

千葉工業大学

博士學位論文

論文題目

新規低分子 RNA の探索手法の開発
と NMR 法による構造解析

平成 28 年 3 月

博士後期課程 工学専攻 遺伝子・生体工学分野

奥居 沙弥

論文目次

第1章 序論	1
1-1 本論文における低分子 RNA	
1-2 低分子 RNA が発現する仕組み	
1-3 低分子 RNA の解析手法	
1-4 本研究の目的および本論の構成	
第1部 低分子 RNA 解析手法の開発	19
第2章 新規 RNA 発見のための網羅的低分子 RNA 配列解析	
2-1 はじめに	
2-1-1 次世代シーケンサー(Next-Generation Sequence NGS)	
2-1-2 RNA の二次構造予測	
2-1-3 マウス(C57BL/6JmsSLC)	
2-1-4 解析した次世代シーケンスサンプルデータ	
2-2 方法	
2-2-1 二次構造によるクラスタリングと新規 RNA の探索	
2-3 結果	
2-3-1 マウスの脳から得られた RNA のシーケンサー解析	
2-3-2 二次構造によるクラスタリングと新規候補 RNA の探索	
2-3-3 新規候補 RNA の生体内における発現の確認	
2-4 考察	
2-4-1 二次構造に基づくクラスタリング	
2-4-2 新規候補 RNA の探索	
第3章 立体構造形成スクリーニング手法の開発	62
3-1 はじめに	
3-1-1 構造スクリーニング	
3-2 方法	
3-2-1 試料の調製	

3-3 結果

3-3-1 試料管内での時間依存的な転写反応の観察

3-3-2 スクリーニング条件の検討

3-3-3 安定同位体標識を使用したスクリーニング

3-3-4 長さの異なる RNA を用いたスクリーニング

3-4 考察

3-4-1 測定条件の検討

3-4-2 スクリーニングの有用性

第 2 部 低分子 RNA の構造解析

第 4 章 新規低分子 RNA の構造と機能の解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 98

4-1 はじめに

4-1-1 ミトコンドリアゲノム

4-1-2 哺乳類のミトコンドリアにおける tRNA のプロセッシング

4-2 方法

4-2-1 RNA のデザインと調製

4-2-2 NMR 測定

4-2-3 融解温度測定用試料の調製

4-3 結果

4-3-1 MsncR-11 配列解析

4-3-2 二次構造解析

4-3-3 MsncR-11 の断片の NMR による構造解析

4-3-4 mirror tRNA の解析とフラグメントの比較

4-3-5 融解温度測定

4-4 考察

4-4-1 MsncR-11 の二次構造解析

4-4-2 NMR 解析からのミトコンドリア COXI のプロセッシングについて

第5章 総括	163
5-1 本研究により得られた知見	
5-2 本研究の改善点	
5-3 今後の展望	
参考文献	166
研究業績	175
謝辞	178
付録	179

第1章 序論

1-1 本論文における低分子 RNA

生体は複雑な分子メカニズムによって保たれており、さまざまな機構にタンパク質が関与していたことからタンパク質は生体内で働く分子の主役だと考えられ、その機能・構造の解析が進められてきた。しかし、2001年にヒトゲノムが解読され[1]、タンパク質をコードするエキソン領域は約30億塩基中の2%に過ぎず、その他のほとんどがジャンク配列であると考えられていた。その後、The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) [2]のプロジェクトにより、それまでジャンク配列だと考えられていた配列はRNAに転写され、RNAのまま制御、修飾など、生命の多様なプロセスに関与していることが分かってきた[2]。この発見を一つの契機として、RNAに注目があつまり、タンパク質に翻訳されずRNAのまま機能するRNAを総称して non-coding RNA (ncRNA) と名付けられた。ncRNAとしては、リボソーム RNA (ribosome RNA | rRNA) や転移 RNA (transfer RNA | tRNA)、などが古くから知られている。また、ゲノム解析やトランスクリプトーム解析から多くの ncRNA の存在が明らかにされている。ncRNA は残基数や機能により分類されており、本論文では、ncRNA を長さで大きく3つに分けた。1つ目に、50残基以下の miRNA, siRNAなどを超低分子 RNA、2つ目に、約50残基から約500残基からなる snoRNA, tRNAなどを低分子 RNA、3つ目に、約500残基以上の rRNA, mRNA型 Xist RNAなどを長鎖 RNA と定義する (Fig. 1-1)。その中でも、本研究では低分子 RNA の内50残基から150残基の大きさの RNA に焦点をあて研究を行った。

近年、長鎖 RNA が生命現象や疾患に関与していることが多数報告されるよう

になり、RNA 研究において注目を集めている。長鎖 RNA の一つとして、同じ染色体の遺伝子座のセンス鎖とアンチセンス鎖の両鎖から転写される、sense-antisense transcript (SAT) 遺伝子座が報告されている (Fig. 1-2)。マウスの SAT 遺伝子座は 2481 あり、exon 同士は重ならないが sense 鎖と antisense 鎖が双方向から転写される遺伝子座が 899 見つかっている[3](Fig.1-2c,d,e)。興味深いことに、この SAT 遺伝子座の片鎖または両鎖から 50~150nt の長さの低分子 RNA が発現していることが清澤博士らによって報告された [4,5]。この RNA は現在知られている snoRNA や超低分子 RNA には分類されず、ノーザンハイブリダイゼーション法などの生化学的方法により生体内での発現が確認されている。SAT 遺伝子座から発現する低分子 RNA がどのような発現メカニズムを持ち、どのように機能するのかは、分かっていない。

アンチセンス型 RNA の例として、アンチセンス鎖から転写される RNA がセンス鎖の発現を制御することが知られている。一つの例として、ヒトの癌抑制に関わる遺伝子 ANRIL (アンチセンス鎖) に PRC2 複合体が結合し、センス鎖側の H3K27 のメチル化を誘発して遺伝子発現を抑制することが分かっている[6]。この様に、SAT から発現する RNA が相補鎖の発現に関与している可能性がある。但し、中には機能を持たないものも報告されている。Airn は父親由来の染色体から選択的に合成され DNA メチル化を介してゲノムインプリンティングに関与する[7]。Airn のアンチセンス RNA は RNA 自体が遺伝子に結合するなどの機能をするわけではなく、転写されることが重要であるというアンチセンス RNA もある。このことから、SAT から発現されている低分子 RNA が何らかのかたちで生命現象に関与している可能性は非常に高い。

低分子 RNA として既に報告された ncRNA において、特徴的な構造を形成する tRNA は二次構造においてクローバーリーフ構造を形成し、三次元構造で

はシャープな L 字構造を形成することが分かっている。構造解析手法の発展により snRNA や SRP RNA, tmRNA など低分子 RNA の構造が次々と明らかにされてきている。近年、新規低分子 RNA として発見された RNA には、 Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) や Mirtron がある。CRISPR は 1987 年に既に大腸菌において報告されていたものの、CRISPR と名付けられたのは、2002 年である[8]。数十塩基の短い反復配列とスペーサー配列を交互に持つクラスターを形成する CRISPR は、近年 CRISPR /Cas9 システム (Fig. 1-3) の研究において注目されており、外来 DNA の除去や DNA の任意の位置で切断・編集を行うなど、ZEN[9]や TALEN[10]に次ぐ新しい遺伝子改編ツールである[11]。2007 年に報告された Mirtron は遺伝子のイントロンにコード (イントロンそのものを) する miRNA である。一般的な miRNA と異なり、pre-mRNA から intron 部分を削除する仕組みを使っており、Mirtron がラリアット構造を形成し、酵素による debranch を受け pri-miRNA を形成する。その後は Argnote と共に働くことが報告されている[12] (Fig. 1-4)。配列保存性に 5'末端は GU, 3'末端は AG 塩基があることが全ての Mirtron に報告されているが、哺乳類と無脊椎動物によるヘアピン構造の末端の塩基対の組み方が異なることも報告されている[13]。このように、既に研究が進んでいる RNA の異なる発現の仕方や機能が見つかるなど、生命は非常に複雑であり、未だ新規低分子 RNA が見つかる可能性を含んでいる。

miRNA や siRNA の様な超低分子 RNA では、とりうる構造の種類に限度があり、機能として配列の特異性が効いていた。しかし、RNA が長くなるとヘアピンループの様な構造以外にも、内部ループやバルジアウト、Watson-Crick 塩基対や Hoogsteen 塩基対など RNA の、構造のバリエーションは増えている (Fig. 1-5 [14])。さらに、pseudoknot [15] や G カルテット [16] といった高次構造の形成

が報告されている (Fig. 1-6). また, 標的分子が結合または, 遊離することで構造変化を起こす riboswitch[17], ステムループのモチーフをリンカーで繋げたサンプルが Mg^{2+} 存在下で様々な kissing loop を形成することを示した RNA LEGO [18] も報告されている. 二次構造と三次構造で異なる構造を形成する small ncRNA の代表として, tRNA がある. tRNA は二次構造上では 3 つのステムループを持つクローバーリーフ構造を形成し, 三次構造では L 字型の構造を示すことが知られている (Fig. 1-7). RNA の長さに比例し構造の多様性が増えることから, 50-150 残基の RNA を対象とする我々の研究において, 構造のバリエーションに限度ができると考えられる.

前に記したとおり, 未知の低分子 RNA の発現が報告されていることや新たに報告された低分子 RNA の存在から, 新規低分子 RNA の網羅的な解析が生命現象の理解に重要であると考えた. また, RNA は生体において何らかの構造を形成し, 機能することから RNA の構造に着目した.

1-2 低分子 RNA が発現する仕組み

tRNA はタンパク質合成において mRNA の各コドンに一致するアミノ酸を付加していくという重要な役割をする. 真核細胞において, クローバーリーフの形がそのままコードされた tRNA の発現では, 5'側のリーダー配列と 3'側のトレーラー配列を含んだ前駆体として転写される. 5'末端側のリーダー配列を RNaseP がアクセプターステムを認識して切断する. 3'末端側では RNaseD によってディスクリミネーターまでトレーラー配列を除去する. さらに, tRNA の成熟化には沢山の塩基修飾が必要となり, メチル化修飾やアミノアシル化, シュエードウリジル化といった修飾を受けることが知られている.

rRNA, snRNA のプロセッシングや修飾に関与する snoRNA は, boxC/D 型と

H/ACA 型という 2 種類の保存されたモチーフをもつ RNA である (Fig. 1-8). どちらも遺伝子のイントロンにコードされている. 遺伝子の pre-mRNA として転写され, snoRNP タンパク質が結合した後 snoRNA を含むイントロンは mRNA の成熟のために除去される. 除かれた snoRNA はエキソヌクレアーゼによるプロセッシングを受けて成熟した snoRNA となる[19,20].

snRNA では, 保存された 3' box 領域を持っており, この領域にインテグレーターが結合する. それを介して RNA ポリメラーゼ II の 3' 末端が結合することで, snRNA の 3' 末端のプロセッシングが起こることが分かっている[21]. ここまでに示した発現の仕組みは, RNA が必要な配列分が転写され, ステムループモチーフを認識しそれ以降の転写が制御され, 始めから機能する長さの RNA として発現していた. しかし, 長鎖 RNA の発現に伴い低分子 RNA の発現が報告されていることから, 長鎖 RNA の部分的な構造形成領域がプロセッシングされはたらいっている可能性がある.

1-3 低分子 RNA の解析手法

低分子 RNA が解析された実際の手法を示す. ポリアクリルアミドゲルを使用した電気泳動法により, 発見された RNA を示す. マイコプラズマ・カプリコルムという細菌の低分子 RNA を網羅的に解析するため, 電気泳動法により RNA を分離させたところ, MC2 RNA と MC3 RNA という新規候補 RNA が発見された[22]. これらは細胞の成長因子ではないかと推定されている. 同様に, 二次元電気泳動により線虫の RNA を展開したところ, 約 20-30 残基のサイズを持つ 12 種類の新規 RNA 候補 CeR-101 から CeR-112 が発見されている. 20 数残基の長さの RNA はサイズから超低分子 RNA に入るが, 二次構造予測から得られた構造では, ヘアピン構造に大きなインターナルループを持つことから

miRNA でないことを同定している。また、約 30 残基の長さの RNA もタンパク質コード領域のアンチセンス鎖に当たることなどから、タンパク質発現の制御に関与している可能性があり、miRNA とは異なる新しい一群の RNA の可能性が示唆された[23]。

線虫の Total RNA から配列解析を行い、低分子の安定な 19 個の新規候補 RNA が発見された。そのうちイントロンにコードされた 7 個の RNA はその配列から snoRNA に保存された box を持つこと、二次構造予測から boxC/D 型 snoRNA CeR-19 と boxH/ACA 型 snoRNA CeR-3, 4, 6, 7, 8, 9 であることが分かった。また、CeR-6, 7, 9, 19 では rRNA や snRNA などターゲットとなる配列も見つかった[24]。その後、2010 年には 19 個の新規候補 RNA の一つである CeR-2 の発現領域の解析や RNAi による sno RNP 構成因子のノックダウンにより、rRNA のプロセッシングに関わる boxC/D 型 RNA であることが同定された[25]。

現在ではよく知られる RNA も発見当初は構造などから機能を推定し、解析が進められた RNA もある。10Sa RNA は 1979 年大腸菌で発見され、グラム陽性菌など様々な真正細菌で見つかった。10Sa RNA は *ssrA* 遺伝子にコードされており、*ssrA* が破損することで細胞の成長に影響を与える。10Sa RNA の前後の配列が tRNA 様構造のアミノ酸アクセプターステムと T アーム部分に相当する構造を形成することから、tRNA の様な機能が予測され解析が進められた。5' 末端側が RNaseP により切断されること、3' 末端にアラニンを結合出来き、70S リボソーム上で働いていることが報告された [26,27]。現在は 10Sa RNA は tmRNA と呼ばれ、tRNA と mRNA の両方の機能を有する翻訳のレスキューシステムを行う因子として知られている。このシステムは、終止コドンの無いまたは、末端が切断された mRNA が翻訳されるとリボソームの中で翻訳が止まってしまう。止まってしまったリボソームの A サイトに tmRNA が入り、tRNA 様

構造部分がPサイトへとトランケートされ不完全な mRNA を放出する。さらに、不完全なタンパク質にアラニンとタンパク質の分解を示すタグとなる 11 個のペプチド配列を付加しタンパク質も放出させ、不完全な mRNA とタンパク質を分解へ向かわせる品質管理機構を担う非常に重要な分子であることが知られている[28,29] (Fig. 1-9)。

より大量のデータ解析をする場合、数千～数万オーダーの解析には、DNA チップやマイクロアレイ解析がある。プローブ配列に RNA 画分から逆転写した cDNA をハイブリすることで、相補的な塩基配列の部分に結合し、蛍光や電流により配列を検出することが出来る。また、発現量も観測することが出来る分析方法である。網羅的な解析として、次世代シーケンサー解析が注目されている。近年既に次世代シーケンサー解析により small ncRNA の解析が行われている[30]。RNA 画分を逆転写し、シーケンサーで読むことで配列を得ることが出来る。次世代シーケンサーには、読み取りの様々な方法によって配列数、読める長さの増減など選択することが出来る。また、ノーザンハイブリダイゼーションに比べ感度が良く得られたるため、生体内での発現の少ない RNA も網羅することができる。

1-4 本研究の目的および本論の構成

これまでの ncRNA の解析から生体内の様々な現象に関与していることが知られている。しかしながら、生命は非常に複雑なメカニズムにより形成されており、未だ生命現象の解明には至っていない。現在注目される長鎖 RNA の解析を進めることは非常に重要なことである一方、マウスを使用した先行研究において、長鎖 RNA と共に発現する低分子 RNA が見つかっていることから、低分子 RNA にも目を向け解明していくことで RNA 全体の機能を知ることができ、現在明らかになっていない生体内の分子メカニズムの解明に貢献すると考える。

また、哺乳類では特に脳が発達しており、特異的な RNA が発現している可能性があると考えマウスの脳から RNA を対象とした。そこで、本研究では未知の低分子 RNA を発見し、その新規低分子 RNA の機能と構造を明らかにすることを目的とした。

本論文では、第 1 章は序論とし本研究を行うに至った経緯やこれまで行われてきた研究について記した。実際の研究内容としては、2 部構成になっており第 1 部では 2 種類の低分子 RNA 解析手法の開発を行った。第 2 章は構造を形成する新規低分子 RNA を見つける手法の開発を行った。50-150 残基の低分子 RNA では 50 残基未満の小さな RNA とは異なり格段に構造の多様性を持つことが予想され、既に知られている低分子 RNA と同様に RNA が特定の構造を形成してはたらく可能性が高いと考えた。特定の構造を形成する RNA を得るため、次世代シーケンサーによって網羅的に解析を行い、大量の配列データから二次構造に基づきクラスタリングする手法を開発し、構造を形成する新規低分子 RNA を発見した。第 3 章では、立体構造形成をスクリーニングする手法の開発を行った。配列データから一定のコンフォメーションを形成する RNA を選別する方法の開発を行った。これまで RNA の構造形成を確認する方法は、鋳型の設計から RNA 転写・精製など複数のステップが必要であり、高度なスキル、多くの時間、労力が必要とされていた。この方法では大量の配列データから構造を形成する RNA を見つけるためには、時間が掛りすぎてしまう。そこで、NMR を使用して、誰でも簡便に早く RNA の構造スクリーニングを行うことが出来る、手法の開発を行った。

第 2 部は低分子 RNA の構造と機能の解析を行った。第 4 章において第 2 章で見出された新規低分子 RNA の一つを対象として、構造から機能を推定した。その機能を持ちはたらくことを証明するために、NMR 法を用いて RNA の立体構

造解析と機能の解明をした。最後に、第 5 章では、本研究の結果から総括と RNA 研究における展望について論じた。

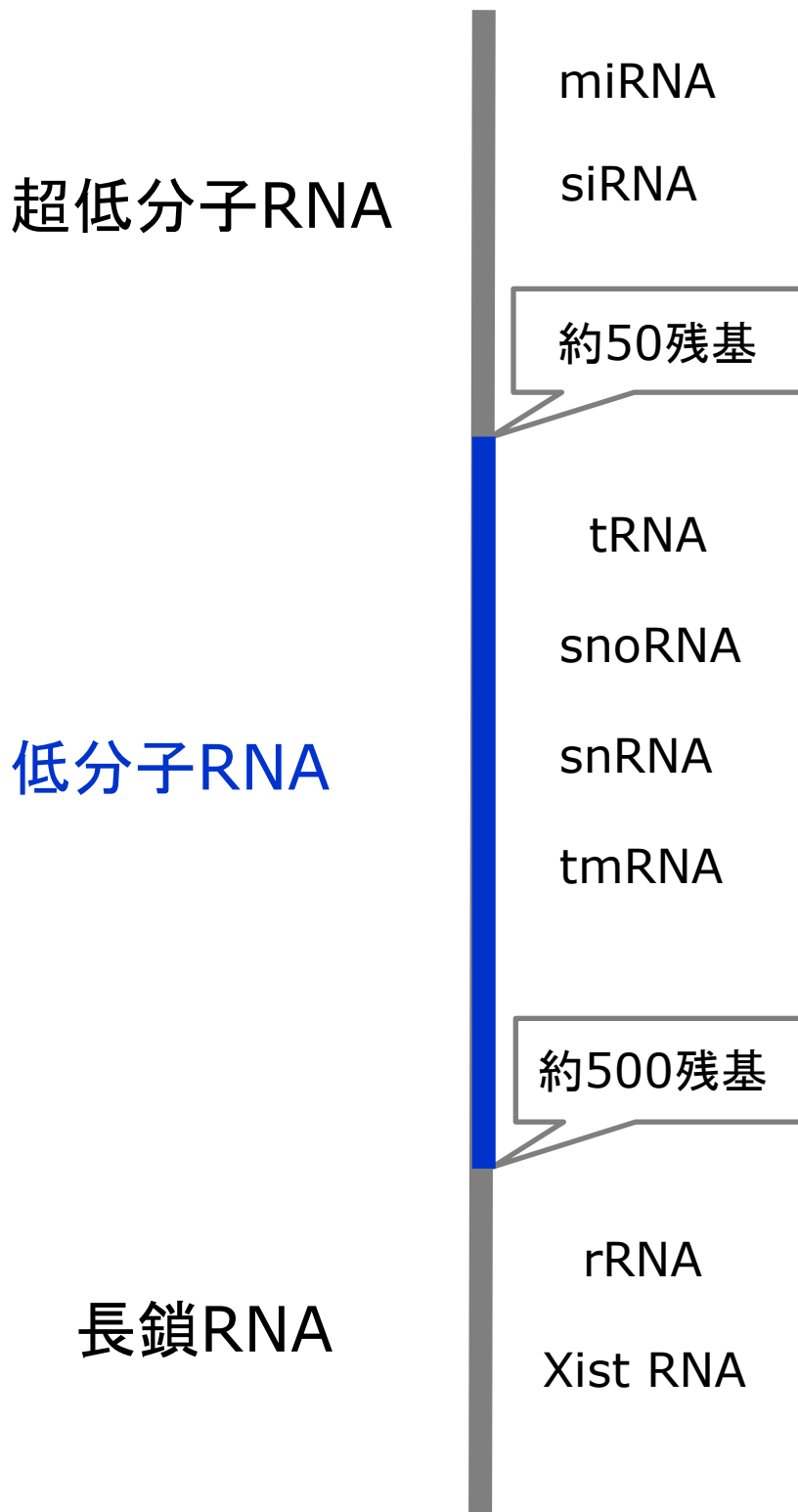


Fig. 1-1 本論文におけるRNAの定義

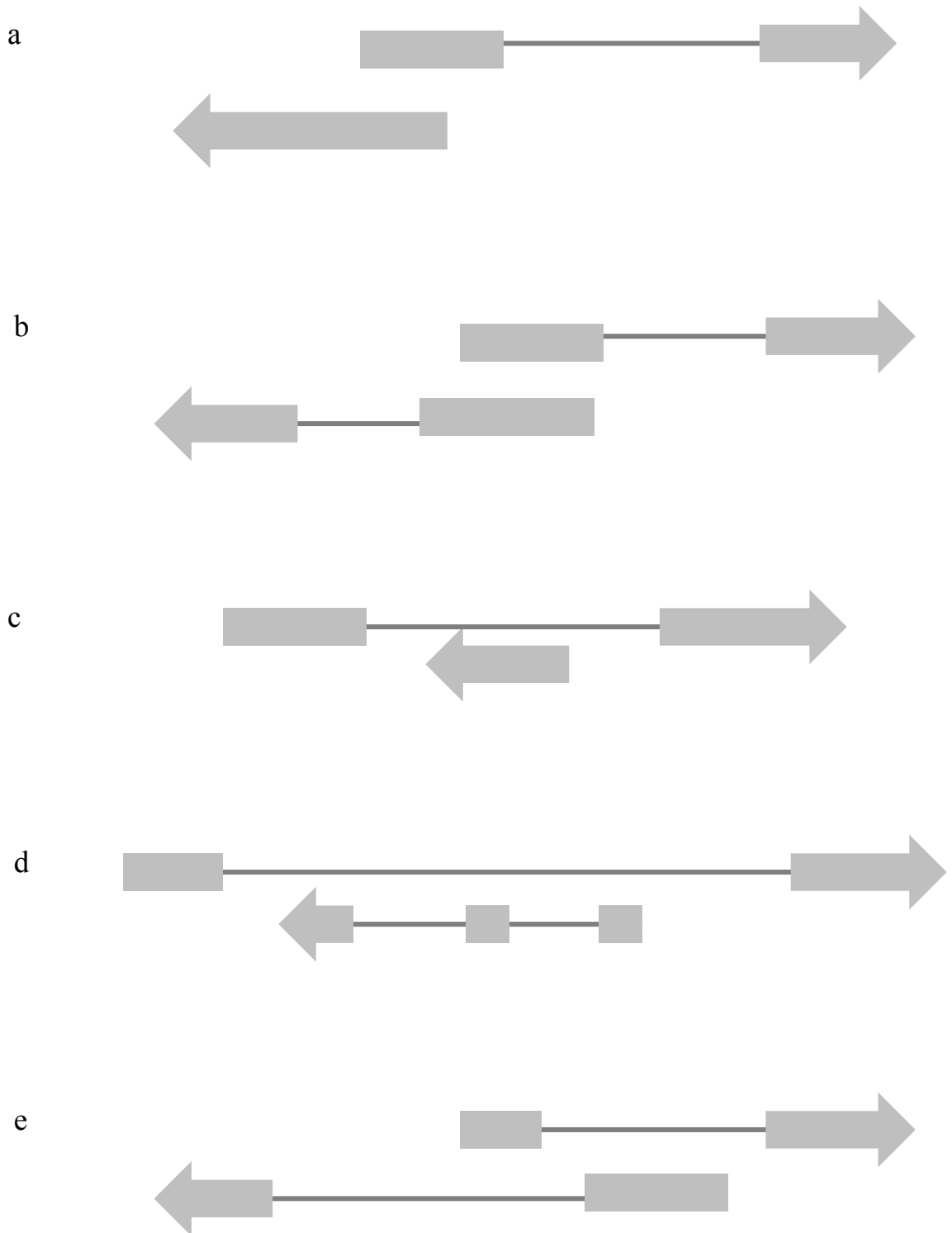
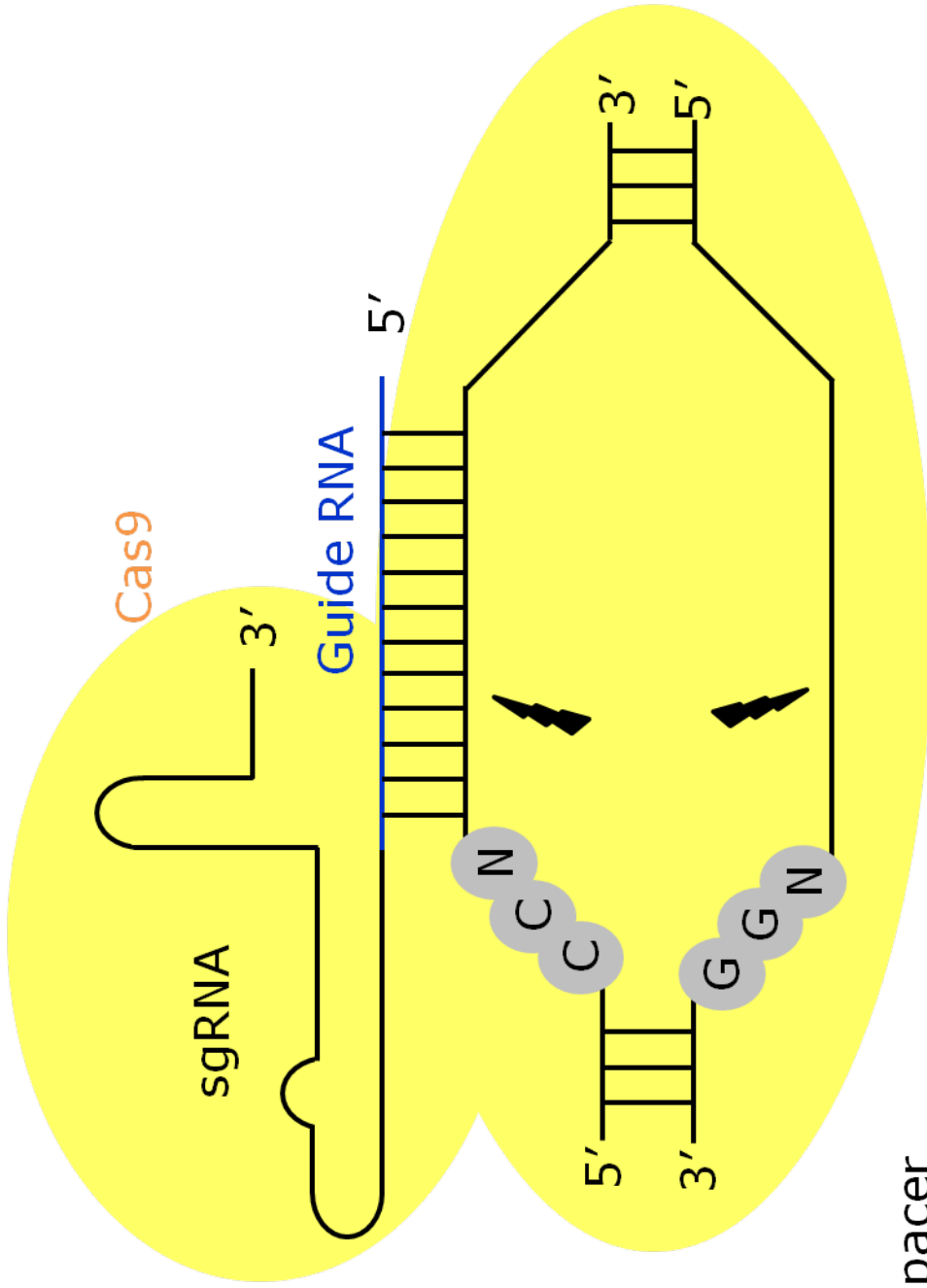


Fig. 1-2 センサーアンチセンスのパターン

灰色の四角または矢印がエクソン，黒線がイントロンを示す．

(a)片方にイントロンがない，(b)両方にイントロンがある，(c)非相補的で片側のイントロンにイントロンを持たないもう一方が入る，(d)非相補的で両方にイントロンをもち、片方のイントロンの中にもう一方が入る，(e)エクソンとイントロンが交互になる



Protospacer Adjacent Motif(PAM)

Fig. 1-3 CRISPR-Cas9 システムの模式図

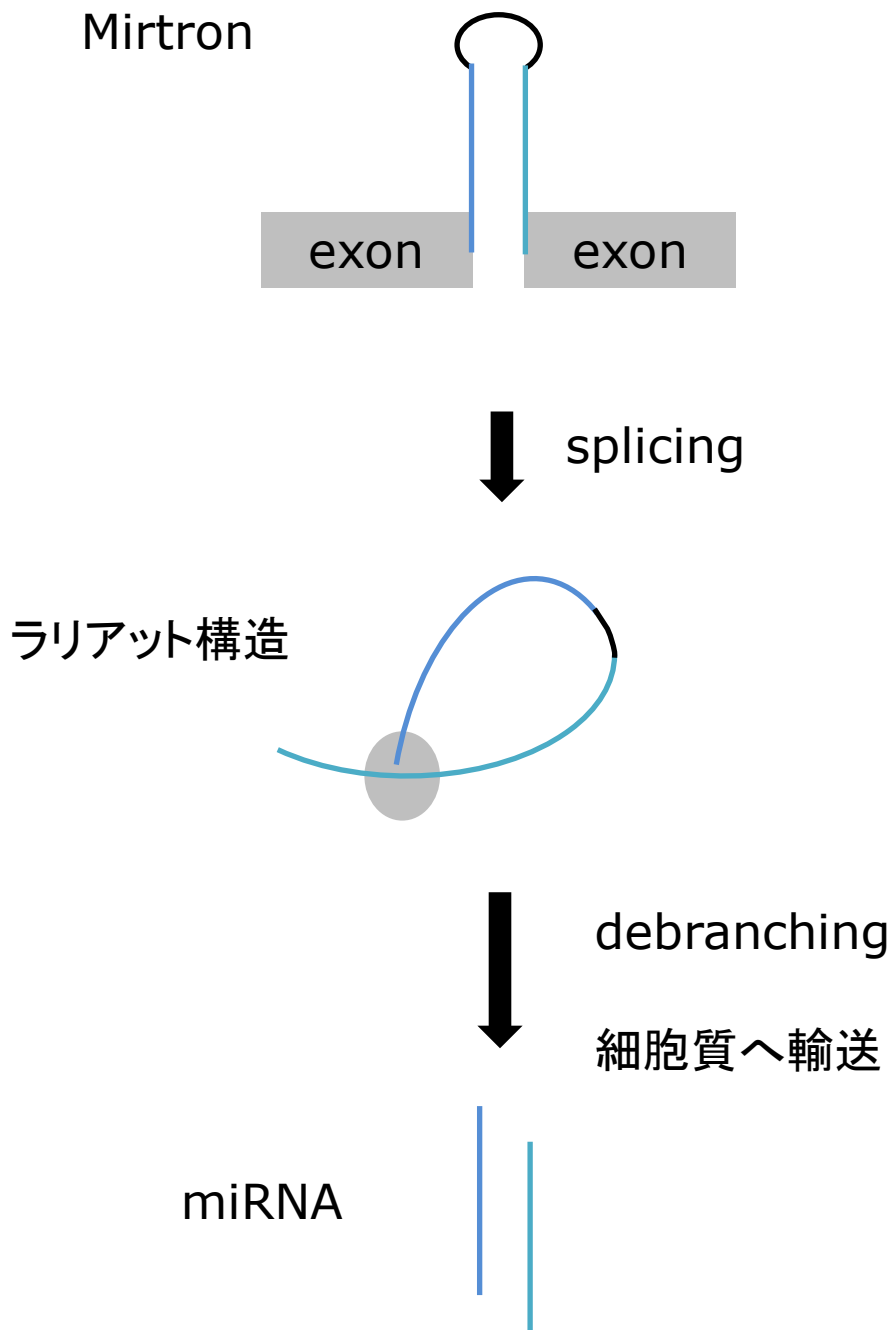


Fig. 1-4 Mirtronのプロセッシングシステム

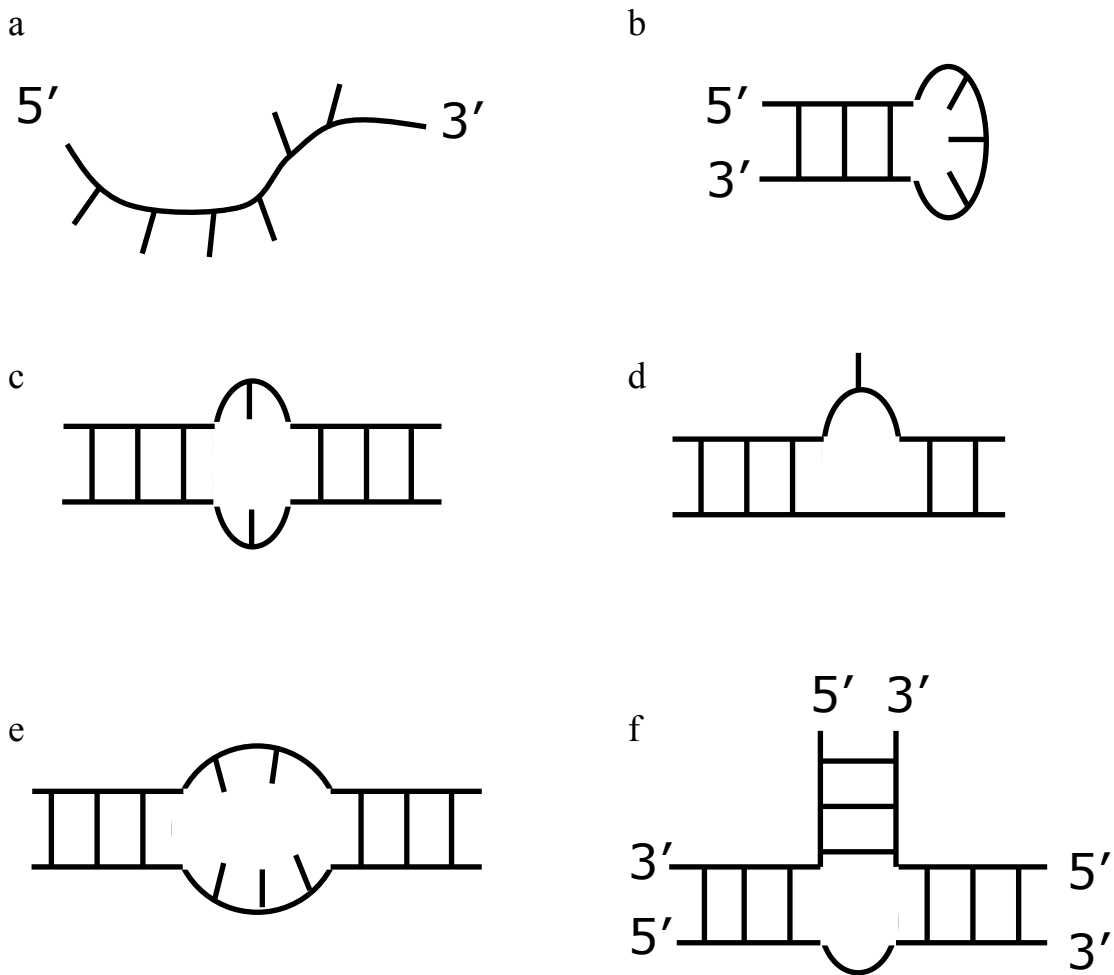


Fig. 1-5 RNAの二次構造

(a)一本鎖RNA, (b)ヘアピンループ, (c)ミスマッチペア, (d)バルジアウト, (e)内部ループ, (f)スリーウェイジャンクション

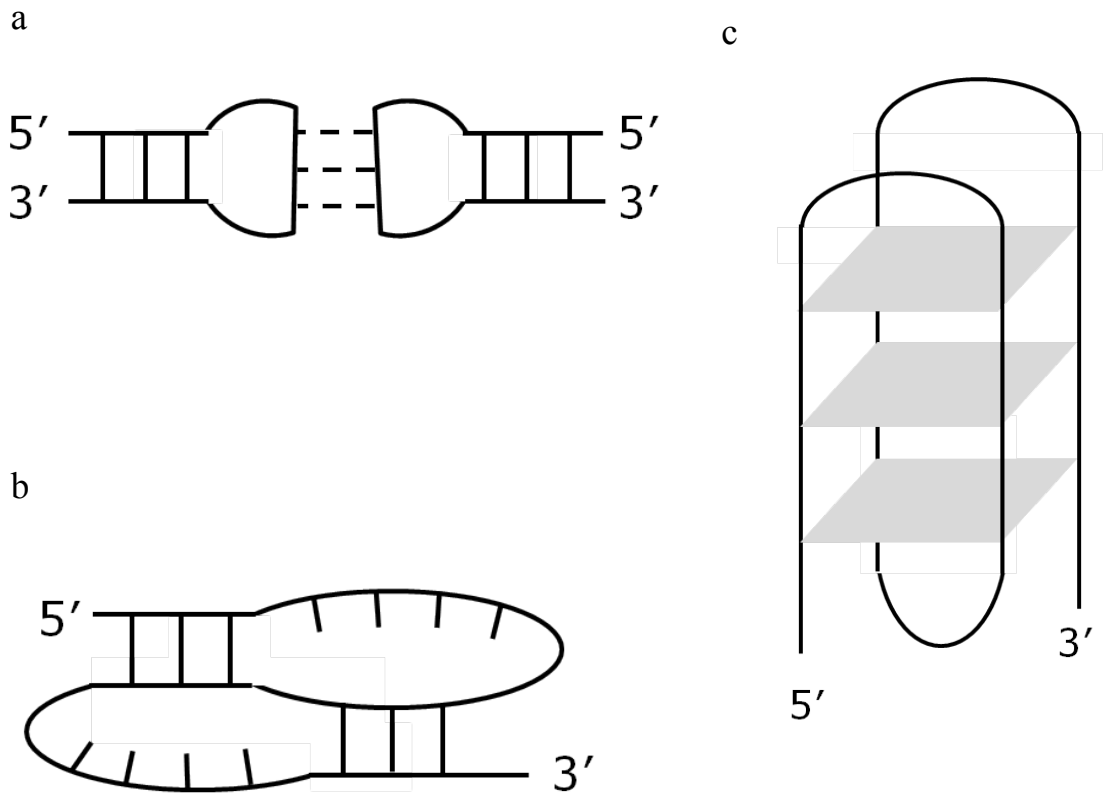


Fig. 1-6 RNAの三次構造
 (a)Kissing loop, (b)pseudoknot, (c)クワンテット

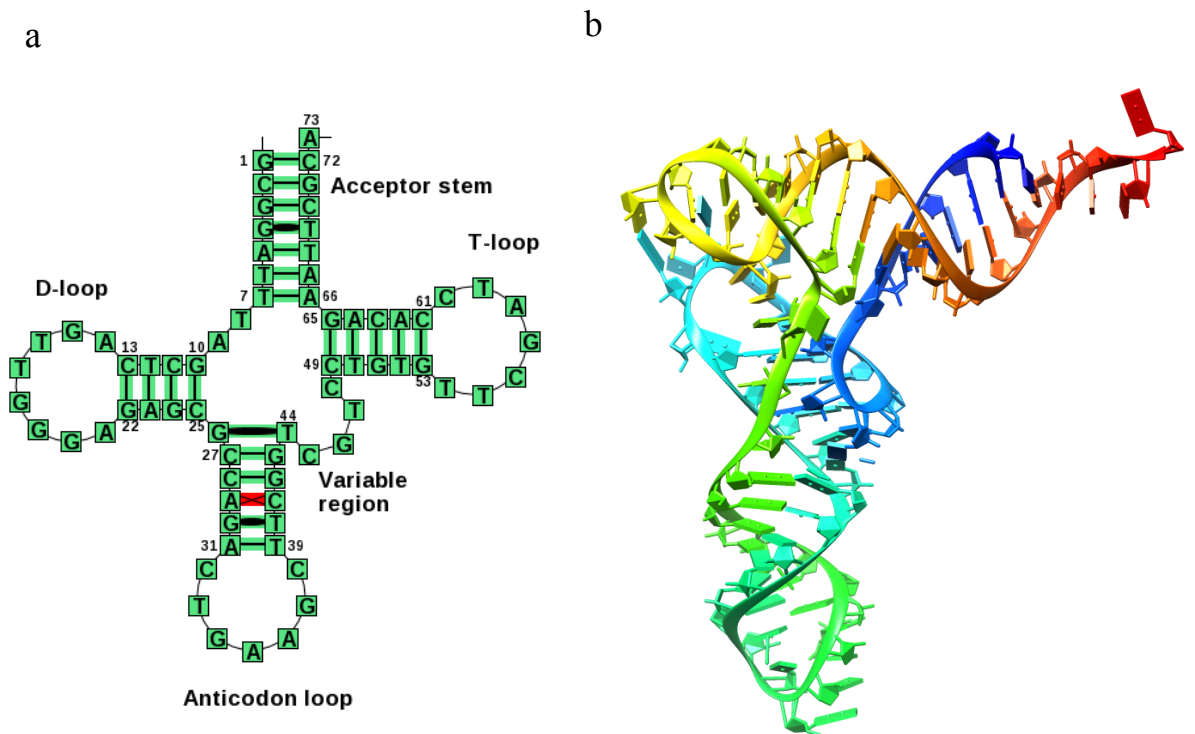


Fig. 1-7 tRNAの構造
 出芽酵母のフェニルアラニン
 (a)二次構造 (tRNAdb ID:tdbD00000787), (b)三次構造 (PDB ID:1EVV)

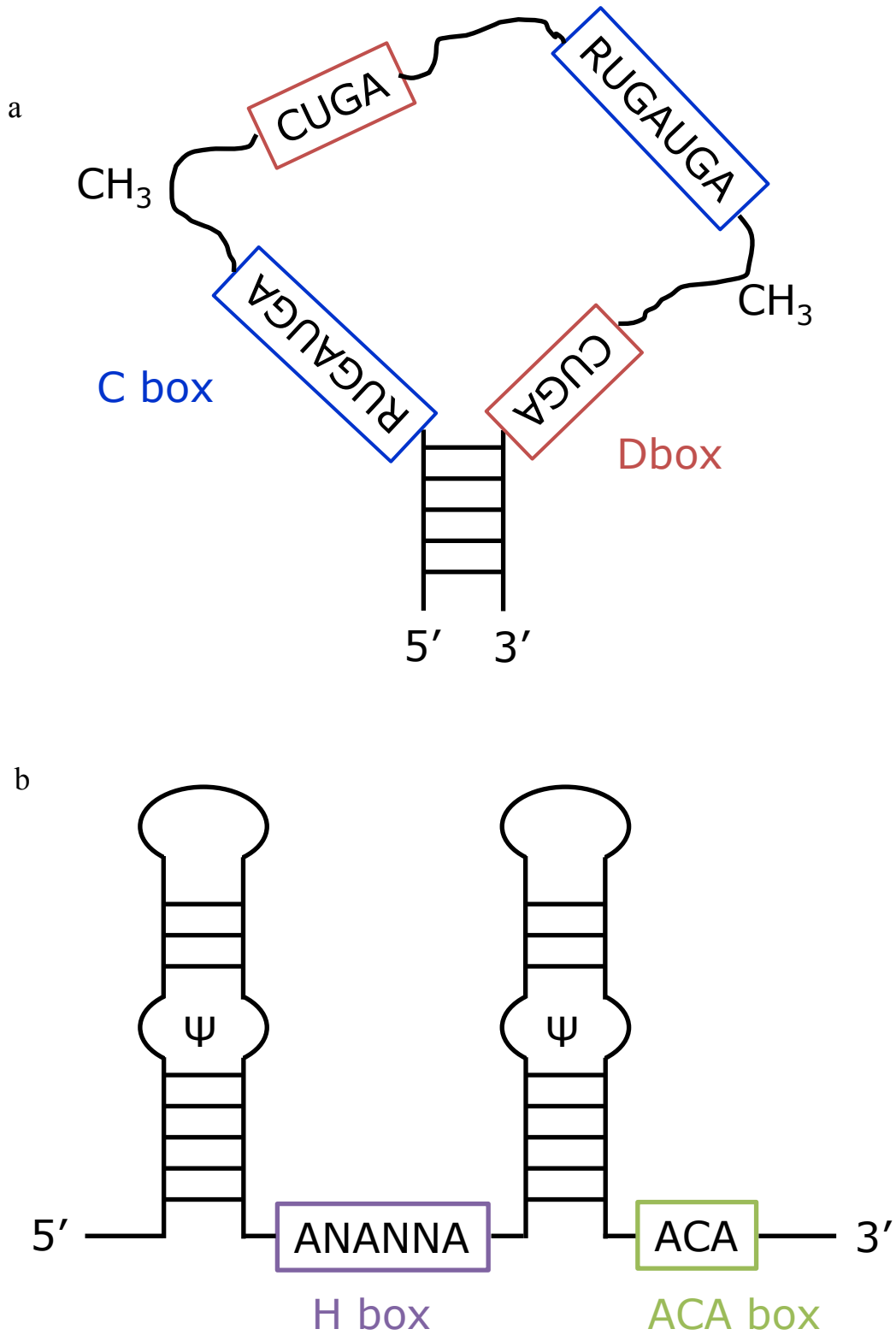
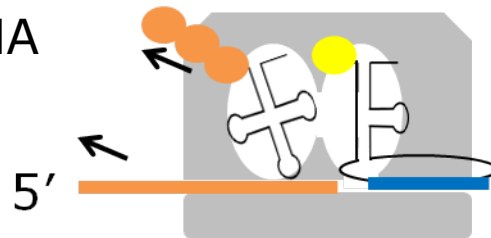


Fig. 1-8 snoRNAの保存されたボックスの二次構造
 (a) boxC/D型 snoRNA, (b) boxH/ACA型 snoRNA

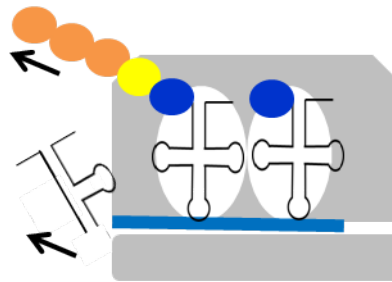
翻訳が止まってしまう



tmRNAが入りmRNA
とtRNAを除去する



分解のタグをつける



mRNAの品質が
保たれる

N ○○○○○○●○○○ C

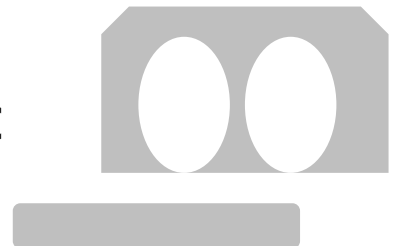


Fig. 1-9 tmRNAの品質管理システム

第 1 部 低分子 RNA を解析する手法の開発

第2章 新規 RNA 発見のための網羅的低分子 RNA 配列解析

2-1 はじめに

本研究は「マウス細胞内に存在する低分子 RNA の高次構造に基づく網羅的な解析」というプロジェクトにおいて、高知大学 清澤博士と弘前大学 牛田博士、当研究室の河合博士との共同で解析が行われた研究である。本プロジェクトでは未知の低分子 RNA の発見を目指し、網羅的な解析を行う。生体内において RNA が分解されず働くためには安定な構造を形成している、または特異的なターゲットと結合していると考え二次構造に基づく低分子 RNA の解析を行った。

2-1-1 次世代シーケンサー (Next-Generation Sequencer | NGS)

現代における DNA シーケシングは、遺伝子導入した鑄型のチェック, DNA-タンパク質相互作用解析, 腸内フローラの網羅的解析といった実験の場面から、メディカルチェックや警察の科学鑑定に至るまで、様々な場面で活躍をしている。DNA シーケンシング初期の原理は、1975年にサンガーらによって開発されたジデオキシ法がある。ジデオキシ法は、目的の一本鎖 DNA を鑄型とし、デオキシヌクレオチド (dNTP) と 1 種類のジデオキシヌクレオチド (ddNTP) を用い、相補鎖 DNA を合成する。合成する際、dNTP が取り込まれると DNA は伸長されるが、ddNTP が取り込まれると伸長反応が止まり、様々な長さの DNA が合成される。この反応を 4 種類の ddNTP により合成し、PAGE 法を用いて目的の DNA 配列を決める方法である[31]。この手法は塩基の読み取り精度は高いものの、1回の解析で配列を読めるリード数や量に限度がある。そこで、より解析処理能力が高く、大量の塩基配列を決定することができる、次世代シーケンサ

一(NGS)が開発された。

2000年以降 NGS の開発競争は激化し、「大量のデータを短時間、低コストで生産する方法」に向かって世界中の研究チームによる開発が進められ、10年程の間に各社独自に開発され、読み取りの方法により NGS は第2世代、第3世代、第4世代と分類されるようになった。各世代の読み取りの特徴について述べる。第2世代では、DNA断片に2種類のアダプターを付け DNA ライブラリーを作製する。DNA をシーケンサー解析用に、スライドガラス上に増幅させ DNA クラスターを形成させる。配列の読み取りでは、DNA の1反応ごとに DNA 合成が止まり、各塩基の蛍光を観測する Sequencing by synthesis (SBS) 法により塩基配列を読み取り、合成した DNA 配列を並列に解析が出来る[32]。第3世代では、1分子のリアルタイムの DNA 合成を蛍光や発光を検出することで塩基を決定する方法であり、鋳型の増幅を必要せず配列決定出来るという利点がある[33]。また、他の技術よりも長いリードを検出する。第4世代では、蛍光検出を使用せず、電気を使用し塩基の物性にに基づき識別する方法である[34]。現在もまだ、第3、第4世代の研究開発が続いている。

本研究では、50~150残基のサイズの RNA を網羅的に調べるため、イルミナ社の HiSeq2000 [32]を使用し解析を行った。HiSeq2000 は第2世代に分類されており、得られた RNA を鋳型に DNA を合成し、リード長は100~150 bp 読むことができ、5'末端と3'末端にそれぞれ異なるアダプターを付加し、同一の DNA 断片を両側から読み取るペアエンド法で読むことで1つの配列が2回読まれ、配列データの信頼性が上がる。また、第3世代、第4世代よりもコストが低い、という利点からこの手法による解析を選択した。

2-1-2 RNA の二次構造予測

二次構造予測の方法では、大きく2つに分けられる。1つはRNAの最少エネルギーモデルに基づく方法、もう一つは、複数の配列アライメントによって構造を予測する方法である。エネルギーが最少となる様に最適化された予測方法では、配列の長さを n とし形成しうる可能な全ての構造をあげ、塩基対 (i, j) に依存する2つの塩基対（例えば前後の塩基）が許容できるエネルギーモデルの構造を予測する。依存する2つの塩基対形成のエネルギーがより小さくなるように、可能な塩基対を再帰的に計算する動的なアルゴリズムが Zuker らによって提唱され、このアルゴリズムを使用した Mfold が広く使われている[35]。これまでのアルゴリズムでは、*pesudoknot* 構造を予測することができなかった。例えば、*pesudoknot* では塩基を形成する i と j の間の予測だけでなく、その他に塩基対 m と n について予測することが必要になる。RNaseP や tmRNA, グループ I イントロンなどでは、より複雑な構造を形成することが報告され、二次構造予測にも複雑な構造の予測が求められるようになった。本研究で使用した *vsfold5* は、これまでの塩基対形成の自由エネルギーを計算するだけでなく、二次構造形成の *cross-linking* エントロピーを計算し予測に用いるため、tRNA の様な構造予測を得意とし、*pesudoknot* 構造の予測も行うことができる方法である[36]。複数の配列を比較する方法では、いくつかの RNA 配列を比較し、共通の部分的な二次構造を持つ RNA を予測する方法である[37]。Sankoff らのアルゴリズムに基づき単純化した方法として Foldalign[38]という予測プログラムがある。このプログラムでは2つの配列または、いくつかの配列を比較しその相関係数が高い部分構造を示すプログラムである。三次元的な予測として、タンパク質の三次構造予測に由来する方法を利用し、各塩基の中心にダミーの原子を置き最少エネルギーになる三次元的な構造を探すプログラムとして FARNa[39]

が公開されている。近年さらに研究が進み、ここに示したプログラムに限らず、最少エネルギーを計算する方法と配列のアライメントを組み合わせた方法や公開されている方法を改善し長鎖の RNA を予測可能にした方法など、多くの RNA の構造予測プログラムが公開されている。

2-1-3 マウス(C57BL/6JmsSLC)[40,41,42,43]

本研究で使用したマウス C57BL/6 は、20 世代以上にわたり継続的に近親交配し、遺伝的な差異を揃えた近郊系のマウスであり、また、ゲノムの全配列が公開されており、他の系統のマウスよりも腫瘍の発生の割合が低い遺伝子改変マウスとして非常に広く実験用に使用されている。そもそも C57BL/6J の由来は、1920 年代 C57BL マウスを Little らにより育成しており、その後ジャクソン研究所において繁殖したものを C57BL/ 6J と呼ばれている。Jms はラボコードを示しており、東京大学医科学研究所において生産されたマウスを示す。

遺伝子の特徴として、他の系統のマウスよりも腫瘍の発生の割合が低いことが知られ Nnt 遺伝子に変異があり

2-1-4 解析した次世代シーケンスサンプルデータ

RNA の抽出からシーケンサー解析については、清澤博士と牛田博士によって行われた。C57BL/6JmsSLC のマウス (8~10 週齢) の脳を採取しフェノールの pH を調節して DNA と RNA を分離させ RNA のみを抽出する Acid Guanidinium thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction 法によって、60 μ g の RNA を抽出した。抽出した RNA を 12%変性 PAGE により泳動し 40~140 残基の RNA を回収した。この後の解析はタカラバイオに委託した。このうち 20 ng の RNA を TruSeq Small

RNA Sample Preparation Kit (illumina 社) を使用し 5' と 3' 末端にアダプター (付録 1) を結合した. 3' 末端アダプター相補的なプライマーを使用し逆転写反応をさせた. 合成された一本鎖 cDNA を鋳型として PCR により反応を 12 サイクル行い増幅させ, 変性 PAGE により約 80~190 残基 (約 160~350 塩基対) の DNA を分離しライブラリーとした (付録 2 [44]). この cDNA を HiSeq 2000 (illumina 社) を用いて次世代シーケンサーによる解析を行った. 100 残基の Pair-end 法で配列を得た. 本解析に使用した RNA はシーケンス解析を委託したタカラバイオ株式会社によって, 2100 Bioanalyzer (Agilent 社) を用いてシーケンスライブラリーの品質を測定され, ピークサイズ, 濃度ともに問題ないことが証明されている (Fig. 2-1).

2-2 方法

2-2-1 二次構造によるクラスタリングと新規候補 RNA の探索

抽出した RNA 配列から既知の RNA を取り除くため, 得られた配列の 100 万配列をゲノムデータベースにあて, 既知の RNA を抽出した. この部分の解析は学生の奥村氏が担当した. 本研究室で開発された smallRNAfilter を使用し, 抽出した既知の RNA 配列を約 1 億配列から取り除いた. 残った RNA 全ての二次構造を vsfold5 により予測した. 予測のオプションには, pseudoknot 形成予測なし, Kuhn length 7 に設定した. 予測した RNA をステムの数と階層の数で, 構造をパターン化し分類した (Fig. 2-2). 構造のパターン (0-0 から 9-2 まで) と残基数 (40 残基以下-59 残基, 60-79 残基, 80-89 残基, 90-109 残基, 110-200 以上) により分類した. さらに, 本研究室で開発された smallRNAclass を使用し, 各グループの中の二次構造の類似性と配列の類似性でサブグループに分類した. サブグ

ループの代表的な配列をゲノムデータベース (UCSC Genome Browser(マウスのゲノムデータ GRCm38/mm10)) [45] と snoRNA のデータベース (snOPY) [46] 上にマッピングし, 既知の RNA を除去した. また, データベースに当たらない配列も取り除いた. 一致度として, 配列の 5'または 3'末端の 3 残基までの欠損を許容した. クラスタリングには当研究室で開発されたプログラムを使用した.

2-3 結果

2-3-1 マウスの脳から得られた RNA のシーケンサー解析

シーケンサー解析により得た 112,869,955 配列から 2 本のリードの重複部分が 11 残基以上有り, ミスマッチがない RNA 107,480,246 配列を抽出した. 抽出した RNA は 11 残基から 189 残基の範囲に分布していた (Fig. 2-3). 殆どの RNA は 40-100 残基の長さに位置しており, 122 残基, 133 残基, 142 残基の位置に RNA が集まっていた. これらの大きさを持つ RNA として, rRNA の断片の 5.8S rRNA と 28S rRNA また, H/ACA 型 snoRNA が当てはまる.

残基数の分布から既知の RNA が大量に含まれている事がわかったため, サンプルングとして約 1 億配列の内 1%に当たる 100 万配列について解析を行った. 100 万配列中 962,744 配列が読まれ, これらの配列を二次構造予測し, 二次構造のパターンと残基数でクラスタリングした結果, 159 グループに分けられた (Table 2-1). 得られた RNA の殆どは, rRNA の断片や snoRNA であった. ここで見つかった既知の RNA をリストアップし, 約 1 億配列からリストアップした配列を抜き取り, 残された「解析すべき RNA」は 726,257 配列であった. 解析した約 1 億配列を割合で示すと, 95%は rRNA, boxC/D snoRNA, boxH/ACA

snoRNA で構成されていた。tRNA は 0.8%, その他の RNA (snRNA, 4.5S RNA, SRP RNA, 7SK RNA, RNaseP RNA, Vault RNA, Y RNA, mitochondrial tRNAs) が 3.5%含まれており, 残された解析すべき RNA は 0.7%であった (Fig. 2-4)。

2-3-2 二次構造によるクラスタリングと新規候補 RNA の探索

解析すべき 726,257 配列を残基数で分布させた (Fig. 2-5)。配列を vsfold5 で二次構造予測を行い, 二次構造が予測できなかった 102 配列と残基数が 39 残基以下の配列を除いた, 685,061 配列を構造のパターンと配列数で, 216 グループに分類した (Table 2-2)。さらに, グループの中を二次構造と配列の類似性によってサブグループに分類した。それぞれのサブグループに 10 配列以上含まれているものを解析対象とした。サブグループの代表的な配列を UCSC Genome Browser のデータベースにマッチさせ, アノテートされている配列は, 解析対象から除外した。この解析では, snoRNA, snRNA, tRNA やトランスポゾンが見つかった。ゲノムのデータベース上でゲノムのイントロンに一致する配列は, snOPY のデータベースにマッピングし, snoRNA と scaRNA を除いた。2つのデータベースにマッピングし, どちらでも除かれなかった新規低分子 RNA 候補を 16 候補見つけた (Table 2-3)。最初のサンプリングとして行った解析において, 見つかった 2つの RNA を候補番号 1 と 2 とした。その後に見つかった配列も読まれた配列数の多い順番に番号を振った。新規 RNA 候補を Mouse structured small non-coding RNA (MsnCR) と呼びその後に各配列の番号を付けた。各新規 RNA の二次構造とゲノム上の位置を Fig. 2-6(a)~(p)に示す。今回発見された新規 RNA は長さや染色体, 見つかった数に偏りはなかった。共通している部分では, MsnCR-5 と 16 以外の新規 RNA は遺伝子のイントロンに一致していた。イントロンでも非常に広いイントロンの一部の場合やエクソンに近いなど, それぞれ

異なっていた。MsncR-4 は Rhot2 の 18 番目のイントロンに完全に一致しており配列の一部が rRNA の配列と一致することから、これまで見つかっていなかった哺乳類の Mirtron の可能性が高い。より多くの解析をしていくことで、新規の Mirtron が見つかる可能性があると考えられる。MsncR-1, 5, 7 は SAT であり、相補鎖の制御などに関与している可能性が考えられる。MsncR-12 は繰り返しの配列でありゲノム上で 4 回ほど繰り返されている。また、MsncR-12 自体は 111 残基であるがこの配列内においても、最小単位 40 残基とした配列が 8 回繰り返されている。単純なリピート配列なのか、何らかの構造を形成し CRISPR の様に機能しているのかはわからない。MsncR-16 の場合、遺伝子のイントロンでもなく、周りのコード領域からも離れており、43 残基と短い。現在のところ新規 RNA の機能は、わかっていない。

2-3-3 新規候補 RNA の生体内における発現の確認

新規候補 RNA として見出された 16 個の配列の生体内での存在を確認するため、牛田博士らによってノーザンハイブリダイゼーション法による確認が行われた。ノーザンハイブリダイゼーションには ULTRAhy oligo (Ambion 社) と DIG システムを使用し行われた。この結果、3 つの RNA からバンドを検出することができた。MsncR-7 は胃でバンドが確認された。脳での存在量が少なかった可能性が考えられる。MsncR-3 は脳と腸、NIH3T3 においてバンドが検出された。MsncR-4 は、脳、肺、肝臓、脾臓、胃、小腸、腎臓、NIH3T3 でバンドが確認され特に小腸では短いバンドが非常に強く出ていた (Fig. 2-7)。

2-4 考察

2-4-1 二次構造に基づくクラスタリング

マウスの脳から得られた RNA を抽出した 40 から 140 残基の長さの small RNA を次世代シーケンサーにより解析した。サンプリングのために解析を行った約 1,000,000 配列を二次構造予測し、ステムの数と階層による構造のパターンと残基数で分類を行った。140 残基未満の RNA は二次構造予測を行った配列のバリエーションは、ステム 6 個、階層は 4 つまでに限られた。得られた配列の 95% には rRNA の断片や snoRNA の配列が大量に含まれており、新規低分子 ncRNA は 0.7% に過ぎなかった。この解析において見つかった tRNA は、体細胞内に存在する量よりも少なかった。これは tRNA の立体構造や修飾のためにアダプターのライゲーションや逆転写反応の間に不完全な cDNA が形成されたことが細胞内の量よりもシーケンサーで読まれた tRNA が少なかった原因ではないかと考える。このようなことから、塩基修飾は逆転写反応の効率を低下させているかもしれない。私たちの先行研究において同じ様に抽出した RNA サンプルを今回とは異なる cDNA の調製試薬、異なる会社のシーケンサーを使用した時は、読まれた配列の約半分程を tRNA が占めていた。このことから、次世代シーケンサーの解析では読まれなかった tRNA があるように他にも見逃している RNA があることが示唆された。

低分子 RNA 配列の二次構造に基づくクラスタリングは配列を特徴づける方法である。私たちが二次構造に目を付けた理由は、同じ二次構造を持つ RNA 配列を分類すれば、新しい生化学的な機能に寄与する RNA を一度に得ることができるのではないかと考えたからである。本解析により、異なるゲノム上の位置から発現しており、同じ構造パターンに分類され、tRNA の後ろから発現

されていることから機能も似ている可能性がある 1 サンプルを新規候補 RNA の中から見出した (Fig. 2-8). より多くの新規低分子 RNA を分類することで、このような同じ構造と機能を持つ RNA を見つけることが出来ると考える. このクラスタリングでは、ステムの数と階層が同じでも実際に予測される二次構造では、異なる形を示すものがあることから、構造のパターンにステムや階層の位置情報を加えるなど、より正確な分類を行うことで同じ構造と機能を持つ RNA をまとめることが出来るかもしれない. 今回構造のパターン化するために、二次構造予測プログラム vsfold5 を選択した、これは熱安定性だけで予測する他のプログラムよりも構造パターンが多くなることを予測し使用した. 但し、設定したパラメータにより構造が変化してしまう RNA もあるため、同じ配列データによって本解析結果とどの程度の差異が生まれるのかを検討しておく必要があるかも知れない. また、これから立体構造予測も含めた分類やより残基数の大きい RNA も対象とできるような分類方法を確立できれば、本解析手法がより広く使われるだろうと考える.

2-4-2 新規候補 RNA の探索

私たちは 16 個の新規 RNA 候補を発見した. それぞれの候補はマウスの脳の中で存在するものの、見つかった配列数は少なかった. ノーザン解析でも 3 種類しか見つかっていない. これは、次世代シーケンサーの感度が非常に高く、生体内において存在量の少ない RNA を観測出来たと考える. ここで見つかった新規 RNA 候補は NMR 法による解析が順次進められている. 低分子 RNA が細胞内で安定に存在するためには、立体構造を形成しているまたは、RNA やタンパク質などと相互作用して安定していると考えられる. それらの構造を決定すれば、結合パターンを同定することができるだろう. 16 候補の安定性を調べるために、

私たちは解析に使用した vsfold5 のほかに Mfold [47] と CENTROIDFOLD [48] の 2 つの予測ソフトをしようし二次構造を予測した。殆どの場合予測した二次構造は同じシステムを組むなど部分的に似ていた。MsncR-3 と 13 では、3 つの予測ソフトで異なる構造を示していた (Fig. 2-9A, B)。この 2 つの RNA は安定な二次構造ではなかったために、プログラムにより異なる構造を示したと考える。対称的に MsncR-6, 7, 8 では、3 つの予測ソフトにおいて全て同構造を示しており、3 つの RNA は安定な構造を形成したためと考えた (Fig. 2-10A, B, C)。今後は二次構造予測の結果から、得られた結果を融解温度測定や NMR 法によって解析し確かめていくことで、新規低分子 RNA の機能が明らかになることが期待される。

Table 2-1 最初の 1,000,000 readsの配列を二次構造パターンで分類

パターン (stem-level)	長さ (nt)																合計
	11-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99	100-109	110-119	120-129	130-139	140-149	150-159	160-189	合計	
0-0	19			2												21	
1-1	2,285	978	5,136	18,062	18,403	2,216	17	7	2			1				1	
2-1	31	284	10,368	11,927	33,707	91,545	386	145	46	7	2	12				1	
2-2	2	49	940	2,556	68,668	53,143	98,434	2,282	234	188	77	1				1	
3-1		1	29	1,042	64,036	177,576	27,733	1,489	402	492	13	14	110	2	2	2	
3-2			19	26	9,452	55,742	8,326	7,281	2,540	867	537	1,148	127	2		86,067	
3-3			1		3	418	208	12,630	377	949	97	174	36	33		14,926	
4-1					71	413	1,029	513	147	50	141	5,044	16	1		7,426	
4-2					4	179	20,289	1,168	1,925	1,022	2,250	49,796	16,487	1,834		76	
4-3								51	293	1,425	31,948	636	14,194	9	6	48,562	
4-4									1	1	86	18	15	4	1	126	
5-1							1		6	19	1,360	150				1,536	
5-2								8	15	1,473	528	479	282	11	4	2,800	
5-3									59	170	152	163	686	203	2	1,435	
5-4											1	42	11	12	1	67	
6-1										1	1	4		3		9	
6-2										2	4	24	232	9	3	274	
6-3										3		1	8,958	378	16	9,356	
6-4														1	1	2	
7-1												1				0	
7-2													9	2		12	
7-3														3	1	4	
合計	2,337	1,312	16,493	33,615	194,344	381,232	156,423	25,574	6,047	6,669	37,197	57,708	41,163	2,507	116	962,737	

Table2-2 Remining RNAを残基数と二次構造パターンで分類

パターン (stem-level)	長さ (nt)														合計	
	11-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99	100-109	110-119	120-129	130-139	140-149	150-159		160-189
0-0	170	11	51	53	27	13		3	2	11	3				3	347
1-1	16,556	14,521	43,537	24,580	15,419	4,635	1,491	721	154	66	55	46	10	20	105	121,916
2-1	1,259	7,812	39,187	49,204	33,889	24,957	6,992	2,897	863	384	287	388	15	38	106	168,278
2-2	50	698	4,911	13,093	28,061	27,224	16,663	7,302	2,723	983	534	163	36	15	66	102,522
3-1	3	44	720	6,204	27,976	34,165	15,835	7,445	2,957	2,251	803	471	448	40	175	99,537
3-2		15	149	414	9,459	23,791	20,413	19,535	9,925	6,249	4,199	4,286	640	51	77	99,203
3-3			18	20	27	776	1,595	6,211	2,537	1,999	2,126	1,848	438	113	9	17,717
4-1			3	9	445	1,948	2,890	3,444	2,354	1,710	1,283	1,565	225	64	105	16,045
4-2			1	10	22	715	3,101	6,860	8,898	8,998	7,686	13,888	3,634	891	95	54,799
4-3				1	5	8	26	454	849	2,329	4,259	3,492	2,636	624	105	14,788
4-4					3		1	9	9	80	346	153	212	323	32	1,159
5-1						3	19	95	259	470	815	551	119	20	9	2,360
5-2							8	153	670	2,167	2,786	4,384	3,028	649	151	13,996
5-3							1	1	90	304	916	1,568	2,557	986	323	6,746
5-4							2	1		3	8	85	123	176	104	502
5-5													1	2		3
6-1									4	18	38	103	53	30	5	251
6-2									11	89	172	1,159	978	475	100	2,984
6-3										7	20	242	1,301	516	188	2,274
6-4													13	35	59	107
6-5													1			1
7-1											1	2	2	7	2	14
7-2												8	35	39	30	112
7-3											1		7	448	26	482
7-4															2	2
8-1														1		1
8-2														1	3	4
8-3															2	2
8-5												2				2
9-2															1	1
合計	18,038	23,101	88,577	93,588	115,333	118,235	69,037	55,122	32,305	28,118	26,338	34,404	16,512	5,564	1,883	726,155

Table2-3 解析により見出された新規候補RNA (structured small non-coding RNAs)

番号	パターン (stem-level)	配列数	長さ	染色体	鎖	開始位置	終了位置	備考
MsnR-1	2-2	2900	66	66	8 (+)	85,053,592	85,053,657	transportin2 (imortin3, Karyopherin beta 2b) (SAT)
MsnR-2	3-3	2300	125	125	7 (-)	29,446,449	29,446,573	signal-induced proliferation-associated 1 like 3
MsnR-3A	2-1	492	40	40	2 (-)	122,375,454	122,375,493	downstream of tRNA(His) gene in a tRNA gene cluster.
MsnR-3B	2-1	13	43	43	2 (-)	122,377,320	122,377,362	downstream of tRNA(His) gene in a tRNA gene cluster.
MsnR-4	2-2	256	83	83	17 (-)	25,844,314	25,844,395	ras homolog gene family member T2 (SAT)
MsnR-5	3-2	217	99	99	8 (+)	84,208,586	84,208,684	between Mirs (SAT)
MsnR-6	4-2	216	119	119	15 (-)	36,243,689	36,243,807	ring finger protein 19A
MsnR-7	2-2	190	97	97	3 (+)	96,193,400	96,193,496	synaptic vesicle glycoprotein 2a (SAT)
MsnR-8	2-2	102	93	93	2 (+)	11,866,008	11,866,101	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 6
MsnR-9	4-3	100	130	130	12 (+)	110,653,291	110,653,420	dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1
MsnR-10	5-2	88	113	113	14 (-)	121,592,620	121,582,734	dedicator of cytokinesis 9 (dock9)
MsnR-11	3-2	46	90	90	2 (-)	22,589,651	22,589,738	myosin IIIA (Chr2) and reverse strand of tRNA (ChrM)
MsnR-12	2-2	42	111	111	3 (-)	80,866,800	80,866,911	repeated sequene
MsnR-13	2-2	36	86	86	9 (-)	40,306,598	40,306,683	gramd1b
MsnR-14	3-1	27	74	74	12 (-)	84,156,162	84,156,235	ELM2 and Myb/SANT-like domain containing 1
MsnR-15	3-2	24	93	93	7 (+)	101,202,373	101,202,465	part of RMER1B
MsnR-16	1-1	17	43	43	12 (+)	109,603,793	109,603,835	upstream of Meg8

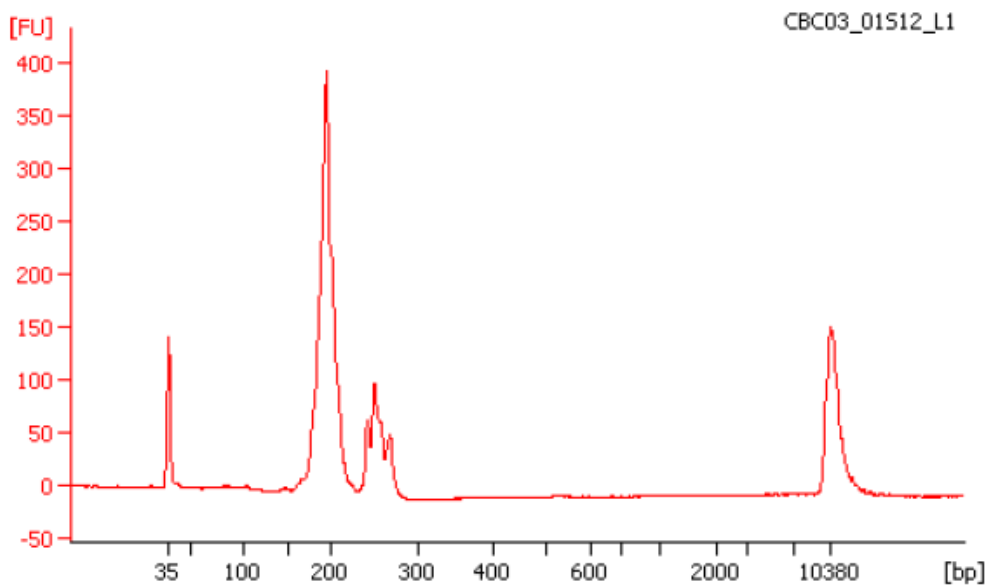
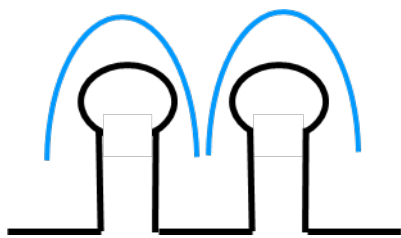
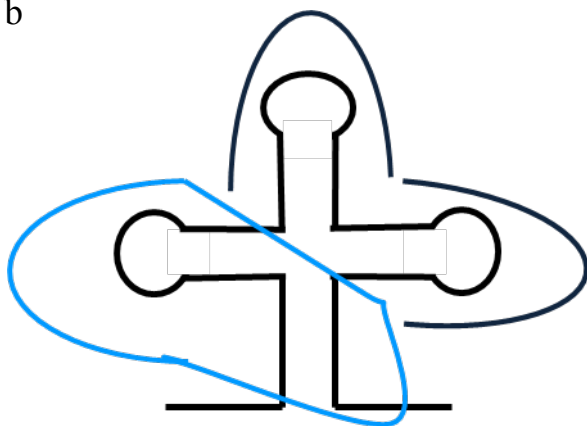


Fig. 2-1 シーケンスライブラリーの解析データ
タカラバイオ株式会社により、2100 Bioanalyzer (Agilent社)によって
解析された結果
ピークサイズ 194bp, 250bp, 濃度 6.4 nmol/l

a



b



c

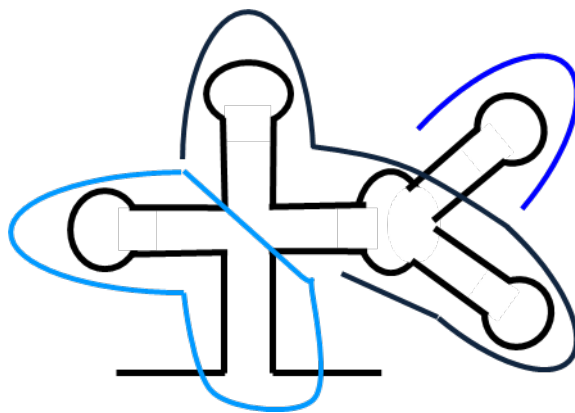


Fig. 2-2 二次構造に基づくクラスタリングの構造パターン—の例
ステムの数-階層 (stem)-(level) (a)2-1、(b)3-2、(c)4-3

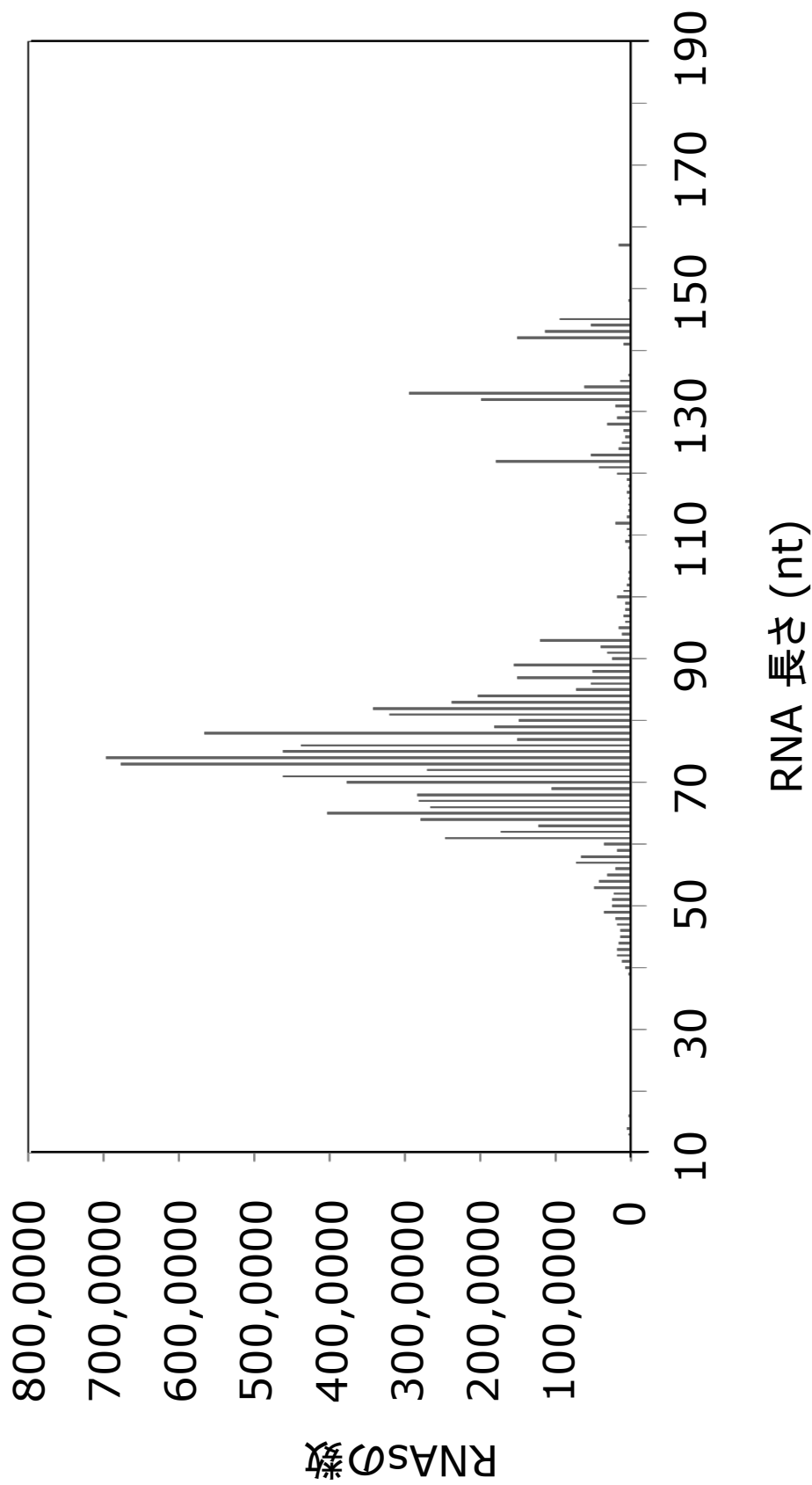


Fig. 2-3 107,480,246配列を残基数の分布

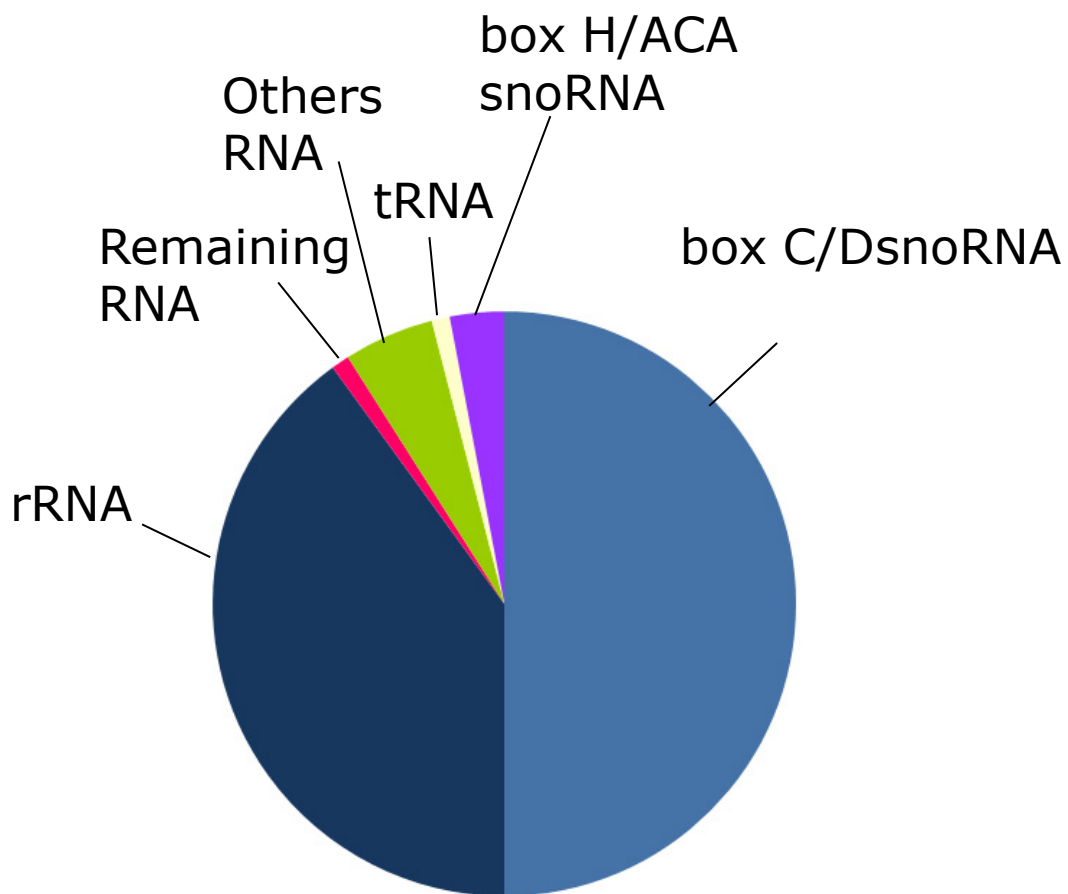


Fig. 2-4 約一億個の配列の分類
 boxC/D snoRNA 50.8%、rRNA 42.3%、Othres RNAs 3.5%、 boxH/ACA
 snoRNA 1.9 %、 tRNA 0.8%、 Remaining RNA 0.7 %

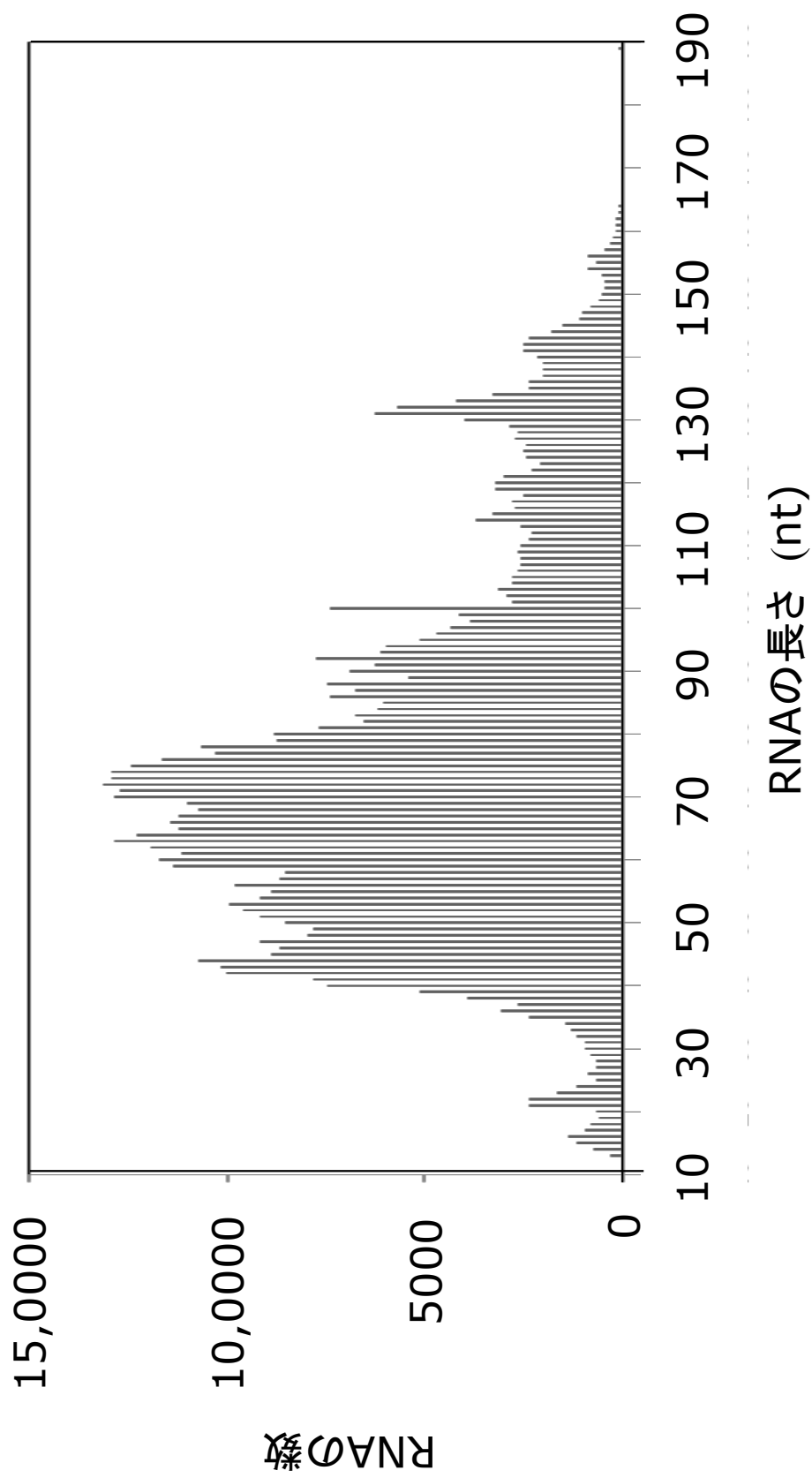


Fig. 2-5 Remaining RNA726,257配列を残基数で分布

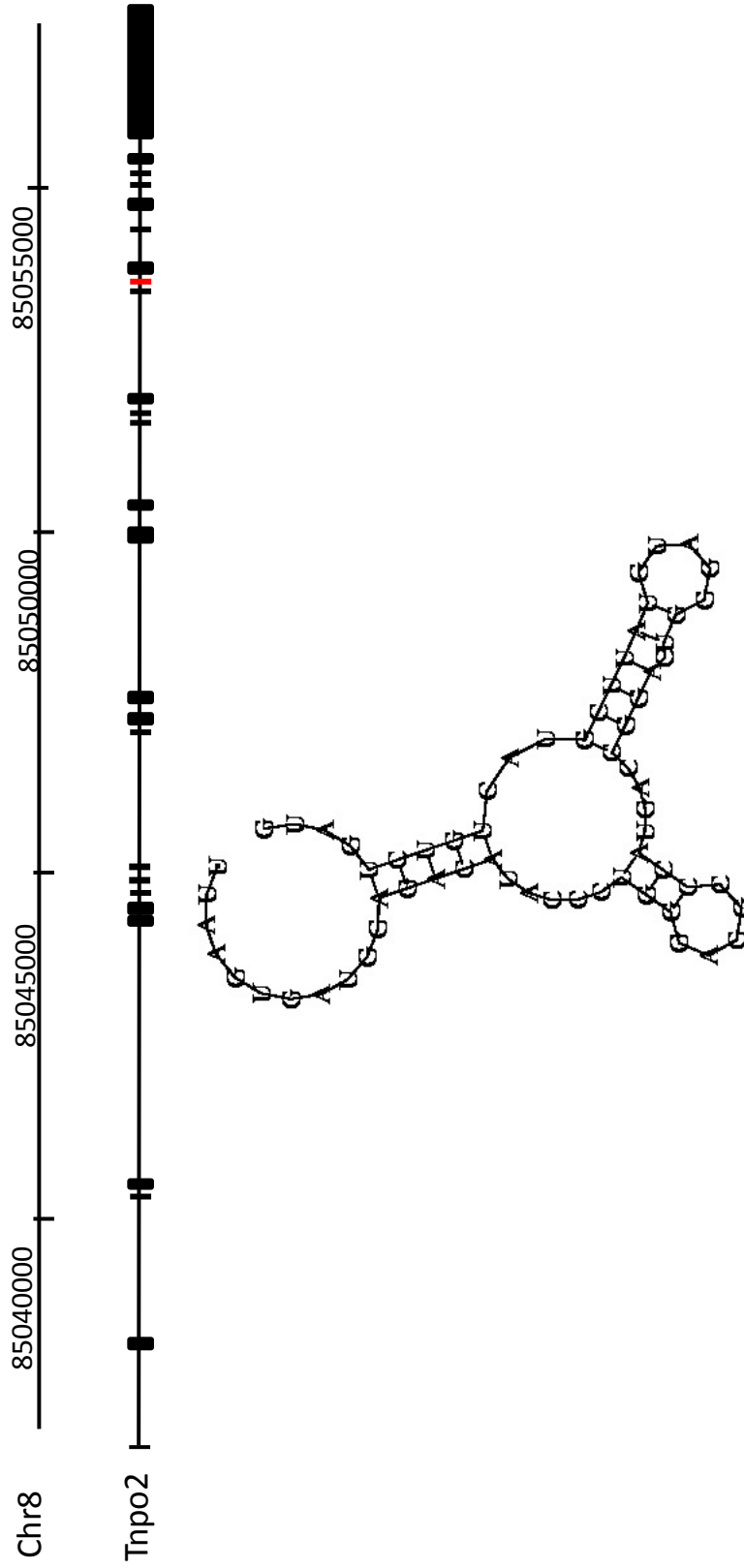


Fig. 2-6 (a) MsnrR-1 ゲノム上の位置と二次構造予測
赤がサンプルの配列が一致する領域

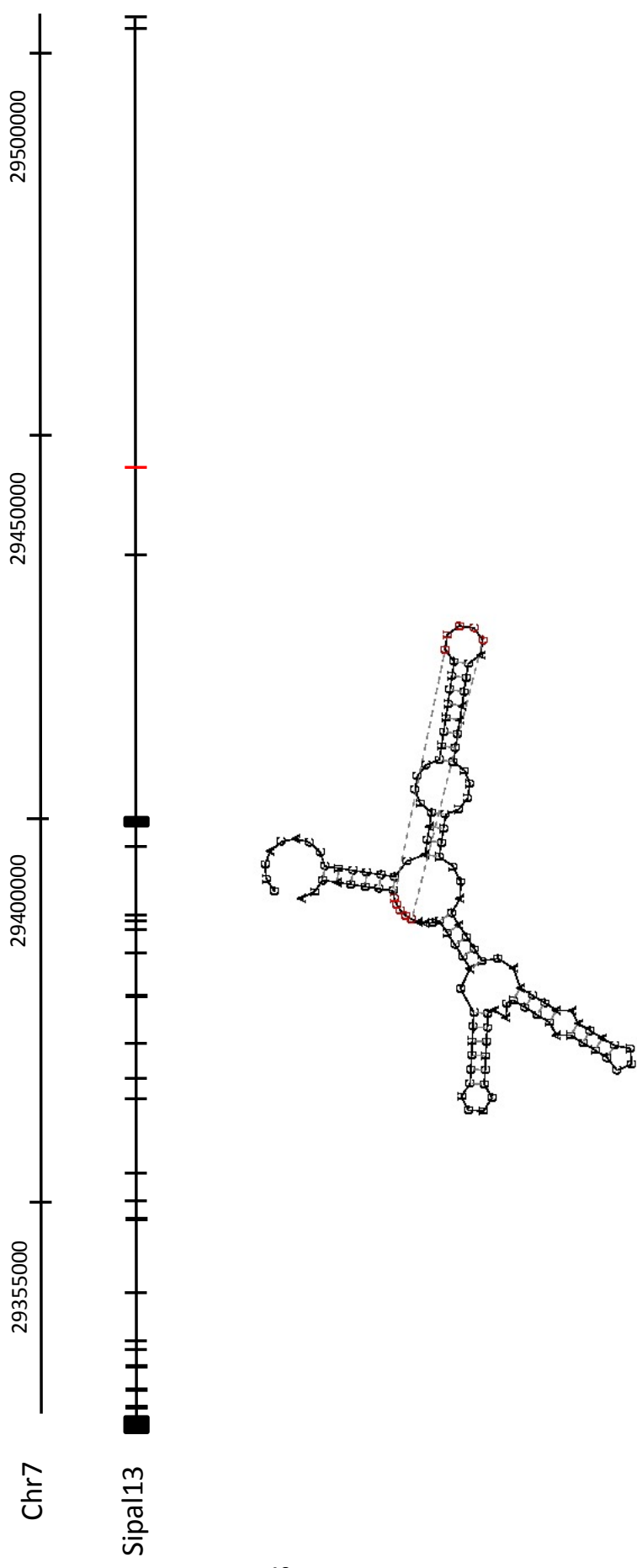


Fig. 2-6 (b) MsnR-2 ゲノム上の位置と二次構造予測
赤がサンプルの配列が一致する領域

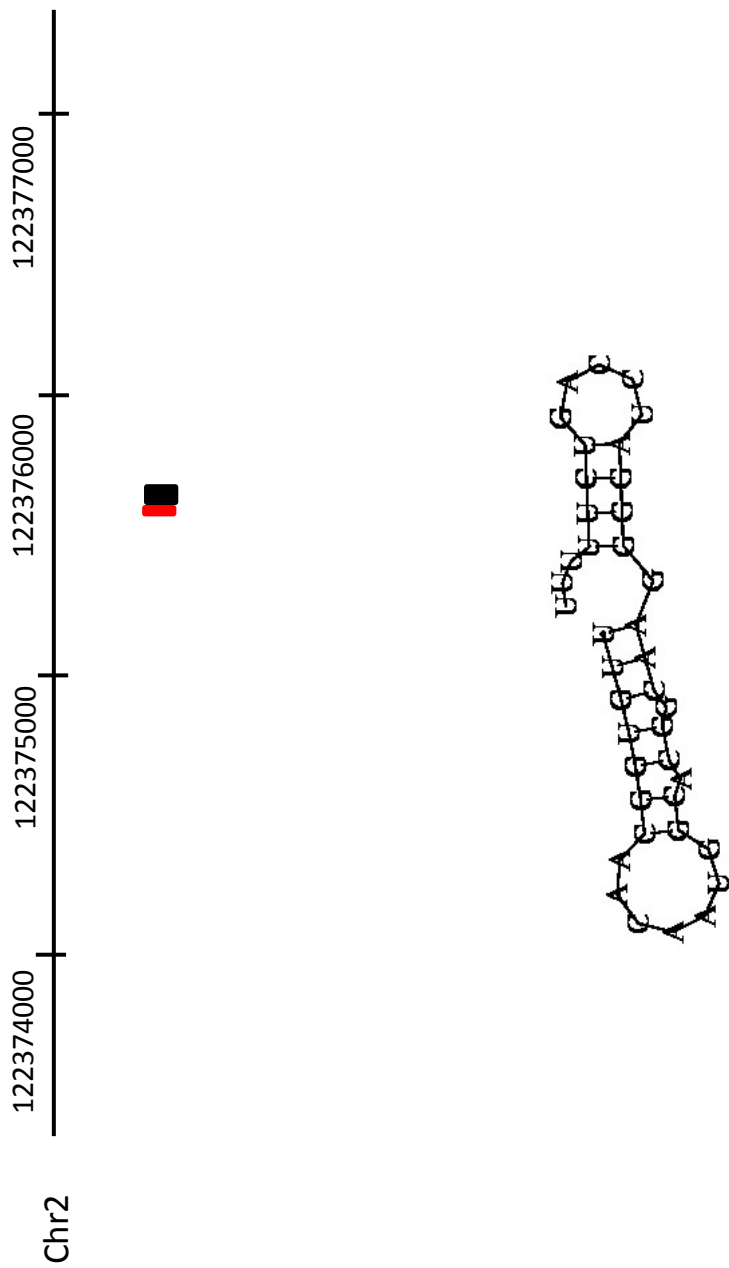


Fig. 2-6 (c) MsnR-3 ゲノム上の位置と二次構造予測
赤がサンプリングの配列が一致する領域

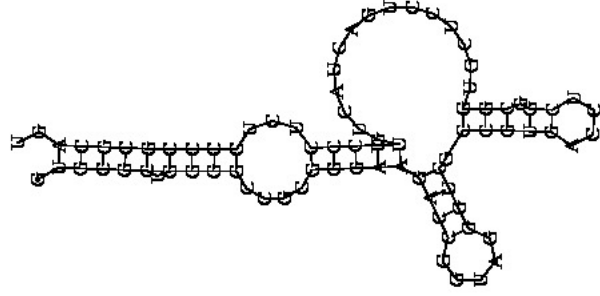
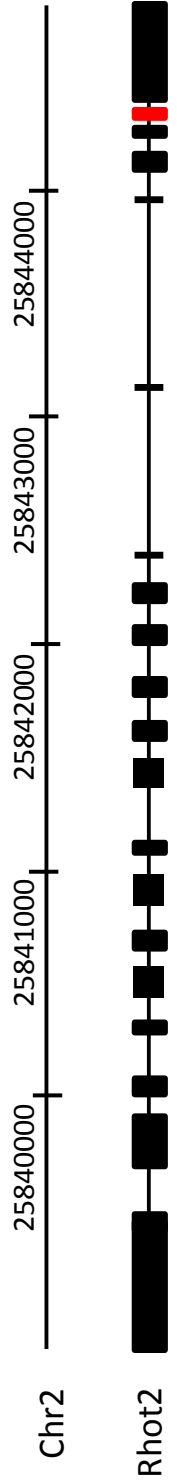


Fig. 2-6 (d) MsncR-4 ゲノム上の位置と二次構造予測
赤がサンプルの配列が一致する領域

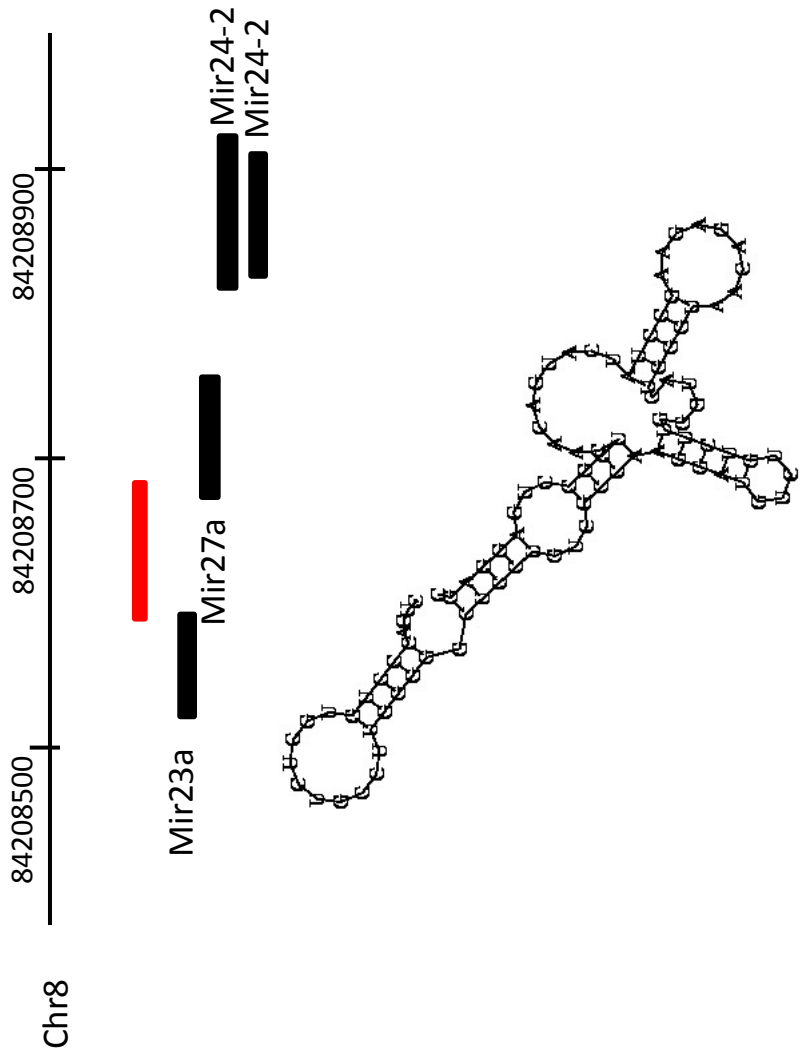


Fig. 2-6 (e) MsncR-5 ゲノム上の位置と二次構造予測
赤がサンプルの配列が一致する領域

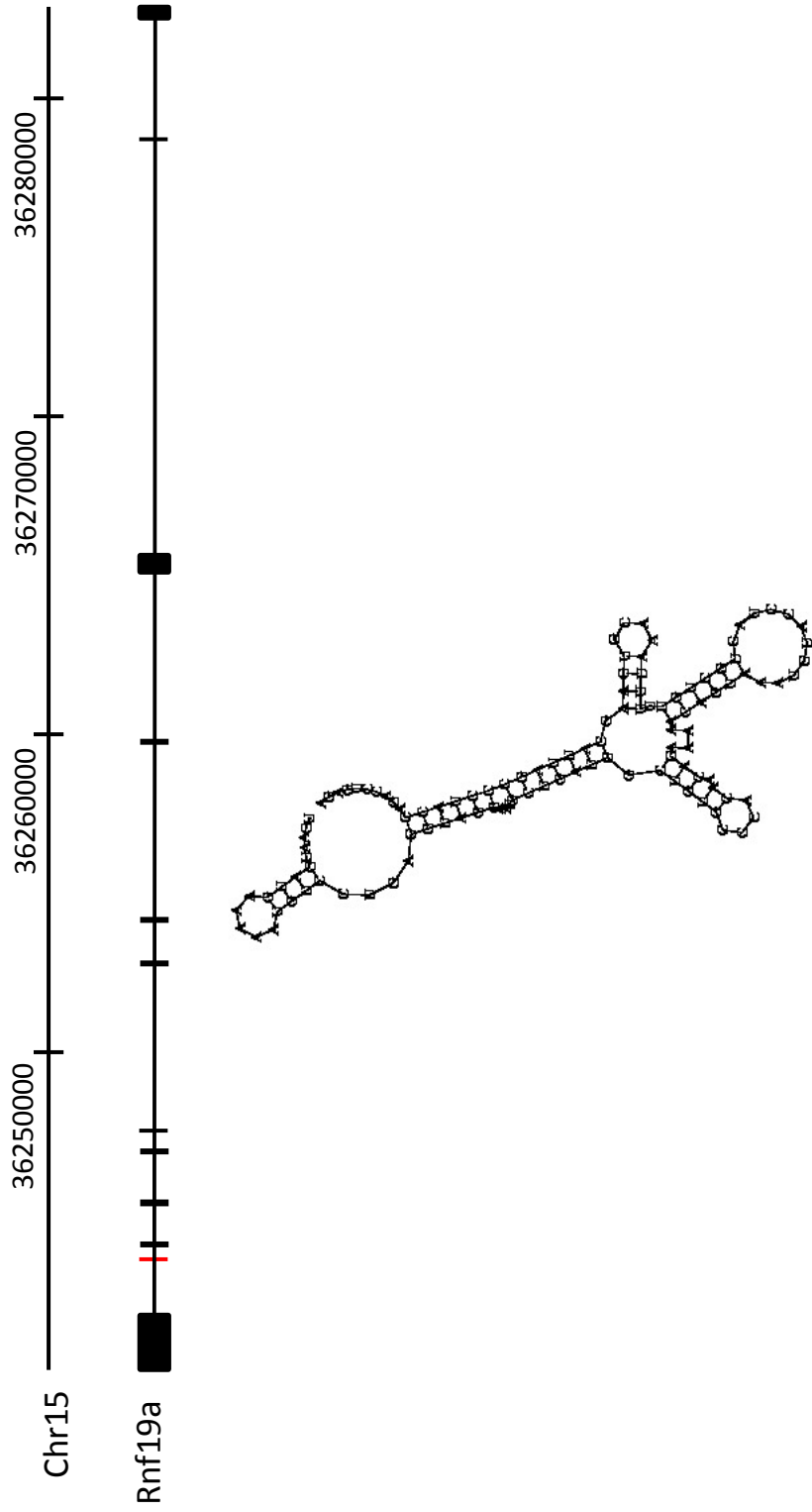


Fig. 2-6 (f) MsnR-6 ゲノム上の位置と二次構造予測
赤がサンプルの配列が一致する領域

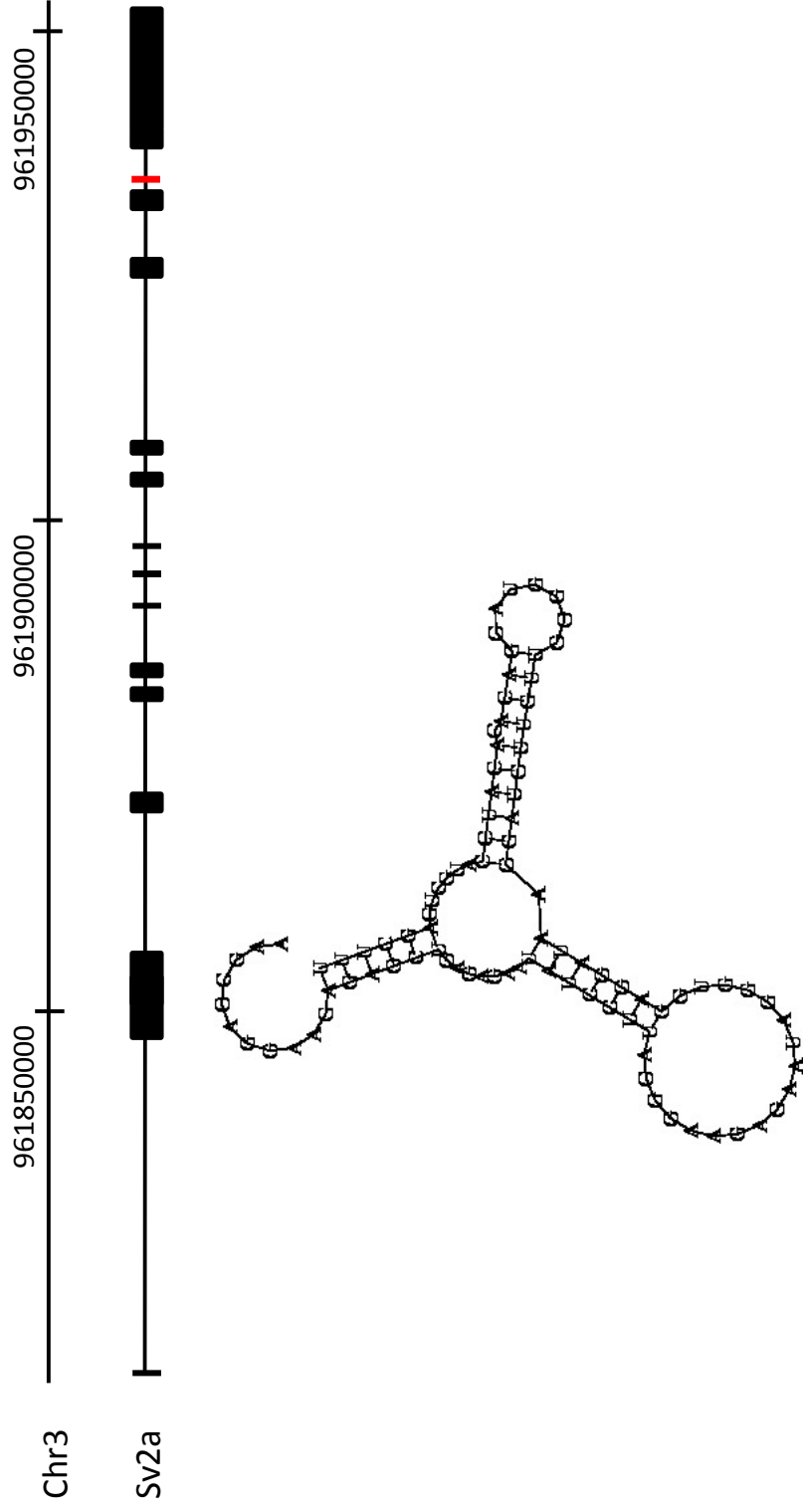


Fig. 2-6 (g) MsnR-7 ゲノム上の位置と二次構造予測
赤がサンプルの配列が一致する領域

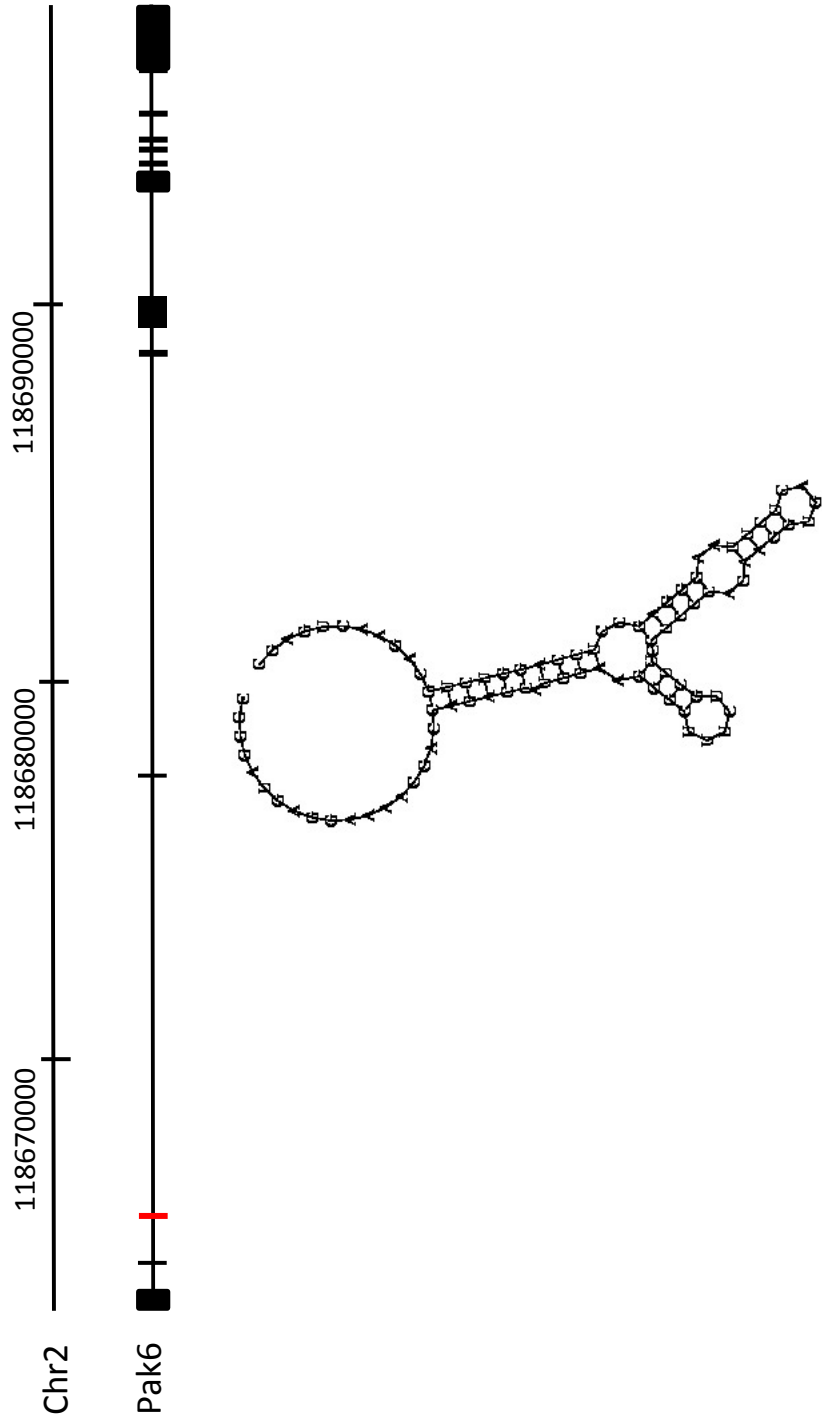


Fig. 2-6 (h) MsnR-8 ゲノム上の位置と二次構造予測
赤がサンプルの配列が一致する領域

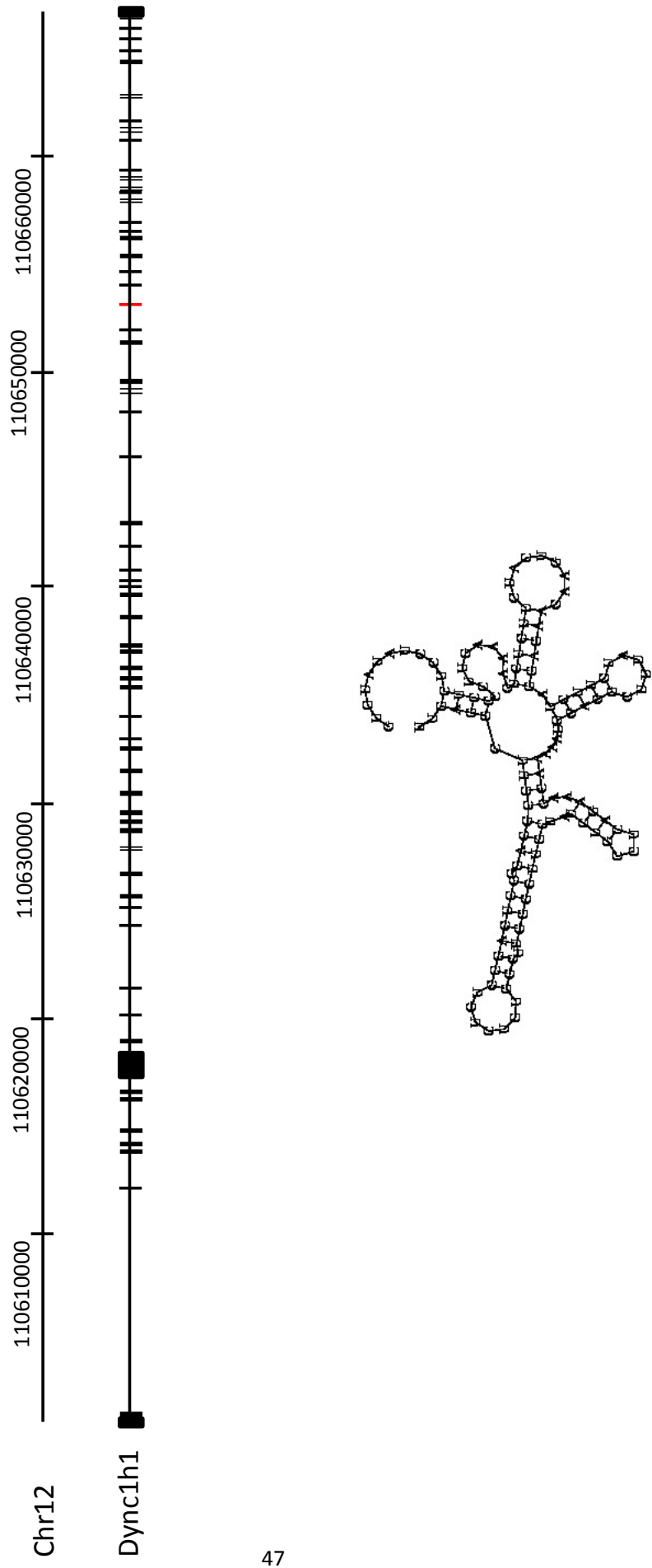


Fig. 2-6 (i) MsnR-9 ゲノム上の位置と二次構造予測
赤がサンプルの配列が一致する領域

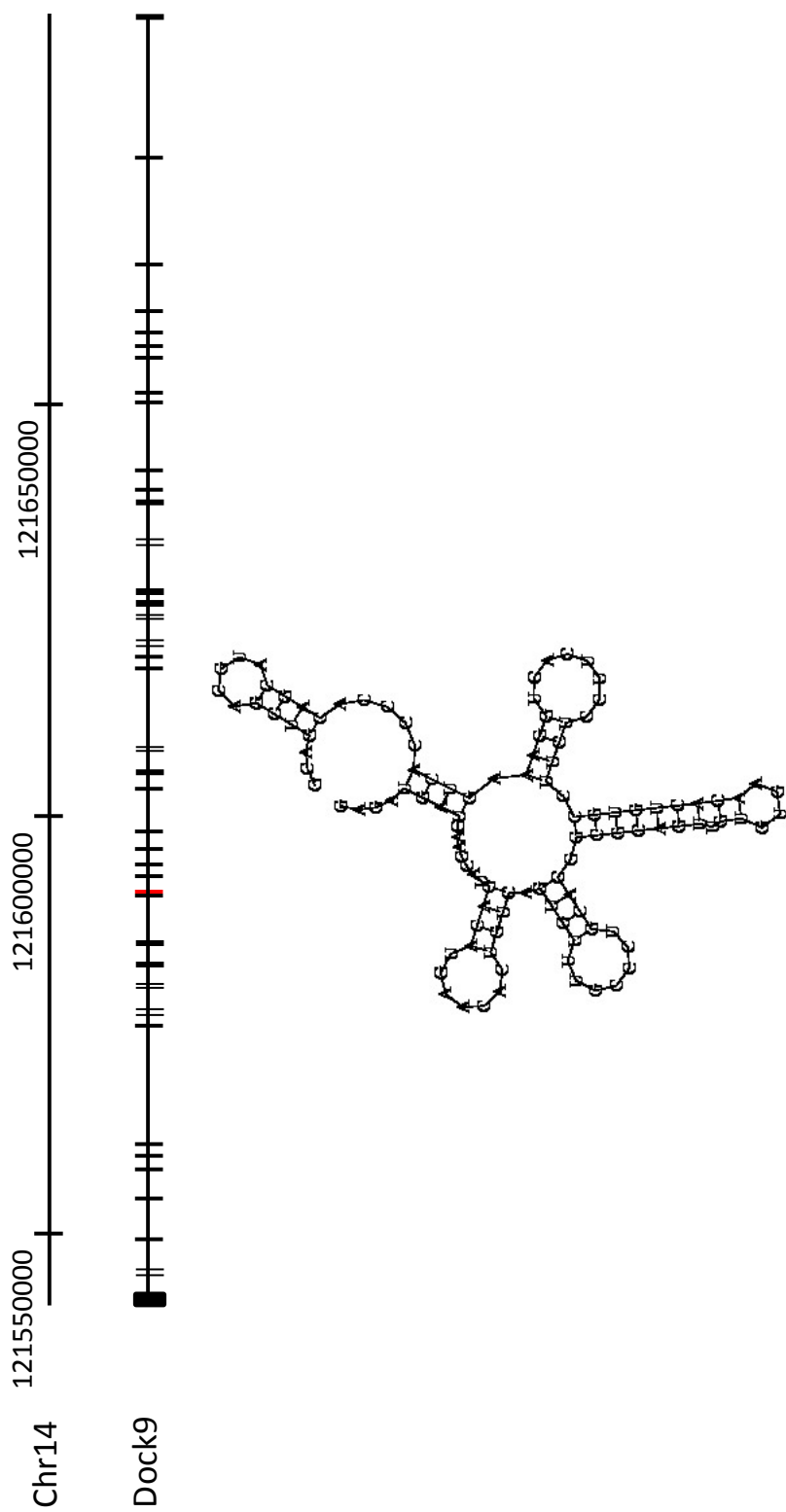


Fig. 2-6 (j) MsnR-10 ゲノム上の位置と二次構造予測
赤がサンプルの配列が一致する領域

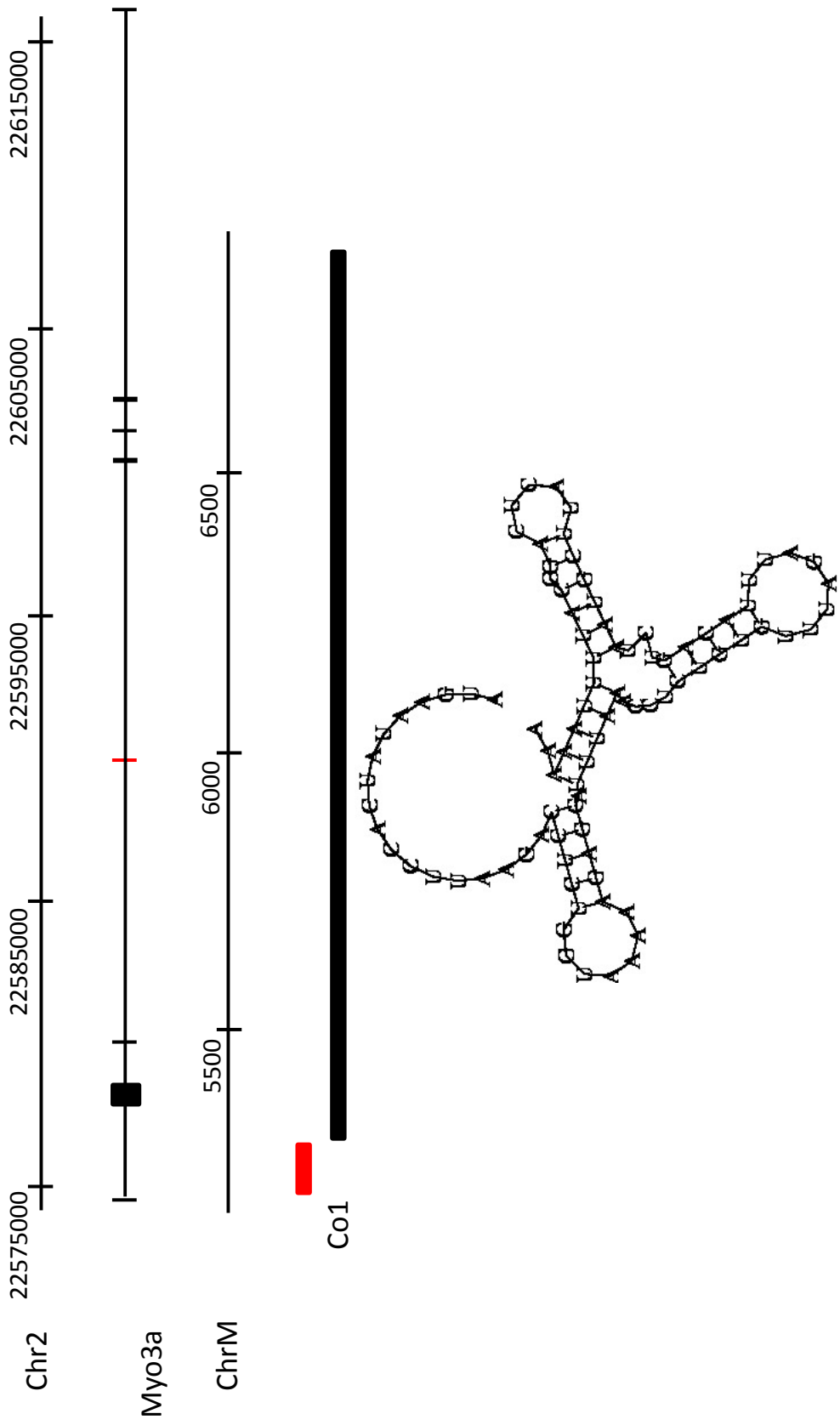


Fig. 2-6 (k) MsnR-11 ゲノム上の位置と二次構造予測
 赤がサンプルの配列が一致する領域, 2か所に一致

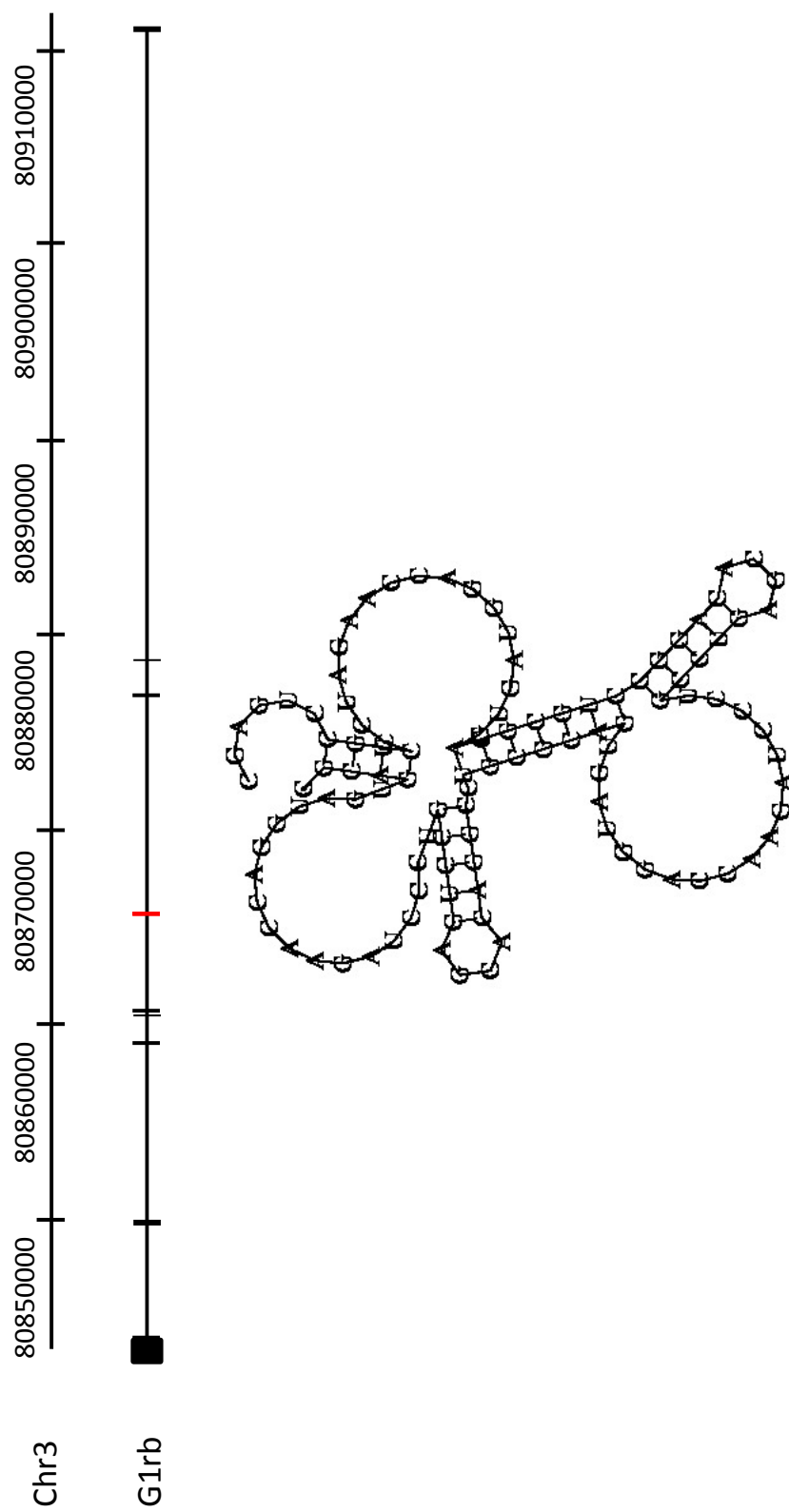


Fig. 2-6 (I) MsnR-12 ゲノム上の位置と二次構造予測

赤がサンプルの配列が一致する領域, 但しオーバーラップしながら繰り返し返しの配列が当たっていた

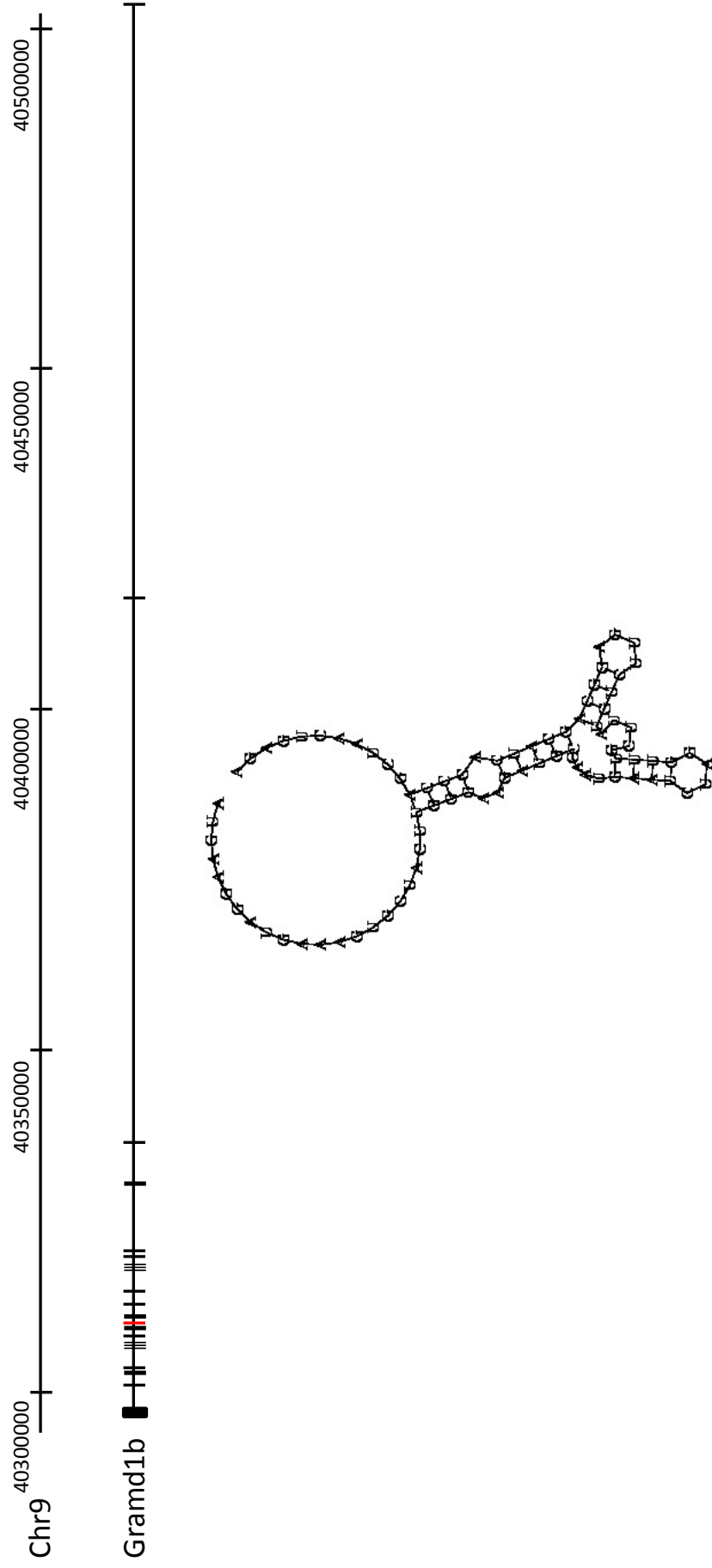


Fig. 2-6 (m) MsnR-13 ゲノム上の位置と二次構造予測
赤がサンプルの配列が一致する領域

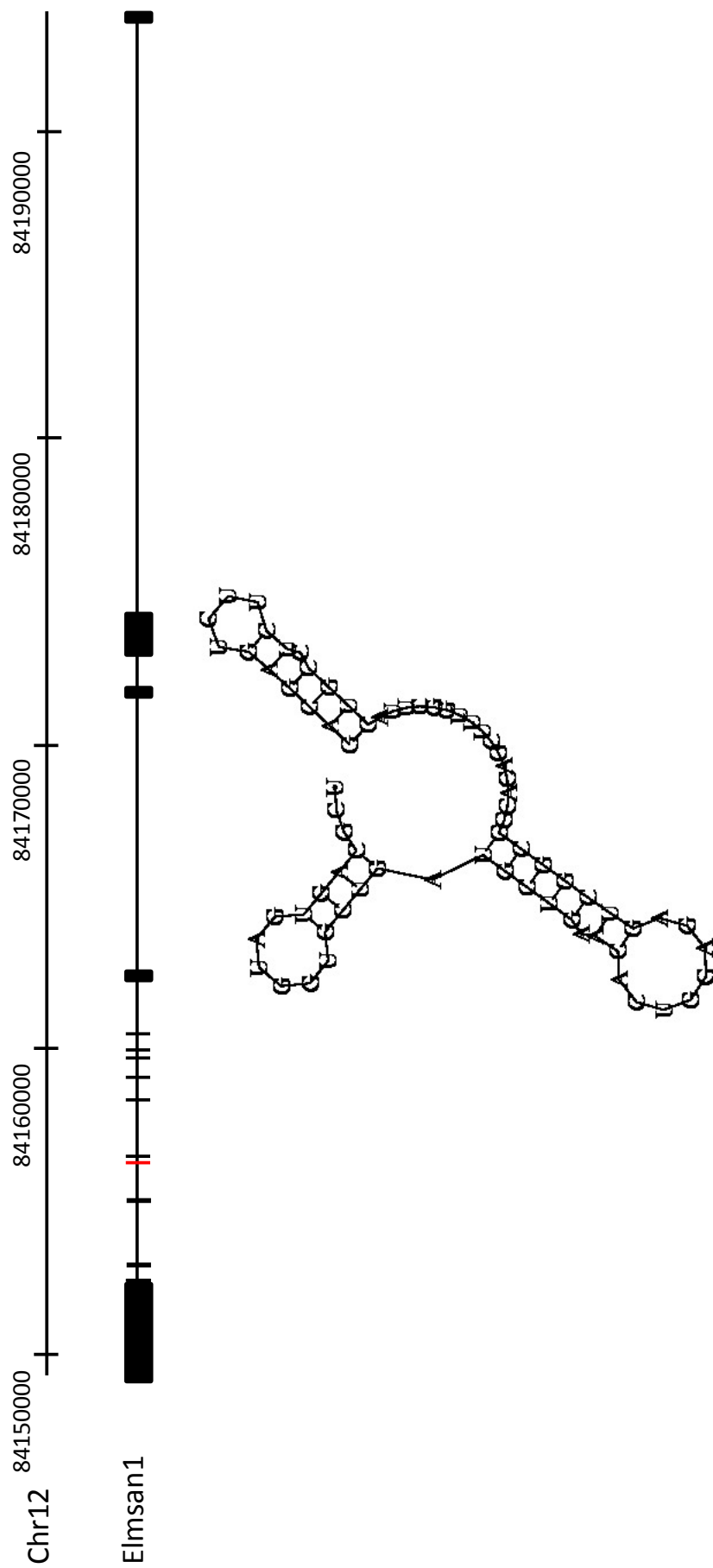


Fig. 2-6 (n) MsnrR-14 ゲノム上の位置と二次構造予測
赤がサンプルの配列が一致する領域

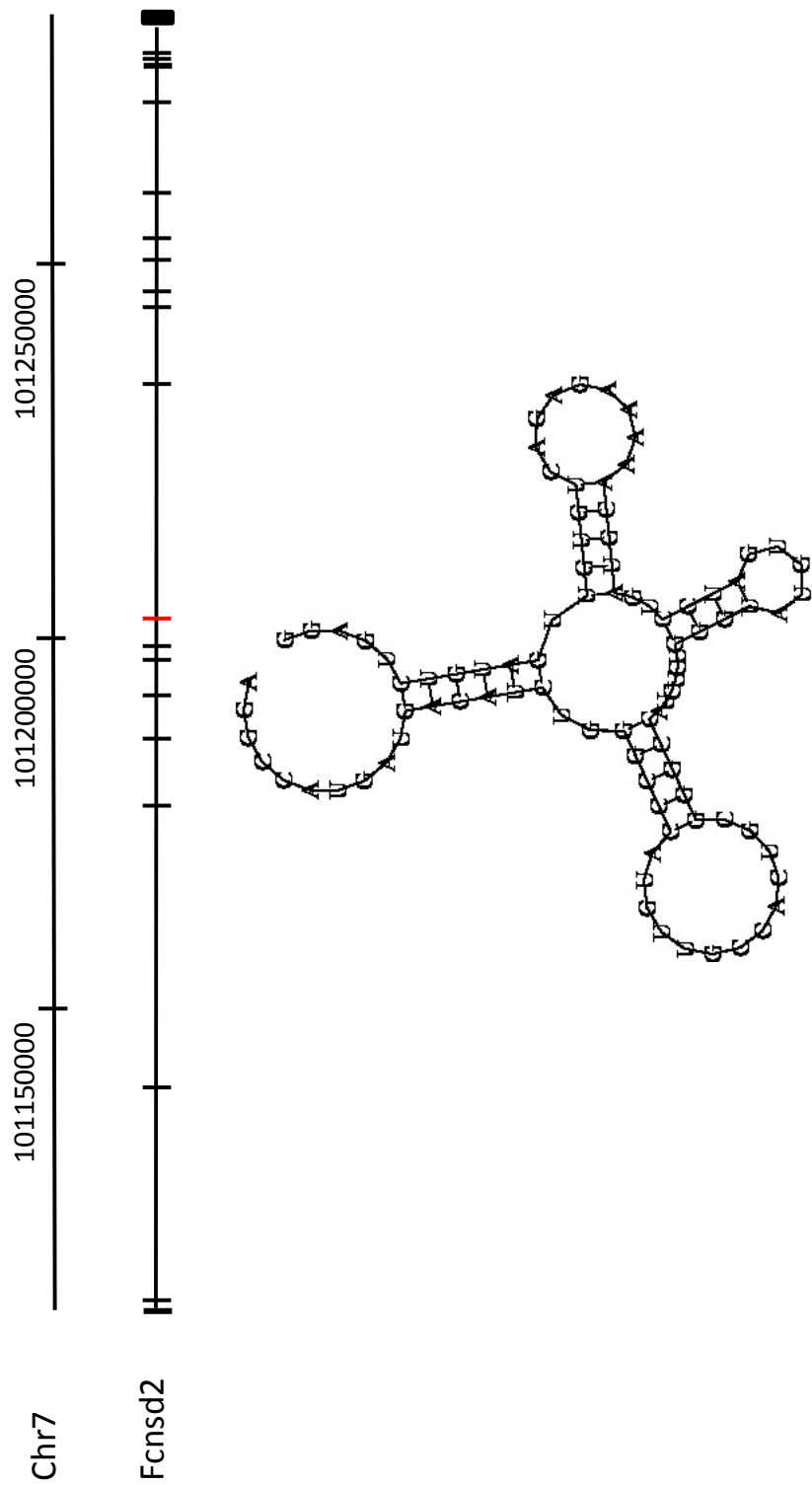


Fig. 2-6 (o) MsnR-15 ゲノム上の位置と二次構造予測
赤がサンプルの配列が一致する領域

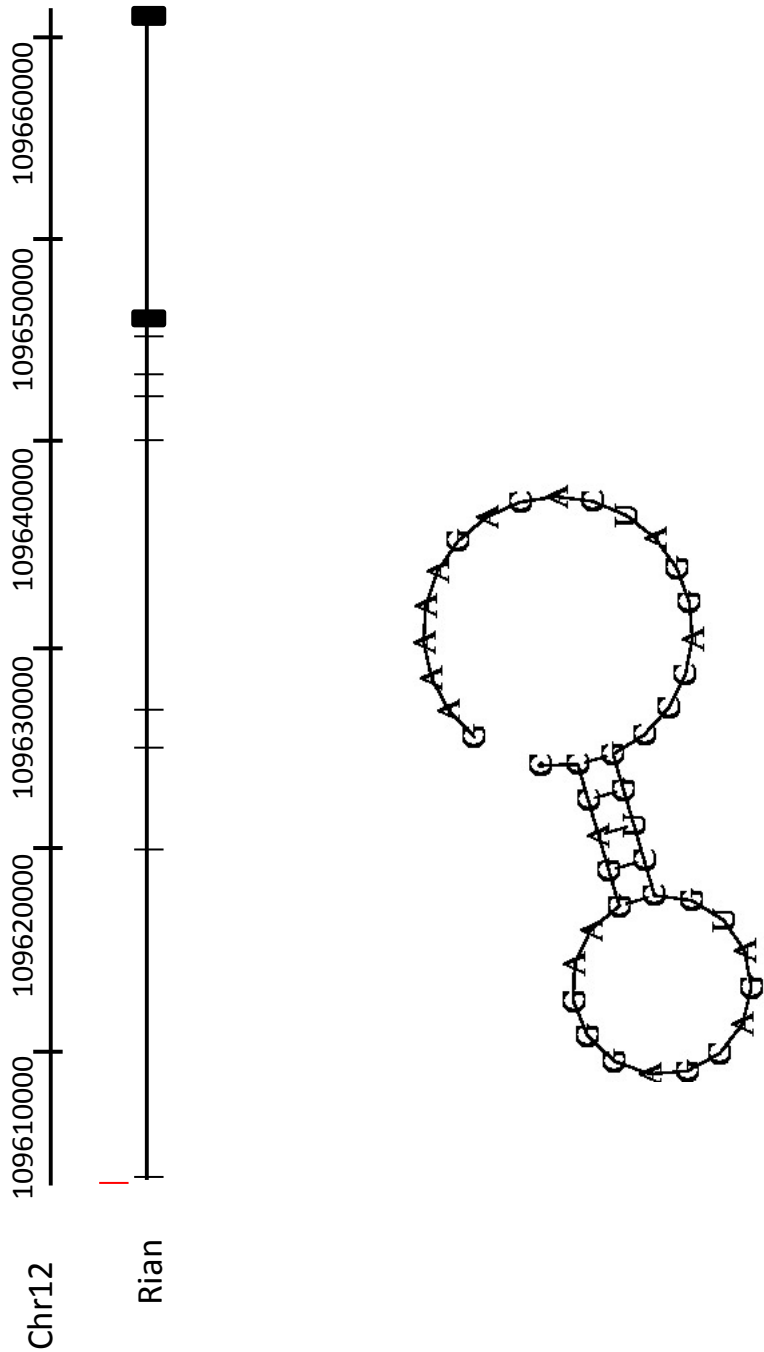


Fig. 2-6 (p) MsnR-16 ゲノム上の位置と二次構造予測
赤がサンプルの配列が一致する領域

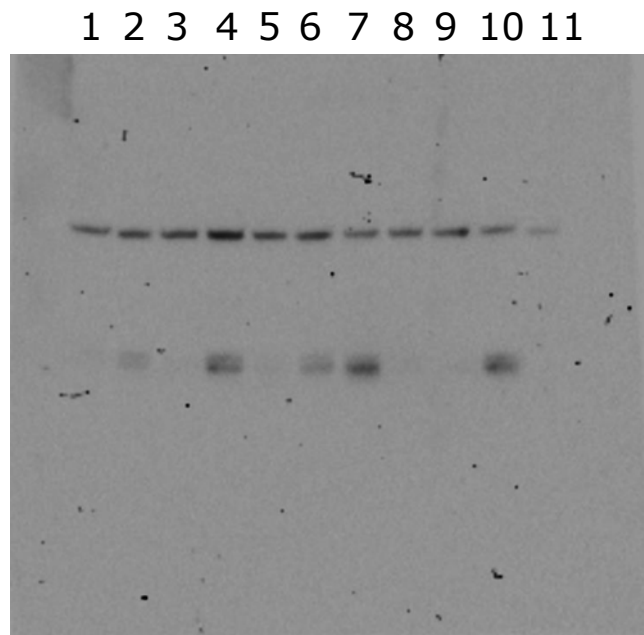


Fig. 2-7 ノーザンハイブリダイゼーションによりMsncR-4の発現確認
1, brain 2, thymus 3, heart 4, lung 5, liver 6, stomach 7, intestine 8,
kidney 9, testis 10, muscle 11, NIH3T3

a



b

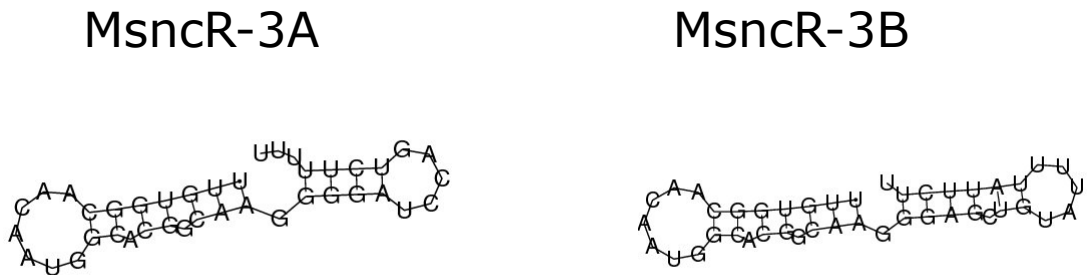
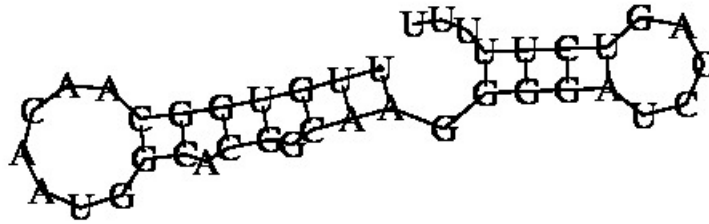
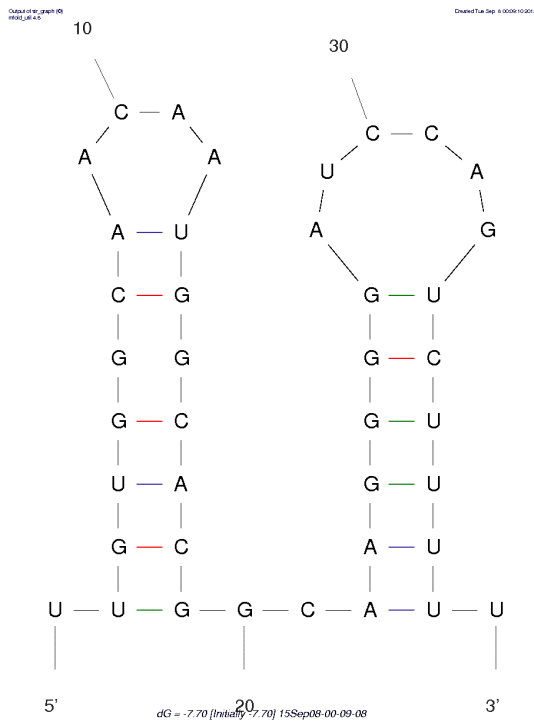


Fig. 2-8 二次構造に基づくクラスタリングに見出した例
同じ構造を形成するものは同じ機能を持つのではないかと考え、クラスタリングを行った結果、この条件を満たしたMsnrR-3
(a)ゲノム上の位置、 (b)二次構造予測

a



b



c

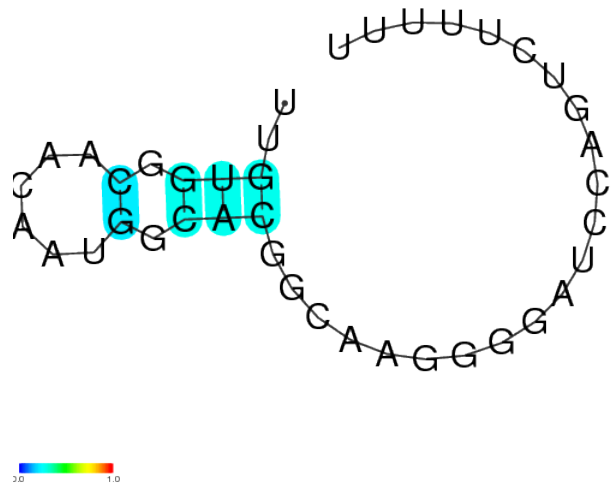


Fig. 2-9.3つの予測プログラムを使った二次構造の比較において、異なる構造を示した例

(A) MsnR-3 (a)vsfold5, (b)Mfold, (c)Centroid fold

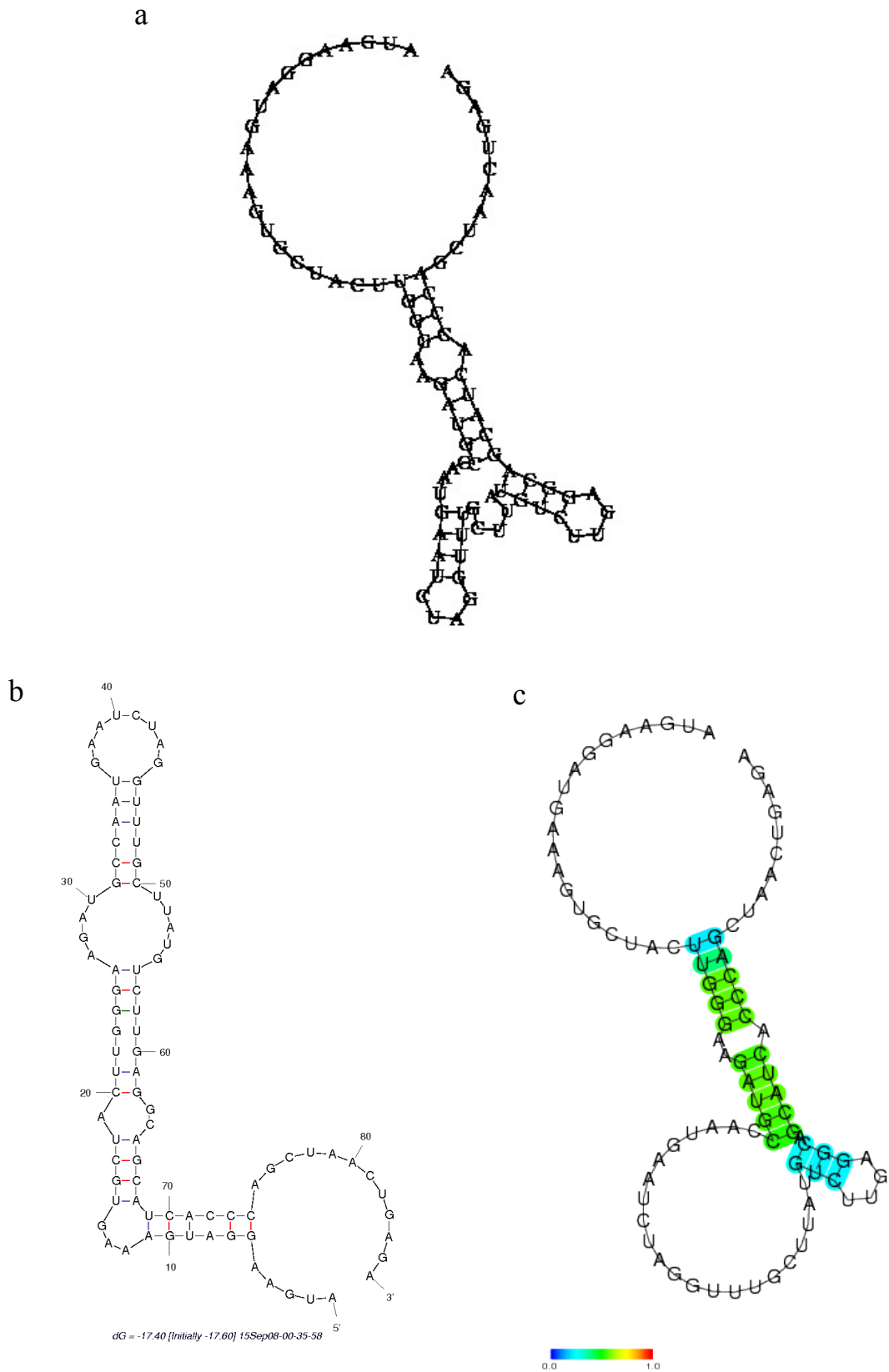


Fig. 2-9. 3つの予測プログラムを使った二次構造の比較において、異なる構造を示した例

(B) MsnR-13 (a)vsfold5, (b)Mfold, (c)Centroid fold

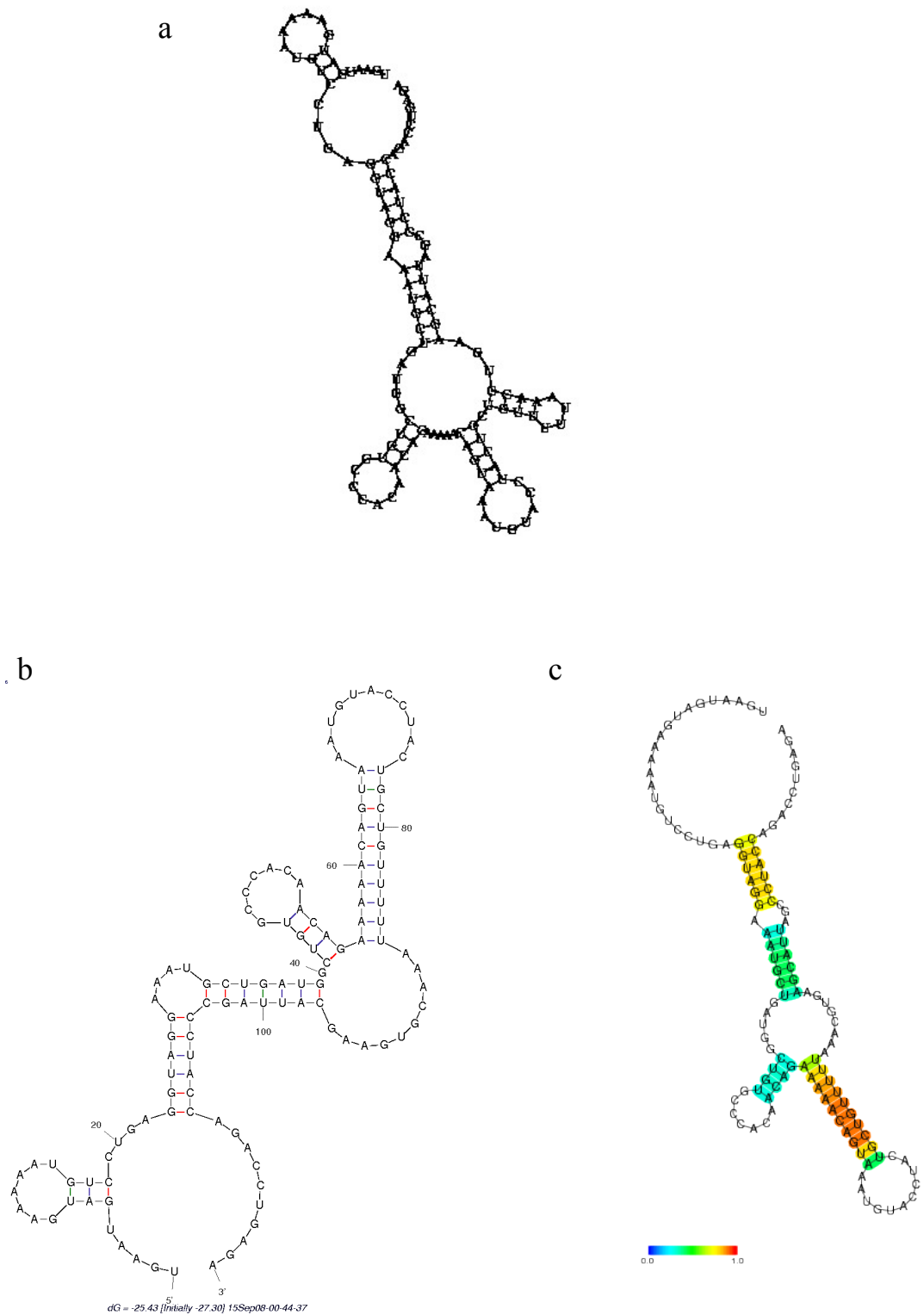
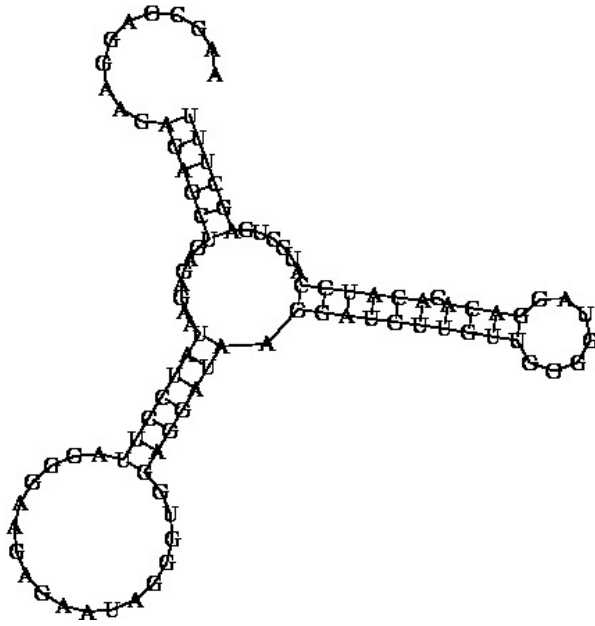
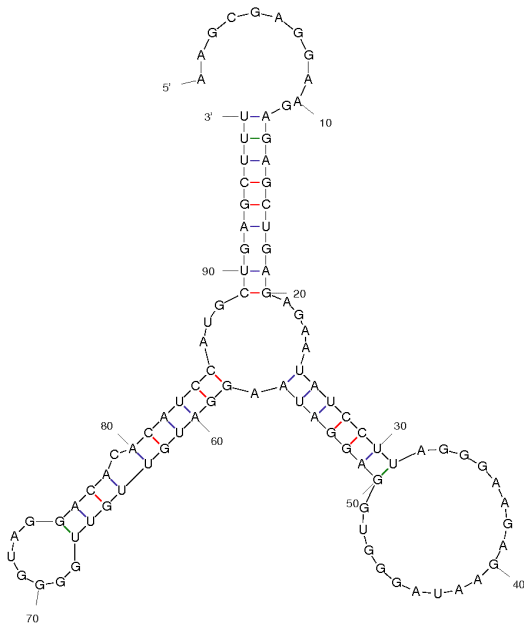


Fig. 2-10. 3つの予測プログラムを使った二次構造の比較において、良く似た構造を示した例
 (A)MsnR-6 (a)vsfold5, (b)Mfold, (c)Centroid fold

a



b



dG = -21.28 [Initially -24.10] 15Sep08-00:57:49

c

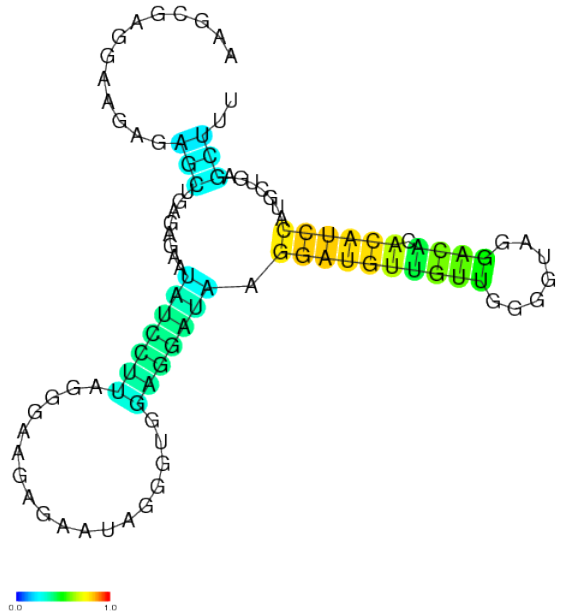


Fig. 2-10. 3つの予測プログラムを使った二次構造の比較において、良く似た構造を示した例

(B) MsnR-7 (a)vsfold5, (b)Mfold, (c)Centroid fold

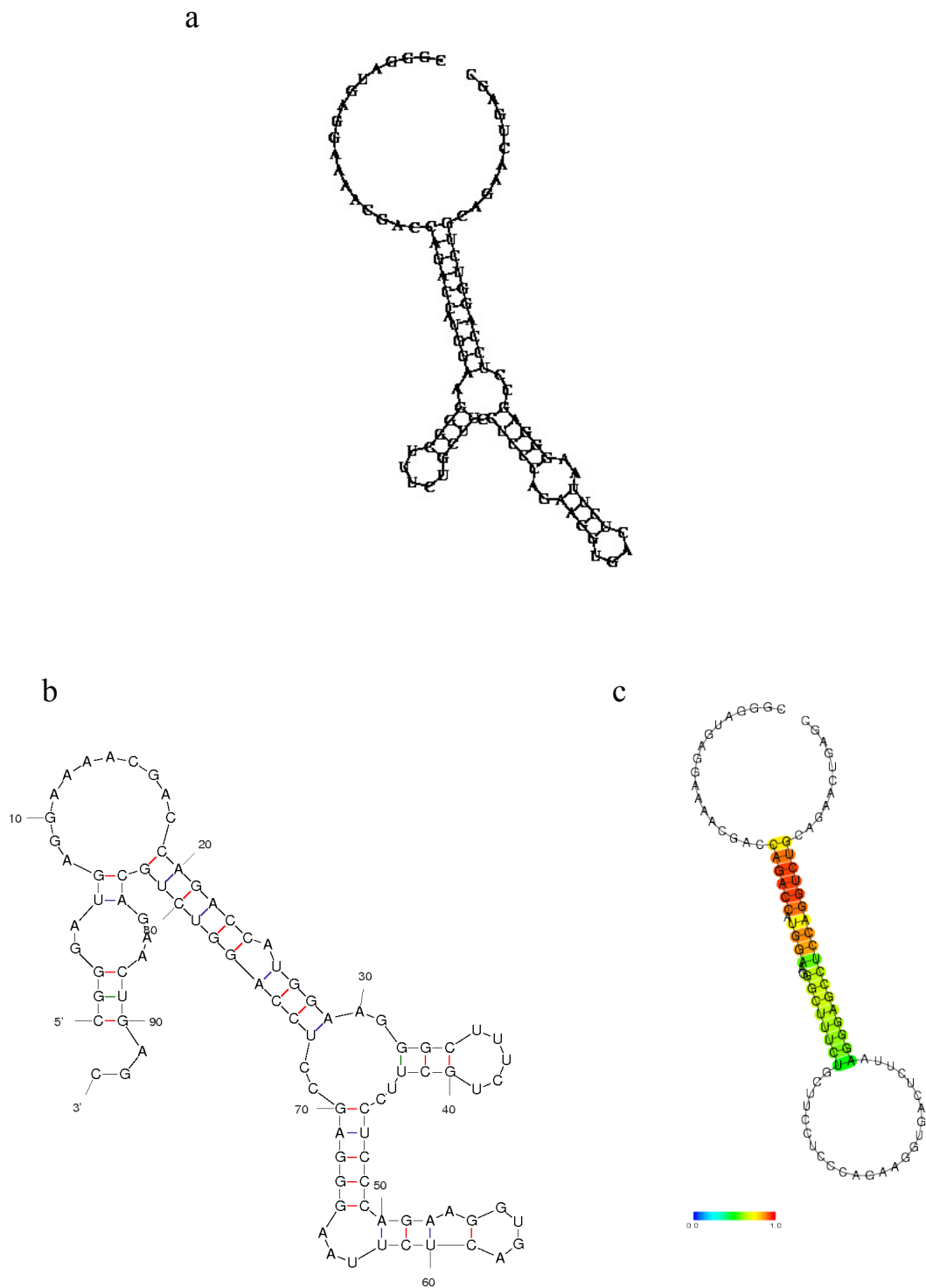


Fig. 2-10. 3つの予測プログラムを使った二次構造の比較において、良く似た構造を示した例
(C)MsncR-8 (a)vsfold5, (b)Mfold, (c)Centroid fold

第3章 RNAの構造スクリーニング手法の開発

3-1 はじめに

既往研究より、50-150 残基程度の RNA を得るため、シーケンサー解析により大量の RNA 配列を得た。第2章では、二次構造に基づく低分子 RNA の解析手法について示した。低分子 RNA は、特徴的な構造を形成し機能するものが報告されている。そのため、低分子 RNA の解析において立体構造形成は重要なカギとなる。また近年の次世代シーケンサーの技術発展により、大量の配列データが得られるようになったことから、RNA の構造スクリーニング法が開発が求められてきた。しかし、これまで立体構造のスクリーニング手法はなかった。本研究では効率的に構造解析を行うため、RNA の立体構造をスクリーニングする手法の開発に取り組んだ。

3-1-1 構造スクリーニング

様々な機能をもち沢山の分子メカニズムに関与するとして、はやくから解析が進められてきたタンパク質には、NMR 法による三次元的スクリーニングがおこなわれていた。医薬品業界ではタンパク質同士の相互作用にスクリーニングが広く使われるようになっていた。その例として1996年に Abbott 社が開発したスクリーニング Structure-Activity Relationship (SAR) by NMR という方法が開発されている[49]。低分子化合物のライブラリーからタンパク質に結合する低分子化合物をスクリーニングする方法で、タンパク質自体は ^{15}N 安定同位体標識を使用し ^1H - ^{15}N _HMQC スペクトルを測定しておく。次にスクリーニングした化合物添加時のタンパク質の化学シフト変化を観測し、タンパク質との結合領域の決定・最適化を行う。同じ様に他の結合領域も低分子化合物の探査・最適化を

行う。2つの低分子化合物同士をリンカーでつなぎ、化合物とタンパク質の複合体の構造を NMR 法または X 線結晶構造解析により決定する方法である。

国内で開発されたスクリーニングとしては、「my Presto」という医薬スクリーニングソフトがある。これは、「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術」というプロジェクトにおいて開発され、タンパク質のモデリングと化合物のドッキングシュミレーションや三次元的な複合体を計算することが出来るシステムである。この様に *vitro* におけるタンパク質のスクリーニング方法が報告・使用されている。このようにスクリーニング方法は開発されていたが、*in vitro* と *in vivo* におけるタンパク質の構造や機能が異なるのではないかという疑問は常に考えられてきた。2001年に生きた状態の大腸菌の中でタンパク質を NMR により測定したことが報告された[50]。このような方法は *in-cell* NMR と名付けられた。その後、様々な研究を経て、真核生物であるヒトの細胞を用いて、タンパク質の NMR スペクトルが観測されている[51]。実際に *in-cell* NMR の方法を使い、安定同位体標識を行ったタンパク質を生きた細胞内に入れ、多次元 NMR を使用して測定し、細胞の中でタンパク質の立体構造が解析されている[52]。その結果、安定に構造を組む領域では、*in vitro* も *in vivo* でも同じ構造をとっていたが、ループのような構造がしっかり固まっていない領域では、異なる場合もある、ということが報告されている。この様にタンパク質をスクリーニングする方法は大きく発展してきている。

RNA は、タンパク質と同様に生体内で様々な現象に関与しており RNA の構造を知ることは、重要である。これまでの核酸の構造のスクリーニングには、データベース上の配列・二次構造の予測、相同性のある核酸のモデル、酵素を使った核酸を切断する方法などが用いられていた。特に二次構造予測は核酸のエネルギーを計算し予測する方法で、配列があれば手軽に行うことができる手法

であり、パラメータを変えることで様々な条件の構造を予測できる。そのため、古くから開発が続いており Mfold や Centroid fold, 当研究室で開発された vsfold [53] など様々な予測ソフトが web 上に公開され誰でも自由に使うことができる。しかし、二次構造予測は非常に便利であるが、あくまでも配列から計算予測されているため、実際の RNA の構造とあっているのか分からない。

これまで RNA にはタンパク質の様なスクリーニング方法は存在していないが、三次元的な構造解析を行った例がある。transfer-messenger RNA の内一つに PK1 という領域がある。この領域は三次元的な構造である pseudoknot を形成することが知られており、機能として trans-translation に重要であることが報告されていた。そこで、この PK1 領域のみを取り出し、pseudoknot 構造を壊す様な変異を入れることで tmRNA の活性との関係を NMR 法により解析していた。PK1 は Mg^{2+} 存在下において pseudoknot 構造を形成することが分かり、pseudoknot を壊す様な変異を加えることで tmRNA の活性が落ちることが分かった。また pseudoknot 構造を保持したまま、2つのステムを結ぶループ部分を欠損させた場合では、trans-translation 活性が下がることから、ループの配列が機能に重要であることを示している[15].

3-2 方法

3-2-1 試料の調製

鋳型 DNA には、主に INTT の手法の開発に使用した PK1, LINE17, DIS39, 3種類の RNA と異なる長さのサンプルを使用するという目的で、第4章で作製した MsncR-11-T, MsncR-11-I.IV-A58 その他に MsncR-11-G を用いた。使用する鋳型 DNA 配列に T7 プロモーターの相補配列と転写効率を上げるための配列

(GG)を付加した鋳型 DNA を北海道システムサイエンス株式会社に注文した (Table 3-1). また, それぞれの RNA の二次構造を Fig.3-1 に示した.

鋳型 DNA と T7 プロモーターのセンス鎖をそれぞれ 10 μ M に調製し, 等量で混ぜ 368 K で 5 分間アニーリングを行い室温まで除冷した. 冷めた DNA 溶液の中に, Ampliscribe T7-Scribe™ Standad RNA IVT Kit (Epicentre Biotechnologies 社) を使用し, 転写反応液 (10 \times 転写緩衝液, NTP, DTT, Polymerase, RNase free water, D₂O) を加え (Table 3-2), 対照式 NMR 試料管 (株式会社シゲミ) に入れた. 反応液を入れた試料管を NMR 分光計 XWIN DRX600 および AVANCE DRX-600 (Bruker 社) において, 298 K または 303 K で測定を行った (Fig. 3-2). PK1, MsncR-11-G, MsncR-11-T, MsncR-11-I.IV-A58 の鋳型を使用し, 上記と同じ方法でアニーリングを行った. 転写反応液には転写用緩衝液 A の 10 \times 緩衝液 (Table 3-3), NTPs, DTT, 太陽日酸社製 RNA Polymerase を使用した. 組成は Table 3-2 に合わせて調製した. PK1 は対称式試料管に入れ測定した. MsncR-11-T, MsncR-11-G は 310 K, 2 時間インキュベート後, 転写反応液をノーマル NMR 試料管に入れ測定を行った. MsncR-11-I.IV-A58 は転写反応液をノーマル NMR 試料管に入れ, 室温で 24 時間放置した後, 測定を行った. 測定に使用したパルスシーケンスは付録に記した.

3-3 結果

3-3-1 試験管内での時間依存的な転写反応の観察

(i) RNA polymerase が入っていない状態の転写反応液の 1D スペクトルを測定した. RNA が塩基対を形成した時にシグナルが観測されるイミノプロトン領域である 15~10 ppm の領域にシグナルがないことと, NTP シグナルが観測される

9~5 ppm の領域にシグナルが有ることを確認した (Fig. 3-3). 鋳型の DNA とプロモーターにより塩基対は形成しているが, NTP が 5 mM に対し鋳型 DNA は 1 μ M と非常に少ない量であるため確認出来なかったと考える. 次に, PK1 RNA の鋳型が入った転写反応液に RNA polymerase を添加し 303 K で 1D_jump and return (1D_JR) (Fig. 3-4a) と 1D_3-9-19 (Fig. 3-4b) の測定を行った(table 3-4). RNA polymerase を加える前 (Fig. 3-4 N) から 20 時間まで 2 時間各のスペクトルを測定した. 転写に使用した Kit の推奨する転写反応条件は 310 K, 2 時間であるが RNA が作られていく様子を観測するため本測定では 7 K 温度を下げ測定を行った. イミノプロトン領域では, RNA が AU 塩基対と GC 塩基対を形成すると 1 塩基対につき 1 つのシグナル, GU 塩基対では 1 塩基対に 2 つにシグナルが観測される. Fig. 3-4a では, 時間経過ごとに塩基対形成のシグナルが増えていくことを観測した. Fig. 3-4b の NTP のシグナルが見える領域では, 8.4 ppm~7.8 ppm にアデニンの H8 と H2, グアニンの H8, ウリジンとシトシンの H6 が観測され, 5.8~6.1 ppm のシグナルは各塩基の H1' のシグナルが観測されている. RNA の塩基対形成のシグナルの増加に比例し NTP のシグナルが時間経過ごとに減少していくことを観測した. このイミノプロトンシグナルの増加と NTP シグナルの減少の強度変化を Fig. 3-5 に示した. その結果, 転写開始後 4 時間後までの間に急速に転写反応が進みそれ以降も, 緩やかに反応が続いていた. NTP の消費に伴い RNA の塩基対が形成されていることから, NMR 試料管に入れた転写反応液の中で RNA の転写合成が進行していることが分かった.

(ii) INTT により転写を行った PK1 と精製された PK1 のシグナルの比較を行った. INTT では反応液に酵素を加えてから 48 時間後まで, 298 K, 1D_JR の測定を行い (Fig. 3-6a, Table3-5), 反応終了後 2D_NOESY の測定を行った (Fig. 3-6b, Table3-6). Fig. 3-6a において, 精製した PK1 のスペクトル[15]と INTT の結果を

比較したところ、精製した PK1 のシグナルと INTT のシグナルが部分的に一致していた。また、PK1 RNA は Mg^{2+} 存在下で pseudoknot という三次構造を形成することが知られており、11.4 ppm と 11.2 ppm の 2 つのシグナルは pseudoknot を形成した際、観測される GU 塩基対の特徴的なシグナルが観測された。INTT 法を用いた転写でも、同位置にシャープなシグナルが観測された。48 時間後では、12 時間後のシグナルに比べシグナルが弱くなっているが同位置に確認できた。転写反応液中には少なくとも 5 mM の Mg^{2+} が含まれていることから、転写で RNA が生産されると同時に RNA と Mg^{2+} が作用し pseudoknot 構造を形成したと考える。

(iii) Fig. 3-6b では、2D_NOESY スペクトルの内、塩基対形成時のアミノプロトン領域を示している。精製した PK1 のシグナルは全体的に僅かに下方方向にシフトしているが、シグナルの観測される位置が一致していたことから、INTT 法による転写では精製した PK1 と同じ二次構造を形成していることが分かった。1D のイミノプロトンシグナルよりも 2D のスペクトルが従来法の PK1 のシグナルと一致していた理由としては、2D に展開したことでシャープなシグナルはよりはっきりと観測されたためと考えられる。Fig. 3-6a の 48 時間後のシグナルでは、ベースラインが隆起しており、シグナルもブロードになっていた。これは、タンパク質、Triton-X や PEG などベースラインを歪ませてしまう物質が転写反応液には含まれていることがまず挙げられる。他の原因としては、転写反応においてできた短い RNA や RNA の断片同士が結合することによる塩基対形成のシグナルの出現、複数のフォールディングの RNA の出現が考えられる。また、ここで使用した PK1 RNA では Mg^{2+} の有無によって構造が変わることが知られていることから Mg^{2+} が枯渇したことで正しくフォールディング出来なかった RNA があることから、ベースラインが歪んでしまったと考える。

3-3-2 スクリーニング条件の検討

(i) 構造スクリーニングのコスト削減を目的に，Kit を使わない条件での転写反応液を使用した方法と長い RNA が INTT 法でも構造形成を観測出来るのかを確かめるため，長さの異なる RNA を使用しスクリーニングを行なうことにした．サンプルは MsncR-11-G，MsncR-11-T の鋳型を使用した．反応液には，Ampliscib T7 Kit の 10×転写緩衝液から緩衝液 A (Table 3-3) に代え，NTP，DTT も研究室で調整したものを使用した．この測定では，実際にスクリーニングとして使うことを想定し，0.5 ml チューブで 37 °C，2 時間転写反応を進行させ，反応後 NMR 試料管（ノーマル試料管）に移し，測定を行った (Fig. 3-7)．MsncR-11-G (96 nt) はどのシグナルも非常にブロードであった．これは，転写効率が Kit より悪いことが原因と考えられた．また，RNA の残基数が長いことで，シグナル同士が重なり，シグナルがブロードに見えている可能性が高い．11.5 ~ 10.4 ppm のあたりにブロードなシグナルを観測した．MsncR-11-T (68 nt) でも INTT 法による測定を行った (Fig. 3-8)．Fig. 3-8 の d は，2 時間の転写反応後すぐに測定を行った．精製したスペクトル (Fig. 3-8 赤線) と比較して，14 ~ 12 ppm に似たシグナルが出ていることが観測出来た．12 ~ 11 ppm の間のスペクトルはあまり似ていなかった．Fig. 3-8 c は，Fig. 3-8d を測定してから 2 日後に再度同じ条件で測定を行った．2 つのシグナルを比較すると，14 ~ 12 ppm のシグナルの分離が悪くなり 11.5 ~ 10 ppm の領域では，MsncR-11-G と同様にブロードな高いシグナルを観測した．Fig. 3-8b は，緩衝液 A が観測するシグナルに影響を与えているかを観察するため，緩衝液 A に精製した MsncR-11-T を最終濃度 3 O.D.U になるように加え，測定を行った．精製したものと同一波形を示すはずであったが，

全く異なるスペクトルを得た。加えた RNA の濃度が薄いため、本来見えるはずのシグナルが見えなかったという理由も考えられる。12.4 ppm 付近には緩衝液 A を使用した測定では共通してシグナルが見えたことから、緩衝液に含まれる成分が原因であると考えられる。

緩衝液 A を INTT 法に使用することの問題があるのかを確認するため、既に INTT 法で観測したスペクトルと精製したスペクトルが一致していた PK1 を使用し、測定を行った (Fig. 3-9, Table3-7) [79, 80]。Kit を用いた場合 (Fig. 3-9b) と緩衝液 A を用いた場合 (Fig. 3-9c) のスペクトル比較したところ、14 ~12 ppm のシグナルが集まっているところは似ていたが、Fig. 3-9c, 11.5 ~10.5 ppm の領域のシグナルは Fig. 3-9a と b とも異なっていた。転写反応液中の環境により RNA のフォールディングに影響が出ている可能性が高いと考える。

(ii) 緩衝液 A および大腸菌酸酵素を使用し、転写反応後精製し帰属を行った MsncR-11-I.IV-A58 の鋳型を使用し、INTT 法で測定を行った。NMR 試料管に転写反応液を加え、室温で 24 時間反応させた後測定を行った (Fig. 3-10)。試料管の中で転写反応を進めることで、外気と触れる面積が減り効率が良くなる可能性があること、Fig. 3-11 で非常に長い時間転写反応が続いていたこと、と Fig. 3-8c と d のシグナルが変化していたことなどを考慮し、Fig. 3-10c では室温で 24 時間転写反応を行った後、測定を行った。Fig. 3-10a と c を比較したところ、Fig. 3-10c のシグナルは分離が悪いが、13.8 ~12.2 ppm の領域では似た位置にシグナルが観測された。Fig. 3-13b, Fig. 3-7 でも観測された 11.5 ~10 ppm の間にブロードで大きな山が観測されている。転写反応自体は進んでいても、均一にフォールディング出来ていない可能性がある。Fig. 3-10b は、緩衝液 A に NTP と精製した MsncR-11-I.IV-A58 が 3 O.D.U になるようにを加えたものである。ベースラインが 10.5 ppm で異様に下がり、スペクトル全体として水平にあわせられなか

った。Fig. 3-10a のスペクトルと比較したところ、13.8 ppm~12.2 ppm の領域でシグナルの位置が一致していた。MsncR-11-T では同じ 3 O.D.U になるように加えても、RNA のシグナルを観測できなかったのは、MsncR-11-I.IV-A58 と比べ倍以上の長さを持っていたこと、長いヘアピン構造の MsncR-11-I.IV-A58 の方が、構造が安定だったことが理由であると考えた。MsncR-11-T の Fig. 3-8c と d の測定を行う前には一度ボルテックスにより転写を止めたが、スペクトルは変化した。ボルテックスだけでは、実際には転写反応を完全には止められていないと考える。

本測定に使用した緩衝液はまだ検討する必要がある。また、フォールディング出来ていないと考えられる山を少しでも減らし、RNA が均一のフォールディングしやすい緩衝液に近づけることができれば、スクリーニングの効果が各段に上がると考える。

3-3-3 安定同位体標識を使用したスクリーニング

より多くの構造情報を得るため、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した NTP を使用し、INTT スクリーニングを行った。本測定では 289 K, Fig. 3-5 より 4 時間後までの急激な変化後以降も RNA が転写されていることから 48 時間以上観測を行った。RNA の形成を確認するため、1D_JR (Fig. 3-11) と形成された塩基対を確認するため 2D_ ^1H - ^{15}N _HMQC (Fig. 3-12) を測定した。イミノプロトン領域では Polymerase が添加されてから、10 時間程度まで、シグナルが増加していたが、それ以降 12.5~13.2 ppm のシグナル自体は大きくなっているものの、分離が悪くなっており、14.5 ppm と 11.4 ppm と 11.2 ppm のシグナルは時間経過とともに減少し 72 時間後には完全に消失した。HMQC スペクトルでも、 ^{15}N 側の 165~160 ppm と 150~145 ppm にシグナルが集まっており、Fig. 3-12a, c スペクトルでは、観測された

位置は良く似ており， pseudoknot 形成を示す 11.4 ppm と 11.2 ppm のシグナルが観測されていた。しかし， Fig. 3-12b では 11.9 ~ 13.5 ppm のシグナルが増えており分離しておらず， pseudoknot の形成を示すシグナルは消失していた。また 165 ~ 160 ppm のシグナルの分離が悪くなっており， 150 ~ 145 ppm の位置のシグナルは精製したシグナルとは異なっていた。これらのことから， 転写反応開始後生産された RNA にマグネシウムが作用し， 精製したサンプルと同じく pseudoknot を形成したシグナルを観測出来ていた。 Fig. 3-6a でマグネシウムが枯渇し， pseudoknot 構造を形成出来ない RNA の割合が pseudoknot を形成する RNA を超えてしまったことで， シグナルの波形や分布が変わってしまったと考える。また， 反応終了後の反応液に， Mg^{2+} を 1 mM 添加し， 測定を行った (Fig. 3-11 Mg^{2+} 1 mM)。しかし， pseudoknot の形成を示すシグナルは観測出来なかった。精製した PK1 の場合， 0.5 μ M PK1 に対して， 0.5 mM Mg^{2+} 添加においてスペクトルのドラステックな変化が見られている。このことから， 一度フォールディングした RNA の構造は反応液に Mg^{2+} 添加しただけでは変化しづらいと考えられる。反応終了後の試料管を確認したところ， アグリゲートした酵素が白色の沈殿となって沈んでいた。アグリゲートしたタンパクなどと結合してしまうことで PK1 RNA は， Mg^{2+} を添加しても Mg^{2+} と結合できず構造変化出来なかったのではないかと考えた。

3-3-4 長さの異なる RNA を用いたスクリーニング

すでに構造が決まっている PK1 以外のサンプルとして， LINE17 (17 nt) と DIS39 (39 nt) の 2 つのサンプルを使用した。

(i) Fig. 3-6a と同様に 298 K， 反応液に酵素を加え 48 時間測定を行った。それぞれ， 以前に精製し測定されたサンプルと比較した。LINE17 RNA はヘアピンループ構造を形成し， 6 つの塩基対を形成することが知られており (Fig. 3-1b)， 精製

した RNA シグナルでは 12 ~13 ppm に小さなシグナルが集まっており，13.1 ~14 ppm に大きなシグナルが集っていた．11 ~10 ppm にもシグナルが観測された．48 時間経過後のスペクトルでは，シグナルの分離は悪いものの，14 ~12 ppm までのシグナルの波形に似ていた．しかし，11 ~10 ppm にあるシグナルは，非常にブロードなシグナルが見えるが，精製した RNA の波形とは大きく異なっていた (Fig. 3-13a)．

(ii) DIS39 はヒト免疫不全ウイルス I 型を複製するための複製開始部位であり，ループ同士が Kissing 相互作用を形成することが知られている．精製したスペクトルでは，13.3 ppm から 12 ppm の間にシグナルが集まり他に 14.5 ppm, 14 ppm, 11.5 ppm, 10.4 ppm の 4 つのシャープなシグナルがある．INTT 法で転写させたスペクトルでは，シグナルが集まっている場所や 14.5 ppm 付近にシグナルが観測された (Fig. 3-13b)．しかし，11.5 ~10 ppm の間のシグナルは精製した RNA のシグナルとは異なりブロードであった．12 時間までの間は，13.3 ~12 ppm までの塩基対由来のシグナルより，シグナルの体積が明らかに大きい．時間経過と共に大きくなっていることから，このブロードな山の正体はフォールディングがうまくいかなかった RNA，転写が途中で止まった RNA，RNA 同士が相互作用している可能性が高い．PK1, LINE17, DIS39 の 3 つのサンプルを比較したところ，試料管の中で転写反応を起こすことができた．開発のため転写反応の進行を追ったが，ある一定時間経過した後に，観測するだけで十分に RNA が構造形成をしているか否かを確認出来るスペクトルを得ることができる．

3-4 考察

3-4-1 測定条件の検討

Fig. 3-5 より急激なシグナルの変化後もシグナルの増減が確認されたことから、転写反応時間を延ばすことでより沢山の RNA を得ることが出来る可能性が考えられた。また、一般的に 0.5 ml, 1.5 ml のチューブ内で転写反応を行うが、対称式 NMR 試料管を使用すると、外気と触れあう面が非常に小さくなり反応液の酸化が起りにくくなるのが、転写には良い条件である可能性があると考えた。今回使用した Kit のコントロール DNA を 100 ng 使用した時の RNA の合成効率は 30-50 μg である。本研究では、約 200 ng の鋳型を使用し INTT の測定を行っているため、Kit のコントロール DNA と同等の合成効率であれば、50-100 μg 程の RNA を観測していることになる。但し、本研究では鋳型をモル濃度で計算し加えていることと、鋳型の長さを考慮していないため厳密な値ではない。Fig. 3-5 より転写開始から 4 時間以降も緩やかに減ってはいるが、スペクトルでは NTPs のシグナルが残っており、効率よく NTP を使用する方法を検討する必要がある。本解析の転写に使用している T7 ポリメラーゼの活性の最適温度は 37°C であり、生体温度に近いことから選択している。ポリメラーゼの最適温度が 40°C と少し高い SP6 ポリメラーゼをなど他の酵素を使用し検討することで転写効率の上昇する配列もあるかもしれない。鋳型設計時の注意として、T7 ポリメラーゼは 5'末端に GG 配列を好むことが知られている[56]。また、*in vitro* 転写では 3'末端に余分な配列が付加されてしまうことがあるが、この付加を減らす方法として、鋳型の 5'末端に 2'-O-メチル化をする方法[57]や転写反応液に DMSO を加える方法 [58]が報告されている。INTT 法の改良したスクリーニング法として Helmling ら[58]によって開発された方法では、鋳型の編集や緩衝液の

交換という過程があり，簡便で誰にでもできるという面も考慮した INTT 法とは少し方向性が違うと考えるが，興味深い方法でもある．購入した転写 Kit を使用することで転写反応液の再現性をとり易くしたが，条件検討で使用した緩衝液 A を INTT 測定用に最適化することが出来れば，より低価格でのスクリーニングすることが出来る．

3-4-2 スクリーニングの有用性

本研究では，新規候補 RNA の中から NMR による構造解析の対象として，構造を形成する RNA をスクリーニングする方法の開発を行った．NMR 法により構造を見るためには，鋳型のデザインから測定用サンプルにするまで，約 2 週間が必要となる．さらに，測定の結果構造を形成していなければ，全て振り出しに戻ってしまう．それを防ぐ方法として，NMR 試料管の中で転写反応を起こし，転写反応液中に出来た RNA を精製のステップを経ることなくそのまま測定・観測する方法の開発に成功した．本手法により，スクリーニングに掛る時間は各段に短縮される．鋳型のデザインを行い，試料管の中に転写反応液を入れ，一定時間後測定をするだけである．サンプルにより，精製した時のスペクトルと一致するものとそうでないものがある．そのため，INTT 法により塩基対形成を確認出来る領域にシグナルが観測された RNA は，全てを構造形成していると考えられる．この構造形成状態には，最低 3 つの状態に分けることができると考える．一つ目は，Fig. 3-6a の様な状態で，一定のコンフォメーションを形成している場合である．二つ目は，Fig. 3-13b の様な状態で，部分的に一定のコンフォメーションを形成しているまたは，転写された RNA の中に一定のコンフォメーションを形成するものとしめないものが共存している場合である．三つ目の状態の場合，Fig. 3-14 に示した．この場合，RNA 自体は転写されているものの，

GC 塩基対が非常に多くシグナルが重なってしまっている可能性と、転写効率が悪いために観測出来ていない可能性がある。今後より良い転写条件を見つけることが、精度の良いスクリーニングを可能にし、RNA 研究に関わる人に広範にわたって使用されていくのではないかと考える。

本研究では RNA の構造形成を迅速に観測する方法として開発を行ったが、INTT 法もっと広く活躍出来る可能性があると考え。溶液中での転写反応を追えることから、長鎖 RNA などの構造形成の過程を見ることが出来るかもしれない。他にも、溶液中に RNA と結合する様なリガンドやタンパク質を入れた場合とない場合で、RNA の構造形成の変化の観察や相互作用も観測出来るかも知れない。本研究では、サンプルごとに転写反応の過程を観測したが、転写反応液を調製後 NMR のサンプルチェンジャーなどを使うことで、スクリーニングサンプルの数が増えても手軽にスクリーニングすることができるだろう。

Table 3-1 鋳型の配列

配列名	配列
T7プロモーターのセンス鎖	5'-CTAATACGACTCACTATA-3'
PK1	5'-TGCGGCTTTTTAGGAGGCCAACCGCCCCCTCCTATAGTGAGTCGTATTAG-3'
LINE17	5'-GGCTTTTATCCAAAGCCTATAGTGAGTATTAG-3'
DIS39	5'-GGGTCGCCCTGCCGTGCCGGCTTCAGCAAAGCCGACCCCTATAGTGAGTCGTATTAG-3'
MsncR-11-T	5'-GGGTAAAATGGCTGAGTAAGCAATTAGACTGTAAAATCTAAACACAGAGGTTAAATCCCTCTTTTACCC TATAGTGAGTCGTATTAG-3'
MsncR-11-I.IV-A58	5'-GGGTAAAATGTCTGAGTAAGCAATTTTACCCCTATAGTGAGTCGTATTAG-3'
MsncR-11-G	5'-TAAAATGGCTGAGTAAGCAATTAGACTGTAAAATCTAAACACAGAGGTTAAATCCCTCTTTTACCCAGAGG TCTTAAGGTGATATCCCTATAGTGAGTCGTATTAG-3'

Table 3-2 ampliscribe T7 standar Kitを使用した時の転写の条件

試料名	ストック濃度[mM]	体積[μ l]
RNase free water		46
Template DNA	0.005	40
10 \times Buffer	unknown	20
NTPs	100	64
DTT	100	20
RNA polymerase	unknown	10
total		200

Table 3-3 転写用緩衝液A

試薬名	濃度
Tris-HCl pH 8.1 at 37°C	40 mM
MgCl ₂	35 mM
NaCl	10 mM
TritonX -100	0.01%
spd	2 mM
PEG -8000	80 mg/mL

Table 3-4 PK1の1Dスペクトル(Fig.3-4)
測定パラメータ

device name	avance 600	avance 600
temperature (K)	303	303
pulseprogram	zg0jr.g	p3919gp
TD [points]	32768	32768
NS	1680	1680
DS	8	8
SW [ppm]	23.9411	23.9411
SF [MHz]	600.13	600.13
d1 [sec]	1	1
d9 [μsec]	50	60
d16 [μsec]	-	250
d19 [μsec]	-	138
p0 [μsec]	10	10
p1 [μsec]	9.89	10
p16 [μsec]	-	1000
p28 [μsec]	-	1000
p11 [dB]	-0.45	-0.45
p118	-	-0.45
O1 [Hz]	2825.45	2825.45
RG	128	35.9
SI	32768	32768
WDW	EM	EM
LB [MHz]	5	3
BC_mod	quad	quad

Table 3-5 PK1の1Dスペクトル (Fig.3-6A)
測定パラメータ

device name	drx 600
temperature (K)	298
pulseprogram	zg0jr
TD [points]	32768
NS	200
DS	8
SW [ppm]	23.9411
SF [MHz]	600.13
d1 [sec]	1
d9 [μsec]	50
p0 [μsec]	10
p1 [μsec]	10
pl1 [dB]	-0.95
O1 [Hz]	2817.05
RG	128
SI	16384
WDW	EM
LB [MHz]	10
BC_mod	quad

Table 3-6 PK1のNOEYSスペクトル (Fig.3-6B)
測定パラメータ

device name	drx 600
temperature (K)	298
pulseprogram	noesystjp.h
TD(F2)[point]	2048
TD(F1)[point]	512
NS	300
DS	8
SW(F2)[ppm]	23.9411
SW(F1) [ppm]	23.9411
SF(F2)[ppm]	600.13
SF(F1) [ppm]	600.13
d0 [usec]	0.000003
d1 [sec]	1
d8 [sec]	0.15
d9 [μsec]	50
d11 [sec]	0.03
p0 [μsec]	10
p1 [μsec]	10
p16 [μsec]	5000
pl1 [dB]	-0.95
O1 [Hz]	2817.05
l3	1
RG	512
SI(F2)	2048
SI(F1)	1024
WDW(F2)	SINE
WDW(F1)	SINE
SSB(F2)	2
SSB(F1)	2
ME_mod(F2)	no
ME_mod(F1)	no
BC_mod(F2)	qpol
BC_mod(F1)	no

Table 3-7 LINEとDIS39スペクトル (Fig.3-9) 測定パラメータ

LINE		DIS39	
strength (MHz)	drx600	strength (MHz)	drx600
temperature (K)	298	temperature (K)	298
pulseprogram	zg0jr	pulseprogram	zg0jr
TD [points]	4096	TD [points]	32768
NS	200	NS	200
DS	8	DS	8
SW [ppm]	23.9411	SW [ppm]	23.9411
SF [MHz]	600.13	SF [MHz]	600.13
d1 [sec]	2	d1 [sec]	1
d9 [μsec]	50	d9 [μsec]	50
p0 [μsec]	10	p0 [μsec]	10
p1 [μsec]	10	p1 [μsec]	10
p11 [dB]	-0.25	p11 [dB]	-0.8
O1 [Hz]	2816.17	O1 [Hz]	2818.8
RG	64	RG	128
SI	4096	SI	16384
WDW	EM	WDW	EM
LB [MHz]	10	LB [MHz]	10
BC_mod	quad	BC_mod	quad

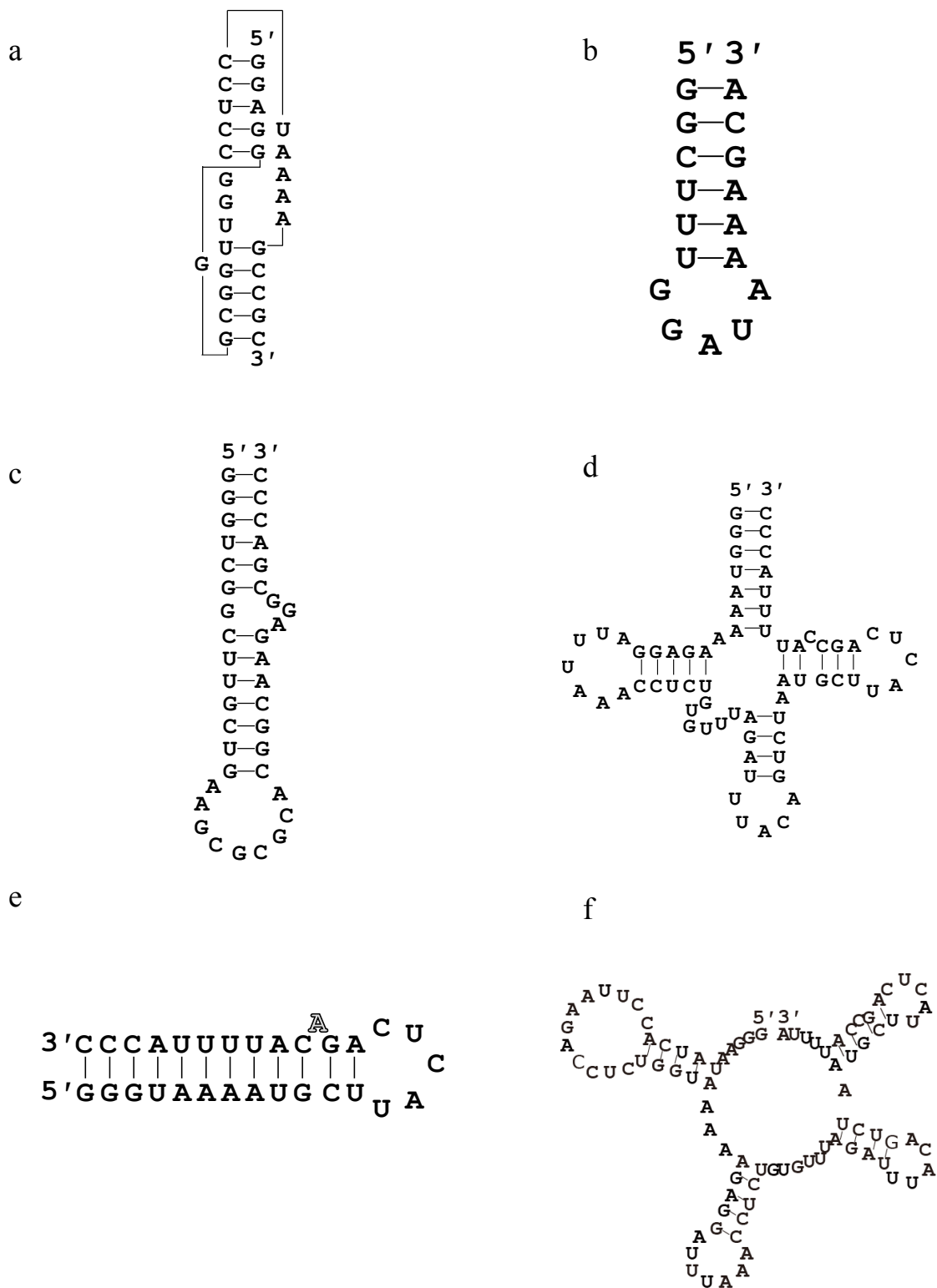


Fig.3-1 RNAの二次構造予測

(a) PK1, (b)LINE17, (c)DIS39, (d)MsncR-11-T, (e)MsncR-11-I.IV-A58, (f) MsncR-11-G

赤字はシュードノット形成を示す

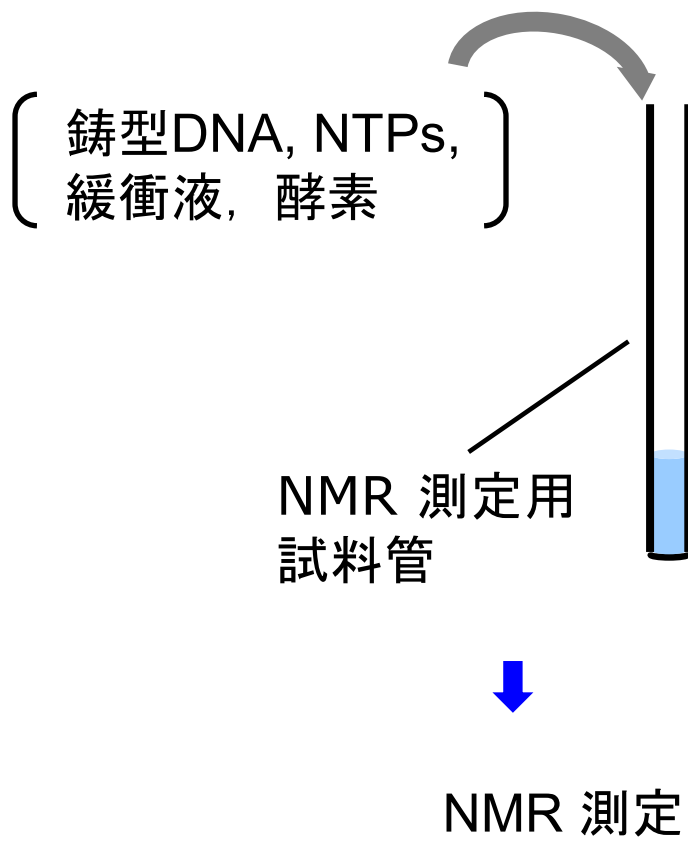


Fig.3-2 INTTスクリーニングによる転写方法の模式図

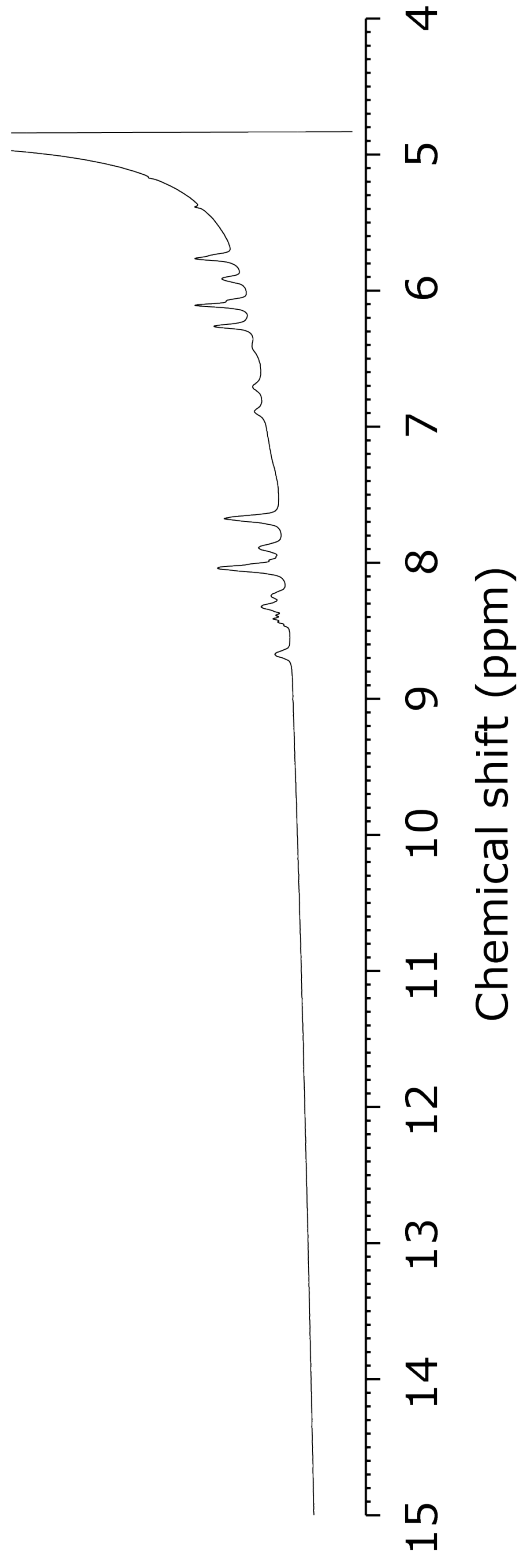


Fig.3-3 転写反応液のRNA Polymerase以外を測定した1Dスペクトル

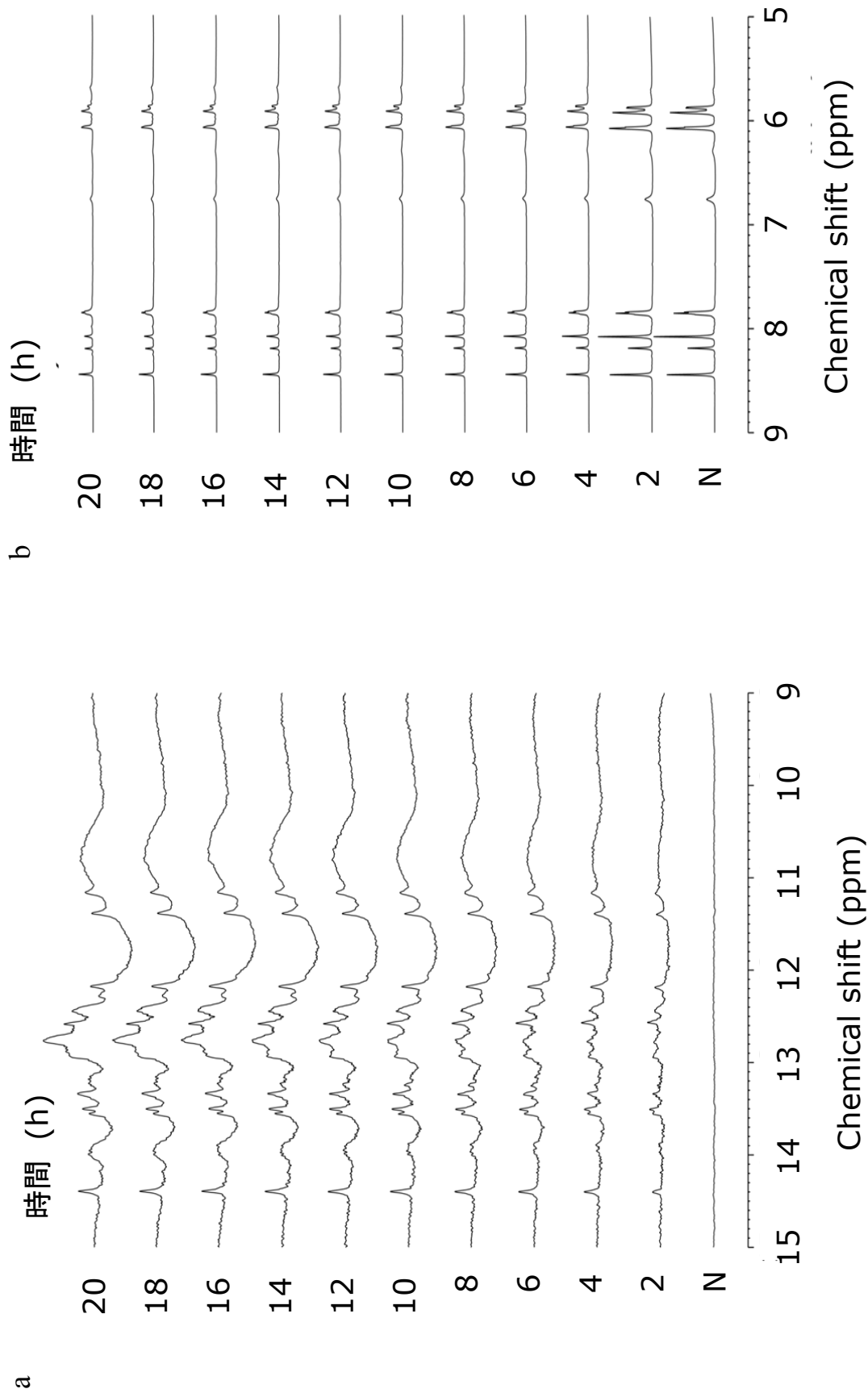


Fig.3-4 試験管内での転写を時間ごとに観測

(a) イミノプロトン領域 (b)NTPsシグナル領域

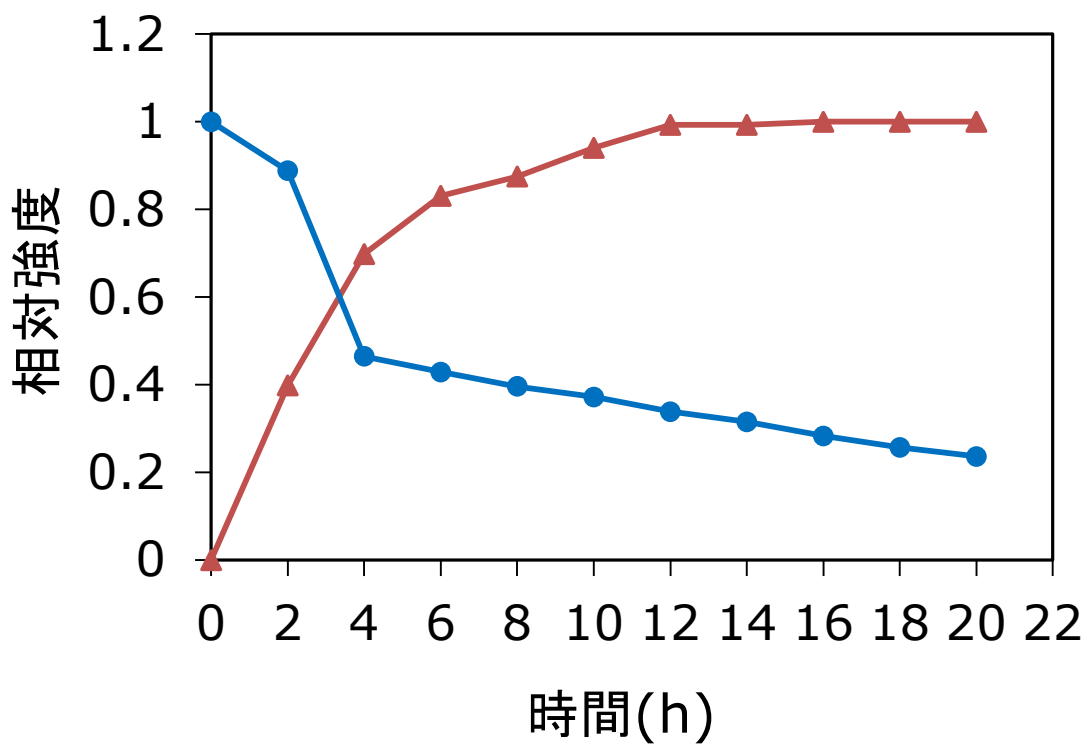


Fig.3-5 Fig.3-4の時間ごとのシグナル変化の相対グラフ
赤線三角がFig.3-4a, 青線丸がFig.3-4b

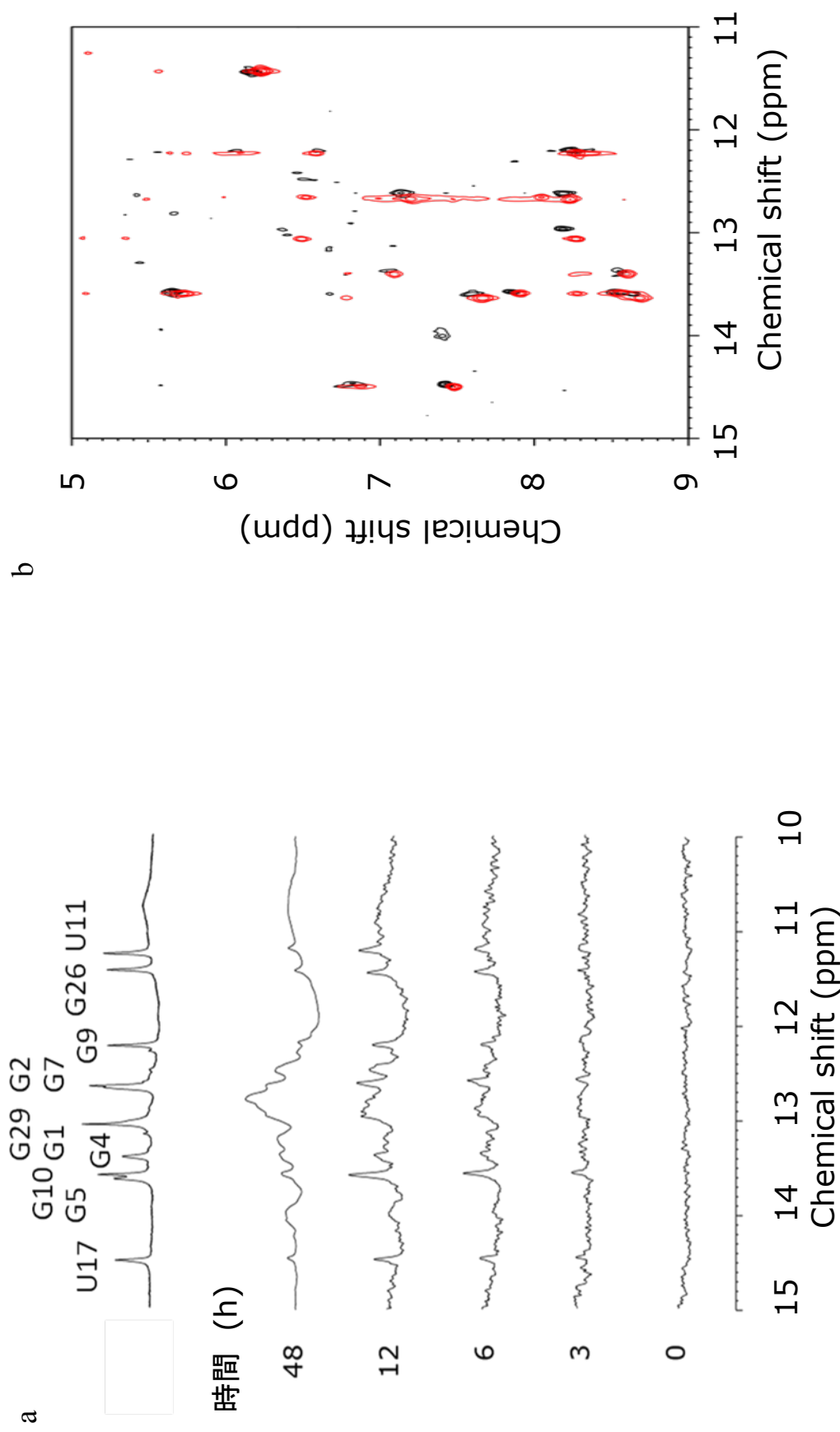


Fig.3-6 PK1を使ったINTT法の観測

(a) Polymerase投入直後から48時間までのイミノプロトン領域の測定。(b) NOESYスペクトルのアミノプロトン領域 黒はINTT法, 赤は精製済み一番上のスペクトルを測定したRNAを測定したスペクトル

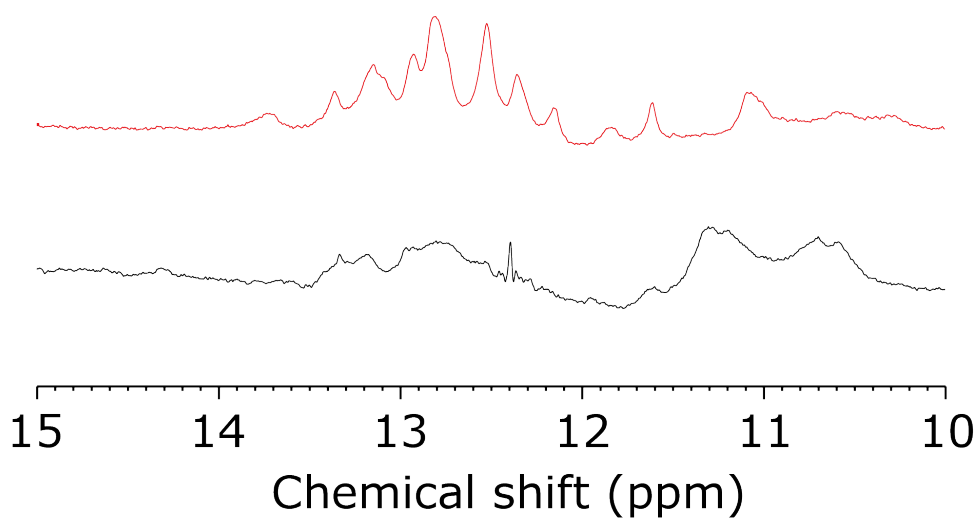


Fig. 3-7 MsncR-11-G のINTT法によるスペクトルと精製したRNAスペクトルの比較

赤線：精製したスペクトル 黒線：INNT法で観測したスペクトル

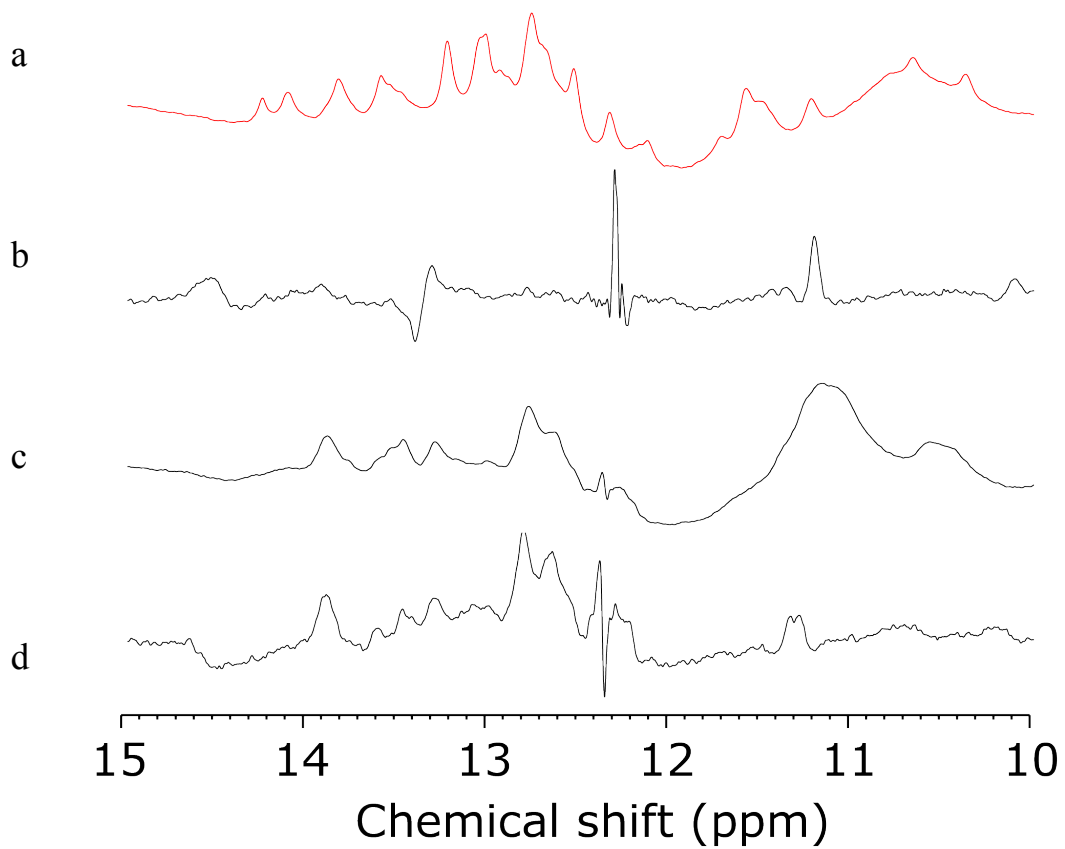


Fig. 3-8 INTTスペクトルと精製したRNAスペクトルの比較

(a) 精製したスペクトルMsncR-11-T (b) 緩衝液Aに精製したRNAとNTPを加えたもの (c) 2日後に測定したもの (d) 2時間の転写後すぐに測定したもの

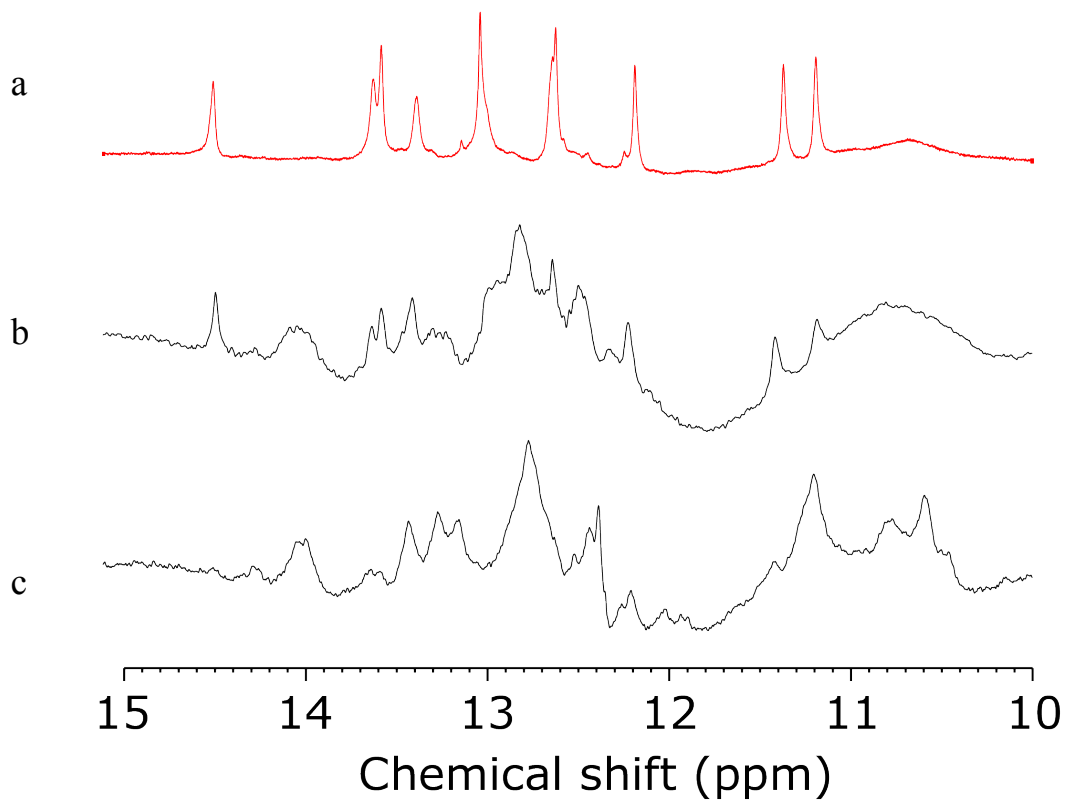


Fig. 3-9 INTTによる転写と精製したスペクトルのPK1の比較
(a)精製したRNAのシグナル (b)ampliscrib T7Kitを使用しINTTで観測した
(c)緩衝液A, NTPs, DTTと大陽日酸社のT7 RNA polymeraeを使用しINTTで観測した

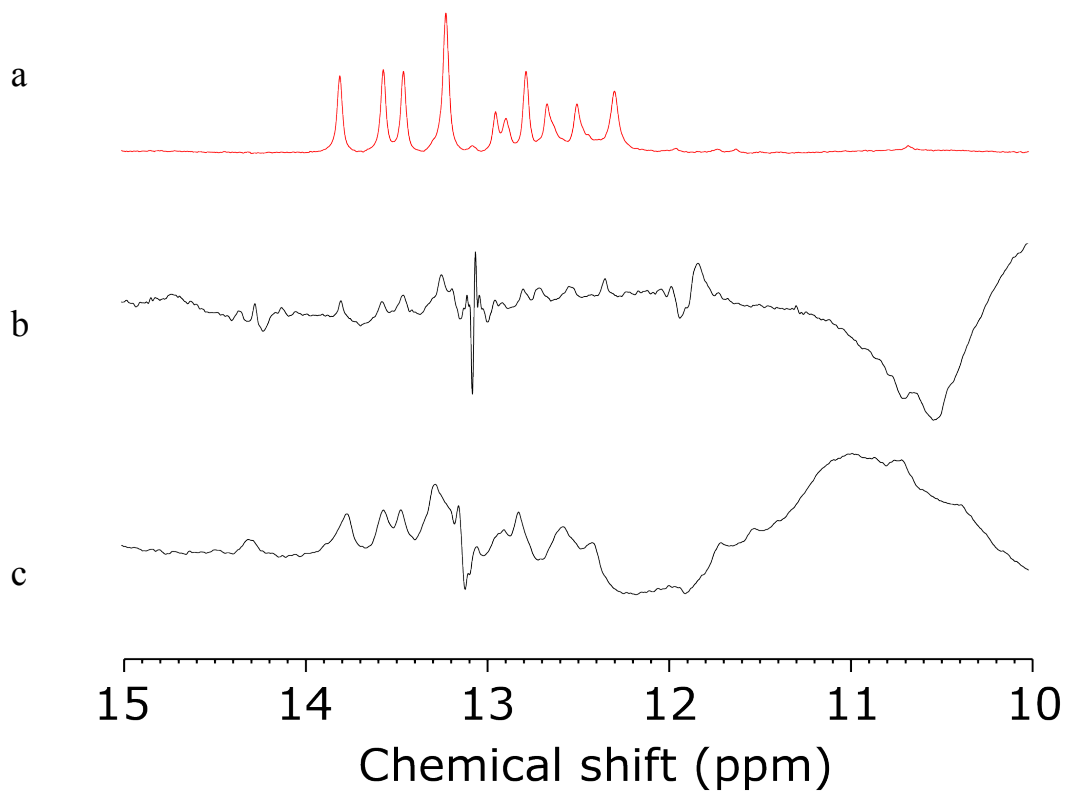


Fig. 3-10 INTTスペクトルと精製したRNAスペクトルの比較MsnR-11-I.IV-A58

(a)精製したRNAのシグナル (b) 転写緩衝液に精製したRNAを加えたもの (c)緩衝液A, NTPs, DTTと大陽日酸社のT7 RNA polymeraseを使用しINTTで観測した

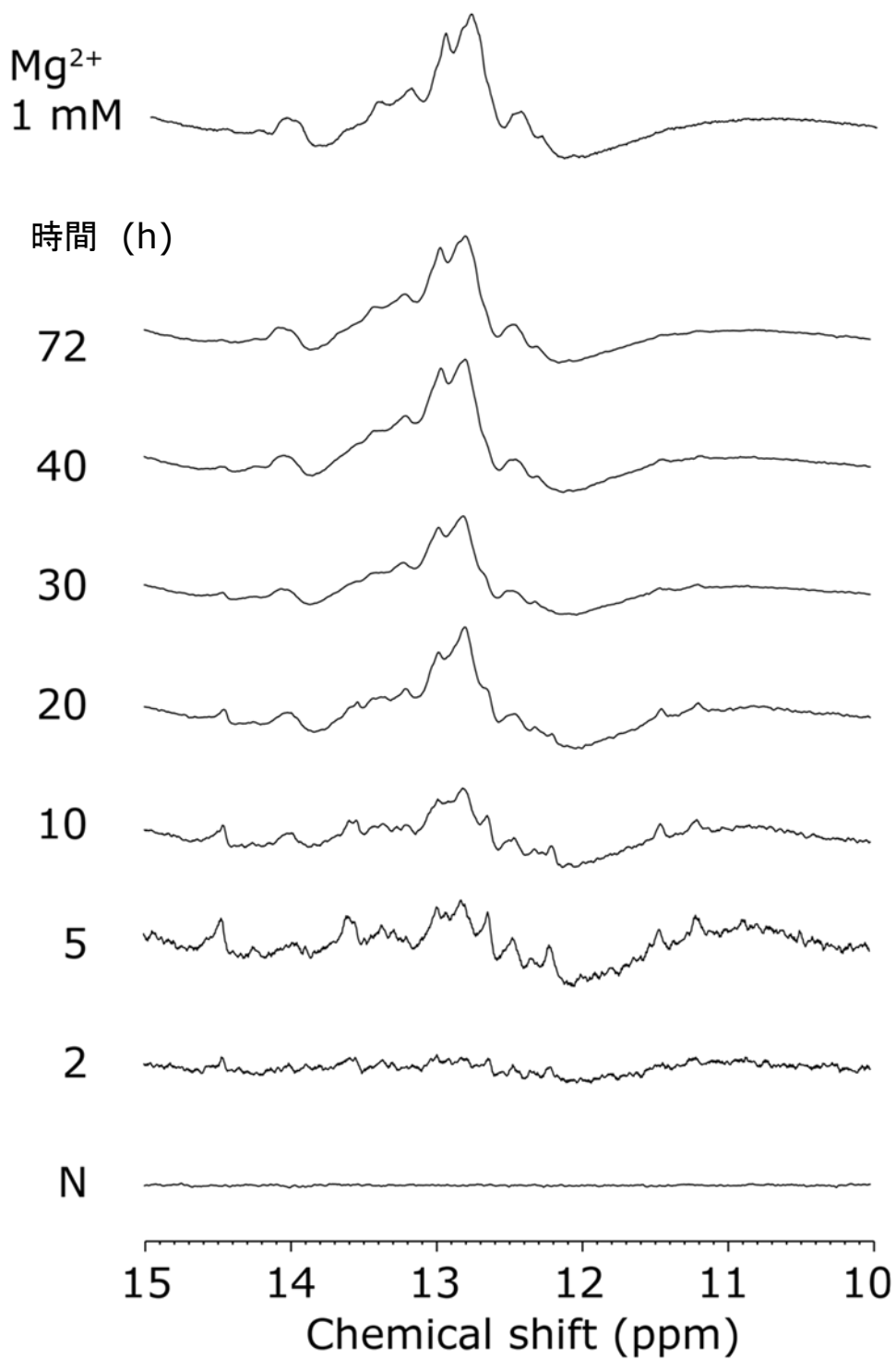


Fig.3-11 ¹³C/¹⁵N安定同位体標識NTPを使用したPK1のINTT法による測定
 上部スペクトルは72時間後にMg²⁺を添加した後のスペクトル

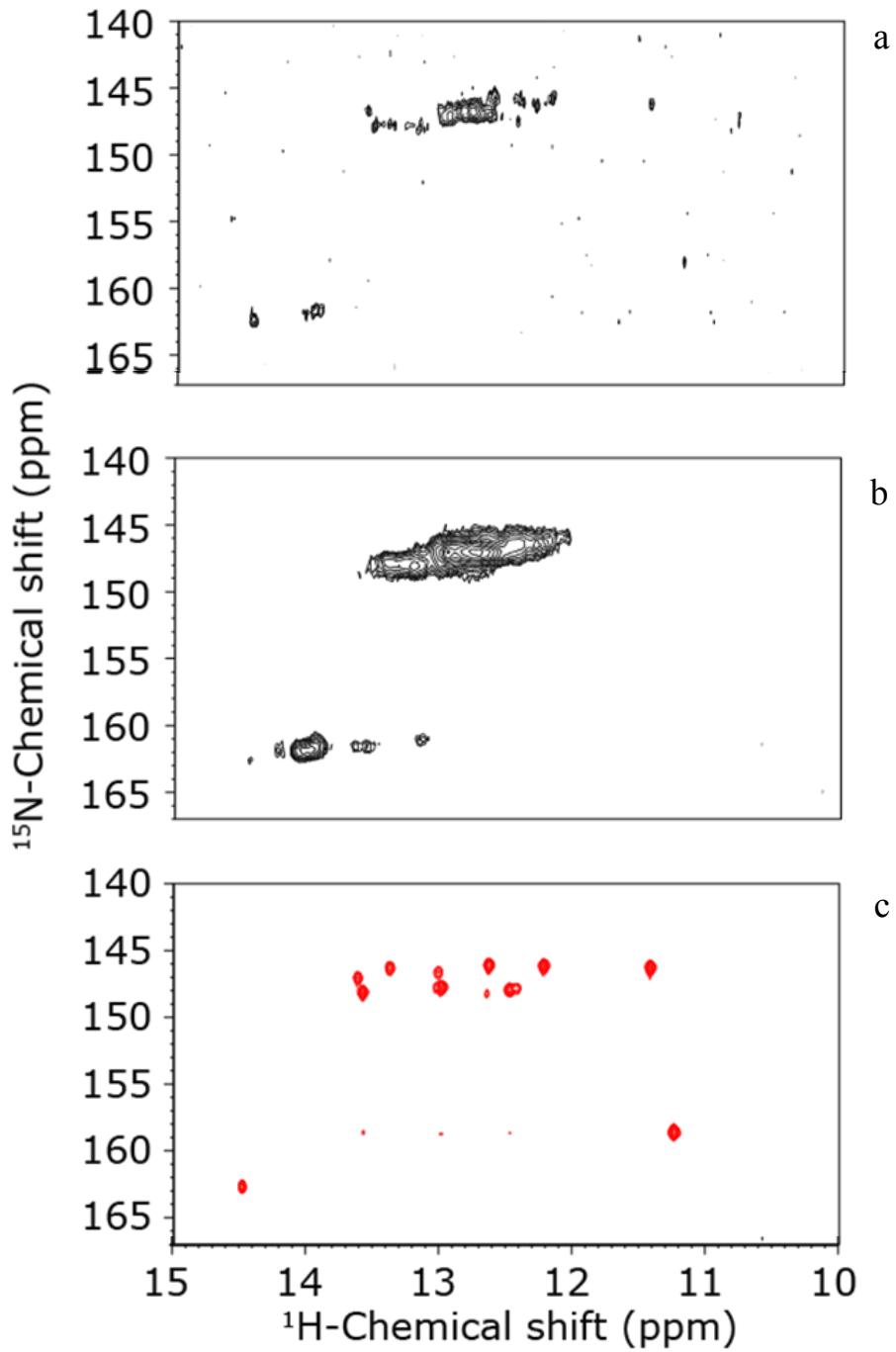


Fig. 3-12 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 安定同位体標識を使用したPK1のINTT法を使用したHMQCスペクトル

(a)転写開始後13時間後 (b)転写開始後63時間後
(c)精製したPK1を以前に測定したスペクトル

a

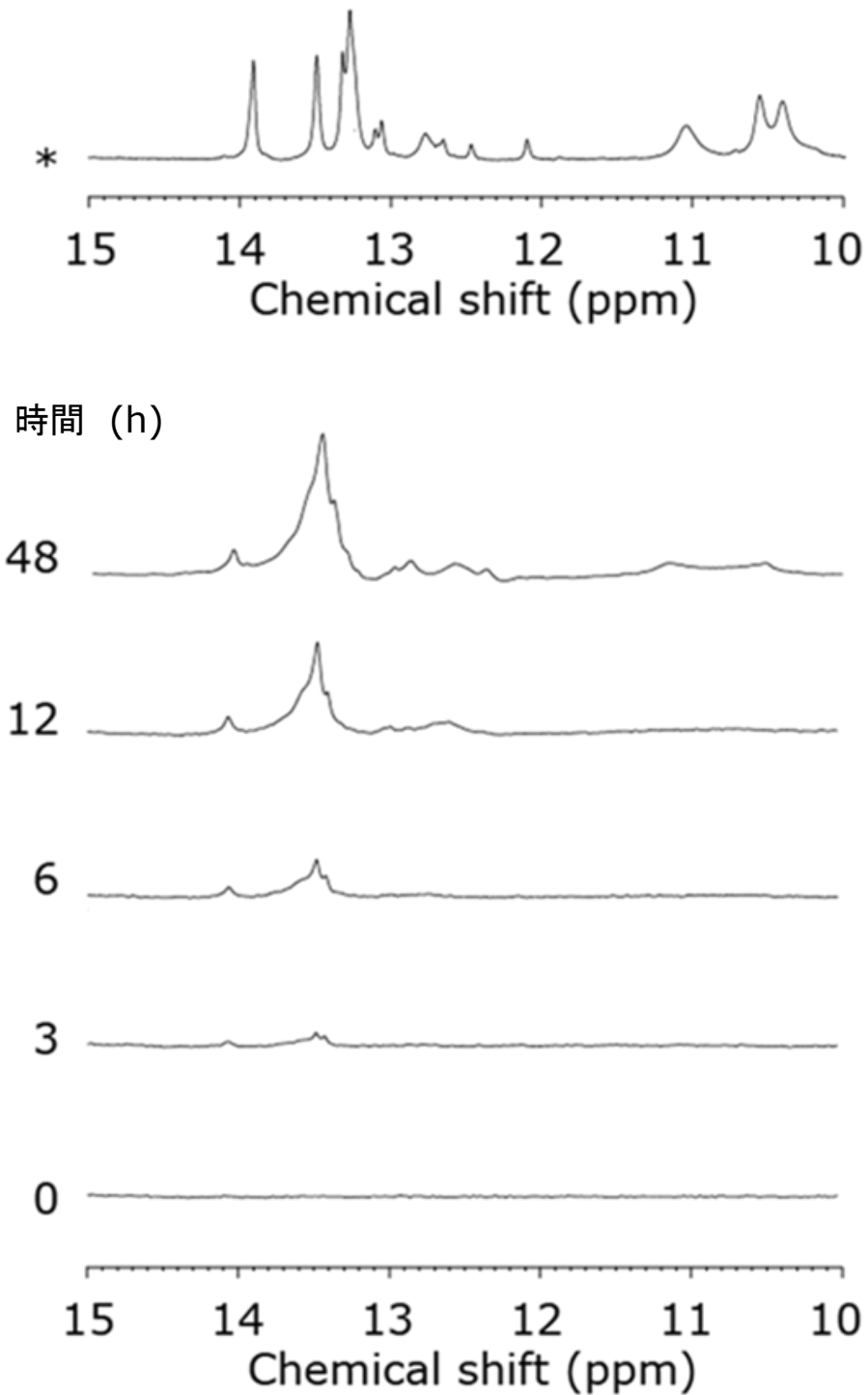


Fig. 3-13a INTTスペクトルの時間経過と精製したLINE17 スペクトル
黒線：INTT法のスペクトル 赤線：精製したスペクトル

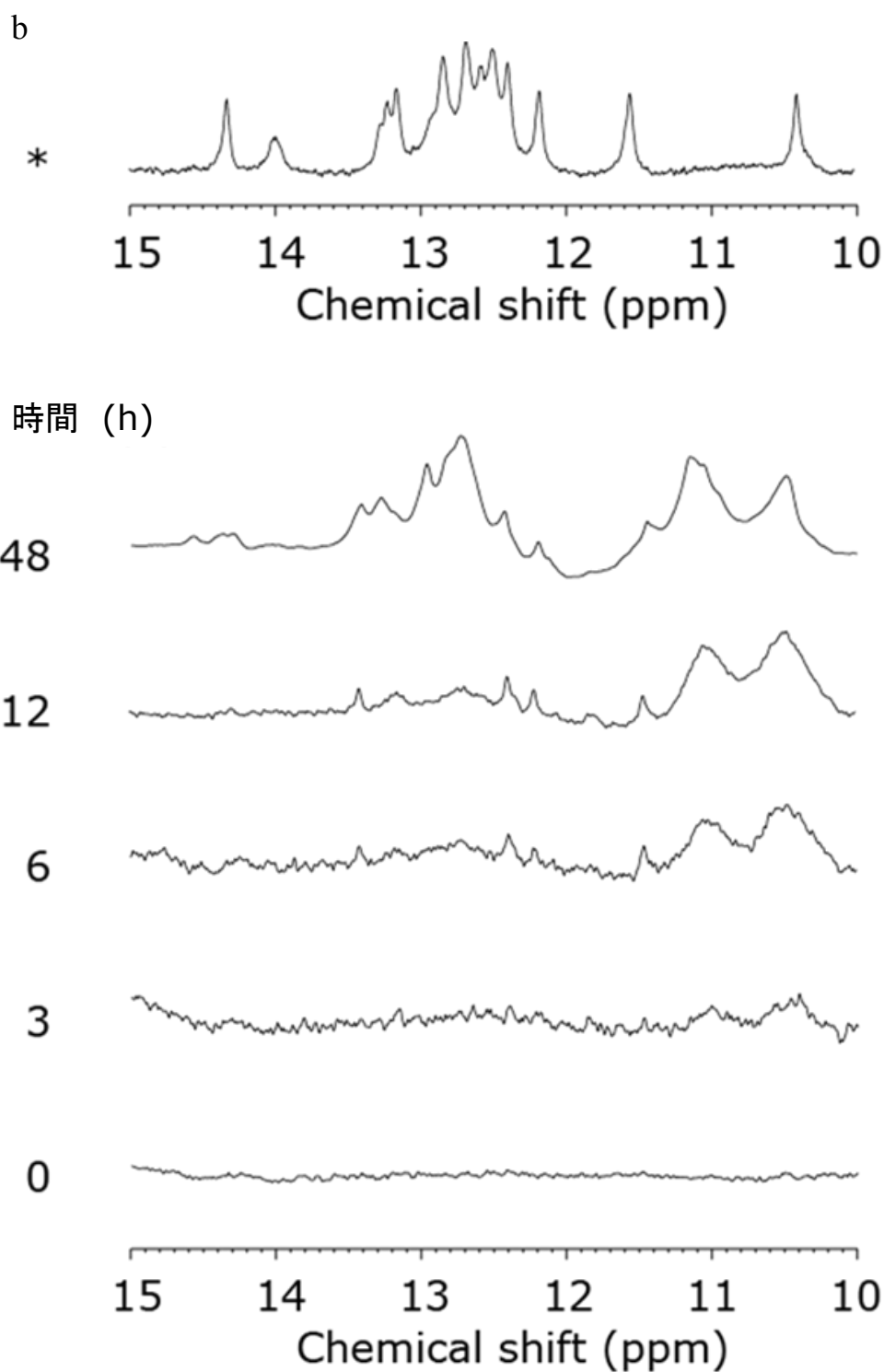


Fig. 3-13b INTTスペクトルの時間経過と精製したDIS39 スペクトル
 黒線：INTT法によるスペクトル 赤線：精製したスペクトル

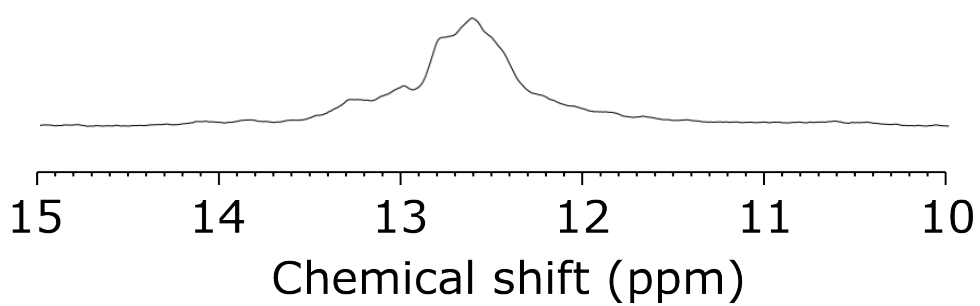


Fig. 3-14 INTT法に観測したスペクトルより構造形成の判断が出来ないスペクトル

第2部 低分子 RNA の構造解析

第4章 新規低分子 RNA の構造と機能の解析

4-1 はじめに

第2章で解析し見出された新規低分子 RNA 候補は、生体内において安定な構造を形成していると考え、NMR 法により構造解析を行うことにした。本章では 16 候補のうち 1 つの RNA に着目し、ゲノム上の配列解析、二次構造予測、NMR 法を組み合わせることにより、新規低分子 RNA の構造と機能を解明した。

4-1-1 ミトコンドリアゲノム

ミトコンドリアは 1950 年代から研究が行われ、その構造は細胞内二重膜を形成し、組織に依存して一つの細胞あたり一個から数千個があり、細胞内での局在も細胞の成長段階により異なる。機能として、ミトコンドリアの内膜のマトリクスにおいて、TCA 回路の反応により生体エネルギー物質 ATP を生産、脂質やコレステロールの合成と、生命の生存に重要な器官である[59]。ミトコンドリアのゲノムは核ゲノムと異なり独自のゲノムを持ち、母親由来のゲノムが遺伝すること分かっている[60]。哺乳類のミトコンドリアのゲノムは 16,295 kbp の長さを持つ 2 本鎖 DNA である (Gene Bank J01420)。2 個の rRNA と 12 個の mRNA、22 個の tRNA がコードされている (Fig. 4-1)。2 本鎖ゲノムは片方を heavy chain もう片方を light chain と呼ばれ、pre-mRNA の生産には、heavy chain, light chain 両鎖からゲノム一周ずつが転写されることが分かっている[61]。ミトコンドリアの機能低下による機能異常、欠損によるミトコンドリア病は、脳、心臓、肝臓、筋肉などの組織に重篤な疾患を引き起こす。ミトコンドリア病の原因は、核ゲノムの変異やミトコンドリアゲノムの変異や欠損であり、ミトコンドリアゲノ

ムの点変異は既に 100 か所以上が同定されている。しかし、効果的な治療法の確立はされておらず、現在対症療法がメインとなっている。この様なことから、ミトコンドリアにおける様々なメカニズムを解明することは、非常に重要である[62].

4-1-2 哺乳類のミトコンドリアにおける tRNA のプロセッシング

ゲノム一周分が転写された pre-mRNA から mature な rRNA と mRNA を得るためには、rRNA, mRNA の前後にコードした tRNA がプロセッシングすることで、成熟した 5'末端と 3'末端が形成される。この方法を **punctuation model** と言う[63]. ミトコンドリアゲノム上のうち、2つの rRNA, 8つの mRNA と 2つの bi-cistronic な mRNA を含む 10 個のタンパク質は **punctuation model** によるプロセッシングが行われる。しかし、COXI と Cyt b は 5'末端の上流に tRNA を持っていない。代わりに、tRNA の相補鎖 tRNA^{Tyr} と tRNA^{Glu} をそれぞれ持っており、この **mirror tRNA** が mRNA のプロセッシングに関与しているのではないかと考えた。また、どちらのケースにも当てはまらない COX III については、どのようなメカニズムにおいてプロセッシングされているのかは、分かっていない。

ヒトのミトコンドリアにおける tRNA のプロセッシングでは、tRNA の 5'末端を RNaseP が[64-66]、3'末端側をミトコンドリア tRNaseZ の ELAC2[67]によって切断されることが報告されている。tRNaseZ は tRNA のシュード-アクセプターステムと T アームを認識することによって 3'末端を切り詰める[68]。その後、CCA 付加酵素が切断末端の後に CCA 配列を付加する[67]。但し、tRNA の 5'末端側の切断する酵素である ELAC2 は、COXI mRNA の 5'末端のプロセッシングに関与しないことが報告されている[67]。他方では、ヒトのミトコンドリア mRNA には MRPP1, MRPP2, MRPP3, PTCD1 の酵素が関与している可能性が示されて

おり, COXI mRNA のプロセッシングは, MRPP1 が関与している可能性が高い[64]. COXI mRNA の 5'末端のプロセッシングに関与する酵素については, 現在知られていない.

4-2 方法

4-2-1 RNA のデザインと調製

断片の設計には, 二次構造予測ソフト vsfold5 を使用し二次構造予測を行った[35,52]. また, 構造解析をしやすくするため, 部分構造を取り出した断片をデザインした. さらに, 全ての鋳型に転写の効率を上げるため, 末端に配列(GC 塩基対)を加えた. 予測された構造が修飾や断片化によって, 全体で予測された構造と変化しないことを確認した. 設計した鋳型は Table 4-1 に示した. 設計した鋳型 DNA を, 北海道システムサイエンス株式会社に委託合成した.

RNA の転写合成・精製

RNA 合成には, T7 ポリメラーゼを使用した試験管内転写法で行った[53]. はじめに, 20 μ l スケールで条件検討を行った. 条件検討には, Ampliscribe T7-ScribeTM Standad RNA IVT Kit の 10 \times 転写緩衝液, T7 ポリメラーゼと当研究室で調整した 10 \times 転写緩衝液 A (Table 3-3), 大陽日酸社製の酵素を用いた際の転写効率の検討, および転写反応時間を 2 時間と 4 時間で検討を行った.

委託合成した鋳型 DNA と T7 プロモーターのセンス鎖の濃度が 1 : 1 になるようにし, 0.5 ml チューブに入れ 368 K で 5 分インキュベートし, 室温に戻るまで放冷した. ここに, 10 \times 転写用緩衝液, NTP, DTT, RNase free water を加え, 最後に RNA polymerase を加えた. この時の反応液の組成は Table 4-2 に示

した。反応液をピペティングにより十分攪拌させ、転写反応液を 37°C でインキュベートした。インキュベート後、ボルテックスミキサーで反応液を攪拌し転写反応を終結させた。PAGE 法により転写した RNA の長さにあわせた変性ゲルで転写反応の確認を行った。条件検討の結果、効率のよい条件を使用し 1 ml 以上のスケールで RNA の転写合成を行った。

転写反応終結後、RNA を精製するため、まず PAGE 法を用いた。転写終結した反応液に 8 M Urea に BPB (プロモフェノールブルー) および XC (キシレンシアノール) が入った色素を反応液と等量になるよう加えた。反応液に Urea を加えることで、RNA の高次構造を解きゲルの中で RNA を残基数で分離させる。ゲルに色素を加えた反応液をアプライし、1000 V で泳動を行った。BPB と XC の色素を指標とし、目的の RNA のバンドがゲルの中央付近になるまで泳動させ、ゲルに UV を照射して目的のバンドの位置を確認し切り出した。切り出したゲルは粉碎し、滅菌水を加え 6 時間以上常温で振とうさせた。その後、9000 rpm, 10 min, 10 °C で遠心しゲル片を沈め、RNA が溶出した上清を回収した。上清を回収したゲル片には再度滅菌水を加え、振とうと上清の回収を吸光度が 0.1 A を切るまで繰り返し行った。

次に、RNA 抽出液中の Urea やアクリルアミドを取り除くため、エタノール沈殿を行った。回収した RNA 抽出液を 0.8 μm の滅菌フィルター (Merck 社) に通し、上清に入っているゲル片を取り除き、遠心エバポレーターを使用し、吸光度が 1 A 以上の濃さになるまで濃縮を行った。濃縮した RNA 抽出液に液量の 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウムと 3 倍量の 99.9 % エタノールを加え、-80 °C で 60 min 静置した。静置後、9000 rpm, 30 min, -10 °C で遠心し、沈殿した RNA と廃液を分離して、沈殿物を遠心エバポレーターで乾燥させた。乾燥した沈殿物を 200 μl の滅菌水で溶かし再度エタノール沈殿を行った。

また、安定同位体標識サンプルの調整には、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した NTP を使用し、同様の手順で転写合成を行った。転写合成を行った RNA を Table 4-3 に示した。

RNA の化学合成

Expedite System DNA/RNA Synthesizer Model8909 を使用し固相合成を行った。合成は脱トリチル化，縮合反応，縮合反応，キャッピング，酸化反応を RNA の残基数分を行った。合成終了後，エタノール：アンモニア水 = 1:3 の溶液を用いて CPG カラムから切り出し， 55°C で 12 h インキュベートし塩基とリン酸基の脱保護を行った。サンプルに TBAF を 500 μl 加え 24 h 静置し，1 M TAEE を 1 ml 加えて反応を止めた。サンプルを完全に乾燥させ，リボースの 2' 水酸基の脱保護を行った。次に，簡易 ODS カラム (Sep-Pak) を用いて遊離した保護基を除去した。脱保護が完了した試料は，等量の 8 M 尿素，BPB，XC 色素を混合し変性 PAGE で精製を行った。UV ランプの光をあてゲルに影ができた部分を切り出した。切り出したゲルを破砕し，滅菌水を加え一晩振盪し，RNA をゲル片から抽出した。その後，9000 rpm，10 分，常温で遠心し，ゲル片を沈殿させ上清を回収，再び滅菌水を加え 6 時間振盪した。これを吸光度 0.1 A 以下になるまで繰り返した。そして，0.8 μL フィルター (MILIPORE 社製) を用いてゲル片を取り除いた。

次にエタノール沈殿を行った。フィルターを通した上清の液量に対して 3 倍量の 100 % エタノール，1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウムを加え， -85°C で 1 時間冷却し，9000 rpm，30 min， -10°C で遠心を行った。上清を取り除き，沈殿した RNA を遠心エバポレーターで乾燥し，200 μL の滅菌水で溶かし，マイクロチューブに回収した。この回収液に対して 3 倍量の 100%エタノール，1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウムを加え， -85°C で 30 分冷却し，15, 000 rpm，30 min， -10°C で遠心を行った。その後，上清を取り除き，沈殿した RNA を遠心エバポレーターで乾燥

し、200 μ L の滅菌水で溶かした。

サンプルのポイント標識には $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した NTP を使用し合成を行った。

北海道システムサイエンスに委託合成した RNA と化学合成を行った RNA の配列を Table 4-4 に示した。

4-2-2 NMR 測定

200 μ l の滅菌水に溶解した RNA から塩や Urea を取り除くために、限外濾過膜（ビバスピン MW:3000）（Sartorius 社）を使用し、4500 \times g、15 min、10 $^{\circ}$ C の遠心を RNA 以外の吸光度が RNA の値より下回る所まで繰り返した。RNA を単一のコンフォメーションにするため、RNA を 2 A 以下、200 μ l ずつ分注し、368 K、5 min インキュベートし急冷した。非変性 PAGE でコンフォメーション確認した。各 RNA の濃度は Table 4-5 に示した。サンプルを対称式マイクロサンプルチューブ（BMS-005）（シゲミ）に入れ測定を行った。

NMR スペクトルの測定には、Avance 600 spectrometer（Bruker Biospin K. K.）を使用し、解析処理は TOPSPIN3.1 を使用した。イミノプロトン測定における水消しには、jump-and return pulse を使用した[69]。NOESY スペクトルの観測には mixing time を 0.05 または 0.15 s の 2 種類測定した。NOESY スペクトルは交換性プロトンの間の NOE を観測するため、3 つの 90 $^{\circ}$ パルスを、jump-and return pulse の様に配置した[70]。 ^{15}N 標識したサンプルを使用し、塩基対を決める測定として、 ^1H - ^{15}N HMQC スペクトル[71]を測定した。測定に使用したパルスシーケンスは付録に記した。

4-2-3 融解温度測定用試料の調製

RNA サンプルを 95 $^{\circ}$ C で 5 min 保温し、急冷したのちに、最終濃度が 50 mM

NaClを含む20 mM リン酸緩衝液となるように加えた。最終的にRNA 0.3A, 液量 325 μ L となるように調製した。各試料を37°Cで30分間保温後に、測定用セルに試料を入れた。測定する波長は260 nmで、測定温度は25°Cから95°Cまで、1°C/minの速さで温度を上昇させた。

4-3 結果

4-3-1 MsncR-11の配列解析

次世代シーケンサー解析より見つかった新規低分子RNAの一つであるMsncR-11は、およそ90残基の長さを持ち、46配列見つかった[72]。また、ゲノム上では核ゲノム2番染色体のmyosin IIIAのイントロンの相補鎖で、シュードジーンの間と、ミトコンドリアゲノムのcytochrome oxidase I (COXI)の上流に位置していた (Fig. 4-2a, b)。この領域はその裏鎖にtRNA^{Tyr}およびtRNA^{Cys}がコードされている。以前の解析では同じ領域を持つ配列の長さが短いまたは長い配列は、異なるサブグループになっていたことから、MsncR-11の配列を再度検索したところ、40-122残基の長さを持つ158配列が見つかった (Table 4-6)。MsncR-11の5'末端側では最も長い配列で、mirror tRNA^{Cys}の配列に44残基重なっていた。3'末端側にはゲノムと一致する配列UUAの後にpoly(A)が18残基付加されていた (Fig. 4-3)。

2番染色体配列とミトコンドリアのゲノム配列を比較したところ、MsncR-11が一致する領域の近くで、2か所一致しない塩基が見つかった。シーケンサー解析より見出されたMirror tRNA^{Cys}とMirror tRNA^{Tyr}が重なり読まれた5つの配列を2つのゲノム配列と比較したところ、5配列ともミトコンドリアのゲノム配列と一致していた (Table 4-7)。このことから、シーケンサー解析により得ら

れた配列はミトコンドリアから発現していると考えた。ラットにおいても、mirror tRNA^{Cys}, tRNA^{Tyr} の低分子 RNA が発現していることが報告されている [73].

シーケンサー解析より mirror tRNA^{Tyr} と COXI が重なる領域の配列を探索したところ、両方にまたがる配列は 1 配列のみ見つかった。COXI と一致する配列は 142 配列見つかった。このうち 32 配列は切断された配列がそろっており CCU の前で切断されていた (Table 4-8).

Table 4-6 でシーケンサー解析より見出された配列の殆どに poly(A)の配列が付加されていたが、分解へ向かう目印だけではなく、ミトコンドリアにおける poly(A)Polymerase (PAP) と polynucleotide hosphorylase (PNPase) よる、ポリアデニル化は mRNA 安定化に寄与していることが報告されている [74,75].

4-3-2 二次構造解析

(i) マウスのミトコンドリア tRNA^{Tyr} の構造を、3'末端のディスクリミネーターを除いて示した (Fig. 4-4a)。Fig. 4-4a の相補的になるように塩基を並べた構造を示した (Fig. 4-4b)。Mirror tRNA^{Tyr} の領域を vsfold5 によりパラメータを変動させ二次構造を予測した。Fig. 4-4c と d では、Kuhn length とステム形成の値を小さくすることで、クローバーリーフの様な二次構造を予測した。しかし、Kuhn length を大きくすると T アームの構造を形成しなくなった (Fig. 4-4e)。他の予測プログラムとして、Mfold と Centroid fold を使用し二次構造予測を行った (Fig. 4-4f, g)。異なるプログラムで予測された構造は、Fig. 4-4b の構造に良く似ていた。シーケンサー解析より得られた配列の poly(A)を除去し 3'末端のゲノム上 CCU を加えて二次構造予測を行ったところ、tRNA の様な構造を予測した (Fig. 4-4h)。6つの予測構造から、D アームは全ての予測構造において共通し

ていた。アンチコドンアームについても、ステムの長さなどの違いはあるが殆ど共通していた。Tアームでは、大きく3種類の構造に分けられた。一つ目は、5つのループと2または3塩基対から成るステム (Fig. 4-4b, f, g), 二つ目は、ステムにバルジアウトを持つ (Fig. 4-4c, d, h), 3つ目に、ステムを持たない (Fig. 4-4e) という構造に分けられた。

(ii) MsncR-11 の構造を NMR 法により解析するため、予測した二次構造に一致するフラグメントをデザインした。Mirror tRNA^{Tyr} に当たる領域に、転写効率を上げるため、末端に GC 塩基対を加えた配列を MsncR-11-T と名付けた (Fig. 4-5a-e)。tRNA の 3'末端のプロセッシングには、アクセプターTループを認識する必要があることから、まず Tアームに位置するステムループの内、最もステムが長くなる Fig. 4-4c, d, h に予測された構造を MsncR-11-IV と名付けデザインした (Fig. 4-6a)。複数のプログラムにより3種類の構造が予測されたため、どの構造を形成しているかを調べるため、MsncR-11-IV のバリエントを作製した (Fig. 4-6b-e)。次に、tRNA が pre-mRNA から切り出される際、アクセプターステムと Tアームが認識される。tRNA の三次構造ではアクセプターステムと Tアームが動軸状に並んだ構造を形成していることから、アクセプターステムと Tアームを繋げた長いステムループを MsncR-11-I.IV と名付けた (Fig. 4-7a)。MsncR-11-I.IV において、MsncR-11-IV と同じ構造を形成しているのかを調べるため、バリエント (Fig. 4-7b-e) を作製した。MsncR-11-IV と MsncR-11-I.IV で形成する二次構造を MsncR-11-T において形成しているかを確認するため、MsncR-11-I.IV のバリエントと共通の一塩基置換をした MsncR-11-T のバリエントをデザインした (Fig. 4-8a-e)。MsncR-11 の二次構造予測より全てに共通していた Dアームとアンチコドンアームをそれぞれ、MsncR-11-II と MsncR-11-III と名付けデザインした (Fig. 4-9)。それぞれ、デザインした配列の RNA を変性

PAGE 法により精製されていることを確認した (Fig. 4-10a-c).

4-3-3 MsncR-11 の断片の NMR による構造解析

MsncR-11-IV

MsncR-11-IV とそのバリエーションについて、288 K 軽水中で 1D_{JR} の測定をした。MsncR-11-IV から 13.3 ppm と 12.8 ppm にシャープな GC 塩基対由来のシグナルを得た。2D_{NOESY} の測定より 13 ppm のシグナルが AU 塩基対に由来することが分かった (Fig. 4-11a, Fig. 4-12)。2 つの GC 塩基対の形成には C49:G57 と G48:C59 または G48:C58 を組んでいる可能性がある。C58 または C59 どちらがバルジアウトする塩基かを決定するため、4 つの変異体を作製し解析を行った (Fig. 4-11b-e)。一つ目の変異体として、C58 を A に変えた変異体

(MsncR-11-IV-A58) (Fig. 4-6b) を同様の条件下で測定した。非常にブロードな GC 塩基対由来のシグナルが 1 つ観測されたが、MsncR-11-IV で観測されたシグナルとは、異なるシフトであった (Fig. 4-11b)。C58 に変異を加えるとスペクトルが大きく変わることからステムループを保つことが出来なくなるのではないかと考えた。この理由として、RNA が短く末端の AU 塩基対の形成が弱いことや、変異を入れたことで全く異なる構造を形成したと考え、末端に AU 塩基対を 2 つ加えた変異体を作製した (MsncR-11-IV-AU2) (Fig. 4-6c)。

MsncR-11-IV-AU2 は MsncR-11-IV に良く似たスペクトルを示した。13.2 ppm のシグナルは 12.7 ppm のシグナルより面積が広いことから 2 つのシグナルが重なっていると考えた (Fig. 4-11c)。

しかし、末端に AU 塩基対を足したにも関わらず、シグナルの数が MsncR-11-IV より 1 つしか増えていないことから、末端の結合が弱いと考えられた。そこで、末端に付加する塩基対を GC 塩基対に変更した変異体 (MsncR-11-IV-GC2) (Fig.

4-6d) とさらに、末端に GC 塩基対を付加し C58 を A に変えた変異体

(MsncR-11-IV-GC2-A58) (Fig. 4-6e) をそれぞれ作製し解析した。末端に共通する GC 塩基対由来のシグナルを 12.3 ppm と 12.5 ppm に観測した。

MsncR-11-IV-GC2-A58 では、12.3 ppm のシグナルが他の高磁場側のシグナルと比較し 2 倍以上になっていることから、末端の 2 つの GC 塩基対が重なっていることが分かった。MsncR-11-IV と MsncR-11-IV-GC2 を比較したところ、

MsncR-11-IV で観測されたシグナルに良く似た 3 つのシグナルが 12.5 ~13.5 ppm の間に観測され、MsncR-11-IV-A58 と MsncR-11-IV-GC2-A58 を比較したところ、MsncR-11-IV-GC2-A58 でも G57 と考えられるブロードなシグナルを観測した

(Fig. 4-11b, e) (Table 4-9)。この様に、A58 に変異を入れたサンプルと入れていないサンプルで共通のシグナル変化を確認したことから、MsncR-11 の二次構造では、C59 がバルジアウトしていることが示唆された。Fig. 4-6 では、解析により決定した二次構造を示した。

MsncR-11-I.IV

MsncR-11-I.IV は、12 塩基対を持つ長いステムループが予測された。MsncR-11-I.IV の 1D スペクトルと 2D_NOESY スペクトルを測定したところ、13.8 ppm から NOE を連鎖出来た部分を実線で繋げ、U61 から G2 までの塩基対の連鎖帰属をすることが出来た (Fig. 4-13a, Fig. 4-14)。転写合成により作製しているため 3'末端に 1 残基付加された RNA があり、G2 と G3 は 2 つずつシグナルが観測された。

MsncR-11-I.IV と MsncR-11-IV が同じステムループを形成していることを確認するため、C58 を A に変異させた変異体 MsncR-11-I.IV-A58 の解析によって C59 がバルジアウトしていたことを確認した (Fig. 4-13b, Fig. 4-15)。

次に C59 を変異させることで、G48:C58 と C59:G49 の 2 つの塩基対の連鎖す

る NOE を観測出来るのではないかと考え、C59 を A, G, U に変異させた RNA (MsncR-11- I.IV-A59, -U59, -G59) の測定を行った。

MsncR-11-I.IV-A59 の測定から、MsncR-11-I.IV および MsncR-11-I.IV -A58 で、はっきり確認出来た U61 のシグナルが消失した (Fig. 4-13c)。NOESY スペクトルより NOE を連鎖帰属したところ、U62 から G2 までと U47, G48 と連鎖帰属が出来た (Fig. 4-16)。MsncR-11-I.IV-U59, -G59 を測定した際、MsncR-11-T-A59 では消失していた U61 シグナルを観測した (Fig. 4-13d, e, Fig. 4-17, 4-18)。このことより、MsncR-11-I.IV-A59 の構造では C59 を A に変異させたことで、A60 がバルジアウトすることが示された。MsncR-11-I.IV は MsncR-11-IV と共通のステムループを形成し、アクセプターステム部分は二次構造予測通りの塩基対を形成していることが示唆された (Table 4-10)。

MsncR-11-II

MsncR-11 の二次構造予測では、どのようなプログラムでも共通予測された D アームに位置するステムループを MsncR-11-II と名付け解析を行った (Fig. 4-9a)。288 K で 1D スペクトルを測定したところ、イミノプロトンが観測される領域に二次構造予測より多くのシグナルを観測した。そのため、288 -308 K まで温度を変え測定を行った (Fig. 4-19)。温度上昇と共にシグナルが減り、308 K では 4 つのシグナルが観測された。298 K までの低温度における RNA の状態を明らかにするため、5 mM Mg²⁺ 存在下で非変性 PAGE を行った。バンドの泳動度から、二量体と考えられる位置にバンドが確認された (Fig. 4-20)。また、U16 を安定同位体標識した MsncR-11-II_U16 を使用し解析を行った。1D_JR のスペクトルと ¹⁵N_Deccouple のスペクトルを比較した。その結果、13.5ppm のシグナルが 2 つに割れたことから (Fig. 4-21)、MsncR-11-II のループ同士で kissing-loop 相互作用していることが示された。ステムループを形成していることを確認するた

め、2D_NOESY スペクトルを測定したが、塩基対シグナルの形成を示すシグナルは1つしか確認できなかった (Table 4-11)。

MsncR-11-III

MsncR-11-III を 288 K, 軽水中で測定を行った。1D スペクトルからは、5つのシグナルが観測され、予測された構造の塩基対の数とピリミジン残基の数が、NMR スペクトルから観測された数と一致していた。2D_NOESY スペクトルでは、対角ピークを観測することが出来たが、連続する塩基対を示す NOE を観測することはできなかった。そのため、MsncR-11-III を重水置換し連鎖帰属を行った。その結果、U31 ~U36, と A38 ~G41, の連鎖帰属を行うことが出来た。また、A2 と A4 塩基の H2 から A15 と C13 の H1' との間に NOE が見えたことから末端側がステムを組んでいる可能性が高いことが分かった (Fig. 4-22)。U37 の塩基前後との NOE を観測出来なかったが、塩基がフリップアウトしている可能性が考えられた (Table 4-12)。

4-3-4 mirror tRNA の解析とフラグメントの比較

mirror tRNA^{Tyr} の構造を形成するために MsncR-11-T とそのバリエーションを使用しスペクトルの変化が Fig. 4-13 と一致するかを確認した。MsncR-11-T とバリエーションの 1D スペクトルは互いに似ていた (Fig. 4-23)。MsncR-11-I.IV のバリエーションにおいて特徴的なシグナルの変化が観測された。このシグナルと MsncR-11-T のバリエーションが同じ様に変化しているのかを確認した。MsncR-11-T-A58 の 12.2 ppm (Fig. 4-23b 矢印), MsncR-11-T-U59 の 13.3ppm (Fig. 4-23d 矢印), MsncR-11-T-G59 の 12.8 ppm (Fig. 4-23e 矢印) の 3 つ特徴的なシグナルが一致していた (Table 4-13)。

2D_NOESY スペクトルの解析では一部、NOE を連鎖することが出来たが、12.3

~13.3 ppm 付近ではシグナルが密集しており、明確に分離した NOE を観測すること出来なかった (Fig. 4-24). この NOESY スペクトルと、フラグメントとのスペクトルを比較するのは容易ではないため、G 塩基と U 塩基に安定同位体標識を行った MsncR-11-T を使用し ^1H - ^{15}N HMQC スペクトルを測定した. GC 塩基対を示すシグナルを7つ観測した (Fig. 4-25a 黒). この HMQC スペクトルと、既に帰属が出来ている MsncR-11-I.IV の G 塩基, C 塩基を安定同位体標識したサンプルの HMQC スペクトルを重ねた (Fig. 4-25a 赤). 重なったシグナル G57, G2, G3, G48 のシグナルに一致していた. Fig. 4-25b でも同様に MsncR-11-T の U 標識と MsncR-11-I.IV の A, U 標識を重ねたところ U61, U62, U4, U64 のシグナルが一致していた (Table 4-14).

これまで観測したスペクトルのうち、特に明らかな変化を見せた C58 を A に変異させたサンプルの効果を調べるために、ワイルドタイプと C58A の変異体のスペクトルを重ね合わせその差を見た (Fig. 4-26). 12.2 ppm のシグナルを比較した所、2D スペクトルにおいても一致していた. これらのことから、全長においても、MsncR-11-I.IV のステムループを形成している事が示唆された.

4-3-5 融解温度測定

MsncR-11-I.IV とそのバリエーションの融解温度を測定した (Fig. 4-27). MsncR-11-I.IV-A59 が他のサンプルに比べて 2°C ほど融解温度が高かった.

4-4 考察

4-4-1 MsncR-11 の二次構造解析

私たちはマウスの脳から得た次世代シーケンサーによって見出された新規

RNA 候補の一つである MsncR-11 の mirror tRNA^{Tyr} の配列探索と構造解析を行った。マウスのミトコンドリアにおける COXI mRNA の成熟化には、配列の解析から COXI mRNA の AUG 開始コドンの 3 残基上流で切断が起きる事を発見した (Table 4-9)。また、mirror tRNA が切断された後に poly(A) が付加したことが分かった (Table 4-7)。このことから、COXI mRNA プレカーサーの mirror tRNA 領域が特異的な構造を形成しプロセッシングプロモーターによって認識し、切断されると考え、私たちは mirror tRNA の二次構造を解析した。

mirror tRNA は複数の予測プログラムから、異なる二次構造を予測した。NMR 解析から MsncR-11 は vsfold5 で予測した Fig. 4-4c, d の構造に一致していた。この結果は、vsfold5 は tRNA 様構造の様な複数のステムループ構造の予測を得意とする。二次構造予測に cross-linking entropy (CLE) のエネルギーの計算がされているため、NMR 解析の結果と一致したと考える[35]。ただし、CLE エネルギーを計算に入れていない時、長い一本のステムを予測する傾向を持っている。

MsncR-11-IV, -I.IV, -T とそのバリエーションの比較により、MsncR-11-T において、T アームに当たるステムループを形成していることが示唆された。MsncR-11-T の二次構造を帰属は出来なかったため、MsncR-11-II と MsncR-11-III の構造を形成しているのかを同定することができなかった。融解温度測定において MsncR-11-I.IV とそのバリエーションの測定では、どの配列もどの配列も大きく融点が変わることはなかった。MsncR-11-IV とそのバリエーション、MsncR-11-T とそのバリエーションでも同じ様に融解温度の測定を行うことや、各配列の緩和時間の測定を行うことで、NMR 法による解析の結果をより強く示すデータを得ることができるかもしれない。さらに、融解温度測定や緩和時間の測定による結果を積み重ねることで、二次構造予測の向上やバルジアウトを持つ RNA 構造の解

析に重要なデータになるかもしれない。

4-4-2 NMR 解析からミトコンドリア COXI のプロセッシングについて

私たちは MsncR-11-T が tRNA 様構造を形成しシュード-アクセプター T アームを認識し COXI mRNA の 5'末端のプロセッシングに関与するかも知れない、と推測し解析を行った。次世代シーケンサー解析より得られた配列がミトコンドリアゲノムまたは、2 番染色体どちらから発現しているかを、MsncR-11 の上流に一致する RNA 配列を比較し解析した。そして、mirror tRNA^{Cys} に一致する 5 つの配列を見つけた (Table 4-7)。シーケンサー解析では 50-150 残基の RNA 画面分をとり解析しているため、mirror tRNA^{Cys} と tRNA^{Tyr} をカバーする長い配列の存在する可能性が考えられたが、見つからなかった。Mirror tRNA^{Tyr} の 5' と 3' 末端はプロセスされていた。mirror tRNA^{Cys} が付加された、COXI の 5'末端を含む (2 つの mirror tRNA を含む) 286 残基の配列の二次構造を vsfold5 で予測したところ、長い転写物は tRNA 様構造を形成することが分かった。COXI mRNA プレカーサーの時に tRNA 様構造を認識し切断する可能性が考えられた。

今回の研究に用いた RNA はマウスから抽出したが、哺乳類と脊椎動物のミトコンドリアゲノムの COXI の上流の配列を比較した。(Fig. 4-28)。

ヒトのミトコンドリアにおいて、tRNA 遺伝子は mRNA と rRNA に隣接する 5' と 3' の両方に tRNA が存在する。tRNA のプロセッシングにより mRNA と rRNA は成熟する[48]。ヒトとマウスのそれぞれの遺伝子の配置などがよく似ているためこのメカニズムはマウスのミトコンドリアにも適応する事ができると考える。しかし、ミトコンドリアにおける tRNaseZ, ELAC2 は tRNA^{Tyr} と COXI の界面を切断しないことが報告されている[67]。そのため、マウスのミトコンドリアにおける、COXI の 5'末上流配列の切断には ELAC2 以外の酵素が関与している可能

性が考えられる。

ミトコンドリアのポリアデニル化は、mRNA の成熟化[76]だけでなく tRNA と rRNA も同様にポリアデニル化することが知られている[77,78]。ncRNA の poly(A)付加は tRNA と rRNA のプレカーサーや中間体、核サーベイランスの一部として知られている[79]。MsnCR-11 に付加されていた poly (A) は安定化だけでなく、分解されるサインの可能性もあり、5'末端が不揃いだったのも 5'末端側から分解されていた可能性が考えられる。

COXI 同様に 5'末端に tRNA を持たない Cyt b の 5'末端上流の配列を検索したところ、mirror tRNA^{Glu} の配列を次世代シーケンサーの解析より僅かだが見つけた。COXIII の 5'末端の上流には mirror tRNA はないが、この領域において二次構造が予測されたことから[80]、MsnCR-11 の様な構造を形成しプロセスされている可能性が考えられる。

Table 4-1 鑄型DNA配列

試料名	配列
MsnR-11-I-IV	5'- GGGTAAAATGGCTGAGTAAAGCAATTTTACCCCTATAGTGAGTCGTAATTAG-3'
MsnR-11-I-IV-A58	5'- GGGTAAAATGTCTGAGTAAAGCAATTTTACCCCTATAGTGAGTCGTAATTAG-3'
MsnR-11-I-IV-A59	5'- GGGTAAAATTTGCTGAGTAAAGCAATTTTACCCCTATAGTGAGTCGTAATTAG-3'
MsnR-11-I-IV-U59	5'- GGGTAAAATAGCTGAGTAAAGCAATTTTACCCCTATAGTGAGTCGTAATTAG-3'
MsnR-11-I-IV-G59	5'- GGGTAAAATCGCTGAGTAAAGCAATTTTACCCCTATAGTGAGTCGTAATTAG-3'
MsnR-11-T	5'- GGGTAAAATGGCTGAGTAAAGCAATTAGACTGTAAAATCTAAACACAGAGGTTTAAATCCCTCTTTTACCC TATAGTGAGTCGTAATTAG-3'
MsnR-11-T-A58	5'- GGGTAAAATGTCTGAGTAAAGCAATTAGACTGTAAAATCTAAACACAGAGGTTTAAATCCCTCTTTTACCC TATAGTGAGTCGTAATTAG-3'
MsnR-11-T-A59	5'- GGGTAAAATTTGCTGAGTAAAGCAATTAGACTGTAAAATCTAAACACAGAGGTTTAAATCCCTCTTTTACCC TATAGTGAGTCGTAATTAG-3'
MsnR-11-T-U59	5'- GGGTAAAATAGCTGAGTAAAGCAATTAGACTGTAAAATCTAAACACAGAGGTTTAAATCCCTCTTTTACCC TATAGTGAGTCGTAATTAG-3'
MsnR-11-T-G59	5'- GGGTAAAATCGCTGAGTAAAGCAATTAGACTGTAAAATCTAAACACAGAGGTTTAAATCCCTCTTTTACCC TATAGTGAGTCGTAATTAG-3'

Table 4-2 転写反応液の組成

(A) ampliscribe T7 standar Kitを使用した時のミニスケール転写の条件

試料名	ストック濃度 [mM]	体積 [μ l]
RNase free water		4.6
Template DNA	0.005	4
10×Buffer	unknown	2
NTPs	100	6.4
DTT	100	2
RNA polymerase	unknown	1
合計		20

(B)緩衝液Aを使用した時のミニスケール転写の条件

試料名	ストック濃度 [mM]	体積 [μ l]
RNase free water		2
Template DNA	0.01	4
10×Buffer	Table.4-2	4.3
NTPs	100	7.2
DTT	100	2
RNA polymerase	10 μ g/ml (glycerol 50%)	0.5
合計		20

Table 4-3 転写調製したRNA

試料名	配列
MsnR-11-I-IV	5'-GGGUAAA AUGCUU ACUCAGCCAUUUUACCCC-3'
MsnR-11-I.IV-A58	5'-GGGUAAA AUGCUU ACUCAGACAUUUUACCCC-3'
MsnR-11-I.IV-A59	5'-GGGUAAA AUGCUU ACUCAGCAAUUUUACCCC-3'
MsnR-11-I.IV-U59	5'-GGGUAAA AUGCUU ACUCAGCUAUUUUACCCC-3'
MsnR-11-I.IV-G59	5'-GGGUAAA AUGCUU ACUCAGCGAUUUUACCCC-3'
MsnR-11-T	5'-GGGUAAA AAGAGGAUUUAAACCUCUGUGUUUAGA UUUACAGUCUAAUGCUUACUCAGCCAUU UUACCCC-3'
MsnR-11-T-A58	5'-GGGUAAA AAGAGGAUUUAAACCUCUGUGUUUAGA UUUACAGUCUAAUGCUUACUCAGACA UU UUACCCC-3'
MsnR-11-T-A59	5'-GGGUAAA AAGAGGAUUUAAACCUCUGUGUUUAGA UUUACAGUCUAAUGCUUACUCAGCAA UU UUACCCC-3'
MsnR-11-T-U59	5'-GGGUAAA AAGAGGAUUUAAACCUCUGUGUUUAGA UUUACAGUCUAAUGCUUACUCAGCUA UU UUACCCC-3'
MsnR-11-T-G59	5'-GGGUAAA AAGAGGAUUUAAACCUCUGUGUUUAGA UUUACAGUCUAAUGCUUACUCAGCGA UU UUACCCC-3'

Table 4-4 化学合成したRNAの配列

試料名	配列
MsrcR-11-II	5'-AGAGGAUUUAAAACCUCU-3'
MsrcR-11-III	5'-UAGAUUUACAGUCUA -3'
MsrcR-11-IV	5'-AUGCUUACUCAGCCAU-3'
MsrcR-11-IV-A58	5'-AUGCUUACUCAGACAU -3'
MsrcR-11-IV-AU2	5'-AAAUGCUUACUCAGCCAUUU-3'
MsrcR-11-IV-GC2	5'-GGAUGCUUACUCAGCCAUCC-3'
MsrcR-11-IV-GC2-A58	5'-GGAUGCUUACUCAGACAUC-3'

Table 4-5 使用したRNAの濃度

試料名	濃度 [mM]
MsnR-11-II	0.16
MsnR-11-II-U16label	0.14
MsnR-11-III	0.19
MsnR-11-IV	0.51
MsnR-11-IV-A58	0.15
MsnR-11-AU2	0.31
MsnR-11-GC2	0.19
MsnR-11-GC-A58	0.22
MsnR-11-I.IV	0.62
MsnR-11-I.IV-A58	0.29
MsnR-11-I.IV-A59	0.7
MsnR-11-I.IV-U59	0.1
MsnR-11-I.IV-G59	0.18
MsnR-11-I.IV AU label	0.23
MsnR-11-I.IV GC label	0.21
MsnR-11-T	0.34
MsnR-11-T-A58	0.14
MsnR-11-T-A59	0.09
MsnR-11-T-U59	0.1
MsnR-11-T-G59	0.04
MsnR-11-T U label	0.082
MsnR-11-T G label	0.079

Table 4-7 2番染色体とミトコンドリアゲノムの配列比較とシーケンサーにより得られた配列

Chromosome 2 (-) 22589829 - 22589698

Mitochondrial genome (+) 5146 - 5277

Chromosome 2 GCTTCTCAATCTACTTCTACCGCCGAAAAAAAAA-TGGCGGTAGAAGTCTTAGTAGAGGATTTCTCTACACCTTCGAATTTGCAATTCGACATGAATATCACCTTAAGACCTCTGGTAAAAAGAGGATTTA

Mitochondrial Genome GCTTCTCAATCTACTTCTACCGCCGAAAAAAAAAATGGCGGTAGAAGTCTTAGTAGAG-ATTTCTCTACACCTTCGAATTTGCAATTCGACATGAATATCACCTTAAGACCTCTGGTAAAAAGAGGATTTA

CGCCGAAAAAAAAAUGGCGGUAGAAGUCUUAGUAGAG-AUUUCUCUACACCU

AAAAAAAAAUGGCGGUAGAAGUCUUAGUAGAG-AUUUCUCUACACCUUCGAAUUUGC

AAUUGGCGGUAGAAGUCUUAGUAGAG-AUUUCUCUACACCUUCGAAUUUGCAAUUCGAC

AAAAAUGGCGGUAGAAGUCUUAGUAGAG-AUUUCUCUACACCUUCGAAUUUGCAAUUCGACAUGAAUUCACCUUAAGACCUCUGGUAAGAGGGAUUUA

AAAAAUGGCGGUAGAAGUCUUAGUAGAG-AUUUCUCUACACCUUCGAAUUUGCAAUUCGACAUGAAUUCACCUUAAGACCUCUGGUAAGAGGGAUUUA

Table 4-9 MsncR-11-IVとそのバリアントの測定パラメータ

sample name	MsncR-11-IV	MsncR-11-IV-A58	MsncR-11-IV_AU2	MsncR-11-IV_GC2	MsncR-11-IV_GC2-A58
device name	avance 600	avance 600	avance 600	avance 600	avance 600
temperature (K)	288	288	288	288	288
pulseprogram	zg0jr-g	zg0jr-g	zg0jr-g	zg0jr-g	zg0jr-g
TD [points]	32768	32768	32768	32768	32768
NS	200	400	400	400	400
DS	8	8	8	8	8
SW [ppm]	23.9411	23.9411	23.9411	23.9411	23.9411
SF [MHz]	600.13	600.13	600.13	600.13	600.13
d0 [μ s]	0	0	0	0	0
d1 [s]	1	1	1	1	1
d9 [μ s]	50	50	50	50	50
p0 [μ s]	10	10	10	10	10
p1 [μ s]	9.89	9.89	9.89	9.89	9.89
pl1 [dB]	0.2	-0.05	0.12	-0.2	-0.1
O1 [Hz]	2822.71	2823.26	2820.87	2822.34	2822.89
RG	128	128	128	128	128
SI	32768	32768	32768	32769	32770
WDW	EM	EM	EM	EM	EM
LB [MHz]	3	5	3	3	4
BC_mod	quad	quad	quad	quad	quad

Table 4-9 continued

sample name	MsnR-11-IV
device name	avance 600
temperature (K)	288
pulseprogram	noesyphjp.g1
TD(F2)[point]	4096
TD(F1)[point]	512
NS	128
DS	16
SW(F2)[ppm]	23.9411
SW(F1) [ppm]	23.9411
SF(F2)[ppm]	600.13
SF(F1) [ppm]	600.13
d0 [μ s]	3
d1 [s]	1
d8 [s]	0.15
d9 [μ s]	50
p0 [μ s]	10
p1 [μ s]	9.98
p11 [dB]	0.2
O1 [Hz]	2821.97
RG	128
SI(F2)	4096
SI(F1)	1024
WDW(F2)	GM
WDW(F1)	GM
LB(F2)	-10
LB(F1)	-10
GB(F2)	0.05
GB(F1)	0.1
ME_mod(F2)	no
ME_mod(F1)	no
BC_mod(F2)	qpol
BC_mod(F1)	no

Table 4-10 MsncR-11-I.IVとそのバリアントの測定パラメータ

sample name	MsncR-11-I.IV	MsncR-11-I.IV-A58	MsncR-11-I.IV-A59	MsncR-11-I.IV-U59	MsncR-11-I.IV-G59
device name	avance 600	avance 600	avance 600	avance 600	avance 600
temperature (K)	288	288	288	288	288
pulseprogram	zg0jr.g	zg0jr.g	zg0jr.g	zg0jr.g	zg0jr.g
TD [points]	32768	32768	32768	32768	32768
NS	400	400	400	400	400
DS	8	8	8	8	8
SW [ppm]	23.9411	23.9411	23.9411	23.9411	23.9411
SF [MHz]	600.13	600.13	600.13	600.13	600.13
d1 [s]	1	1	1	1	1
d9 [μs]	50	50	50	50	50
p0 [μs]	10	10	10	10	10
p1 [μs]	9.89	9.89	9.89	9.89	9.89
pl1 [dB]	0.1	0.1	0.23	0.23	0.23
O1 [Hz]	2824.17	2822.34	2822.89	2822.89	2822.89
RG	128	128	128	128	128
SI	32767	32768	32768	32768	32768
WDW	EM	EM	EM	EM	EM
LB [MHz]	7	7	7	7	7
BC_mod	quad	quad	quad	quad	quad

Table 4-10 continued

sample name	MsnrcR-11-I.IV	MsnrcR-11-I.IV-A58	MsnrcR-11-I.IV-A59	MsnrcR-11-I.IV-U59	MsnrcR-11-I.IV-G59
device name	avance 600	avance 600	avance 600	avance 600	avance 600
temperature (K)	288	288	288	288	288
pulseprogram	noesyhjp.g1	noesyhjp.g1	noesyhjp.g1	noesyhjp.g1	noesyhjp.g1
TD(F2)[point]	4096	4096	4096	4096	4096
TD(F1)[point]	512	512	512	512	512
NS	128	216	128	224	224
DS	16	16	16	16	8
SW(F2)[ppm]	23.9411	23.9411	23.9411	23.9411	23.9411
SW(F1)[ppm]	23.9411	23.9411	23.9411	23.9411	23.9411
SF(F2)[ppm]	600.13	600.13	600.13	600.129954	600.129954
SF(F1)[ppm]	600.13	600.13	600.13	600.129954	600.129954
d0 [μs]	0.000003	0.000003	0.000003	0.000003	0.000003
d1 [s]	1	1	1	1	1
d8 [s]	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
d9 [μs]	50	50	50	50	50
p0 [μs]	10	10	10	10	10
p1 [μs]	9.98	9.98	9.98	9.98	9.98
p11 [dB]	0.1	0.1	0.2	0.3	0.25
O1 [Hz]	2821.97	2822.34	2824.17	2823.8	2820.14
RG	128	128	128	128	128
SI(F2)	4096	4096	4096	4096	4096
SI(F1)	1024	1024	1024	1024	1024
WDW(F2)	GM	GM	GM	GM	GM
WDW(F1)	GM	GM	GM	GM	GM
LB(F2)	-15	-15	-15	-15	-15
LB(F1)	-15	-15	-15	-15	-15
GB(F2)	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
GB(F1)	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
ME_mod(F2)	no	no	no	no	no
ME_mod(F1)	LPfc	LPfc	LPfc	LPfc	LPfc
BC_mod(F2)	qpol	qpol	qpol	qpol	qpol
BC_mod(F1)	no	no	no	no	no

Table 4-11 MsncR-11-IIの測定パラメータ

sample name	MsncR-11-II			
device name	drx 600	298	303	308
temperature (K)	288	298	303	308
pulseprogram	zg0jr	zg0jr	zg0jr	zg0jr
TD [points]	32768	32768	32768	32768
NS	1000	200	200	1000
DS	8	8	8	8
SW [ppm]	23.9411	23.9411	23.9411	23.9411
SF [MHz]	600.13	600.13	600.13	600.13
d1 [s]	1	1	1	1
d9 [μs]	50	50	50	50
p0 [μs]	10	10	10	10
p1 [μs]	10	10	10	10
pl1 [dB]	-0.4	-0.4	-0.4	-0.4
O1 [Hz]	2813.54	2813.54	2813.54	2813.54
RG	128	128	128	128
SI	16384	16384	16384	16384
WDW	EM	EM	EM	EM
LB [MHz]	10	10	10	10
BC_mod	quad	quad	quad	quad

sample name	MsncR-11-II-U8
device name	avance 600
temperature (K)	288
pulseprogram	zg0jr
TD [point]	4096
NS	200
DS	64
SW [ppm]	23.9411
SF [ppm]	600.13
d1 [s]	2
d2 [s]	0
d9 [μs]	50
d11 [s]	0.03
p1 [μs]	9.89
pl12 [dB]	12.1
pl13 [dB]	10.6
pl1 [dB]	-0.4
O1 [Hz]	2823.62
RG	90.5
PCPD2 [μs]	75
PCPD3 [μs]	190
SI	32768
WDW	QSIN
LB	2
BC_mod	quad

Table 4-12 MsncR-11-III
の測定パラメータ

sample name	MsncR-11-III
device name	avance 600
temperature (K)	303
pulseprogram	noesyph
TD(F2)[point]	2048
TD(F1)[point]	800
NS	112
DS	32
SW(F2)[ppm]	11.0205
SW(F1) [ppm]	10.9999
SF(F2)[ppm]	600.13
SF(F1) [ppm]	60013
d0 [μ s]	3
d1 [s]	2
d8 [s]	0.2
p1 [μ s]	10
p11 [dB]	0.145
O1 [Hz]	2824.72
RG	4096
SI(F2)	2048
SI(F1)	1024
WDW(F2)	GM
WDW(F1)	GM
LB(F2)	-5
LB(F1)	-5
GB(F2)	0.05
GB(F1)	0.1
ME_mod(F2)	no
ME_mod(F1)	LPfc
BC_mod(F2)	qpol
BC_mod(F1)	no

Table 4-13 MsncR-11-Tとそのバリエーションの測定パラメータ

sample name	MsncR-11-T	MsncR-11-T-A58	MsncR-11-T-A59	MsncR-11-TU59	MsncR-11-TG59
device name	avance 600	avance 600	avance 600	avance 600	avance 600
temperature (K)	288	288	288	288	288
pulseprogram	zg0jr.g	zg0jr.g	zg0jr.g	zg0jr.g	zg0jr.g
TD [points]	32768	32768	32768	32768	32768
NS	512	512	512	512	1000
DS	16	16	16	16	16
SW [ppm]	23.9411	23.9411	23.9411	23.9411	23.9411
SF [MHz]	600.13	600.13	600.13	600.13	600.13
d1 [sec]	1	1	1	1	1
d9 [μsec]	50	50	50	50	50
p0 [μsec]	10	10	10	10	10
p1 [μsec]	9.89	9.89	9.89	9.89	9.89
p11 [dB]	0.23	0.23	0.23	0.35	0.37
O1 [Hz]	2826.37	2826.37	2826.37	2825.27	2822.34
RG	128	128	128	128	128
SI	32768	32768	32768	32768	32768
WDW	EM	EM	EM	EM	EM
LB [MHz]	10	10	10	5	10
BC_mod	quad	quad	quad	quad	quad

Table 4-13 continued

sample name	MsncR-11-T	MsncR-11-T-A58
device name	avance 600	avance 600
temperature (K)	288	288
pulseprogram	noesyphjp.g1	noesyphjp.g1
TD(F2)[point]	4096	4096
TD(F1)[point]	512	512
NS	672	248
DS	16	16
SW(F2)[ppm]	23.9411	23.9411
SW(F1) [ppm]	23.9411	23.9411
SF(F2)[ppm]	600.13	600.13
SF(F1) [ppm]	600.13	600.13
d0 [μ s]	3	3
d1 [s]	1	1
d8 [s]	0.05	0.1
d9 [μ s]	50	50
p0 [μ s]	10	10
p1 [μ s]	9.98	9.98
p11 [dB]	0.13	0
O1 [Hz]	2823.63	2823.07
RG	128	128
SI(F2)	4096	4096
SI(F1)	2048	1024
WDW(F2)	GM	GM
WDW(F1)	GM	GM
LB(F2)	-15	-15
LB(F1)	-15	-15
GB(F2)	0.1	0.05
GB(F1)	0.1	0.1
ME_mod(F2)	no	no
ME_mod(F1)	LPfc	LPfc
BC_mod(F2)	qpol	qpol
BC_mod(F1)	no	no

Table 4-14 標識サンプルの測定パラメータ

sample name	MsnCR-11-T G標識	MsnCR-11-T U標識	MsnCR-11-I.IV GC標識	MsnCR-11-I.IV AU標識
device name	avance 600	avance 600	avance 600	avance 600
temperature (K)	288	288	288	288
pulseprogram	hmqcf3jrph.g	hmqcf3jrph.g	hmqcf3jrph.g	hmqcf3jrph.g
TD(F2)[point]	2048	2048	2048	2048
TD(F1)[point]	512	256	128	128
NS	32	24	16	16
DS	16	16	16	16
SW(F2)[ppm]	23.9411	23.9411	23.9411	23.9411
SW(F1)[ppm]	30	30	30	30
SF(F2)[ppm]	600.13	600.13	600.13	600.13
SF(F1)[ppm]	60.81	60.81	60.81	60.81
d0 [μs]	0.000003	0.000003	0.000003	0.000003
d1 [s]	1	1	1	1
d2 [s]	0.00345	0.00345	0.00345	0.00345
d9 [μs]	50	50	50	50
d11 [s]	0.03	0.03	0.03	0.03
p1 [μs]	10	10	10	10
p21	13.3	13.3	13.3	13.3
p11 [dB]	0.15	0.22	-0.2	-0.1
p113 [dB]	10.6	10.6	10.6	10.6
O1 [Hz]	2823.36	2823.73	2820.1	2821.75
RG	64	64	64	64
PCPD3 [μs]	190	190	190	190
SFO3 [MHz]	60.82	60.82	60.82	60.82
SI(F2)	2048	2048	2048	2048
SI(F1)	256	1024	256	256
WDW(F2)	GM	GM	QSINE	QSINE
WDW(F1)	GM	GM	QSINE	QSINE
LB(F2)	-15	-15	-	-
LB(F1)	-15	-15	-	-
GB(F2)	0.05	0.05	-	-
GB(F1)	0.1	0.1	-	-
SSB(F2)	-	-	2	2
SSB(F1)	-	-	2	2
ME_mod(F2)	no	no	no	no
ME_mod(F1)	no	LPfc	no	no
BC_mod(F2)	quad	quad	quad	quad
BC_mod(F1)	no	no	no	no

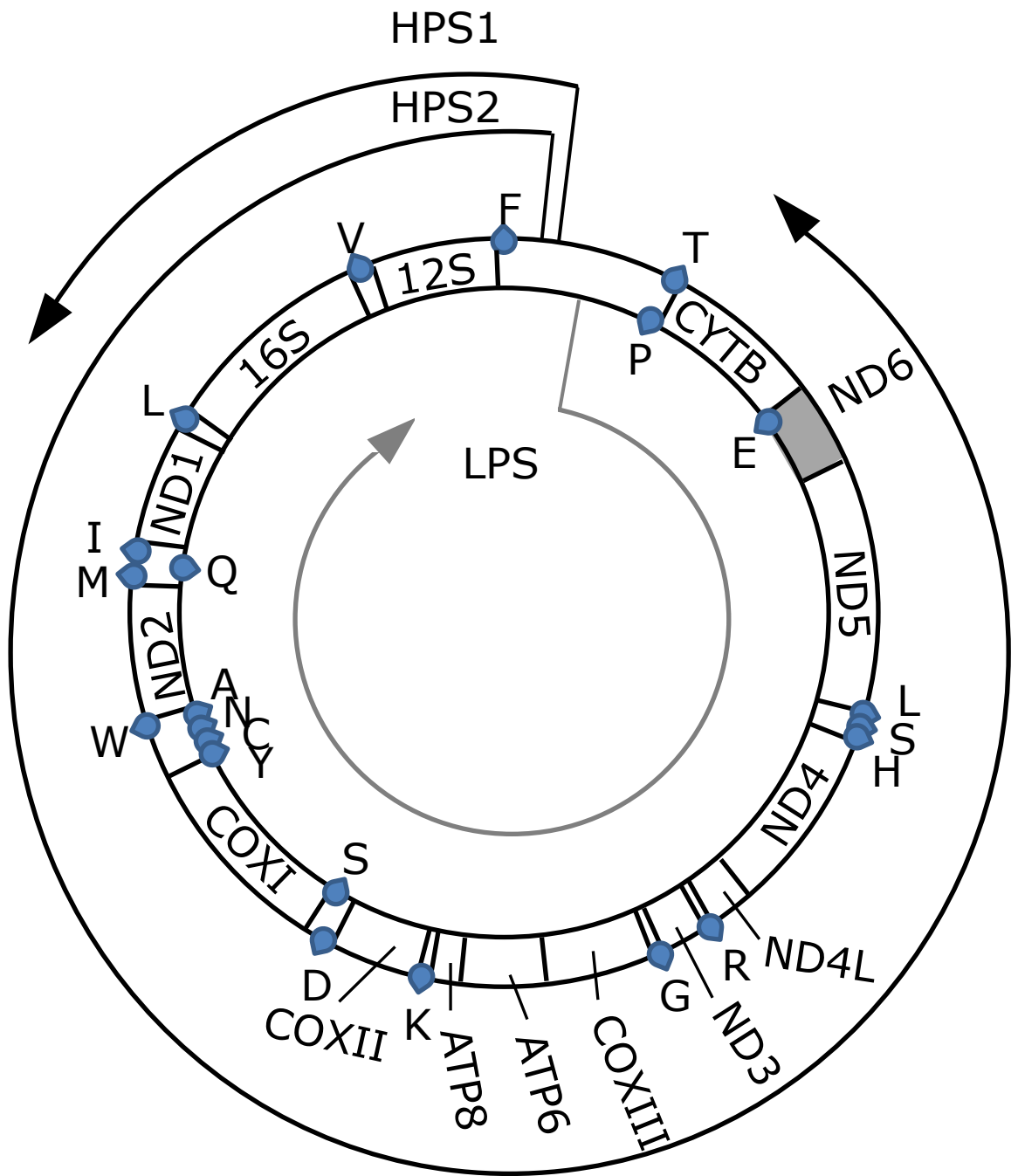


Fig. 4-1 哺乳類のミトコンドリアゲノムの模式図
 青の丸がtRNA，白い枠の中に書かれた文字が各タンパク質とrRNAを示す。HPSはHeavy chainの転写方向を示し，LPSはLight chainの転写方向を示す。

a

Chromosome 2



b

Mitochondrial genome

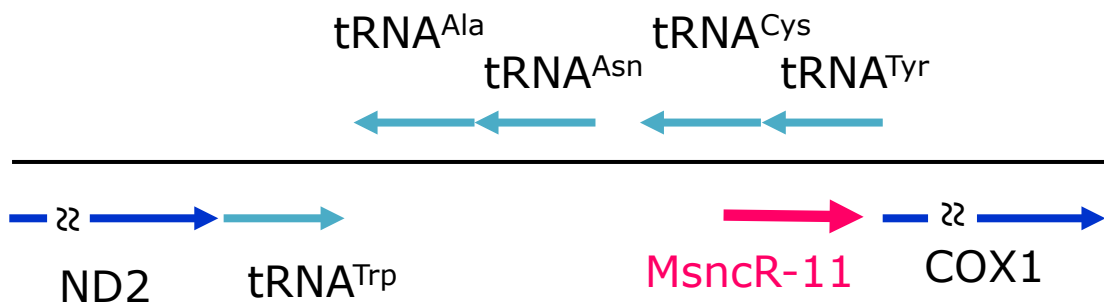


Fig. 4-2 MsncR-11のゲノム上の位置
(a)核ゲノム上の位置(b)ミトコンドリアゲノム上の位置
赤MsncR-11, 青mRNA, 水色tRNA

ゲノム

代表的な配列

```
TTTGGCAATTCGACATGAATAATCACCTTAAAGACCTCTGGTA---TTTACCCTAAGTTCAATTAATCGTT~  
AUGAAUAUACCCUUAAGACCUCUGGUA---UUUAAAAAA  
ACACCUUCGAAUUUGCAAUUCGACAUGAAUAUACCCUUAAGACCUCUGGUA---UUUAAAAAAAAAAAA  
UGAAUAUACCCUUAAGACCUCUGGUA---UUUAAAAAAAAAAAA
```

Fig. 4-3 MsncR-11のゲノム上の位置
一番上の配列が、ゲノムの配列、青文字COXIの配列
2番目がKiyosawa, H., et al, *Genomics* **106**,(2015)に報告したMsncR-11の配列
3番目と4番目の配列はシーケンサー解析により得られた配列が、5'末端と3'
末端が最も長くなるように配置した。

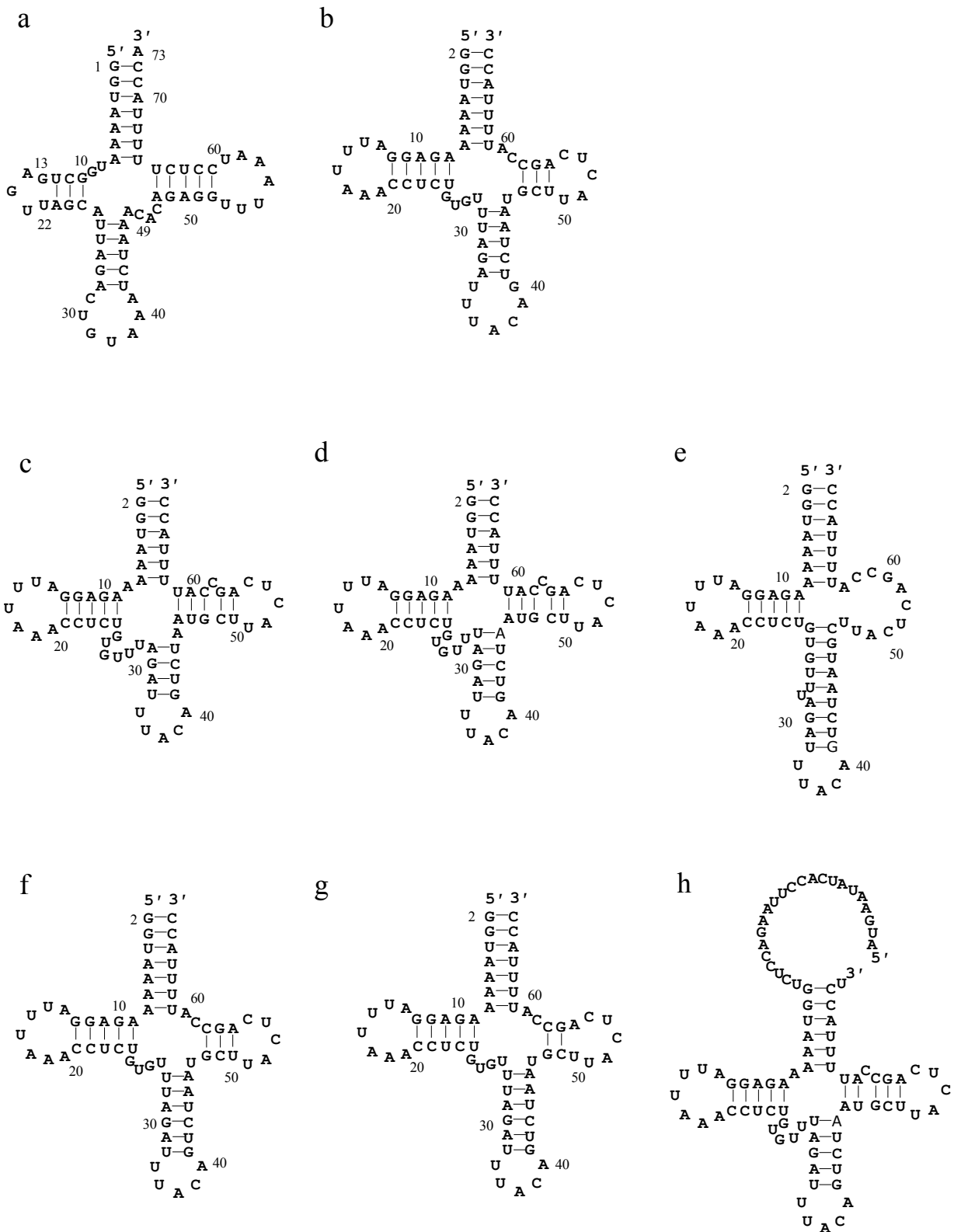


Fig. 4-4 MsnrR-11を複数のプログラムにより予測した二次構造
 (a)ミトコンドリアのtRNA^{Tyr}(tRNA db ID:tdbD00003621)
 (b)tRNA^{Tyr}に基づき並べた, (c, d, e)vsfold5でKuhn lengthをそれぞれ
 7, 8, 9で予測した, (f)Mfold, (g)Centroid fold

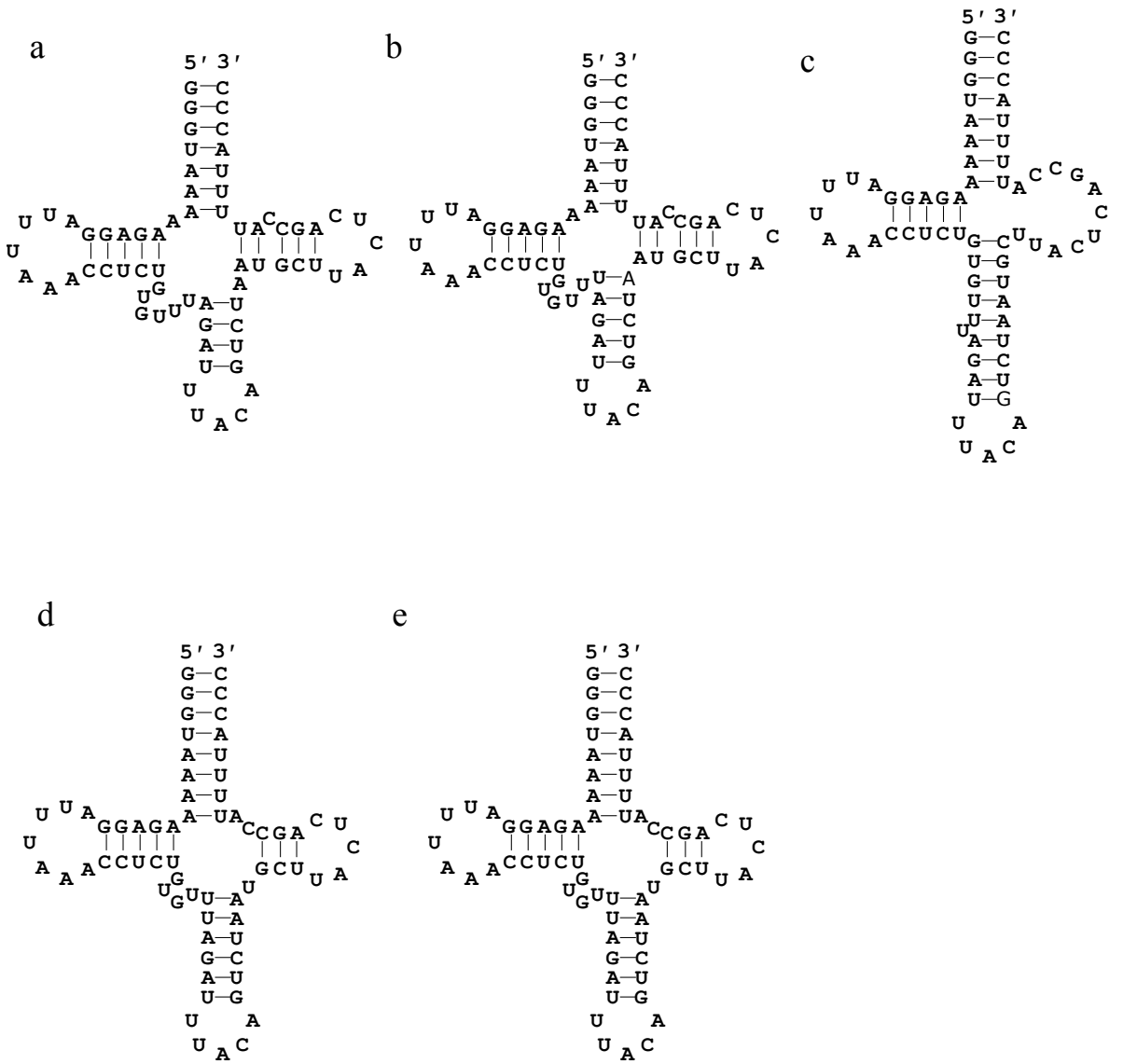


Fig. 4-5 Msnr-11の末端にGC塩基対を付加し予測して二次構造 (a-e)Fig.4-4と同じ条件で予測を行った

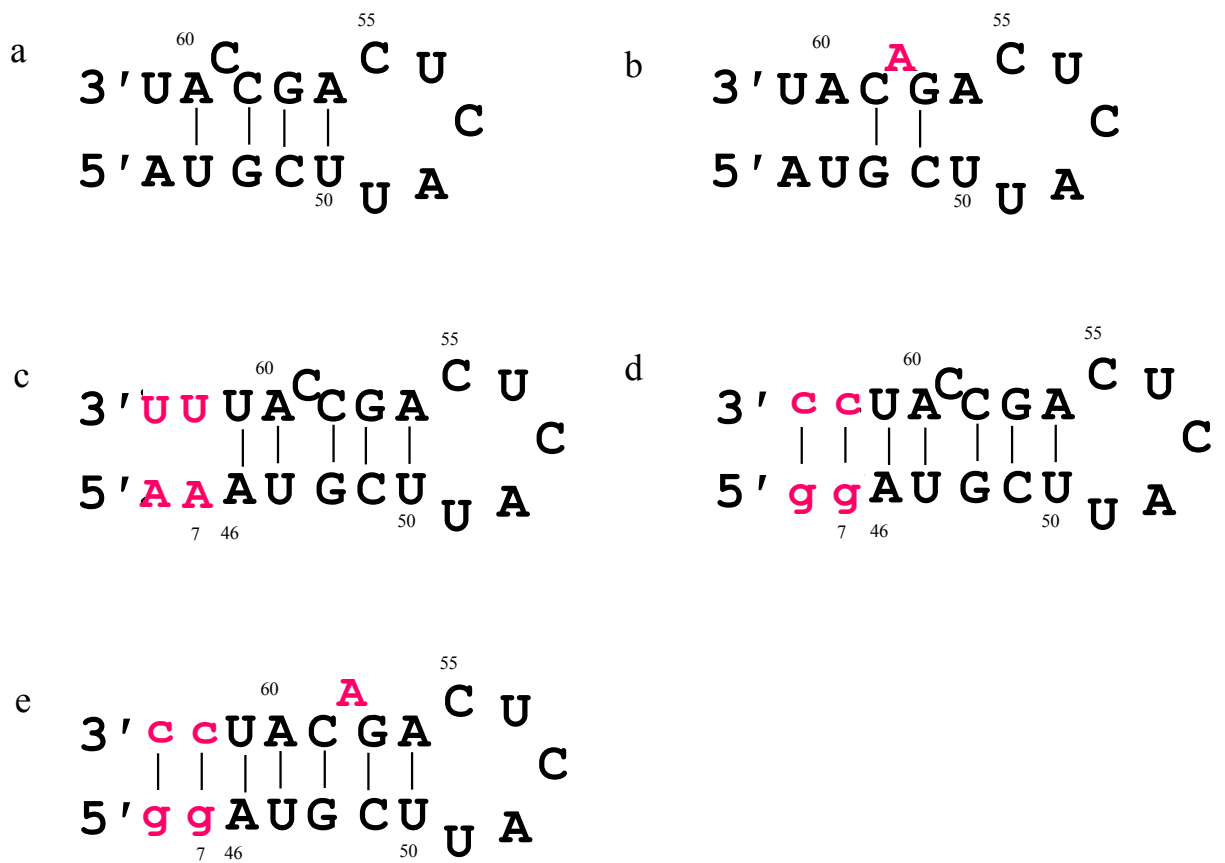


Fig. 4-6 MsncR-11のTアームに当たるフラグメントとバリエーションの解析によって明らかになった二次構造
 (a)MsncR-11-IV , (b)MsncR-11-IV-A58 , (c)MsncR-11-AU2 , (d)MsncR-11-GC2 , (e)MsncR-11-GC2-A58

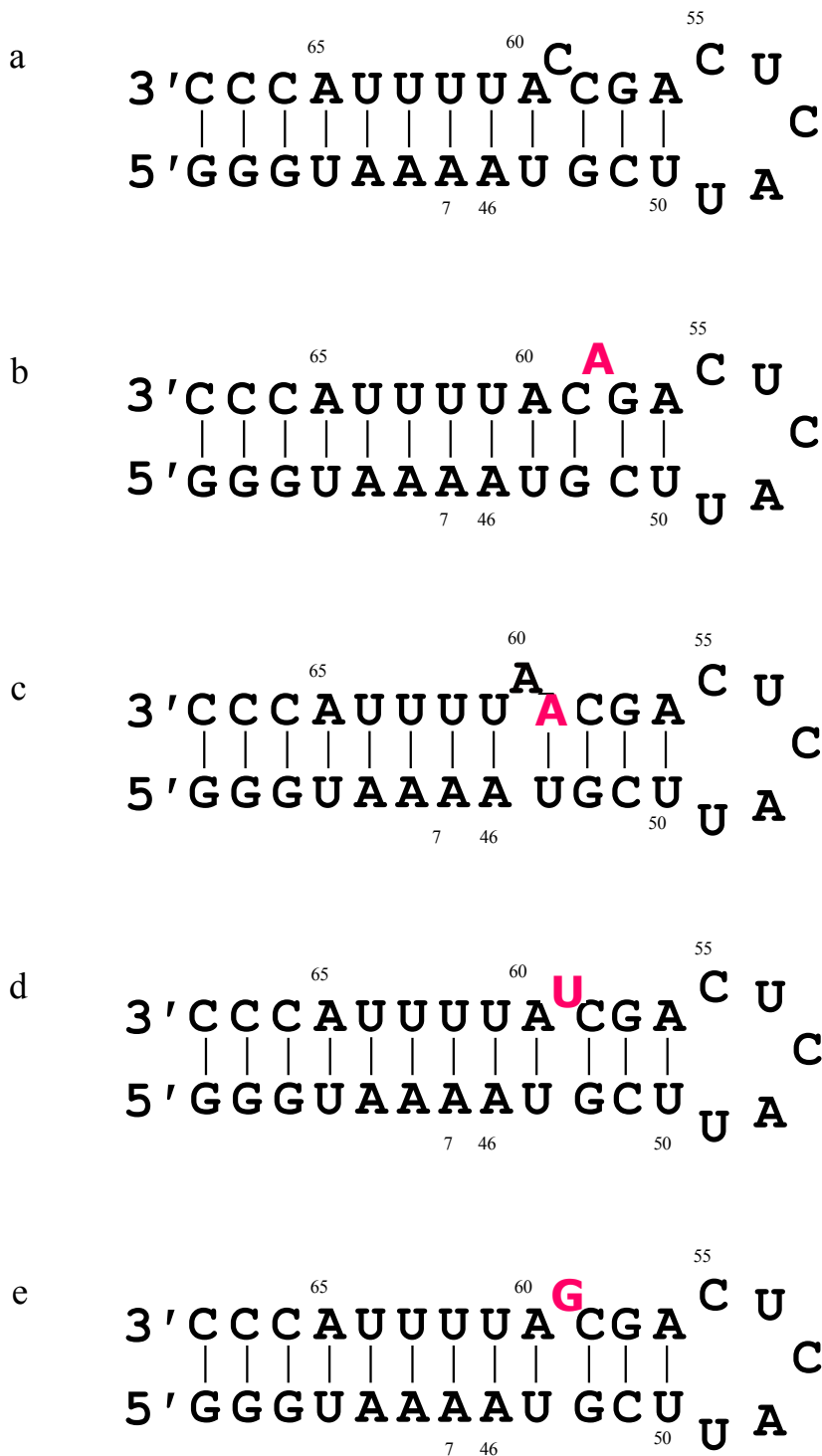


Fig. 4-7 MsncR-11のシュード-アクセプター-Tアームに当たるフフラグメントとバリエントを解析により明らかにした二次構造
 (a)MsncR-11-T, (b)MsncR-11-T-A58, (c)MsncR-11-T-A59, (d)MsncR-11-T-U59, (e)MsncR-11-G59

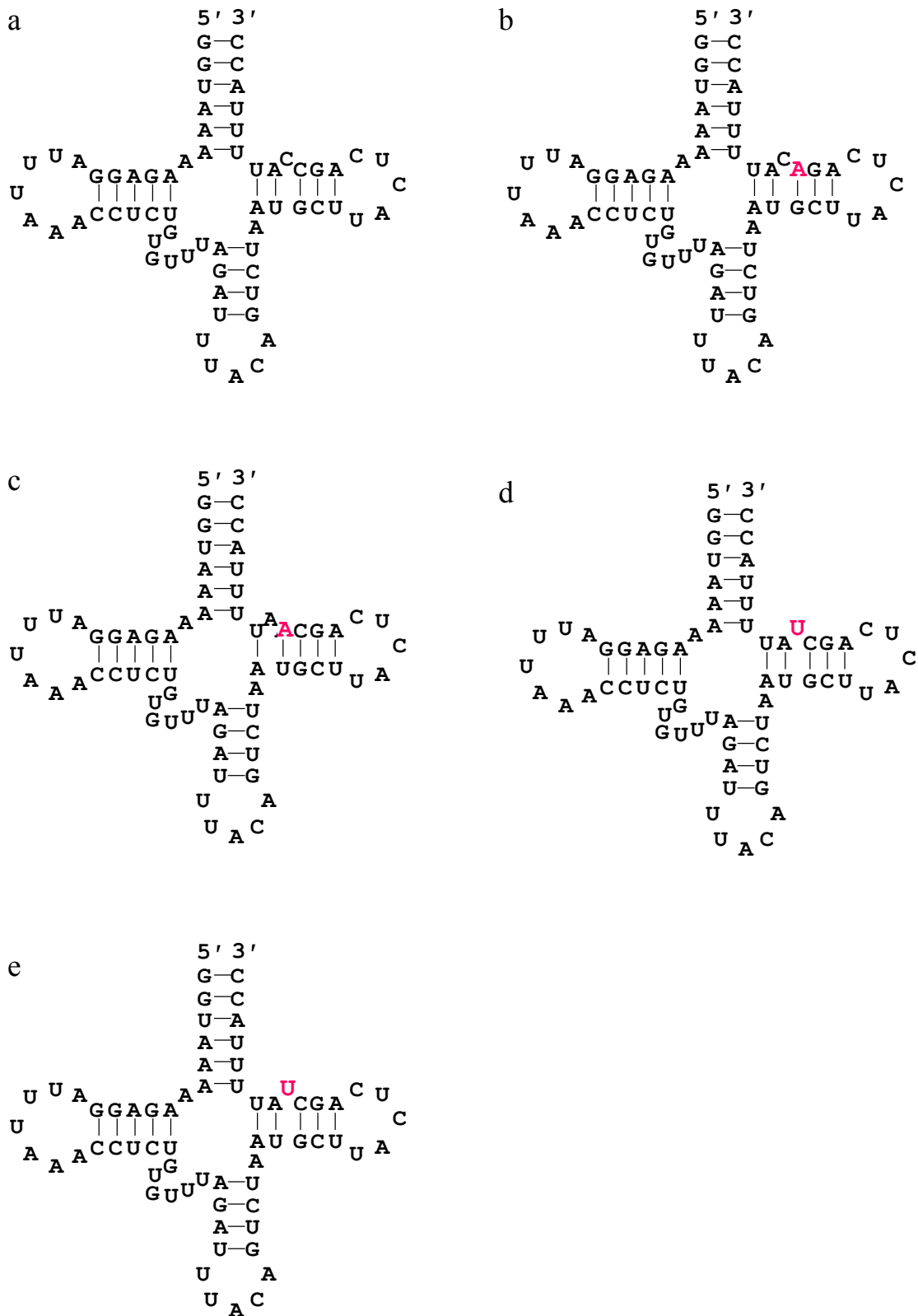
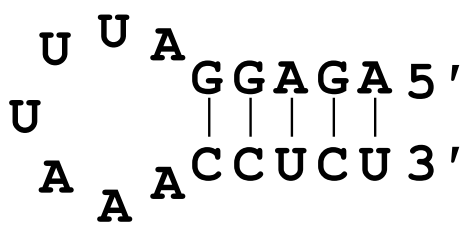


Fig. 4-8 MsncR-11-Tとバリエーションの二次構造
 (a)MsncR-11-T, (b)MsncR-11-T-A58, (c)MsncR-11-T-A59, (d)MsncR-11-T-U59, (e)MsncR-11-G59

a



b

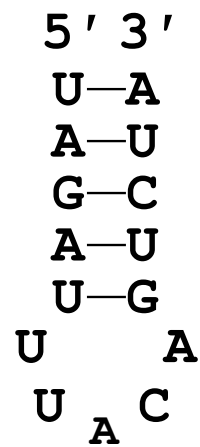


Fig. 4-9 MsncR-11-Tのdアームに当たる断片とアンチコドンアームに当たる断片の二次構造
 (a)MsncR-11-II, (b)MsncR-11-III

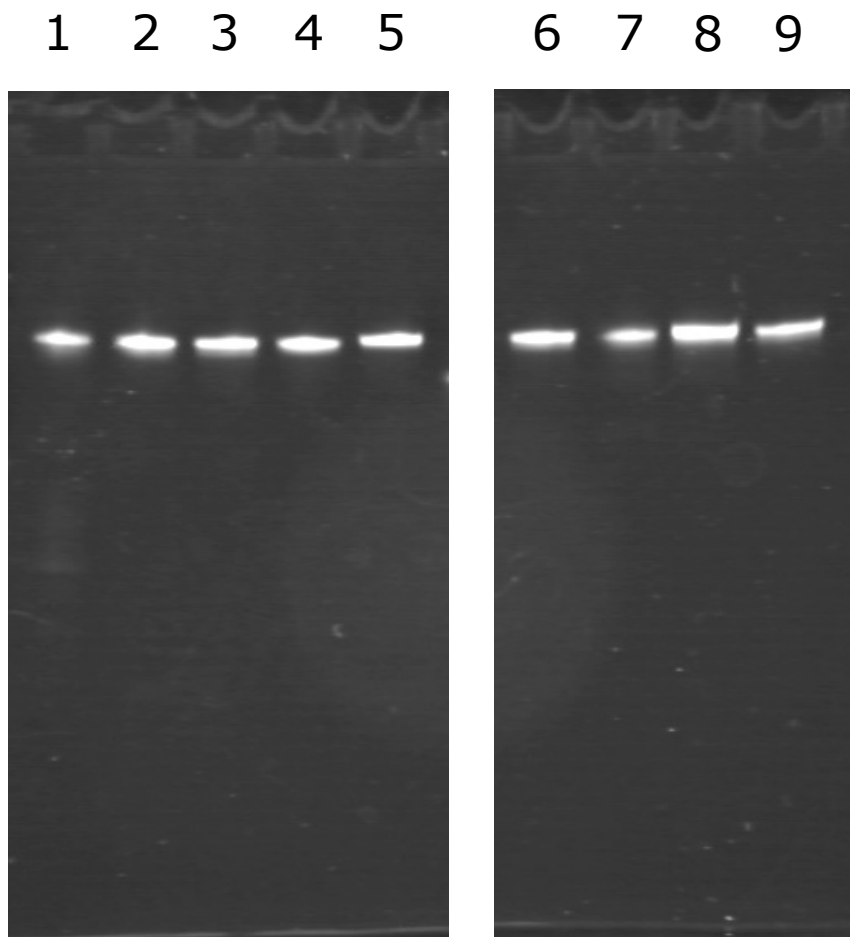


Fig. 4-10 (a) 精製したRNAの12%変性PAGEによる確認
 1. MsncR-11-T, 2. MsncR-11-T -A 58, 3. MsncR-11-T -A59,
 4. MsncR-11-T -U59, 5. MsncR-11-T -G59, 6. MsncR-11-T _A label,
 7. MsncR-11-T _C label, 8. MsncR-11-T _U label, 9. MsncR-11-T _G label

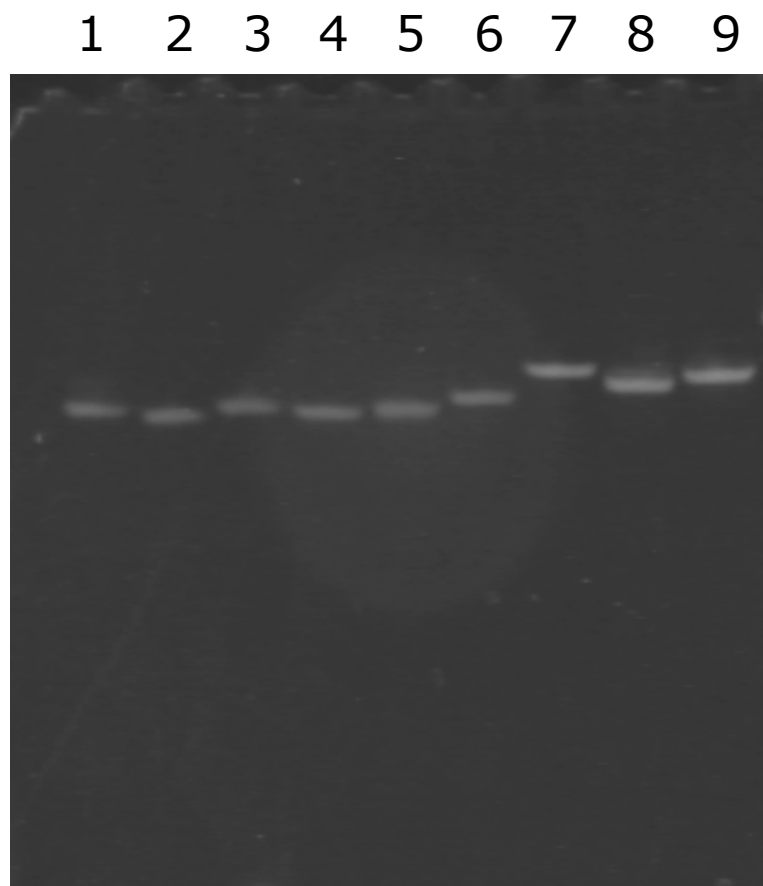


Fig. 4-10 (b) 精製したRNAの20%変性PAGEによる確認

1. MsncR-11-II, 2. MsncR-11-II -U16, 3. MsncR-11-II I, 4. MsncR-11-IV,
5. MsncR-11-IV -U54, 6. MsncR-11-IV -A58, 7. MsncR-11-IV- AU2, 8.
MsncR-11-IV- GC2, 9. MsncR-11-IV -GC2-A58,

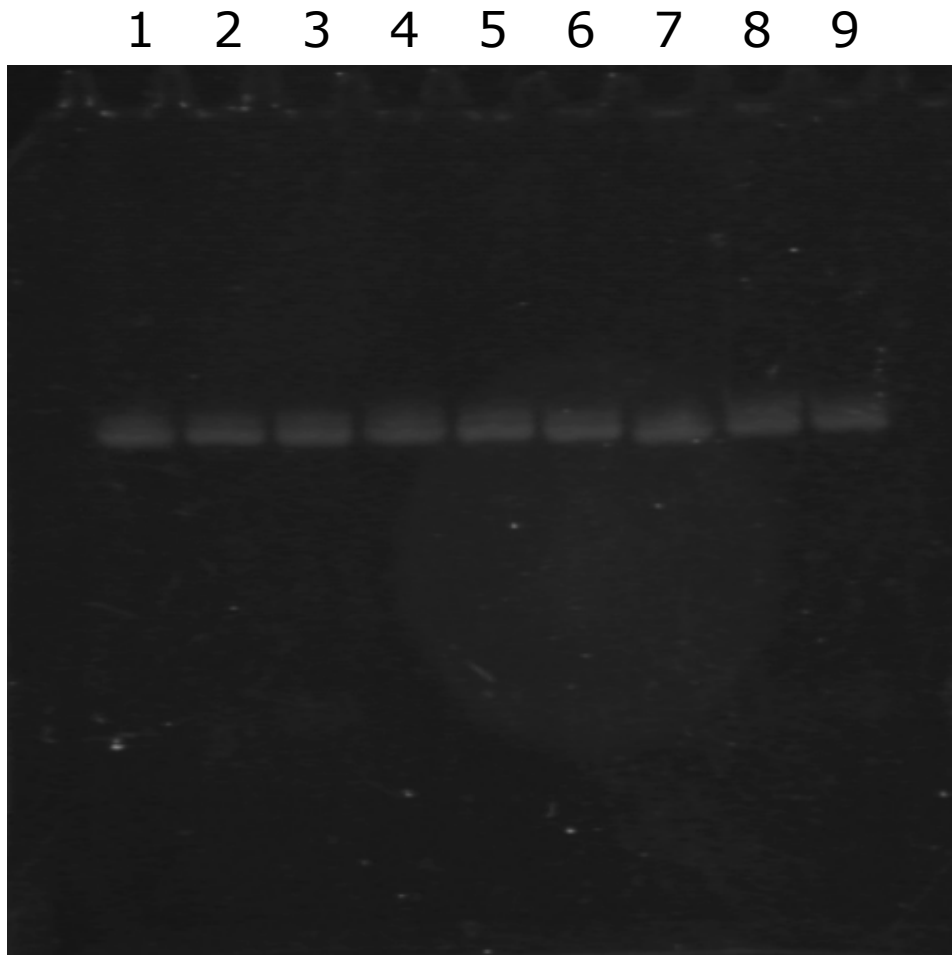


Fig. 4-10 (c) 精製したRNAの20%変性PAGEによる確認

1. MsncR-11-I.IV , 2. MsncR-11-I.IV _GC 標識, 3. MsncR-11-I.IV _AU標識, 4. MsncR-11-I.IV -A58, 5. MsncR-11-I.IV -A58_GC標識, 6. MsncR-11-I.IV -A58_AU標識, 7. MsncR-11-I.IV -A59, 8. MsncR-11-I.IV -U59, 9. MsncR-11-I.IV -G59

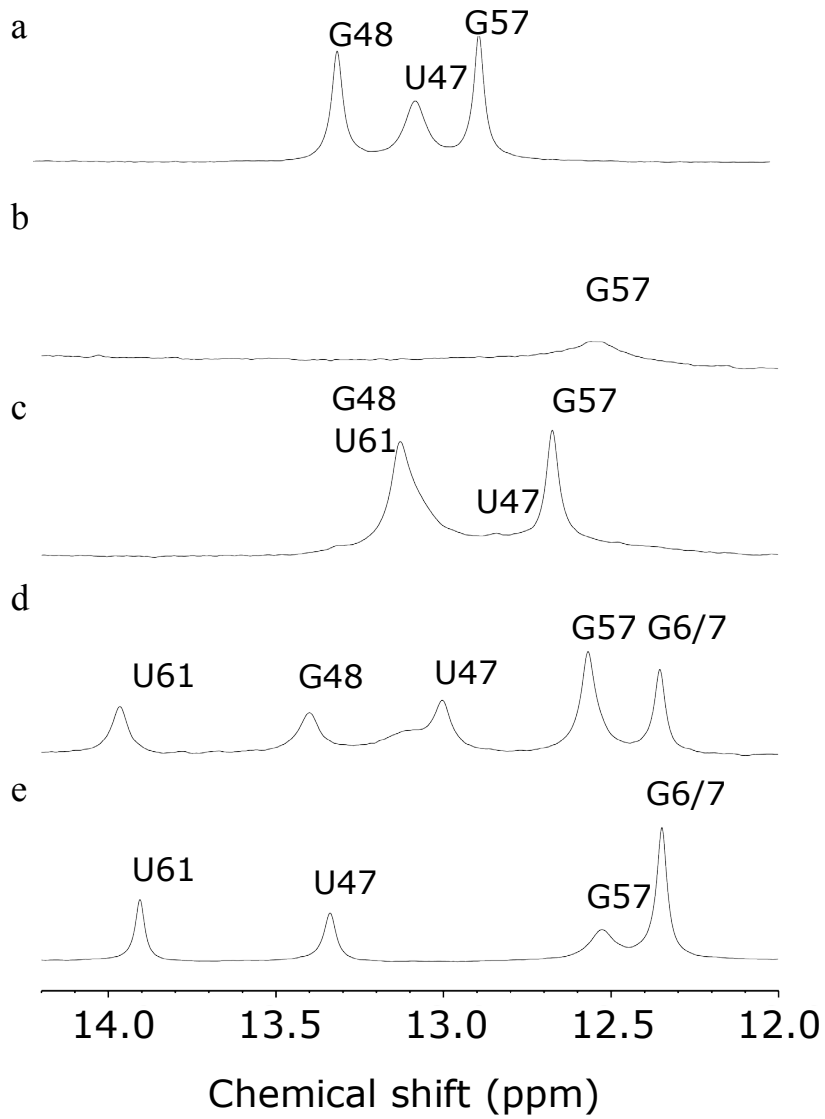


Fig. 4-11 MsncR-11-IVとバリエントの1Dスペクトル
 (A)MsncR-11-IV, (b)MsncR-11-IV-A58, (c)MsncR-11-AU2, (d)MsncR-11-GC2, (e)MsncR-11-GC2-A58

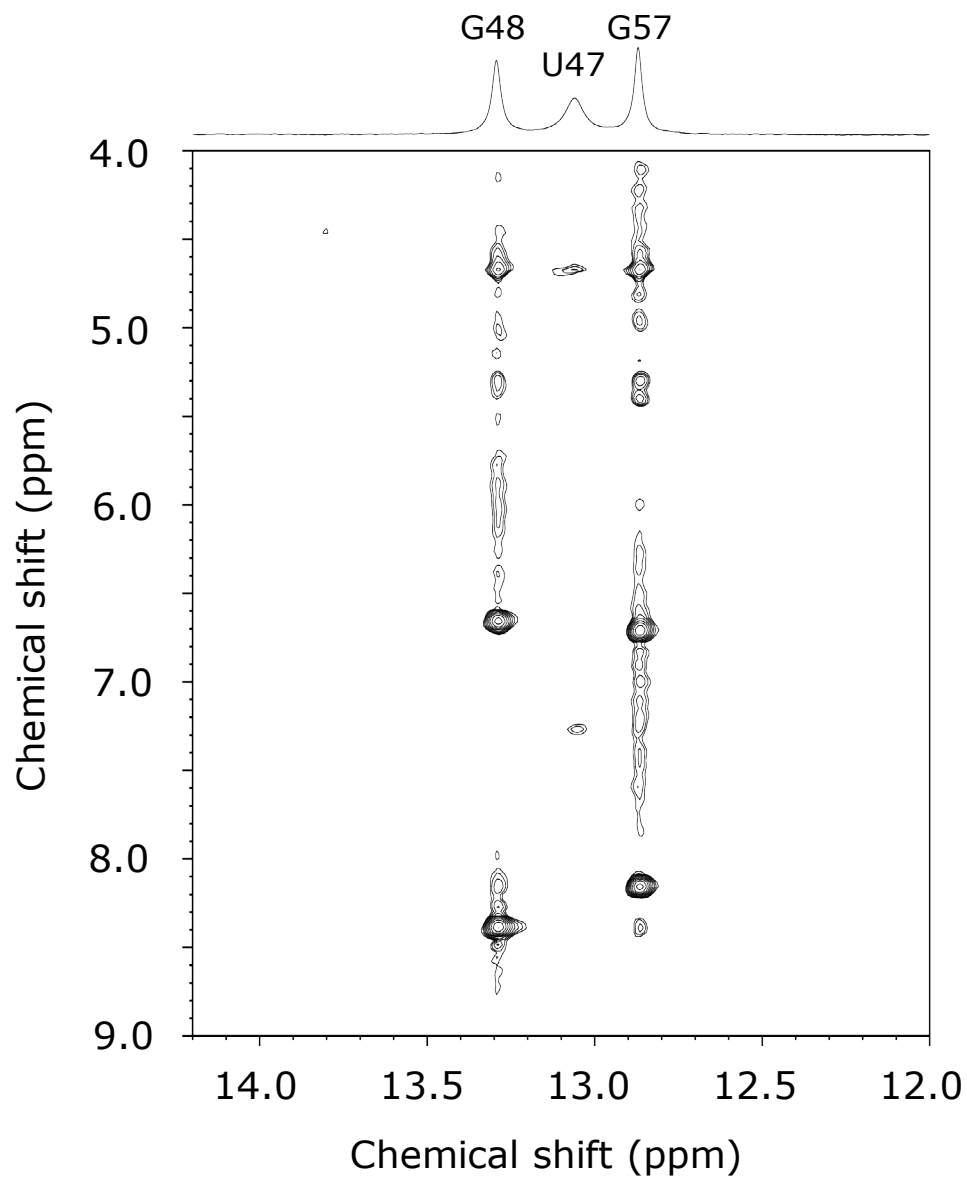


Fig. 4-12 MsnR-11-IVのNOESYスペクトル

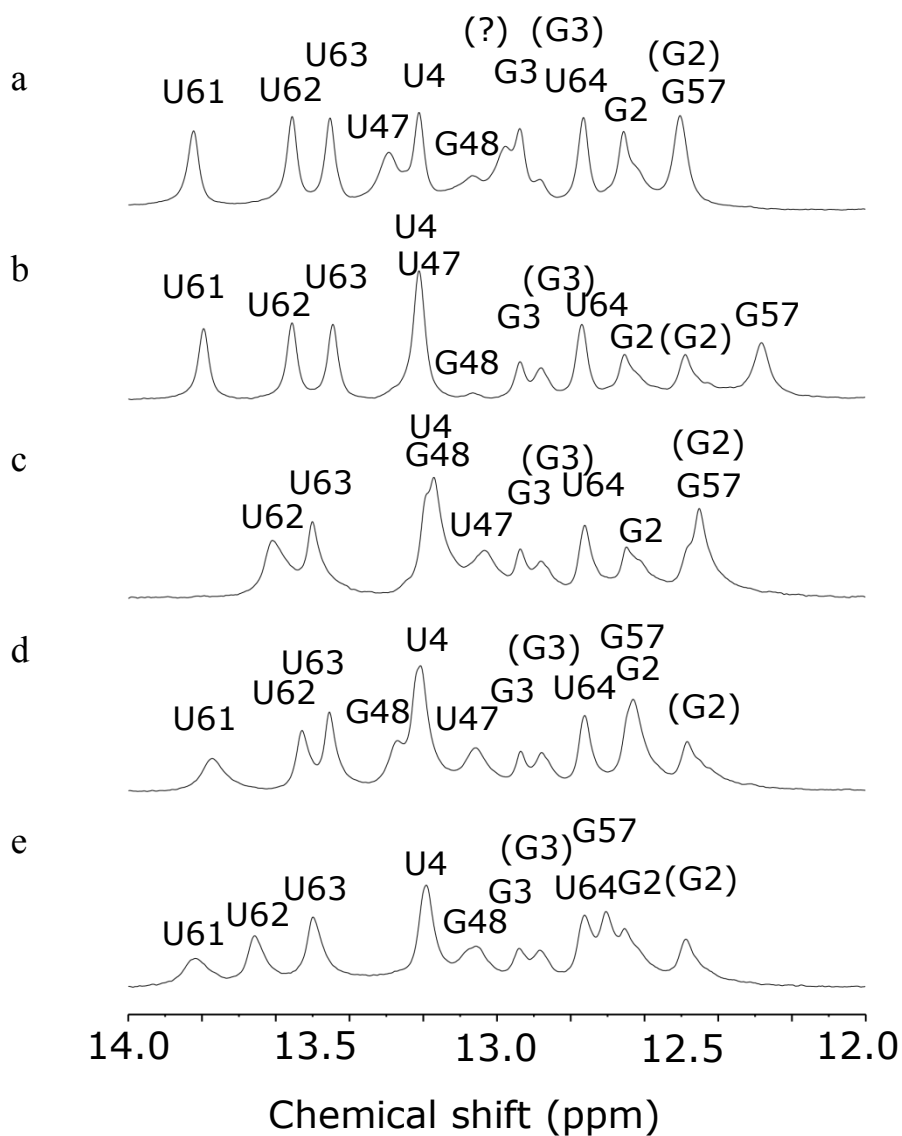


Fig. 4-13 MsnCR-11-I.IVとバリエーションの1Dスペクトル
 (a)MsnCR-11-T, (b)MsnCR-11-T-A58, (c)MsnCR-11-T-A59, (d)MsnCR-11-T-U59, (e)MsnCR-11-G59

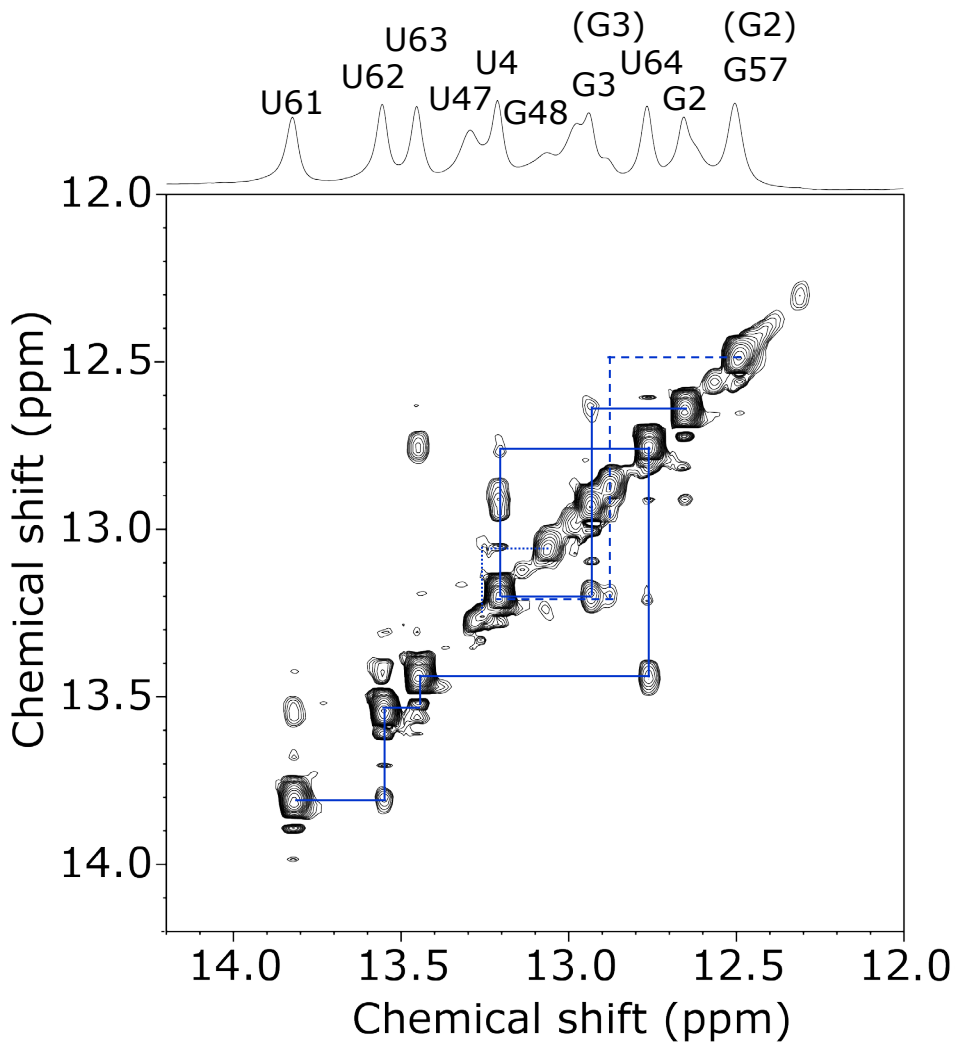
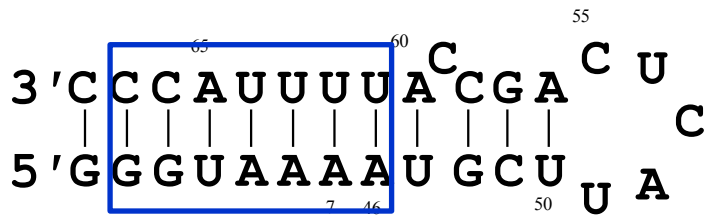


Fig. 4-14 MsnR-11-I.IV NOESYスペクトル
MsnR-11-I.IVの二次構造(上), 連鎖帰属を青線をつないだ

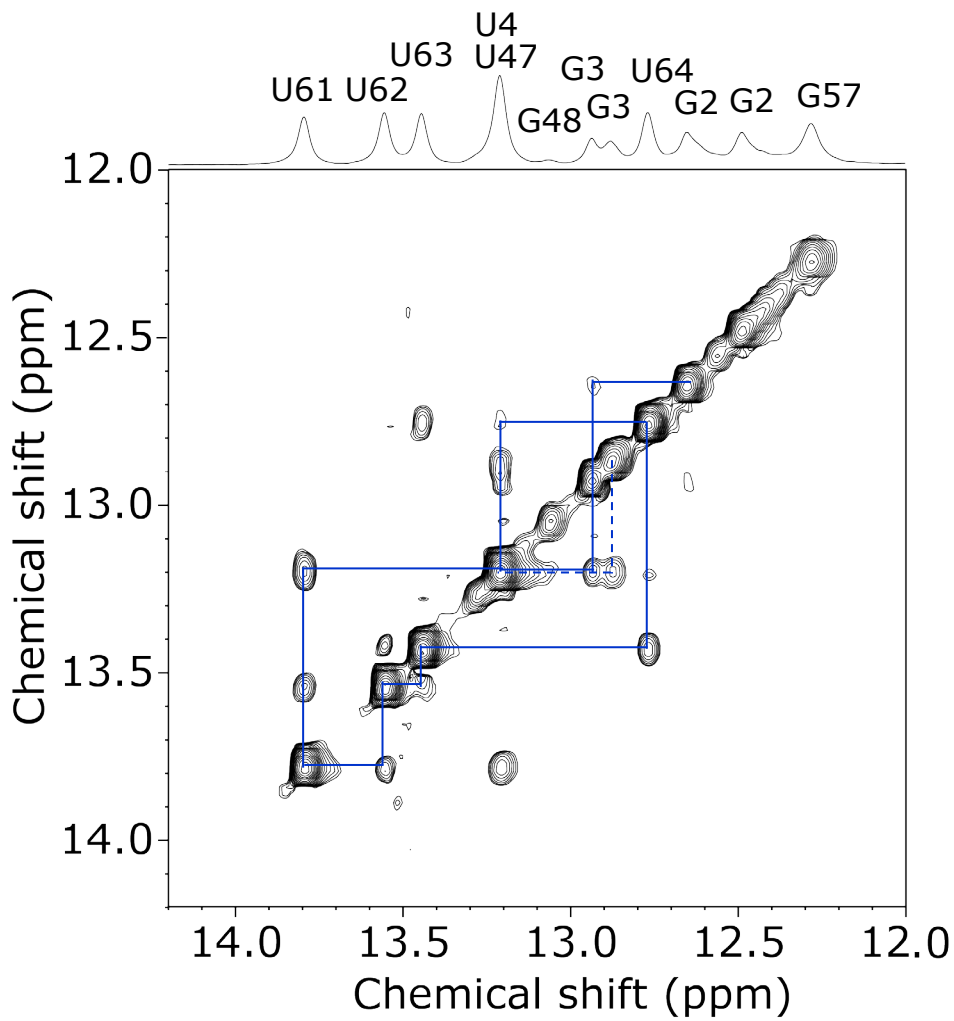
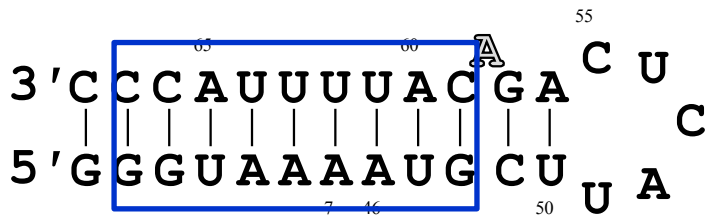


Fig. 4-15 MsnR-11-I.IV-A58 NOESYスペクトル
 MsnR-11-I.IV-A58の二次構造(上), 連鎖帰属を青線をつないだ

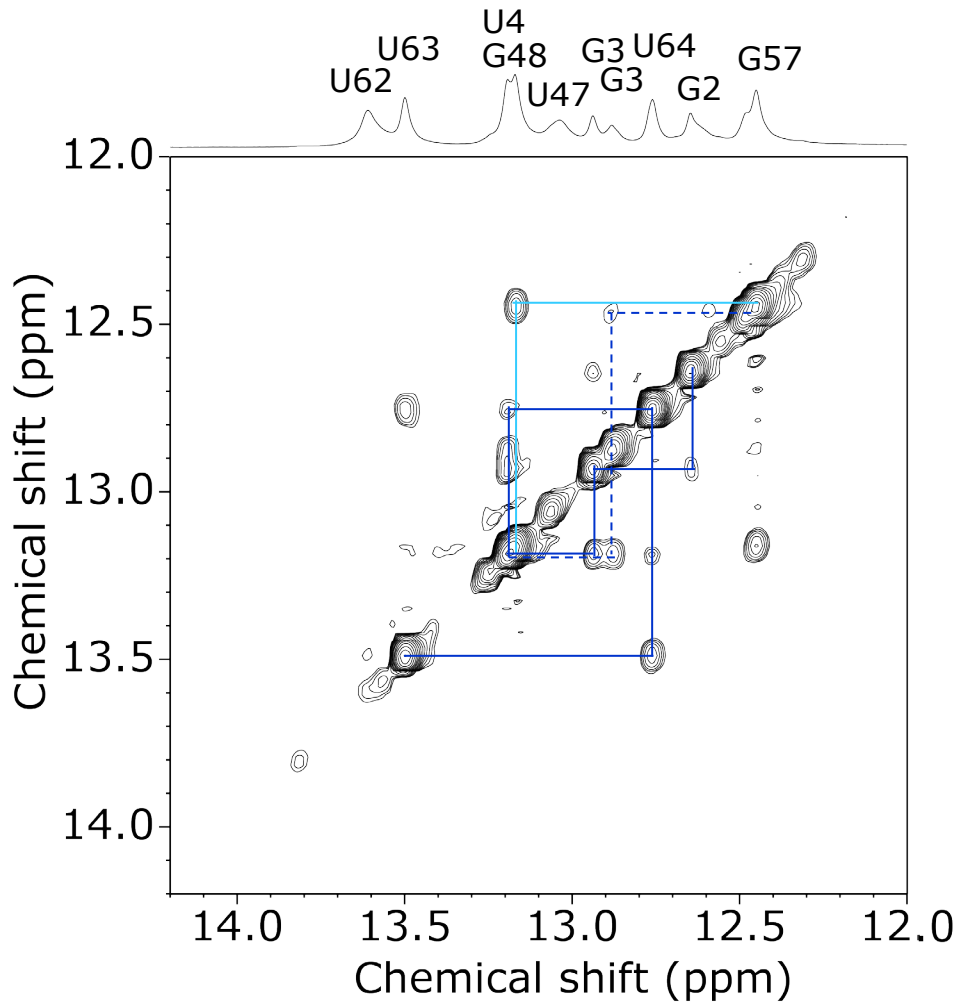
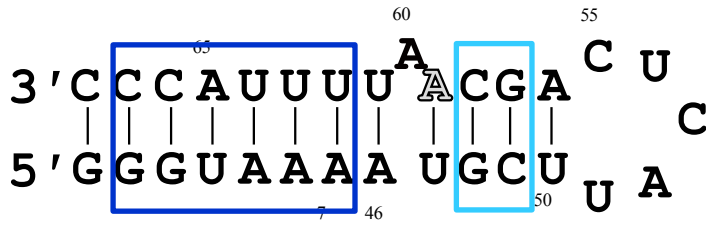


Fig. 4-16 Msnr-11-I.IV-A59 NOESYスペクトル
 Msnr-11-I.IV-A59の二次構造(上), 連鎖帰属を青線, 水色線でつないだ

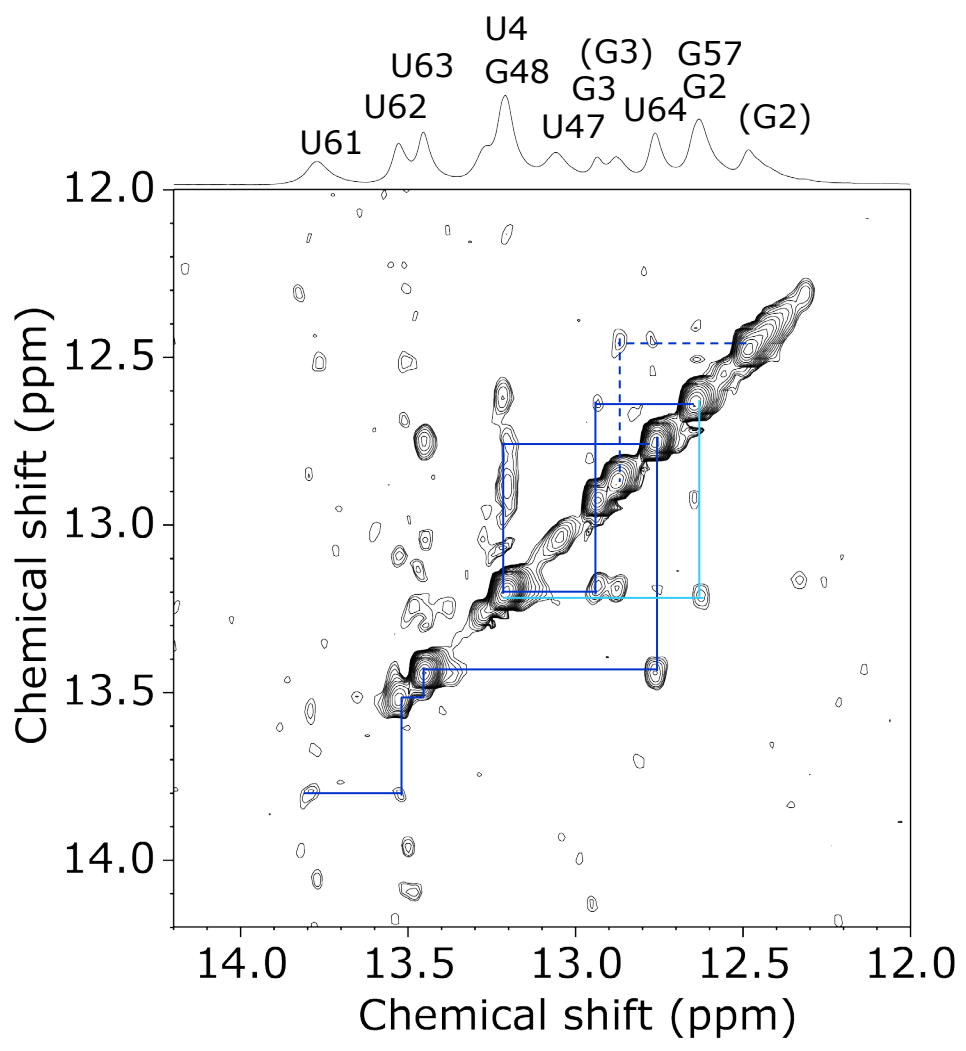
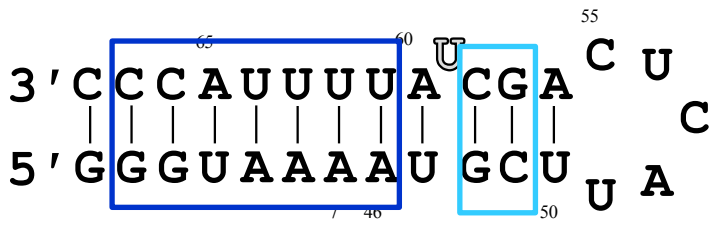


Fig. 4-17 MsnR-11-I.IV-U59NOESYスペクトル
 MsnR-11-I.IV-U59の二次構造(上), 連鎖帰属を青線, 水色線でつないだ

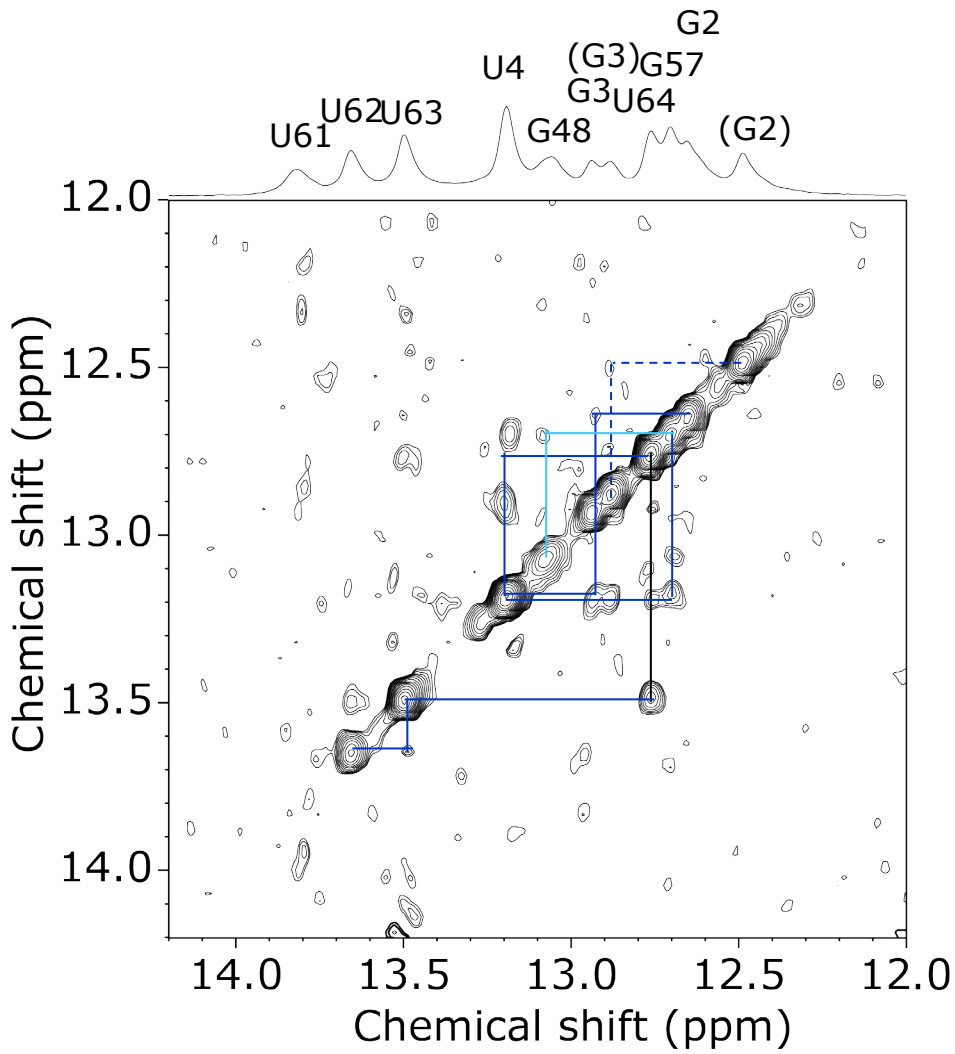
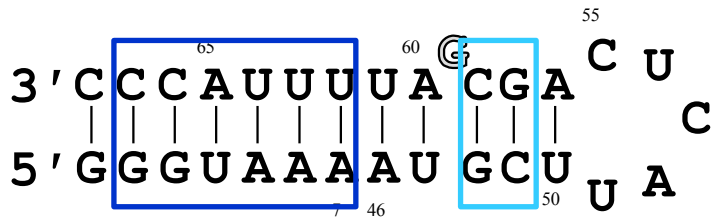


Fig. 4-18 MsnR-11-I.IV-G59NOESYスペクトル
 MsnR-11-I.IV-G59の二次構造(上), 連鎖帰属を青線, 水色線でつないだ

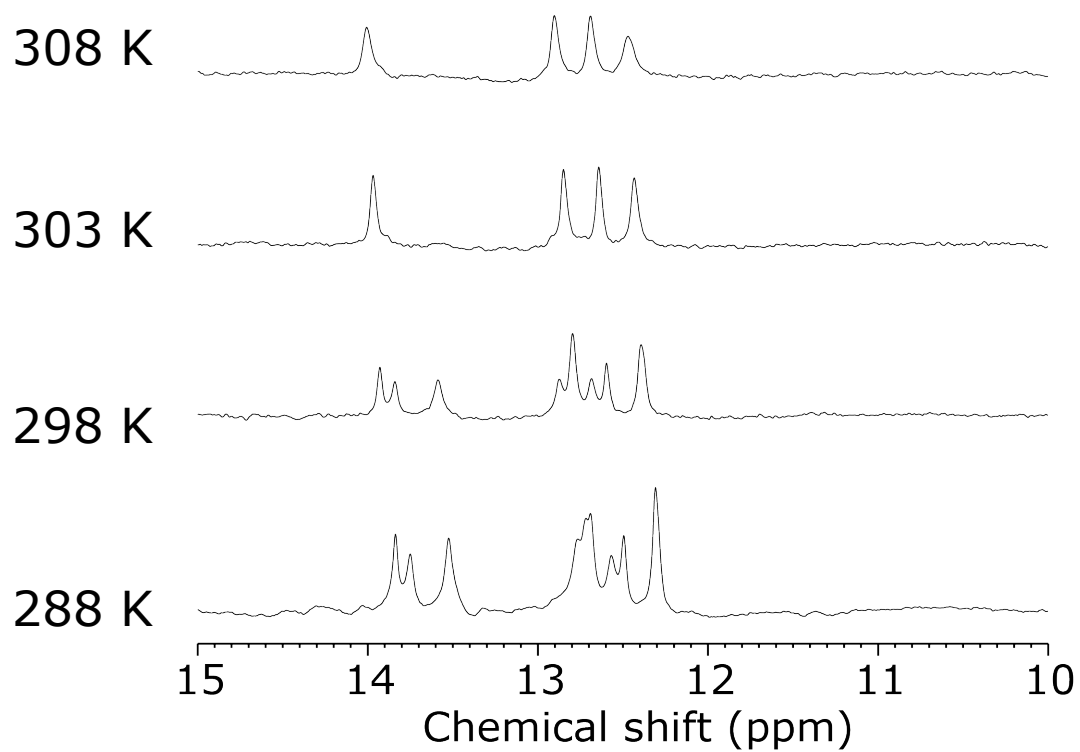


Fig. 4-19 MsncR-11-IIの1Dスペクトル温度変化

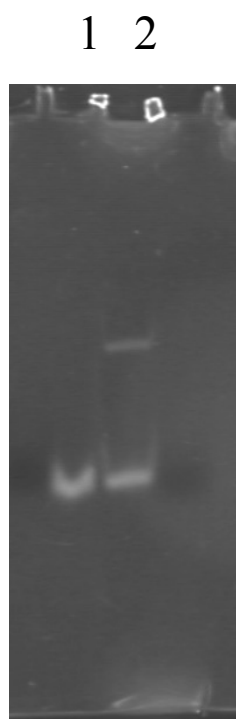


Fig. 4-20 MsnR-11-II 20%非変性PAGE Mg^{2+} 5mM存在下による二量体化の確認
レーン1.MsnR-11-IV, 2.MsnR-11-II

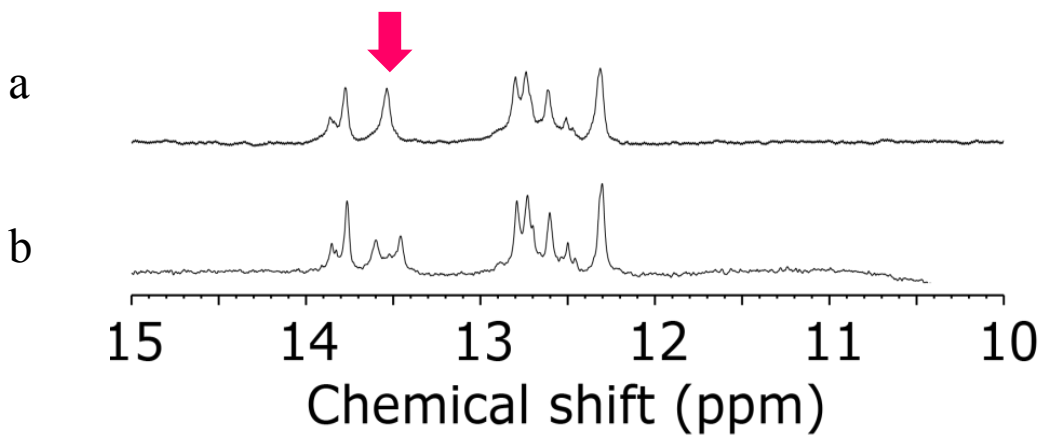


Fig. 4-21 MsnR-11-II 1D₁₅N_Deccoupleと1D_JRスペクトルの比較
(a)1D₁₅N_Deccouple, (b)1D_JR
Deccoupleで一本になったシグナル(矢印)

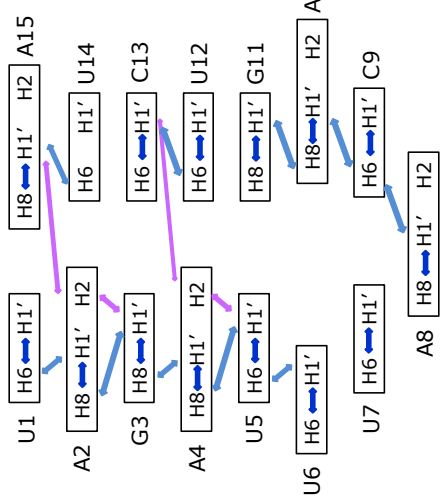
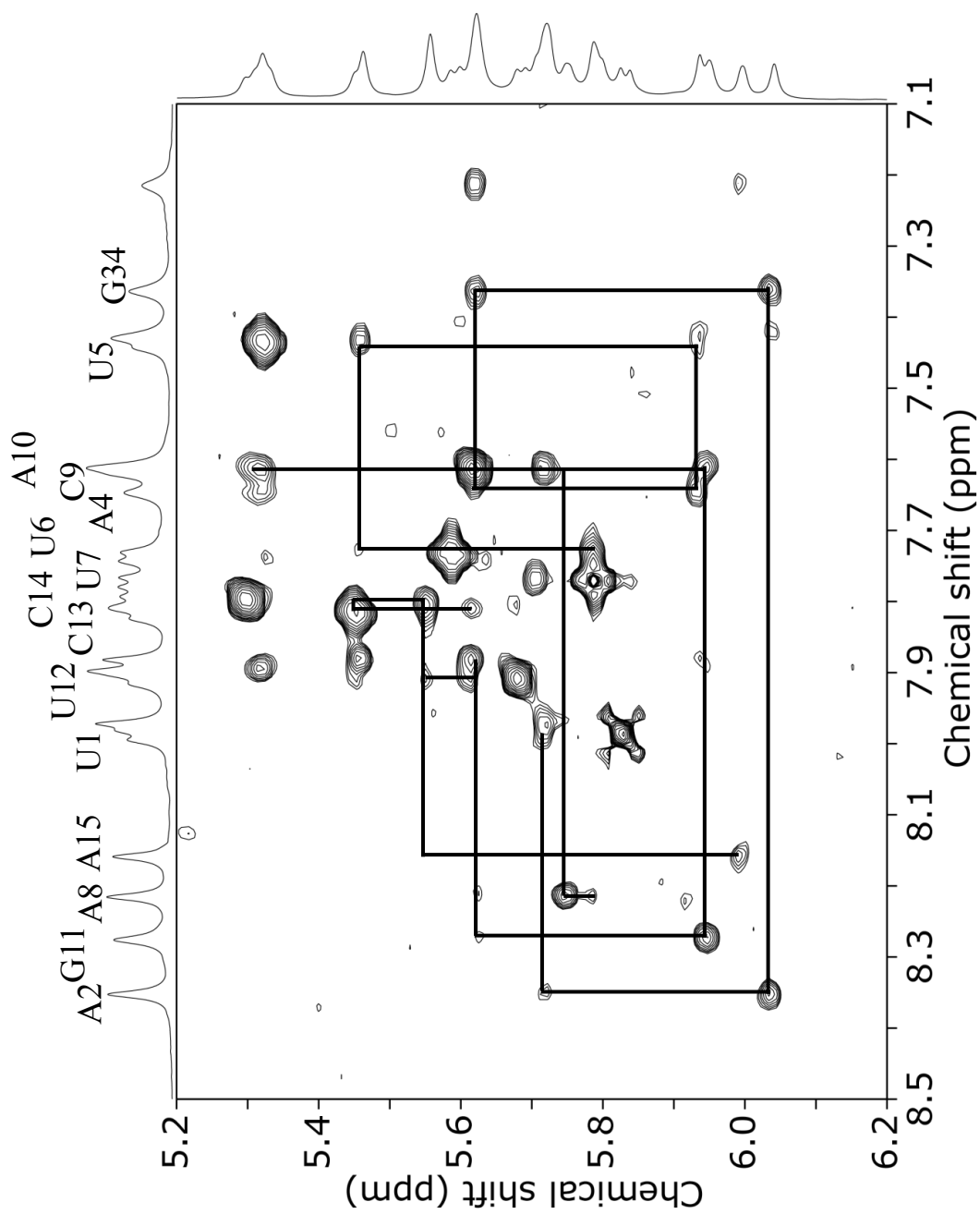


Fig. 4-22 MsnR-11-III 1D_{JR}とNOESYスペクトル
MsnR-11-IIIの帰属の模式図(左)

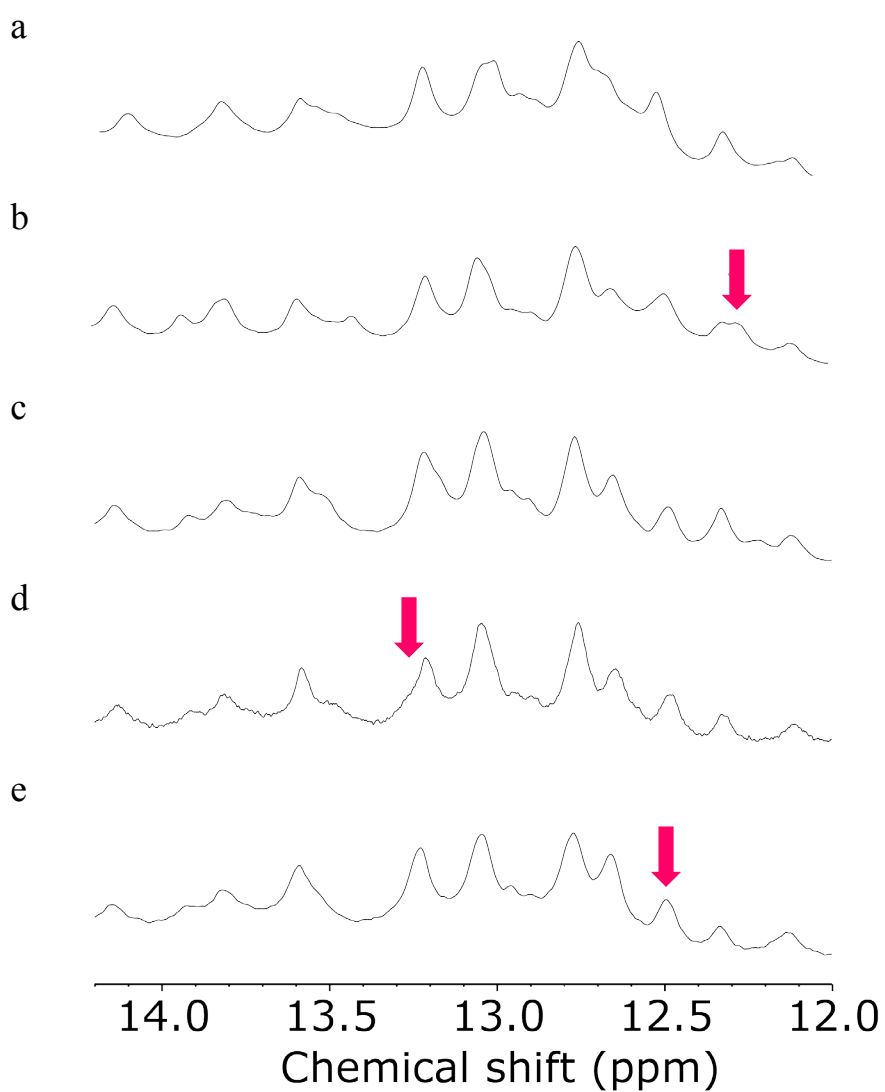


Fig. 4-23 MsncR-11-Tとバリエーションの1Dスペクトル

(A)MsncR-11-T, (b)MsncR-11-T-A58, (c)MsncR-11-T-A59, (d)MsncR-11-T-U59, (e)MsncR-11-G59

MsncR-11-I.IVのバリエーションに特徴的に変化したシグナルの位置を示す (Black arrows)

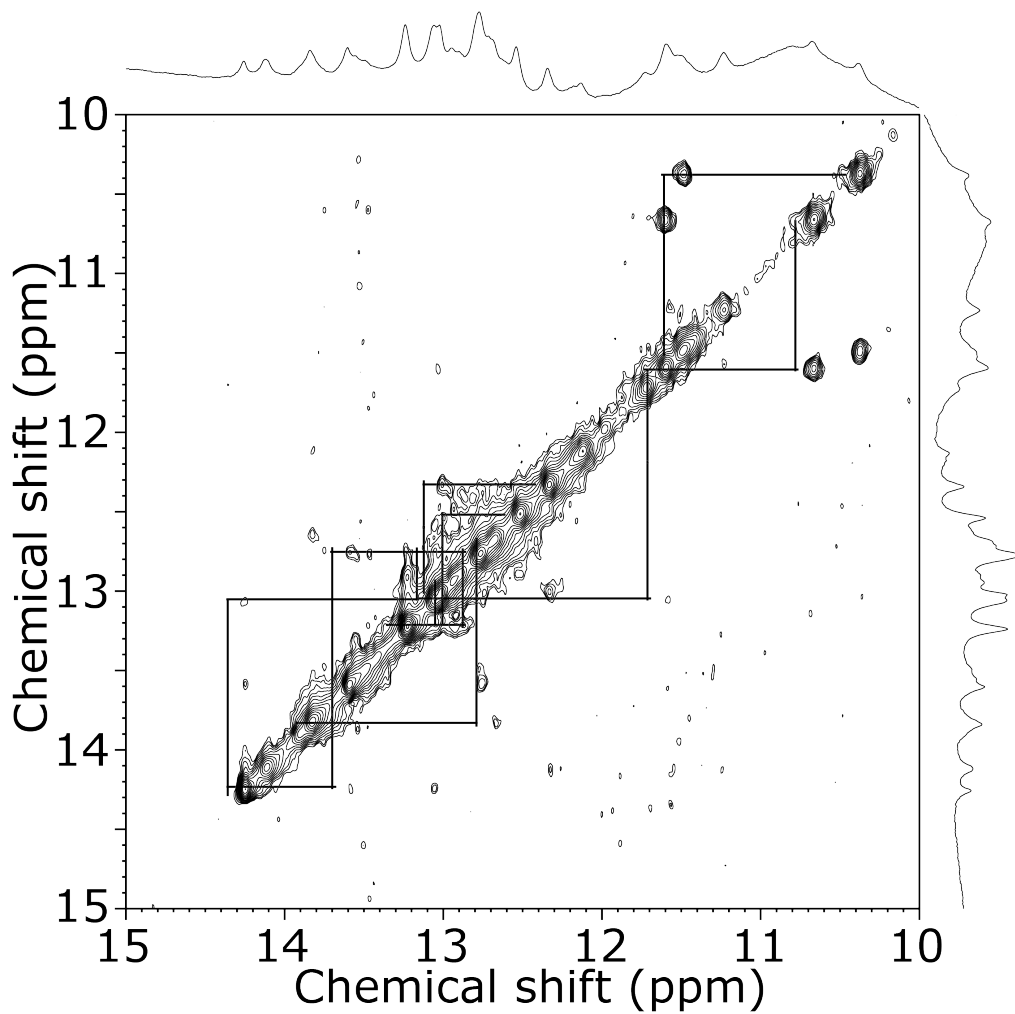
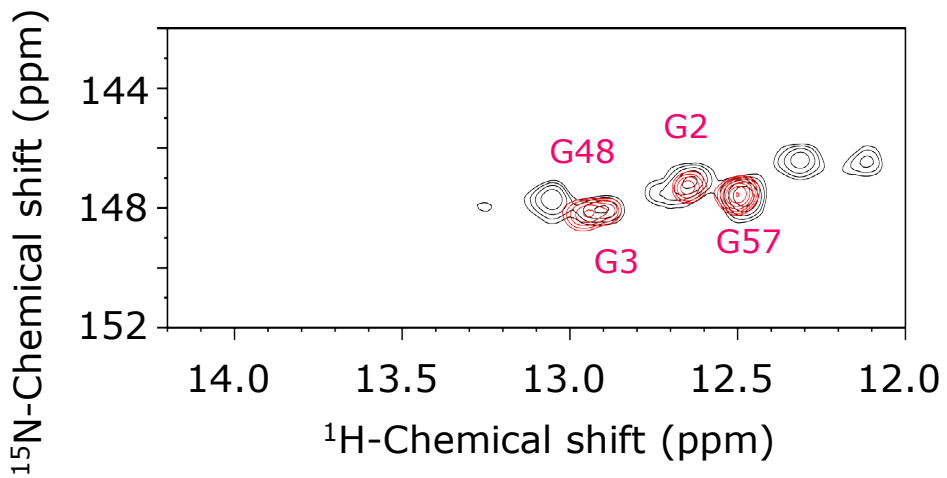


Fig. 4-24 MsnR-11-T NOESYスペクトル
NOEを連鎖出来たものを示した(Black line)

a



b

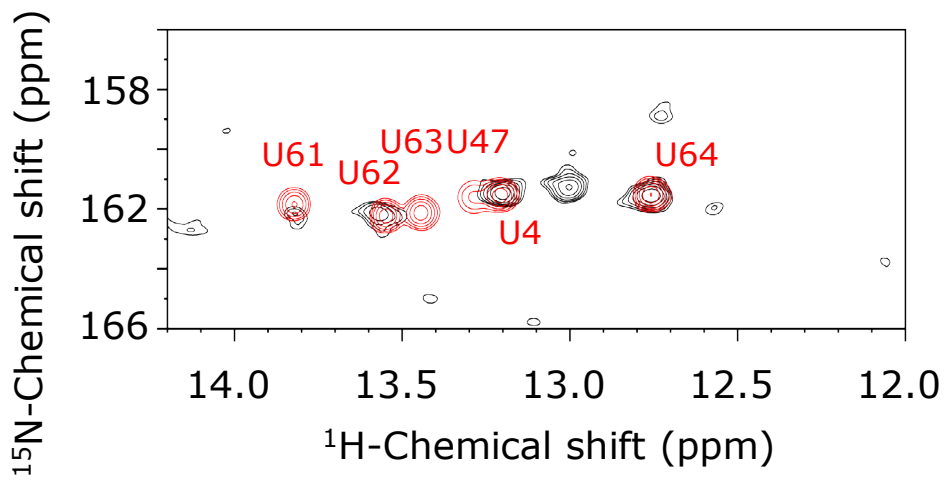


Fig. 4-25 MsnR-11-TとMsnR-11-I.IVの標識を使用した¹H-¹⁵N HMQC スペクトル

(a)MsnR-11-T G標識(黒), MsnR-11-I.IV GC標識(赤)

(b) MsnR-11-T U標識(黒), MsnR-11-I.IV AU標識(赤)

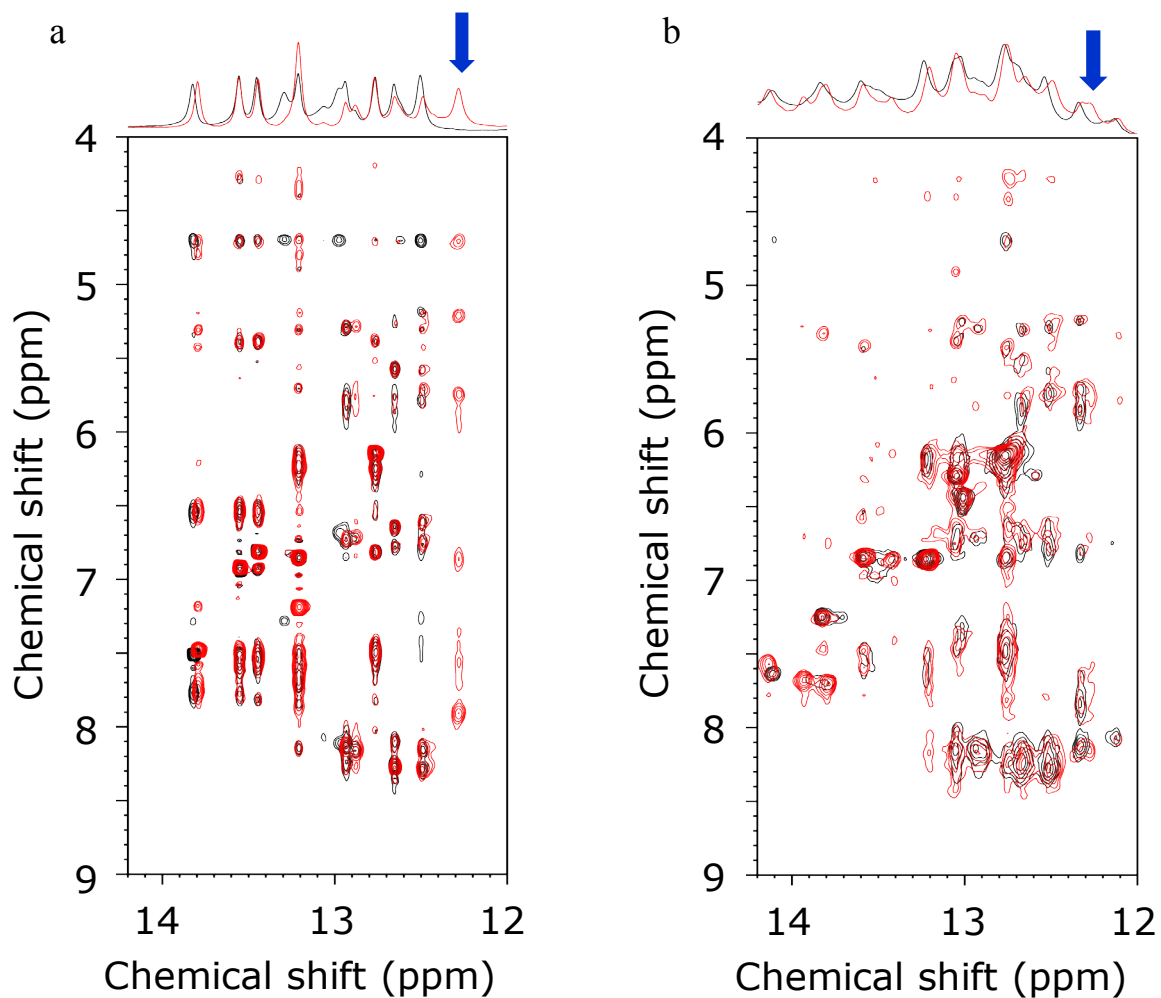


Fig. 4-26 ワイルドタイプ(黒)とC58A(赤)のバリエントのNOESYスペクトル比較

(a)MsnCR-11-I.IVと-A58, (b)MsnCR-11-Tと-A58

矢印はC58をAに置換したことにより特徴的に変化したシグナル

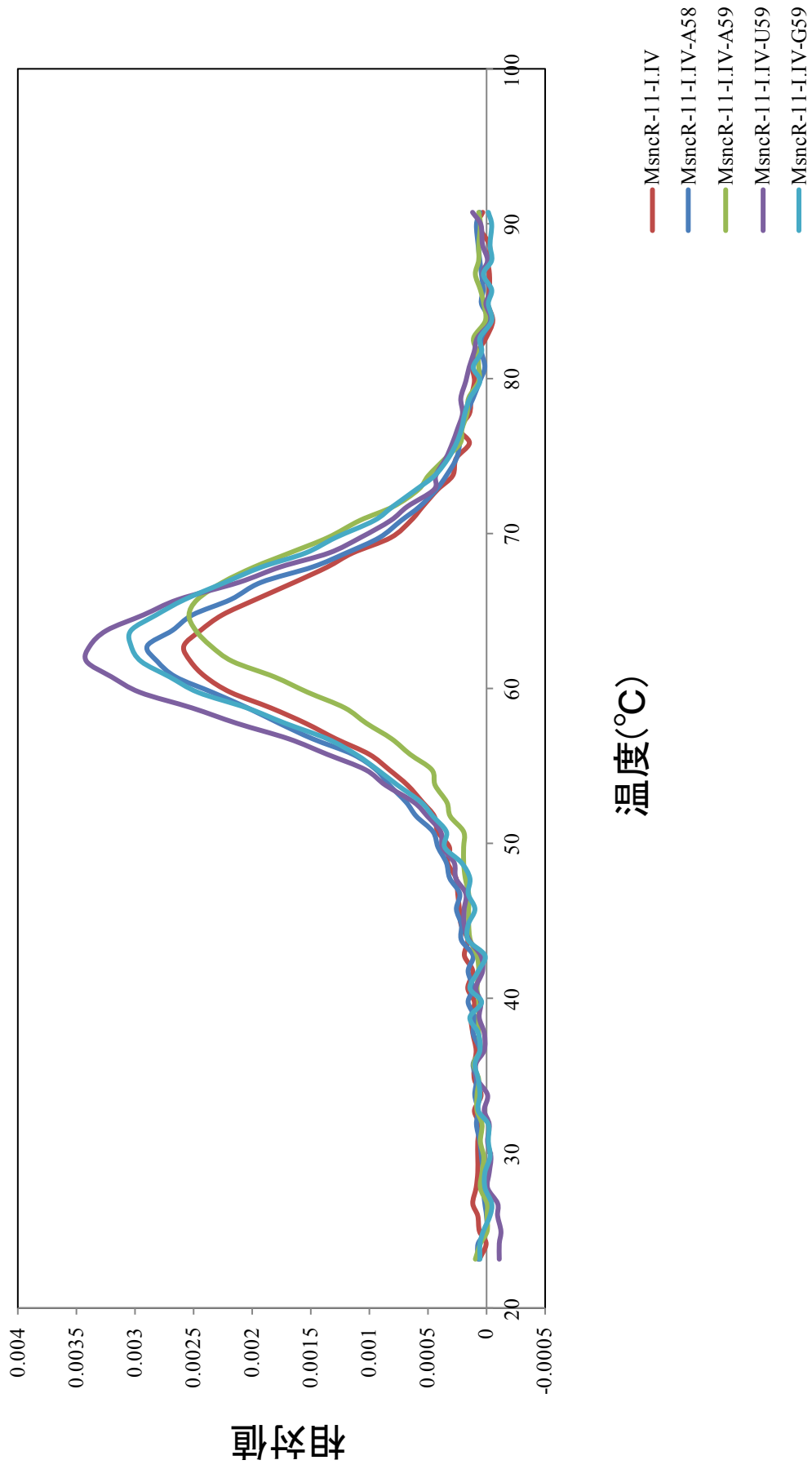


Fig.4-27 MsncR-11-I.IVとその置換体の融解温度

		10	20	30	40	50			
Mouse	TGGTAAAAAG	AGGATTTAAA	CCTCTGTGTT	TAGATTTACA	GTCTAATGCT				
Rat	TGGTAAAAAG	GGG-GCTCAA	CCCCTGTCTT	TAGATTTACA	GTCTAATGCT				
Human	TGGTAAAAAG	AGG--CCTAA	CCCCTGTCTT	TAGATTTACA	GTCCAATGCT				
Pan	TGGTAAAAAG	AGG--CTTAA	CCCCTGTCTT	TAGATTTACA	GTCCAATGCT				
Cow	TGGTAAAAAG	AGGAGTCAAA	CCTCTATCTT	TAGATTTACA	GTCTAATGCT				
Chikin	CGATAAGAAG	AGGAATTGAA	CCTCTGTAAA	AAGGACTACA	GCCTAACGCT				
Frog	TGGGAAGAAG	AGGACTTGAA	CCTCTGTAAT	TGGGGCTACA	ACCCACCGCC				
Zebvra	TGGTAGAAAA	AGGACTCAAA	CCTCTGTCCG	CGGAGCTACA	ATCCGCCGCC				
fish	*	*	**	**	**	**	*	*	**

		60	70	80	90				
Mouse	T-A---CTCA	GCCATTTTAC	CT-----	---ATGTTCA	TTAATCGTT				
Rat	T-A---CTCA	GCCATTTTAC	CT-----	---ATGCTCG	TAAACCGTT				
Human	TCA---CTCA	GCCATTTTAC	CTCACCCTCA	CTGATGTTCA	CCGACCGTT				
Pan	TCA---CTCA	GCCATTTTAC	CC-----	CTGATGTTCA	CCGACCGCT				
Cow	TTG---CTCA	GCCATTTTAC	CC-----	---ATGTTCA	TTAACCGCT				
Chikin	TCAACTCTCA	GCCATCTTAC	CT-----	---GTGACCT	TCATCAACC				
Frog	TAACC-CTCG	GCCATCTTAC	CT-----	---GTGGCTA	TTACTCGTT				
Zebvra	TAAACTCTCG	GCCACCCTAC	CT-----	---GTGACAA	TCACACGTT				
fish	*	**	**	**	*	**	**	**	*

Mirror tRNA^{Tyr}

COXI mRNA

Fig. 4-28 哺乳類と脊椎動物のCOXI上流のトコンドリアゲノムの配列比較

第 5 章 総括

5-1 本研究により得られた知見

RNA のままで機能する ncRNA が生命現象を解き明かす重要な因子ではないかと考え、未だ見つかっていない新規の ncRNA に着目した。既往研究より、長鎖 RNA 解析中に低分子 RNA が発見され、その機能・発現メカニズムが不明であることから、50 から 150 残基の長さの低分子 RNA を解析対象とし研究を行った。

本研究では 2 つの手法の開発と 1 つの解析例を示した。一つ目として、一定の構造を形成する新規 RNA を探索する方法の開発を試みた。生体内において発現する「構造を持ち機能する新規 RNA」を網羅的に調べるため、配列データを残基数と独自の二次構造のパターンに基づき分類を行った。本手法を使用することで、同じ二次構造を形成するものを各グループに分類することができれば、同じ機能を持つ新規 RNA を一括に見つけることが出来ると考えたからである。シーケンサー解析により得られた大量の配列データを本手法によりクラスタリングし、ゲノムデータベースに照らし合わせ解析を行った結果、16 個の新規低分子 RNA を得ることが出来た。新規候補の中から同じ構造を形成し、同じグループに分類された、異なるゲノム上の位置の RNA が見つかった。この RNA の発見により開発したクラスタリング方法を用いることで、同じ構造と機能をもつものをグループに分類できる可能性を示唆した。

二つ目の方法では、溶液中における構造形成を観測する方法を開発した。RNA の構造形成を確認するために必要とされていた RNA 精製のスキルと時間を大幅に省き、NMR 試料管の中に市販の転写反応液、鋳型 DNA を入れ NMR で測定するだけという、誰でも簡便に出来る方法確立した。この手法を使用することで、溶液中において構造形成する RNA を速くスクリーニングすることができ、

使う試薬も少量で良いことからコストパフォーマンスも良く、構造解析を行う候補を効率的に見出すことができる。実際に得られるスペクトルは、RNA の長さや構造の硬さなどによりスペクトルが異なることを見出した。既に精製し帰属されたスペクトルと比較したところ、良く似たスペクトルが得られたことから、本手法がスクリーニングに有効な方法であると考ええる。

実際の解析例では、一つ目の解析方法である、二次構造によるクラスタリングを使用し見出された 16 個の新規候補 RNA のうち 1 つを解析対象とした。機能は配列解析とゲノムの位置、構造予測から推定し、NMR 法による構造解析を行った。新規候補 RNA の MsncR-11 はミトコンドリアゲノムの COXI の前にコードしており、見つかった殆どの配列には poly(A)が付加されていた。このことから、COXI の成熟に関与する機能を推定した。次に MsncR-11 を二次構造予測したところ tRNA 様構造を形成した。全体の構造解析の助けとするため、tRNA 様構造の T アームとアクセプター T アームの断片を合成した。全体構造と断片の構造を比較した結果、MsncR-11 の構造と機能を明らかにすることができた。

5-2 本研究の改善点

二次構造クラスタリングでは、解析する RNA の量を増やし、新規候補 RNA をより多く発見することで、同じ構造を持つ RNA が同じ機能を保持しているという仮説を証明することができるのではないかと考える。また、本解析で利用した構造のパターンの種類を見直しより正確に分類する必要があるかも知れない。

INTT 法では、どのような RNA でも効率よく転写出来る方法・条件を見つけることで、構造形成を判別出来ないサンプルを減らす必要がある。実際の解析例を増やすことで、本手法の有効性が示されると考える。

NMR 法による構造解析では、全体構造において、ステムループ構造の様な特

微的で安定な構造でなければ、そのフラグメントのみを取り出し解析することは出来ない。安定な構造を形成していない場合にも対応できる構造解析の手法や解析にかかる時間を減らすための解析プログラムの開発されることで、より多くの RNA を解析出来るようになると思う。

5-3 今後の展望

ヌクレオチドが発見されてから 100 年近い時間が経過し、現在様々な手法・技術・装置を使うことが出来、膨大な生命現象の情報を既にこの手に持っている。それでもなお、解明に至らない生命の分子メカニズムは非常に複雑である。生命解明には、本論文で解析を行った未だ見つかっていない新規の低分子 RNA の発見が必要であると思う。また、生物の進化を経ても重要な因子や部分領域はドメインとして保持され、長鎖 RNA の中にも保持されているが見つかっていないものが残されているかもしれない。

それぞれ開発した手法を広く使用してもらえるように、様々な研究に応用していきその有用性を広めていきたい。それにより、新規の構造を形成する RNA の発見・解析につながり、構造から機能を解明し生体分子メカニズム解明に貢献するだろう。

参考文献

- [1] Venter, J. C. et al. (2001) The sequence of the Human genome. *Science*, **291**.1304-1351.
- [2] ENCODE <http://www.genome.gov/10005107>
- [3] Kiyosawa, H., Yamanaka, I., Osato, N., Kondo, S., Hayashizaki, Y., and RIKEN GER Group. (2003) Antisense transcripts with FANTOM2 clone set and their implications for gene regulation. *Genome research*, **13**(6b), 1324-1334.
- [4] Kiyosawa, H., Mise, N., Iwase, S., Hayashizaki, Y., and Abe, K. (2005) Disclosing hidden transcripts: mouse natural sense–antisense transcripts tend to be poly (A) negative and nuclear localized. *Genome research*, **15**(4), 463-474.
- [5] Chiba, M., Kubo, M., Miura, T., Sato, T., Rezaeian, A. H., Kiyosawa, H., ... and Yasue, H. (2008) Localization of sense and antisense transcripts of Prdx2 gene in mouse tissues. *Cytogenetic and genome research*, **121**(3-4), 222-231.
- [6] Yap, K. L., Li, S., Muñoz-Cabello, A. M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., ... and Zhou, M. M. (2010) Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Molecular cell*, **38**(5), 662-674.
- [7] Carrieri, C., Cimatti, L., Biagioli, M., Beugnet, A., Zucchelli, S., Fedele, S., ... and Gustincich, S. (2012) Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature*, **491**(7424), 454-457.
- [8] Jansen, R., Embden, J., Gastra, W., & Schouls, L. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, **43**(6), 1565-1575.
- [9] Cathomen, T., & Joung, J. K. (2008). Zinc-finger nucleases: the next generation

emerges. *Molecular Therapy*, *16*(7), 1200-1207.

[10] Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., ... and Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, *326*(5959), 1509-1512.

[11] O'Connell, M. R., Oakes, B. L., Sternberg, S. H., East-Seletsky, A., Kaplan, M., Doudna, J. A. (2014). Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*, *516*(7530), 263-266.

[12] Ruby, J. G., Jan, C. H., and Bartel, D. P. (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, *448*(7149), 83-86.

[13] Berezikov, E., Chung, W. J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E. C. (2007) Mammalian mirtron genes. *Molecular cell*, *28*(2), 328-336.

[14] T. Dandekar. (2002) RNA Motifs and Regulatory Elements, Springer Berlin Heidelberg, p14.

[15] Nameki, N., Chattopadhyay, P., Himeno, H., Muto, A., and Kawai, G. (1999) An NMR and mutational analysis of an RNA pseudoknot of Escherichia coli tmRNA involved in trans-translation. *Nucleic acids research*, *27*, 3667-3675.

[16] Gilbert, D. E., and Feigon, J. (1999) Multistranded DNA structures. *Current opinion in structural biology*, *9*(3), 305-314.

[17] Nudler, E., & Mironov, A. S. (2004). The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends in biochemical sciences*, *29*(1), 11-17.

[18] Horiya, S., Li, X., Kawai, G., Saito, R., Katoh, A., Kobayashi, K., and Harada, K. (2003) RNA LEGO: magnesium-dependent formation of specific RNA assemblies through kissing interactions. *Chemistry and biology*, *10*(7), 645-654.

[19] Filipowicz, W., and Pogačić, V. (2002) Biogenesis of small nucleolar

ribonucleoproteins. *Current opinion in cell biology*, **14**(3), 319-327.

[20] Yoshihama, M., Uechi, T., Asakawa, S., Kawasaki, K., Kato, S., Higa, S., ... and Kenmochi, N. (2002) The human ribosomal protein genes: sequencing and comparative analysis of 73 genes. *Genome research*, **12**(3), 379-390.

[21] Baillat, D., Hakimi, M. A., Nääär, A. M., Shilatifard, A., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005) Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II. *Cell*, **123**(2), 265-276.

[22] Ushida, C., and Muto, A. (1995) Novel small stable RNAs of *Mycoplasma capricolum*. *DNA Research*, **2**(5), 229-230.

[23] Hokii, Y., Kubo, A., Ogasawara, T., Nogi, Y., Taneda, A., Arai, R., ... and Ushida, C. (2006) Twelve novel *C. elegans* RNA candidates isolated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Gene*, **365**, 83-87.

[24] Wachi, M., Ogawa, T., Yokoyama, K., Hokii, Y., Shimoyama, M., Muto, A. and Ushida, C. (2004) Isolation of eight novel *Caenorhabditis elegans* small RNAs. *Gene*, **335**, 47-56.

[25] Hokii, Y., Sasano, Y., Sato, M., Sakamoto, H., Sakata, K., Shingai, R., ... and Ushida, C. (2010) A small nucleolar RNA functions in rRNA processing in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic acids research*, **38**(17), 5909-5918.

[26] KoMINE, Y. U. R. I. K. O., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K. and Inokuchi, H. (1994) A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**(20), 9223-9227.

[27] Ushida, C., Himeno, H., Watanabe, T., and Muto, A. (1994) tRNA-like structures in 10Sa RNAs of *Mycoplasma capricolum* and *Bacillus subtilis*. *Nucleic acids*

research, **22**(16), 3392-3396.

[28] Muto, A., Ushida, C. and Himeno, H. (1998) A bacterial RNA that functions as both a tRNA and an mRNA. *Trends in biochemical sciences*, **23**(1), 25-29.

[29] T Moore, S. D., and Sauer, R. T. (2007) The tmRNA system for translational surveillance and ribosome rescue. *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 101-124.

[30] Randau, L., Münch, R., Hohn, M. J., Jahn, D., and Söll, D. (2005) Nanoarchaeum equitans creates functional tRNAs from separate genes for their 5' -and 3' -halves. *Nature*, **433**(7025), 537-541.

[31] Sanger, F. and Coulson, A. R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, **94**(3), 441-448.

[32] Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., ... and Anastasi, C. (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *nature*, **456**(7218), 53-59.

[33] Rasko, D. A., Webster, D. R., Sahl, J. W., Bashir, A., Boisen, N., Scheutz, F., ... & Klammer, A. (2011). Origins of the E. coli strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *New England Journal of Medicine*, **365**(8), 709-717.

[34] Ohshiro, T., Matsubara, K., Tsutsui, M., Furuhashi, M., Taniguchi, M., & Kawai, T. (2012). Single-molecule electrical random resequencing of DNA and RNA. *Scientific reports*, **2**.

[35] Hofacker, Ivo L. "RNA Secondary Structure Prediction." *eLS* (2005).

[36] Dawson, W.K., Fujiwara, K., and Kawai, G. (2007) Prediction of RNA Pseudoknots using heuristic modeling with mapping and sequential folding. *PloS One* **2**,

e905

- [37] Gorodkin, J., Heyer, L. J., & Stormo, G. D. (1997). Finding the most significant common sequence and structure motifs in a set of RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 25(18), 3724-3732.
- [38] Havgaard, J. H., Lyngsø, R. B., & Gorodkin, J. (2005). The FOLDALIGN web server for pairwise structural RNA alignment and mutual motif search. *Nucleic Acids Research*, 33(suppl 2), W650-W653.
- [39] Das, R., & Baker, D. (2007). Automated de novo prediction of native-like RNA tertiary structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(37), 14664-14669.
- [40] 日本 SLC 株式会社 <http://www.jslc.co.jp/>
- [41] The Jackson Laboratory <https://www.jax.org/strain/000664>
- [42] Mekada, K., Abe, K., Murakami, A., Nakamura, S., Nakata, H., Moriwaki, K., ... & Yoshiki, A. (2009). Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Experimental Animals*, 58(2), 141-149.
- [43] Pouilly, L., Sorg, T., & Auwerx, J. (2008). Genetic background determines metabolic phenotypes in the mouse. *Mamm Genome*, 19, 318331Chaudhury.
- [44] illumina 社 次世代シーケンサーのセミナー資料
http://www.illumina.co.jp/documents/pdf/2014_techsupport_session2.pdf
- [45] Kent, W. J. (2002) BLAT—the BLAST-like alignment tool. *Genome research*, 12(4), 656-664.
- [46] Yoshihama, M., Nakao, A., and Kenmochi, N. (2013) snOPY: a small nucleolar RNA orthological gene database. *BMC research notes*, 6(1), 426.
- [47] Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization

prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406-3415.

[48] Sato, K., Hamada, M., Asai, K., and Mituyama, T. (2009) CENTROIDFOLD: a web server for RNA secondary structure prediction. *Nucleic Acids Res.* **37**, W277-W280.

[49] Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P., and Fesik, S. W. (1996) Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science*, **274**(5292), 1531-1534.

[50] Serber, Z., Ledwidge, R., Miller, S. M., and Dötsch, V. (2001) Evaluation of Parameters Critical to Observing Proteins Inside Living *Escherichia coli* by In-Cell NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, **123**(37), 8895-8901.

[51] Inomata, K., Ohno, A., Tochio, H., Isogai, S., Tenno, T., Nakase, I., ... and Shirakawa, M. (2009) High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature*, **458**(7234), 106-109.

[52] Sakakibara, D., Sasaki, A., Ikeya, T., Hamatsu, J., Hanashima, T., Mishima, M., ... and Ito, Y. (2009) Protein structure determination in living cells by in-cell NMR spectroscopy. *Nature*, **458**(7234), 102-105.

[53] Dawson, W., Fujiwara, K., Kawai, G., Futamura, Y., and Yamamoto, K. (2006) A method for finding optimal RNA secondary structures using a new entropy model (vsfold). *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **25**, 171-189.

[54] Baba, S., Kajikawa, M., Okada, N., & Kawai, G. (2004). Solution structure of an RNA stem-loop derived from the 3' conserved region of eel LINE UnaL2. *Rna*, **10**(9), 1380-1387.

[55] Takahashi, K. I., Baba, S., Chattopadhyay, P., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Takaku, H., Kawai, G. (2000). Structural requirement for the two-step dimerization of human immunodeficiency virus type 1 genome. *Rna*, **6**(01), 96-102.

- [56] Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W., and Uhlenbeck, O.C. (1987) Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8783-8798.
- [57] Kao, C., Zheng, M., Rudisser, S. (1999) A simple and efficient method to reduce nontemplated nucleotide addition at the 3 terminus of RNA transcribed by T7 RNA polymerase, *RNA* **5**, 1268-1272.
- [58] Helmling, C., Keyhani, S., Sochor, F., Fürtig, B., Hengesbach, M., and Schwalbe, H. (2015) Rapid NMR screening of RNA secondary structure and binding. *Journal of biomolecular NMR*, **63**(1), 67-76.
- [59] Ernster, L., & Schatz, G. (1981). Mitochondria: a historical review. *The Journal of cell biology*, **91**(3), 227s-255s.
- [60] Birky Jr, C. W. (2001). The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual review of genetics*, **35**(1), 125-148.
- [61] Taanman, J.W. (1999) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta* **1410**, 103-123.
- [62] Schapira, A. H. (2006). Mitochondrial disease. *The Lancet*, **368**(9529), 70-82.
- [63] Ojala, D., Montoya, J., and Attardi, G. (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* **290**, 470-474 .
- [64] Sanchez, M.I., Mercer, T.R., Davies, S.M., Shearwood, A.M., Nygård, K.K., Richman, T.R., Mattick, J.S., Rackham, O., and Filipovska, A. (2011) RNA processing in human mitochondria. *Cell Cycle* **10**, 2904-2916.
- [65] Holzmann, J., Frank, P., Löffler, E., Bennett, K.L., Gerner, C., and Rossmannith, W. (2008) RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human

mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell* **135**, 462-474.

[66] Rossmannith, W., Tullo, A., Potuschak, T., Karwan, R., and Sbis, E. (1995) Human mitochondrial tRNA processing. *J. Bio. Chem.* **270**, 12885-12891.

[67] Brzezniak, L.K., Bijata, M., Szczesny, R.J., and Stepien, P.P. (2011) Involvement of human ELAC2 gene product in 3'end processing of mitochondrial tRNAs. *RNA Biol.* **8**, 616-626 .

[68] de la Sierra-Gallay, I.L., Pellegrini, O., and Condon, C. (2005) Structural basis for substrate binding, cleavage and allostery in the tRNA maturase RNase Z. *Nature* **433**, 657-661.

[69] Plateau, P., and Gueron, M. (1982) Exchangeable proton NMR without base-line distortion, using new strong-pulse sequences. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7310-7311.

[70] Okui, S., and Kawai, G. (2015) In NMR tube transcription for rapid screening of RNA conformation. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **34**, 103-113.

[71] Bax, A., Griffey, R.H., and Hawkins, B. L. (1969) Correlation of proton and nitrogen-15 chemical shifts by multiple quantum NMR. *J. Magn. Reson.* **55**, 301-315.

[72] Kiyosawa, H., Okumura, A., Okui, S., Ushida, C., and Kawai, G. (2015) Secondary structure-based analysis of mouse brain small RNA sequences obtained by using next-generation sequencing. *Genomics* **106**, 122-128.

[73] Sbis, E., Tullo, A., Nardelli, M., Tanzariello, F., and Saccone, C. (1992) Transcription mapping of the Ori L region reveals novel precursors of mature RNA species and antisense RNAs in rat mitochondrial genome. *FEBS lett.* **296**, 311-316.

[74] Nagaike, T., Suzuki, T., Katoh, T., and Ueda, T. (2005) Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly (A) polymerase and polynucleotide phosphorylase. *J. Biol. Chem.* **280**, 19721-19727.

- [75] Slomovic, S., Laufer, D., Geiger, D., and Schuster, G. (2005) Polyadenylation and degradation of human mitochondrial RNA: the prokaryotic past leaves its mark. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6427-6435.
- [76] Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R., and Young, I. G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature* **290**, 457-465.
- [77] Yokobori, S., and Paabo, S. (1997) Polyadenylation Creates the Discriminator Nucleotide of Chicken Mitochondrial tRNA^{Tyr}, *J. Mol. Biol.* **265**, 95–99.
- [78] Tomita, K., Ueda, T., and Watanabe, K. (1996) RNA editing in the acceptor stem of squid mitochondrial tRNA^{Tyr}. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4987–4991.
- [79] Wolin, S.L., Sim, S., and Chen, X. (2012) Nuclear noncoding RNA surveillance: is the end in sight? *Trends Genet.* **28**, 306-313.
- [80] Mercer, T.R., Neph, S., Dinger, M.E., Crawford, J., Smith, M.A., Shearwood, A.M.J., Haugen, E., Bracken, C.P., Rackham, O., Stamatoyannopoulos, J.A., Filipovska, A., and Mattick, J.S. (2011) The Human Mitochondrial Transcriptome. *Cell* **146**, 645-658.

研究業績リスト

主論文

1. Hidenori Kiyosawa, Akio Okumura, Saya Okui, Chisato Ushida and Gota Kawai

Secondary structure-based analysis of mouse brain small RNA sequences obtained by using next-generation sequencing

Genomics, **106**, 122-128, 2015

第2章の2-3結果2-3-3以外に相当し、この論文中のRNAの抽出とシーケンサー解析（データ処理の前まで）は牛田博士と清澤博士が担当し、RNA配列のデータベース検索の一部を奥村が担当した。

2. Saya Okui and Gota Kawai

In NMR tube transcription for rapid screening of RNA conformation

Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, **34**, 103–113, 2015

第3章全体に相当

3. Saya Okui, Chisato Ushida, Hidenori Kiyosawa and Gota Kawai

Sequence and structure analysis of a mirror tRNA located upstream of the cytochrome oxidase I mRNA in mouse mitochondria

The Journal of Biochemistry, mvv106, 2015

第4章全体に相当

学会発表

1. ○奥居沙弥, 牛田千里, 清澤秀孔, 河合剛太
マウスのミトコンドリア mRNA のプロセッシングに關与する mirror tRNA の二次構造の解析
第 54 回 NMR 討論会, 津田沼, 11 月 6 日～11 月 8 日・2015 年, ポスター
2. ○奥居沙弥, 牛田千里, 清澤秀孔, 河合剛太
RNA 構造スクリーニングのための NMR 試験管内転写法の検証
第 16 回 日本 RNA 学会年会, 名古屋, 7 月 23 日～7 月 25 日・2014 年, ポスター
3. ○奥居沙弥, 牛田千里, 清澤秀孔, 河合剛太
マウスの脳から得られた新規低分子 RNA の構造解析
第 36 回 日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 3 日～12 月 6 日・2013 年, ポスター
4. ○奥居沙弥, 鈴木穰, 加藤英政, 牛田千里, 清澤秀孔, 河合剛太
配列解析によって得られた低分子 RNA の NMR 構造解析
第 15 回 日本 RNA 学会年会, 松山, 7 月 24 日～7 月 26 日・2013 年, ポスター
5. ○奥居沙弥, 牛田千里, 清澤秀孔, 河合剛太
マウス脳から発現する 50-100 残基 RNA のクラスタリングと構造解析
第 35 回 日本分子生物学会年会, 博多, 12 月 11 日～12 月 14 日・2012 年, ポスター
6. ○奥居沙弥, 牛田千里, 清澤秀孔, 河合剛太
マウス由来の新規低分子 RNA の構造的特徴の解析

第 51 回 NMR 討論会, 名古屋, 11 月 8 日~11 月 10 日・2012, ポスター

7. ○奥居沙弥, 牛田千里, 清澤秀孔, 河合剛太

RNA 構造スクリーニングのための NMR 試験管内転写法の開発

第 14 回 日本 RNA 学会年会, 仙台, 7 月 18 日~7 月 20 日・2012, ポスター

ー

その他

1. ○奥居沙弥, 牛田千里, 清澤秀孔, 河合剛太

マウス低分子 RNA の探索と構造解析

公開シンポジウム「Structured ncRNA 研究の前哨」, 津田沼, 6 月 20 日・2014,

口頭

謝辞

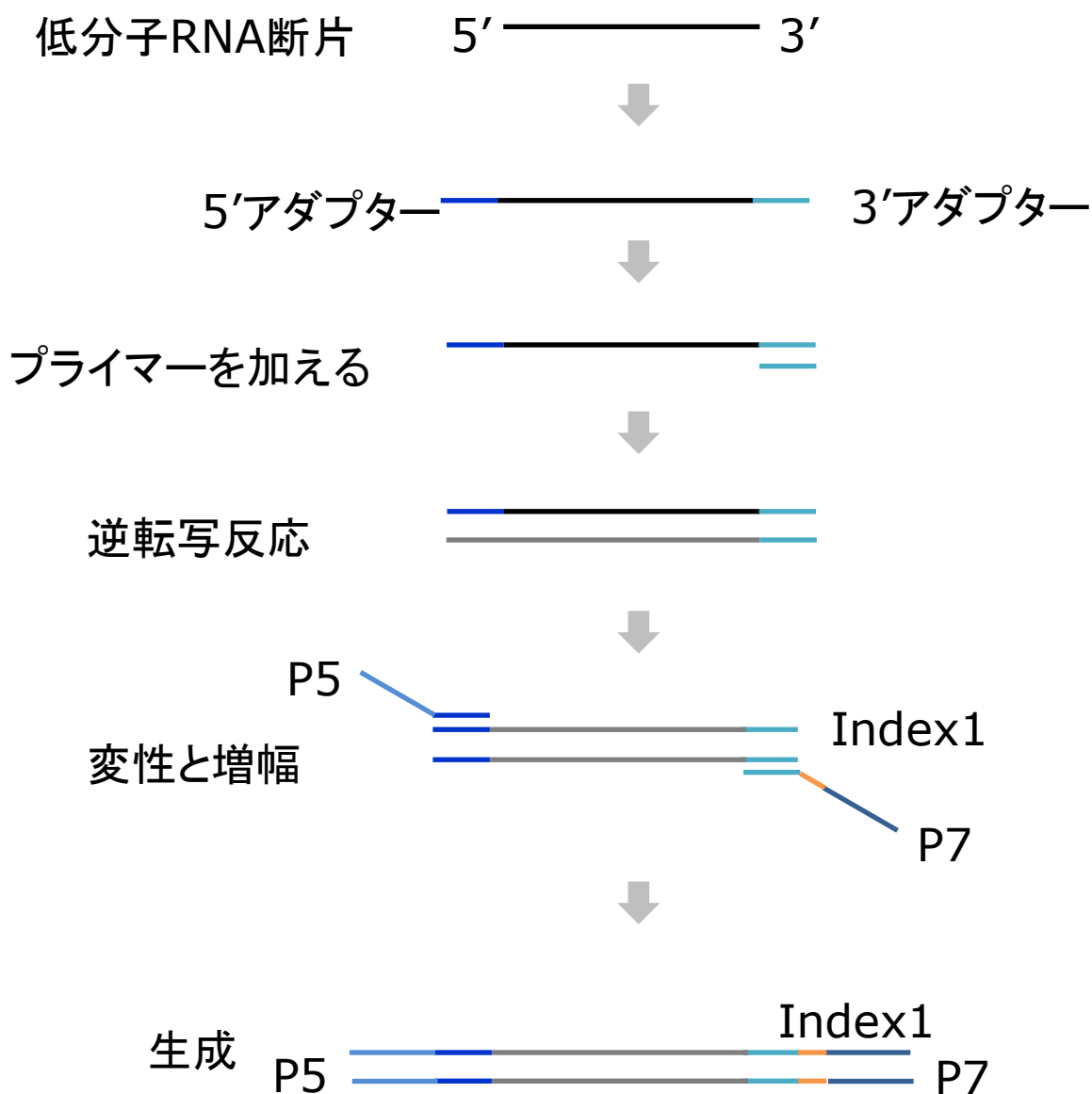
本研究を行うにあたり、恵まれた環境を与えて下さり、温かくご指導下さいました、本学教授 河合剛太博士に深く感謝いたします。ならびに、本研究において様々な視点からの助言や研究室での実験も受け入れて下さった、共同研究者、高知大学 清澤秀孔博士、弘前大学 牛田千里博士に心から感謝いたします。

本研究を共に進めてきたマウスチーム奥村章臣氏、小倉総一郎氏、山崎大輝氏、小林健太氏、博士課程の学生生活を共にした仲間、そして本学客員研究員竹中章郎博士に深く感謝いたします。

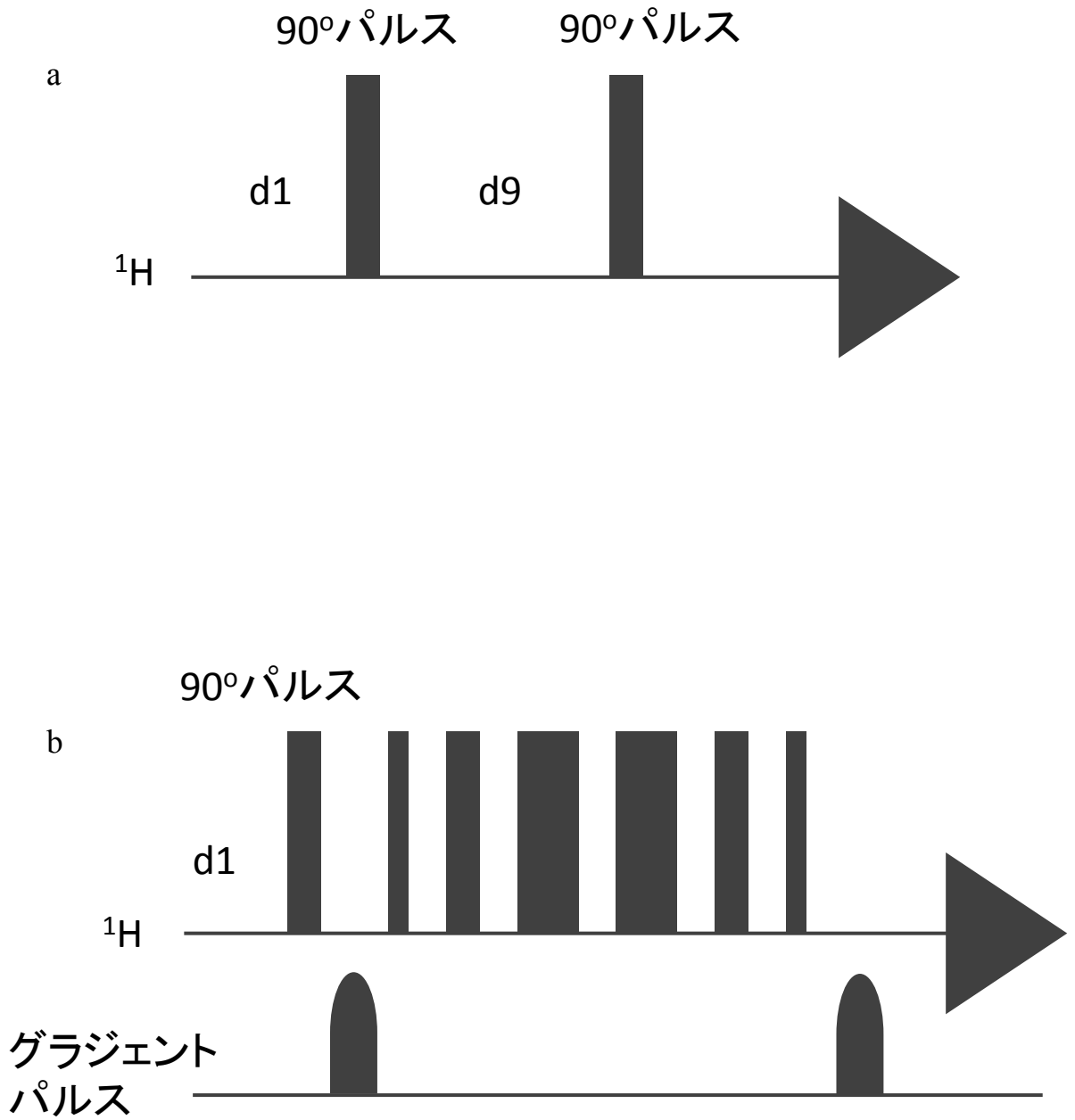
最後に、経済面や健康を気遣ってくれた家族、精神面を支えてくれた大切な友人と最も尊敬する株式会社シゲミと株式会社バイオネットの社外取締役高橋征三先生、博士の学位取得までに出会った全ての方々に心から感謝致します。

付録 1 シーケンス用のアダプター配列

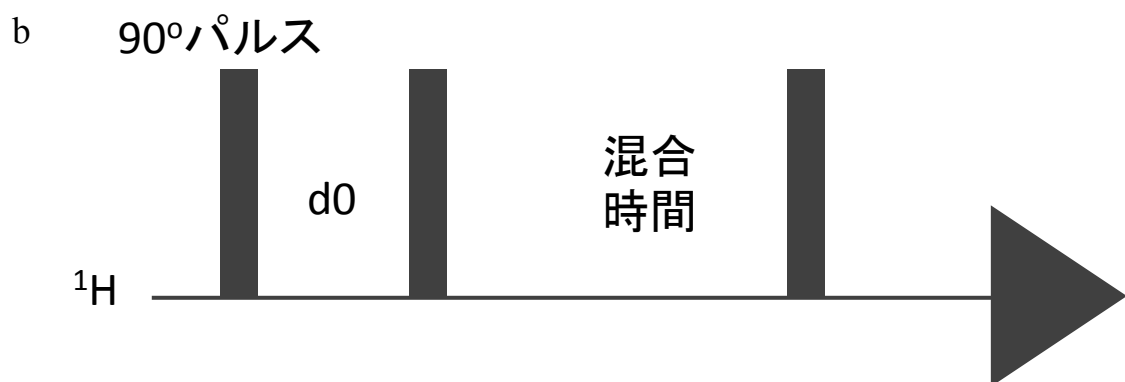
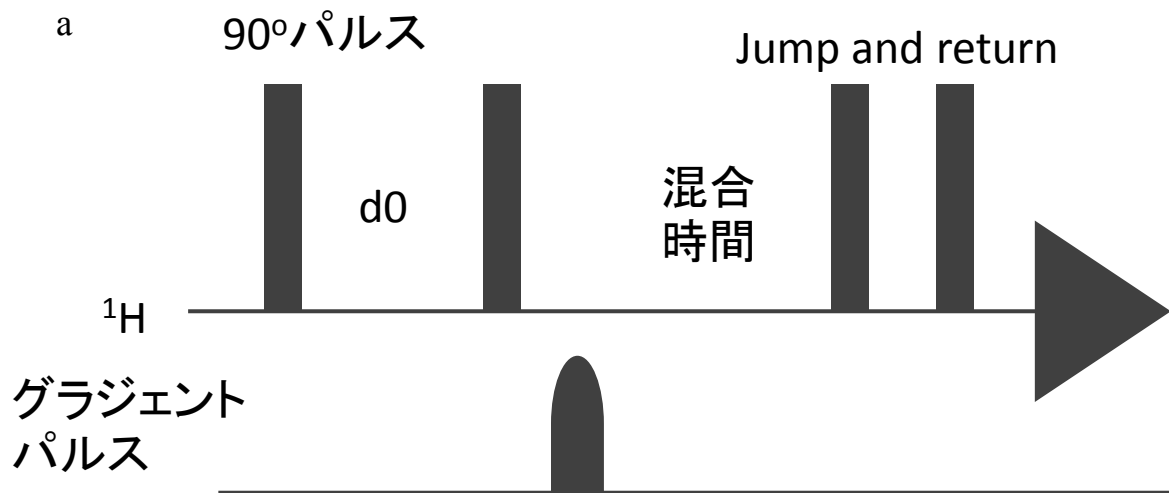
配列名	配列
5'アダプター	5'- AAAGATCCTGCA-3'
3'アダプター	5'-CATCGATCCTGCAGGCTAGAGAC -3'



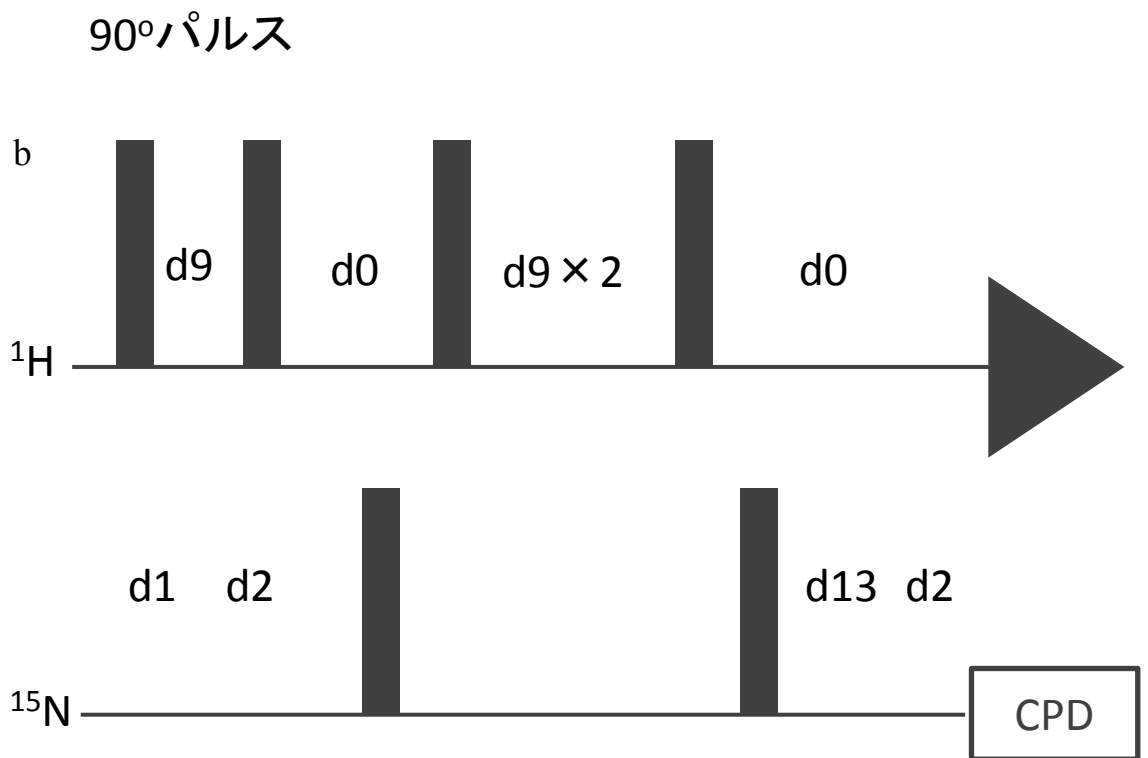
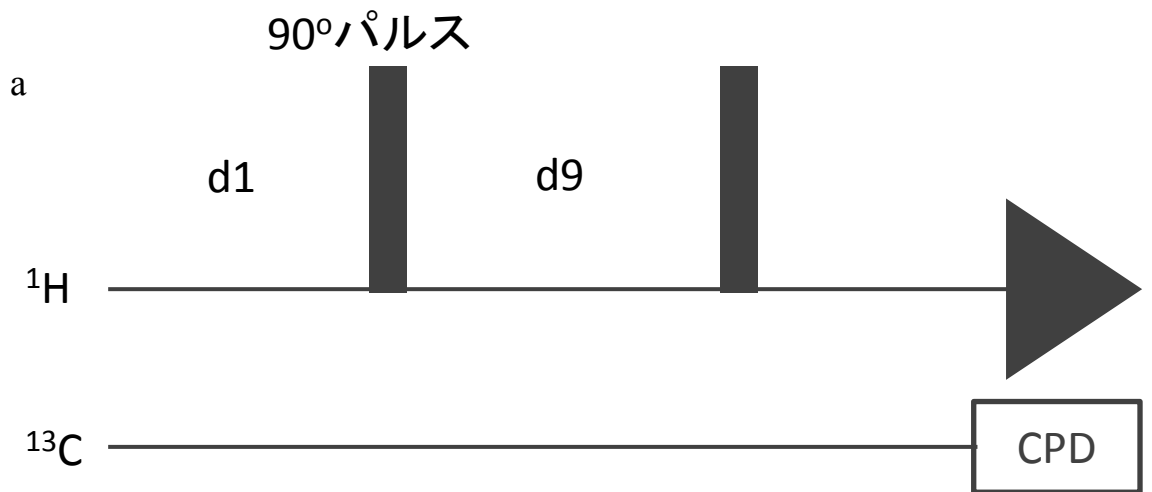
付録2 TruSeq Small RNAKit ワークフロー(illumina社)



付録3 パルスシーケンス
 (a) jump and return (b)1D_3919



付録4 パルスシーケンス
(a) noesyph (b) noesyph



付録5 パルスシーケンス
 (a)zg0jrcpd23.g (b) hmqcf3jrph.g