

審査の結果の要旨

氏名 春元 俊正

本学位論文では、化学的手法を用いた核酸タンパク質複合体に対する阻害物質取得法を確立し、Argonaute (AGO)タンパク質に対する阻害物質を取得するとともに、得られた化合物の活性評価を通じて、その取得手法の有効性の実証を目指している。

本論文は 5 章より構成されている。第 1 章は本論文の序論であり、核酸タンパク質複合体に対する阻害物質取得の課題に加え、AGO-RNA 間結合における結合に最も重要な相互作用領域を設定し、研究戦略を提示している。第 2 章では、SPR 評価系の構築及び小規模ライブラリからのスクリーニング研究について述べられている。まず、RNA 5' 末端結合領域にフォーカスした SPR 評価系構築の検討がなされている。核酸とタンパク質の相互作用解析において課題となる非特異的結合を低減するため、AGO2 MID ドメインを用い、センサーチップ基盤には 1 ヌクレオチドのみを提示する阻害評価系を設計した。本評価系の妥当性を検証するため、天然ヌクレオチドおよび Adenosine を評価した結果、AMP, UMP>CMP, GMP>>Adenisine という阻害活性の序列を確認し、目的とする SPR 評価系構築を達成した。次に、SPR と NMR の組み合わせにより小規模ライブラリ(1266 化合物)からのスクリーニングを検討した。SPR 評価においては、濃度一点評価、濃度依存性評価を行うことで選抜を行った。二次評価としては NMR 評価を選択し、 ^1H - ^{15}N 相関 heteronuclear single-quantum coherence (HSQC) スペクトルを測定し、各化合物の AGO2 MID ドメインに対する結合の有無、および標的領域に結合しているか否かの評価を行った。その結果、標的部位に結合している化合物として 1 化合物同定されたものの、AMP と比較するとその親和性は劣る結果となった。一連の結果は SPR と NMR の組み合わせによるスクリーニング戦略が有用であることを示している。一方で、ヒット化合物の割合が低く、また、溶解度が低いもしくは非特異結合に由来すると考えられるシグナルを示した化合物が多いという課題の抽出に至り、さらなる評価系の改良の必要性を提示した。第 3 章では、In silico SCR, SPR, NMR による大規模ライブラリスクリーニング研究について述べられている。第 2 章でのスクリーニング戦略に加え、in silico screening を 1st screening としてさ

らに組み込み、大規模ライブラリ(6,817,770 種)からのスクリーニングを行った。In silico screening では、まずカルボン酸、硫酸、リン酸構造の酸性官能基を有する化合物を初期選抜し、リン酸構造に着目した選抜およびファーマコフォアスクリーニングによる選抜の後、ドッキングシミュレーションを通じて 171 種を抽出した。二次および三次スクリーニングでは第 2 章と同様に SPR と NMR を用いた解析を行うことで、ヒット化合物 3 種の同定に至った。取得した化合物はいずれも既報化合物と比較して顕著に強い阻害活性を示すことが確認された。第 2 章では 1266 種から 1 種という低ヒット率であったのに対し、本章の検討においては 171 種の SPR 評価からヒット化合物を 3 種同定されており、in silico screening の有用性が実証された。In silico SCR において酸性官能基を初期選抜したことで溶解性が高い物質が選ばれたことも寄与したとも考えられている。第 4 章では、取得化合物の活性評価について述べられており、ヒット化合物の RNA induced silencing complex (RISC)形成阻害能を評価した。HeLa lysate を用いた AGO2-siRNA 結合系に各低分子を阻害剤として添加し、免疫沈降法により AGO2 を精製後、含まれている siRNA のアンチセンス鎖を stem-loop PCR 法により定量した。その結果、本研究にて取得した 3 化合物はいずれも既報分子と比較して強い RISC 形成阻害活性を示した。この結果は、BCI-137 を超える親和性を有している結果と相関する結果と考えられる。一方、内在性 miRNA に対してはいずれも顕著な阻害活性は確認されなかった。RISC 形成においては mature RISC に対する阻害は pre-RISC と比較して大きなエネルギーが必要であるという生化学的な考察から、mature RISC から miRNA をはがすためにはさらなる親和性の向上が必要であることが考察されている。第 5 章は論文の総括と核酸タンパク質複合体に対する阻害物質の応用展開及び今後の展望を述べている。

以上、本研究において、化学的手法を用いた核酸タンパク質複合体に対する阻害物質取得法を構築し、AGO2 に対する阻害物質を取得を達成し、質の高い label free 評価手法を適切に組み合わせることの有効性を実験的に明らかにしている。さらに、取得化合物の活性解析を通じて AGO2 に対する阻害物質に関する重要な知見も含む研究内容と言える。さらに本研究は、他の核酸タンパク質複合体に対する阻害物質の取得手法としての重要なコンセプトも含んでいる。このように本論文はバイオエンジニアリングの分野において新たな研究指針を与える得るものである。

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。