



Title	RNA自己複製系における2本鎖RNAの形成メカニズムと反応への影響の解明に関する研究
Author(s)	富田, 憲司
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55849
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (富田 憲司)	
論文題名	RNA自己複製系における2本鎖RNAの形成メカニズムと反応への影響の解明に関する研究
論文内容の要旨 生命の起源を知るアプローチの一つとして、無生物から生物を創る、人工細胞の構築が行われている。当研究室では、生命の自己複製能力に着目した人工ゲノム複製モデルとして、RNA複製酵素 (Qβレプリケース) を用いたRNA自己複製系が構築されている。 この系では、RNAの種類によっては自己複製反応が途中で止まってしまうという生命のモデルとしては致命的な問題がある。これは、鋳型鎖RNAと相補鎖RNA (以下、鋳型鎖、相補鎖と称する) がハイブリダイゼーションにより2本鎖RNAを形成し、2本鎖RNAには翻訳系やQβレプリケースが作用できないことが原因と考えられている。しかし、①2本鎖RNAが反応を停止させる明確な実験的証拠は得られていなかった。また、②RNAがどのようなメカニズムで全長2本鎖RNAを形成するかも明らかではなかった。 そこで本研究では、①2本鎖RNAの自己複製反応への影響、②その中でも特に複製または翻訳反応への影響を実験的に明らかにすることを試みた。また、②自己複製系において反応停止の原因と考えられている2本鎖RNAが形成されるメカニズムを実験的に明らかにすることも試みた。これらの2つの課題を解決することで、自己複製系における反応の停止の解消に関する知見を得ることを目的とした。 まず、①と②の目的について2本鎖RNAの自己複製反応への影響を確認するため、複製活性及び翻訳活性を有する1本鎖RNAである鋳型鎖に対して、相補鎖をハイブリダイゼーションさせた2本鎖RNA (以下、全長2本鎖RNAと称する) を作成し、全長2本鎖RNAを用いて、複製・翻訳反応を行いその活性を調べた。その結果、全長2本鎖RNAは複製・翻訳反応を共に阻害することが明らかになった。次に全長2本鎖RNAが反応を阻害する原因として、2本鎖の連続する長さや2本鎖を形成する場所が重要であると予想し、鋳型鎖に対して長さや場所の異なる様々な相補鎖をハイブリダイゼーションさせた様々な部分的な2本鎖RNAを作成し、これらを用いて複製・翻訳反応を行いその活性を調べた。その結果、複製反応はRNAの2本鎖部分の連続する長さによってより大きく阻害され、翻訳反応はRNAの2本鎖部分の場所によっては阻害される場合と逆に活性が上昇する場合もあることが明らかとなった。 自己複製系において2本鎖形成 (全長2本鎖RNA形成) は反応を阻害することが明らかになったため、次に③の目的であるRNA自己複製系におけるRNAの全長2本鎖RNA形成メカニズムを知ることを試みた。RNAが2本鎖を形成する場合、複製途中で挿入配列 (QβレプリケースによるRNA複製に必須の認識配列に、挟まれる配列) のループ構造がまず2本鎖を形成すると予想し、様々な長さのループ構造を有するRNAを用いて反応温度を変化させて複製反応実験を行い、2本鎖率等を調べた。その結果、温度と2本鎖率には負の相関があること、ループ構造の長さや2本鎖の温度変化度合いには負の相関があることが明らかになり、ループ構造の2本鎖形成という2本鎖形成メカニズムを肯定する実験的証拠が得られた。 本研究により、2本鎖RNAが反応を停止させる明確な実験的証拠を得ることができ、またRNA自己複製系におけるRNAの2本鎖RNA形成メカニズムの一端を明らかにすることができた。本研究の成果は、自己複製系の改良のための重要な知見となるであろう。具体的には、連続する2本鎖部分が短く、ループ構造の短いRNAのデザインにより複製反応の阻害が解消され、2本鎖形成の場所のデザインにより翻訳反応の促進もしくは阻害が解消され、全体としてより自己複製が進むRNAの開発が期待される。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (富田 憲司)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	清水 浩
	副 査	教授	松田 秀雄
	副 査	教授	若宮 直紀
	副 査	教授	前田 太郎
	副 査	准教授	市橋 伯一

論文審査の結果の要旨

本論文はRNA自己複製系における2本鎖RNAの形成メカニズムと反応への影響について研究したものである。

第1章は序論である。研究の背景と本研究の目的について述べられている。

第2章においては、2本鎖RNAの自己複製反応への影響が検証された。複製活性及び翻訳活性を有する1本鎖RNAである鋳型鎖に対して、相補鎖をハイブリダイゼーションさせた2本鎖RNA（以下、全長2本鎖RNAと称する）が作成され、この全長2本鎖RNAを用いて、複製・翻訳反応が行われた。その活性を調べた結果、全長2本鎖RNAは複製・翻訳反応を共に阻害することが明らかになった。次に全長2本鎖RNAが反応を阻害する原因として、2本鎖の連続する長さや2本鎖を形成する場所が重要であると予想し、鋳型鎖に対して長さや場所の異なる様々な相補鎖をハイブリダイゼーションさせた様々な部分的な2本鎖RNAを作成し、これらを用いて複製・翻訳反応を行い、その活性が調べられた。その結果、複製反応はRNAの2本鎖部分の連続する長さによって、より大きく阻害され、翻訳反応はRNAの2本鎖部分の場所によっては阻害される場合と逆に活性が上昇する場合もあることが明らかとなった。以上の結果は、これまで明らかでなかった2本鎖RNAが及ぼす自己複製反応への影響を初めて明らかにしたものである。このRNA複製中の2本鎖RNA形成は、人工細胞のゲノム複製が停止する原因として指摘されていることから、2本鎖RNAの影響を明らかにしたことは重要な成果だと認められる。

第3章では、RNA自己複製系におけるRNAの全長2本鎖RNA形成メカニズムの解明について述べられている。RNAが2本鎖を形成する場合、複製途中に挿入配列（Q β レプリケースによるRNA複製に必須の認識配列に、挟まれる配列）のループ構造がまず2本鎖を形成するというメカニズムの仮説が立てられた。このモデルの検証のために、様々な長さのループ構造を有するRNAを用いて様々な反応温度での複製反応実験が行われた。その結果、温度と2本鎖率には負の相関があること、ループ構造の長さや2本鎖の温度変化度合いには負の相関があることが明らかになった。この結果は、ループ構造の2本鎖形成という上記2本鎖形成メカニズム仮説を肯定する実験的証拠が得られた。この成果は、これまで不明であった2本鎖形成メカニズムについて、実験的証拠に基づく仮説を提唱できたという点で価値があると認められる。

本論文では、2本鎖RNAが反応を停止させる明確な実験的証拠が示され、またRNA自己複製系におけるRNAの2本鎖RNA形成メカニズムの一端が明らかにされた。本論文の成果は、人工細胞モデルやRNA増幅法として広く応用されているRNA複製系の改良のための重要な知見となると認められる。したがって本論文は博士（情報科学）の学位論文として価値のあるものと認める。