

# 論文審査の結果の要旨

氏名 宮内 健常

本論文は往復循環クロマトグラフィー法という新規アフィニティー精製手法を考案し、それに基づいた自動分注機ベースの自動精製装置を開発し、実際に大腸菌、酵母、マウスの機能性 RNA の単離精製に成功したものである。

第 1 章では RNA 単離精製手法開発の必要性とこれまでの手法が述べられている。ゲノム解読の結果、高等な生物ほどゲノム中の非コード領域の割合が高く、しかもその領域のほとんどが転写されていることが明らかになりつつある。これらの転写物である ncRNA (非コード RNA) は様々な種類が続々と判明しているが機能、構造 (RNA 修飾、末端構造など) が解析された例は少ない。機能、構造解析を進めるには RNA の単離技術が求められるが、従来の RNA 単離手法は多くの時間、労力、熟練が必要で、実用は困難であった。本論文で開発された手法はより簡便で効率的に多数の RNA の単離が可能であり、実用的な RNA 単離手法となっている。

第 2 章では本手法の概念、理論式、装置開発、理論式の検証が述べられている。往復循環クロマトグラフィー法は、各ターゲットと結合する樹脂を詰めた複数のチップをマルチチャンネルピペッターに装着し、試料溶液中で吸引、吐出、攪拌を繰り返し、試料溶液を全てのチップに循環させることを基本原理としている。十分な循環後、各チップを別々に洗浄、溶出し、各目的物を得る。1つの溶液から複数の目的物を同時に精製でき、試料に無駄が出ない、全てが同一条件化で精製される、スケールが変更可能、自動化が容易などの利点がある。次に、必要なピペッティング回数などの見積のため、簡略化したモデルから往復循環の理論式を導出している。更に、これらの概念に基づく自動精製装置を柏キャンパス周辺企業の協力の下で開発している。自動分注機に 3 種の特製恒温槽、攪拌用ポンプ、水供給ポンプが接続され、パソコン上でプログラムを作成し運転が行われる。次に、試作機を用いて実際に大腸菌 tRNA<sup>Pro2</sup> を精製し、理論式を検証している。ピペッティング毎にサンプリングし、tRNA<sup>Pro2</sup> を定量して理論式へフィッティングを試みたところ、妥当な平衡定数値で比較的良くフィッティングできており、理論式の妥当性、実用性の証明となっている。得られた平衡定数値からの収量、収率の予測も行われ、実験値と理論値が比較的近い値となり、実際に大まかな予測が可能であった。理論式から試料が微量であるほど収率が高いことが予測されていたが、実験値でも同じ傾向が見られ、実際に本手法が微量成分に対し有効であることが示された。

第 3 章では本手法のパフォーマンス検証のため、様々な機能性 RNA の単離精製を試みている。まず、大腸菌の全 tRNA と 4 種の sRNA の自動精製が行われた。48 種類の大腸菌 tRNA のうち 4 組 8 種は配列が似ているため共通のプローブを用い、sRNA を入れた合計 48 種を 8 つずつ 6 組に分けて単離精製が試みられた。洗浄法の改良などにより全て

の目的 RNA の単離精製に成功している。その際、非常に微量な sRNA についても高回収率での精製に成功している。次に、真核生物 ncRNA の複数同時自動精製を試み、出芽酵母 ncRNA 8 種、マウス ncRNA 6 種、マウス miRNA (miR-122a) の単離精製に成功している。

第 4 章では、単離された RNA の質量分析を行い、RNA 種の同定と修飾、末端構造の解析が行われた。修飾が未知な大腸菌 tRNA 5 種については様々な質量分析により修飾を決定している。これにより初めて大腸菌 tRNA の全修飾が明らかとなった。マウス ncRNA の LC/MS 解析では cap 構造、末端への A や U の付加といった末端構造が検出できた。miRNA は 122a について質量分析が行われ、122a は 4 種類の末端バリエーションの混合物であることが判明している。

以上のように本論文では、往復循環クロマトグラフィー法という新規手法の考案から装置開発を行い、実際に様々な ncRNA の単離精製に成功している。また、単離された RNA を解析することでマイクロアレイやクローニングでは分からない様々な情報が得られることが示された。報告が急増している真核生物 ncRNA の解析に非常に有用であり、新たな生命現象の発見へと繋がる研究成果である。

なお、第 2 章における装置開発では加工は協力企業が行ったが、論文提出者が主たる設計、組立を行っている。また、第 3 章の酵母、マウスの RNA 精製は大原智也、折戸智美との共同研究であるが、論文提出者が主体となって精製法の立案、検証が行われた。上記以外の往復循環クロマトグラフィー法に関する理論の考案や実験はすべて論文提出者により行われたものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。