

# 論文審査の結果の要旨

氏名 前田 雄介

本論文は、RNA 二重鎖への結合能を有する新規カチオン性人工ペプチドの合成及び RNA 二重鎖との相互作用解析について述べたものであり、序論及び三章からなる本論より構成されている。

序論では、RNA 干渉の機構及びこれを医薬へ応用した RNAi 医薬の特徴について概観し、実用化における現状の課題を明確にしている。さらに、これらの課題を克服するために行われている先行研究について概観した上で、本研究の合成標的である RNA 二重鎖特異的に結合する分子の重要性について説明している。RNA 二重鎖結合性分子として種々のカチオン性オリゴペプチドを考案し、分子の特徴や設計指針、及びこれを用いた RNAi 医薬キャリア分子への適用可能性を論じ、本研究の目的、意義、位置づけを述べている。

第一章では、考案した種々のカチオン性オリゴペプチドの設計及び合成について述べている。先行研究から、RNA 二重鎖とカチオン性オリゴペプチドとの相互作用で重要と考えられる官能基間距離、キラリティ、自由度、官能基の種類に着目し、これらの要因に関して検討するためのペプチド分子群を設計している。まず、官能基間距離を制御するために、側鎖長の異なるアミノ酸を用いたペプチドを設計している。また、キラリティの影響を検討するため、L-アミノ酸に加え D-アミノ酸を用いたペプチドを設計している。また、ペプチド主鎖の自由度を制御するため、分子中にグリシン及びプロリン骨格を導入したペプチドを設計している。さらに、官能基の重要性を検討するため、リン酸と水素結合の形成が可能な水酸基、アミド基とグアニジノ基との交互配列を有するペプチドを設計している。Fmoc 固相合成法によりオリゴマーを合成し、脱保護後に液相中でペプチドをグアニジル化することにより、設計した各カチオン性オリゴペプチドの合成を達成している。また、CD スペクトルの測定から、各ペプチドの二次構造がランダムコイルであることを確認したことについて述べている。

第二章では、第一章で合成した各カチオン性オリゴペプチドと、RNA 二重鎖及び DNA 二重鎖との相互作用を比較検討している。モデル核酸二重鎖として、12 量体の RNA と DNA を用い、RNA 二重鎖に対するペプチドの親和性を、RNA-ペプチド複合体の熱力学的安定性により評価している。まず、アミノ基やグアニジノ基を有するペプチドの官能基間距離を制御することで、RNA 二重鎖への親和性が向上することを述べている。一方、これらのペプチドは、DNA 二重鎖の熱力学的安定性の向上を示さないことから、カチオン性オリゴペプチドが、RNA 二重鎖選択的に相互作用していることを示唆している。また、ペプチドのキラリティが RNA との相互作用に影響を及ぼさないことを述べている。次に、ペプチド主鎖の自由度を制御したペプチドを比較することで、グアニジノ基を有するペプチドが RNA 二重鎖と、エンタルピー的に極めて強く相互作用していることを述べている。さらに、水酸基やアミド基とグアニジノ基の交互配列を有するペプチドが

RNA 二重鎖に結合しないことから、RNA 二重鎖との結合において、カチオン性アミノ酸の連続した構造が重要であることを述べている。また、CD スペクトルの測定から、カチオン性オリゴペプチドが、RNA 二重鎖に結合する際に二次構造が誘起されることを示している。等温滴定カロリーメトリーの測定から、カチオン性オリゴペプチドを RNA 二重鎖へ加えると熱量変化が観測されたのに対し、DNA 二重鎖の場合では有効な熱量変化がみられないことから、設計したペプチドが RNA 二重鎖選択的に結合することを示している。また、RNA 二重鎖のメジャーグループに結合することが知られているネオマイシンを用いた結合阻害実験により、ペプチドが RNA 二重鎖のメジャーグループに結合する可能性を示唆している。さらに、蛍光異方性測定から、設計したカチオン性オリゴペプチドと RNA 二重鎖との解離定数を測定し、ペプチドと RNA の親和性を定量的に評価している。さらに、各ペプチドが RNA 結合タンパク質と同等の結合力を有していることを示している。また、先行研究で得られたオリゴジアミノ糖よりも十倍以上強く結合することから、カチオン性オリゴペプチドが RNA 二重鎖との結合に適した構造であることを述べている。さらに、各ペプチドの RNA との結合性と RNA の熱安定性に相関がみられたことから、RNA-ペプチド複合体の熱力学的安定性による結合力の評価法が適切であることを示している。

第三章では、最も強く RNA 二重鎖に結合したペプチドを用い、モデル siRNA21 量体との熱安定性、ヌクレアーゼ耐性、RNAi 活性に及ぼす影響について調べた結果について述べている。前章までで述べた、RNA 二重鎖 12 量体と比較して、siRNA は複数のペプチドが結合する可能性を考慮し、siRNA とペプチドの混合比を制御して、熱安定性に関する検討を行っている。各ペプチドは、モデル RNA 二重鎖と同様に siRNA の熱安定性を効率的に向上させることを述べている。また、カチオン性オリゴペプチドは siRNA と結合することにより RNase A による分解を阻害することから、生体内での siRNA の安定性向上に効果的であることを述べている。さらに、グアニジノ基を有するペプチドが、当量依存的に siRNA の RNA 干渉を阻害するのに対し、アミノ基を有するペプチドは siRNA の RNA 干渉を阻害しないことを見出している。

以上のように、種々のカチオン性オリゴペプチドを設計、合成し、RNA 二重鎖との相互作用の比較から、RNA 二重鎖に効率的に結合し、その熱安定性を向上させるのに重要な分子構造を明らかにした。また、カチオン性オリゴペプチドは、siRNA の熱安定性を向上させることに加え、ヌクレアーゼ耐性を向上させ、かつ RNA 干渉を阻害しないという性質を種々の実験により明らかにした。

これらの成果は、タンパク質化学、核酸化学、医学、薬学などの諸分野に大きく寄与することが期待される。

よって本論文は、博士（生命科学）の学位請求論文として合格と認められる。