

論文審査の結果の要旨

氏名 原 口 健

本論文は5章からなる。第1章はイントロダクションであり、RNA 干渉機構についての研究背景が説明されている。特に最近明らかになりつつある microRNA (miRNA) の生物学的重要性、miRNA 解析における miRNA 阻害法の必要性、既存技術の問題点、そして miRNA 阻害ベクターの必要性について述べられており、本論文の目的を示している。

第2章は miRNA 阻害ベクターの開発の手順と開発した miRNA 阻害ベクターの特長について述べられている。まず miRNA の阻害方法として miRNA と相補な配列を持つ Decoy RNA を細胞核内で発現させる方法を選択している。そして Decoy RNA を発現するプロモーターとして、転写開始点および転写終結点を厳密に制御でき、かつ転写活性の高い RNA polymerase III 系のプロモーターであるマウス U6 プロモーターを使用している。この Decoy RNA は、その標的である miRNA が機能する細胞質に輸送される必要があることから、これまでに Exportin-5 による核外輸送が詳細に調べられているステム-ループ構造を持つ small RNA を Decoy RNA の基本構造とし、Decoy RNA の二次構造や miRNA 結合配列 (MBS) の最適化を行い miRNA 阻害活性の高い RNA 構造を絞り込んでいる。こうした miRNA 阻害ベクターの検索の結果、特に高い miRNA 阻害効果を示した Decoy RNA を Tough Decoy RNA; TuD RNA と名付け、その構造・配列の持つ特性について述べている。既存の miRNA 阻害ベクターはどれも Decoy RNA を発現させる手法であるが、Decoy RNA の2次構造の詳細にまで注目して設計されたものはこれまでにはなく、この点において本論文は独創的である。またその斬新な試みが後で述べられるような成果につながっており評価できる。

さらに開発した TuD RNA について独自に開発した assay 系を使用して詳細な解析を行っている。まずは TuD RNA が様々な miRNA にたいして特異的に阻害効果を示し、さらにその効果が長期間持続することを示している。従来よく使用されていた miRNA 阻害法は 2' -OMe や LNA といった合成化合物を用いたものであるため持続性がないという欠点があった。そのためこの TuD RNA のもつ阻害

効果の持続性は miRNA 解析において特に重要である。そして TuD RNA には核外移行能や細胞内での分解への耐性といった性質があることを明確に示しており、TuD RNA が設計時に期待したとおりの性質を持っていることを実証している。そして、これが miRNA 阻害効果を有し、それに伴って強い生物学的活性が発揮されることを示している。これは TuD RNA が生物学的活性を誘導し得るだけの強力な阻害能を持っているということであり、また TuD RNA の使用例を示したという点で高く評価できる。この miRNA 阻害効果については既存の手法との比較も行っている。その結果、TuD RNA が既存の手法と比べはるかに高い miRNA 阻害効果を持っていることを示しており、この点が本研究において最も評価できる点である。最後に TuD RNA が標的 miRNA の属する family の他の member に対して阻害効果を示すかどうかについて検討している。すなわち miRNA には seed 配列が同一であり、共通の標的遺伝子を有すると考えられている miRNA family が存在する。標的認識において重要な配列が同一であるため特異性があるかどうか注目されるが、解析の結果 TuD RNA は miRNA family 間では区別をせずに阻害すると結論している。本論文ではこの性質を相補的に働くと考えられる miRNA family を一括して阻害できるという利点もあると考察している。たしかに個々の miRNA を特異的に阻害できないという点においては欠点であるが、ノックアウト技術にはない性質であることを考慮すると、miRNA 解析方法の幅が広がるという点において意義があると考えられる。以上のように本論文第 2 章は新規で、極めて強力な miRNA 阻害方法を提供するものである。

第 3 章は結論と今後の展望について、本論文において開発した技術の応用面での今後の展開に関して述べられている。本論文の第 2 章において述べられているこの技術の特長を考えると、基礎化学における miRNA の機能解析において大いに役立つと考えられる。また将来的には miRNA を標的とした創薬としても十分に期待できる。

第 4 章は謝辞であり、第 5 章は参考文献について書かれている。

なお、本論文は原口 健・尾崎 由佳・伊庭 英夫との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、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（理学）の学位を授与できると認める。