

氏名	ありよし じゅんぺい 有吉 純平
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第821号
学位授与の日付	平成29年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学位論文題目	Development of the novel oligonucleotides for the functional regulation of RISC by promotional release of microRNA from RISC (RISCのmicroRNAの保持機構に着目した遺伝子制御分子の開発)
審査委員	(主査)准教授 小堀哲生 教授 田嶋邦彦 教授 山口政光

論文内容の要旨

論文は、3章から構成される。

第1章では、miRNAとタンパク質からなるRISCから、miRNAを脱離させることを目指し、ペプチドと核酸を結合したAnti-miR oligonucleotide (AMO)を開発し、活性評価した結果について報告している。タンパク質とmiRNAとの結合に重要な役割を果たすPIWI-boxとmiRNAの5'末端リン酸基の静電的相互作用を競合的に阻害するペプチド(RINDA: RISC-inhibitor disturbing active-site of RISC)を設計し、AMOの3'末端に導入した。その結果、修飾したペプチドコンジュゲート核酸RINDA-asが効率的にmiRNAをRISCからmiRNAを脱離させることを明らかとした。

第2章では、AMOに導入された化学修飾が、miRNAの脱離速度と脱離率に与える影響を評価した。AMOの化学修飾には、2'-OMe型RNAや、Locked Nucleic Acid(LNA)が汎用される。そこで、2'-OMe型RNAとLNAを複数個導入したAMOを設計し、RISCからのmiRNA脱離反応に用いた。その結果、標的miRNAに対する T_m 値が高いAMOは、miRNA脱離速度($T_{1/2}$)が速いことが明らかになった。さらに、miRNA脱離速度($T_{1/2}$)が速いAMOは、RISC活性阻害効果(IC_{50})が高い事も示された。

第3章では、3段階からなるRISCのRNA切断反応において、miRNAの脱離反応が誘導される際の実験的解析を行った結果について報告する。RISCによる標的RNA認識機構は(I) RISCがmiRNAのSeed領域で標的RNAと結合する過程 (II) miRNAの3'末端がPAZからリリースされる過程 (III) 標的RNAがRISCのヌクレアーゼ活性によって切断される過程、から成る。そこで本章ではAMOを数種類設計し、各過程におけるmiRNA解離速度をUnloading Assayによって評価した。その結果、第3過程において最も効率よくmiRNAが脱離することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

MicroRNA(miRNA)は、細胞の分化・増殖・代謝・アポトーシスなどの極めて重要な生命現象を担う Non-codingRNA である。近年、miRNA の発現異常がガンをはじめとした様々な疾患の原因の1つであることが明らかとなった。このため miRNA は核酸医薬の標的分子として高い注目を集めており、欧米のベンチャー企業を中心として miRNA の活性制御分子の開発が盛んに行われている。

本論文では、miRNA が機能を発揮するためには必ず RNA-induced silencing complex (RISC) とよばれるリボヌクレオプロテインを形成することに着目し、RISC からの miRNA 脱離反応に関する速度論的解析と、miRNA 脱離反応を促す新規核酸誘導体の開発について報告されている。Chapter1 では、PIWI-Box の2つの Lys 残基と、miRNA の5'末端リン酸基との静電作用に着目し、静電相互作用を阻害する酸性ペプチド(RINDA:RISC-inhibitor disturbing active-site of RISC)を設計し、miRNA 脱離反応の促進を実現している。リボヌクレオプロテイン選択的分解の誘導を目指す本手法は、RISC にフタをしてリボヌクレオプロテインの活性を制御する従来法とは全く異なる手法である。そのため、学術的におおいに評価できる。Chapter 2 と Chapter 3 では、RISC からの miRNA の解離の作用機序を解析することで、より効果的に miRNA 脱離反応を誘導する機能性核酸の設計指針を提案している。従来は、RISC の活性制御分子として分解酵素により代謝されることのない核酸誘導体を用いられていたが、本研究により RISC の活性制御には、RISC の構造変化を誘起する核酸誘導体を設計の指針として用いる必要が有ることが明らかとなった。以上のように本論文は生体で重要な働きをするリボヌクレオプロテイン複合体の選択的制御に関する重要な概念、手法開発を論じ、また、核酸医薬品の重要標的分子である RISC の機能解明に関わる重要な評価法を提案している。その学術的意義は高く、また今後の RNA 研究の重要な概念、手法として高く評価される。

本論文は審査を経て掲載された以下の2編の学術論文(両論文とも申請者が筆頭著者である)並びに現在投稿準備中の論文に基づいて作成されている。

1. J. Ariyoshi, D. Momokawa, N. Eimori, A. Kobori, A. Murakami, A. Yamayoshi, "Development of Novel Antisense Oligonucleotides for the Functional Regulation of RNA-Induced Silencing Complex (RISC) by Promoting the Release of microRNA from RISC" *Bioconjugate Chemistry*, **26**, 2454-2460 (2015).
2. J. Ariyoshi, Y. Matsuyama, A. Kobori, A. Murakami, A. Yamayoshi, "The relationship between the releasing profiles of microRNA from RNA-induced silencing complex (RISC) and inhibitory effects on RISC functions by anti-microRNA oligonucleotides" *in preparation*.
3. J. Ariyoshi, N. Eimori, A. Kobori, A. Murakami, A. Yamayoshi, "Characterization of the releasing profiles of microRNA from RISC using anti-miRNA oligonucleotides" *Chemistry Letters*, **46**, 143-145 (2017).