

氏名（本籍）	奥居 沙弥（宮崎県）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第 193 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	新規低分子 RNA の探索手法の開発と NMR 法による構造解析
論文審査委員	(主査) 教授 河合 剛太 (副査) 教授 村上 和仁 教授 黒崎 直子 教授 坂本 泰一 准教授 渡邊 宇外

学位論文の要旨

新規低分子 RNA の探索手法の開発と NMR 法による構造解析

1. 序論

タンパク質に翻訳されることなく、RNA として必要に応じて発現し、機能する RNA を総称し、non-coding RNA (ncRNA) と呼ぶ。ncRNA は生体内の様々なメカニズムに関与していることが知られ、解析が進められている。本研究では 50-150 残基の長さを持つ RNA を低分子 RNA と呼び、このサイズの RNA に着目した。この大きさの RNA は、既知の超低分子 RNA（約 20 数残基）に比べ、より複雑な構造を形成でき、一方、数千残基の長さを持つ長鎖 RNA のように部分的な構造ではなく、分子全体で特定の構造を形成する可能性が高い。このため、立体構造解析が有効な対象といえる。そこで本研究では、新規の低分子 RNA の構造および機能を明らかにすることを目的とし、低分子 RNA を発見する手法の開発、実際に見出した新規低分子 RNA の構造と機能の解析を行った。

2. 新規 RNA 発見のための網羅的低分子 RNA 配列解析

50-150 残基の未知の RNA を発見するため、次世代シーケンサーによる解析を行った。生体内において RNA は何らかの構造をとっており、たとえば tRNA や SRP RNA などの低分子 RNA は機能するための特定の構造を形成していることが知られている。そこで、新規低分子 RNA を見出す方法として、二次構造に基づいた独自のクラスタリング法を開発した。本解析では配列による分類も併用し、マウスの脳から得た候補配列データを 216 のグループに分類した。さらに各グループに含まれる配列を精査することによって、新規低分子 RNA を 16 個発見した。これらの RNA

を Mouse structured small non-coding RNA に基づき、MsncR と名付けた。

3. 立体構造形成スクリーニング手法の開発

生体内において RNA は様々な反応に関与している低分子 RNA は、それぞれ特定の立体構造を形成して機能している可能性が高い。したがって、機能する低分子 RNA は特定の立体構造を形成している可能性が高い。そこで、多くの候補 RNA の中から安定な立体構造を形成する RNA をスクリーニングする手法を開発した。この手法では、NMR 試料管の中に転写反応液を入れ、そのまま観測することで、RNA の精製や測定用試料の調製といったステップを省きスクリーニングすることができる。本手法を In NMR Tube Transcription に基づき、INTT 法と名付けた。さまざまな RNA について INTT 法による測定を行った結果、(1) 明確な立体構造形成を確認できる場合、(2) 部分的に立体構造を形成している場合、あるいは立体構造を形成した分子と形成していない分子が共存している場合、および (3) 立体構造形成を確認できない場合、という 3 つの場合に区別できることが分かり、本スクリーニングの有用性が確かめられた。

4. 新規低分子 RNA の構造と機能の解析

上記のシーケンサー解析により見出された新規候補 RNA の一つである MsncR-11 の構造解析を行った。MsncR-11 は、ミトコンドリアのシトクロームオキシダーゼ I (COXI) mRNA の 5'末端上流に位置し、相補鎖に tRNA がコードされている。ミトコンドリアにおける mRNA の成熟化には、mRNA の前後に付随している tRNA が切断される必要がある。しかし、COXI の 5'末端上流には tRNA は付随していない。したがって、MsncR-11 が tRNA の役割を果たす可能性が考えられた。MsncR-11 の配列を複数の予測プログラムにより二次構造予測を行ったところ tRNA 様の構造を示したが、T アーム部分では予測プログラムの種類により異なる 3 つの構造が予測された。そこで、T アーム領域の断片などをデザインし、それらの NMR スペクトルと全長のスペクトルを比較することによって、二次構造を同定した。その結果 MsncR-11 が tRNA 様構造を形成し、ミトコンドリアの mRNA の成熟化に関与していることを示唆した。

5. 総括

本研究において、新規低分子 RNA を発見するための手法および RNA の立体構造をスクリーニングする手法の開発を行った。さらに、発見した新規低分子 RNA の一つについて、その構造から機能を推定することに成功した。これらの構造に着目した解析手法を使用することによって、未だ明らかにされていない生体分子メカニズムの一部を担う新規低分子 RNA の発見・解析に寄与することが期待できる。今後、本研究で開発した手法がさらに発展することによって、さまざまな RNA の機能が解明されると期待できる。

審査結果の要旨

近年、生命科学の分野で RNA の持つさまざまな機能が注目されているが、その一種である低分子 RNA については、まだ知られていないことが多く残されていると考えられており、その発見と機能解析を進めることは、生命現象の解明のために重要な課題である。本論文は、二次構造あるいは立体構造という新しい視点から新規の低分子 RNA を発見する手法の開発を行い、さらに実際に発見した RNA の一つについて、立体構造解析を行うことによって機能の推定を行った。これらの成果が全 5 章にまとめられている。

第 1 章では、序論として、低分子 RNA 研究の背景および現状について述べている。また、これまでに発表されている低分子 RNA の解析手法について概説したうえで、本研究における開発および解析の意義について明確に示している。

第 2 章では、近年その機能の高度化が著しく生命科学の中心的な分析機器となっている DNA シーケンサー（DNA の塩基配列の解析装置）を利用した新規低分子 RNA の発見手法の開発について述べている。現在の最先端機器である次世代シーケンサーを用いた解析により、億単位の RNA 配列を得ることができる。申請者は、低分子 RNA の多くが特定の立体構造を形成して機能していることに着目し、大量の RNA 配列の中から機能的に重要なものを効率良く発見する手法を開発した。開発した手法では、まず、それぞれの RNA の二次構造を予測している。所属する研究室で開発された二次構造予測プログラムを組み込んだ解析システムを利用し、大量の RNA の二次構造予測を実現した。さらに、予測された二次構造をパターン化することで、効率のよいクラスタリングを可能とした。二次構造に基づくクラスタリングは、機能に結びついた性質を用いての解析となることが説明されている。マウスの脳から抽出した RNA に対して実際にこの手法を適用し、1 億個の RNA 配列の中から、特定の立体構造を形成して機能する RNA を 16 個発見することに成功したことが述べられている。発見した RNA は、mouse structured small non-coding RNA に基づき、MsncR と命名されている。本研究についての論文は、発表後の半年間で 300 回以上ダウンロードされた。このうち 60%が海外からのダウンロードである。

第 3 章では、数多く見出された候補 RNA の中から特定の立体構造を安定して形成するものを選び出すための手法の開発について述べている。まず、実験的な二次構造解析法としては核磁気共鳴（NMR）法が適していることが述べられている。しかし、通常行われている NMR 法による解析では、まず NMR 測定用の試料を転写合成法あるいは化学合成法によって調製し、電気泳動法やクロマトグラフィーによって精製する必要がある。これらの作業には 2 週間程度の期間が必要であり、また、熟練した技術が要求される。本論文では、NMR 試料管内において転写合成を行い、精製することなく NMR スペクトルの測定を行う手法を開発し、実際に、RNA の立体構造情報を得られることを示した。この手法では、作業開始から 1 時間程度で結果を得ることも可能であり、また、特別な技術や精製装置等を必要としないことから、多数の試料について解析を行うことが可能となる。実際に、3 種類の RNA についてこの手法を適用し、この手法の可能性について追及

したことが述べられている。本手法は、RNA の立体構造のスクリーニングだけでなく、RNA と他の分子との相互作用のスクリーニング、すなわち、薬物候補のスクリーニングにも応用可能である。また、この開発に関する論文を発表した直後に海外のグループが改良した手法の論文を発表しているが、依然として本論文で開発した手法が優れていることが述べられている。

第4章では、本論文において見出した RNA の一つ (MsnrR-11、第2章) について、二次構造についての解析を行い、その機能を推定したことについて述べている。MsnrR-11 は、マウスのミトコンドリアゲノムに由来していた。動物のミトコンドリアでは、ゲノム全体が連続して転写された後、tRNA 部分が切断されることによって生成した断片が mRNA となる機構が知られている。MsnrR-11 は tRNA ではないが、その下流にタンパク質の遺伝子 (COXI) が連続しており、この mRNA の生成に関与していることが予想された。また、MsnrR-11 の領域の逆鎖には tRNA 遺伝子が存在していた。MsnrR-11 の二次構造が tRNA に類似していることから、tRNA ではないものの、類似した立体構造を形成し、それが tRNA を認識する酵素によって認識される可能性がある。このことを明らかにするために、NMR 法により二次構造についての解析を行った。解析のために、RNA の断片化および選択的な安定同位体標識手法などの解析手法を活用している。NMR 法による解析の結果として、MsnrR-11 は、実際に tRNA 様の二次構造を形成していることが明らかとなったことから、MsnrR-11 は COXI mRNA の成熟化に関与していることが示唆された。以上のように、NMR 法による二次構造あるいは立体構造の解析が、RNA の機能の解明に寄与することを実証したことが述べられている。

第5章では総括を論じている。

本論文はこれまでに知られていなかった低分子 RNA の構造および機能について研究したものであり、解析のための有用な2つの手法を開発するとともに、ミトコンドリアにおける mRNA の成熟化の機構について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。したがって、学位申請者の奥居沙弥は、博士 (工学) の学位を得る資格があると認める。