

(論文内容の要旨)

RNA は生体内において遺伝情報をタンパク質へと変換する際の仲介役を果たすだけでなく、リボザイム、例えばリボソームにおいては触媒活性を担う rRNA、また、リボスイッチなど多様な機能を担っている。これら RNA が機能を発揮するには、多数の RNA 分子間の相互作用を介して特定の高次構造を形成することが必要である。1990年に、機能を持つ RNA を人工的に取得する手法 (*in vitro* selection 法) が開発された。これにより、天然に存在する RNA-RNA 間の相互作用を解析するだけでなく、人工的に RNA-RNA 間の相互作用を新規に作成し、それを解析することが可能となった。その結果、これまでに多くの新しい RNA-RNA 相互作用が確立され、解析されてきた。これらは生命現象における RNA の役割を解明するうえで重要な情報を提供する。また、さらには分子設計によるナノバイオロジー、医療分野への応用に役立つ。

申請者の研究の目的は、従来の *in vitro* selection 法をさらに一段前進させ、ある一つの RNA に存在する特定の部位を標的として RNA-RNA 相互作用を合理的に取得する手法を、構築することである。従来の *in vitro* selection 法では、RNA 中の任意の部位を標的として RNA-RNA 相互作用をつくり出すことは非常に困難である。

この研究では、分子モデリングの適用により、二つの RNA 分子の間にあらかじめ構造既知の RNA-RNA 相互作用を一つ導入し、この問題を解決することとした。すなわち、1) この相互作用を足場として、一つの RNA にランダム配列を有する RNA の部分 (プール RNA と呼ぶ) を設置し、2) これを、この配列の標的となる、もうひとつの RNA の特定の部分 (以下標的 RNA と呼ぶ) に立体的に接近させる。3) このことにより、標的部位に対して特異的に結合する RNA の特定の塩基配列を合理的に取得する方法を考案した。

この手法により、A) これまでに取得不能であった新しい RNA 分子間相互作用を強制的に作り出し、それを取得することができる、B) 2つの相互作用、すなわち既知のものと新しく出来たものを連結するために必要な中間領域も、プール RNA から、最適化したものを選択することができる、C) 標的 RNA と2カ所で結合する RNA は高度なモジュール性をもつため、その構造解析や分子設計への応用が容易である、D) 取得される RNA は2つの特定部位で結合するため、一つ一つの結合部位のみでは弱い結合しかできないが、これら二つを合わせる事により、標的となる RNA との間でシナジスティックに高い結合能を持つことになる、ことが期待できる。

この手法を用いて6塩基からなるインターナルループ構造 (loopB) を標的部位とした *in vitro* selection を行い、あらかじめ導入した相互作用 (GAAA loop-11nt receptor 相互作用) と selection で得られた新たな相互作用 (loopB-Loop-G 相互作用) の2つの相互作用が協調的に働くことで、標的 RNA に結合する目的通りの性質を持つ RNA を取得することができた。得られた RNA は2つの結合モジュール、11nt receptor と Loop-G およびそれらを結ぶ中間領域から構成され、いずれの領域も独立した機能性モジュールとして扱うことが可能であった。2つの相互作用は単独では K_d 1 μ M 以上の弱い結合能力しか持たないが、中間領域によって適切に相対的な立体配置を調整することで、RNA 全体では結合能力を K_d 5.7nM まで上昇させる事が確認された。また RNA による RNA の認識に際して高い特異性をもつことが示された。この結果は、研究で用いた RNA 構築法が実際に上記の利点すべてを持つことを支持している。また、この手法は任意の標的部位に対するアプタマーを取得するうえで一般的な手法になり得ると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

申請者の研究の目的は、既知のものと新しいものの独立した2つの協調的な RNA-RNA 相互作用により、標的となる RNA に強固に結合する人工的な RNA を取得するための新しい手法の確立である。この手法により、構造既知の RNA-RNA 相互作用を基盤にして、立体構造の分子デザインをおこなっている。結果として、人工的に特殊な RNA-RNA 相互作用を起こさせ、これを形成する RNA の塩基配列を決定することができる。また、この手法は、RNA-RNA 相互作用が弱いために、任意の標的部位に結合する RNA を取得することが困難であった、従来の RNA-RNA 相互作用を取得する方法がもつ大きな問題点を克服する、応用範囲の広い、一般性を持つ手法であると考えられる。すなわち、近年の分子デザインと selection 法を組み合わせる RNA の機能と構造の相関関係に関する研究の流れを、さらに発展させた新規性の高い研究である。

具体的には、分子設計によりあらかじめプール RNA 分子と標的 RNA 分子の間に相互作用を導入することで、A) これまでに取得不能であった新しい RNA 分子間相互作用を強制的に作り出し、それを取得することができた、B) 2つの相互作用、すなわち既知のものと新しく出来たものを連結するために必要な領域も、プール RNA から、最適化したものをえらぶことができた、C) 標的 RNA と2カ所で結合する RNA は高度なモジュール性をもつこととなるため、その構造解析や分子設計への応用が容易である、D) 取得される RNA は2つの特定部位で結合するため、ひとつひとつの結合部位のみでは弱い結合しかできないものの、これら二つを合わせる事により、標的となる RNA との間で高い結合能を持つものが得られた、などの成果を上げることができている。

論文の結論については、非常に詳細な生化学的な解析が行われている。そのため、この手法の実践により、申請者が、予測した通りに目的とする RNA を取得していることが明快に理解できる。さらには、人工的な RNA 相互作用がどのように確立されていくか、その過程について、新たな興味深い知見が得られている。また、分子モデリングの精度についても、ここで得られたデータから、これまで以上に詳細に評価することができた。

こうした RNA-RNA 相互作用の構築法の実践とそれに関する新たな知見を敷衍する事には、生命現象における機能性 RNA の役割を解明するうえで大きな意義を持つ。また、それにより得られる知見は、生体内の RNA の機能の制御や、人工的な機能性 RNA の設計による、医療分野を含むナノバイオテクノロジーへの応用が期待できる。よって本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

平成 21 年 1 月 29 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。