

氏名	三好 祐一		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	工学		
学位授与番号	博甲第	6196	号
学位授与の日付	2020年 3月25日		
学位授与の要件	自然科学研究科 生命医用工学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Novel methods for detection of small RNAs and photo-dependent intercellular delivery of biomolecules (低分子 RNA の蛍光検出と生体分子の光依存的細胞内導入のための新手法開発)		
論文審査委員	教授 大槻 高史	教授 徳光 浩	准教授 佐藤 あやの
<b>学位論文内容の要旨</b>			
<p>本研究では、光化学的手段（蛍光、光増感剤）を利用した (i) 低分子核酸の検出法及び (ii) 生体分子の光依存的な細胞内導入法の開発に取り組んだ。</p> <p>(i) In-stem molecular beacon を利用した成熟 tRNA の検出 細胞の機能は、RNA の発現や、局在によって制御されている。そのため、RNA の発現レベルや局在を調べるために様々な RNA の検出方法が開発されている。その代表的な方法の1つに molecular beacon (MB) が挙げられる。近年、哺乳動物細胞が熱などのストレスに曝された際に tRNA が細胞質から核内へ局在変化したり、分解されたりすることが報告されている。しかし、tRNA は mRNA と比較して複雑な構造を形成しているため、tRNA を検出する方法はわずかし報告されていない。そこで私たちは、in-stem molecular beacon (ISMB) を用いて、tRNA の検出を試みた。その結果、tRNA の D arm を含む 5'末端を標的とした ISMB が、tRNA 転写産物だけでなく、修飾されている成熟 eMet もそれぞれ高感度に検出できることを明らかにした。また、ISMB が tRNA を検出するまでに要する時間は、一本鎖 RNA を検出する場合よりも長時間であることが明らかになった。これらの結果は、tRNA を含む高次構造をもつ RNA の新たな検出手法として ISMB が有用であることを示唆している。</p> <p>(ii) 光応答性分子のリンカー配列が PCI 効率に及ぼす影響の解明 細胞膜透過性ペプチド (cell penetrating peptide: CPP) はペプチドやタンパク質の細胞内送達に用いられている。しかし CPP 融合ペプチドやタンパク質は細胞内に取り込まれた後、エンドソーム内にトラップされてしまうことが課題である。この課題を解決する手法の一つに photochemical internalization (PCI) 法がある。PCI 法は光と光増感剤を利用することで、エンドソーム内にトラップされたペプチドやタンパク質を細胞質に脱出させる方法である。私たちは以前の研究で、PCI 法を利用して、光依存的に細胞質内で機能を発揮する光応答性分子を開発した。しかし、これまでに開発した光応答性分子の PCI 効率は十分ではなかった。そこで私たちは、光応答性分子において光増感剤の近傍に存在するアミノ酸配列 (リンカー配列) が PCI 効率に及ぼす影響について調べた。その結果、リンカー配列が疎水性アミノ酸である FF と LL の場合に高い PCI 効率を示すことを明らかにした。さらに、PCI 効率が積み荷や光増感剤よりもリンカー配列の影響を受けることが明らかになった。本研究の成果は、PCI 法や光線力学的療法で用いられる光応答性分子の新たな設計指針を示す。</p>			

## 論文審査結果の要旨

本研究論文では (i) 低分子 RNA の検出, 及び (ii) 生体分子の光依存的な細胞内導入法について報告が行われた。

(i) 高度に構造をとっている低分子 RNA の検出は困難であるが, 本研究では in-stem MB (ISMB) を用いて低分子 RNA (tRNA) の検出法の検討が行われた。その結果, tRNA 上の D arm と呼ばれる部位を含む 5' 末端を標的とした ISMB が, tRNA 転写産物・内在性 tRNA をそれぞれ高感度に検出できることを明らかにした。また, ISMB が tRNA を検出するまでに要する時間は, 複雑な構造をもたない一本鎖 RNA を検出する場合よりも長いことが明らかになった。これらの結果は, 設計した ISMB を用いた tRNA の検出が様々な生物学や医学分野の研究に寄与することを示唆している。

(ii) 細胞膜透過性ペプチド (CPP) はペプチドやタンパク質の細胞内送達に用いられているが, CPP 融合ペプチドやタンパク質は細胞内に取り込まれた後, エンドソーム内にトラップされてしまうことが課題である。この課題を解決する手法の一つに PCI 法がある。PCI 法は光と光増感剤を利用することで, エンドソーム内にトラップされたペプチドやタンパク質を細胞質に脱出させる方法である。これまでに開発された光応答性分子の PCI 効率は十分ではなかったため, 光応答性分子において光増感剤の近傍に存在するアミノ酸リンカー配列が PCI 効率に及ぼす影響について調べた。そして, リンカー配列が疎水性アミノ酸である FF と LL の場合に高い PCI 効率を示すことが明らかになった。本研究の成果は, 光応答性分子の新たな設計指針を示しており, PCI 法や光線力学的療法の発展に寄与すると考えられる。

これらの研究成果は, 生命医用工学にとって有用な知見と方法論を提供するものだと考え, 学位審査委員会は学位論文の内容, 公聴会による発表内容等を総合的に判断し, 本論文は博士 (工学) に値するものと判定した。