

## 審査の結果の要旨

氏名 カシム ヴィヴィ

RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) は遺伝子発現を特異的に、効率よく制御する有用な技術として注目されている。また、安価で安定的に RNAi を誘導するための方法として中間体である short interfering RNA (siRNA) を発現するベクターが開発されて以来、実験手法として急速に発展し、医療への応用の可能性も注目されている。しかし、RNAi を更に有用な技術として利用するには、改善の余地がある。本論文では、以上の背景をもとに、制御可能な siRNA 発現ベクターの開発と siRNA の有効的なターゲットシーケンスの同定という 2 つの課題の解決を試みるとともに、siRNA 発現ベクターライブラリーを用いた応用例として microRNA (miRNA) パスウェイ関わる因子のスクリーニング系の検討を行い、全 5 章より構成されている。

第一章では、序論として RNAi の歴史、メカニズムを概観し、本研究の背景及び目的を述べている。

第二章では、部位・時間特異的に制御可能な siRNA 発現ベクターの開発に関して述べている。U6 等の RNA polymerase III (pol III) プロモーターは siRNA 発現ベクターに適するとされているが、部位・時間特異性がなく、それを用いた siRNA 発現ベクターでは致死遺伝子の発現抑制が困難である。本論文では、Cre-loxP 組み換えシステムで制御できる U6 プロモーターを用いた Cre-On siRNA 発現ベクター、つまり Cre recombinase 存在下でのみショートヘアピン型の siRNA による RNAi が誘導され、標的遺伝子の発現が抑制される方法を開発した。この方法はホタルルシフェラーゼを標的遺伝子としたモデル系で検証され、TAT ペプチドと核移行シグナル (NLS) との Cre recombinase 融合蛋白の存在下でのみその濃度依存的に RNAi が誘導され、標的遺伝子の発現が抑制された。この手法は RNAi を応用する際非常に有用であり、Cre-loxP 制御型 siRNA 発現ベクターの最初の報告の一つであった。

第三章では、RNAi を siRNA で誘導する際の重要な課題であるターゲットシーケンス選択の方法として、断片化された標的遺伝子を用いてパラレル型の siRNA 発現ベクターライブラリーを構築し、スクリーニングすることによって、抑制効率が良く、かつ非特異性や毒性を持たないターゲットシーケンスを同定する方法について述べている。こうしたライブラリーはターゲットシーケンスと抑制活性、非特異性、毒性との関係を解析するためのソースとしても利用でき、RNAi メカニズムの研究やターゲットシーケンスを予測するためのアルゴリズムの開発にもつながる。

第四章では、miRNA パスウェイが阻害されるとレポーター遺伝子の発現が上がるようなショートヘアピン型 siRNA 発現ベクターライブラリーを用いたスクリーニング系の検討とスクリーニングの結果 (40 クローン) について述べている。miRNA パスウェイとの関連がまだ報告されていなく、詳細に解析する価値があるクローンが複数同定された。

第五章では、第二章から第四章までの研究を総括し、本論文の成果を含めて今後の展望を論じている。

以上のように、本論文では、RNAi の応用に関わる技術について述べており、これらは、遺伝子発現を効率よく、特異的に制御する方法として極めて重要であり、RNAi 技術開発や医療へ更なる応用につながる。

よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。