

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019 年度

受付番号 60624

氏名 山上 龍太

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

## 記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: ペンシルベニア州立大学 (国名: アメリカ合衆国)2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。細胞内 RNA フォールディング機構の解明と応用3. 派遣期間: 平成 31 年 4 月 1 日 ~ 令和 3 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名: ペンシルベニア州立大学部局名: Department of Chemistry5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注) 「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

A. 研究の目的と背景

本研究では、細胞内 RNA フォールディング機構を理解することによって、細胞内で RNA が効率よく機能するための基本原理を探りました。

近年、マイクロ RNA やリボスイッチなどの機能性低分子 RNA が次々と発見されています。機能性 RNA は、標的タンパク質の発現量を調節し、病原体感染に対する免疫系を制御するなど、生命活動を維持するために必要です。これらの RNA 機能を逆手にとって、RNA を使った合成生物学技術の開発が精力的に進められています。しかしながら、細胞内で効率よく機能する RNA を予測する方法は、未だ確立されていません。この問題には、細胞内 RNA フォールディング機構を十分に理解できていないという背景があります。そこで私は、以下の一連の研究を行いました。

(a)細胞環境が RNA の機能とフォールディングに与える影響について

(b)天然型リボザイムと人工型リボザイムの RNA フォールディング活性の違い

(c)細胞内 RNA の構造を網羅解析する技術開発

B. 研究実施状況

以下に研究実施状況を示します。

(a) 細胞環境が RNA の機能とフォールディングに与える影響について

これまで、RNA の基本性質は、ほとんどが高塩濃度、高金属イオン濃度、希薄溶液など、非生理的な試験管条件の中で研究されてきました。そのような試験管条件は、実験結果を統一化

し、単純化できるメリットがありますが、細胞内での RNA の本来の性質を見落とす可能性が問題点として挙げられます。事実、細胞内 RNA フォールディングは、試験管内で観測された結果と異なることが受入先である Bevilacqua 研究室によって、明らかになっています(Ding *et al*, *Nature*, 2014)。Bevilacqua 研究室は、細胞内 RNA のフォールディング機構を明らかにすることを目的として、細胞内と試験管内実験を行う多角的な視野を基盤に研究を展開しています。私は、同研究室で細胞内 RNA フォールディング機構を簡便に解析するために、細胞内に似た環境を試験管内に再現する擬似細胞環境の構築を目指し、研究を行ってきました。私は、大腸菌内の全代謝物解析と全金属イオン解析のデータに基づき、細胞内におけるアミノ酸-マグネシウム複合体(aaCM)の存在量を化学平衡の観点から予測しました。そこで、aaCM が RNA の機能とフォールディングに与える影響を確認したところ、aaCM は、HDV リボザイムの立体構造を安定化することがわかりました。また、RNA 分解への影響を確認したところ、aaCM は、HDV リボザイムを熱分解から保護することを発見しました。反応速度解析により、aaCM は、条件によりますが、HDV リボザイムの自己切断活性を 3 倍-30 倍まで増大させることを発見しました(Yamagami *et al*, *Nature Communications*, 2018)。そこで、本研究をさらに発展させるため、以下の点に着目し、研究を進展させました。

(a1) aaCM は、HDV リボザイムのみならず、他の RNA にも作用するか？

(a2)他の代謝物-マグネシウム複合体は、RNA の機能を促進するか？

(a1) aaCM は、HDV リボザイムのみならず、他の RNA にも作用するか？

aaCM の他の RNA に対する影響を確認するため、tRNA を用いた実験を行いました。大腸菌由来 tRNA<sup>Phe</sup> と tRNA<sup>Ala</sup> 及び酵母由来 tRNA<sup>Phe</sup> と tRNA<sup>Ala</sup> の転写産物を用いて、生物物理学的手法を用いて、aaCM がこれらの tRNA に与える影響を確認しました。熱変性実験において、aaCM は、HDV リボザイムと同様に tRNA の熱安定性を向上させ、RNA フォールディング活性を向上させることが示唆されました。さらに、In-line probing 法によって、aaCM の存在下と非存在下における tRNA の構造を確認したところ、tRNA の構造自体に大きな変化はないことが示唆されました。すなわち、aaCM は、RNA の構造を変化させることなく、RNA の安定性を向上させていることが示唆されました。また、aaCM の効果は RNA の分子種に依存しておらず、より一般的な効果であることが予想されました。また、aaCM は、細胞内の機能性 RNA に対して同様に振舞っていることが予想されました。本研究は、受入研究室の大学院生との共同で行われました。私は、共同第一著者として、論文を報告しました。

(a2)他の代謝物-マグネシウム複合体は、RNA の機能を促進するか？

上記の結果をふまえて、私は、aaCM のみならず、他の代謝物-マグネシウム複合体も同様に RNA に作用するのではないかと考えました。大腸菌の全代謝物解析の結果によると、細胞内にもっとも多く存在する代謝物はアミノ酸ですが、ヌクレオチドも同様に細胞内で高濃度に存在しています。ヌクレオチドは、一つから三つのリン酸基を介してマグネシウムと相互作用します。そこで、ヌクレオチド-三リン酸、ヌクレオチド-二リン酸、ヌクレオチド-一リン酸に着目し、それらのマグネシウム複合体が RNA の機能に及ぼす影響を確認しました。その結果、ヌクレオチド-三リン酸は、マグネシウムに対する親和性が高すぎることで理由となって、RNA の機能に影響を与えることができないことが示唆されました。また、ヌクレオチド-一リン酸は、細胞内の濃度が低いことが理由となって、RNA の機能に影響を与えることができないことも示唆されました。その一方で、ヌクレオチド-二リン酸-マグネシウム複合体(NDPCM)は、細胞内濃度が高く、マグネシウムに対する親和性も高いです。事実、NDPCM の RNA 機能に対する影響を確認したところ、NDPCM は、RNA の触媒活性を促進することが示唆されました。したがって、NDPCM も aaCM と同様に細胞内で RNA の機能を促進していることが予想されました。本研究は、受入研究室の大学生と共同で行われました。私は、本研究を統括し、共同責任著者として論文を報告しました。

(b)天然型リボザイムと人工型リボザイムの RNA フォールディング活性の違い

RNA フォールディング機構を探るため、私は、過去の研究において、シュードノット構造を形成する人工型リボザイムの合理設計法を開発しました(Yamagami *et al*, *Nucleic Acids Res.*, 2019)。この手法の詳細なプロトコルを世界に先駆けて報告するために、私は、シュードノット

ト構造を含む人工型リボザイムの合理設計法に関する論文を 2021 年に *Methods in Molecular Biology* 誌に報告しました。この論文は、Rochester 大学の Mathews 博士との共同で執筆されました。私は、共同第一著者として本論文を執筆しました。

上記の研究において、人工型リボザイムのフォールディング活性は、天然型リボザイムに比べて低いという結果が得られています。そこで私は、人工型リボザイムと天然型リボザイムのフォールディング活性の違いは、何に由来するのか？ということに着目し、研究を進めました。この問題を解決するために、試験管内進化法(SELEX 法)および RNA 合成法を用いて、人工型リボザイムおよび天然リボザイム中にランダム変異を導入しました。さらに、次世代シーケンサーを用いて、変異部位を網羅的に解析する手法を開発しました。この方法を用いて、活性中心近傍にない変異部位は、RNA の触媒活性そのものには影響しないことを確認しました。現在、得られた変異体リボザイムのフォールディング活性を熱力学的手法と生化学的手法を用いて確認しています。これによって、RNA のフォールディングに影響する部位を特定し、そのフォールディング機構を予測します。

### (c) 細胞内 RNA の構造を網羅解析する技術開発

(b)でデザインした RNA のフォールディングを詳細に解析するために、細胞内 RNA の構造を網羅解析する技術開発を行いました。まず、構造がよく知られている tRNA を用いて実験を行いました。本技術は、ジメチル硫酸(DMS)を用いた RNA の化学標識反応と逆転写反応を用いて、RNA の構造情報を cDNA に写し取り、それを次世代シーケンスによって網羅解析するものです。この方法によって得られた構造情報を用いることで、細胞内の tRNA の構造を 95%の精度で予測することができるようになりました。さらに、現在、本方法を用いて、細胞内における人工型リボザイムの構造を解析中です。また、現在、本研究をまとめた論文を執筆中です。

## C. 成果発表

以上の研究成果によって、以下の論文を出版しました。

1. M. Kayedkhordeh<sup>†</sup>, **R. Yamagami**<sup>†</sup>, P.C. Bevilacqua\* and D.H. Mathews\*. “Inverse RNA folding workflow to design and test ribozymes including pseudoknots”, *Methods in Mol. Biol.*, *In press*. <sup>†</sup>co-first author
2. K.A. Leamy<sup>†</sup>, **R. Yamagami**<sup>†</sup>, N.H. Yennawar, and P.C. Bevilacqua\*. “Single Nucleotide Control of tRNA Folding Cooperativity Under Near-Cellular Conditions”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 116(46): 23075-23082, (2019). <sup>†</sup>co-first author.
3. **R. Yamagami**<sup>\*</sup>, R. Huang and P.C. Bevilacqua\*. “Cellular concentrations of nucleotide diphosphate-chelated magnesium ions accelerate catalysis by RNA and DNA enzymes”, *Biochemistry*, 58, 3971-3979, (2019). \*co-corresponding author.

また、以下の論文を執筆中です。

1. **R. Yamagami**, J.P. Sieg, A.M. Assmann, and P.C. Bevilacqua\*. “tRNA Structure-seq: Genome-wide Analysis of in vivo tRNA Structurome Reveals Structural Dynamics in tRNA under Heat Stress”, manuscript in preparation.

## D. 関連学会への参加状況

以下の学会に参加し、研究成果を報告しました。

1. **R. Yamagami**, M. Kayedkhordeh, D.H. Mathews and P.C. Bevilacqua. “Successful design of highly active HDV ribozymes by a combined computational and experimental study” RNA 2019, 2019 年 6 月, Poland, poster

新型のコロナウイルスの影響によって、当初参加予定であった学会(RNA2020, tRNA conference 2020, PacificChem 2020)は、延期となりました。