

平成 27 年 4 月 17 日

公益財団法人富山第一銀行奨学財団
理事長 金岡純二 殿

助成研究成果概要報告書

教育機関名：国立大学法人 富山大学	助成金額：850 千円	
研究代表者：井川善也	所属：理学部 化学科	職位：教授
研究題目：低分子医薬の新規ターゲットとしての RNA 分子スイッチの解析：リガンド認識から遺伝子制御への伝達機構の解明と人工改変		

【研究概要】

RNA 分子スイッチは、「低分子医薬の作用標的」として期待され、既存の蛋白質スイッチに比べ多くの利点を有するため、その人為制御は「細胞機能を人工制御する」技術を要する分野での分子ツールとして有望視されている。天然の RNA 分子スイッチをこれらの目的の制御因子として利用する研究は数例報告されているが、いずれも小型で単純なタイプのスイッチを用いており、遺伝子発現の高次な制御には不十分である。本研究では「c-di-GMP 応答型 RNA 分子スイッチ（リボスイッチ）のモジュール集積構造と多段階制御」の知見に立脚し、リガンド分子による制御機構の同定をおこない、人工リボスイッチ構築の基礎知見を得る。

系統的な欠失変異体から発現するリボスイッチ RNA を *in vitro* 転写により合成し、化学修飾などの手法により、状態の二次構造を実験的に同定する。分子認識モジュールを有する変異体については、c-di-GMP の添加による二次構造の変化も検証する。

【成果要約】

RNA の二次構造予測プログラムを利用した同リボザイムのモジュール集積型構造の構造ドメインを単位として、4つの領域に区分したリボスイッチ RNA について欠失変異体を作成し、分子スイッチとしての性能を転写 (mRNA) および翻訳 (酵素活性) を指標に評価した。その結果、本リボスイッチは c-di-GMP 結合に応じて翻訳の段階を負に制御する「スイッチオフ型」分子スイッチであることが強く示唆された。次にこの制御を直接引き起こす部位とその変化をリボスイッチが細胞内で作動する条件下において同定すべく、鋳型 DNA からの転写合成時に c-di-GMP を添加しておき、リガンドの結合が RNA 合成と同時に進行する条件下で硫酸ジメチルによる RNA 構造解析を行なう実験プロトコルを確立し、実際に解析を行なった。その結果、従来法のプロトコルでは同定できなかった「リガンド分子 (c-di-GMP) の添加に依存した構造変化の検出」に成功した。実験データを詳細に解析した結果、構造変化を伴う遺伝子制御部位としてリボソーム結合部位が同定された。また本研究で確立した化学修飾法プロトコルはリボスイッチ RNA 構造の変化部位を一塩基単位で同定できることから、本リボスイッチの解析に限らず、人工リボスイッチ設計の作動確認を含むリボスイッチ研究全般に有用な実験手法となることを明らかにした。

(別添資料)

研究成果 発表状況	【雑誌論文, 学会発表, 図書, 新聞掲載, 研究に関連して作成した Web ページ, 産業財産権 (特許権等) の出願・取得状況について記入】 学会発表 1) 西村圭一郎、柿澤仁史、古田弘幸、井川善也 c-di-GMP応答型リボスイッチの発現プラットフォームの機能解析 第8回バイオ関連化学シンポジウム (H27/9/12 岡山大学) 2) 柿澤仁史、西村圭一郎、松村茂祥、古田弘幸、井川善也 コレラ菌由来c-di-GMP応答型リボスイッチの機能構造相関解析 H26年度日本化学会近畿支部北陸地区講演会と研究発表会 (H27/11/21 富山大学) 3) 柿澤仁史、西村圭一郎、古田弘幸、井川善也 c-di-GMP応答型リボスイッチの発現プラットフォームの機能及び構造解析 第37回 日本分子生物学会年会 (H27/11/25 パシフィコ横浜)		
経費の 執行状況	区分	執行額 (円)	備考
	物品費	807940	使い捨プラスチック製品 分子生物学試薬 卓上小型遠心機など、
	旅費	42060	工学研究院応用化学部門 古田弘幸教授と共同研究