

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～平成 27 年度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)

研 究 成 果 報 告 書

平成 28 年 5 月

学校法人名 千葉工業大学

大 学 名 千葉工業大学

研究組織名 ハイテク・

リサーチ・

センター

研究代表者 河合剛太

(千葉工業大学工学部教授)

はしがき

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。総合所見はAおよびBという結果であった。留意事項として構造解析のさらなる拡充の重要性が指摘され、これに対応するため、平成26年度において、RNAのX線結晶構造解析をスタートさせた。本報告書はこの5年間の研究成果をまとめたものである。また、これらの成果を公表する公開シンポジウムを平成28年7月に開催する予定である。

本プロジェクトの推進にあたり、北海道大学遺伝子病制御研究所の廣瀬哲郎博士および横浜国立大学大学院工学研究院の内藤晶博士に外部評価委員をご担当いただき、それぞれ3回の評価をお願いした。廣瀬博士はRNA研究の第一人者であり、また、内藤博士は生体分子のNMR解析の第一人者で、現在の日本核磁気共鳴学会会長でもある。平成24年8月にはプロジェクト1年目の研究成果について、また平成25年9月にはプロジェクト2年目の研究成果について評価をいただき、その後のプロジェクトの推進に活かした。また、平成27年2月に中間報告書以降の研究成果についての評価をいただき、プロジェクトの最終年度に向けて活用した。外部評価委員からは、率直で重要なコメントを多数いただくことができ、これによってプロジェクトを適切な方向に進めることができた。この場を借りて、お二人の評価委員に深い感謝の意を表したい。

研究代表者 河合剛太

[研究成果の概要]

本研究プロジェクトは、2つの研究チームによって推進した（図1）。チーム1では主として手法の開発を推進し、チーム2では主としてそれを応用した解析を推進した。

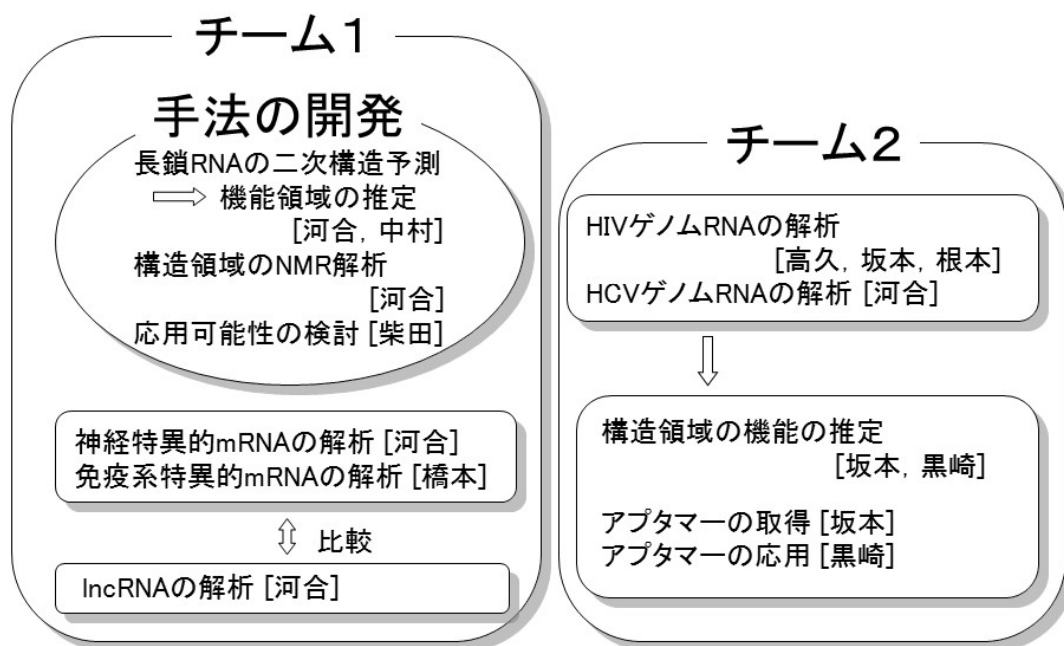


図1 プロジェクトの構成

チーム1では、長鎖RNAについて二次構造解析を行い、二次構造を形成する可能性の高い領域を検出する方法の開発、および検出した領域に対応するRNA断片の二次構造あるいは立体構造をNMR法によって解析する手法の開発を行った。また、RNA断片と他の分子との相互作用を迅速に解析するための手法の開発を進めた。

まず、長鎖RNAの二次構造を解析するために、千葉工大において開発されたRNAの二次構造予測プログラムであるvsfoldを利用し、一方、その可視化のために武田薬品工業において中村慎吾（平成25年よりプロジェクトのメンバー）が開発したGenoPoemics（GP）を用いた。vsfoldなどの二次構造予測プログラムは、通常数百残基程度のRNAの予測が限界であり、それ以上の長さのRNAの二次構造を直接的に予測することはできない。そこで、開発者のWayne Dawson博士と協力して、長鎖RNAから300残基程度の断片の配列を、適度にオーバーラップさせながら、順次解析し、それを一つのファイルに出力するプログラム、vswindowを開発した。一方、中村と協力して、GPでvswindowの出力を利用できるように改良し、vsfold/GPとして利用できるように改良した。さらに、これらのプログラ

ムのインターフェースを改良し、平成 27 年度にインターネットを介して利用できる Web サイト (<http://www.rna.it-chiba.ac.jp/~vswindow/>) をスタートさせた。GP を利用して実施したさまざまな解析結果について、**[報告 1]**にまとめた。今後、広く国内外からこのサイトが利用され、vsfold/GP が活用されると期待している。

NMR 法による RNA の構造解析については、LINE RNA の逆転写酵素認識部位および HCV ゲノム RNA の分子内相互作用部位など、長鎖 RNA の機能構造を対象として進めた。これらの解析において、残余双極子相互作用 (RDC) を利用した解析手法を応用し、従来の NMR 法だけでは決定が難しかった RNA の全体構造を実際に決定することに成功している。一方、当研究室において高度好熱菌から発見したリボスイッチ(遺伝子発現制御を行う RNA 領域)を対象に、人工塩基対システムを利用した常磁性タグの導入という NMR 法における新規手法の開発も行った。また GP によって中村が発見していた J モチーフと呼ばれる RNA の構造解析も実際に行っている。これらの結果について、**[報告 2]**にまとめた。

当初計画の一つとして、long non-coding RNA (lncRNA) の二次構造解析と mRNA との比較を予定していたが、これについては有意な結果が得られていない。今後、解析結果が蓄積することによって、mRNA と lncRNA を特徴づけるものが見出せると期待している。

チーム 1 では、RNA の機能を解析する新しい手法として、材料化学が専門の柴田と協力して、水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法において、RNA を簡便にセンサーの金表面に固定する手法の開発も行った。柴田が独自に開発している自己組織化膜の作成技術を応用することによって、実際に RNA をセンサーに結合させ、その様子を QCM 装置でモニターすることに成功している。この技術をさらに改良することによって、長鎖 RNA の一部をセンサーに固定し、タンパク質等との相互作用を簡便に観測することができると期待している。また、柴田は光によって生体分子のセンサーへの吸脱着を制御する手法も開発した。これらの成果は**[報告 6]**にまとめてある。

チーム 2 では、HIV-1 および HCV を対象として、その機能構造領域を見出すこと、および機能構造領域に対するアプタマーを取得し、それを機能制御に応用することをめざした。このために、高久は、T 細胞内に存在する miRNA のうち、HIV-1 を標的とするものを探し出し、それが実際に HIV-1 を標的としていることを示した。また、細胞内の転写伸長反応の阻害因子である HEXIM1 が HIV-1 の TAR 領域と直接に相互作用していることを示し、アプタマーの標的としての可能性を示した。一方、HCV についても細胞内の因子である Prostaglandin A₁ が HCV の IRES 依存的翻訳を阻害することを見出した。これらの成果は、**[報告 3]**に示されている。高久によって示された HIV-1 あるいは HCV の機能領域は、今後の構造解析あるいはアプタマー取得のターゲットとして活用していく予定である。一方、黒崎は、HIV-1 のスプライシングに着目し、そのドナーサイトとアクセプターサイトの重要性を解析する系を立ち上げた (**[報告 4]**)。この系は、坂本により取得されるアプタマー

の効果の解析に利用する予定である。坂本は HCV および HIV-1 の機能構造に対するアプタマーの取得を試みた。これまでに HIV-1 の TAR 領域および DIS 領域に対するアプタマーの取得に成功している。また、HIV-1 の 5'-UTR の構造解析も進めており、今後のアプタマー取得に活かしていく予定である。以上の成果は[報告 5]にまとめてある。

本プロジェクトは、RNA の構造解析を NMR 法によって行うという方向でスタートしたが、平成 25 年度から核酸の X 線結晶構造解析の第一人者である竹中章郎博士にメンバーとして加わっていただき、X 線結晶構造解析も導入することとした。平成 26 年度から根本がメンバーとして加わり、坂本と協力して RNA の X 線結晶構造解析を開始した（[報告 7]）。なお、平成 26 年 8 月には、竹中博士のご協力により X 線回折系を更新した。一方、NMR 分光計についても平成 25 年 10 月に理化学研究所から無償貸与を受け、本学津田沼キャンパスに設置した。これらにより、津田沼キャンパスの 8 号館に RNA の調製から NMR 解析および X 線結晶構造解析を行うための設備がそろい、二次構造予測システムと合わせて、長鎖 RNA の機能構造を解析するための拠点が整備されたといえる。

本プロジェクトにおいて形成された長鎖 RNA の機能構造解析の基盤のさらなる向上とその活用のため、mRNA をターゲットとした創薬の基盤研究を推進する特定非営利活動法人（NPO）の設立を計画している。すでに複数の大学および製薬企業が参加することとなっており、今年度中に活動を開始する予定である。

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, 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
附属総合研究所・教授	下遠野邦忠	HCV ゲノム RNA についての解析を行う。 (平成 24 年 9 月まで)
博士研究員	大山貴子	長鎖 RNA の構造領域解析の手法を開発する。 (平成 25 年 3 月まで)
附属総合研究所・客員研究員	竹中章郎	RNA の構造解析あるいは構造と機能の関係について助言する。 (平成 25 年 4 月より)
附属総合研究所・共同研究員	中村慎吾	長鎖 RNA の二次構造解析について助言する。 (平成 25 年 7 月より)
工学部・助教	根本直樹	HIV ゲノム RNA の構造解析 (平成 26 年 4 月より)

※千葉工業大学の附属総合研究所は、平成 27 年度より附属研究所となっている（名称変更）。