

論文審査の結果の要旨

氏名 小林 芳明

本論文は、系統的に 2'-O-methyl (2'-OMe)修飾を導入した small interfering RNA (siRNA)により、siRNA の seed 領域が2つの機能ドメインに分かれることを明らかにし、さらにこの発見と過去の知見を組み合わせ、塩基変異を識別可能な核酸医薬品への応用に向けた siRNA の新たな配列設計法の構築を行った論文である。本論文は 4 章からなる。

第 1 章イントロダクションでは、本研究の背景および目的について述べられている。まず、siRNA による RNA 干渉 (RNA interference, RNAi)とオフターゲット効果について、それぞれの分子機構が説明されている。両機構には、siRNA と Argonaute2 (AGO2) タンパク質の相互作用と、siRNA の seed と呼ばれる領域 (5'末端より 2-8 塩基)が重要で、特にオフターゲット効果の強さを制御していると説明されている。さらに、オフターゲット効果は seed 領域の 2'-OMe 修飾によっても制御されることが説明されている。最後に、siRNA の核酸医薬品応用に向け、従来の siRNA では標的にできない疾患遺伝子の特徴とそれを解決する方策を説明することで、本研究に必要な背景がまとめられている。

第 2 章では、2'-OMe 修飾した siRNA の RNAi およびオフターゲット効果への影響について解析した結果が示されている。論文提出者は、siRNA の seed 領域に導入する 2'-OMe 修飾を 5'末端より 2 塩基目から 1 塩基ずつ連続的にふやし、これらをヒト子宮頸癌由来細胞株 (HeLa 細胞)に導入し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。いずれの siRNA も未修飾 siRNA と比べて RNAi 効果には変化が見られなかったが、オフターゲット効果は、2-5 塩基目の 2'-OMe 修飾で最も減弱することを明らかにした。2-5 塩基目の 2'-OMe 修飾でオフターゲット効果が最も減弱する理由については、論文提出者らの先行研究より、siRNA は AGO2 タンパク質に安定に載ることはできるが、塩基の立体配置が変わることでオフターゲット遺伝子とは安定な塩基対合ができないためであることが示唆されていた。また、6 塩基目以降に 2'-OMe 修飾を追加すると、逆にオフターゲット効果を促進する傾向が見られた。そこで、seed 領域を 2-5 および 6-8 塩基に分けてレポーターアッセイを行うことで、6-8 塩基目の 2'-OMe 修飾は RNAi お

よびオフターゲット効果を促進する傾向があることを見出した。この理由を調べるために、AGO2 と siRNA 複合体の結晶構造を用いた構造シミュレーションを行い、6–8 塩基の中でも 7 塩基目の 2'-OMe 修飾が 8 塩基目の立体配置を塩基対合しやすい向きに調整していると考えられる結果を得た。さらに、レポーターアッセイによっても、7 塩基目の 2'-OMe 修飾が RNAi およびオフターゲット効果を促進していることを明らかにした。

第 3 章では、2'-OMe 修飾の解析から明らかにされた特徴と過去の知見を組み合わせて新たな siRNA の配列設計法の構築に取り組んだ。がん原因遺伝子の 1 つである *kirsten rat sarcoma virus (KRAS)* 遺伝子は 1 塩基変異が起こることによってがん化が誘発されるため、1 塩基変異を区別して抑制する手法をレポーターアッセイにより解析している。変異部位の野生型配列に対し、siRNA ガイド鎖の 11 塩基目および、5 もしくは 6 塩基目を mismatch させることで変異型遺伝子を特異的に抑制できることを見出した。さらに、6–8 に 2'-OMe 修飾を導入することで変異型遺伝子への特異的な抑制効果の程度を強めることを明らかにした。また、その siRNA を *KRAS* 遺伝子に 1 塩基変異をもつ膵臓がん細胞株に導入し、変異型 *KRAS* 遺伝子を特異的に抑制すること、さらには細胞増殖を抑えることを明らかにした。

第 4 章では、総合討論が行われている。本研究は、2'-OMe 修飾を用いた siRNA の解析により、siRNA の seed 領域が 2–5 と 6–8 塩基目という 2 つの機能ドメインに分かれることを初めて明らかにした。さらに、これらの特徴を踏まえ、過去の知見を活用することで新たな siRNA の配列設計法の構築にも成功した。本手法は核酸医薬品を開発する上で極めて重要だと考えられる世界初の手法であり、従来の医薬品で標的にできなかった疾患に対しての治療法となることが期待できる。

なお、本論文の第 2 章は田申氏・福原大輝氏・赤瀬大氏・相田美砂子氏・程久美子氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行なったもので、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。