

Title	Exploring new methods in regulating circular RNA production using cellular model
Author(s)	Lu, Ni
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96401
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、 〈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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

Abstract of Thesis

Name (Ni Lu)

Title

Exploring new methods in regulating circular RNA production using cellular model
(細胞モデルを用いた新規環状RNA生合成促進法の探索)

Abstract of Thesis

Circular RNAs (circRNAs) are a class of non-coding RNA, which are covalently closed-loop RNA molecules. They have recently seen an increase in interest, with recent literature uncovering their pivotal roles in regulating various aspects of cell function and disease progression. Developing ligands capable of regulating circRNAs and, eventually, modulating disease progression would be particularly interesting. However, there has yet to be an established theoretical basis on how such a feat could be achieved.

CircRNA's most notable feature is the mechanism of its biogenesis involving back splicing, which requires the upstream branch point adenosine and 3' splice site (ss) close to the 5' ss downstream. This back splicing is achieved by interactions between introns flanking the circularizing exon, such as the presence of a pair of reverse complementary sequences (RCSs), which are suggested to form a stable hairpin structure with an intronic stem and exonic loop region (Fig. 1A). Thus, based on the above mechanism of biogenesis, we explored the feasibility of upregulating circRNA production in cells via facilitating the formation of the precursor hairpin structure using externally introduced ligands. Toward this end, we conducted two case studies utilizing a previously reported pre-mRNA model construct for expression of circZKSCAN1, consisting of exon 2 and 3 of gene ZKSCAN1 flanked by a pair of 36-nt RCSs.

In Chapter 1, I demonstrate the feasibility of utilizing an RNA binding small molecule, naphthyridine carbamate dimer (**NCD**), to promote the production of circRNA in the cellular environment. **NCD** was recently reported to form a 2:1 complex with 5'-UGGAA-3'/5'-UGGAA-3' motif and facilitate the formation of duplex RNAs. When the plasmid construct used for model expression of circZKSCAN1 was modified to express a pre-mRNA containing an **NCD** binding motif within the RCSs flanking the circularizing exons. **NCD** was able to induce circZKSCAN1 production in a concentration dependent manner. While plasmids containing full match RCSs and control compound showed no such upregulation. (Fig. 1B)

In Chapter 2, I demonstrate the feasibility of utilizing a specially designed bridging oligonucleotide (**BON**) to promote the production of circRNA in the cellular environment. **BON** was designed with two disjointed segments targeting sequences flanking the RCS pair. Upon hybridization **BON** physically bridges the flanking introns two distant disjointed sequences flanking the circularizing exon(s), creating new inter-intronic interaction surfaces, and facilitating the formation of the pre-requisite hairpin structure for exon-circularization. **BON** showed the capacity to increase in the production of circZKSCAN1 in a concentration dependent manner, regardless of RCS and exon design of the target model pre-mRNA. No up-regulation was observed for control ONs which were either comprised of fully or partially scrambled sequences. (Fig. 1C)

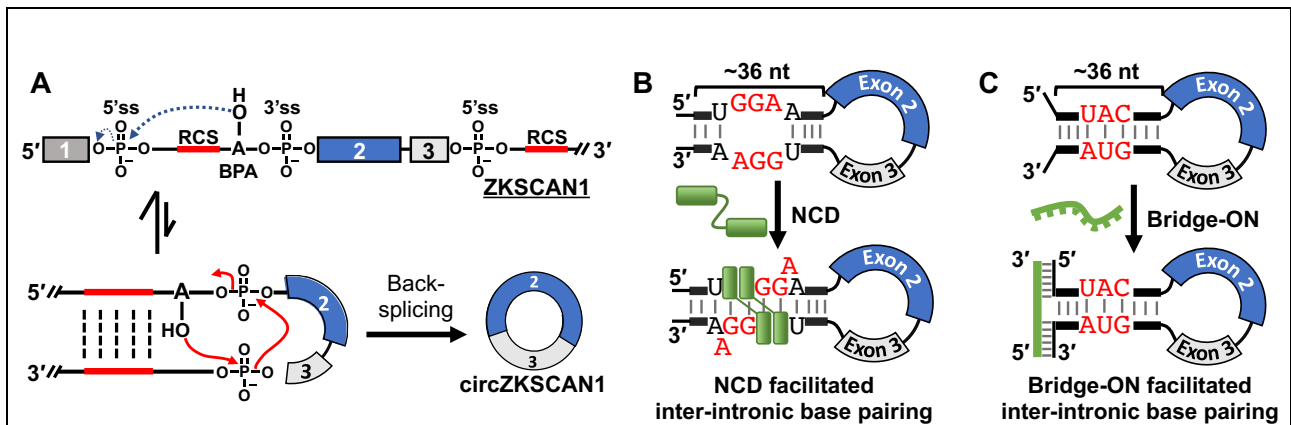


Figure 1. Schematic representation of presented concepts in (A) back-splicing and role of RCSs in production of circZKSCAN1. (B) NCD facilitating inter-intronic interaction in model pre-mRNA to upregulate circRNA. (C) Schematic representation of BON facilitating inter-intronic interaction in model pre-mRNA to upregulate circRNA.

Overall, we explore and demonstrate two distinct methods that were utilized to upregulate circZKSCAN1 production in cellular model by exploiting circRNA's mechanism of biogenesis. Although our current understanding of circRNA regulation remains in its infancy, the methods and modality presented here hopefully sets a steppingstone for future endeavors in this field. The results of above contents will be discussed in detail.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (N I Lu)	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 教授 中谷 和彦
	副 査 教授 高尾 敏文
副 査 特任教授 (常勤) 島本 啓子	

論文審査の結果の要旨

本論文は、近年がんや神経変性疾患など疾患の発症や重症化に関わる新種の RNA である環状 RNA の生合成促進について、核酸標的創薬に使われる主なモダリティである低分子と修飾オリゴ核酸を用いて、人為的に環状 RNA の生成を促進させる新規手法を探索し、細胞レベルで実証し、環状 RNA を対象とする新たな疾患の治療戦略概念を提案している。環状 RNA の研究背景を述べた General Introduction と RNA ミスマッチ結合低分子を用いた環状 RNA 生合成促進の実証を述べた第一章、修飾オリゴ核酸を用いた実証に関する研究が述べられた第二章の三部構成となっている。

環状 RNA は、メッセンジャーRNA 前駆体 (pre-mRNA) 中のエクソンが特殊なスプライシング (バックスプライシング) 機構により生合成される。バックスプライシングは、環状化するエクソンの両端にあるイントロン間で、逆相補鎖配列間の相互作用により、エクソンを含むヘアピン構造の形成により促進される反応機構が示唆されている。

第一章では、所属する研究室で開発されたナフチリジンカルバメート (NCD) が、UGGAA 反復配列中の 5'-GGA-3'/5'-GGA-3' トリヌクレオチドミスマッチを有するヘアピン構造に結合し、不安定なミスマッチを安定化することにより、RNA 二重鎖構造の形成を促進させるという研究に基づいて、この特定のミスマッチ構造に結合する分子 NCD と NCD 結合可能部位を含むモデル pre-mRNA を用いて、pre-mRNA のイントロン間相互作用を配列選択的な低分子の結合安定化による環状 RNA の生合成促進の可能性を検証している。対象とした 5'-GGA-3'/5'-GGA-3' 配列がモデル pre-mRNA のイントロン内にある逆相補鎖配列に存在する場合のみ、NCD の濃度依存的にモデル pre-mRNA 由来の環状 RNA 生合成が促進されることを示し、低分子を用いた環状 RNA 生合成促進手法を実証した。

第二章では、標的 RNA に対して相補的な配列設計が可能で、標的 RNA と非常に安定な二重鎖を形成することが報告されている修飾オリゴ核酸を用いて、pre-mRNA のイントロン内にある逆相補鎖配列の周辺配列をオリゴ核酸により架橋することで環状 RNA の生合成促進の可能性を検証した。新規に設計された「架橋型オリゴ核酸」は、逆相補鎖配列と環状化するエクソンの配列に依存せず、濃度依存的にモデル pre-mRNA 由来の環状 RNA 生合成を促進されることを示し、修飾オリゴ核酸を介した架橋による環状 RNA 生合成促進手法を新たに実証した。

上記二章の内容は細胞内で環状 RNA 生合成促進を誘導する分子設計の布石になるものである。

以上のように、本論文は細胞モデルを用いた新規環状 RNA 生合成促進手法の研究として、理学に寄与するところが大きい。

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。