

千葉工業大学  
博士学位論文

LINE 逆転写酵素による LINE RNA の  
特異的な認識機構

工学専攻  
構造生物学研究室

大津 舞菜

平成 31 年 (2019 年) 3 月

## 目次

|  |          |
|--|----------|
| <b>第1章 序</b>                           | ...1~15  |
| 本研究のはじめに                               |          |
| 1-1 LINE とは                            | ...2     |
| 1-2 研究で用いた LINE                        | ...2     |
| 1-2-1 ゼブラフィッシュ由来の LINE                 |          |
| 1-2-2 近年報告された論文：LINE RNA を認識する逆転写酵素の領域 |          |
| 1-3 既往研究                               | ...4     |
| 1-4 本研究の目的                             | ...4     |
| 1-5 本論文の構成                             | ...5     |
| <br>                                   |          |
| <b>第2章 試料の調製</b>                       | ...16~31 |
| 2-1 RNA 試料の調製                          | ...16    |
| 2-2 ペプチド試料の調製                          | ...21    |
| <br>                                   |          |
| <b>第3章 NMR 法による LINE RNA の立体構造決定</b>   | ...32~53 |
| 3-1 はじめに                               | ...32    |
| 3-2 方法                                 | ...32    |
| 3-2-1 NMR スペクトルの測定                     |          |
| 3-2-2 立体構造計算                           |          |
| 3-2-3 分子動力学計算                          |          |
| 3-3 結果                                 | ...37    |
| 3-3-1 NMR スペクトルの解析                     |          |

|            |   |          |
|------------|---|----------|
| 3-3-2      | 立体構造決定                                  |          |
| 3-3-3      | 立体構造の特徴                                 |          |
| 3-4        | 考察                                      | ...39    |
| 3-4-1      | 立体構造の比較                                 |          |
| 3-4-2      | 立体構造に基づいた LINE の認識特異性                   |          |
| 3-5        | まとめ                                     | ...39    |
|            |   |          |
| <b>第4章</b> | <b>ゲルシフト法による LINE RNA と逆転写酵素の相互作用解析</b> | ...54～64 |
| 4-1        | はじめに                                    | ...54    |
| 4-2        | 方法                                      | ...54    |
| 4-2-1      | 電気泳動                                    |          |
| 4-3        | 結果                                      | ...56    |
| 4-3-1      | RRD2 による RNA の識別                        |          |
| 4-3-2      | RRD1 による RNA の識別                        |          |
| 4-4        | 考察                                      | ...57    |
| 4-4-1      | 識別メカニズムの比較                              |          |
| 4-5        | まとめ                                     | ...58    |
|            |   |          |
| <b>第5章</b> | <b>NMR 法による LINE RNA と逆転写酵素の相互作用解析</b>  | ...65～90 |
| 5-1        | はじめに                                    | ...65    |
| 5-2        | 方法                                      | ...65    |
| 5-2-1      | RNA とペプチドの混合                            |          |
| 5-2-2      | NMR スペクトルの測定                            |          |

|                            |          |
|----------------------------|----------|
| 5-3 結果                     | ...67    |
| 5-3-1 RRD2 との相互作用          |          |
| 5-3-2 RRD1 との相互作用          |          |
| 5-4 考察                     | ...69    |
| 5-4-1 RRD の結合方法            |          |
| 5-4-2 RRD の構造予測            |          |
| 5-5 まとめ                    | ...71    |
| <br>                       |          |
| 第 6 章 認識メカニズムと LINE の分化の考察 | ...91～93 |
| <br>                       |          |
| 参考文献                       | ...94～96 |
| <br>                       |          |
| 研究業績                       |          |
| <br>                       |          |
| 謝辞                         |          |

## 第1章 序

本研究のはじめに

多くの生物種が様々な種類の Long interspersed nuclear element (LINE) をもっていることが知られている。LINE はゲノムの多くの割合を占めていることが知られているがその役割や増幅機構の詳細などは解明されていない。また、ゲノム中に LINE が占める割合や LINE の配列は生物種によって特徴があるため、LINE の役割を知ることによって生物が持つ特徴の由縁や新しい機能の獲得について解明できると考え、本研究を進めた。

2001 年にヒトゲノムの全配列が明らかとなり、タンパク質をコードする領域はわずか 1%で、非翻訳領域が 99%を占めることが分かった<sup>1)</sup>。また、転位性因子が全ゲノムの約半分を占めており、非翻訳領域の主要な構成要素であることが示された。さらに、ヒトゲノムには主として 3 種類の LINE (LINE-1: L1, LINE-2: L2, LINE-3: L3) があり、全ゲノムの 21%を占めている (表 1-1)<sup>2)</sup>。L1 が全ゲノムの 17%を占め、L2 は 3%を占めている。このことから、ゲノムの構造や機能の解析にとって LINE が重要であることが考えられる。なお、L1, L2 および L3 の特徴については次の節で述べる。

本研究では L2 の LINE を研究対象としている。L1 と L2 は逆転写酵素による RNA の認識機構が異なることが考えられているが、L2 を解析することによって LINE の分化などを考察したいと考えている。さらに、新しい LINE が誕生する仕組みを明らかにすることによってヒトへの進化のメカニズムの解明につなげたいと考えている。なお、本研究で用いているゼブラフィッシュ由来の LINE は、鳥で最初に発見された繰り返し配列 (Chicken repeat 1: CR1) に近縁な LINE である。

## 1-1 LINE とは

転位因子には DNA トランスポゾンと RNA トランスポゾン（レトロトランスポゾン）があり，RNA トランスポゾンはさらに Long terminal repeat (LTR, 長鎖末端反復配列) 型と non-LTR 型に分けられる．本研究の対象である LINE は non-LTR 型に属する（図 1-1, 2）<sup>3,4)</sup>．

ゲノム上の LINE から転写された RNA を LINE RNA と呼ぶ．LINE は転写されたのち，自身にコードされており翻訳された逆転写酵素が自身の LINE RNA を認識し増幅することが知られている．逆転写酵素にはエンドヌクレアーゼドメイン (EN ドメイン) と逆転写酵素ドメイン (RT ドメイン) が含まれている．EN ドメインがゲノム DNA に切込みを入れ，その DNA の 3'末端をプライマーとして RT ドメインが逆転写することによって増幅することが知られているが，認識機構は解明されていない（図 1-3）<sup>5~8)</sup>．なお，DNA をプライマーとして利用し逆転写が行われることを target-primed reverse transcription (TPRT) と呼ぶ<sup>9~11)</sup>．

ヒトゲノムには L1, L2 および L3 が存在する．L1 はコピー数が最も多く転位しうる唯一のタイプであり，L2 と L3 に属するものは転位活性のない遺残物からなる．L1 エlementには 2 つの遺伝子があり，そのうちの 1 つはウイルスの *pol* 遺伝子産物に似たポリタンパク質をコードしている．3'末端に LTR をもたず，ポリ A 配列をもつ（図 1-2）<sup>4)</sup>．

## 1-2 研究で用いた LINE

### 1-2-1 ゼブラフィッシュ由来の LINE

本研究では、CR1 クレード（系統群、共通の祖先から進化した生物群）に近縁な L2 クレードに属するゼブラフィッシュ由来の LINE を研究対象としている（図 1-4）<sup>12)</sup>。

L2 クレードに属するいくつかの LINE の塩基配列のアラインメントから、LINE RNA の 3'末端はステムループが保存されていることが推測されている（図 1-5）<sup>13)</sup>。なお、L2 は逆転写酵素が自身のステムループを特異的に認識しており、逆転写酵素による LINE RNA の認識が厳しいこのタイプは *stringent type* と呼ばれている<sup>14)</sup>。対して、認識が緩いタイプは *relaxed type* と呼ばれており<sup>14)</sup>、L1 はこちらに属する。

ここでは、その中で互いによく似ているが逆転写酵素の認識の特異性が異なる ZfL2-1 と ZfL2-2 の 2 つの LINE に着目する。

### 1-2-2 近年報告された論文：LINE RNA を認識する逆転写酵素の領域

近年、ZfL2-1 と ZfL2-2 については、逆転写酵素の RNA 認識に関与する領域が特定された<sup>15)</sup>。3'末端のステムループを含む 300 残基程度の RNA に対して、逆転写酵素の領域を狭めていく結合実験が行われ、RNA の識別が可能な最も短い領域が特定された（図 1-6）。この領域に対応する配列を本論文中では RNA recognition domain (RRD) と呼び、ZfL2-1 由来の RRD (RRD1, 67 アミノ酸残基) は ZfL2-1 のみを認識し、ZfL2-2 由来の RRD (RRD2, 48 アミノ酸残基) は ZfL2-2 のみを認識することが逆転写酵素全体およびその変異体を用いた生化学的な実験で示された。また、67 アミノ酸残基の RRD1 の一部である RRD1-48 (48 アミノ酸残基) は ZfL2-1 と ZfL2-2 の両方を認識することも示されている。

### 1-3 既往研究

これまでに、LINE RNA のステムループ構造の立体構造解析が行われ、ZfL2-2 についてはウナギにも同じ LINE が見つかっており (UnaL2) , これに由来する LINE RNA の逆転写に関与する領域 (RNA2-17) の立体構造はわれわれの先行研究によって決定されている (PDB ID: 1wks) <sup>16)</sup>. なお, この領域の RNA 配列はウナギでもゼブラフィッシュでも同じ配列である. 立体構造解析および生化学的な解析から, RNA2-17 ではループ部分の 1 残基 (G8) が認識に重要であり, U10 がループ構造を支えていることが推測されており (図 1-7) <sup>16)</sup>, さらに逆転写の開始機構について考察されている <sup>17)</sup>.

ZfL2-1 については, LINE RNA の逆転写に関与する領域の立体構造は決定されていない. なお, ZfL2-1 についてはウナギにおいて対応する LINE は見つかっていない.

### 1-4 本研究の目的

LINE は生物種によって含まれている種類や数に特徴があることから, LINE の増幅機構を解明することは LINE が存在している意味や生物の進化の解析に重要なことであると考えられる. また, 逆転写酵素による LINE RNA の特異的な認識が, ゲノム内の LINE の種類や数の偏りに大きく影響しており, 生物種がそれぞれもつ特徴の由縁になっていると考えられる.

LINE は自身にコードされた逆転写酵素により RNA を介して逆転写することによって新たな位置に挿入されることが知られているが, 逆転写酵素による



LINE RNA の認識機構の詳細は解明されていない。

そこで本研究では、LINE の逆転写に重要だと考えられている RNA の領域および逆転写酵素の領域について、立体構造解析および相互作用解析を行うことによってその認識機構を解明することを目的としている。RNA の立体構造解析については、既往研究において構造が決定されていない ZfL2-1 由来の RNA の解析を行った。また、相互作用解析については ZfL2-1 由来と ZfL2-2 由来の両方の試料を用いた。本論文において解析に用いた試料の名称を表 1-2 に記す。

なお、これまでに ZfL2-1 の RNA の立体構造および RRD1 と RRD2 の立体構造は解明されていない。

## 1-5 本論文の構成

本論文の第 1 章では背景および目的を記した。

第 2 章では、本研究で用いた試料の調製について記す。

第 3 章では、溶液 NMR 法を用いた RNA1-34 の立体構造決定について記す。

この章は投稿論文: [Maina Otsu, Masaki Kajikawa, Norihiro Okada and Gota Kawai, Solution structure of a reverse transcriptase recognition site of a LINE RNA from zebrafish. \*The Journal of Biochemistry\* \*\*162\*\*, 279–285 \(2017\)](#) に対応している。

第 4 章では、LINE RNA と逆転写酵素に由来する領域についてのゲルシフト法による相互作用解析について記す。この章は投稿論文: [Maina Otsu and Gota Kawai, Distinct RNA recognition mechanisms in closely related LINEs from zebrafish. \*Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids\*, in press](#) に対応している。

第 5 章では、NMR 法による相互作用解析について記す。この章に対応する内容については投稿準備中である。

第 6 章では、これまでの解析に基づいた LINE の認識メカニズムや LINE の分化の考察について記す。

表 1-1 ヒトゲノムの転位性因子<sup>2)</sup>

| 分類          | ファミリー  | コピー概数     | ゲノムに占める比率(%) |
|-------------|--------|-----------|--------------|
| SINE        | Alu    | 1,200,000 | 10.7         |
|             | MIR    | 450,000   | 2.5          |
|             | MIR3   | 85,000    | 0.4          |
| LINE        | LINE-1 | 600,000   | 17.3         |
|             | LINE-2 | 370,000   | 3.3          |
|             | LINE-3 | 44,000    | 0.3          |
| LTRレトロエレメント | ERV    | 240,000   | 4.7          |
|             | MaLR   | 285,000   | 3.8          |
| DNAトランスポゾン  | MER-1  | 213,000   | 1.4          |
|             | MER-2  | 68,000    | 1.0          |
|             | その他    | 60,000    | 0.4          |

ヒトゲノムにおいて LINE が 21%を占める.

表 1-2 本論文での試料名

| RNA                                    | 残基数 | 試料名      |
|--|-----|----------|
| ZfL2-1 由来の RNA                         | 34  | RNA1-34  |
| ZfL2-1 由来の RNA<br>10 番目の A 残基を G 残基に置換 | 34  | RNA1m-34 |
| ZfL2-1 由来の RNA                         | 45  | RNA1-45  |
| ZfL2-1 由来の RNA<br>10 番目の A 残基を G 残基に置換 | 45  | RNA1m-45 |
| ZfL2-1 由来の RNA                         | 55  | RNA1-55  |
| ZfL2-1 由来の RNA<br>10 番目の A 残基を G 残基に置換 | 55  | RNA1m-55 |
| ZfL2-1 由来の RNA                         | 14  | RNA1-sl2 |
| ZfL2-2 由来の RNA                         | 17  | RNA2-17  |
| ZfL2-2 由来の RNA<br>8 番目の G 残基を A 残基に置換  | 17  | RNA2m-17 |
| ZfL2-2 由来の RNA                         | 41  | RNA2-41  |
| ZfL2-2 由来の RNA<br>8 番目の G 残基を A 残基に置換  | 41  | RNA2m-41 |

| ペプチド            | アミノ酸残基数 | 試料名     |
|-----------------|---------|---------|
| ZfL2-1 由来の逆転写酵素 | 67      | RRD1    |
| ZfL2-1 由来の逆転写酵素 | 48      | RRD1-48 |
| ZfL2-2 由来の逆転写酵素 | 48      | RRD2    |

RNA の配列は図 2-2 に、ペプチドの配列は図 2-4 に示す。

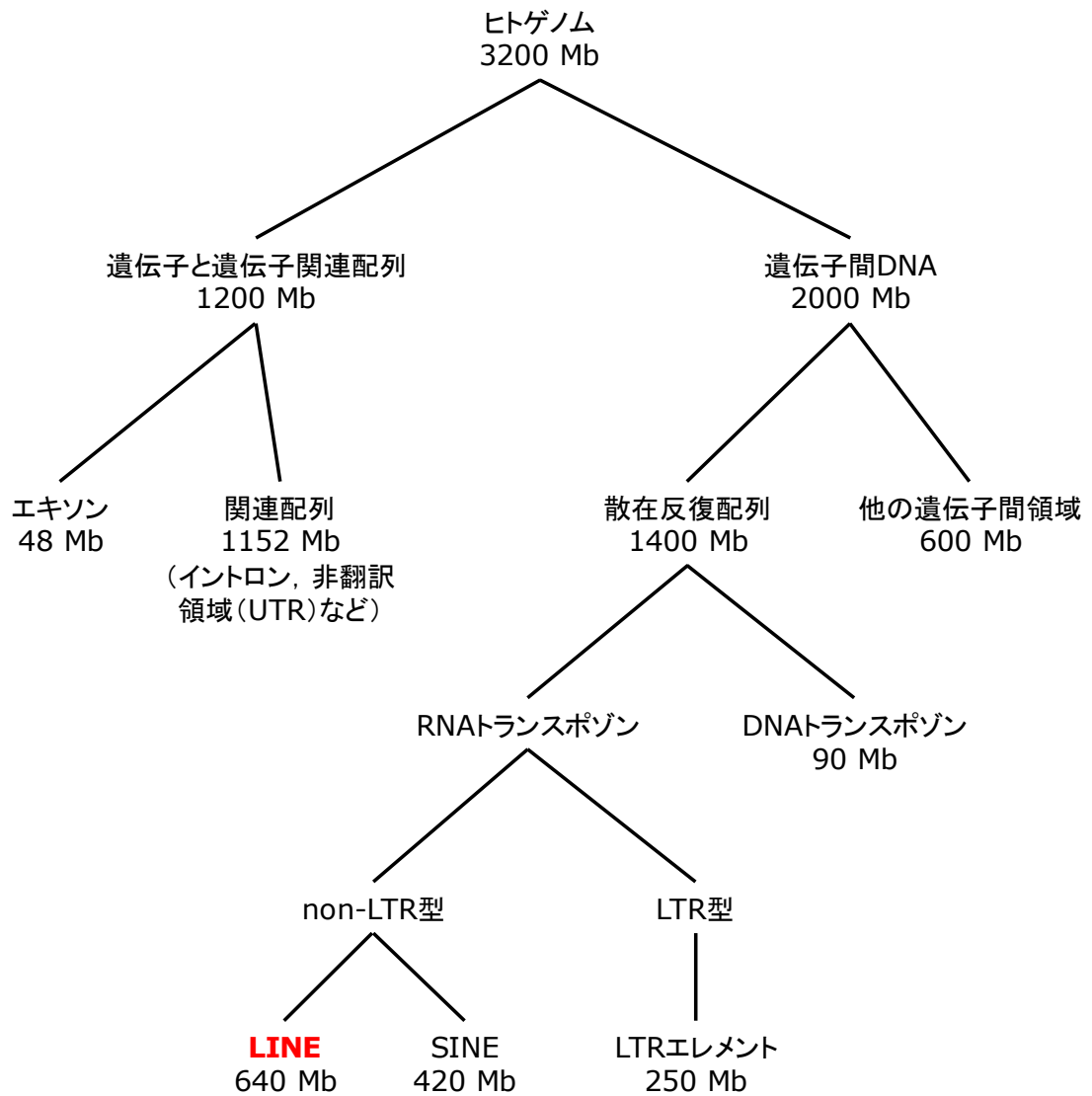
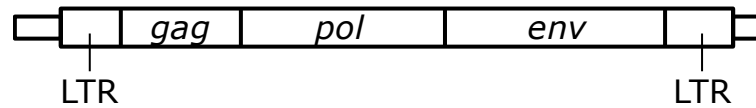


図 1-1 ヒトゲノムの構成<sup>3)</sup>

LINE は non-LTR 型の RNA トランスポゾンである。

※文献 3) より一部改編

レトロウイルス (約7 kb)



LINE-1 (約6 kb)

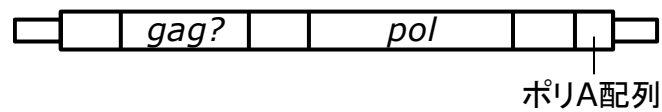


図 1-2 LTR 型と non-LTR 型<sup>4)</sup>

レトロウイルスは Long terminal repeat (LTR) を含み (上) , LINE-1 は LTR を含まない (下) .

※文献 3) より一部改編

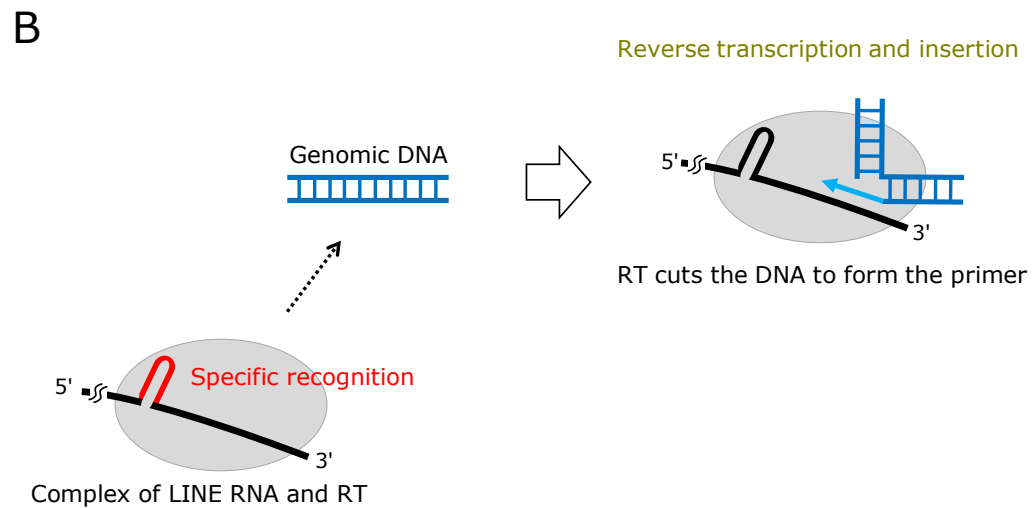
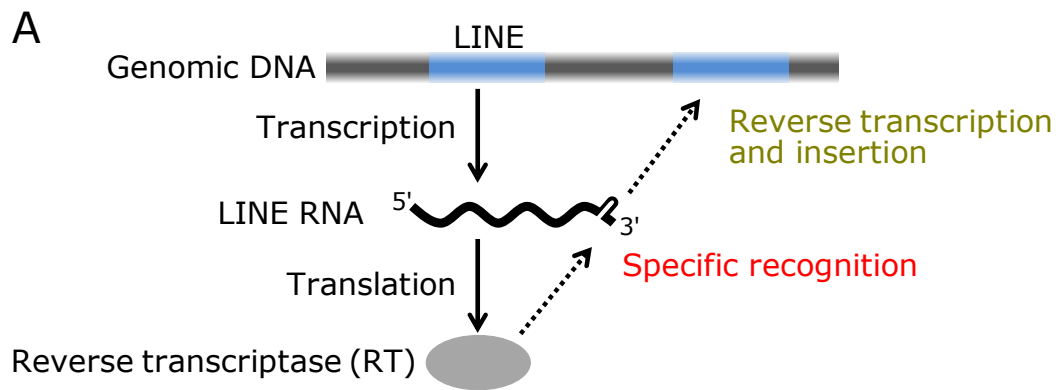


図 1-3 LINE の増幅の流れ

A : LINE の増幅の流れ

逆転写酵素が自身の LINE RNA を特異的に認識し増幅する.

B : 逆転写反応の開始

ゲノム DNA に切込みを入れ, その DNA の 3'末端をプライマーとして逆転写する.

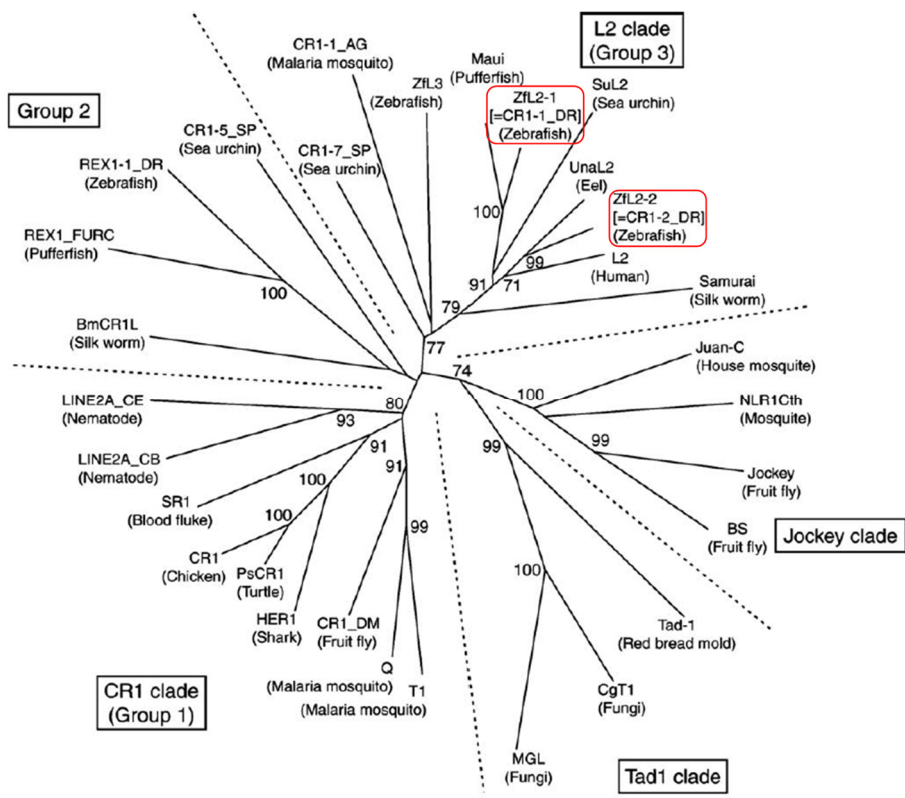


図 1-4 L2 およびそれと近縁な LINE の分類<sup>12)</sup>

ZfL2-1 および ZfL2-2 は L2 クレードに属する。

ZfL2-1 および ZfL2-2 を赤枠で示した。



```

conserved seq.      TGTAA CGCTTT                                AAAGCG      TAAAT      repeat
UnaL2                ATATGCACATTTTGTACGCCTCGCTTTGGATA-----AAAGCGTCT-GCAAATA (AATGTAATGTAATGTAA)
ZfL2                 TTGTCCTCATTTGTAAGTCGCTTTGGATA-----AAAGCGTCT-GCTAAATGAC (TAAATGTAATGTAAA)
UnaSINE1             TGTAAGAGTTGTGTAAGCCTCGCTTTGGATA-----AGAGCGTCT-GCTAAATGCC (TGTAATGTAATGTAA)
UnaSINE2             GAGGCATCAATTGTAAAGCGCTTTGGATA-----AAAGCGCTA-TATAAATGCAGT (CCATTTACCATTTA)
SmaI                 GCACACATGACTGTAAGCCTCGCTTTGGATA-----AAAGCGTCT-GCTAAATGGCATA (TATTATTATT)
Human L2             TCACTGCTGTATCCCCAGCGCTTAGMACAGTGCCTGGCACATA-GTAGGCGCTC-AATAAATATTTGT (TGAATGAATGAAT)
MIR1                 GAGTTAATAYATTGTAAAGCGCTTAGAACAGTGCCTGGCACATA-GTAGGCGCTC-AATAAATGTTRGY (TATTATT)
CR1-1 DR            ATGACCATTTATGTGAAGGGCTTTGACACAATCTACATTGT---AAAAGCGCTA-TACAAAATAAAAGC (TGAATTGAATTGAA)
CR1-3 DR            ATTCCTGTTTATTGTAAAGCACTTTGAATTGCCACTGTGTAT---GAAAGTGCTA-TATAAATAAA (CTGCTTGCCTTGC)
CR1-4 DR            TTGATGCTTATTGTAAAGCGCTTTGGGTGTCTTG-----AAAGCGCCATTTACAAAATAAAATGA (ATTATTATTATT)
SINE3-1             CCCCTCATGATTGTGAAGCGCTTTGGGTGTATGGCCATACACAATAAAAGCGCTA--TATAAATTAC (ACATTACATTACATTA)
CiLINE2             TCTCCTGTATCTATTGAAGCGCTTTGAGGCGACTTTTGTGTGA-TTTGGCGCTA-TATAAATTAA (AATTGAATTGAATTGAA)
Af1SINE             ATGACTGGATGTGTAAAGCGCTTTGGGTCCCTTAGGGACTAG--TAAAGCGCTA-TACAAAATTACAGG (CCATTTACCATTT)
MauI                CCCTGGGATTCTGTAAAGCGCTTTGAAACAATTTTATTGTA--TAAGCGCTA-TATAAATAAA (GATTGATTGATTGATT)

```

図 1-5 L2 クレードの 3'末端のアラインメント<sup>13)</sup>

下線はステムを組むことが予測された領域<sup>13)</sup>。

ZfL2-1 および ZfL2-2 を赤枠で示した。

解析に用いている領域に色を付けた。

ZfL2-1 の配列のうち橙色はステム領域、黄色はループ領域を示す。

ZfL2-2 の配列のうち緑色はステム領域、黄緑色はループ領域を示す。

図中の表記と本論文中の名称の対応

図中の表記：本論文中の名称

UnaL2 : UnaL2

ZfL2 : ZfL2-2

CR1-1\_DR : ZfL2-1

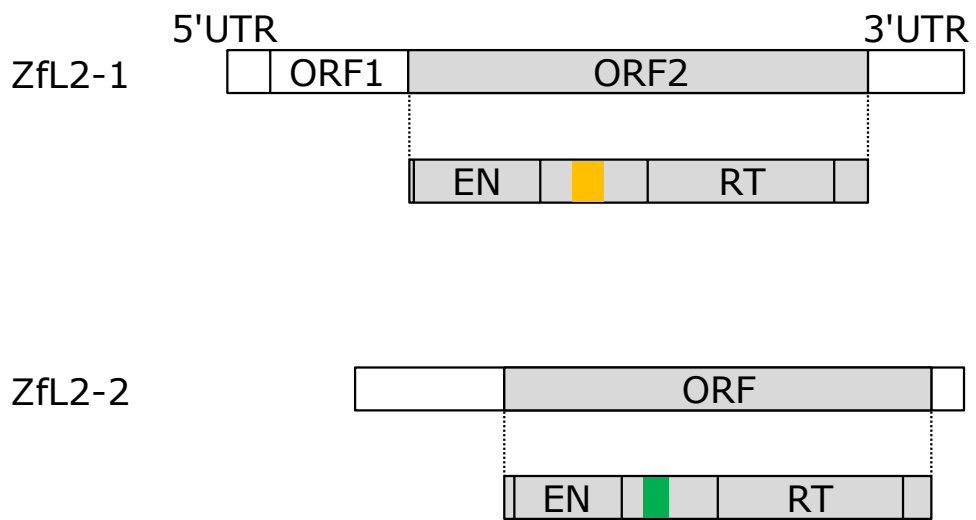


図 1-6 RRD の領域

EN: Endonuclease domain

RT: Reverse transcriptase domain

それぞれの色のついている領域が RRD にあたる。  
以後, RRD1 は橙色で示し, RRD2 は緑色で示す。

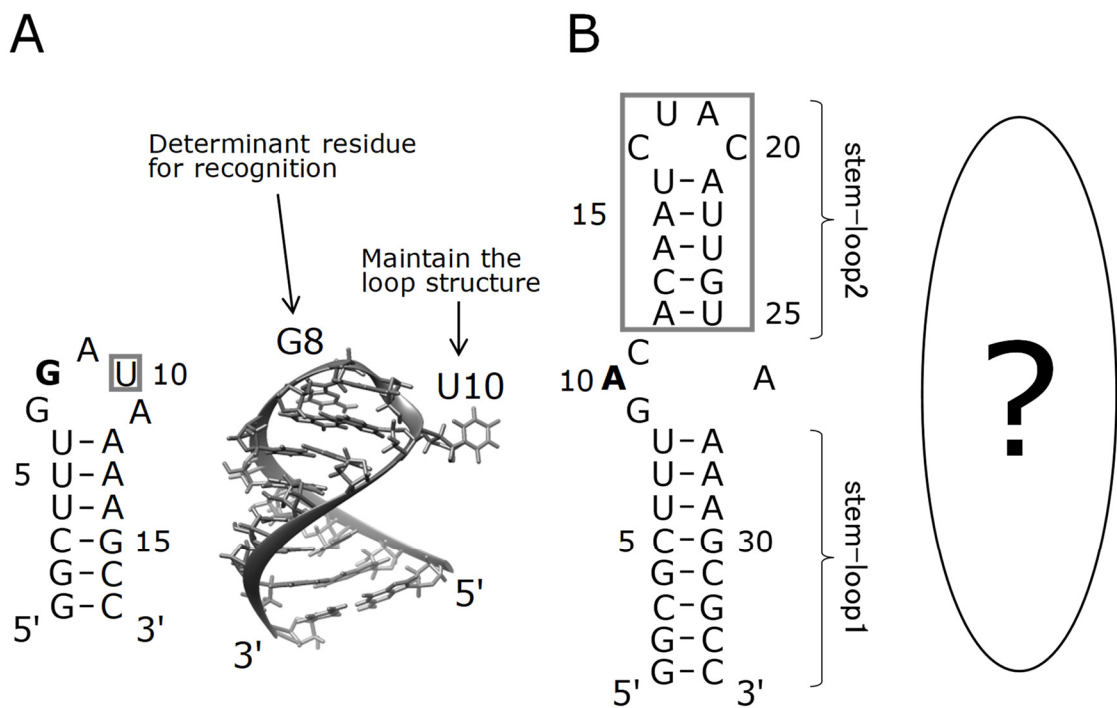


図 1-7 ZfL2-1 および ZfL2-2 由来の RNA

A : RNA2-17 の配列および立体構造

既往研究により立体構造は決定されている (PDB ID: 1wks) <sup>16)</sup>.

B : RNA1-34 の配列

既往研究において立体構造は決定されていない。

## 第 2 章 試料の調製

### 2-1 RNA 試料の調製

ZfL2-1 および ZfL2-2 由来の LINE RNA の 3'末端に存在するステムループの一部を解析対象の領域とした。この領域は逆転写反応の開始において逆転写酵素による認識に必要な領域である。

RNA 試料の合成方法は試験管内転写合成法と化学合成法がある。試験管内転写合成法では安定同位体標識された NTP を用いることによって、残基特異的な安定同位体標識試料を調製することができる。また、化学合成法では安定同位体標識されたアミダイトユニットを用いることによって部位特異的な安定同位体標識試料を調製することができる。

本研究では、試験管内転写合成法および化学合成法により RNA 試料を合成し、電気泳動法により精製した。調製した RNA 試料を表 2-1 に、配列および予測される二次構造を図 2-1 および図 2-2 に示す。また、最終産物の確認の PAGE の一部を図 2-3 に示す。

#### 【試験管内転写合成法による RNA の調製】

試験管内転写合成法<sup>18)</sup>では、鋳型 DNA (北海道システム・サイエンス株式会社に委託合成し、必要に応じて PAGE 法による精製を行ったもの) および非標識 NTP または <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 標識 NTP を用いて RNA を合成した。

#### <転写>

鋳型 DNA (アンチセンス鎖) と T7 promoter 断片 (センス鎖, 18 残基, 5'-CTAATACGACTCACTATA-3') をアニーリングし, T7 RNA polymerase を用いて

転写した。まずは 20  $\mu\text{L}$  スケールでの転写の条件検討を行った後、1~2.1 mL スケールでの転写を行った。転写反応液の調製は、市販の T7 standard キット (T7-Scribe™ Standard RNA IVT Kit, CELLSRIPT, 50 Reactions) を用いる方法と、キットを用いない方法で行った。キットを用いない方法では転写反应用緩衝液などを自ら調製し、酵素は T7 RNA polymerase (大陽日酸株式会社) を使用した。それぞれの組成を表 2-2 に示す。転写反応液は 200~300  $\mu\text{L}$  を基本のスケールとし、複数本調製することによって 1~2.1 mL スケールの転写を行った。

#### <RNA の精製>

RNA の精製<sup>19)</sup> は、Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 法により行った。

試料は変性状態の PAGE (12%または 20%) によって精製した。ゲル用のガラス板は縦 : 40 cm, 横 : 30 cm, 厚さ : 1 mm を使い、コームは 1 レーンまたは 2 レーンのものを用いた。まず、表 2-3 の組成でゲルを作成し、ゲル板に流し込み静置し、乾燥しないように包み一晩かけて固めた。次に、作成したゲルを用いて電気泳動を行った。転写反応液は変性 PAGE 用色素 (8 M Urea, Xylene cyanol (XC), Bromophenol Blue (BPB)) を加えて泳動した。

色素を参考に RNA が中央まで流れたら泳動を止め、UV 照射により RNA の位置に印を付けてゲル片を切り出し 50 mL 遠沈管に入れた。なお、試験管内転写合成法では目的の長さよりも数残基長い RNA が含まれていることがあるため目的の RNA と切り分ける必要がある。ゲル片に滅菌水を加えて振とうし、濃度勾配を利用して RNA を水へ抽出した。4 h 以上振とうした後 9000 rpm, 10 °C, 10 min で遠心し、上清を新しい遠沈管に取った。ゲルが入っている遠沈管は再び滅菌水を加えて振とうし上清の吸光度 (260 nm) が低くなるまで繰り返した。

次に、エタノールを用いて核酸を沈殿させ精製するエタノール沈殿を行った。遠沈管に取った上清を、遠心エバポレーターを用いて濃縮し、試料の体積の3倍量の100%エタノールおよび10分の1量の3 M 酢酸ナトリウムを加えて-85 °Cで一晩保存し、9000 rpm, -10 °C, 30 min で遠心して液体（エタノール廃液）を別の遠沈管に移し、沈殿（RNA）と液体に分けた。エタノール廃液は吸光度を測定してRNAが含まれていないことを確認し廃棄した。沈殿は遠心エバポレーターで乾燥させ、RNAが溶解する程度の滅菌水（200 µL程度）を加えてよく溶かし、もう一度エタノール沈殿を行った。2回目のエタノール沈殿は1回目と同様の手順で行った。なお、2回目は溶液を1.5 mL チューブに移し、15000 rpm, -10 °C, 30 min で遠心した。乾燥させた沈殿は滅菌水を加えてよく溶かした。

エタノール沈殿の後、vivaspin 2（3000 MWCO PES, sartorius）を用いて脱塩および緩衝液交換を行った。なお、アニーリング・急冷によるコンホメーションの統一を脱塩の後に行った。

#### i. 脱塩

試料と滅菌水をvivaspin 2の2 mLの目盛まで加え、5000g, 10 °Cで、内液の体積が10分の1程度（約200 µL）になるまで遠心を行った。遠心後、再び2 mLの目盛まで滅菌水を加えて遠心する過程を2回繰り返した（合計3回遠心した）。

#### ii. アニーリング・急冷

脱塩後に測定した吸光度に基づき、試料の分注および希釈を行い95 °Cで5 min アニーリングし、急冷（氷水中でマイクロチューブを素早く動かしながら3 min 冷却した後に氷上で2 min 以上静置）した。

#### iii. 緩衝液交換

アニーリング後、再びvivaspin 2を用いて緩衝液交換を行った。手順は脱塩と

同じであるが、滅菌水の代わりに測定用緩衝液（50 mM NaCl 含む 20 mM リン酸緩衝液，軽水）を用いた。

緩衝液交換後，変性状態および非変性状態の PAGE を行うことによって精製およびコンホメーションを確認した。

### 【化学合成法による RNA の調製】

短い残基の RNA や部位特異的に標識した RNA の調製には研究室の化学合成機（Expedite System DNA/RNA Synthesizer Model8909）を用いた。標識箇所には内部ループや末端に位置しているため連鎖帰属ができていなかった残基や，認識に重要であると考えている残基を選んだ。なお，化学合成では 3'末端は Controlled Pore Glass（CPG）カラムを用いて合成を行うため，3'末端の残基は標識することができない。

化学合成法を用いた調製は，まず自動合成機による合成を行い，次に合成試料の脱保護を行った後，合成試料の精製を行った。

#### <自動合成機による合成>

標識箇所には標識アミダイト（大陽日酸株式会社）を用いた。試料はそれぞれ 1  $\mu\text{mol}$  スケールで CPG カラム 1 本分ずつ合成した。

合成に用いるアミダイトユニットは水分に弱いため，使用前にデシケーターに入れ真空にすることによって試薬瓶などの周囲の水分を飛ばした後，アルゴンガスを充満させたエアバックの中で調製した。アミダイトユニットはシリンジと針を用いて 1 g につき 10 mL の無水アセトニトリルで溶解した。

化学合成法による調製では RNA の 3'末端から合成が行われ、合成の際に除去されるトリチル基の吸光のデータ（トリチルデータ）が得られる。得られたトリチルデータから合成効率を確認しながら合成した。

#### <合成試料の脱保護および脱塩>

化学合成機で合成した直後の試料は CPG カラムに結合しており、保護基が付加されている。よって、CPG カラムからの切り出しを行った後、塩基およびリン酸基の脱保護、水酸基の脱保護（DNA の場合はこの操作は必要ない）、簡易 ODS カラムを用いた脱塩を行った。

##### i. CPG カラムからの切り出し

1 カラムあたり 100%エタノール：アンモニアが 1：3 の溶液 4 mL とシリンジ 2 本を用いて切り出しを行った。シリンジで CPG カラムを両側から挟み、溶液を左右のシリンジに 10 往復させる操作を 15 分置きに 6 回繰り返した。

##### ii. 塩基およびリン酸基の脱保護

CPG カラムから RNA を切り出した溶液をバイアル瓶に入れ、55 °C で 12 h インキュベートした。

##### iii. 水酸基の脱保護

インキュベートした溶液をバイアル瓶から 50 mL 遠沈管に移し、遠心エバポレーターで完全に乾燥させ、1 M tetrabutyl ammonium fluoride/tetrahydrofuran (1 M TBAF/THF) を 500  $\mu$ L 加えて完全に溶解し、室温で 24 h 静置した。

##### iv. 簡易 ODS カラムを用いた脱塩

水酸基の脱保護を終えた試料に、2 M tetraethyl ammonium acetate (2 M TEAA) を 1 mL 加え、遠心エバポレーターで完全に乾燥させた。乾燥した試料は滅菌水 2 mL で完全に溶解し、簡易 ODS カラム (Sep-Pak C18, Waters) を用いて脱塩し



た. 簡易 ODS カラムは 100%アセトニトリル 4 mL および TEAA 10 mL でカラムの初期化を行い, 試料を通した後に滅菌水で洗浄した (17 残基の RNA は 2 mL, 34 残基の RNA は 10 mL で洗浄した). 70%アセトニトリルを 15 mL 通した後, 吸光度が 0.1 O.D.以下になるまで 70%アセトニトリルを 1 mL ずつ通してカラムからの溶出を行った. 溶出した試料はエバポレーターで乾燥させ, PAGE 法による精製を行った.

#### <合成試料の精製>

脱塩および脱保護した試料は PAGE 法による精製を行った. PAGE 法による精製は上記の試験管内転写合成法での精製と同じ手順で行った. なお, 化学合成法では 1 残基ずつ繋げて合成するため, 目的の長さよりも短い RNA が含まれており, 目的の RNA と切り分ける必要がある. 試験管内転写合成法では目的の長さよりも長い RNA が含まれているため, 同じ PAGE 法による精製でも RNA の切り出し方が異なる.

#### 2-2 ペプチド試料の調製

ZfL2-1 および ZfL2-2 について, RNA を認識する逆転写酵素の領域が特定されていた<sup>15)</sup>. 本論文ではこの領域を RNA recognition domain (RRD) と呼ぶ. ZfL2-1 由来の RRD については, RNA を識別できる 67 アミノ酸残基の RRD1 と, RNA と結合するが識別できない 48 アミノ酸残基の RRD1-48 が特定されている. なお, RRD1-48 は RRD1 の配列の C 末端側が 19 アミノ酸残基短い配列である. 一方, ZfL2-2 由来の RRD については, RNA を識別できる 48 アミノ酸残基の RRD2 が特定されている. 本研究では, これら 3 種類のペプチドを解析に用いた. 解析

に用いたペプチドの配列を図 2-4 に示す.

ペプチド試料の調製は大腸菌による合成や無細胞タンパク質生合成系による合成, 化学合成法による合成がある. 本研究では化学合成法により調製されたペプチドを用いた (北海道システム・サイエンス株式会社に合成を委託). なお, 本研究において無細胞タンパク質生合成系によるペプチド試料の調製も試みたが, 解析に利用できる試料は得られなかった.

ペプチドの収量および純度を表 2-4 に示す (合成を委託した北海道システム・サイエンス株式会社からの資料の値を記載).

表 2-1 調製した RNA 試料

| ZfL2-1 由来の RNA      |                     |                         |            |
|---------------------|---------------------|-------------------------|------------|
| 試料名                 | 標識の状態               | 合成方法                    | 量          |
| RNA1-34             | 非標識                 | 試験管内転写合成法 <sup>※1</sup> | 96 nmol    |
| RNA1-34_A-label     | A 残基標識              | 試験管内転写合成法               | 56.7 nmol  |
| RNA1-34_G-label     | G 残基標識              | 試験管内転写合成法               | 59.9 nmol  |
| RNA1-34_U-label     | U 残基標識              | 試験管内転写合成法               | 11.4 nmol  |
| RNA1-34_Full-label  | 全残基標識               | 試験管内転写合成法 <sup>※2</sup> | 54.5 nmol  |
| RNA1-34_A10-label   | A10 残基標識            | 化学合成法                   | 27.6 nmol  |
| RNA1-34_C11-label   | C11 残基標識            | 化学合成法                   | 28.4 nmol  |
| RNA1-34_C33-label   | C33 残基標識            | 化学合成法                   | 59.9 nmol  |
| RNA1-34_A26-label   | A26 残基標識<br>(30%標識) | 化学合成法 (委託合成)            | 38.4 nmol  |
| RNA1m-34            | 非標識                 | 試験管内転写合成法               | 55.9 nmol  |
| RNA1m-34_A-label    | A 残基標識              | 試験管内転写合成法               | 50.4 nmol  |
| RNA1m-34_G-label    | G 残基標識              | 試験管内転写合成法               | 31.5 nmol  |
| RNA1m-34_Full-label | 全残基標識               | 試験管内転写合成法               | 53.6 nmol  |
| RNA1m-34_G10-label  | G10 残基標識            | 化学合成法                   | 232 nmol   |
| RNA1m-34_A26-label  | A26 残基標識<br>(30%標識) | 化学合成法 (委託合成)            | 38 nmol    |
| RNA1-45             | 非標識                 | 試験管内転写合成法               | 52.5 nmol  |
| RNA1m-45            | 非標識                 | 試験管内転写合成法               | 86.3 nmol  |
| RNA1-55             | 非標識                 | 試験管内転写合成法               | 169.7 nmol |
| RNA1m-55            | 非標識                 | 試験管内転写合成法               | 173.7 nmol |
| RNA1-sl2            | 非標識                 | 化学合成法 (委託合成)            | 88 nmol    |

| ZfL2-2 由来の RNA     |                     |               |                   |
|--------------------|---------------------|---------------|-------------------|
| 試料名                | 標識の状態               | 合成方法          | 量                 |
| RNA2-17            | 非標識                 | 化学合成法（一部委託合成） | 129.2, 103.6 nmol |
| RNA2-17_G8-label   | G8 残基標識             | 化学合成法         | 192 nmol          |
| RNA2-17_A11-label  | A11 残基標識<br>(10%標識) | 化学合成法（委託合成）   | 156 nmol          |
| RNA2m-17           | 非標識                 | 化学合成法（一部委託合成） | 104, 100.4 nmol   |
| RNA2m-17_A8-label  | A8 残基標識             | 化学合成法         | 26 nmol           |
| RNA2m-17_A11-label | A11 残基標識<br>(10%標識) | 化学合成法（委託合成）   | 124 nmol          |
| RNA2-41            | 非標識                 | 試験管内転写合成法     | 56.3 nmol         |
| RNA2m-41           | 非標識                 | 試験管内転写合成法     | 60 nmol           |

※1 既往研究において調製された試料

※2 既往研究において調製された試料を一部含む

試料の量は 260 nm の吸光度を測定し計算した。

表 2-2A 転写キットを用いた転写反応液の組成

|  |             |             |
|--|-------------|-------------|
| RNase Free Water                               | 60 $\mu$ L  |             |
| 10 $\times$ T7-Scribe™ Transcription Buffer    | 20 $\mu$ L  |             |
| 100 mM NTP                                     | 60 $\mu$ L  |             |
| 20 $\mu$ M 鋳型 DNA<br>(T7 promoter とアニーリングしたもの) | 20 $\mu$ L  | ボルテックス      |
| 100 mM DTT                                     | 20 $\mu$ L  | ピペッティング後に氷上 |
| T7-Scribe™ Enzyme Solution                     | 20 $\mu$ L  | 氷上でピペッティング  |
|  | 200 $\mu$ L |             |

(鋳型 DNA 以外の試薬はキット (T7-Scribe™ Standard RNA IVT Kit, CELLSRIPT) に含まれている)

表 2-2B 転写キットを用いない転写反応液の組成

|  |                         |             |
|--|-------------------------|-------------|
| 滅菌水  | X $\mu$ L <sup>*1</sup> |             |
| 100 mM NTP   | 60 $\mu$ L              |             |
| 20 $\mu$ M 鋳型 DNA<br>(T7 promoter とアニーリングしたもの)             | 20 $\mu$ L              |             |
| 80% Glycerol   | Y $\mu$ L <sup>*2</sup> |             |
| 4 $\times$ 転写反应用緩衝液 <sup>*3</sup>                          | 50 $\mu$ L              | ボルテックス      |
| 100 mM DTT   | 20 $\mu$ L              | ピペッティング後に氷上 |
| 10 mg/ mL T7 RNA polymerase<br>(50% Glycerol 含む, 大陽日酸株式会社) | 1 $\mu$ L               | 氷上でピペッティング  |
|  | 200 $\mu$ L             |             |

※1 転写反応液が 200  $\mu$ L になるように滅菌水で調節

※2 Glycerol 濃度は 20  $\mu$ L スケールでの条件検討により試料ごとに調節 (0.25%~5.25%)

※3 4 $\times$ 転写反应用緩衝液

360 mM Tris-HCl (pH 8.1, 37°C)

140 mM MgCl<sub>2</sub>

40 mM NaCl

8 mM Spd

0.04% TritonX

320 mg/mL PEG 8000

表 2-3 精製に用いたゲルの組成

|                            |           |           |
|----------------------------|-----------|-----------|
|                            | 12%       | 20%       |
| 40%アクリルアミド溶液 <sup>※1</sup> | 36 mL     | 60 mL     |
| 10×TBE                     | 12 mL     | 12 mL     |
| Urea                       | 50.4 g    | 50.4 g    |
| 超純水                        | 120 mL まで | 120 mL まで |
| APS                        | 0.1 g     | 0.1 g     |
| TEMED                      | 20 μL     | 20 μL     |
|                            | 120 mL    | 120 mL    |

※1 Acrylamide と N, N'-Methylene-bis (acrylamide) の比率は 19:1

表 2-4 ペプチドの収量および純度<sup>a)</sup>

|         | 収量     | 純度     |
|---------|--------|--------|
| RRD1    | 5.1 mg | 95.69% |
|         | 1.3 mg | 96.26% |
| RRD1-48 | 5.6 mg | 95.32% |
| RRD2    | 5.3 mg | 95.67% |
|         | 5.3 mg | 95.11% |
|         | 1.5 mg | 95.1%  |

a) ペプチドの収量および純度は、合成元である北海道システム・サイエンス株式会社からの資料の値を記載した。

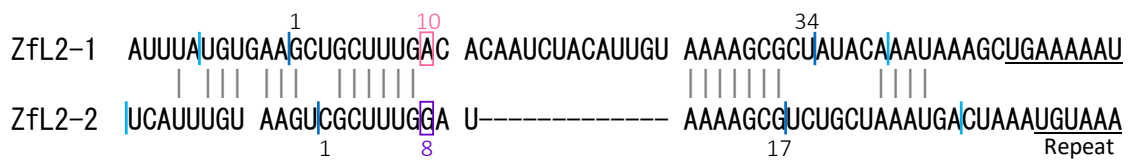


図 2-1 解析に用いた RNA の領域

3'末端に存在するステムループ付近の配列.

青色の線の間領域は RNA1-34 (ZfL2-1) および RNA2-17 (ZfL2-2) に対応する配列.

水色の線の間領域は RNA1-45 (ZfL2-1) および RNA2-41 (ZfL2-2) に対応する配列.

桃色の四角および紫色の四角は認識に重要な残基を示す.

なお, 試験管内転写合成法によって RNA を合成した際には転写効率を上げるために 5'末端の配列を置換している.



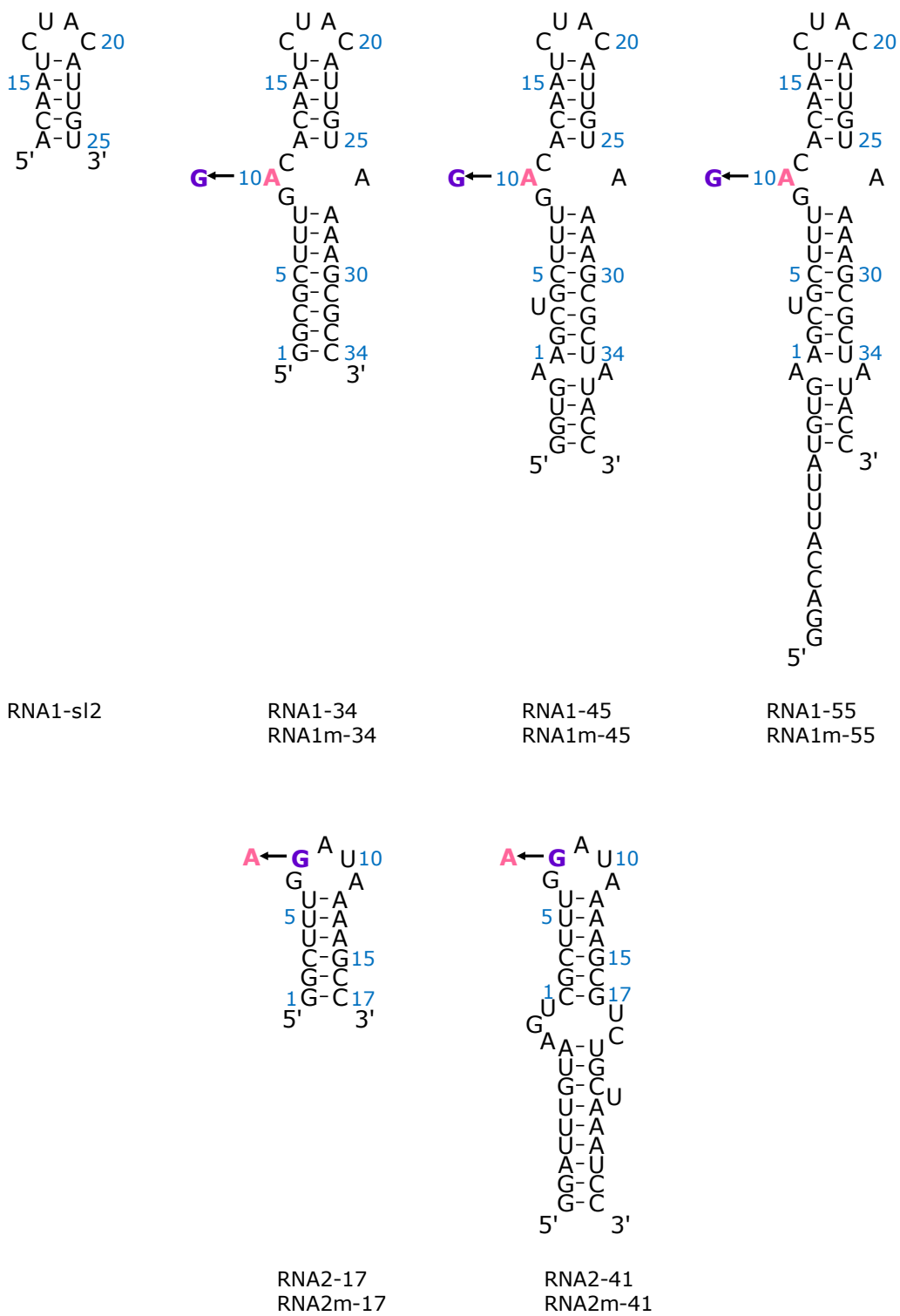


図 2-2 RNA の予測される二次構造

桃色および紫色は認識に重要な残基を示す. 青色は残基番号を示す. 矢印は置換した残基を示す.

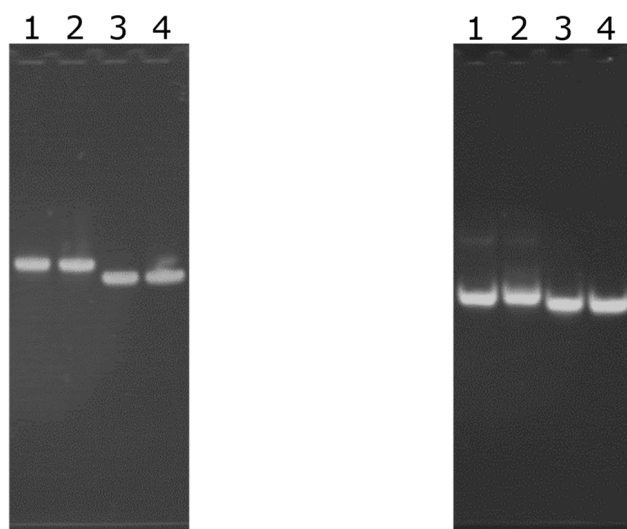


図 2-3 試料の確認の PAGE

左：精製確認のための変性 PAGE (10%)

右：コンホメーション確認のための非変性 PAGE (10%)

1：RNA1-45

2：RNA1m-45

3：RNA2-41

4：RNA2m-41



## 第3章 NMR法によるLINE RNAの立体構造決定

### 3-1 はじめに

LINEの特異的な認識メカニズムを解析するため、まずはLINE RNAの単体での立体構造解析を行った。

立体構造解析については溶液NMR法を用いて解析した。溶液中の立体構造が得られることや、核酸は結晶化に向いていないことから、溶液NMR法による解析を行った。

既往研究において、ゼブラフィッシュ由来のLINEであるZfL2-2の3'末端のステムループに対応するRNA (RNA2-17)の立体構造が決定されている (PDB ID: 1wks)<sup>16)</sup>。

本研究では、ZfL2-1由来のRNA (RNA1-34)の立体構造解析を行い、立体構造を決定した (PDB ID: 2rvo)<sup>20)</sup>。

### 3-2 方法

#### 3-2-1 NMRスペクトルの測定

ZfL2-1由来のRNAであるRNA1-34では解析を進めるために残基特異的な安定同位体標識試料 (試験管内転写合成法) や、部位特異的な安定同位体標識試料 (化学合成法) を調製した。また、RNA1-34の部分的な配列であるRNA1-s12や、RNA1-34を1残基置換したRNAであるRNA1m-34も用いた (図3-1)。試料の調製については第2章に記す。試料の緩衝液は5%の重水を含み、50 mM塩化ナトリウムを含む20 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) を用いた。

NMR分光計はDRX-500, DRX-600, AVANCE-600 (ブルカージャパン株式会

社) を用いた。帰属には理化学研究所の AVANCE-800 において測定した NMR スペクトルを用いた。測定温度は 288 K~318 K で測定し、288 K で測定したデータを用いて構造計算を行った。軽水中でのイミノプロトンスペクトルは jump and return パルスで溶媒のシグナルを除去した (1D JR) 。また、軽水中での HOHAHA スペクトルや NOESY スペクトルは 3-9-19 パルスで溶媒のシグナルを除去した (HOHAHA 3-9-19, NOESY 3-9-19) 。

得られた NMR スペクトルは TopSpin (3.0.b.8 または 3.5pl7, ブルカー・ジャパン株式会社) および SPARKY (Ver. 3.114, UCSF) を用いて解析した。

### 3-2-2 立体構造計算

立体構造計算では構造を収束させるため、NMR スペクトルから得られた距離情報などを用いて計算した後に、さらに残余双極子相互作用 (Residual dipolar coupling: RDC) を用いて精密化計算を行った<sup>21,22)</sup>。

まず、通常の新標識試料の他に標識試料などを用いて解析を進め、より多くのシグナルを帰属し、立体構造を計算してある程度収束した構造を得た。また、調製した Pfl フェージを入れる前と後で NMR スペクトルを測定し解析することによって RDC の値を求めた。次に、ある程度収束した構造と、算出した RDC の値を用いて精密化計算を行った。

#### < 構造計算 (RDC の情報を含めない構造計算) >

標識試料などを用いて帰属を進めて拘束条件を作成し立体構造計算を行った。構造をより収束させるため、計算した立体構造と計算に用いた拘束条件を比較して、立体構造では遠いが拘束条件として入力していない残基を挙げ、その残基について NMR スペクトルを確認し、確実にシグナルが無い残基について“近く

ない”という情報を拘束条件に追加した。“近くない”の拘束条件は距離を 4.50 Å とし、許容範囲の幅は、近い側の許容値を 0.50 Å、遠い側の許容値を 30.0 Å とした。さらに、NOE の選別を行った。拘束条件の作成に用いた NOESY スペクトルは Mixing time: 200 ms である。同じ試料と同じ NMR 装置を用いた同じ時期の Mixing time: 50 ms と 100 ms の NOESY スペクトルも測定されていたため、200 ms と 100 ms または 50 ms のスペクトルを比較して、NOE の volume がどちらも相関が無いシグナルは除いた。

立体構造計算には、cns\_solve (Ver. 1.3, Yale University) を用い、立体構造の表示には、Chimera (Ver. 1.8.1, UCSF) を用いた。

#### <Pfl ファージの調製>

Pfl ファージを重水のリン酸緩衝液 (50 mM NaCl 含む 20 mM リン酸緩衝液, pH 6.5, 重水) に交換するため、まずは重水のリン酸緩衝液を調製した。重水のリン酸緩衝液は、軽水のリン酸緩衝液を遠心エバポレーターで乾燥させて重水で溶解することによって調製した。

次に、Pfl ファージの緩衝液交換を行った。Pfl ファージは ASLA biotech の MAGNETIC RESONANCE COSOLVENT #P100-RNA (54±4 mg/ mL, 2.0 mL) を用いた。まず、超遠心用のチューブに Pfl ファージ 300 µL (54±4 mg/ mL) と重水のリン酸緩衝液 3 mL を入れ、超遠心機 (himac CS150GX II Micro Ultracentrifuge, HITACHI) で 80000 rpm, 20 °C, 60 min 遠心し、上清を遠沈管に取り (廃液), 沈殿に重水のリン酸緩衝液 3 mL 加え、氷上でピペッティングしながら Pfl ファージを丁寧によく懸濁した。さらに遠心・上清分取・溶解・懸濁を 2 回繰り返す (遠心は合計 3 回行った), 緩衝液を交換した。緩衝液交換後の Pfl ファージは希釈液を調製し 270 nm の吸光度を測定して濃度を計算した。

#### <RDC の値の算出>

調製した Pf1 フェージを標識試料に加えて NMR スペクトルの測定を行った。まず、Pf1 フェージを加える前に  $^2\text{H}$ -NMR を測定し、Pf1 フェージを加えて割れ幅を確認した後、tuning, shimなどを調製し、SQC スペクトルおよび TROSY スペクトルを測定した。Pf1 フェージの濃度は 20 mg/mL になるように測定試料を調製した。

測定した NMR スペクトルは TopSpin を用いてデータ処理および解析を行った。これまでの SQC スペクトルの帰属を参考に、研究室で開発されたパルスプログラム (TROSY スペクトルの高磁場側と低磁場側のシグナルをそれぞれ独立に観測するプログラム, 未発表) を用いて 288 K の TROSY スペクトルの解析を行った。帰属は SPARKY に入力した。

288 K の TROSY スペクトルを用いて、Pf1 フェージ有無でのカップリング定数の変化を観測することによって RDC の値を算出した。まず、Pf1 フェージなしの TROSY スペクトルの割れ幅を読み、さらに Pf1 フェージ有りの TROSY スペクトルの割れ幅を読み、2つの割れ幅の差を取り RDC の値とした。RDC の誤差は、測定した TROSY スペクトルの精度 (Topspin の spectral resolution: HzpPT [Hz] の値) が約 1.5 Hz であったため、1.5 Hz とした。

また、318 K の RDC の値も算出し、288 K の値と比較した。

なお、RDC は、シグナルを確実に読み取れた残基のみを用いることにした。重なっているシグナルや、ブロードなシグナル、シグナルは独立しているが SPARKY の Peak Pick (Pointer Mode の find/ add peak) によって複数ヶ所をピックされたシグナルは用いなかった。

### <精密化計算 (RDC の情報を含めた構造計算) >

本研究で用いている精密化計算は研究室独自の手法である。

算出した RDC の値と, RDC の情報を含めずに計算したある程度収束した立体構造を用いて精密化計算を行った. 配向テンソルの推定は XPLOR-NIH (NIH) によるグリッドサーチで行った.

グリッドサーチの初期構造はある程度収束した構造 (精密化計算前) で拘束条件を満たしたエネルギーの低い 50 個を用いた. また, 使用した RDC の値は収束が低い残基 (末端, 内部ループ, ループ) を除いて使用した.

精密化計算の初期構造は, グリッドサーチと同じくエネルギーの低い 50 個を用いた. また, RDC の値は算出できた全ての値を用いた.

グリッドサーチにより得られた配向テンソルの主軸 ( $Da$ ) と斜方軸 ( $R$ ) の値を用いて精密化計算を行ったが, 計算の収束が低かった. そこで,  $Da$  と  $R$  の値を前後に振って精密化計算を行い, 最もよく収束した構造を精密化された最終的な構造とした.

また, 精密化計算では RDC の値が強く効き過ぎてしまい, ステムが細長くなる傾向にあった. 特に内部ループでは, G9 が反対側の鎖に食い込んでいることが多かった. vdw の強さを変えてもほとんど変化しなかったため, H2' (n) - H6/H8 (n+1) および O2' (n) - H5' (n+1) の距離が RNA-A 型となるように距離の拘束条件を追加した (36 個の拘束条件. class STEM: (n) H2' - (n+1) H6/H8, (n) O2' - (n+1) H5').

### 3-2-3 分子動力学計算

得られた立体構造を基に AMBER12<sup>23)</sup> を用いて分子動力学計算 (MD 計算) を



100 ns 行った。まず、全体の電荷をゼロとするためにナトリウムイオンを付加した。次に、RNA 分子と最も近い壁の距離が 9.0 Å となるような箱を仮定してその中を水分子で埋めた。力場パラメータとしては ff12SB を用いた。100 ns の本計算では周期境界条件を用い、静電的相互作用については particle-mesh Ewald 法で計算した。また、ファン・デル・ワールス相互作用のカットオフは 9 Å とした。

さらに、MD 計算の結果に基づき各残基のゆらぎを解析した。3 残基ごとに重ね合わせた際の真ん中の残基の R.m.s.d. の値を用いた。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 NMR スペクトルの解析

RNA1-34 のイミノプロトンスペクトルの帰属および NOESY スペクトルの帰属を図 3-2, 3 に示す。シグナルの帰属では、残基特異的な標識試料や部位特異的な標識試料、部分的な配列の試料、1 残基置換した試料やその標識試料と比較しながら解析を進めた (図 3-4, 5)。なお、部分構造や 1 残基置換した試料は、RNA1-34 の一部もしくは全体とほとんど同じ構造であることを確認してからシグナルの帰属のための比較に用いた。

#### 3-3-2 立体構造決定

立体構造計算に用いた情報を図 3-6~8 に示す。立体構造計算での拘束条件および統計値を表 3-1, 2 に示す。また、得られた立体構造を図 3-9 に示す。

図 3-6 では立体構造計算に用いた NOE の相関図を示す。実線はシグナルが観

測された NOE を示し、点線はシグナルが無いことを確認し“近くない”という情報を入力した残基を示す。図 3-7 では精密化計算に用いた RDC の値を入力した残基を示す。精密化計算には 24 個の RDC の値を用いた。図 3-8 では構造計算に用いたその他の構造情報を示す。

精密化前の立体構造計算では 200 回計算し、拘束条件を満たす 58 個の構造が得られた。このうちエネルギーの低い 50 個の構造と RDC の値を用いて精密化の計算を行った。精密化前の構造の R.m.s.d. (All) は  $1.665 \pm 0.950$  であったが、精密化後は  $1.465 \pm 0.561$  となり、RDC の値を用いることによってより収束した構造が得られた。

なお、RNA1-34 の精密化計算では、グリッドサーチと構造計算を繰り返すことによって収束した構造を得ることができた。この方法は当研究室の独自の手法であり、ゆらぎの大きい他の RNA の構造計算においても有用であると考えている。

### 3-3-3 立体構造の特徴

RNA2-17 については GGAUA ループの G7 と A11 が塩基対を組んでいることが示されていた<sup>16)</sup>。一方、RNA1-34 については内部ループの G9 と A26 は平均構造において塩基対を組んでいなかった。しかし、RNA1-34 の MD 計算を行った結果、1 ns から 80 ns まで近い距離であることが示された。MD 計算の結果を図 3-10 に示す。各残基のゆらぎについて、RNA1-34 ではステムループ部分のゆらぎが大きいですが、内部ループの C11 や A26 もゆらいでいることが分かった。10 ns ごとの構造およびその重ね合わせを図 3-11 に示す。

### 3-4 考察

#### 3-4-1 立体構造の比較

立体構造計算によって得られた構造は平均構造であるため分子のゆらぎは分からない。そこで、MD 計算を行うことによって動的性質を調べた。平均構造では G9 と A26 は塩基対を組んでいないが MD 計算では近い位置にあったことから、溶液中ではある程度の割合で塩基対が組み立てられていることが示唆され、このことは RNA2-17 において G7 と A11 が塩基対を組んでいることと対応していると考えられる。

#### 3-4-2 立体構造に基づいた LINE の認識特異性

RNA1-34 と RNA2-17 の立体構造の比較から、RNA1-34 の内部ループの G9, A10, C11, A26 は RNA2-17 のループの G7, G8, A9, A11 のそれぞれと立体構造上の位置が対応していることが示唆された (図 3-12)。2 種類の LINE において立体構造上の位置が対応していることから、LINE が増幅する際の逆転写酵素による RNA の認識では、逆転写酵素は残基の違いを識別していることが考えられた。

### 3-5 まとめ

溶液 NMR 法を用いることによって RNA1-34 の立体構造を決定することができた。

また、立体構造の比較により、2 種類の LINE での逆転写酵素による RNA の認識の特異性は残基の種類によることが考えられた。

表 3-1 拘束条件

|  |       |
|--|-------|
| Number of experimental restraints          |       |
| Distance restraints                        | 357   |
| Intraresidue                               | 74    |
| Sequential                                 | 135   |
| Medium range                               | 11    |
| Long range                                 | 12    |
| Overlaped                                  | 14    |
| absence of strong NOE signals              | 43    |
| vdw distance (only with RDC) <sup>a)</sup> | 36    |
| Hydrogen bonding                           | 32    |
| Dihedral restraints                        | 294   |
| Planarity for base pairs                   | 13    |
| RDC C-H (base)                             | 24    |
| Alignment tensor                           |       |
| <i>Da</i>                                  | -25.9 |
| <i>R</i>                                   | 0.04  |

a) 水素原子が食い込むことを避けるため拘束条件を追加した（本文の 3-2-2 参照）。

表 3-2 統計値

|   |                   |
|---|-------------------|
| Heavy-atoms r.m.s. deviation (Å) <sup>a</sup> without RDC |                   |
| All   | 1.665 ± 0.950     |
| All (pairwise)  | 2.139 ± 0.708     |
| Backbone  | 1.595 ± 0.951     |
| Backbone (pairwise)                                       | 2.031 ± 0.716     |
| 1-8,27-34   | 0.574 ± 0.317     |
| 1-8,27-34 (pairwise)                                      | 0.704 ± 0.196     |
| 12-16,21-25   | 0.479 ± 0.189     |
| 12-16,21-25 (pairwise)                                    | 0.536 ± 0.125     |
| r.m.s.d. around the ideal values without RDC              |                   |
| bonds (Å)   | 0.00340 ± 0.00005 |
| angle (°)   | 0.8148 ± 0.0087   |
| Heavy-atoms r.m.s. deviation (Å) <sup>a</sup> with RDC    |                   |
| All   | 1.465 ± 0.561     |
| All (pairwise)  | 1.342 ± 0.476     |
| Backbone  | 1.218 ± 0.459     |
| Backbone (pairwise)                                       | 1.119 ± 0.420     |
| 1-8,27-34   | 0.296 ± 0.113     |
| 1-8,27-34 (pairwise)                                      | 0.348 ± 0.065     |
| 12-16,21-25   | 0.439 ± 0.169     |
| 12-16,21-25 (pairwise)                                    | 0.425 ± 0.098     |
| r.m.s.d. around the ideal values with RDC                 |                   |
| bonds (Å)   | 0.00340 ± 0.00003 |
| angle (°)   | 0.8112 ± 0.0109   |

<sup>a</sup>Averaged r.m.s.d. between an average structure and the 10 converged structures were calculated. The converged structures did not contain experimental distance violation of >0.5 Å or dihedral violation >5°.

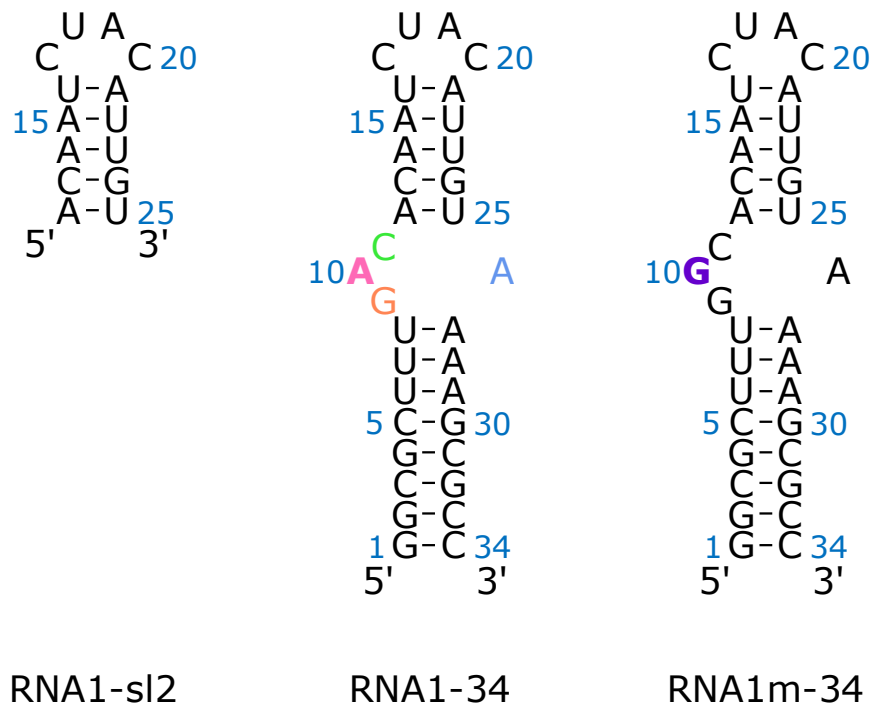


図 3-1 立体構造解析に用いた RNA

RNA1-34 の解析を進めるために RNA1-34 の部分的な配列である RNA1-s12 や、RNA1-34 を 1 残基置換した RNA である RNA1m-34 を用いた。

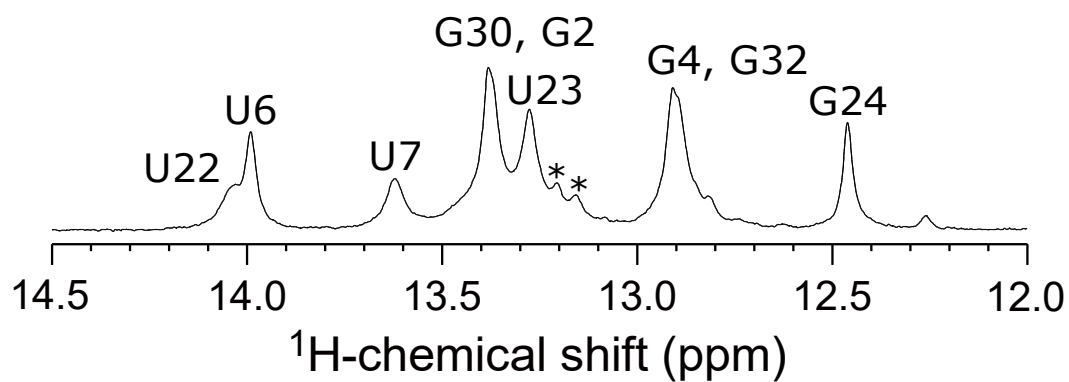


図 3-2 RNA1-34 のイミノプロトンスペクトル

\* : 末端に付加された配列由来のシグナル

(化学合成法により調製した試料にはこのシグナルがない)

ステムの端に位置する U8, U16, U25, C34 のシグナルは帰属されていない.

ステムの端の塩基対のイミノプロトンシグナルは溶媒の水との交換によって観測されなかったことが考えられる.

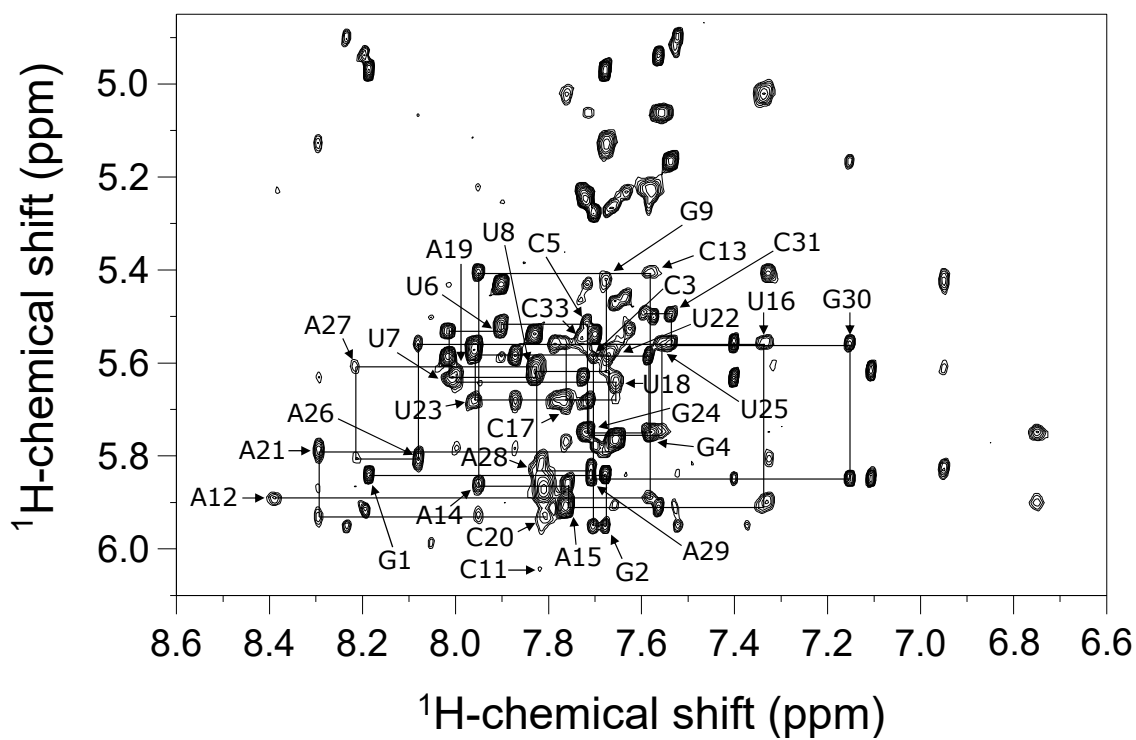


図 3-3 RNA1-34 の NOESY スペクトル

RNA1-34 の連鎖帰属を線で示した。

残基内のシグナルに残基番号を示した。

A10, G32, C34 の残基内のシグナルは帰属されていない。



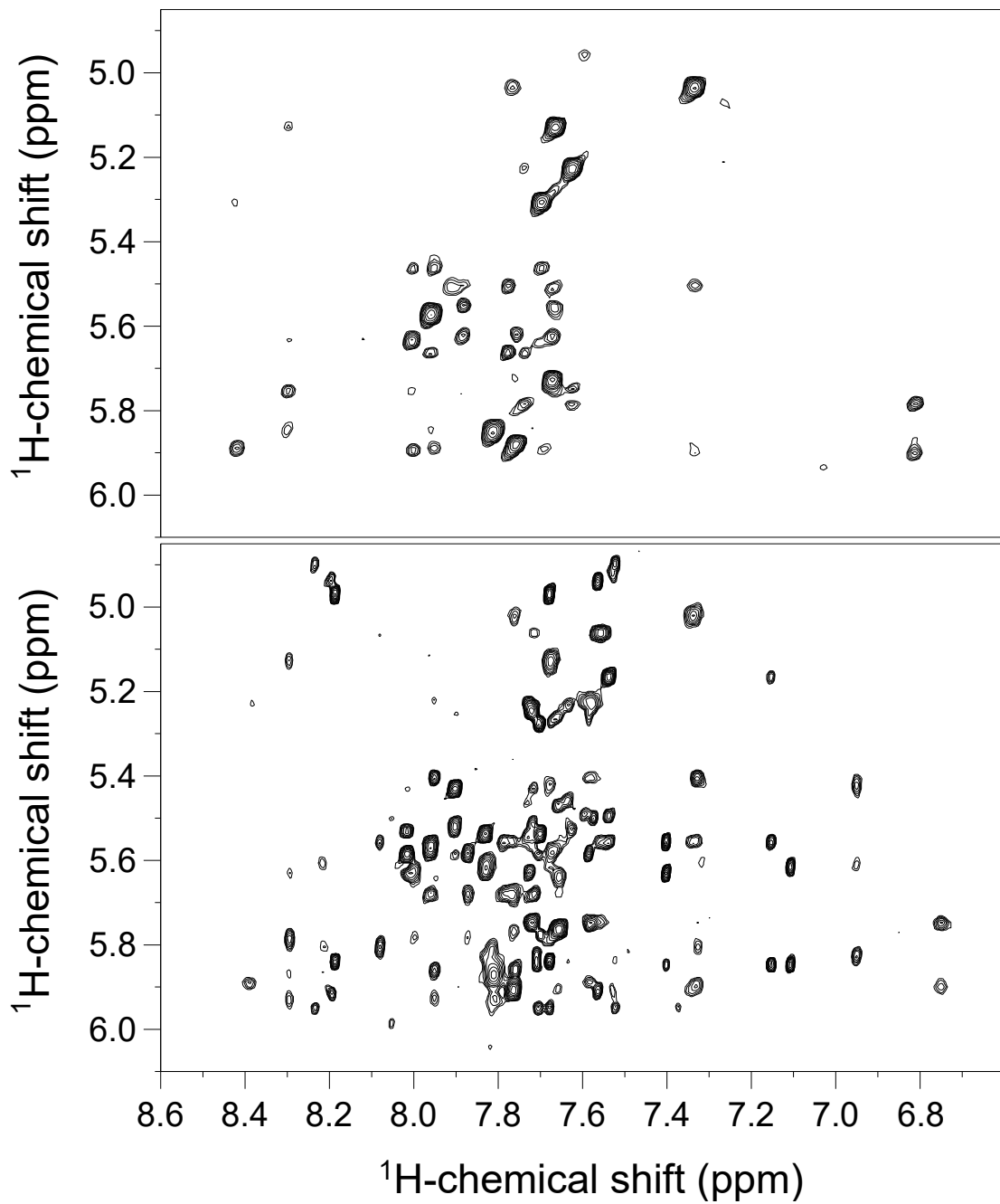


図 3-4 RNA1-s12 (上) と RNA1-34 (下) の NOESY スペクトル  
RNA1-s12 と RNA1-34 は多くのシグナルが重なりスペクトルが似ていた.

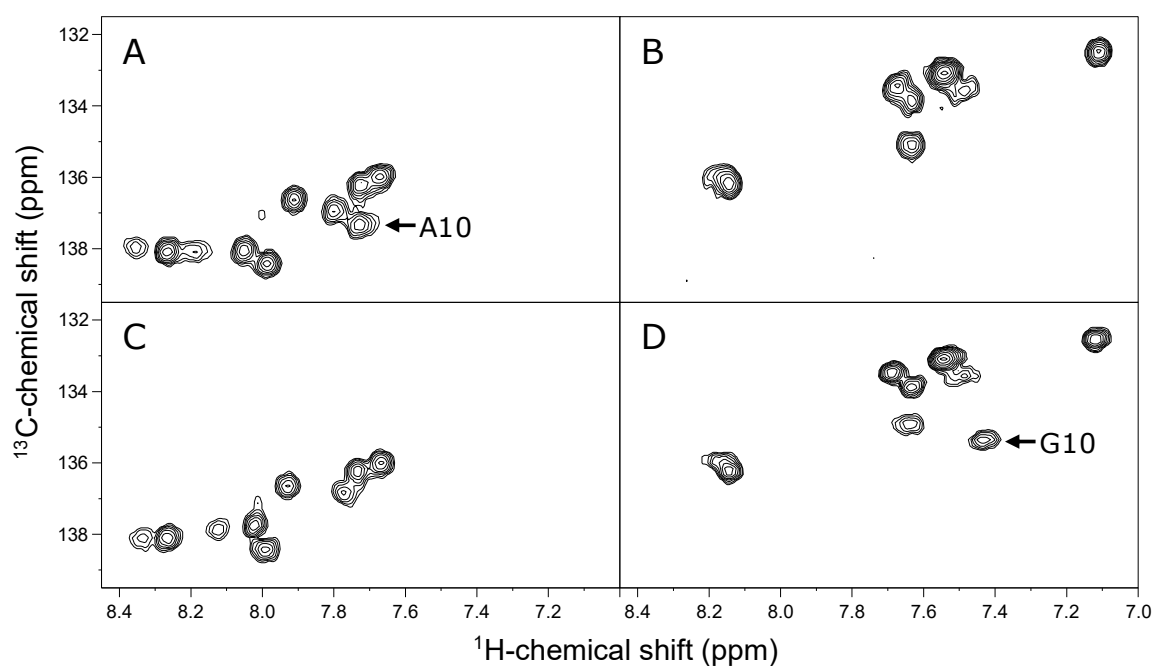


図 3-5 RNA1-34 および RNA1m-34 の SQC スペクトル

A : RNA1-34 の A-label

B : RNA1-34 の G-label

C : RNA1m-34 の A-label

D : RNA1m-34 の G-label

RNA1-34 と RNA1m-34 は置換残基以外のシグナルがほとんど同じであった。

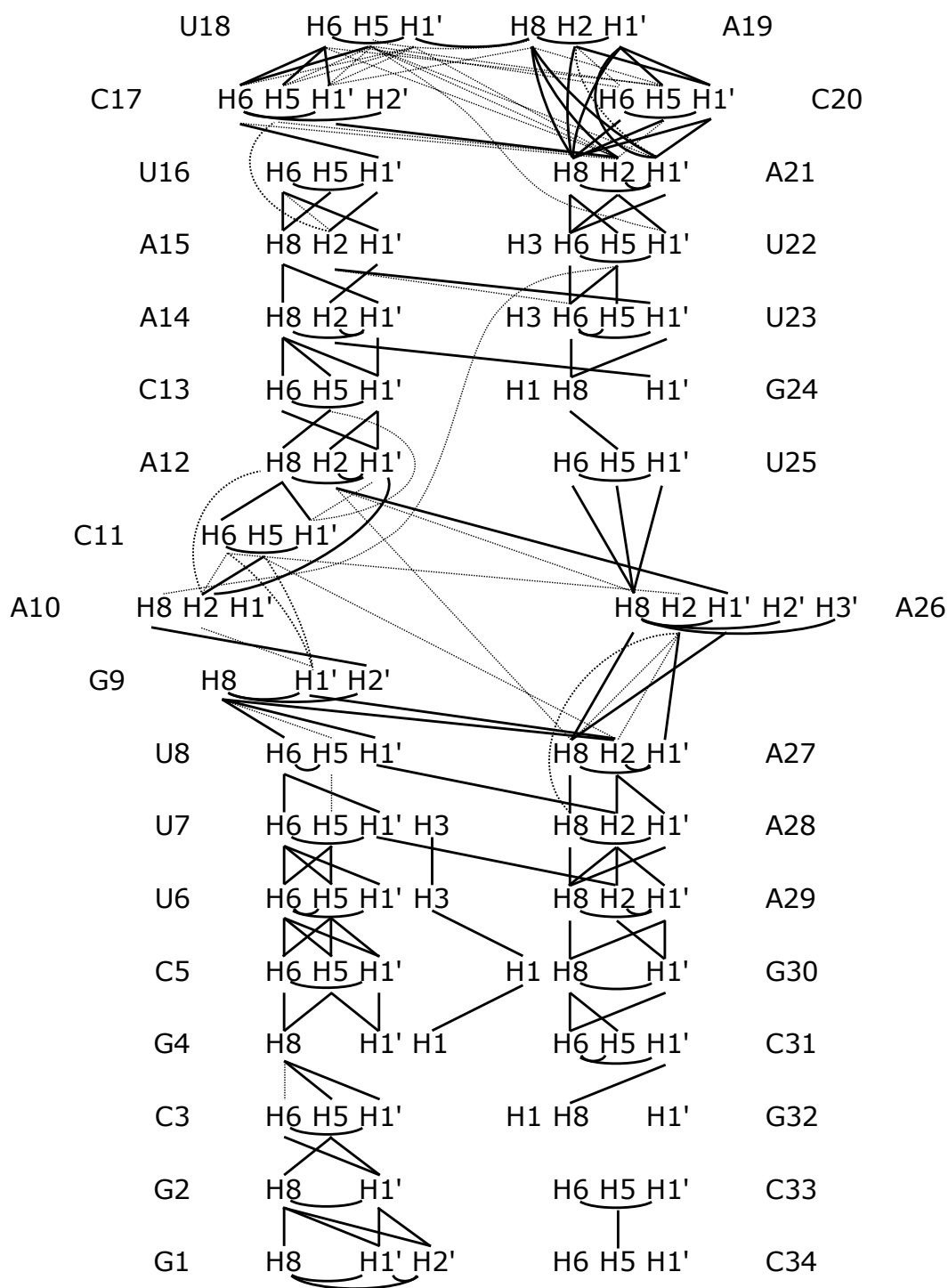


図 3-6 立体構造計算に用いた NOE の情報

— : 距離情報  
 ..... : “近くない”

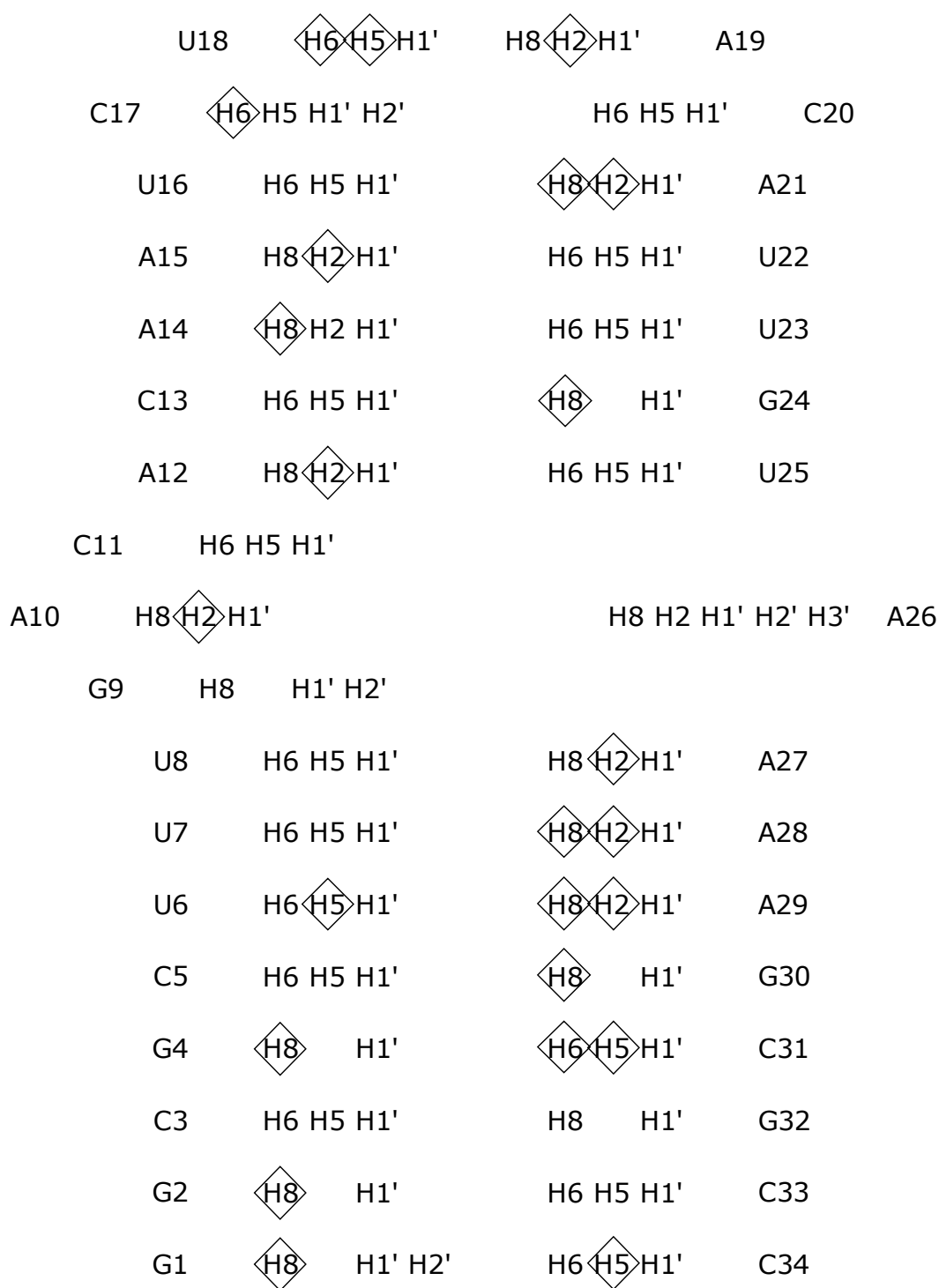


図 3-7 精密化計算において RDC の値を用いた残基

◇ : RDC の値を用いた残基

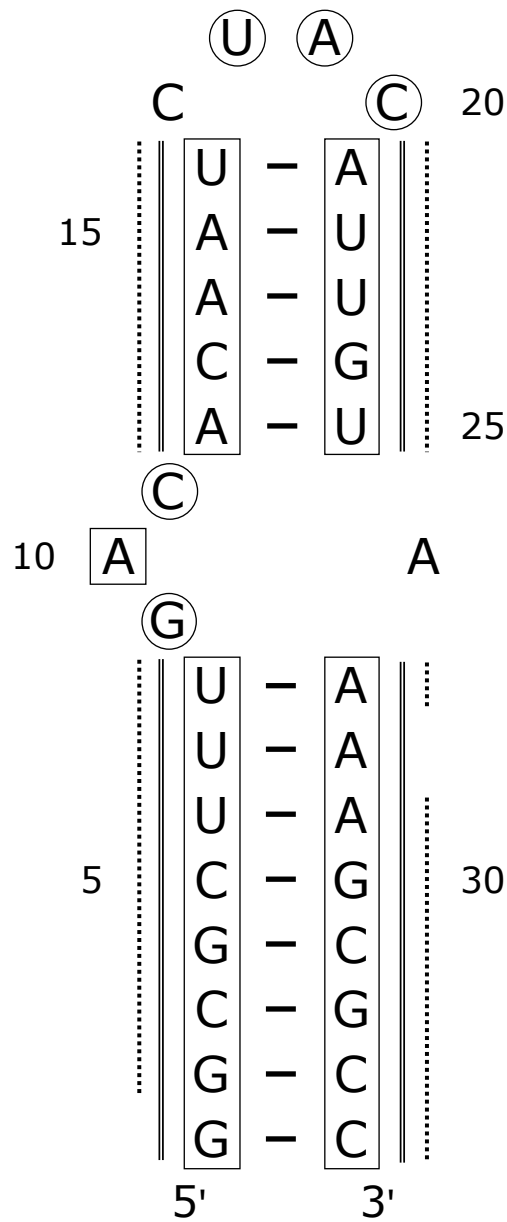


図 3-8 立体構造計算に用いたその他の情報

- : C2'-endo form
- : C3'-endo form
- ..... : anti form
- = : RNA-A helix
- : Hbond, Plane

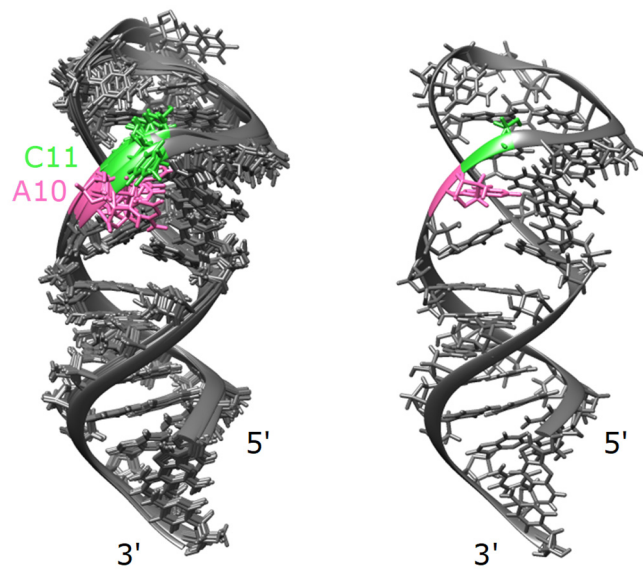


図 3-9 RNA1-34 の立体構造

左：エネルギーの低い 10 個の構造

右：平均構造

P ink: A10, Lime green: C11

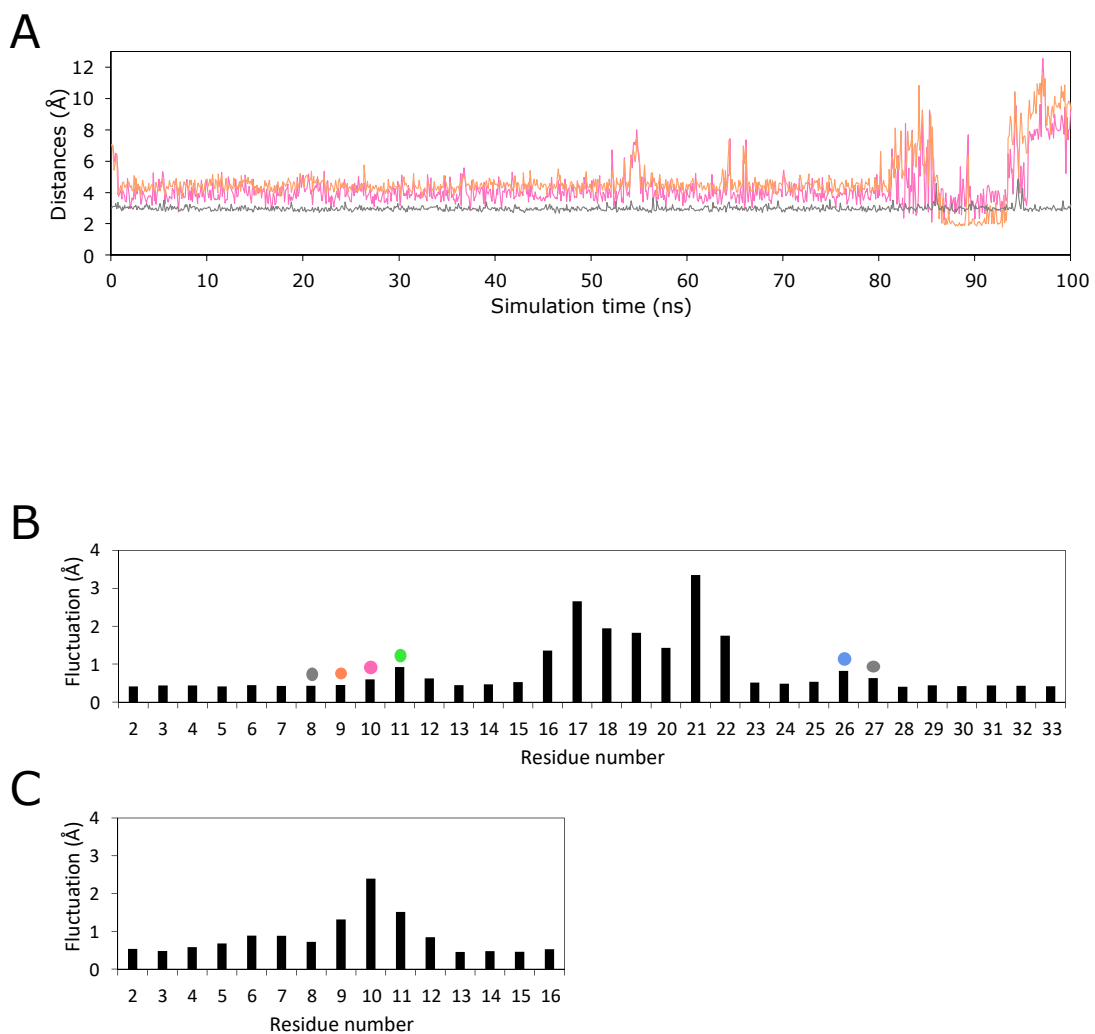


図 3-10 RNA1-34 の MD 計算の結果

A : RNA1-34 の MD 計算の結果

Pink: distances between H2 of A10 and H2 of A26. Coral: distances between H1 of G9 and N1 of A26. Grey: distances between H3 of U8 and N1 of A27

B : RNA1-34 の各残基のゆらぎ

棒グラフの上の丸の色は図 3-10A, 11 の各残基の色と対応している.

C : RNA2-17 の各残基のゆらぎ

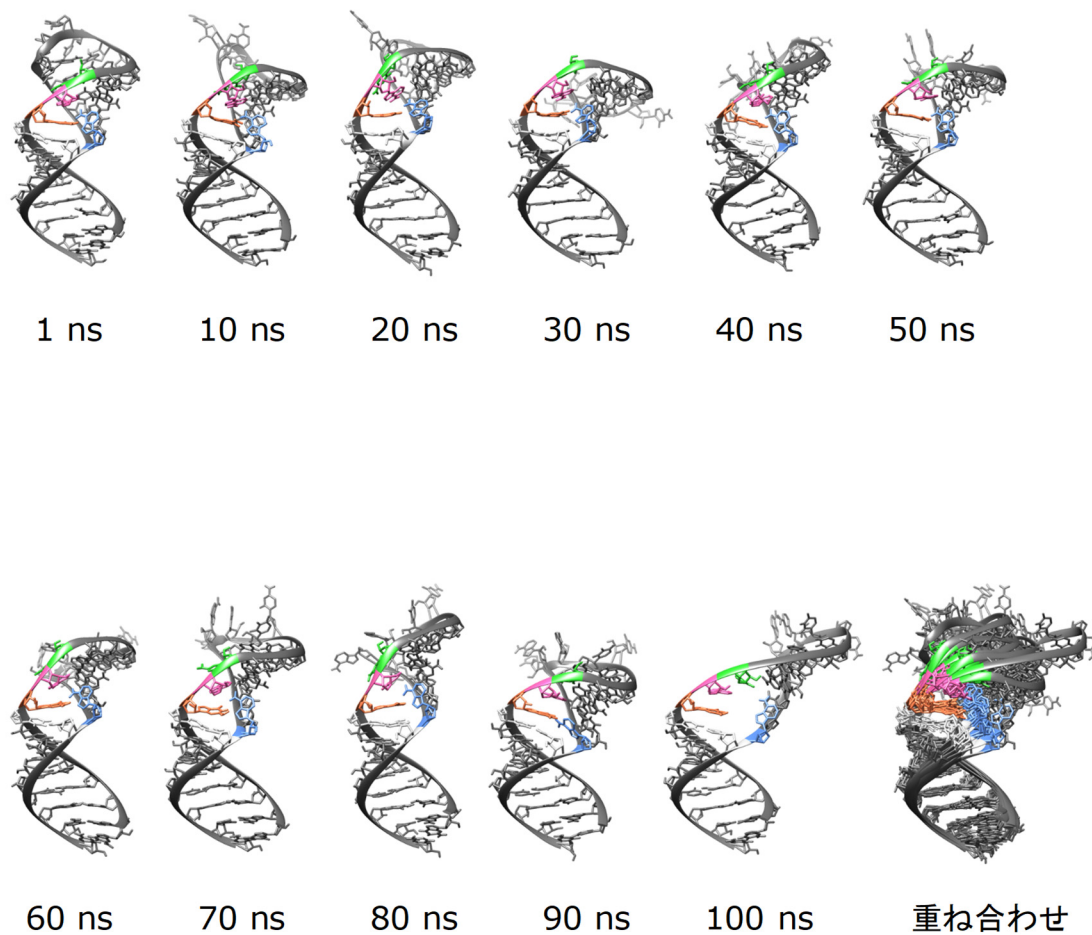


図 3-11 RNA1-34 の MD 計算の 10 ns ごとの構造

Light gray: U8/A27, Coral: G9, Pink: A10, Lime green: C11, Cornflower blue: A26  
 それぞれの色は図 3-10B の棒グラフの上の色と対応している。



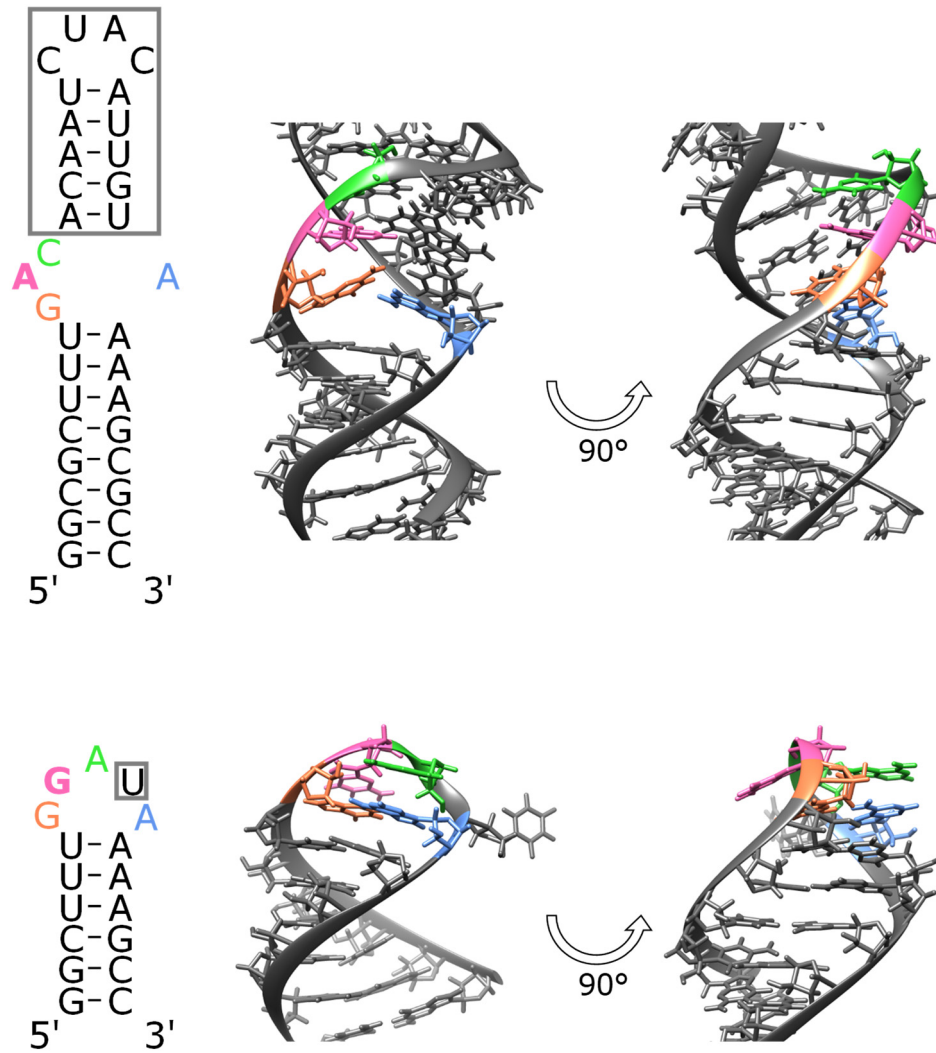


図 3-12 RNA1-34 (上) と RNA2-17 (下) の立体構造の比較  
 配列と立体構造の色は対応している。  
 Coral: G9/G7, Pink: A10/G8, Lime green: C11/A9, Cornflower blue: A26/A11

## 第4章 ゲルシフト法による LINE RNA と逆転写酵素の相互作用解析

### 4-1 はじめに

逆転写酵素による認識メカニズムを解明するため、まずはゲルシフト法による解析を行った。なお、LINE RNA については3'末端のステムループの領域を用いた（図 4-1）。逆転写酵素については特異的な相互作用を示す最も短い領域を用いた（図 4-1）。

ゲルシフト法による解析では、RNA とペプチドのモル比やインキュベート時間など様々な条件で実験を行った。本論文では、RRD1 と RRD2 による RNA1 および RNA2 への結合の差が最も分かりやすい結果が得られた実験の条件を記す。

RNA とペプチドを用いてゲルシフト法による相互作用解析を行い、RRD による認識の方法について考察した<sup>24)</sup>。

### 4-2 方法

#### 4-2-1 電気泳動

ゲルシフト法による解析に用いた RNA については立体構造解析に用いた RNA より長い配列を用いた（図 4-1, 図 2-1,2）。立体構造解析では解析が容易になることから試料は短い RNA を用いたが、ゲルシフト法による解析ではそれよりも長い RNA を用いた。ZfL2-1 由来の RNA1-45 および ZfL2-2 由来の RNA2-41 と、さらにそれぞれを 1 残基置換した配列である RNA1m-45 および RNA2m-41 を用いた。また、RNA1 の一部のステムループと同じ配列の RNA1-s12 も用いた。試料の調製については第 2 章に記す。

ペプチドについてはそれぞれの RNA を識別する領域である RRD1 および

RRD2 を用いて解析を進め、補足として RNA を識別しない領域である RRD1-48 も用いた (図 4-1) .

RNA とペプチドのモル比は 1:3 になるように調製した. RNA は 50 mM 塩化ナトリウム含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液の状態であり, ペプチドは滅菌水に溶解した状態である. RNA1-45, RNA1m-45, RNA2-41, RNA2m-41, RNA1-sl2 の濃度はそれぞれ 1.4  $\mu$ M, 2.3  $\mu$ M, 1.5  $\mu$ M, 1.6  $\mu$ M, 6.3  $\mu$ M である. RRD1, RRD2, RRD1-48 の濃度はそれぞれ 22.7  $\mu$ M, 25.2  $\mu$ M, 10.1  $\mu$ M である. RNA が 5 pmol, ペプチドが 15 pmol になるように 0.5 mL チューブ内で混合し, 混合後の体積は RNA1-45/RNA1m-45/RNA2-41/RNA2m-41 +RRD1 では 4.13  $\mu$ L で, RNA1-45/RNA1m-45/RNA2-41/RNA2m-41 +RRD2 では 4.07  $\mu$ L で, RNA1-sl2 +RRD1/RRD2/RRD1-48 では 2.53  $\mu$ L であった. 室温で 30 min 静置した後に色素 (80% Glycerol, XC, BPB) を混ぜ, 非変性状態の PAGE (10%) を行った. 泳動用緩衝液は塩化ナトリウムを含まないもしくは 50 mM または 100 mM 含む TBE 緩衝液 (89 mM Tris/ 89 mM Boric Acid/ 2 mM EDTA) を用いた. ゲルは SYBR Gold nucleic acid gel stain (Invitrogen MOLECULAR PROBES) を用いて染色し, FAS-III (NIPPON Genetics Co., Ltd) によって撮影した. バンドの強度は積分して数値化する in-house program によって 5 段階に分類した. なお, RNA1-45/RNA1m-45/RNA2-41/RNA2m-41 では同じレーンにある RNA のみのバンドとシフトしたバンドの濃さを比較して各レーンでの比を取り, RNA1-sl2 では RNA 単独のレーンのバンドと各レーンの RNA のバンドの濃さを比較して相対値を取った. また, シフトしたバンドが見られた一部のゲルについては, RNA を染色する SYBR Gold を用いて染色した後に, ペプチドを染色する Quick-CBB (富士フイルム和光純薬株式会社) を用いて染色した.

## 4-3 結果

### 4-3-1 RRD2 による RNA の識別

ZfL2-2 とよく似ている UnaL2 では逆転写酵素による認識に G8 が重要であることが示されていた<sup>16)</sup>。そこで、まずは RRD2 を用いてゲルシフト法による解析を行った。

塩化ナトリウム非存在下では RNA1-45 はシフトせず RNA1m-45 はシフトした。また、RNA2-41 と RNA2m-41 では RNA2-41 のシフトしたバンドの強度がわずかに強かった。

塩化ナトリウム存在下では RNA2-41 のみシフトしたバンドが出た。

RNA のシフトしたバンドが出た一部のゲルについて CBB 染色を行ったところ、SYBR Gold 染色によって染色された RNA のシフトしたバンドの位置と同じ位置が CBB 染色によって染色された。このことから、シフトしたバンドは RNA とペプチドの複合体であることが確認できた。

電気泳動法による結果を図 4-2 に、結果をまとめた表を表 4-1 に示す。

### 4-3-2 RRD1 による RNA の識別

RRD2 による相互作用解析では既往研究<sup>16)</sup>と一致した結果を得ることができたため実験系に問題は無いと考え、次に RRD1 を用いた相互作用解析を行った。

塩化ナトリウム非存在下では RNA1-45 および RNA1m-45 においてシフトした強いバンドがあり、RNA2-41 および RNA2m-41 においてもシフトしたバンドは出たが強度は RNA1-45/RNA1m-45 に比べると弱かった。また、RNA1-45 と RNA2-41 はともに、1 残基置換した RNA との強度はほとんど差が無かった。

塩化ナトリウム存在下では RNA1-45 および RNA1m-45 のみシフトしたバンドが出た。

RRD1 の結合において 1 残基置換の影響が無く、RNA1 と RNA2 で結合に差が出たことから、RNA1 に存在していて RNA2 には存在していない RNA1-s12 に注目した。相互作用解析を行ったところ、RNA1-s12 と RRD1 の組み合わせではバンドが見られなかったことから、RRD1 が RNA1-s12 と結合することが示された。なお、RNA1-s12 では CBB 染色においてバンドが確認できなかった。

電気泳動法による結果を図 4-3, 4 に、結果をまとめた表を表 4-1 に示す。

RNA とペプチドのモル比について、条件検討において 1:1 ではシフトが明確ではなく 1:5, 7, 10 では沈殿していることが考えられたため、本論文には 1:3 になるように調製した結果を示した。なお、解離定数の測定は行っていない。

## 4-4 考察

### 4-4-1 識別メカニズムの比較

RRD1 では RNA1 の内部ループもしくは RNA2 のループ部分の配列は結合に影響が無いことが分かった。また、RRD1 と RNA1-s12 において RNA1-s12 のバンドが見られなかったことについては、結合したことにより電荷が正になり泳動できなかったことが考えられた。これらのことから、RRD1 はステムループの有無を識別していることが考えられた。一方、RRD2 では 1 残基が重要であることが分かった。

塩濃度を上げることによって非特異的な結合を抑えることができる。RRD1 では RNA1 と結合し、RRD2 では本来の組み合わせである RNA2 のみと結合した。

RRD1 と RRD2 は相同性が 31%であるにも関わらず，認識の方法が異なることが本研究によって初めて分かった．RRD による認識の模式図を図 4-5 に示す．さらなる認識メカニズムの解析のためには，ペプチドと RNA の複合体の立体構造解析が必要であると考えられる．

#### 4-5 まとめ

よく似た 2 種類の LINE において，RRD による RNA の認識の方法が異なることが本研究によって初めて明らかとなった．

表 4-1A ゲルシフト法による相互作用解析の結果

|      | NaCl | RNA1-45 | RNA1m-45 | RNA2-41 | RNA2m-41 | RNA1-si2 |
|------|------|---------|----------|---------|----------|----------|
| RRD1 | low  | ++      | ++       | +       | +        | none     |
|      | high | +-      | +-       | -       | -        | none     |
| RRD2 | low  | +-      | +        | ++      | +        | -        |
|      | high | -       | -        | +       | -        | -        |

++: intense shifted band (> 1); +: shifted band (0.5 – 1.0); + -: weak shifted band (0.3 – 0.4); -: no shifted band (< 0.3); none: no shifted or free band was observed

表 4-1B ゲルシフト法においてシフトしたバンドの強度

|      | NaCl | RNA1-45<br>※1 | RNA1m-45<br>※1 | RNA2-41<br>※1 | RNA2m-41<br>※1 | RNA1-si2<br>※2 |
|------|------|---------------|----------------|---------------|----------------|----------------|
| RRD1 | low  | 1.5           | 1.1            | 0.5           | 0.5            | 0.0            |
|      | high | 0.4           | 0.3            | 0.0           | 0.0            | 0.1            |
| RRD2 | low  | 0.3           | 0.8            | 1.1           | 0.7            | 0.6            |
|      | high | 0.1           | 0.1            | 0.7           | 0.2            | 0.7            |

※1 各レーンでの比

※2 RNA 単独のレーンとの相対値

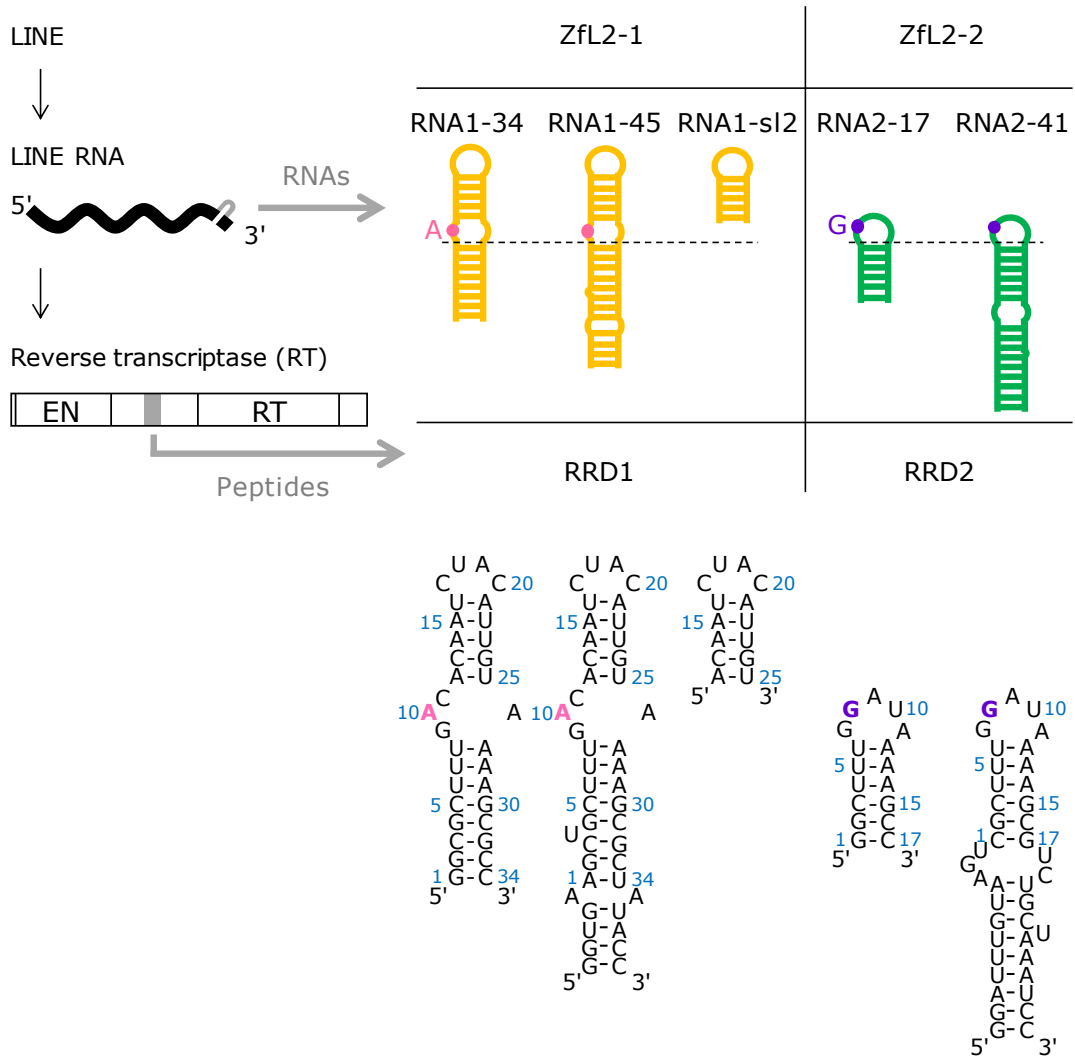


図 4-1 相互作用解析に用いた領域

RNA は 3'末端に存在するステムループの領域を用いた.

ペプチドは RNA を識別する最も短い領域およびその一部を用いた.



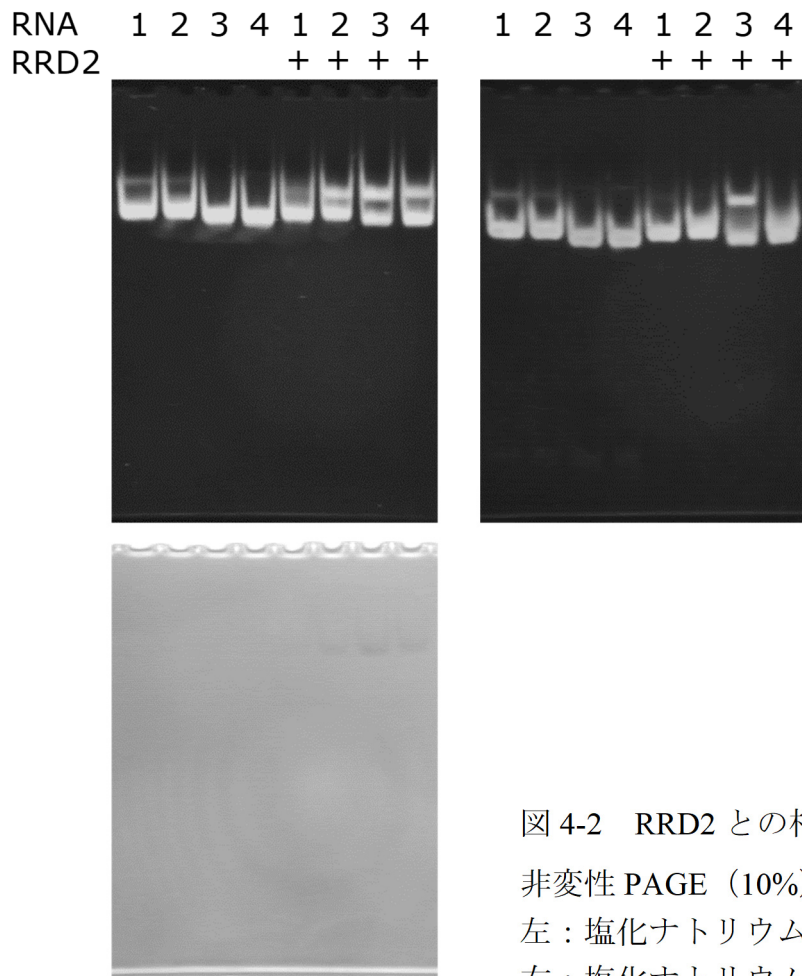


図 4-2 RRD2 との相互作用解析

非変性 PAGE (10%)

左：塩化ナトリウム非存在下

右：塩化ナトリウム存在下

(50 mM NaCl)

上：SYBR Gold 染色

下：CBB 染色

1：RNA1-45

2：RNA1m-45

3：RNA2-41

4：RNA2m-41

RNA1-45 でも RNA2-41 でも G の方に強く結合した。

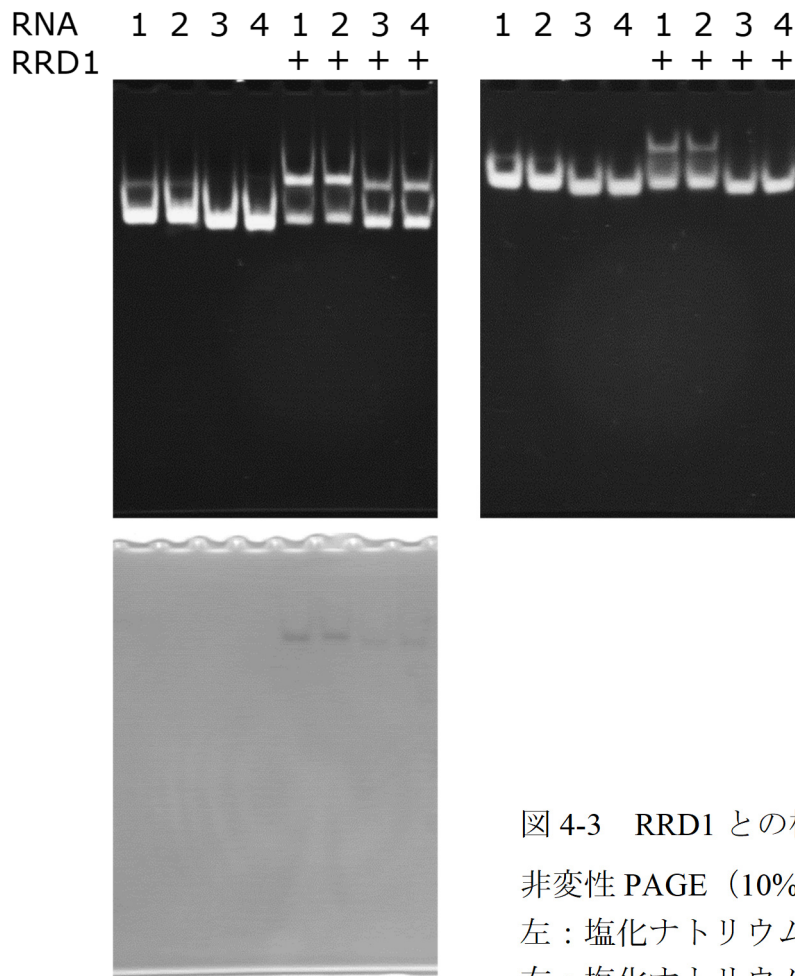


図 4-3 RRD1 との相互作用解析

非変性 PAGE (10%)

左：塩化ナトリウム非存在下

右：塩化ナトリウム存在下

(100 mM NaCl)

上：SYBR Gold 染色

下：CBB 染色

1：RNA1-45

2：RNA1m-45

3：RNA2-41

4：RNA2m-41

RNA1-45 でも RNA2-41 でも 1 残基の置換による差が出なかった。

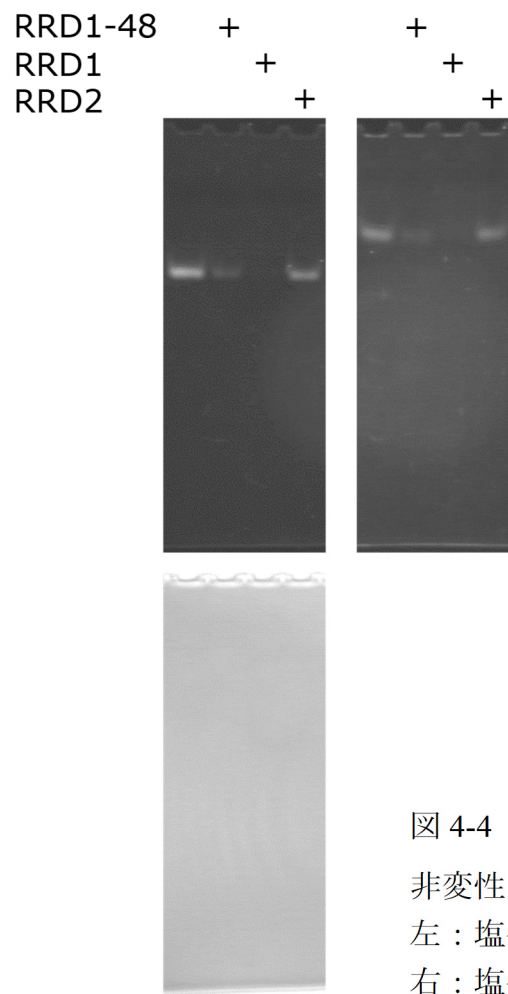


図 4-4 RNA1-s12 との相互作用解析

非変性 PAGE (10%)

左：塩化ナトリウム非存在下

右：塩化ナトリウム存在下

(100 mM NaCl)

上：SYBR Gold 染色

下：CBB 染色

RNA1-s12 と RRD1 の組み合わせではバンドが観測されなかった。

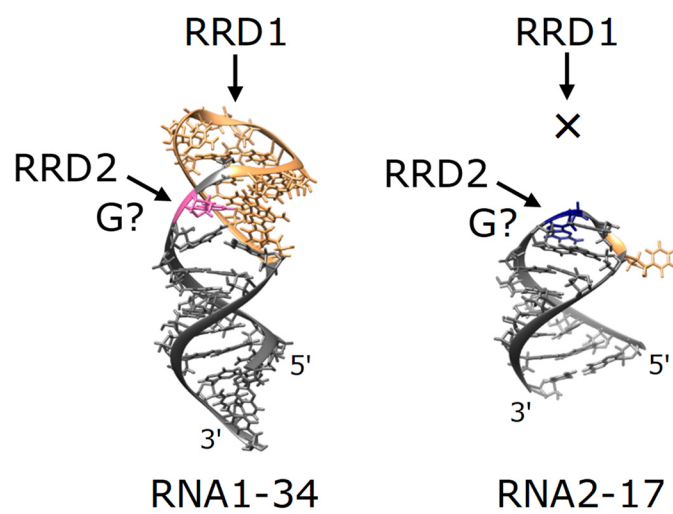


図 4-5 RRD による RNA の認識の模式図

RRD1 は s12 の有無を識別し，RRD2 は 1 残基を識別していることが分かった．

## 第5章 NMR法によるLINE RNAと逆転写酵素の相互作用解析

### 5-1 はじめに

ゲルシフト法と同様に、LINE RNAと逆転写酵素の一部の領域を用いて、NMR法による相互作用解析を行った。LINE RNAについては3'末端のステムループの領域を用いた。NMR法による解析では残基数が少ない方が解析を容易に進めることができるため、短いRNAを用いた。逆転写酵素については特異的な相互作用を示す最も短い領域（RRD1とRRD2）および2種類のRNAを識別しない領域（RRD1-48）を用いた。

### 5-2 方法

#### 5-2-1 RNAとペプチドの混合

NMR法による相互作用解析ではRNAとペプチドのモル比が1:1になるように0.5 mLチューブに調製し、対称形マイクロサンプルチューブまたはNMRサンプルチューブ(株式会社シゲミ)に詰めて軽水中でNMRスペクトルを測定した。さらに、RNA2-17とRRD2の組み合わせについてはペプチドを追加して1:2および1:3になるように調製しNMRスペクトルを測定した。RNAとペプチドの組み合わせを表5-1に示す。なお、NMR法による相互作用解析では同じ配列であるが標識残基が異なるRNAを用いて複数回実験を行っており、本論文ではそのうちの一部を示す。緩衝液は5%の重水を含み、50 mM塩化ナトリウムを含む20 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)を用いた。なお、この緩衝液はRNAの構造解析において使用した緩衝液と同じである。

NMR スペクトルの測定では、実験の初期に行った室温で混合した方法と、沈殿の防止を試みて氷上で混合した方法がある。RNA とペプチドを混合した際に沈殿が生じてしまうことが分かり、沈殿を防止する条件を検討した。ゲルシフト法における条件検討から氷上で混合すると余計な複合体が起きにくい傾向があったため、NMR スペクトルの測定用試料を低温で調製することを試みた。氷上で混合した方法では、RNA とペプチドをそれぞれ氷上で冷却した後に混合し、氷上に挿して冷却した NMR サンプルチューブに詰めて測定した。しかし、氷上で混合した方法でも沈殿は生じた。

沈殿を防止する条件の検討については、顕微鏡を用いて試料のドロップを作り、緩衝液の条件などを変えて沈殿の有無を観察する方法も行った。顕微鏡を用いることによって少量の試料で多数の条件の検討を行うことができたが、沈殿を防止する条件を見つけることはできなかった。同時期に行っていたゲルシフト法による条件検討において低温での調製に効果がありそうだと思われたが、顕微鏡では低温で試料を調製することができなかったため（光を当てているため室温よりも高温であることが考えられ、ドロップの乾燥も早かった）、それ以上の条件検討を行わなかった。

### 5-2-2 NMR スペクトルの測定

RNA の塩基対の情報を得ることができるイミノプロトンスペクトルの測定や、標識残基を観測できる測定などを行った。NMR 分光計は AVANCE-600 (600 MHz, TopSpin: Ver. 2.1, ブルカー・ジャパン株式会社) を用いた。測定温度は 288 K で測定した。軽水中でのイミノプロトンスペクトルは jump and return パルスで溶媒のシグナルを除去した (1D JR)。また、軽水中での HOHAHA スペクトルは

3-9-19 パルスで溶媒のシグナルを除去した (HOHAHA 3-9-19) .

得られた NMR スペクトルは TopSpin を用いて解析した. イミノプロトンスペクトルのピークの大きさは, スペクトルの中の最も高いシグナルの高さを合わせて表示した.

### 5-3 結果

#### 5-3-1 RRD2 との相互作用

<イミノプロトンスペクトル>

RNA2-17 と RNA2m-17 では, RNA2-17 において大きな変化が見られた (図 5-1) . RNA2m-17 については, 新たなシグナルがわずかに観測されたが RNA2-17 よりも小さな変化だった.

RNA1-34 と RNA1m-34 では, RNA1-34 はシグナルの変化がほとんど見られなかったが, RNA1m-34 は大きな変化が見られた (図 5-2) .

RNA2-17 では, さらにペプチドを追加したところシグナルが徐々に変化し, 1 : 3 でシグナルが完全に移行した (図 5-3) .

<SQC スペクトル>

RNA2-17\_G8-label では, RRD2 を加えることによって新たなシグナルが観測された (図 5-4) . RNA 単独のシグナルと複合体のシグナルがそれぞれ単独に観測されたことから, 2 つの状態は *slow exchange* である. 1 : 3 でシグナルが完全に移行した (図 5-4C) .

<HOHAHA スペクトル>

RNA2-17 と RRD2 が 1 : 1 のスペクトルでは、U6 のシグナルがブロードもしくは消失した。一方、U10 のシグナルは大きな変化は無かった (図 5-5A) 。 さらにペプチドを追加した 1 : 3 のスペクトルではシグナルが完全に移行した (図 5-5B) 。

### 5-3-2 RRD1 との相互作用

#### <イミノプロトンスペクトル>

RNA1-34 と RNA1m-34 はともに同じような化学シフト (10.5 ppm, 10.6 ppm, 12.4 ppm, 13.5 ppm, 14.1 ppm 付近) に新たなシグナルがわずかに観測された (図 5-6) 。

RNA2-17 と RNA2m-17 では、RNA2-17 の G1 のシグナルがシフトしたが、それ以外のシグナルに大きな変化は見られなかった (図 5-7) 。

#### <SQC スペクトル>

RNA1-34\_A10-label では、RRD1 を加えることによって A10H8 のシグナルの化学シフトが変化した、A10H2 の化学シフトは変化しなかった (図 5-8) 。

#### <RRD1-48>

RRD1 より C 末端側から 19 アミノ酸残基短い配列である RRD1-48 のペプチドを用いた解析も行った。

RNA1-34 および RNA1m-34 では、RRD1 と同じような化学シフト (10.5 ppm, 10.6 ppm, 12.4 ppm, 13.5 ppm, 14.1 ppm 付近) に新たなシグナルが RRD1-48 においても観測された (図 5-9) 。



RNA2-17 および RNA2m-17 では、どちらの RNA でも新たなシグナルが観測された (図 5-10) .

## 5-4 考察

### 5-4-1 RRD の結合方法

#### <RRD2>

ZfL2-2 由来の RNA とペプチドである RNA2-17 と RRD2 においては、1:1 の RNA2-17 の SQC スペクトルでは G8 の新たなシグナルが観測され、HOHAHA スペクトルでは U10 には影響せず U6 が変化したことから、RRD2 は RNA2-17 のループ部分の G8/U6 側から RNA と結合していることが考えられた。なお、RNA2-17 と RRD2 の 1:1 の SQC スペクトルで 2 つのシグナルが観測されたことについては、RNA の一部のみが結合していることが考えられる。混合した際に沈殿が生じたことや、逆転写反応の機構から RNA とペプチドは 1:1 で結合することが考えられることから、RNA とペプチドのモル比は 1:1 になるように調製しているが沈殿したことによってペプチドの濃度が下がっていることが考えられる。

ZfL2-1 由来の RNA である RNA1-34 と RRD2 については、RNA1-34 の A10 を G10 に変えても RNA の構造はほとんど変化しなかったが RRD2 による認識特異性が変化したことから、この 1 残基が RRD2 による特異的な認識に重要であることが示された。

RRD2 においてはゲルシフト法による解析の結果と対応する結果が得られたことから、ゲルシフト法による解析の結果から推察した RRD の認識方法 (図 4-5) を支持する結果が得られたと考える。

## <RRD1>

ZfL2-1 由来の RNA とペプチドである RNA1-34 と RRD1 においては, RNA1-34 の SQC スペクトルでは A10H2 は変化せず, A10H8 は変化したことから, A10H8 側から RNA に結合していることが考えられた.

また, ZfL2-1 由来 RRD1 より C 末端側に 19 アミノ酸残基短い配列である RRD1-48 では RNA2-17 および RNA2m-17 のスペクトルに変化が見られたが, RRD1 では変化が見られなかった. RRD1-48 と RRD1 で結合能に差が出たことから C 末端側に長いことで RNA2 と結合しなくなったことが考えられた. さらにゲルシフト法による解析によって RRD1 は RNA1-sl2 と結合していることが考えられたことから, RRD1 は N 末端側の部分によって内部ループの部分に結合し, C 末端側の部分によってステムループの有無を確認し識別していることが考えられた.

イミノプロトンシグナルが変化した試料ではペプチドのトリプトファン側の鎖の NH シグナルが明瞭に観測されたが, 変化しなかった試料ではシグナルが弱いか観測されなかったことから, 特異的に結合できない場合には沈殿を生じている可能性が考えられた.

本研究では, NMR 法による相互作用解析について RNA 側のスペクトルの変化を解析した. RNA にペプチドを加えることによって, RNA のイミノプロトン領域において新たなシグナルを観測することができたが, そのシグナルの帰属は進んでおらず今後の解析の課題である. 解析を進めるためには RNA を部位特異的に標識する方法が有効であると考えている.

#### 5-4-2 RRD の構造予測

解析に用いているペプチドの天然変性領域の予測を行った。予測には PONDRA (Molecular Kinetics, Inc.)<sup>25)</sup> を用いた。PONDRA によるフォールディングの予測結果を図 5-11 に示す。配列による解析から、現在解析を行っている領域である RNA 認識に関与している領域 (RRD1 および RRD2) が単体では天然変性領域であることが示唆された。

また、ペプチド単体での NMR スペクトルではペプチドのアミドプロトンのシグナルが狭い領域に観測されたことから特定の機能のある構造を形成していないことが考えられた (図 5-12)。しかし、RNA を加えるとペプチドのアミドプロトンのシグナルが観測された化学シフトの幅が広がったことから、RNA と結合することによってペプチドが構造変化していることが考えられた (図 5-12)。このことから、RRD は天然変性であることが示唆された。

RRD は天然変性であることが予測されているため単体での立体構造解析は困難であると考えられる。RRD の解析を進めるためには RNA との複合体の構造解析が重要であると考えられる。

#### 5-5 まとめ

##### <RRD2>

ZfL2-2 由来の組み合わせである RNA2-17 と RRD2 については、RRD2 は RNA2-17 の G8/U6 側から結合しており、外側に飛び出している U10 は認識に関係が無いことが考えられた。

また、ZfL2-2 由来のペプチドである RRD2 と結合しないはずの ZfL2-1 由来の RNA1-34 が、認識に重要だと考えている 1 残基を置換したことによって

(RNA1m-34 を用いることによって)RRD2 に認識され, 認識特異性が変化した. なお, RNA1-34 と RNA1m-34 は NMR スペクトルの比較などから立体構造はほとんど同じことを確認している.

RRD2 においてはゲルシフト法による解析の結果と対応する結果が得られ, RRD2 による識別には 1 残基 (G8/A8, A10/G10) が重要であることが分かった.

#### <RRD1>

ZfL2-1 由来の組み合わせである RNA1-34 と RRD1 については, RRD1 は RNA1-34 の A10H8 側から結合していることが考えられた. また, RRD1 と RRD1-48 とのゲルシフト法による解析結果の比較から, 内部ループの上部に位置するステムループ (RNA1-s12) を RRD1 の C 末端側の部分で認識していることが考えられた.

RNA1-34 と RNA2-17 はともに, 1 残基置換した RNA との結合に大きな差が見られなかったことから, RRD1 においてもゲルシフト法による解析の結果と対応する結果が得られたと考えた.

表 5-1 NMR 法による相互作用解析における試料の組合せと対応する図

|         | RNA1-34                 | RNA1m-34  | RNA2-17  | RNA2m-17   |
|---------|-------------------------|-----------|--|------------|
| RRD1    | A10-label               | G10-label | G8-label                                       | A8-label   |
|         | 氷上                      | 氷上        | 氷上   | 氷上         |
|         | 1D: 図 5-6<br>SQC: 図 5-8 | 1D: 図 5-6 | 1D: 図 5-7                                      | 1D: 図 5-7  |
| RRD2    | A-label                 | G-label   | G8-label                                       | A8-label   |
|         | 室温                      | 室温        | 氷上   | 氷上         |
|         | 1D: 図 5-2               | 1D: 図 5-2 | 1D: 図 5-1, 3<br>SQC: 図 5-4<br>HOHAHA:<br>図 5-5 | 1D: 図 5-1  |
| RRD1-48 | A-label                 | A-label   | Non-label                                      | Non-label  |
|         | 室温                      | 室温        | 室温   | 室温         |
|         | 1D: 図 5-9               | 1D: 図 5-9 | 1D: 図 5-10                                     | 1D: 図 5-10 |

上段：RNA の標識

中断：混合した方法

下段：対応する図

表 5-1 NMR 法による相互作用解析の結果

|         | RNA1-34 | RNA1m-34 | RNA2-17 | RNA2m-17 |
|---------|---------|----------|---------|----------|
| RRD1    | +       | +        | +       | -        |
| RRD2    | +       | +++      | ++      | +        |
| RRD1-48 | +       | +        | ++      | ++       |

+++ : 大きく変化した

++ : 変化した

+ : 少し変化した

- : 変化なし

RRD2 は同じ RNA で比べると G の方に強く結合し、1 残基の置換によって差が出た。

RRD1 は同じ RNA で比べると 1 残基の置換の差がほとんど出なかった。

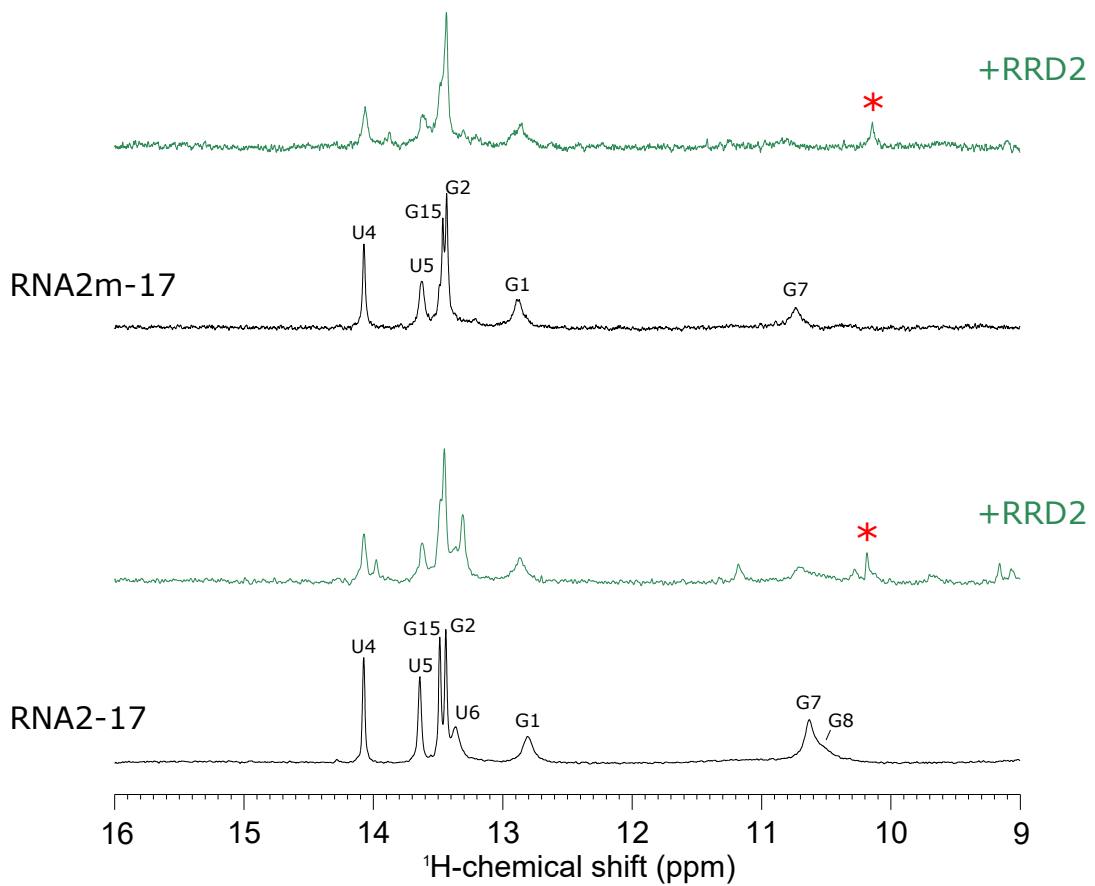


図 5-1 RNA2-17 および RNA2m-17 と RRD2 のイミノプロトンスペクトル

\* : ペプチドのトリプトファン側鎖の NH シグナル

(どのペプチドにもトリプトファンは 2 残基含まれているが、どちらのシグナルであるかは明らかでない)

RNA2-17 はシグナルが変化し、RNA2m-17 は少し変化した。

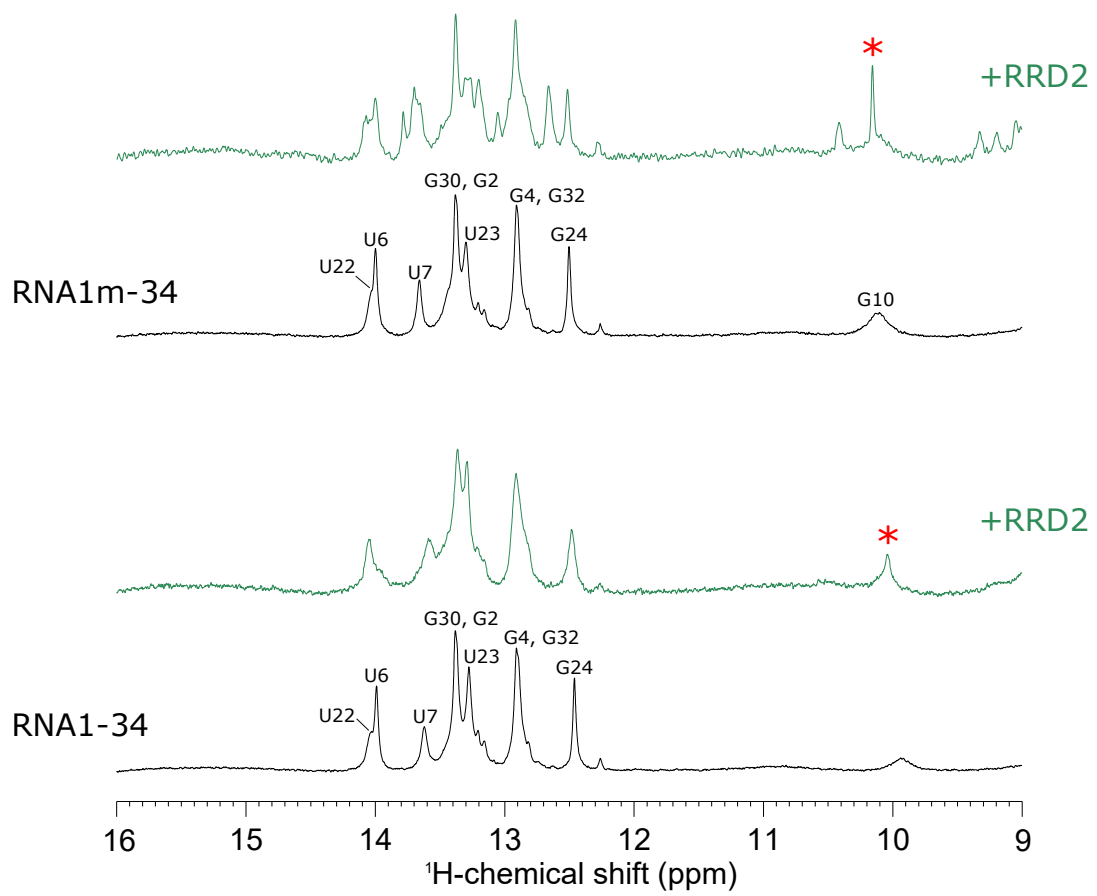


図 5-2 RNA1-34 および RNA1m-34 と RRD2 のイミノプロトンスペクトル  
 RNA1-34 ではシグナルがほとんど変化しなかったが，RNA1m-34 では大きく変化した。



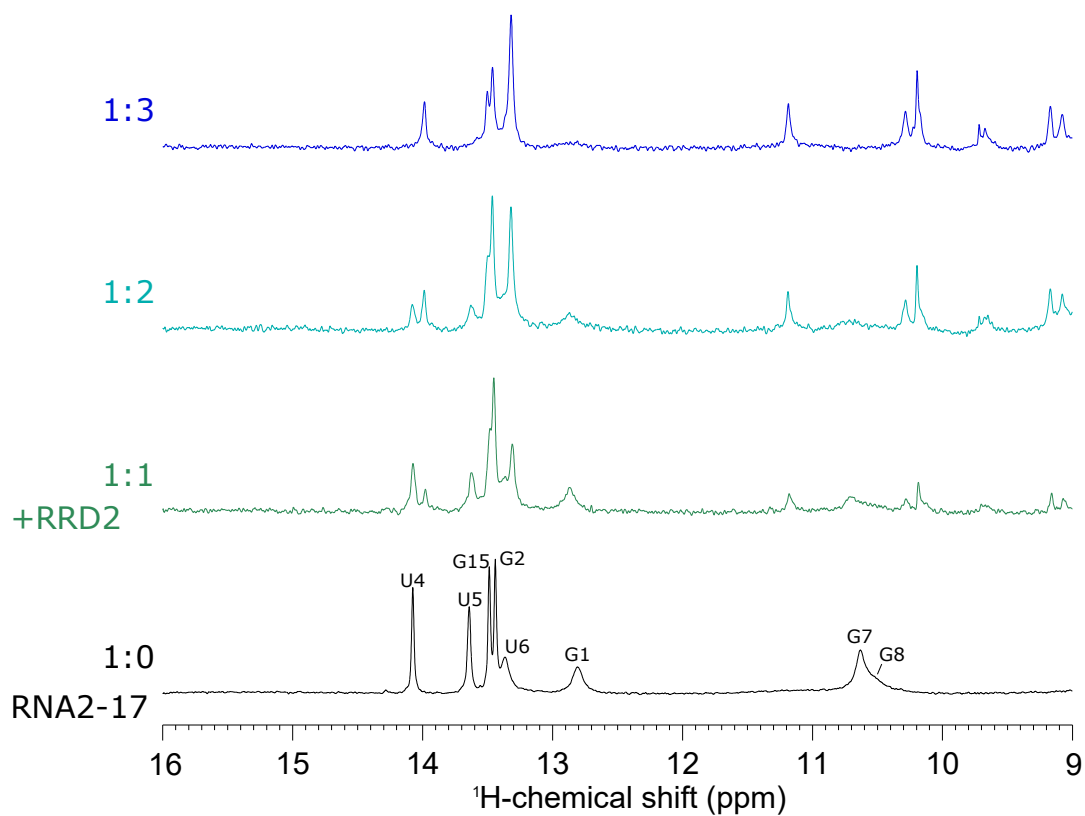


図 5-3 RNA2-17 と RRD2 のイミノプロトンスペクトル

RNA とペプチドのモル比は下から 1:0, 1:1, 1:2, 1:3 である。

1:1 は緑色, 1:2 は青緑色, 1:3 は青色で示す (以後同様)。

RRD2 を増やすとシグナルが徐々に変化し 1:3 で完全に移行した。

RNA 単独のシグナルと複合体のシグナルがそれぞれ単独に観測されたことから, 2つの状態は *slow exchange* である。

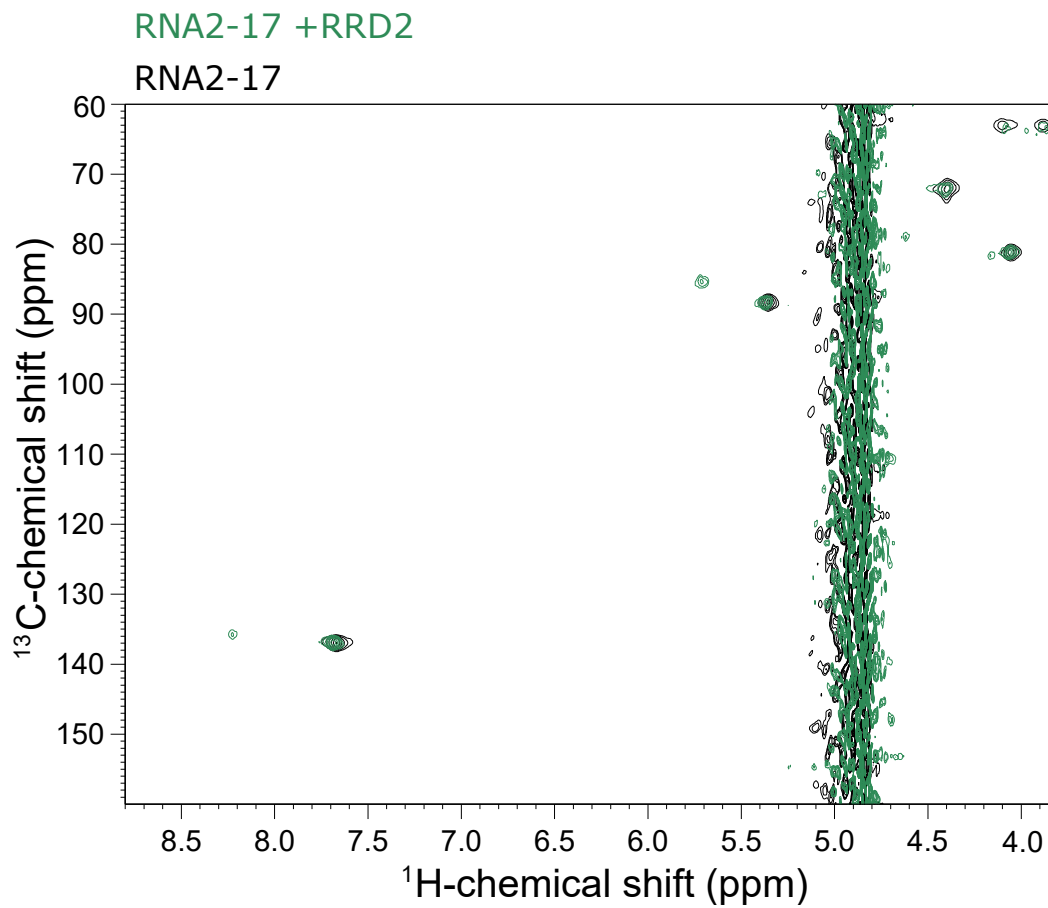


図 5-4A RNA2-17\_G8-label の SQC スペクトル

RNA2-17 と RRD2 のモル比が 1:1 の SQC スペクトルにおいて新たなシグナルが観測された。

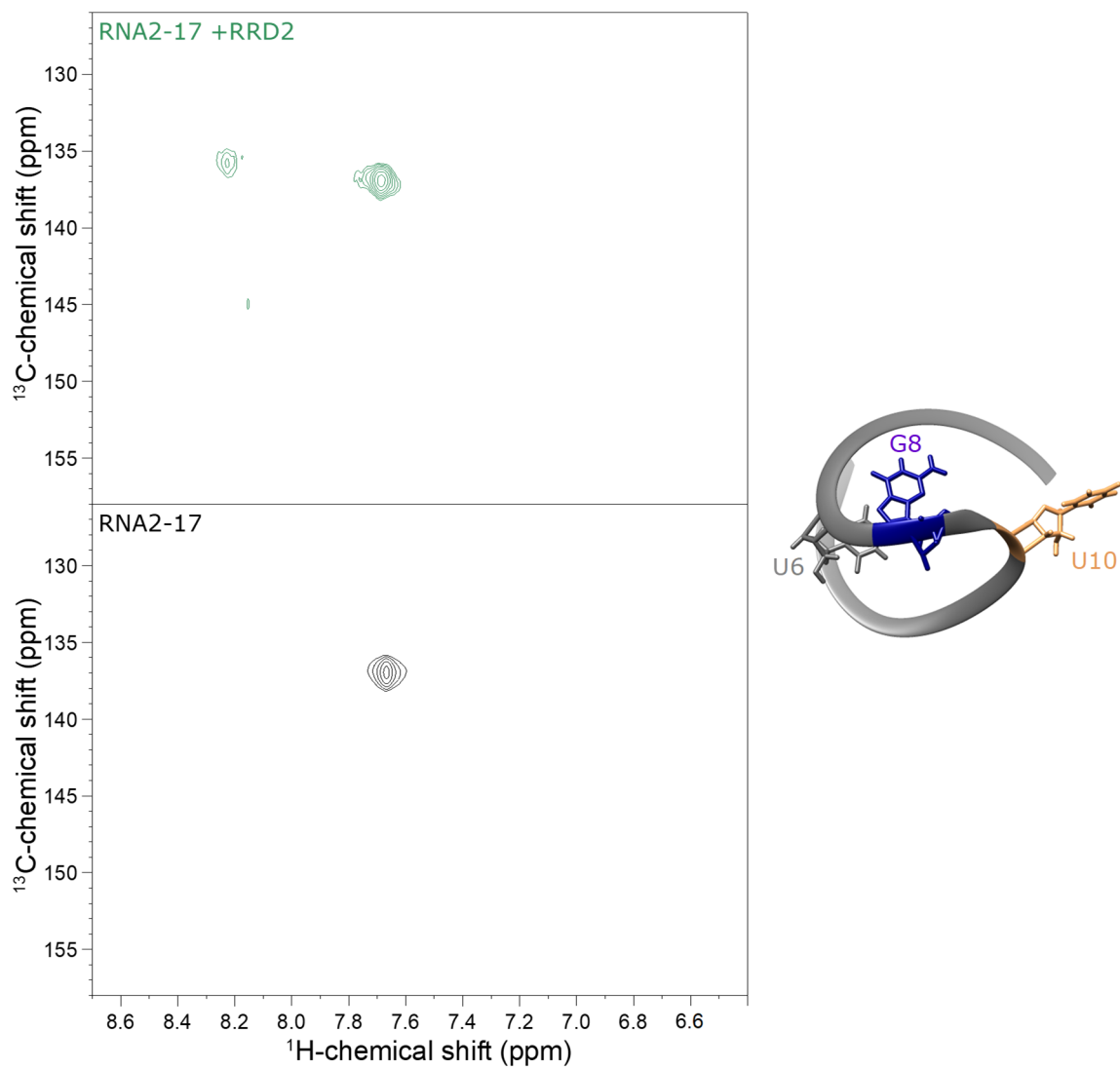


図 5-4B RNA2-17\_G8-label の SQC スペクトル (base の領域)

右の図は RNA2-17 を上から見た図.

Dim gray: U6; Navy blue: G8; Sandy brown: U10

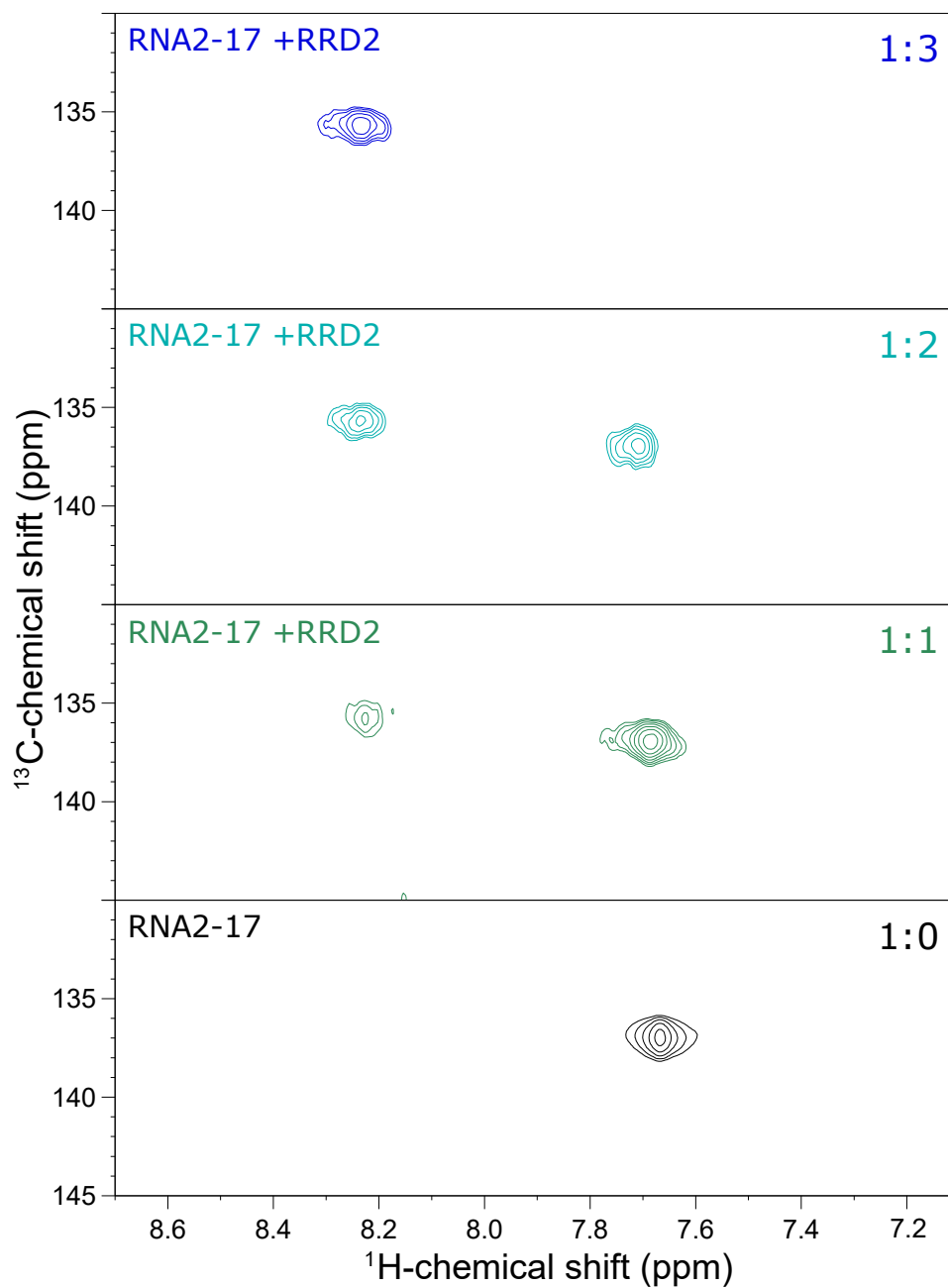


図 5-4C RNA2-17\_G8-label の SQC スペクトル (base の領域)

RRD2 を増やすとシグナルが徐々に変化し 1:3 で完全に移行した。

RNA 単独のシグナルと複合体のシグナルがそれぞれ単独に観測されたことから 2 つの状態は slow exchange である。

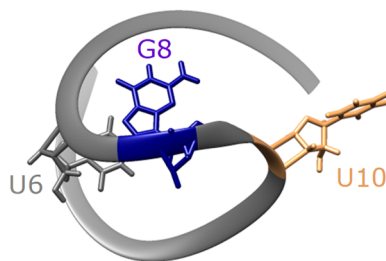
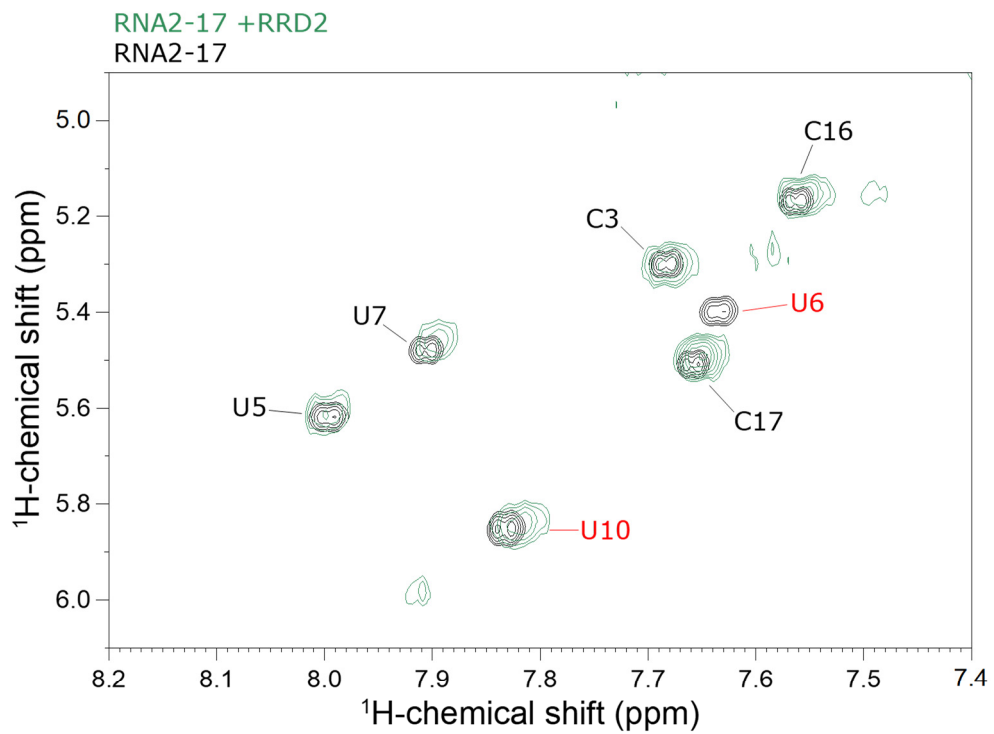


図 5-5A RNA2-17 の HOHAHA スペクトル

U6 のシグナルはブロードもしくは消失したが U10 のシグナルは大きな変化は無かった。

下の図は RNA2-17 を上から見た図。

Dim gray: U6; Navy blue: G8; Sandy brown: U10

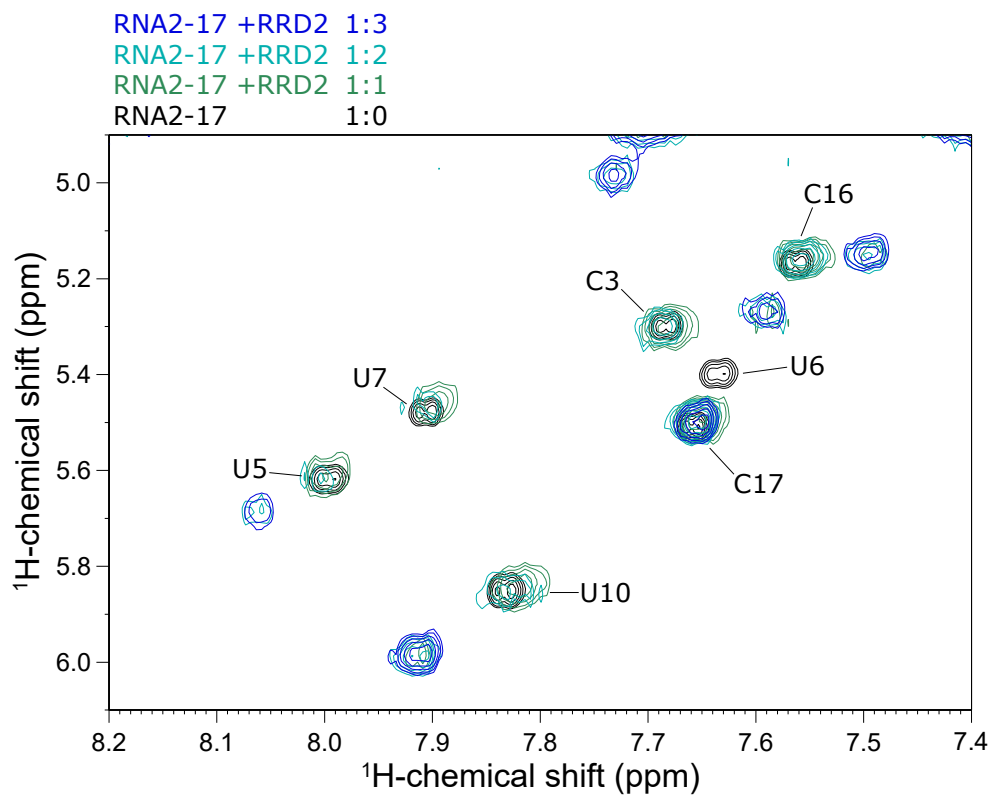


図 5-5B RNA2-17 の HOHAHA スペクトルの RRD2 の増加による変化  
 RRD2 を増やすとシグナルが徐々に変化し 1:3 で完全に移行した.

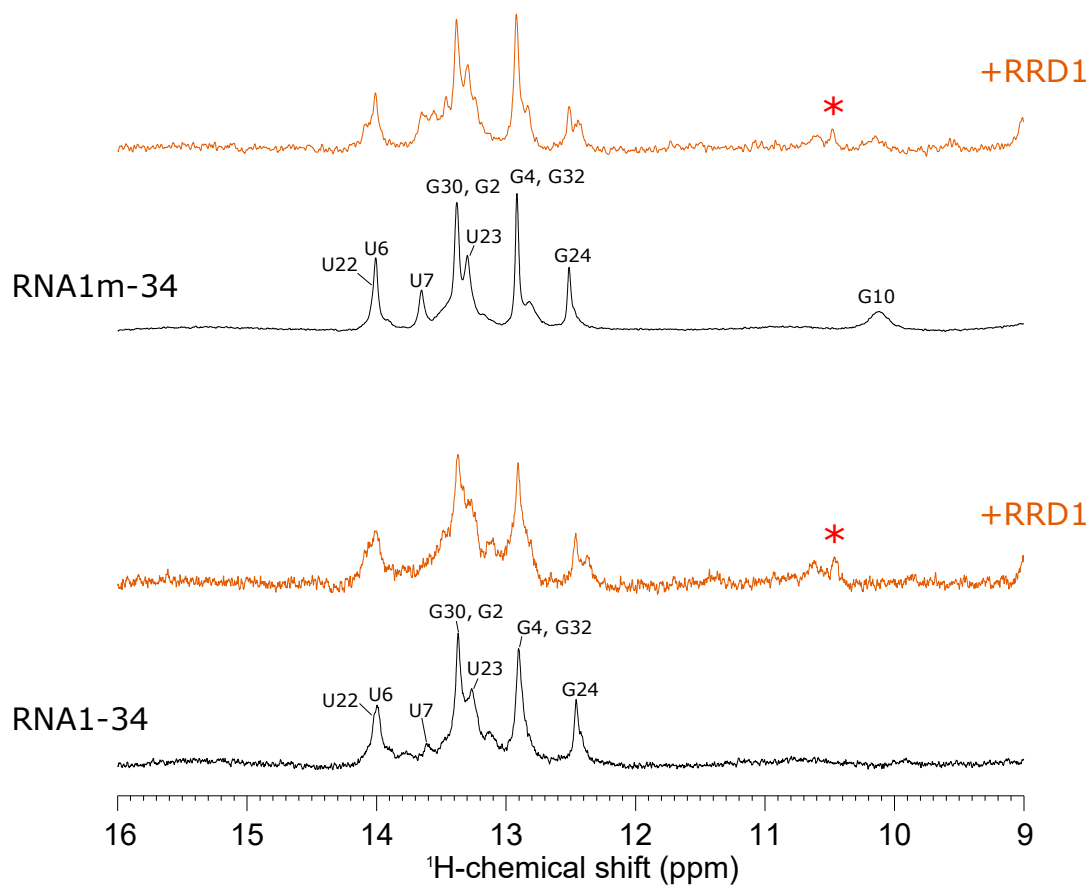


図 5-6 RNA1-34 および RNA1m-34 と RRD1 のイミノプロトンスペクトル  
 RNA1-34 でも RNA1m-34 でもシグナルが少し変化した。

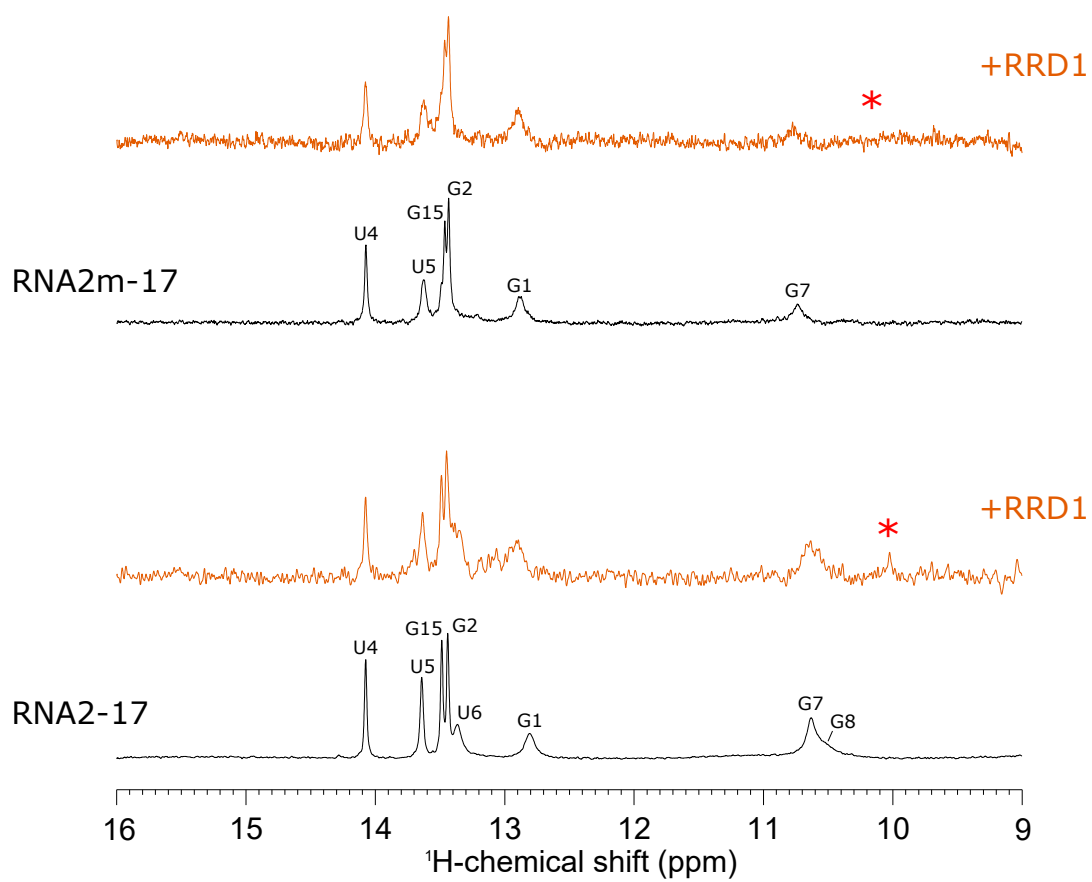


図 5-7 RNA2-17 および RNA2m-17 と RRD1 のイミノプロトンスペクトル  
 RNA2-17 はシグナルが少し変化したが，RNA2m-17 は変化しなかった。  
 RNA2-17 では，1 残基置換による変化に少し差が出たが両方とも小さな変化だった。



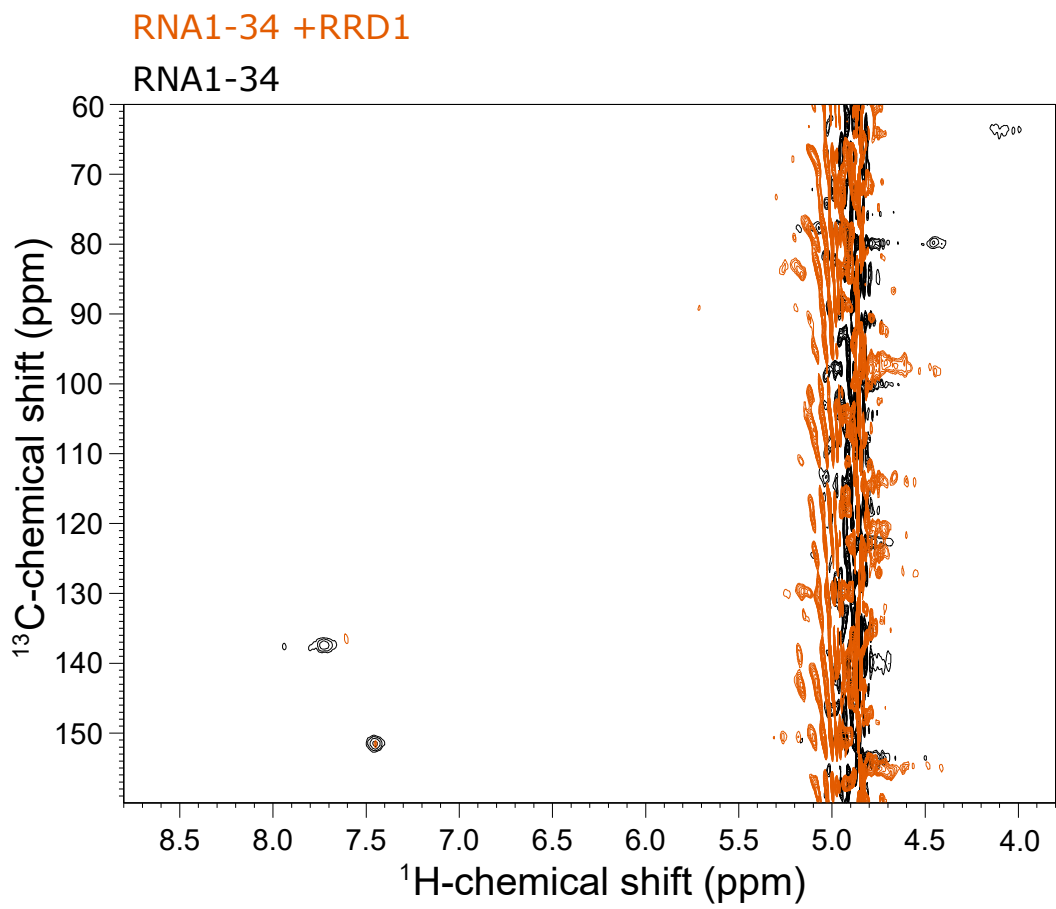


図 5-8A RNA1-34\_A10-label の SQC スペクトル  
RNA1-34 の A10 のシグナルが変化した。

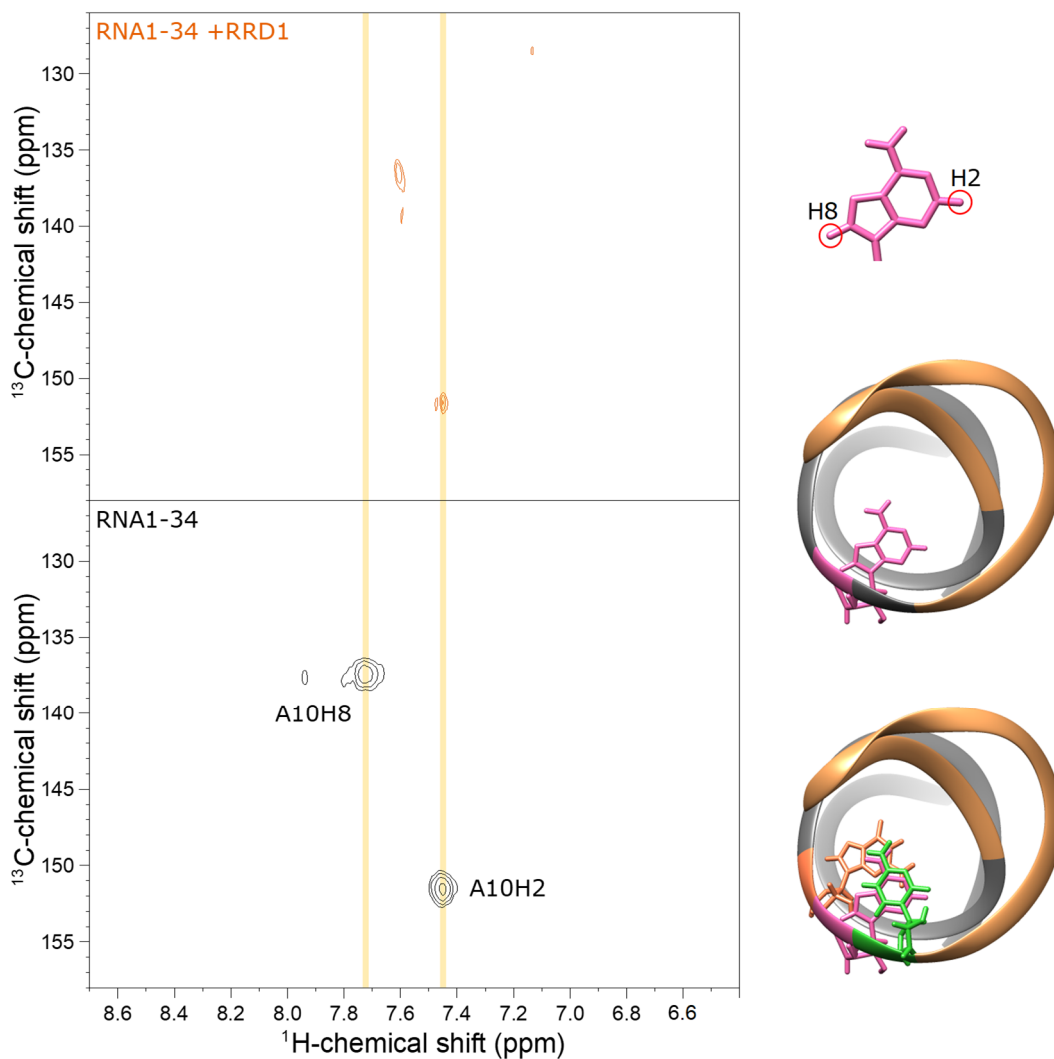


図 5-8B RNA1-34\_A10-label の SQC スペクトル (base の領域)

A10H8 のシグナルの化学シフトが変化した， A10H2 の化学シフトは変化しなかった。

右の図は A10 の塩基の化学構造および RNA1-34 を上から見た図 (A10 のみを表示した図と A10 の上下の残基も表示した図) である。

Coral: G9; Pink: A10; Lime green: C11; Sandy brown: s12 (backbone only)

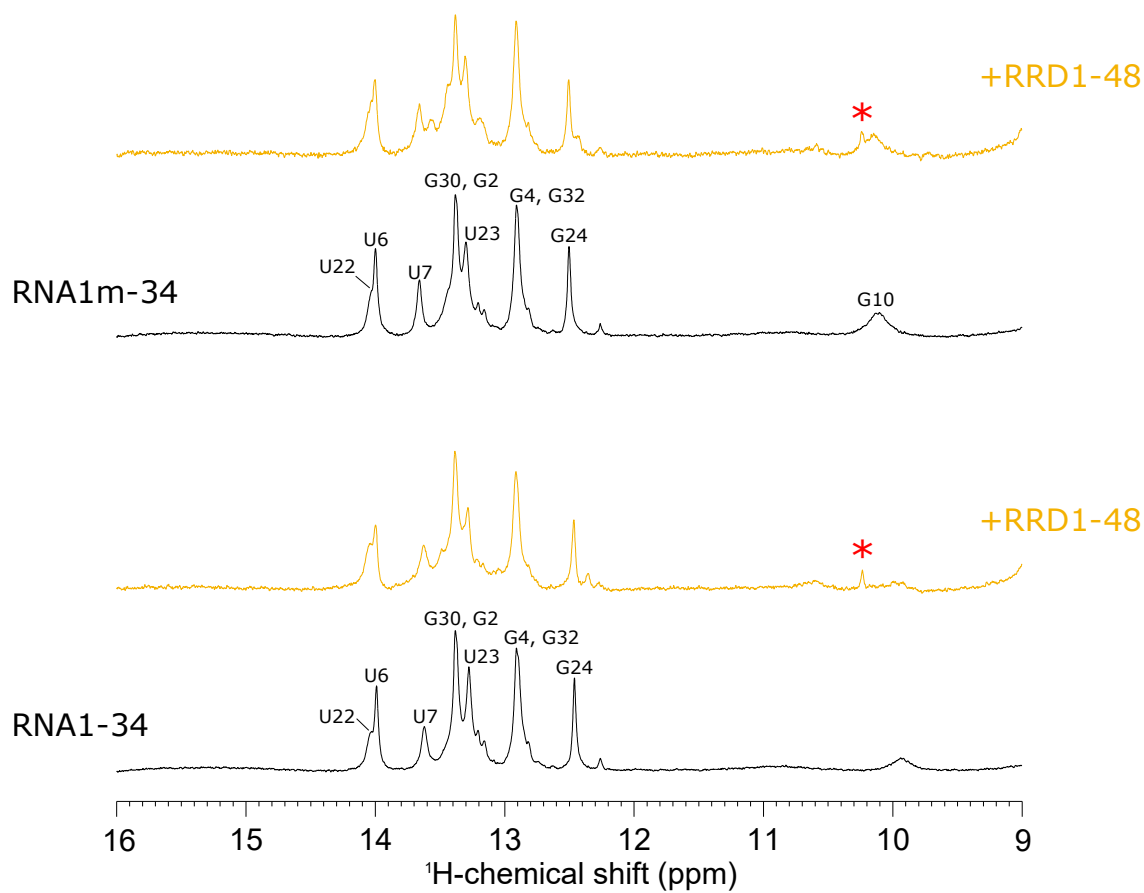


図 5-9 RNA1-34 および RNA1m-34 と RRD1-48 のイミノプロトンスペクトル  
 RRD1-48 を加えたスペクトルは黄色で示す (以後同様) .  
 RNA1-34 でも RNA1m-34 でもシグナルが少し変化した.

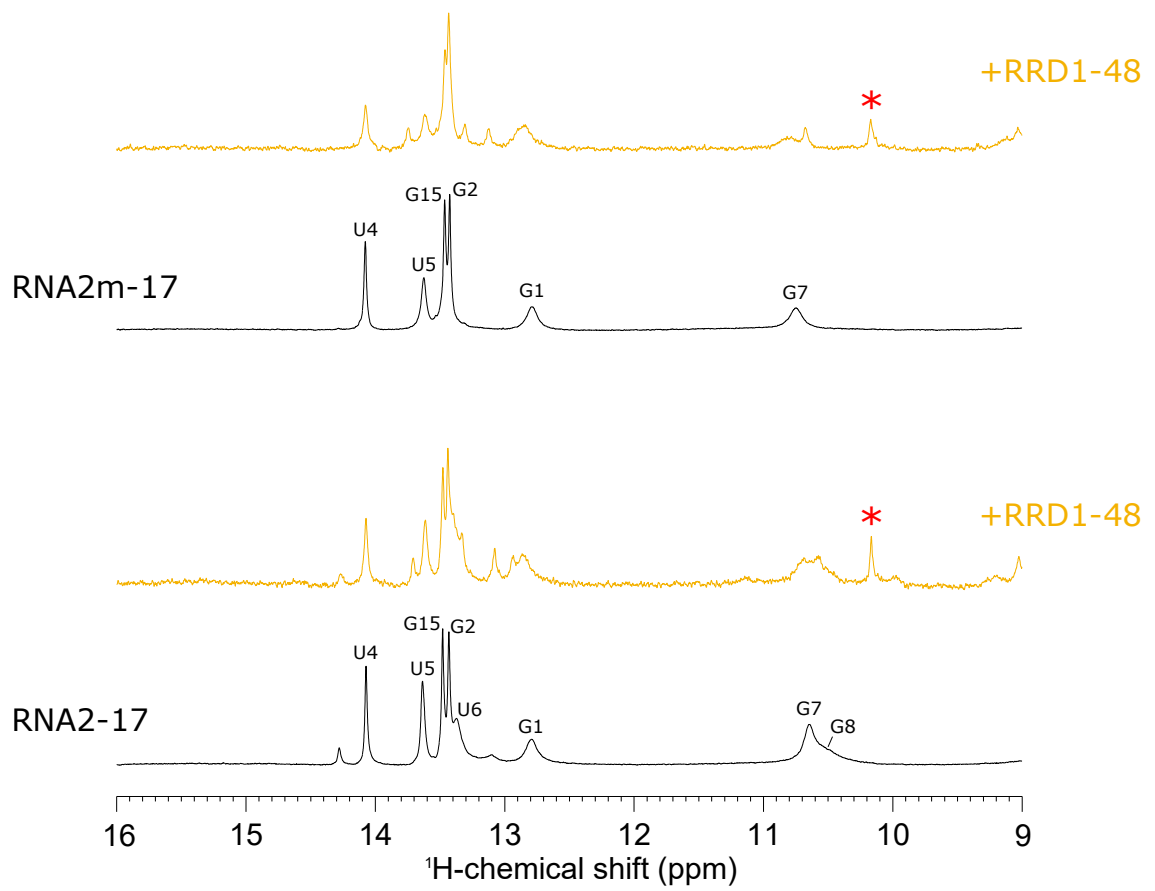


図 5-10 RNA2-17 および RNA2m-17 と RRD1-48 のイミノプロトンスペクトル  
RNA2-17 でも RNA2m-17 でもシグナルが変化した.

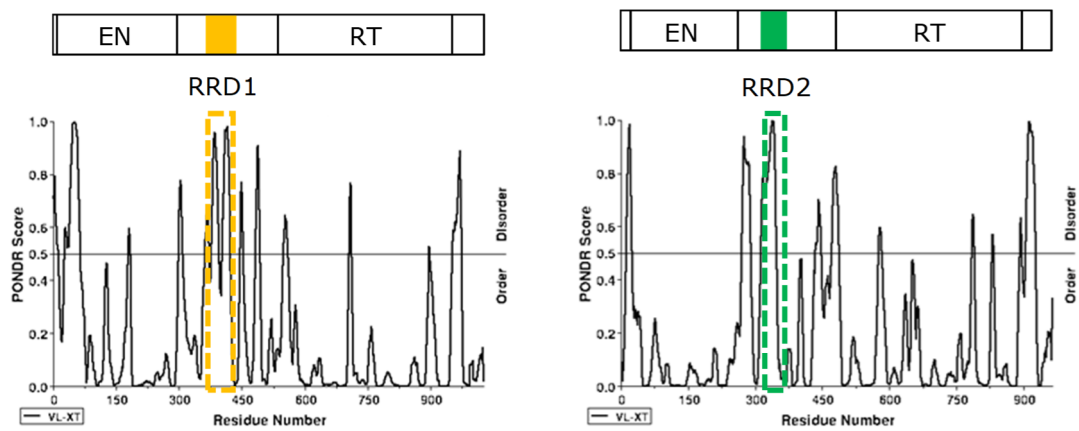


図 5-11 PONDR による天然変性領域の予測

左：ZfL2-1 の逆転写酵素

右：ZfL2-2 の逆転写酵素

点線の四角：RRD の領域

RRD1 および RRD2 は天然変性であることが予測された。

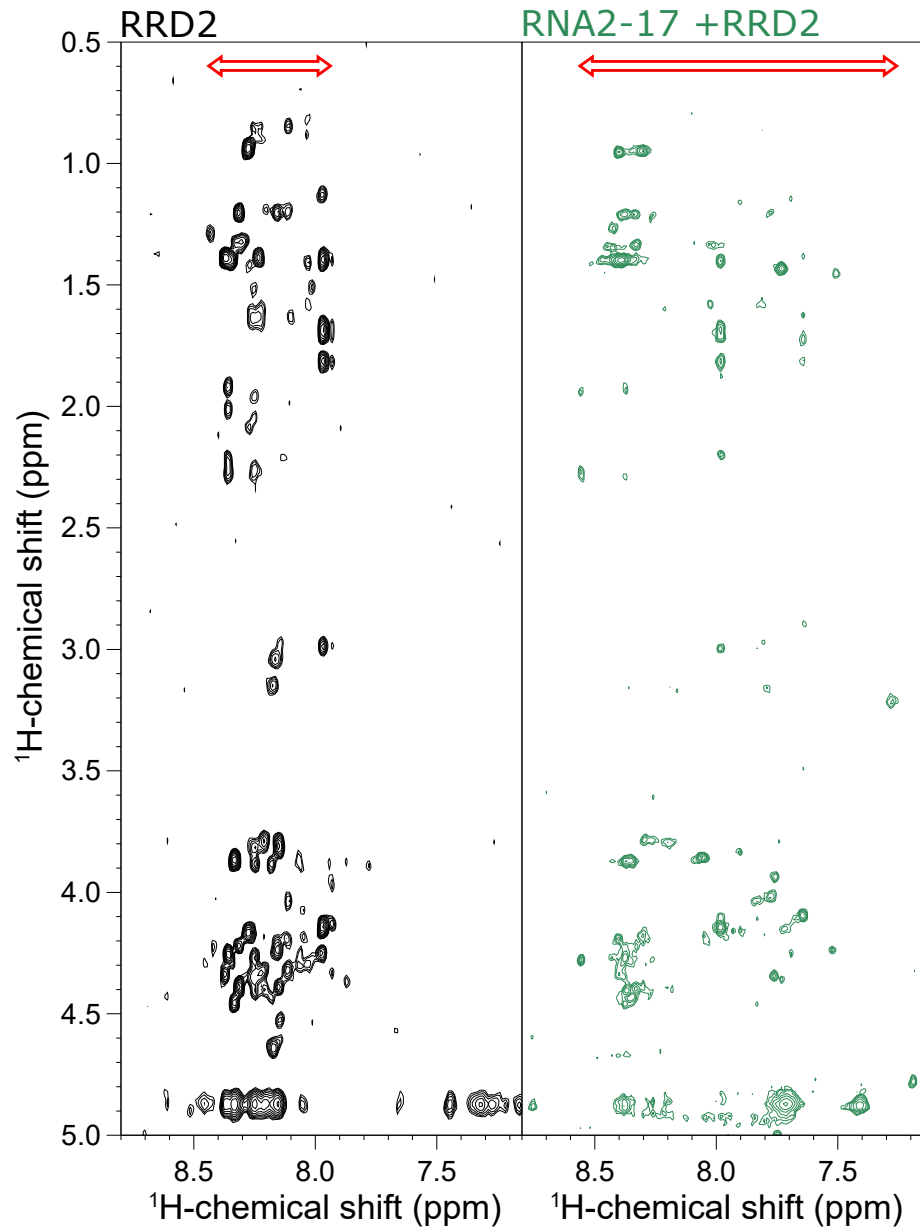


図 5-12 RNA2-17 と RRD2 の HOHAHA スペクトル

RRD2 単独ではシグナルが狭い領域に観測されたことから特定の構造を形成していないことが考えられた (左) .

RNA2-17 を加えることによって RRD2 のシグナルの観測された幅が広がったことから、RNA と結合して特定の構造を形成していることが考えられた (右) .

## 第 6 章 認識メカニズムと LINE の分化の考察

本研究ではゼブラフィッシュ由来の 2 種類の LINE (ZfL2-1, ZfL2-2) を研究対象とし、逆転写酵素による RNA の特異的な認識メカニズムを解析するために RNA の立体構造解析および RNA とペプチドの相互作用解析を行った。

本研究において明らかとなった認識メカニズムを図 6-1 に示す。本研究による解析から、よく似ているが認識の特異性の異なる ZfL2-1 と ZfL2-2 において、同じ L2 であるにも関わらず認識方法に違いがあることが初めて明らかになった。ZfL2-2 では RRD は図 6-1 のステムループの 1 残基の違いを識別し、ループ部分の G8/U6 側から結合することが考えられた。一方、ZfL2-1 では RRD は図 6-1 のステムループの s12 の有無を識別し、内部ループの A10H8 側から結合することが考えられた。

逆転写の開始機構については既往研究において、逆転写酵素は 3'末端のステムループ (図 1-5 の下線の範囲) に結合したうえで、さらに 3'末端側にある 5 残基の配列を鋳型として繰り返し逆転写を行う (Slippage reaction) 機構が推測されている<sup>6,17)</sup>。本研究における解析から得られた逆転写酵素が結合する向きは、この機構と一致していると考えられる。

本研究による解析から、ZfL2-1 と ZfL2-2 において RRD が識別している領域がステムループか 1 残基かで違いがあり、このことから ZfL2-1 と ZfL2-2 は RRD による認識の“緩さ”が異なることが考えられる。また、他のクレードの LINE でありヒトゲノムにおいて 17%を占めている L1 は 3'末端がポリ A であることから、L2 よりも“緩い”認識機構であることが考えられる。これらのことから、

認識の“厳しい” L2 から認識の“緩い” L1 へと LINE が分化し、認識が“緩い”ことで L1 がヒトゲノム内で劇的に増幅し、ゲノムが再編成された可能性が考えられ、L1 が増加したことによってヒトがもつヒトである特徴を得た可能性が高いと考える。LINE の認識の特異性についてさらに解析を進めることによって、ヒトがヒトである由縁を解明することができるかもしれない。

LINE や SINE などの転位性因子のデータベースである Repbase<sup>26)</sup>には、ゼブラフィッシュ由来の LINE が 42 種類登録されており、そのうち 31 種類の ORF が特定されている。この 31 種類の LINE について ClustalW<sup>27)</sup>によってアラインメント解析を行ったところ RRD に対応する領域で相同性があることが分かった。しかし、配列に変異が入ってしまっていることから、配列のみで LINE の進化を解析することは困難であると考えられる。また、天然変性領域を予測できるプログラムである PONDR による解析や NMR スペクトルから RRD が天然変性領域であることが示唆されている。さらに、相同性が高い RRD1 と RRD2 においても認識の方法が異なることから、LINE の分化についての解析を進めるためには RNA とペプチドの複合体の構造解析を行うことが重要であると考えられる。

本研究によって LINE における RNA の認識機構に関する新たな知見が得られた。この知見は、RNA とタンパク質の相互作用様式という観点からも興味深いものである。



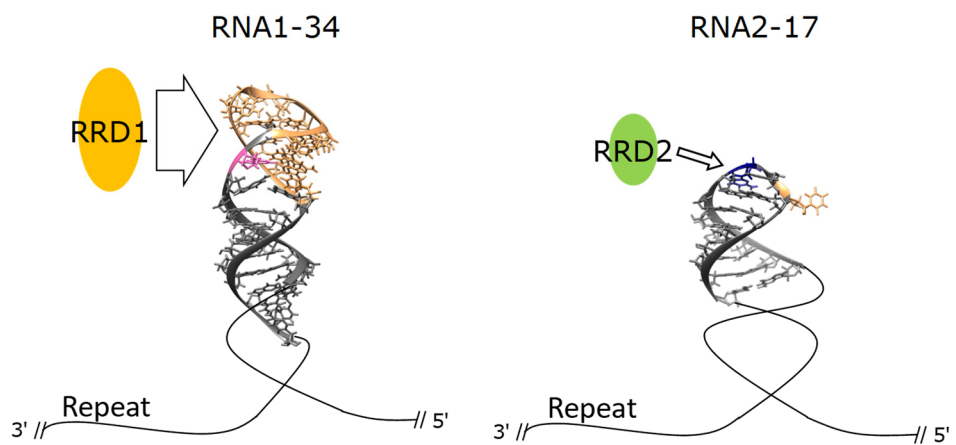


図 6-1 ZfL2-1 および ZfL2-2 の認識メカニズムの考察

RRD1 は s12 の有無を識別し, RRD2 は 1 残基の違いを識別する.

## 参考文献

- 1) 生化学 第 84 卷 第 10 号, P870~874, 日本生化学会, 2012 年 10 月
- 2) ゲノム 第 3 版 -新しい生命情報システムへのアプローチ-, p263 表 9.3, メディカル・サイエンス・インターナショナル
- 3) ゲノム 第 3 版 -新しい生命情報システムへのアプローチ-, p211 図 7.13, メディカル・サイエンス・インターナショナル
- 4) ゲノム 第 3 版 -新しい生命情報システムへのアプローチ-, p259 図 9.8, P262 図 9.14, P264, 図 9.15, メディカル・サイエンス・インターナショナル
- 5) Kazazian, H.H. Jr (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* **303**, 1626-1632.
- 6) Kajikawa, M., and Okada, N. (2002) LINEs Mobilize SINEs in the Eel through a Shared 3' Sequence. *Cell* **111**, 433-444.
- 7) Feng, Q., Moran, J.V., Kazazian, H.H. Jr, and Boeke, J.D. (1996) Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* **87**, 905-916.
- 8) Mathias, S.L., Scott, A.F., Kazazian, H.H. Jr, Boeke, J.D., and Gabriel, A. (1991) Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science* **254**, 1808-1810.
- 9) Luan, D.D., Korman, M.H., Jakubczak, J.L., and Eickbush, T.H. (1993) Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell* **72**, 595-605.
- 10) Yamaguchi, K., Kajikawa, M., and Okada, N. (2014) Integrated mechanism for the generation of the 5' junctions of LINE inserts. *Nucleic Acids Res.* **42**, 13269-13279.

- 11) Cost, G. J., Feng, Q., Jacquier, A., and Boeke, J.D. (2002) Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *EMBO J.* **21**, 5899-5910.
- 12) Sugano, T., Kajikawa, M., and Okada, N. (2006) Isolation and characterization of retrotransposition-competent LINEs from zebrafish. *Gene* **365**, 74-82.
- 13) Kajikawa, M., Ichiyanagi, K., Tanaka, N., and Okada, N. (2004) Isolation and Characterization of Active LINE and SINEs from the Eel. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 673-682.
- 14) Okada, N., Hamada, M., Ogiwara, I., and Ohshima, K. (1997) SINEs and LINEs share common 3' sequences: a review. *Gene* **205**, 229-243
- 15) Hayashi, Y., Kajikawa, M., Matsumoto, T., and Okada, N. (2014) Mechanism by which a LINE protein recognizes its 3' tail RNA. *Nucleic Acids Res.* **42**, 10605-10617.
- 16) Baba, S., Kajikawa, M., Okada, N., and Kawai, G. (2004) Solution structure of an RNA stem-loop derived from the 3' conserved region of eel LINE UnaL2. *RNA* **10**, 1380-1387.
- 17) Nomura, Y., Kajikawa, M., Baba, S., Nakazato, S., Imai, T., Sakamoto, T., Okada, N., and Kawai, G. (2006) Solution structure and functional importance of a conserved RNA hairpin of eel LINE UnaL2. *Nucleic Acids Res.* **34**, 5184-5193.
- 18) Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, W.G., and Uhlenbeck, O.C. (1987) Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8783-8798.
- 19) Sakamoto, T., Otsu, M., and Kawai, G. (2018) NMR Studies on RNA in *Experimental Approaches of NMR Spectroscopy: Methodology and Application to Life Science and Materials Science* (Naito, A. Ed.) pp 439-459, Springer, Singapore.
- 20) Otsu, M., Kajikawa, M., Okada, N., and Kawai, G. (2017) Solution structure of a

- reverse transcriptase recognition site of a LINE RNA from zebrafish. *J. Biochem* **162**, 279-285.
- 21) Baba, S., Seimiya, K., Kimura, T., Fujiwara, K., Someya, T., Sakamoto, T., and Kawai, G. (2004) NMR 法による RNA の立体構造解析における残余双極子相互作用の効果. *分光研究* **53**, 171-176.
- 22) (社) 日本分光学会, 分光測定入門シリーズ第 8 巻 核磁気共鳴分光法, p120-122, 講談社, 2011 年 第 2 刷発行
- 23) D.A. Case et al., University of California, San Francisco (2012)
- 24) Otsu, M., and Kawai, G. Distinct RNA recognition mechanisms in closely related LINEs from zebrafish. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, in press
- 25) Garner, E., Romero, P., Dunker, A.K., Brown, C., and Obradovic, Z. (1999) Predicting binding regions within disordered proteins, *Genome Informatics* **10**, 41-50.
- 26) Jurka, J., Kapitonov, V.V., Pavlicek, A., Klonowski, P., Kohany, O., and Walichiewicz, J. (2005) Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet. Genome Res.* **110**, 462-467.
- 27) Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.

## 研究業績

Maina Otsu, Masaki Kajikawa, Norihiro Okada and Gota Kawai

Solution structure of a reverse transcriptase recognition site of a LINE RNA from zebrafish

*The Journal of Biochemistry* **162**, 279–285 (2017)

(博士学位論文第 3 章に対応)

Maina Otsu and Gota Kawai

Distinct RNA recognition mechanisms in closely related LINEs from zebrafish

*Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, in press

(博士学位論文第 4 章に対応)

## 謝辞

本研究を進めるにあたり，なかなか上手くいかない実験に根気強くご指導くださいました指導教員の河合剛太教授に感謝いたします。

相談に乗ってくださいました先生方や企業の皆様に感謝いたします。

経済面や生活面で支えてくれた家族の皆様に感謝いたします。