The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies on the methods to evaluate interaction of RNA with small molecules
Author(s)	梅本, 詩織
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59436
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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

【32】

氏　　名	梅　本　詩　織（うめもと しおり）
博士の専攻分野の名称	博　士（理学）
学　位　記　番　号	第　２５１９４　号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科化学専攻
学　位　論　文　名	Studies on the methods to evaluate interaction of RNA with small molecules （RNA と小分子の相互作用評価法に関する研究）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　中谷　和彦 （副査） 教　授　高尾　敏文　　教　授　梶原　康宏

論 文 内 容 の 要 旨

本論文では RNA と小分子の相互作用評価法の開発や改良に関する研究について述べる。以下 3 種類のアプローチについてそれぞれ要旨を述べる。

(1) 蛍光分子を指示薬としたディスプレイスメントアッセイの開発

ディスプレイスメントアッセイは標的分子の相互作用を遊離時と結合時で物理的性質が変化する化合物を指示薬として検出する手法である。相互作用を調べたい化合物双方共非標識のまま試薬を混合するだけで行え、大規模な一次スクリーニングに適した簡便さを持つ。一方、指示薬と標的分子との結合に依存して検出できる相互作用が決まるため、アッセイの質を向上させるには様々な結合性を持つ指示薬が必要となる。本研究では環境応答性の蛍光クロモフォアであるキサントンを主骨格とし、蛍光ディスプレイスメントアッセイ指示薬の開発を行った。まず、2,7-ビス(2-アミノエトキシ)キサントン(**X2S**)を合成し、その蛍光が RNA により消光されること、またその消光はループ等の自由度が高い構造を持つ RNA で二本鎖 RNA によるものよりも大きくなることを確認した。続いて **X2S** がループ構造を持つ RNA と小分子の結合を検出できることをスクリーニングへの応用可能性も含めて示した。

続いて、リンカー構造の異なる誘導体を合成し、RNA との結合性を指標に指示薬として評価した。主骨格は同じでもリンカー構造が異なると蛍光の RNA への応答は変化した。その中でより構造選択性の高い結合を示す 2,7-ビス(*N,N*-ジメチルアミノエトキシ)キサントンが得られた。また、主骨格をキサントンからチオキサントンに変えることで波長の異なる指示薬を得られた。蛍光ディスプレイスメントアッセイでは指示薬と波長の重なる化合物の相互作用は検出できないため、波長の異なる指示薬を持つことはアッセイの汎用性に大きく寄与する。

(2) RNA と小分子の相互作用を大腸菌内で検出するためのレポーター遺伝子設計法の検討

RNA と小分子の相互作用を検出するため、様々なレポーター遺伝子が設計されてきた。そのほとんどは 5'-UTR のリボソーム結合部位近傍に標的配列を組み込んで、その相互作用により下流のレポーター遺伝子発現が制御されるよう設計されている。しかし、そのような設計ではリボソームの結合を阻害し、標的分子の有無にかかわらず翻訳量が大きく低下することが多い。翻訳領域に標的配列を挿入した、翻訳開始に影響しないレポーター遺伝子の設計について検討した。アミノ酸挿入に耐性が期待できるタンパク質として GFP を選びスプリット GFP 法で分割される部分に標的 RNA 配列を挿入した。翻訳量は低下せず、翻訳領域への標的配列の挿入がレポーター遺伝子設計として有望であることが示せた。

(3) Huisgen 環化付加反応可能なアルキン RNA の酵素合成とその SPR イメージングへの利用

標識、固定化可能な修飾 RNA は RNA の相互作用検出、評価を行う際非常に有用である。短鎖の修飾 RNA は化学合成できるが、長鎖 RNA の化学合成は難しい。一方酵素を利用すると数千塩基もの RNA を合成することが出来る。T7 ポリメラーゼによる転写では 5'末端はグアノシン構造さえ有ればトリリン酸は必要なく、5'-部位を修飾した塩基も取り込まれると報告されている。私は 5'-アルキン GMP を合成し、T7 ポリメラーゼによる転写で Huisgen 環化付加反応可能な RNA を合成し、それが SPR イメージングに利用できることを示した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者は、RNA と小分子の相互作用を検出・評価する手法の開発を目指し、以下の３つの手法を研究した。

１）蛍光分子を指示薬としたディスプレイスメントアッセイ法の開発

RNA と結合して消光される蛍光分子、2,7-ビス(2-アミノエトキシ)キサントンを指示薬として RNA 結合分子をスクリーニングできることを示した。またリンカー構造の異なる誘導体を合成し、それらの蛍光の RNA への応答が異なることから、キサントンクロモフォアがディスプレイスメントアッセイ指示薬の主骨格として有用であることを示した。さらに主骨格をキサントンからチオキサントンにすることで、励起・蛍光波長が長波長側にシフトした指示薬の開発を行い、ディスプレイスメントアッセイの汎用性を向上した。

２）翻訳開始に影響しないレポーター遺伝子の設計

5'-UTR のリボソーム結合部位(RBS)近傍に標的配列を組み込んだ場合に生じる翻訳量の変動を抑えるために、翻訳領域に標的配列を挿入し、翻訳開始に影響しないレポーター遺伝子の設計を検討した。コードするアミノ酸に依存した翻訳停止などの課題は残るが、目的通り標的配列を挿入による翻訳開始量の変動は少なく、適切なアミノ酸を選ぶことにより翻訳領域への標的配列の挿入がレポーター遺伝子の設計に有望であることを示した。

３）固定化・標識化が容易な RNA の酵素合成法の開発

T7 ポリメラーゼによる転写では、5'-部位を修飾した塩基が取り込まれる事を利用して、5'-アルキン GMP を合成し、T7 ポリメラーゼによる転写で Huisgen 環化付加反応可能な 5'-アルキン修飾 RNA の酵素合成に成功した。またこの RNA を用いて、アジド基を固定化した SPR イメージングセンサーへの RNA の固定化とイメージングへの応用を示した。

上記の成果はいずれも、RNA と小分子の相互作用に関する検出・評価に貢献すると期待される。よって本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。