

## 論文の内容の要旨

### SELEX 法を利用した内在性 RNA 探索法の構築及び HEXIM1 に結合する mRNA 上の新規エレメントの同定

(Development of SELEX-based method for screening of intracellular RNAs  
and identification of a HEXIM1-binding element on mRNAs)

氏名 藤本悠希

RNA は、生命現象の根幹を担う物質であるが、近年になって、従来考えられていた以上に、様々な機能を持った RNA が存在することが明らかになってきている。高等生物の巨大なゲノムの多くの部分が転写されていることを考えると、未だ発見されていない機能性 RNA は、決して少なくないと考えられる。しかし、RNA を、その機能と関連付けた形で網羅的に探索する方法は、これまでに実用化されていない。例えば、網羅的転写物解析により、RNA 自体の存在は明らかにできるが、その機能を明らかにするには、配列情報からの類推ができる場合を除き、個別の解析が必要となる。tRNA や miRNA (micro RNA) 等、配列的・構造的特徴を持つものに関しては、ゲノム配列を対象とした情報科学的な探索による同定が可能であるが、こうした特徴がわかっていない、未知の機能性 RNA については、現状では、情報科学的方法は無効であると言って良い。RNA の持つ機能の全体像を明らかにするためには、機能性 RNA を *de novo* に網羅的に探索する方法の確立が必要である。

そこで、本研究では、まず、機能性 RNA の網羅的探索法の構築を試みた。機能性 RNA の網羅的探索とは、どの機能性 RNA が如何なる因子と相互作用を持つか、あるいは、どの機能性 RNA が如何なる現象・経路に関わっているかを網羅的に解明することであると捉えることができる。この問題には、「どの」機能性 RNA 「如何なる」因子/現象・経路という、2 個の変数がある。本研究では、まず、後者の変数を固定し、前者の変数を変化させることで、その解を求める方法を構築することとした。近年、タンパク質に結合することでその機能制御を担うような RNA が発見されていることを踏まえ、特定の

標的分子に強く結合する核酸配列を取得する方法である SELEX 法を利用して、標的タンパク質に結合する内在性 RNA を *in vitro* で同定する方法を構築した。

通常、SELEX 法は、標的分子に強く結合する、人工の配列を持つ核酸、アプタマーを取得するために用いられる。SELEX 法による RNA アプタマーの取得は、以下のようにして行われる。まず、内部に一定長のランダム領域を持つ化学合成オリゴヌクレオチドを鋳型として PCR を行い、DNA プールを作製する。次に、DNA プールを鋳型として *in vitro* 転写反応を行い、標的分子への結合能を指標とした選択を行う。続いて、選択された RNA を鋳型とした逆転写反応、続く PCR により、再び DNA プールを作製する。これらの一連の反応を繰り返すことで、標的分子に対して高い結合力を持つ RNA 配列を選別する。本研究では、人工の核酸配列ではなく、内在性 RNA の配列を取得することが目的であるので、化学合成オリゴヌクレオチドの代わりに、細胞由来の cDNA ライブラリから、初期 DNA プールを作製することとした。既知の機能性 RNA に、低分子のものが多く含まれることから、cDNA ライブラリには、数百塩基以下の RNA 配列を中心とした、完全長ライブラリを使用した。

構築した探索法の実用性を検証するため、モデル実験を実施した。モデル実験の標的タンパク質には、特定の機能性 RNA と結合することが既知である、ヒトの U1A、HEXIM1 タンパク質を用いた。いずれのタンパク質を用いたモデル実験でも、既知の結合 RNA の配列が得られたことから、構築した方法が、標的タンパク質に結合する機能性 RNA の探索に有用であることが示された。

この方法を網羅的探索へと拡張するためには、先に述べた 2 個の変数のうちの後者、「『如何なる』因子（タンパク質）」についても、変化させる必要がある。そのためには、標的タンパク質を網羅的に合成する方法を確立することが、肝要である。そこで、既存の真核生物由来の無細胞翻訳系を用いた標的タンパク質の合成を検討したが、網羅的合成の道筋をつけることはできなかった。無細胞翻訳系は、近年進歩しつつある技術であり、今後、種々のタンパク質を簡便に合成する方法が確立されれば、本研究の探索法を用いて、新規機能性 RNA の網羅的探索を行うことが可能になると期待される。

次に、上記の探索法を応用し、ヒト HEXIM1 に結合する mRNA の探索を行った。HEXIM1 は、RNA 結合性タンパク質であり、転写伸長因子 P-TEFb を負に制御することで RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) による転写反応を阻害する因子である。RNAPII は、転写開始後数十塩基進んだ地点で、一度転写を停止する。P-TEFb は、RNAPII 及び、その阻害因子をリン酸化することで、RNAPII の転写伸長を再開させる役割を担っている。HEXIM1 は、7SK snRNA 依存的に P-TEFb と結合して 7SK snRNP を形成し、P-TEFb のキナーゼ活性を阻害する。本研究では、HEXIM1 が転写の場において機能するタンパク質であることに着目し、転写の場で合成された mRNA の中に、HEXIM1 と結合するものが存在する可能性があると考え、HEXIM1 を標的タンパク質とした探索を行った。上述の探索法では、低分子の RNA 配列の cDNA ライブラリを用いて初期プールを作製したが、本探索では、mRNA を探索対象とするため、ランダムプライマーを用いて作製した cDNA ライブラリを用いた。

探索の結果、*cad* (carbamoyl-phosphate synthase/aspartate carbamoyltransferase/dihydroorotase) mRNA の一部の領域が、HEXIM1 に結合する配列として取得された。抗 HEXIM1 抗体を用いた共免疫沈降により、HeLa 細胞において、*cad* mRNA が HEXIM1 と共沈降することが示された。RNA 上の

HEXIM1 結合モチーフを特定するために、種々の RNA 変異体を作製し、HEXIM1 との結合能をフィルターバインディングアッセイにより測定した。その結果、結合モチーフは、2 塩基のバルジ構造を含むステム構造からなることがわかった。これは、既知の HEXIM1 結合性 RNA である 7SK snRNA には存在しないモチーフであった。

結合モチーフを含む *cad* mRNA 上の領域と HEXIM1 との解離定数を測定したところ、この RNA は、7SK snRNA よりも強く HEXIM1 に結合することが示された。また、HEXIM1 変異体を用いた解析や、結合競合実験により、*cad* mRNA 上の結合モチーフは、7SK snRNA と同様に、HEXIM1 のアルギニンリッチモチーフを介して HEXIM1 と結合することが示唆された。興味深いことに、RNA と HEXIM1 との結合曲線は、現在提唱されている、1 分子の RNA と HEXIM1 二量体とが一對一で結合するという結合様式には合致しなかった。このことから、RNA と HEXIM1 との結合様式は、現在の理解よりも複雑かつ動的である可能性が考えられる。

同定した HEXIM1 結合モチーフは、20 塩基未満で構成されており、塩基配列自体が結合能に大きな影響を与える部位は一部に限られていた。このことから、*cad* mRNA 以外の mRNA 上に、この HEXIM1 結合モチーフが存在する可能性は十分にあると考え、情報科学的解析により、結合モチーフを持つことが予測されるヒトの RNA 配列を探索した。探索結果のうちの一部について、HEXIM1 との結合を検証したところ、*brd4* mRNA 及び *tcf3* mRNA が、HeLa 細胞において HEXIM1 と結合することが示された。

これら 3 遺伝子は、いずれもタンパク質レベルあるいは mRNA レベルで P-TEFb との関わりが報告されている遺伝子であった。このことから、HEXIM1 は、7SK snRNP の形成による転写反応のグローバルな調節とは別に、mRNA と結合することにより、自身と関わりのある因子の発現を個別に調節する可能性が示唆された。これらの遺伝子に対する解析を進めることで、HEXIM1、P-TEFb の持つ、新たな機能が明らかとなることが期待される。