

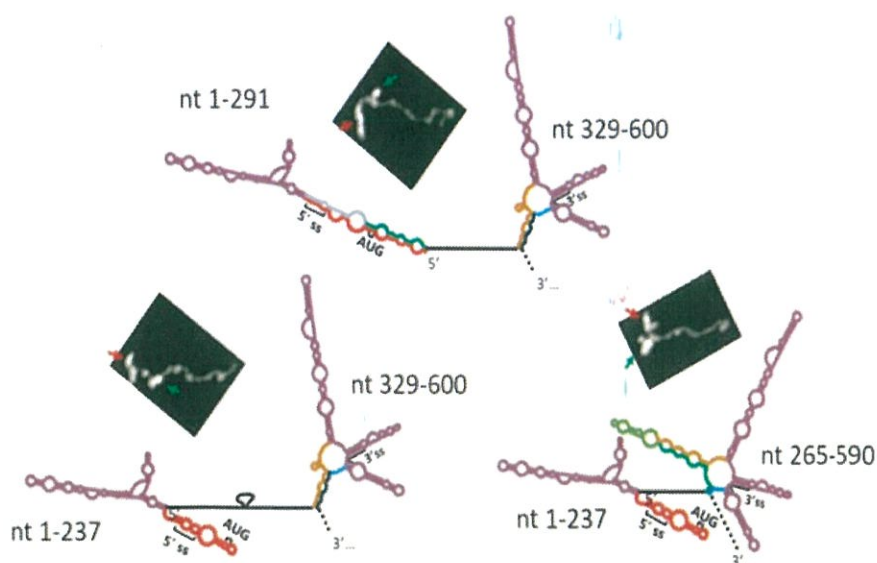
4. 外国人特別研究員との共同研究の概要 (外国人特別研究員との分担状況を明らかにした上で簡潔に記述してください。)

Summary of the collaborative research (Clarify your role and the Fellow's role in the collaborative research.)

二重らせん構造を形成する DNA と異なり、一本鎖 RNA は多様な構造をとる。一本鎖 RNA の多様な構造により、RNA は ribozyme や riboswitch や aptamer など多様な機能を持つ。従って、RNA の構造解析は RNA 研究者にとって非常に重要と考えられるが、これまでに大きな (1000 塩基以上の) RNA 分子で 3 次元構造情報が得られているのは、リボソーマルタンパク質と結合したリボソーム RNA のみである。このリボソームの構造解析に対しては、2009 年にノーベル化学賞が授与されている。Protein data bank に登録されている RNA の構造の 94% が 250 塩基以下の小さな RNA 分子であり、X 線結晶構造解析や NMR、クライオ電子顕微鏡などは RNA 分子の構造解析には不向きである。従って、1000 塩基以上の大きな RNA 分子の構造解析はケミカルマッピングやコンピューターでの予測が主であり、直接的な構造解析法が存在しなかった。この技術的な限界を打破するため、外国人特別研究員である Gilmore 博士は、原子間力顕微鏡 (AFM) と画像解析を組み合わせた RNA 分子の構造解析法を開発してきた。

様々なウイルスが一本鎖 RNA をゲノムとして持つことが知られている。本研究では、C 型肝炎ウイルスやインフルエンザウイルスなど、一本鎖 RNA をゲノムとして持つウイルスのゲノム RNA および mRNA を解析対象とした。初めに、RNA の構造解析のための新たな手法の開発を行った。AFM による RNA 分子の高分解能観察と MATLAB を用いた自動データ解析アルゴリズムを組み合わせ、RNA 分子の構造解析を行った。本研究で開発した RNA の構造解析法を用いて、既知の 28S リボソーム RNA の構造情報と AFM による構造解析結果を比較し、本手法の有用性を確認した。AFM で観察した 28S リボソーム RNA は二次構造を保持しており、これらの二次構造はクライオ電子顕微鏡法で明らかにされたリボソームにも存在することが確認された。従って、我々が開発した手法が大きな RNA 分子の構造解析に有用であることが示された (Gilmore et al., Nuc Acids Res, 2017)。

我々が開発した手法を用いて、インフルエンザウイルスの RNA 分子の構造解析に着手した。インフルエンザウイルスの NS 分節には NS1 タンパク質と NS2 タンパク質がコードされている。NS 分節の mRNA は約 900 塩基の大きさであり、NS2 タンパク質は NS mRNA のスプライシングにより産生される。そこで我々は T7 ポリメラーゼを用いて NS 分節の mRNA を合成し、AFM 観察と MATLAB を用いた画像解析による構造解析を行った。NS mRNA には 5' splice site と 3' splice site 付近に特徴的な構造が認められた。これらのドメインには branched form と unbranched form が存在した。また、MATLAB を用いて RNA サイズを解析したところ、5' splice site と 3' splice site がこれらのドメイン内に存在することが明らかになった (図 1)。従って、これらの構造ドメインが NS mRNA の alternative splicing の制御に関与すると考えられた。そこで、5' splicing site に着目し、ドメイン内の 2 次構造の安定性を変化させることでスプライシング効率を変化させる領域を予測した。現在は、リバースジェネティクス法により 5' スプライシングドメイン内に変異を持つウイルスの性状解析を実施しているところである。



(図 1) インフルエンザウイルス NS mRNA の二次構造モデル

5. 外国人特別研究員との共同研究の成果とその評価
Results and Evaluation of the collaborative research

1000 塩基を超える大きな RNA 分子の構造解析は、その手法が困難なこともあり、十分には進んでいない。しかし、RNA 分子は多様な構造をとることで多様な機能を発揮することが知られており、タンパク質の構造解析と同様に、RNA の構造解析も生命科学の発展には欠かせない。構造解析の主たる解析手法は X 線結晶構造解析、NMR、クライオ電子顕微鏡解析であるが、フレキシブルな構造を持つ RNA の構造解析には適応しづらいため、我々は AFM 解析を用いることとした。さらに MATLAB を用いて自動データ解析アルゴリズムを開発し、AFM 像と 1 次 RNA 配列情報を元に、RNA が実際にどのように二次構造やドメインを形成しているかをモデル化する手法を構築した。本手法を用いた RNA 構造解析の有用性は、既知の 28S リボソーム RNA 構造との比較解析により実証されたことから、今後はウイルス RNA を含むさまざまな RNA の二次構造解析に適応できると考えられる。我々が開発した RNA の二次構造解析法により、RNA 研究が大きく発展することが期待される。

注. 必ず様式 7 及び様式 8 を併せて採用期間終了後 1 か月以内に提出してください。外国人特別研究員本人には様式 7 (Form 7: Research Report) により英語又は日本語で作成いただきます。

Note: This form must be submitted along with the Fellow's Form 7 within one month of the end of the fellowship tenure.