

(続紙 1)

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	Omar Sobhi Mohamed Mahmoud Eladl
論文題目	Elucidation of RNA aptamer structure and interaction in living human cells through in-cell NMR spectroscopy (ヒト生細胞中における RNA アプタマーの構造と相互作用のインセル NMR 法による解明)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、human immunodeficiency virus (HIV)の病因タンパク質である trans-activator of transcription (Tat)に対する RNA アプタマーに関し、ヒトの生細胞中における構造と Tat との相互作用を、in-cell NMR (インセル NMR) 法によって研究した結果をまとめたもので、5章からなっている。</p> <p>第1章は序論で、Tat は HIV 遺伝子の転写伸長に必須の因子であり、従って RNA アプタマーで Tat を捕捉すれば、HIV 遺伝子の転写が抑制されて抗 HIV 効果が期待できる事が説明されている。HIV 遺伝子の転写直後に生成される trans-activation response element (TAR) RNA に Tat は結合するが、TAR RNA よりも 100 倍強い親和性で Tat と結合する RNA アプタマーが所属する研究室で過去に開発されている事が説明され、この RNA アプタマーの構造と Tat との相互作用を研究対象とする事が述べられている。生きた細胞をそのまま試料管に入れて NMR スペクトルを測定するインセル NMR 法が所属研究室で開発中である事が述べられ、本論文ではこの手法を上記の対象に適用する事が説明されている。</p> <p>第2章では、研究対象の RNA を ^{13}C と ^{15}N で安定同位体標識する事で、NMR 法によって得られる情報が格段に増大する事がまず説明されている。インセル NMR 法において必要となる RNA の物質量は、通常の溶液 NMR 法に比べて格段に多い為、従来の化学合成法や試験管内転写法で標識 RNA の調製を行う事は、費用的に現実的ではない。T7 フェージの RNA ポリメラーゼを用いた大腸菌の大量発現系とハンマーヘッド型リボザイムによる目的 RNA の切り出しを組み合わせる事で、インセル NMR で必要となる量の標識 RNA を現実的な費用で調製する事に成功した事が説明されている。標識した RNA を用いて Tat のアナログとの相互作用をインセル NMR 法によって解析したところ、^1H に加えて ^{13}C と ^{15}N のケミカルシフトに関する情報も取得でき、相互作用に関する豊富な情報を取得できる事が示された。</p> <p>第3章では、RNA アプタマーのヒト生細胞中における構造と Tat との相互作用を、インセル NMR 法によって解析した結果が示されている。Tat の結合に際して RNA アプタマーにはウラシル：アデニン：ウラシル (U:A:U) のベーストリプルが2つ誘起される事が、イミノプロトンスペクトルの解析から示された。試験管内における過去の解析結果と照合した結果、2つのベーストリプルの形成によって RNA アプタマーの主溝が広がって Tat を受け入れる空間が確保され、その結果 RNA アプタマーと Tat が2</p>			

か所で同時に結合する事が可能となり、これによって生細胞中においても高い親和性を実現されているものと理解された。

第4章では、ヒト生細胞中の RNA アプタマーはヒトの体温である 37°C においては数時間で断片化し、この時間以降はインセル NMR スペクトルが消失する事が示されている。RNA の断片化を引き起こすと考えられる RNA 分解酵素の活性を抑える為に、RNA 分解酵素の阻害剤を2種類混合し、RNA アプタマーと共にヒト生細胞に導入した。その結果 RNA の断片化が抑制され、37°C においても数時間を超えてインセル NMR スペクトルが観測できる事が示されている。

第5章は総括で、インセル NMR で必要となる量の標識 RNA を現実的な費用で調製する事に成功した事がまず述べられている。次に得られた標識 RNA を用いる事で、ヒト生細胞中における RNA アプタマーの構造と Tat との相互作用の解明に成功した事が述べられている。さらに、RNA 分解酵素の阻害剤を活用する事で、ヒトの体温である 37°C においてもインセル NMR スペクトルが取得できるようになった事が説明されている。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、human immunodeficiency virus (HIV)の病因タンパク質である trans-activator of transcription (Tat)に対する RNA アプタマーに関し、ヒトの生細胞中における構造と Tat との相互作用を、in-cell NMR (インセル NMR) 法によって研究した結果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. T7 ファージの RNA ポリメラーゼを用いた大腸菌の大量発現系とハンマーヘッド型リボザイムによる目的 RNA の切り出しを組み合わせる事で、インセル NMR で必要となる量の標識 RNA を現実的な費用で調製する事に成功した。これにより ^1H に加えて ^{13}C と ^{15}N のケミカルシフトに関する情報も取得でき、構造と相互作用に関する豊富な情報を取得する事が可能となった。

2. ヒト生細胞中における RNA アプタマーの構造と Tat との相互作用をインセル NMR 法によって解析し、Tat の結合に際して RNA アプタマーにはウラシル：アデニン：ウラシル (U:A:U) のベーストリプルが 2 つ誘起される事を見いだした。2 つのベーストリプルの形成によって RNA アプタマーの主溝が広がって Tat を受け入れる空間が確保され、その結果 RNA アプタマーと Tat が 2 か所で同時に結合する事が可能となり、これによって生細胞中においても高い親和性が実現されている事が解明された。

3. RNA 分解酵素の阻害剤を 2 種類混合して RNA アプタマーと共にヒト生細胞に導入する事で、細胞内における RNA 分解酵素による RNA の断片化が抑制された。これにより、ヒトの体温である 37°C においても良好なインセル NMR スペクトルを観測する事に成功した。

以上本論文では、ヒト生細胞中における RNA の構造とタンパク質との相互作用を、生きた細胞をそのまま試料管に入れて NMR スペクトルを測定するインセル NMR 法によって解析する方法論を開発した。これにより当該生体高分子の動作機構を解明する事に成功した。開発された方法論は、バイオマスの利活用に資する酵素の発現量上昇や活性の改善等の研究にも適用可能である。よって、本論文は博士 (エネルギー科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 6 年 1 月 26 日に実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：2024 年 6 月 24 日以降