

京都大学	博士 (医科学)	氏名	小松 リチャード馨
論文題目	RNA structure-wide discovery of functional interactions with multiplexed RNA motif library (多重化RNAモチーフライブラリを用いたRNA構造総体における機能的相互作用の発見)		
(論文内容の要旨)			
<p>RNAは一次配列とその高次構造により機能が規定され、機能単位であるRNAモチーフを成す。RNAモチーフは翻訳、安定性、時空間制御に関連するRNAエレメントとして存在し、分子間相互作用を介して細胞内で重要な役割を果たす。しかし現在まで高次構造に特化しRNAモチーフの機能評価を行う大規模並列解析手法は確立されておらず、RNA高次構造の発見からモチーフの機能評価まで複数の実験を重ねる必要があった。ひいては、RNAエレメントに関する研究の進展を妨げる要因となっていた。</p> <p>本研究では、モチーフとしてのRNA構造と標的分子の相互作用を大規模並列定量するFOREST (folded RNA element profiling with structure library) 法を開発した。FOREST法はRNAモチーフを搭載した多重化ライブラリの設計、ライブラリと標的リガンドを用いたRNAプルダウン、標的結合群のマイクロアレイ走査を行う。FOREST法で使用するライブラリは多数種類(最大1,000,000種類)のRNAプローブを含み、それらはRNAモチーフ領域(1-116 nt)、共通ステム構造(18 bp)、RNAバーコード(25 nt)から構成される。さらに、構造依存性バイアスがない定量を目的としてRNAバーコードに対する相補鎖DNAから成るマイクロアレイを設計の上実装した。</p> <p>実施例として、FOREST法をRNA-タンパク質相互作用解析へと適用した。RNAプルダウン後の標的分子による濃縮度の定量により、各RNAモチーフに対する標的結合スコアを導出した。LIN28Aの精製タンパク質を用いた事例では、既知結合群である<i>let-7</i>ファミリーに属するマイクロRNA前駆体群が有意に高い結合スコアを示すことを確認した。加えて、標的結合性の配列領域が二次構造を形成するにつれ結合スコアが減少する事例の確認、ならびに細胞由来のタンパク質を用いた解析に成功した。</p> <p>次に、グアニン四重鎖構造(G4)を有するRNAモチーフとRNA-タンパク質相互作用に着目した。従来、並列シーケンシングにてG4は解析困難であるためにG4結合性タンパク質群の標的探索に網羅性と定量性が欠けていたが、今回FOREST法にて網羅的に抗G4抗体BG4、CIRBP、DHX36に結合するRNAモチーフを解析した。その結果、全G4コントロール群の有意な結合を観察したが、DHX36のみがG4に対して高い結合特異性を有した。その他G4結合性タンパク質、特に抗G4抗体BG4はG4のみではなくGAAリピートや特定の配列に強く結合し、結合特異性が低いことが分かった。</p>			

<p>同時に、G4結合性タンパク質に対するFOREST法のデータと、G4の安定性を低減した条件におけるデータを統合し、G4である可能性が高いヒト由来のRNAモチーフを探索した。その結果、G4を有するマイクロRNA前駆体を新たに同定することに成功した。従来の大規模G4探索手法では構造依存性バイアスや構造境界が不明瞭であるためG4を有するRNAモチーフの発見が難しいことを鑑みると、FOREST法のデータはG4の発見と評価に一層効果的であり、モチーフ構造の再定義と発見を可能にした。</p> <p>結論として、FOREST法はモチーフ単位でのRNA構造が担う相互作用を大規模に定量する汎用的な手法として機能した。今後、同手法により多種多様なRNAモチーフの機能評価が効率化され、RNAエレメントが司る制御層の解明を推進できる。</p> <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>本研究では、RNAの配列に加え高次構造によって規定されるRNAモチーフに着目し、それらの結合機能を大規模並列に定量評価するFOREST法を構築した。</p> <p>まず、RNA高次構造のデータセットよりRNAモチーフを抽出する手法と、それらを網羅したRNA構造ライブラリの設計方法を開発した。並びに、核酸バーコードを用いて、RNA構造の検出に特化した大規模定量方法を開発した。上記の技術群をRNAプルダウンと統合させた一連の手順をFOREST法と命名し、RNA-タンパク質相互作用の大規模解析法を構築した。複数種類のRNA結合タンパク質に対して適用し、標的タンパク質に結合する既知のRNAモチーフの有意な検出と、RNA-タンパク質相互作用に関与するRNA構造の評価に成功した。</p> <p>次に、従来の方法では解析が困難であった、グアニン四重鎖構造(G4)を有するRNAモチーフとタンパク質の相互作用に着目した。抗G4抗体BG4、CIRBP、DHX36と相互作用するRNAモチーフを網羅的に解析し、タンパク質間でのG4への結合特異性の違いや非G4への交差反応を解明した。さらに、同データの活用により、G4を含むマイクロRNA前駆体を新たに同定することに成功した。</p> <p>以上の研究はRNA高次構造に着目した新しい形態の大規模相互作用解析法の開発に貢献し、RNA高次構造の同定や機能解明に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士(医科学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、令和3年2月8日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>

要旨公開可能日： 年 月 日以降