

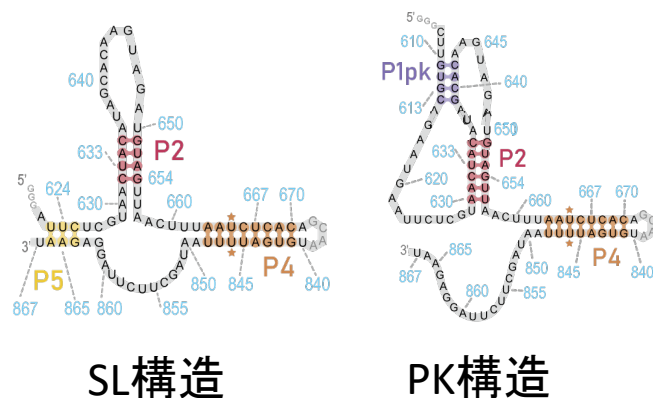
実施課題名: 新規磁場配向剤を用いた100塩基程度の機能性ノンコーディングRNAのRDC測定

【背景】本研究の長期目的は、COVID-19の原因ウイルスであるSARS-CoV-2のウイルスゲノム転写開始機構の解明である。COVID19のウイルスゲノムの転写開始にはゲノムRNAの3' 非翻訳領域 (UTR) に存在する3' PKと呼ばれる配列保存性の高い領域が関与していると示唆されている。3' PKはステムループ (SL) 構造とpseudoknot (PK) と呼ばれる特異な二次構造の2つの構造を形成し得る (Fig. 1)。ゲノムRNA転写に関与するタンパク質複合体primaseがSL構造と結合してPKに転移し、そこにRNA依存RNAポリメラーゼ (RdRp) と結合することで転写開始をするモデルが提唱されている。私は3' PKが2つの構造を実際に形成可能であることをNMR解析から示し、さらにprimaseのコンポーネントが相互作用することも示した。本研究では3' PKの構造スイッチ機構の解明を目指し、SL構造、PK構造の立体構造解析のために新規の磁場配向剤を用いたRDC測定を行った。

【実施内容】

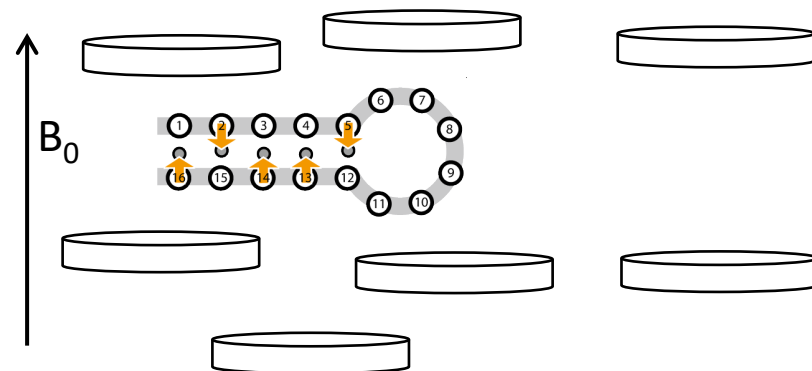
カゼインでコーティングしたチタンナノシート磁場配向剤を用い、SL構造の部分構造を持つ4種類のRNAについてイミノ基のHMQC測定を行った。本提案で用いたカゼインでコーティングしたチタンナノシート磁場配向剤はRNAに用いRDC測定した報告が無かったため、実際にRDC測定が可能か確認した。本研究で用いたチタンナノシート配向剤は磁場に直交する向きに配向する (Fig. 2)。SL構造RNAには二つのステムが含まれており、両方のステムともにA型構造のRNAが磁場に直行する場合とおおむね一致したRDC値であった。これまで一般にRNAのRDC測定に用いられてきた磁場配向剤は磁場方向に配向させるものであり、磁場に直行する配向は超高磁場NMR装置等を用い配向剤非存在下のみであったが、磁場配向剤を用いても直行方向に配向可能であることが示された。

Fig. 1



本課題で用いた3' PKの二つの二次構造 左 SL構造、右 PK構造

Fig. 2



本課題で用いたチタンナノシート配向剤の模式図 磁場に直行する方向に配向するチタンナノシートに沿ってRNAも弱く磁場直行方向に配向する

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF25-01-087			
利用課題名	新規磁場配向剤を用いた100塩基程度の機能性ノンコーディング RNA の RDC 測定			
所属機関	東京科学大学			
所属部署	生命理工学院			
役職・氏名	役職	特任講師	氏名	大山貴子
利用実施時期、及び期間	2025 年 8 月 22 日～2026 年 3 月 19 日 総利用日数:12 日 ☒ 当初計画どおり・ ☐ 当初計画変更 (変更理由)			

1. 本課題の概要・目的

本研究の長期目的は、COVID-19 の原因ウイルスである SARS-CoV-2 のウイルスゲノム転写開始機構の解明である。COVID19 のウイルスゲノムの転写開始にはゲノム RNA の 3' 非翻訳領域(UTR)に存在する 3' PK と呼ばれる配列保存性の高い領域が関与していると示唆されている。3' PK はステムループ(SL)構造と pseudoknot(PK)と呼ばれる特異な二次構造の2つの構造を形成し得る。ゲノム RNA 転写に関与するタンパク質複合体 primase が SL 構造と結合して PK に転移し、そこに RNA 依存 RNA ポリメラーゼ(RdRp)と結合することで転写開始をするモデルが提唱されている。私はは 3' PK が2つの構造を 実際形成可能であることを NMR 解析から示し、さらに primase のコンポーネントが相互作用することも示した。本研究 では 3' PK の構造スイッチ機構の解明を目指し、SL 構造、PK 構造の立体構造解析のために新規の磁場配向剤を用いた RDC 測定を行う。

2. 成果の概要

実施内容

カゼインでコーティングしたチタンナノシート磁場配向剤を用い、SL 構造の部分構造を持つ4種類の RNA についてイミノ基の HMQC 測定を行った。本提案で用いたカゼインでコーティングしたチタンナノシート磁場配向剤は RNA に用い RDC 測定した報告が無かったため、実際に RDC 測定が可能を確認した。本研究で用いたチタンナノシート配向剤は磁場に直交する向きに配向する。SL 構造 RNA には二つのステムが含まれており、両方のステムともに A 型構造の RNA が磁場に直行する場合とおおむね一致した RDC 値であった。これまで一般に RNA の RDC 測定に用いられてきた磁場配向剤は磁場方向に配向させるものであり、磁場に直行する配向は超高磁場 NMR 装置等を用い配向剤非存在下のみであったが、磁場配向剤を用いても直行方向に配向可能であることが示された。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

当初の目標では、4種類の RNA について RDC 測定を予定していた。おおむね予定通りに4種の RNA の測定を行った。RNA と磁場配向剤の混合により、RNA または配向剤の凝集が起こってしまい、十分な S/N 比のスペクトルを得ることが難しいサンプルがあった。そのため、RDC を得られた RNA の2つにとどまった。RNA と配向剤の混合の際に塩強度が 150 mM 程度の場合、凝集を生じやすかった。RDC が得られた配列については、A 型らせんが磁場に直行する配向を取った場合の RDC とおおむね一致した。新規のカゼインコーティングチタンナノシート磁場配向剤で RDC を観測できたため当初の目標はおおよそ達成できた。

成果発表

学会発表

Analysis of the mechanism for RNA structure switching in the 3' untranslated region during the initiation of genome replication of SARS-CoV-2

○Takako Ohyama¹, Yoshitaka Ishii¹ (1 School of Life Science and Technology, Institute of Science Tokyo)

第 27 回日本 RNA 学会年会 2026 年 7 月 8 日～10 日(愛媛) 発表予定

講演

RNA の RDC 測定と構造決定、大山貴子、mRNA ターゲット創薬研究機構 2026 年度 第 1 回講演会

今後の展開

本課題の実施で、従来用いられていた磁場配向剤のみならず、カゼインコーティングされたチタンナノシート配向剤でも RNA の RDC を測定できることが確認できた。

ただし、混合条件によっては配向剤と RNA の混合で凝集が生じることが確認されたため、RNA と配向剤の混合法や溶液条件、さらに配向剤を改良する等の改良により、より S/N の良いスペクトルを得る予定である。

凝集が改善された場合、

3' PK の SL 構造と PK 構造の立体構造決定に用いるための RDC 測定

3' PK の P2、P4、P5 のジャンクション部位の欠損や残基置換等の変異体を用いた RDC 測定からジャンクション部位の構造が構造スイッチに与える影響の解析

を行い、新規磁場配向剤を用いた RNA の構造解析手法を開発しつつ、3' PK の構造スイッチ機構の解析を行う。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

本研究で用いた 3' PK 領域はベータコロナウイルスに共通のゲノム転写開始に関与する領域であり、ベータコロナ属ウイルスで二次構造が保存されている。ベータコロナ属のウイルスは数年ごとにアウトブレイクが発生しており、これまで、MERS、SARS、COVID-19 等が発生した。特に COVID-19 は世界規模で人類活動に多大な打撃を与えた。今後もベータコロナ属ウイルス感染症発生の可能性は高く、今後発生し得る新型ベータコロナウイルスへの備えが必要である。3' PK はベータコロナ属共通のウイルス転写開始メカニズムに関与しており、3' PK がどうゲノム転写開始を制御しているか解明されれば、ベータコロナ属汎用に転写開始を阻害する抗ウイルス薬の開発につながる可能性がある。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

良かった点

担当者が NMR に精通しており、測定の相談がしやすかった

改善してほしい点

特になし

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (○) なし

「あり」の場合理由:

7. その他

8. 利用施設

理化学研究所

溶液 700MHz

利用期間 1: 2025 年 08 月 22 日 ~ 2025 年 08 月 22 日

利用期間 2: 2025 年 08 月 29 日 ~ 2025 年 09 月 01 日

利用期間 3: 2025 年 11 月 18 日 ~ 2025 年 11 月 21 日

利用期間 4: 2025 年 12 月 19 日 ~ 2025 年 12 月 22 日

利用期間 5: 2026 年 03 月 17 日 ~ 2026 年 03 月 19 日

9. その他の利用施設

なし