

審査の結果の要旨

氏名 ブレチン ヴィンセント

長い二本鎖 RNA の存在を引き金として、それが 21 塩基程度に切断された siRNA と呼ばれる小分子 RNA が作られ、それぞれの siRNA と同じ配列を持つ標的 RNA が切断分解される「RNA 干渉」という現象は、もともとはウイルスなどの遺伝的侵略者に対する防御機構として真核生物に備わったものであると考えられている。しかし、siRNA の配列をデザインして化学合成することにより、理論的にはどのような遺伝子であっても簡便に「ノックダウン」することが可能である。実際、2019 年には初の siRNA 医薬品が上市された。siRNA の医薬応用の鍵となるのは、安定性や活性を高めるための化学修飾である。本論文は、ヒト細胞の粗抽出液を用いた試験管内 RNA 干渉系を最大限に活用することによって、新規にデザインされた siRNA の化学修飾「6-mCEPh-purine」の作用メカニズムを生化学的に明らかにしたものである。本論文は全部で 8 章から成るが、略語説明や謝辞などを除き、論文の核となるのは第 2 章から第 5 章までである。第 2 章では RNA 干渉およびそれに関連した RNA サイレンシングの学術背景が、第 3 章では 6-mCEPh-purine の作用メカニズムの解析結果が、第 4 章では総合討論が、第 5 章では材料と方法が、それぞれまとめられている。

第 3 章では、まず 6-mCEPh-purine 修飾をガイド鎖の 5'末端に持つ siRNA の標的切断活性が、未修飾のものよりも有意に高いことを示した上で、その理由を丁寧に検証している。RNA 干渉は、Argonaute ファミリータンパク質と一本鎖 siRNA を核とする RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれるエフェクター複合体を介して起こる。RISC の形成においては、siRNA 二本鎖は、Hsp70/90 シャペロンなどの補助因子を助けを借りながら、まず二本鎖のまま Argonaute タンパク質に取り込まれる(この状態を pre-RISC と呼ぶ)。その後、片方の鎖(パッセンジャー鎖)が選択的に Argonaute から放出され、もう片方の鎖(ガイド鎖)が Argonaute に残ることによって、成熟体 RISC が形成される。RISC は、自身が持つ一本鎖のガイド鎖と相補的な標的 RNA を見つけ出し、Argonaute が持つ RNaseH 様の活性によってそれを切断する。RNA 干渉を忠

実に再現するヒト細胞祖抽出液を用いた生化学的解析から、6-mCEPh-purine は、成熟体 RISC の形成効率を向上させることが示された。さらなる解析から、6-mCEPh-purine は、1) Argonaute が siRNA 二本鎖を取り込む際のガイド鎖・パッセンジャー鎖の選択性を向上させる、2) パッセンジャー鎖が放出された後の成熟体 RISC の安定性を向上させる、という 2 つの独立したメカニズムによって、RNA 干渉活性を向上させていることが明らかにされた。

第 4 章では、第 3 章での実験結果に基づき広範囲な討論がなされている。特に、6-mCEPh-purine 修飾が施されたガイド鎖の 5'末端は、Argonaute が siRNA 二本鎖を取り込む際に最初に認識されると考えられているため、(ガイド・パッセンジャー鎖の選択性という「質的」な向上は観察されるものの) 6-mCEPh-purine が pre-RISC の形成効率に「量的」な影響を与えず、パッセンジャー鎖放出の後に成熟体 RISC の安定性を向上させるという実験結果は、やや予想外なものであった。しかし、「ダブルアンカーポイント仮説」「5'末端認識の構造制約仮説」という 2 つの仮説を立てることにより、実験結果を論理的に説明できるようになった。

このように本論文は、6-mCEPh-purine が RNA 干渉を向上させる分子メカニズムを、これまでに無い精度で詳細に明らかにしたものであり、今後さらに進むと期待される siRNA 医薬デザインの観点からも有用であり、基礎だけでは無く応用面からも意義深い研究である。

なお、本論文は、篠原 史一氏、齋藤 純一博士、Hervé Seitz 博士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 (医科学) の学位を授与できると認める。

以上 1,797 字