

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2018～2020
 課題番号：18K06082
 研究課題名(和文) 長い一本鎖RNAゲノム全長の高次構造を直接可視化解析する

研究課題名(英文) Visual Analyses of Long Single-stranded RNA Genome

研究代表者
 竹安 邦夫 (Takeyasu, Kunio)

京都大学・生命科学研究科・研究員

研究者番号：40135695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：数kbにおよぶ長い一本鎖RNAの構造解析は容易ではない。先人達によるこれまで唯一の成功例(rRNAの二次構造決定)までには20余年を要した。NMRやX-線結晶構造解析等の従来の方法では、より長い、ウィルスゲノムのような一本鎖RNA全長の二次構造を一気に解析することは、現在でも不可能である。申請者は、原子間力顕微鏡を活用し、この問題の解決に挑戦した。28S rRNAの約2倍長のHCVゲノムRNAの高次構造は複雑である。しかし、多くのDomainは雲母片上で非常に良く展開されて、Main Chainとそれから派生する各種Domainの分析は可能であった。現在、二次構造モデルを作成中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

[長い一本鎖RNAのとり高次構造は如何に]この問いに答えることは、以下のような究極的問題の解決へのカギとなる。 (1) RNAウィルスのゲノム構造構築・パッケージング機構 (2) 翻訳におけるmRNAの高次構造と翻訳調節、翻訳効率との関係 (3) RNAの安定性と高次構造との関係、それに及ぼす結合タンパク質の影響。

学術的には、“まるごとから見た”長い一本鎖RNAウィルスゲノムの高次構造(特に二次構造とそれへのRNA結合タンパク質の影響)への挑戦であり、将来の「ウィルスゲノムのパッケージング機構の解明」にもつながる。方法論的には、“Simple”であり、分子生物学と構造生物学との融合である。

研究成果の概要(英文)：Structural analyses of long single-stranded RNA (~10 kb) have been very difficult. For example, it took 20 some years to determine the secondary structure of 28S rRNA using NMR and X-ray crystallography. It is impossible to acquire such secondary structures of much longer single-stranded RNAs such as RNA virus entire genome. We have been applying Atomic Force Microscopy (AFM) to the structural analyses of HCV genome RNA. The outcome of our investigation showed that the HCV genome can be spread out nicely on mica surface exhibiting main chain with many small domains branching out of the main chain. These domains consist of Watson-Crick-type double stranded structures. The number of nucleotides in each domain can be estimated from the volume the domain. Thus, from these data, a secondary structural model of entire HCV genome can be constructed.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：長い一本鎖RNAの高次構造 RNAウィルスゲノム 原子間力顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

tRNAのような短い一本鎖 RNA の結晶構造解析は古くから成功しているが、数 kb の長い一本鎖 RNA の高次構造に関しては、(i)一部分の塩基配列を用いた NMR 解析、(ii)一部分の塩基配列の結晶構造解析、等からの情報を蓄積して全体像が推定・構築されてきた。先人達によって分子全体を用いて高次構造が決定されたのは、リボソームの結晶構造解析から得られた rRNA のみであり、それには 20 余年を要した。

申請者らは原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、長い (1-10 kb) 一本鎖 RNA に適用できる high-throughput 技術の開発に努力してきた。これまでの主な成果は：

- AFM 画像取得のための一本鎖 RNA サンプル調整法を確立した。
- 一本鎖 RNA は低塩濃度下において、不規則な凝集や折り重なりがなく、各種領域 (Domain) の二次構造が全て綺麗に可視化できる。
- AFM 画像においては、二本鎖 DNA の場合は長さで塩基対数は対応する。一方、一本鎖 RNA の場合は画像から得られる体積が塩基数に対応する。
- 独自に開発した MATLAB-based algorithms を用いて、各種 Domain に含まれる塩基数を推定できる。
- HeLa 細胞から単離した 28S rRNA について、AFM 画像の解析の結果は結晶構造解析から提唱されている各種 Domain の二次構造と良く一致した。既知の特に大きい 6 個の Domain (300-1000 nt) のうち、I, II, IV, V and VI に対応する Domain は RNA の単離過程、65 ° の処理下でも安定であることが分かった。Domain I の 3' 側に存在する Y-字型セグメントは構造的に特に安定である。
- さらに、28S rRNA において、幾つかの構造的に不安定な領域を、既知の Domain 内ならびに Domain 間に見出した。また、これまで未同定であった 4 つの小さい Domain (200-300 nt) の構造を同定した。そのうち 2 つは 5' 側の Domain II に、2 つは Domain III に存在した。この Domain III はこれまで単一の構造をとるとされてきたものである。Domain 0 と Peptidyl Transferase Center (PTC) にまたがる領域は構造的に非常に不安定であることも分かった。
- Domain II の 3' 側領域は 4 つの小さい flanking domain と会合し、より高次の構造をとることが分かった。分子のこの部分は、他の部分と比較して、より高次の構造へと compaction を起こしやすいと推定される。

以上から、申請者らの開拓してきた方法論は、長い一本鎖 RNA の二次構造解析に非常に有効であることが分かった。

2. 研究の目的

長い一本鎖 RNA の全体高次構造を可視化解析し、RNA フォールディングのメカニズムを明らかにする。具体的には、HCV ウィルスゲノム RNA (~9 kb) をモデル材料とし、ゲノムの高次構造 (二次構造) を 'まるごと' から見て一気に解明する。

タンパク質の高次構造を語るとき、一次、二次、三次、四次構造の各定義ははっきりしている。一方、核酸の場合は、少々曖昧である。二本鎖 DNA の場合は、二重螺旋が二次構造、ヌクレオソームが三次構造にあたると思われるが、一般にはヌクレオソームも含めてそれ以上は単に高次構造と呼ぶようである。本研究の対象である一本鎖 RNA の場合は、分子内での部分的二重螺旋も含めて、二次元的に展開した構造を二次構造 (図 2) 、そこにタンパク質が結合し離れた領域が立体的に近接したものを三次構造、二次・三次構造を含めて高次構造とする。

我々は 2000 年以降、真核生物、真正細菌、始原菌の DNA ゲノム構築機構について研究してきた。ウィルス RNA ゲノムの高次構造解析は、別の側面から核酸高次構造構築の基本的なメカニズムの解明につながると期待される。

3. 研究の方法

画像解析は、(1) 新しく劈開した雲母表面を (2) スペルミジ (1mM) で 5 分間処理し、蒸留水で洗浄後、(3) 65 ° で 10 分間処理した RNA 溶液を 10 分間のせ、蒸留水で洗浄後、AFM による画像取得に入る。

ゲノム RNA は、T7-プロモーター下に組み込んだ cDNA を転写して得る。5' 近傍、3' 近傍の部分構造は既知であるので、Deletion Mutant を作成し、Mutant と全長の AFM 画像と比較したところ、3' のポリ U (直線部分) 5' の領域等、特徴的な構造が両者に見られた。これらの画像を MATLAB-base のプログラムを用いて解析する。一方、ゲノム中央の大部分 (8kb) の構造は全く未知である。ここに、HCV ゲノム RNA 全長の画像解析を行う意義がある。現在の

ところ、非常に類似した画像が繰り返し得られるので、二次構造決定は可能であると考えている。

4. 研究成果

In vitro で、結合タンパク質のない条件で転写した RNA は、*In vivo* での自然な二次構造をとっているか、という疑問はある。そこで、予備実験として、T7 ポリメラーゼ下に転写したゲノム RNA (~9kb) の可視化を行ったところ、1本の Main Chain とそこから分枝する Watson-Crick 様の多くの Domain が見られた。

これまでに、T7 プロモーター下に組み込んだ cDNA を転写して得られたゲノム RNA (全長、5'近傍、3'近傍、コーディング領域の欠損 RNA) の AFM 画像を MATLAB-base のプログラムを用いて解析した。5'近傍および3'近傍の構造は文献的に明らかになっている部分構造と一致した。これらの部分領域構造は、全長構造を決定する際の方向性の指標となった。以上の結果を、連携研究者(国立衛生研究所所長 脇田隆字 博士)グループと共著で、米国生物物理学会(2019年2月5日、Baltimore、USA)において発表した。

HCV ゲノム RNA は 28 S rRNA のおよそ 2 倍の長さであるため、既知の 5'-領域、3'-領域以外の中央部(約 8 kb)には、構造未知の大小 30 近い二次構造(Watson-Crick 様の二重らせん)が見られる。

HCV ゲノム RNA の中央部のコーディング領域を欠損した RNA の AFM 画像から、Main Chain の同定と各 Domain の体積計算ができた。結晶化、NMR 等により提出されている 5' IRES 領域、3'領域のモデル構造と AFM により得られる画像は酷似していた。

中央部分の塩基長を推定・決定するには多大な労力と時間を要する。現在、HCV ゲノム全長の AFM 画像から、Main Chain (主鎖)の抽出、Main Chain 上に検出された各 Domain の塩基数の推定を行い、二次構造モデルを構築中である。結果は、Int. J. of Mol. Sciences に発表の予定である。

Capsid タンパク質のゲノム構造への結合様式を 'まるごと' から見て解明する計画は現在進行中である。HCV ゲノム RNA に結合する Capsid タンパク質(連携研究者からの提供)は 5'-領域、3'-領域に結合する。AFM 画像から見れば、タンパク質が重合して多量体を形成し、RNA と複雑な立体構造を形成するようである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazuya Morikawa, Yuri Ushijima, Ryosuke L. Ohniwa, Masatoshi Miyakoshi and Kunio Takeyasu	4. 巻 7
2. 論文標題 What Happens in the Staphylococcal Nucleoid Under Oxidative Stress?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 631-648
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms7120631	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jamie L. Gilmore, Hideki Aizawa, Takaji Wkida and Kunio Takeyasu
2. 発表標題 Characterization of Structural Elements in the HCV Genome Using AFM
3. 学会等名 Biophysics Society（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------