNA 逆転写酵素認識部位の立体構造解析 (河合剛太)]

ゼブラフィッシュの LINE 配列部位が ZfL2-1 と ZfL2-2 の 2 種類が存在し、ZfL2-2 が UnaL2 に近いということですが、その後でてくる Zf2-1, Zf2-2 は ZfL2-1, ZfL2-2 とどのような関連があるのでしょうか。

ご指摘ありがとうございます。Zf2-1 は ZfL2-1 の誤記です。また、Zf2-2 は ZfL2-2 の誤記です。大変失礼いたしました。

コメント 9

ZfL2-1 における逆転写酵素と RNA との相互作用解析は重要です。この相互作用を解析して逆転写開始のメカニズムを明らかにしていただきたい。その際、UnaL2 と逆転写酵素との相互作用解析はすでに解析されているのでしょうか。RNA との相互作用解析はどのような NMR 手法を用いて行う計画でしょうか。

これまで、UnaL2 あるいは ZfL2-1 の逆転写酵素の精製を試みてきましたが、共同研究者の梶川博士のグループも私たちも、構造解析に必要な量を調製することができませんでした。理化学研究所のタンパク質調製パイプラインにも依頼しましたが、やはり難しいとの回答でした。このため、相互作用解析に着手できませんでした。最近になって、梶川博士のグループが逆転写酵素において RNA の特異的認識に関与している領域を突き止めました。そこで、この結果に基づいてペプチドを調製し、相互作用解析を行ったところ、報告 1 A に示したように、ペプチドと RNA で特異性が再現できたと考えています。この系については、構造解析を重点的に進め、成果をあげたいと考えています。

コメント 10

以前の報告書内に記載があったのかもしれないが、J-motif についての記載が理解しづらい。J-motif は、GP-vsfold によっても、他の予測法によっても、二次構造が予測されないと記載されているが、そもそも J-motif は、どのようなクライテリアによって抽出されたモチーフなのか？ 既存の二次構造予測では予測できない J-motif が、NMR 解析の結果何らかの特殊構造をとっていることが示唆された点は、大変興味深い。しかし一方で

「二次構造を予測できなかった GP-vsfold」の有用性については、どのように考えればよいのか？

用語の定義および用法が曖昧だったかもしれません。今後の課題としたいと思います。

vsfold を含む二次構造予測プログラムは、A-U, G-C および G-U 塩基対の形成を指標として、予測を行います。したがって、例えばベーストリプルやGカルテットのような構造は予測できません。J-motif も、A-U, G-C および G-U 塩基対とは異なる相互作用によって形成され、このために二次構造予測プログラムでは構造形成が予測されないと考えています。なお、ベーストリプルなどの構造は、一般的には「二次構造」には含まれず、高次構造とみなされると思います。もし配列がランダムであれば、なんらかの塩基対が偶然に形成される可能性が高く、逆に、二次構造がまったく予測されないということは、何らかの高次構造が存在するという可能性を示唆すると考えています。

J-motif については、現時点で立体構造を提示することができておらず、構造形成の実証には至っておりません。現時点では、結晶構造解析も有効ではないかと考えております。

コメント 1 1

今回見いだした ARE 周囲の二次構造は、どの程度意味があるものなのか、それを検討する具体的な方策が不明瞭と思われる。一方で、この解析は「免疫機能に関与する lncRNA の新規機能の検索」のための予備的位置づけなので、できれば次年度以降は lncRNA 機能探索のための具体的な方策を示されることを望む。またその検索成果に期待したい。

ご指摘ありがとうございます。ARE につきましては報告 2 に示したように APOBEC1 との相互作用という新しい観点からの研究をスタートさせております。これについて、解析を進めたいと考えております。また、lncRNA 機能探索のための方策についてぜひ検討したいと考えております。

コメント 1 2

QCM 解析、光吸脱着反応を用いた RNA 解析の想定される例などを記載していただけると、その価値が理解しやすいと思われる。

ご指摘ありがとうございます。プロジェクト終盤では、具体的な応用例を示したいと考えております。

コメント 1 3

miRNA が Luc 発現抑制に関わるという証拠が未だ薄弱であると思われる。実際に予測シード配列から Jurkat 細胞内に存在する miRNA 候補を予測できるはずなので、miRNA 配列に compensatory 変異を加えたものを発現させたときに、derepression 効果がレスキューされるかなど、RNA-RNA 相互作用を確認する実験が必要である。Drosha だけでなく、Dicer のノックダウン実験も必要と思われる。一方、この配列への相互作用因子が、miRNA ではなくタンパク質因子であっても、それは意義深いと思われる。

Drosha のノックダウンに加えて、Ago2/標的 mRNA/miRNA の複合体形成の検出を行いました。詳しくは報告 4 をご参照ください。

コメント 14

DIS 自体の二量体化を阻害するようなアプタマー選別を行ってもよいのではないだろうか。項目 8 に記載のある DIS に対するアンチセンス核酸は、どの程度の阻害効果があるのかが良いコントロールになると思われる。また DIS は直接ビオチン化した方がよいのではないだろうか。NS5A 結合アプタマーに関しても、NS5A に対して HCV 3' UTR との競合条件下で、結合 RNA を選別するようなステップが必要なのではないだろうか。昨年の疑問点に対する回答から、アプタマーを用いて RNA の立体構造探索を行うという興味深いアイデアをよく理解することができた。一方、計画では SELEX と NMR によって立体構造を解析、とあるので、項目 2 の HCV RNA の NMR 解析とどのように連携していくかについても記載があった方がよいと思われた。

報告 5 をご参照ください。

コメント 15

結果の記載によると、スプライシングされずに gag mRNA が生じ、スプライシングを経て tat mRNA が生じる、とある。今回の ASO は、このスプライシング阻害を試みたものと思われる（模式図があるとよいと思われる）。しかし実際の ASO の効果は、gag mRNA の減少と tat mRNA の消失であった。もしスプライシングが阻害されているならば、gag mRNA のレベルが上昇するのではないだろうか。もしスプライシングだけを阻害する目的なら、ASO は RNaseH 切断を伴わない核酸組成にした方がよいと思われる（抗ウイルス作用を優先するのであれば、現在の ASO でもよいと思われるが）。

報告 6 をご参照ください。

[中間評価のコメントに対する対応]

文科省による中間評価において、1名の審査員の評価はおおむね良好であったが、もう1名の審査員からはいくつかの改善すべき点が指摘された。これらについて説明する。

コメント1（研究組織）

チーム1の解析結果を受けてアプタマー創生を行うチーム2への研究の流れがありますが、記載されているチーム2のHCVゲノムRNAやHIV-1ゲノムRNAのアプタマー取得に関し二次構造予測プログラムの成果との関わりを明確に記述いただきたいと思います。

HCVゲノムRNAあるいはHIV-1ゲノムRNAについては、国内外においてすでに多くの二次構造解析が行われており、それらの成果に基づいて、アプタマー取得のための設計が行われております。将来的に、例えばIL8 mRNAやイネのmRNAあるいはlncRNAなどにおいて、予測された二次構造に基づいたアプタマー創生という形が出来上がることをめざし、まずはそれぞれの研究を進めたいと考えておりますが、プロジェクトの終盤で、いずれかの系で具体例を示すことを検討いたします。

コメント2（研究施設・設備）

報告書ではアプタマー相互作用解析には現状QCM法を唯一採用されているように見受けられます。他手法（ITCやSPR）との混合で、有効な核酸相補的相互作用と他の分子間力による相互作用を弁別し、二次構造予測からだけでも、よりユニバーサルなRNA対RNAアプタマー創成が行えるように資源配分する、もしくは共同研究を行うことが望ましいかと思いました。

アプタマー創成を担当している坂本は、平成25年度よりITCを導入し、アプタマーの相互作用解析に利用しています。ITCでは、相互作用に伴う熱力学的なパラメータを解析することができるため、QCMとの組み合わせによって指摘されているような相互作用の分別が可能になるため、これらを活用したいと考えています。SPRは広く用いられている重要な手法ですが、得られる情報はQCMと類似しているため、現時点ではSPRの導入は検討しておりません。河合が導入したQCM装置（NAPiCOS）は、仕組みが単純なため、柴田の開発するRNA固定技術の導入が容易であり、これを活用したいと考えています。

コメント3（進捗状況・研究成果）

チーム1で構造解析手法として①プログラムを用いた二次構造予測を行うか、②実験的に立体構造解析を行うか、によってチーム2におけるアプタマー開発の速度と精度が大き

く左右されます。現状では手法①による成果が先行していますが、手法②への研究資源配分を重点的に行うべきかと思います。NMRの人員が減少しましたが、今後、X線も視野に入れるようなので、人員配備が必要と思います。

プロジェクトとしては、NMR法による長鎖RNAの構造解析手法の開発を中心とすることに変わりはなく、河合のグループを中心に具体的成果をあげるべく努力をしております。一方、NMR法とX線結晶構造解析は相補的な関係にあり、両方の手法を効果的に利用することも重要であります。平成25年度から核酸のX線結晶構造解析が専門の竹中章郎先生を客員研究員にお迎えし、さらに平成26年度においては、竹中先生が前職のいわき明星大学で所有されていたX線回折計を本学に移設し、稼働させました。また、これに合わせて、X線結晶構造解析を専門とする本学教員である根本をメンバーに向え、坂本と協力してHIV-1ゲノムRNAの5'-UTRの結晶化を開始しました。

以上のように、中間評価のコメントについて、適切に対応していると考えております。

研究プロジェクト・メンバー（平成26年度）

工学部・教授	河合剛太	長鎖 RNA の構造解析手法の開発, NMR 法による長鎖 RNA の構造解析手法の開発, HCV ゲノム RNA における構造領域の機能の推定, および研究代表者
工学部・教授	高久 洋	HIV ゲノム RNA における構造領域の機能の推定
工学部・教授	黒崎直子	HIV ゲノム RNA における機能構造領域の応用
工学部・教授	坂本泰一	ウイルスゲノム RNA の構造領域の解析およびアプタマーの取得
工学部・准教授	橋本香保子	免疫系における mRNA の構造と機能の解析
工学部・准教授	柴田裕史	長鎖 RNA の相互作用の解析および応用可能性の検討
工学部・助教	根本直樹	HIV ゲノム RNA の構造解析

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（研究拠点を形成する研究）

長鎖 RNA の機能構造を発見するための技術基盤の開発とその応用

平成 27 年度 報告書

平成 28 年 5 月

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（研究拠点を形成する研究）
長鎖 RNA の機能構造を発見するための技術基盤の開発とその応用
平成 27 年度 報告書

本プロジェクトは、平成 23 年度より 5 年間の計画で、NMR 法を中心とした新しい解析技術を開発し、それを活用してさまざまな長鎖 RNA の機能と構造を明らかにすることをめざして推進された。平成 25 年 9 月に提出した中間報告書についての総合所見は A および B という結果であった。所見として、立体構造解析のさらなる充実の重要性が指摘され、NMR 法に加えて X 線結晶構造解析法の導入が示唆された。これに対応し、平成 26 年度に X 線回折系を導入し、RNA の X 線結晶構造解析に着手した。また、これを担当するため、本学の根本直樹が参加している。

平成 23 年度から基本的なプロジェクトの構成に大きな変更はなく、メンバーについては平成 24 年度および平成 26 年度に若干の変更があったが、27 年度では変化はない。

平成 26 年 12 月の時点で、中間評価以降の研究をまとめた報告書を作成し、2 名の外部評価委員による評価を受け、これを参考に最終年度の研究を推進した。

平成 27 年度の成果を含む 5 年間の研究成果については、研究成果報告書にまとめることとし、ここでは、外部評価委員の評価に対する対応についてコメントする。

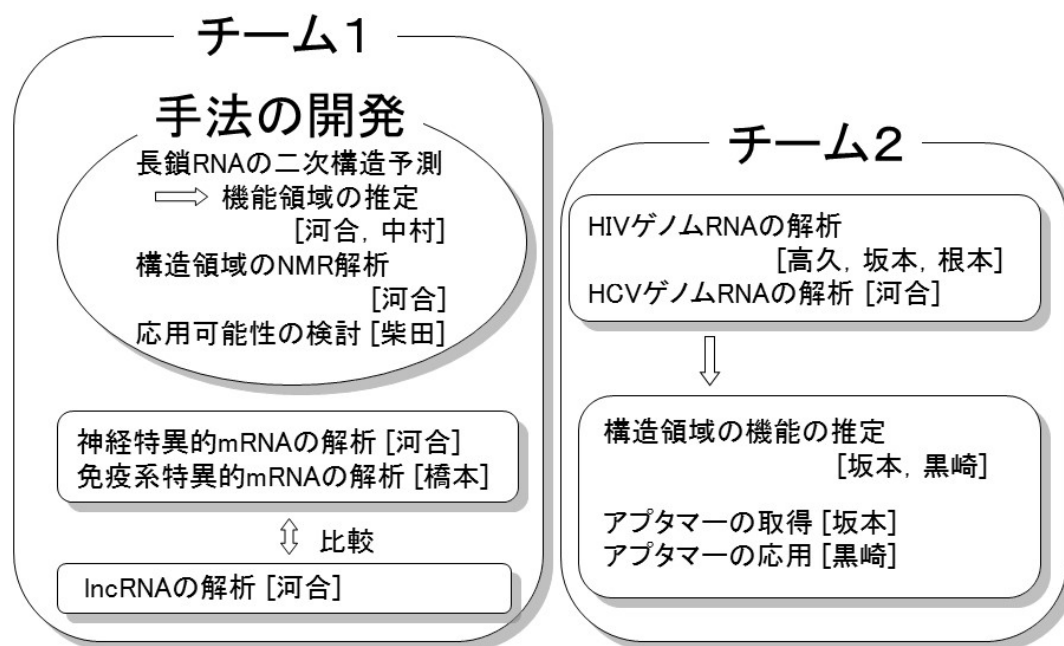


図1 プロジェクトの構成（平成 27 年度）

[外部評価委員のコメントに対する対応]

平成25・26年度報告書に対して、外部評価委員より重要なコメントを頂いた。これらについては、メンバーがそれぞれ対応しているが、以下にその主なものについて述べる。

コメント1

[HCV ゲノム RNA における構造領域の立体構造解析 (河合剛太)]

これらの相互作用が、どのように HCV ゲノム全体の立体構造を決定し、それがゲノム維持や発現にどのように関わっているかが興味深い。こうした方向に向けて、今後どのような解析が可能であるかを提示する必要があるのではないだろうか。

長鎖 RNA において、立体構造を形成する領域を見出し、その構造を明らかにする手法を開発することが、本プロジェクトの目標である。HCV ゲノム RNA の研究においては、RNA 上の異なる位置にある領域間での相互作用が示唆されており、対応する断片を用いることによって、それらの相互作用を NMR 法により明らかにした。コメントは、この研究の先にある、分子内の相互作用が全体構造あるいは機能に与える影響の解析への展開を期待したものであり、重要なポイントである。これに関しては、生化学あるいは細胞生物学的な研究と絡めていくことが必要であり、本プロジェクトのスタート時のメンバーであった下遠野博士との共同研究により、同一の変異が構造と機能にそれぞれどのような影響を与えるのかを比較することによって、構造と機能の関係に迫ることを計画している。また、今後は、本プロジェクトで坂本と根本が進めているような比較的大きな RNA 分子についての X 線結晶構造解析が重要であると考えている。

コメント2

[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)]

本プロジェクトにて開発(改良?)された vsfold/GP システムを用いて、5'UTR 内の構造予測をしているが、翻訳エンハンサー機能と予測構造との関係が今ひとつ理解しがたい。M-fold などで表示される二次構造モデルを作成して議論すると、より分かりやすいのではないかと考えられる。また vsfold/GP システムと他の RNA 二次構造予測アルゴリズムとの比較を行うことも重要であり、ウェット実験による裏付けを通して本システムの優位性が示せるとよいと考える。

非常に重要なご指摘と考えます。vsfold/GP システムについては、現状では限られた特定の研究者が利用している段階であり、その理由の一つが GP による二次構造の提示方法と mfold などによって示される二次構造が見かけ上大きく異なっていることと思われる。これに対応するためには、まず少しでも多くの研究者に vsfold/GP システムを利用しただけことが重要であり、このために平成27年度に vsfold/GP を簡単に利用できる

web サイトを作成し、公開しました (<http://www.rna.it-chiba.ac.jp/~vswindow/cgi-bin/index.cgi>). 今後はこのサイトを利用した研究者からのフィードバックにも期待し、改良していく予定です. なお, vsfold/GP システムと他のシステムとの比較, およびウェット実験との比較については, 今後ぜひとも進めたいと考えています.

コメント 3

[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)]

QCM を用いた新規分子間相互作用の検出技術の開発をめざしており、今回センサー上への DNA の固定化に成功した。この点は技術開発上、大きな進展であると考えられる。今後 RNA の固定化に向かうことは意味があると思われるが、固定した DNA にタンパク質（転写因子など）が相互作用した際に、実際に QCM で定量的に観測できるのか、などの実質的な実験も併せて行うべきであろう。さもないと有用性が不明な技術開発で終わってしまいかねないのではないかな。

重要なお指摘と考えます。DNA の固定化においては、2 本鎖の DNA を用いているため、相互作用したタンパク質を定量的に評価することは本系では困難と推測されます。そのため、既にタンパク質との相互作用が明らかとなっている RNA を用いることで、相互作用だけでなく、定量的な評価についても検討を行う計画です。なお、これまでは比較的短い RNA 断片を利用しておりましたが、比較的長い RNA を用いることによって、その一部分で固定され、他の部分でタンパク質などとの相互作用が起こることを期待しています。また、二種類の成分からなる自己組織化膜を使用して RNA の結合領域を限定し、RNA の一部分のみが固定されるようなシステムの開発も予定しています。

コメント 4

[ウイルスゲノム RNA の構造領域の解析およびアプタマーの取得 (坂本泰一)]

HIV ゲノム調節領域を標的としたアプタマーの取得をめざし、DIS, TAR に結合するアプタマー選択を行い、TAR 結合性アプタマーを取得した。TAR 結合性アプタマーに関しては、すでに先例があり、今回の実験でも同様の配列をもつ RNA 配列が得られている。こうした状況の中で、今後どのような独自性を出していくのかについて記載することが望ましい。また既存の TAR アプタマーに比べて、今回取得されたアプタマーが優れた結合性を示すかどうかの検討なども必要であろう。またそもそも SELEX のストラテジーとして、先例のものとは異なるものを選別するひねった戦略を考案することが重要ではないかな？

重要なお指摘と考えます。既存の TAR アプタマーに結合活性を比較する予定です。さらに、他の標的部位についてアプタマーを取得するとともに、5' -UTR 全体の長鎖 RNA を標的としたアプタマーを取得する計画です。例えば、5' -UTR の 2 つのコンホメーション

ョンを用意し、一方のコンホメーションで **negative selection** をした後に、他方のコンホメーションに対してアプタマーを取得することにより、5' -UTR の 2 つのコンホメーションを識別するアプタマーを取得するなど、TAR アプタマーを取得した時の戦略とは異なる戦略も考えています。

コメント 5

[LINE RNA と逆転写酵素の認識特異性の認識要因 (河合剛太)]

ZfL2-1-G10 と RRM2-2 が複合体を形成することが、反映したことは重要な成果と思います。NMR で複合体由来の信号が見えていますから、複合体の寿命は長いことが考えられます。RRM2-2 の同位体標識化を進めて、NMR による複合体の構造決定を行い、相互作用部位の決定を行うことを期待します。さらに、ZfL2-2 と RRM2-2 についても複合体形成を確かめ、複合体構造を決定することは可能でしょうか。

ZfL2-2 と RRM2-2 についての相互作用解析を進めており、現在までに複合体形成が確認できました。今後は、この複合体の立体構造解析も進める計画です。

コメント 6

[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)]

OsMac1 や OsMac3 の 5' UTR の二次構造予測の結果を基にして、残基数の少ない、活性部位を特定し、この部位について NMR による立体構造決定を行うことは可能でしょうか。

その方向で、すでにターゲット領域を絞り込み、その構造解析を開始しています。また、翻訳エンハンサー活性に影響のある変異体についても並行して解析を進めており、それらを比較することによって、機能との関連を示すことができると期待しています。

コメント 7

[長鎖 RNA の相互作用と解析および応用可能性の検討 (柴田裕史)]

QCM の金基板上にチオール誘導体の自己組織化膜の形成が成功し、DNA の固定化が成功して、さらに RNA の固定化に成功している点は、RNA-RNA, RNA-蛋白質相互作用を解析する展望が出てきた点は評価できます。このプロジェクトで研究が進められている系に応用する展開を期待します。可能性についてのコメントですが、RNA に自己組織化膜に結合するタグを結合させ、このタグによって、RNA を金基板に固定化するという方法は考えられないでしょうか。

重要なお指摘ですが、本研究で進めている手法の良いところは、RNA 側に手を加えず、センサー表面に導入できることだと考えております。この手法での応用を進めたうえで、次のステップとして検討したいと考えています。

研究プロジェクト・メンバー（平成27年度）

工学部・教授	河合剛太	長鎖 RNA の構造解析手法の開発, NMR 法による長鎖 RNA の構造解析手法の開発, HCV ゲノム RNA における構造領域の機能の推定, および研究代表者
工学部・教授	高久 洋	HIV ゲノム RNA における構造領域の機能の推定
工学部・教授	黒崎直子	HIV ゲノム RNA における機能構造領域の応用
工学部・教授	坂本泰一	ウイルスゲノム RNA の構造領域の解析およびアプタマーの取得
工学部・准教授	橋本香保子	免疫系における mRNA の構造と機能の解析
工学部・准教授	柴田裕史	長鎖 RNA の相互作用の解析および応用可能性の検討
工学部・助教	根本直樹	HIV ゲノム RNA の構造解析

公開シンポジウム ポスター

公開シンポジウム

長鎖 RNA の機能構造を発見するための 技術基盤の開発とその応用

講演者

河合剛太 千葉工業大学

梶川正樹 東京工業大学

島田浩章 東京理科大学

柴田裕史 千葉工業大学

坂本泰一 千葉工業大学

高久 洋 千葉工業大学

平成 25 年 6 月 17 日 (月) 14 : 00 ~ 17 : 00

千葉工業大学 津田沼キャンパス 2 号館 2 階会議室 3・4

懇親会 17 : 30 から 2 号館 20 階ラウンジ (会費制)

連絡先 河合剛太 gkawai@sea.it-chiba.ac.jp