The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	小分子を用いたマイクロRNA成熟過程の制御に関する研究
Author(s)	小田部, 尭広
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54029
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式3

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　小田部　尭広　）	
論文題名	小分子を用いたマイクロRNA成熟過程の制御に関する研究

論文内容の要旨

マイクロRNA(miRNA)は，前駆体であるプレマイクロRNA(pre-miRNA)がRNA分解酵素の一種であるDicerにより切断されて生成する22-25塩基の小分子RNAである。ヒトゲノムには，1000以上のmiRNAがコードされていると考えられており，その働きは主に遺伝子の発現制御である。miRNAは，メッセンジャーRNA中の相補的な配列に結合し，メッセンジャーRNAの分解または翻訳抑制を行う。miRNAは翻訳レベルで遺伝子の発現を制御する分子として，種々の生物学的プロセスに関わっている。また，特定の疾患においては，miRNAの発現量の増減が疾患の発症や進行に関わっているということも，近年の研究において明らかになってきている。このような背景から，miRNAやその前駆体の生成過程に関わる分子機構の解明，またそれらを標的とした治療法の開発が行われている。

本研究では，miRNAの前駆体であるpre-miRNAがDicerによって切断される機構に着目した。著者は，miRNAの成熟過程を小分子で制御することができれば，miRNA生成過程を標的とした分子ツール，創薬のリード化合物になると考えた。そこで，pre-miRNAに特異的に結合する小分子の創成を目指し，新規ナフチリジン誘導体を設計・合成した。さらに，合成した誘導体がmiRNAの成熟過程に与える影響に関して研究を行った。

第一章 BzDANPの設計及び合成

本章では，RNAに結合する小分子の設計及び合成を行った。RNAに結合する分子設計の足掛かりとして，二本鎖DNA中のシトシンバルジを相補的な水素結合と隣接塩基とのスタッキング相互作用により認識する，*N,N*-bis(3-aminopropyl)-2,7-diamino-1,8-naphthyridine (DANP)[1]を基に，新たな分子を設計した。シミュレーションの結果，DANPではDNAとの複合体形成時に比べて，RNAに対しては複合体形成時のスタッキング相互作用が不十分であることが示唆された。そこで，二環性であるDANPを三環性にしたBzDANPを設計し，その合成に成功した。

第二章 BzDANPの化学的特性評価

本章では，BzDANPのUV-visスペクトル，蛍光スペクトルやpKaといった物性を評価した。また，熱融解温度測定と表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いてRNAとの結合を評価した。熱融解温度測定の結果より，BzDANPはDANPと比較してバルジ構造を有するRNAの熱安定性を向上させることが分かった。三環性にすることで，RNAとの親和性が向上することが示された。また，蛍光滴定実験より，BzDANPはシトシンバルジに最も強く結合することが示唆された。これらの結果をふまえ，シトシンバルジを持つpre-miR-29aにBzDANPが結合するか否かをSPRにより分析したところ，結合が観測された。

第三章 BzDANPによるmiR-29a成熟過程の抑制評価

本章では，BzDANPがpre-miRNAに結合してDicerによる切断を阻害するか否かを評価した。標的pre-miRNAは，前章でSPRにより結合を評価したpre-miR-29aとした。Pre-miR-29aは，Dicerによる切断部位近傍にシトシンバルジを有しており，BzDANPが結合することによってDicerによる切断が抑制されることを期待した。In vitroのDicerによる切断反応の結果，BzDANPを添加することでmiR-29aの生成が抑制されることが分かった。

Reference:

1) *Suda, H. et al., Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 4507-4512

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　小田部　尭広　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	中谷　和彦
	副 査　教授	加藤　修雄
	副 査　教授	高尾　敏文

論文審査の結果の要旨

申請者は、小分子を用いたマイクロ RNA 成熟過程の制御に関する研究に取組み、以下の成果を上げている。

1）RNA のバルジ構造に結合する新規小分子 BzDANP の設計及び合成

二本鎖 DNA 中のシトシンバルジに結合する分子 *N,N*-bis(3-aminopropyl)-2,7-diamino-1,8-naphthyridine (DANP)が、対応する RNA 二本鎖中のシトシンバルジ構造に対してほとんど結合しないという事実から、DNA と RNA 二本鎖の３次元構造の違いを考慮に入れて、RNA 二本鎖中でよりスタッキング相互作用を強く受けるようにベンゼン環を新たに導入した三環性の分子 BzDANP を設計、合成した。BzDANP とバルジ構造を有する RNA との相互作用を二本鎖融解温度上昇から評価した結果、BzDANP は全てのバルジ構造に結合すること、中でもシトシンバルジ構造を最も強く安定化することを見出した。

2）BzDANP の RNA 結合評価

マイクロ RNA 前駆体の酵素 Dicer によるマイクロ RNA への成熟過程に対する RNA 結合分子の効果を評価するため、Dicer による切断反応部位近傍にシトシンバルジを持つマイクロ RNA29a 前駆体（pre-miR-29a）を対象に選び、BzDANP の結合を表面プラズモン共鳴法、等温滴定カロリメトリーを用いて評価した結果、BzDANP の pre-miR-29a への結合を確認するとともに、その見かけ上の解離定数が数十 uM 程度で有ることを明らかにした。また、ヘアピン型構造を持つ pre-miR-29a への BzDANP の結合部位について、構造結合相関を詳細に調べた結果、バルジ構造に加えて、インターナルループ、ヘアピンループへも結合する事を明らかにした。

3）BzDANP による miR-29a 成熟過程の抑制評価

BzDANP の pre-miR-29a への結合が及ぼす Dicer 切断反応への影響を、^{32}P で放射標識した pre-miR-29a およびそのループ変異体を用いて、BzDANP の各濃度において生成する成熟 miR-29a および未反応の pre-miR-29a を定量した結果、BzDANP が直接 Dicer を阻害する割合は最大でも５％程度と見積もられること、さらに、BzDANP が pre-miR-29a の切断を 50%阻害する有効濃度がおおよそ 70 uM であることを明らかにした。また、ヘアピンループへの結合は Dicer 反応にほとんど影響を及ぼさないが、インターナルループへの結合はシトシンバルジへの結合と同程度の阻害効果を持つこと等を明らかにした。

上記の成果は、RNA の構造を認識する小分子が合理的に設計可能であることを実証し、さらに、結合したマイクロ RNA 前駆体の酵素反応を阻害できる事を明らかにしており、高く評価できる。よって本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。