

## 論文要旨

発生や代謝などあらゆる生命活動は、遺伝子発現が細胞内のある特定の位置・時間において適切に行われることで、初めて正常な状態を維持することができる。しかし、様々な要因によって遺伝子発現に異常が生じると、ガンなどの重篤な疾患の発症につながる事が明らかとなっている。本論文ではこの様な知見から、遺伝子発現の外部刺激による時空間的制御を可能とする技術を開発することで、疾患治療や遺伝子発現の解析ツールへと展開することを目的とした。外部刺激としては即時性と位置特異性に優れ、生体への応用が可能である「光」に着目した。本研究では、①: **microRNA** を始めとしたタンパク質をコードしない **non-coding RNA (ncRNA)** による遺伝子発現調節機構、②: エピジェネティックな遺伝子発現制御機構において重要な役割を担う、DNA 中の「シトシン塩基に施されるメチル化修飾」に焦点を絞り、これらの現象が引き起こす遺伝子発現調節機構を光照射により制御する手法の開発を目指した。

**Chapter 1** 及び **2** では、**microRNA** の機能阻害を目指したアンチセンス核酸 (**ASO**) の開発に関する研究を行なった。近年、**microRNA** の発現および機能異常が感染症およびガンなどを含む重篤な疾患の発症機構に深く関わっていることなどが明らかとなり、**microRNA** を標的とした新規核酸医薬品の開発が世界中で盛んに行われている。

**Chapter 1** では、光照射によって標的遺伝子と架橋する機能性アンチセンス核酸の開発を行った。光応答性分子として、ソラレン誘導体を採用した。**Firefly luciferase** の mRNA をノックダウンする **microRNA** をターゲットとして、光架橋性 **ASO (Ps-Oligo)** の設計、合成を行なった。**Ps-Oligo** の合成後、**microRNA** 機能阻害効果の評価を **HeLa** 細胞中で行った。**Ps-Oligo** の UV 光照射下における **microRNA** に対する機能阻害効果は、UV 光非照射下での阻害効果と比較して顕著に増大する事が明らかとなった。この結果より、**ASO** と **microRNA** との架橋反応が、**microRNA** 機能阻害効果の向上に大きく寄与することが示された。

**Chapter 2** では、RNA-タンパク質複合体 (**RISC: RNA-induced silencing complex**) と **ASO** との相互作用を直接的に解析する手法の開発を目指した。**microRNA** は細胞中で **Argonaute** を中心としたタンパク質群と **RISC** を形成することにより、遺伝子発現を調節している。これらの知見から、**RISC** と **ASO** との結合親和性が、**ASO** の **microRNA** に対する機能阻害効果に多大な影響を与えると考えられる。しかしながらこれまでに、**ASO** と **RISC** との結合親和性に関する研究はほとんど報告されていない。本研究では、**RISC** と **ASO** との相互作用を直接的に解析する手法の開発を目指した。**HEK293T** 細胞由来の細胞破碎液を用いた *in vitro* **RNAi system** を応用し、**RISC** と **ASO** との結合親和性を評価する系を構築した。この評価系を用いて、DNA や、2'OMe 型 RNA、

LNAなどの人工核酸からなるASOとRISCとの結合親和性を評価した。本法により得られたASOとRISCとの結合親和性( $K_d$ )と、ASOの生細胞中でのmicroRNA機能阻害効果を比較すると、両者の間には有意な相関関係が確認された。これに対し、ASOの生細胞中でのmicroRNA機能阻害効果と、ASOとmicroRNAとの熱力学的安定性( $T_m$ )との間に相関関係は見られなかった。以上の結果から、ASOとRISCとの結合親和性は、ASOの持つmicroRNA機能阻害効果に多大な影響をおよぼす、重要なファクターであることが示された。

Chapter 3では、メチル化シトシン(5-mC)の配列特異的な検出および機能制御を可能とする核酸素子の開発を目指した。ゲノムDNA鎖中のプロモーター領域におけるシトシン塩基のメチル化異常が、ガンなどの疾患の原因となることが報告されている。このような知見より、DNA鎖中の5-mCを配列特異的に検出する手法の開発は、疾患の診断や治療につながると考えられる。しかし、シトシン(C)と5-mCはともにグアニン塩基と水素結合を形成するため、従来のPCR法や核酸プローブ法のような「核酸の塩基対形成能」を基板とした手法では、Cと5-mCの違いを識別することは不可能である。本論文ではCと5-mCのソラレンとの反応性の違いを利用し、DNA鎖中の5-mCを配列特異的に検出する手法およびメチル化DNA特異的な遺伝子発現制御法の開発を目指した。Ps-Oligoと、これに相補的な配列を持つターゲットDNAとの架橋効率をポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析した。その結果、ソラレンの反応ターゲット塩基として5-mCを持つ配列との架橋効率は、ターゲット塩基としてCを持つ配列と比較して約4倍高いことが明らかとなった。以上の結果から、Ps-Oligoを用いる事で5-mCの配列特異的な検出および機能制御が可能であることが示された。