The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Studies on regulation of the RNA secondary structures by using small organic molecules |
| Author(s) | 洪, 昌峰 |
| Citation | 大阪大学, 2012, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/59441 |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

【39】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 洪（コウ）　昌（ショウ）　峰（ホウ）（Changfeng Hong） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（理学） |
| 学　位　記　番　号 | 第　２５２０１　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<br>理学研究科化学専攻 |
| 学　位　論　文　名 | Studies on regulation of the RNA secondary structures by using small organic molecules<br>（有機小分子によるRNA二次構造の制御に関する研究） |
| 論　文　審　査　委　員 | （主査）<br>教　授　中谷　和彦<br>（副査）<br>教　授　村田　道雄　　教　授　加藤　修雄 |

## 論　文　内　容　の　要　旨

本論文は５つの章から構成されており、研究は主に有機小分子によるRNA二次構造の制御を目的に行われた物である。以下にそれぞれの研究に対する要旨を述べる。

**（１）合成小分子による $d(CGG)_n$ 配列をもつヘアピンDNA会合体の構築**

核酸の自己集合によるナノ構造構築が注目されている。また、核酸の二次構造は遺伝子発現の制御に重要な役割を果たしている。これまで、我々はミスマッチ結合分子（MBL）が、一本鎖DNAの二次構造を大きく変化させることを報告してきた。本研究ではミスマッチ結合分子を用いてヘアピンDNA同士の会合体を構築することに成功した。二つのナフチリジンカルバメートダイマー（NCD）ユニットを更に繋いだナフチリジンカルバメートテトラマー（$NCT_n$）を合成し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）解析により $d(CGG)_n$ を含むヘアピンDNAとの相互作用を調べた。構造活性相関、ループ領域塩基選択性、メチレンリンカーの長さによる複合体形成効率への影響などを調べることにより、$NCT_5$ が一番効率よく $d(CGG)_n$ を含むヘアピンDNA同士の会合体を形成させることを見出した。本研究により、DNA高次構造の構築へ小分子を用いる新しい手法の有効性が示された。

**（２）合成小分子による $r(CGG)_n$ 配列をもつヘアピンRNA会合体の構築**

RNA分子はステム、バルジーループ、ヘアピンループ、インターナルループ、ジャンクション等、様々な二次構造をもっている。RNAの二次構造は他の一本鎖領域、二次構造と分子間の相互作用により、更なる高次構造を形成する。近年、Kissing loop、リボスイッチなどRNA分子の高次構造形成が生体内の生命活動に非常に重要な役割を果たしていることが報告された。本研究ではNCT6を用いて分子間、及び分子内のヘアピンRNA同士の会合体を構築することに成功した。NCT6を介した分子内ヘアピンRNA同士の複合体形成山来のRNA分子の高次構造変化が確認された。NCT6は $r(CGG)_2$ を含むヘアピンRNAに対して、非常に高い塩基選択性を示した。本研究で初めてMBLがミスマッチRNAと結合する事が確認された。配列選択的にRNAと結合する分子設計への新しい知識が得られた。

**（３）合成小分子によるシュードノットRNAの高次構造の再構築**

シュードノットRNAは非常に重要なモチーフであり、リボザイム、自己スプライシング、テロメラーゼなどの活性中心の形成に直接寄与している。本研究ではNCT6を用いてミスマッチ配列を含むシュードノットRNAの形成を誘起させる事に成功した。$^{19}$F-NMR測定により、ミスマッチ配列を含む領域が化合物との結合に関与していることが強く示された。

**（４）A-Aミスマッチ DNAと結合する新しい分子の開発と $^{19}$F-NMRによる結合の解析**

A-Aミスマッチ DNAと結合する分子、ナフチリジン-アザキノロン（NA）をメチレンリンカーで繋いだ分子ナフチリジン-アザキノロンダイマー(NAD)を合成し、A-AミスマッチDNAと1:1で結合することが確認された。$^{19}$F-NMR測定により、DNAと化合物との結合モードを簡単、正確に確認することができた。

**（５）無細胞翻訳系中でのアンチセンス核酸を用いた遺伝子発現の活性化**

当研究室見出した、無細胞翻訳系で、GFPmRNAの翻訳領域に相互鎖的なアンチセンスオリゴが、翻訳反応を促進させることが今までと違う無細胞翻訳系(PUREExpress)でも、同じく翻訳量の上昇を促す事が確認された。LNA（架橋化核酸）塩基修飾核酸を用いた実験により、GFPmRNAとの結合サイトが非常に重要である事が確認された。

## 論文審査の結果の要旨

申請者は、新規合成有機小分子によりRNAの二次構造制御を目的とした研究に取り組み、以下の３つの成果を上げている。

１）合成小分子によるDNAループ間相互作用の実証

DNAのG-Gミスマッチに強く結合する分子ナフチリジンカルバメートダイマーの二量体であるナフチリジンカルバメートテトラマー(NCTn)を合成し、NCT5がループ領域に $d(CGG)_n$ 配列をもつ二つのヘ

アピン DNA を会合させうることを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）と二重標識 DNA を用いた解析手法により実証した。本研究により、DNA 高次構造の構築へ小分子を用いる新しい手法の有効性が示された。

２）合成小分子による DNA ループ間相互作用の実証

合成小分子 NCT6 が、ヘアピン領域に $r(CGG)_n$ 配列をもつヘアピン RNA とループ-ループ相互作用を介した三者会合体を形成することを見いだした。DNA の場合とは異なり、CGG 配列の繰り返しが２回の場合に、特に明瞭な複合体形成が認められた。更に、NCT6 を介した分子内ヘアピン RNA 間の複合体形成による RNA 二次構造制御を実証した。

３）合成小分子によるシュードノット RNA 構造の構築

NCT6 を用いた配列特異的な結合により、シュードノット RNA 構造を誘起させることに成功した。これにより有機合成小分子が機能性 RNA の構造制御に有効であることを実証した。

上記の成果はいずれも、合成小分子と RNA の結合が RNA の二次構造制御に有効であることを実証する研究であり、高く評価できる。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。