

炭酸カルシウム成形体の成形時圧縮強度について、粒子間付着力および液膜付着力を強度発現要因として考察を行った。そして、成形加圧力ごとに炭酸カルシウム成形体の成形時圧縮強度が高強度を示す添加水量の最適範囲が存在することを明らかにした。さらにその最適範囲内にある炭酸カルシウム成形体の成形時圧縮強度は、 $F_c = F_0 \exp(-c_2 K)$ の実験式と高い相関を得ることから、成形体の成形時圧縮強度に関して空隙率依存性が成り立ち、実験式による検討が適当であることを示した。また、炭酸カルシウム成形体の吸水率と炭酸化率との関係には直線関係があることを示した上で、炭酸化に伴う成形体の圧縮強度は、成形時圧縮強度から最大強度までの範囲において、炭酸化率を変数とした実験式 $F_c = F_0 \exp(k_2 R)$ と高い相関を得ることを示した。

最後に第7章で得られた知見は以下ようになる。

- (1) 成形加圧力が大きくなると成形体の炭酸化が活発となる一定領域を示す含水率は小さくなることを明らかにした。また、同じ成形加圧力であっても添加水量が大きくなると、発現する強度が小さくなることが判った。
- (2) 消石灰量が少なくなると成形加圧によって得られる粒子間付着力が小さくなるために成形時圧縮強度は小さくなる結果となった。また炭酸化による強度上昇を期待することができる消石灰量は50%以下であることを示した。
- (3) 炭酸カルシウム成形体内に粒径の大きな寒水砂が存在すると、消石灰粒子との一体性の欠如によって炭酸化による強度発現が妨げられる結果となった。
- (4) 標準条件で成形した炭酸カルシウム成形体の炭酸化に最適な養生温度、養生湿度は20℃、60%(RH)であり、強度も最も大きく発現する結果となった。炭酸化促進養生に関しては、同実材齢において、より大きな強度上昇を得ることができる最適な養生炭酸ガス濃度があることが判明した。

8章では総括として、より良質な性能を有する炭酸カルシウム成形体の製造条件について言及している。以上から、本論文は炭酸カルシウム成形体の基本的な物性や炭酸化機構、圧縮強度の発現挙動について明らかにしており、多くの成果を有するものである。

以上、本論文の成果を総合的に検討し、博士(工学)のレベルにふさわしい論文として評価するものである。

氏名	久保貴紀
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	産第17号
学位授与の日付	平成17年3月22日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
学位論文題目	コンジュゲートオリゴヌクレオチドの新規化学合成法の開発と遺伝子医療としての応用
論文審査委員(主査)	教授 藤井政幸
(副主査)	教授 荒川剛
(副主査)	教授 河済博文

論文内容の要旨

本論文はオリゴヌクレオチドの医薬への応用を目的として、オリゴヌクレオチドにペプチドをはじめとする各種機能性分子をコンジュゲートし、遺伝子導入剤を使わない細胞内へのデリバリー法の確立と細胞内での局在化制御および白血病細胞に発現するテロメラーゼ阻害について研究したものである。

第1章では遺伝子医薬、DNA結合タンパク、コンジュゲート合成法について研究の背景を述べている。本論文の成果の一つであるオリゴDNA、RNA-ペプチドコンジュゲートの新規合成法の開発に当たって、既存の方法を固相合成法、液相合成法に分けて、それぞれを体系的に整理している。その中で、従来法に内在する方法の問題点を明らかにするとともに、コンジュゲート合成法として求められる必要条件、それを解決するための方策について可能性を考察している。

第2章では細胞内でのタンパク輸送に関わるシグナルペプチドについてこれまでの知見を述べている。特に、タンパク質の核内輸送、核外輸送に関与する輸送タンパク群の作用機構について詳細に調査し、それら輸送タンパク質に認識されるシグナル配列についてこれまでの研究報告を網羅して調べ上げている。これら分子生物学的知見に基づいて、先のオリゴヌクレオチドの細胞内デリバリーを達成するための戦略について考察している。

第3章ではオリゴヌクレオチド-ペプチドコンジュゲートの新規固相合成法の開発について述べている。著者は新規合成法として固相フラグメント縮合法なるものを開発することに成功し、任意のアミノ酸組成を持つペプチドとオリゴヌクレオチドとを固相上で簡便かつ効率的にコンジュゲートする手法の開発に成功している。この合成法の開発により、特に、従来の研究では困難とされていたアルギニンを多く含む塩基性ペプチドをコンジュゲートさせることが出来ることにより、アルギニンを多く含む核局在化シグナルペプチドのコンジュゲートが合成可能となり、オリゴヌクレオチドの核内への局在化制御に大きな進展をもたらす成果となった。また、ウイルス由来の膜融合ペプチド、核外輸送シグナルペプチドとのコンジュゲート体合成が可能になり、オリゴヌクレオチドの細胞膜透過性、細胞質局在化において大きな進展をもたらす原動力となっている。さらには、糖鎖分子も保護基を必要とせずにコンジュゲート出来る点も従来法にはない大きな利点で、糖鎖分子の持つ機能の多様性を考えると今後の進展にも大きな可能性をもたらしたと言える。

第4章では本研究で開発した固相フラグメント縮合法により合成した各種オリゴヌクレオチドコンジュゲートの化学的、生化学的特性について研究している。その結果、オリゴヌクレオチドコンジュゲートは相補的RNA鎖、相補的2本鎖DNAと配列特異的に強く結合することを明らかにしている。また、オリゴヌクレオチドコンジュゲートは細胞内分解酵素類に強い耐性を持つことも、DNase 1 やヒト血清を用いた評価により明らかにしている。これらの特性は、オリゴヌクレオチドを

細胞内で機能させ、標的遺伝子の発現を強く、しかも持続的に抑制する上で大変重要な特性である。

第5章では固相フラグメント縮合法により合成した各種オリゴヌクレオチドコンジュゲートを蛍光ラベルし、ヒト白血病細胞とともに培養することでその細胞への取り込みと細胞内での局在化を評価している。その結果、各種コンジュゲートは遺伝子導入剤を用いることなく細胞内に効率良く導入でき、核局在化シグナルペプチドとコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドは核内に、核外輸送シグナルペプチドや膜融合ペプチドとコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドは細胞質内に局在化することを明らかにしている。毒性の懸念される遺伝子導入剤を使わずにオリゴヌクレオチドを細胞内に導入できる技術が開発されたことは細胞系での遺伝子発現制御だけでなく、生体系においても応用できる可能性を強く示唆しており、今後の進展に大きな期待が持たれる。また、オリゴヌクレオチドを用いて標的遺伝子の発現を制御する際に、mRNAを標的にする場合にはオリゴヌクレオチドは細胞質に、DNAを標的にする場合には核内に局在化することがその効率に大きな影響を与えることは明らかで、オリゴヌクレオチドコンジュゲートにより細胞内での局在化制御が可能となったことは、次に述べられる遺伝子発現制御に大きな効果をもたらす要因となっている。

第6章ではRNA切断活性を持つDNA酵素に各種ペプチドをコンジュゲートし、その触媒活性と細胞内へのデリバリー制御に関して研究している。その結果、コンジュゲートDNA酵素は元のDNA酵素に比べて約3倍触媒活性が向上することや細胞内に効率良く取り込まれることなどを明らかにし、細胞系に応用できるDNA酵素の開発に成功している。従来のRNA酵素やDNA酵素は細胞内への導入が難しく、遺伝子導入剤を用いて導入しても細胞内での寿命が短いためにほとんど効果を発揮できなかった。そのため、細胞内にRNA酵素を発現する遺伝子をウイルスベクターにより組み込んで細胞内での発現によりRNA酵素を発生させると言う方法が取られていたが、本研究の成果により、化学合成した小さなRNA酵素、DNA酵素をペプチドとコンジュゲートさせることにより細胞内で効果を発揮させることが出来る可能性が広がった。

第7章ではオリゴヌクレオチドコンジュゲートを用いてリンパ性白血病細胞に発現するテロメラーゼを阻害することを研究している。その結果、テロメラーゼに含まれるRNAテンプレートに相補的なホスホロチオエートオリゴヌクレオチドとSV40T抗原由来の核局在化シグナルペプチドとのコンジュゲートはテロメラーゼの活性を99.5%以上の効率で抑制することを明らかにしている。本研究成果はオリゴヌクレオチドの細胞内での局在化コントロールにより遺伝子発現制御の効率が著しく向上することを実証しただけでなく、従来法の壁を打ち破り、生体系、医薬への応用の

論文審査結果の要旨

可能性を強く示唆するものである。

第8章ではオリゴヌクレオチドコンジュゲートを用いて骨髄性白血病細胞の異常染色体フィラデルフィア染色体上の bcr/abl 遺伝子の発現を mRNA レベルで阻害することを研究している。その結果、オリゴヌクレオチドと HIV-1Rev タンパク由来核外輸送シグナルペプチドとのコンジュゲートは同遺伝子の発現を約 55%抑制することを明らかにしている。この研究成果も前章同様、オリゴヌクレオチドの細胞内での所在と遺伝子発現抑制効果との相関を明確に示しているとともに、本手法が広く遺伝子発現制御に応用できることを示唆している。本手法が広く DNA, RNA の細胞内デリバリーに応用できることが実証されれば、ノックダウンマウスの作成や遺伝子医薬の開発に大きな道を開く事となる。

第9章では上記研究内容の実験操作の詳細を記述している。

本研究の内容は16編の主論文と15編の参考論文に発表されている。

本論文はオリゴヌクレオチドの医薬への応用を目的として、オリゴヌクレオチドにペプチドをはじめとする各種機能性分子をコンジュゲートし、遺伝子導入剤を使わない細胞内へのデリバリー法の確立と細胞内での局在化制御および白血病細胞に発現するテロメラーゼ阻害について研究したものである。

特に、本研究で開発した固相フラグメント縮合法は従来法では達成できなかった任意のアミノ酸を含むペプチドをオリゴ DNA, RNA にコンジュゲートすることを可能にする優れた手法で、様々な機能性核酸を合成するための優れた手法として評価されるものである。また、糖分子などのペプチド以外の機能性生体分子、標識化合物なども簡便にコンジュゲートさせることが出来、今後様々な機能性核酸の創製を可能にする成果として評価できる。さらに特筆すべきは、本手法は1分子のオリゴヌクレオチドの任意の位置に任意の機能性化合物を複数コンジュゲート出来る点で従来法に比べて大きな優位点を有している。その卓抜した研究成果に対して平成 12 年 XIV International Round Table, Nucleosides, Nucleotides and their Biological Applications (平成 12 年 9 月 10-14 日, San Francisco)においてポスター賞が授与されている。

著者はさらに新規に化学合成したオリゴヌクレオチド・ペプチドコンジュゲートを用いて高効率遺伝子発現制御法の確立にも成功している。特記すべきその成果の一つはコンジュゲートを用いることにより遺伝子導入剤を用いることなくオリゴ DNA, RNA を細胞内に効率良く導入することに成功した点である。従来は細胞毒性の強い陽イオン性界面活性剤を遺伝子導入剤として用いる必要があり、そのことが生体系への応用を妨げていた。本研究成果により細胞への遺伝子導入に止まらず、マウスや人体への応用が強く期待される。そして第2にはオリゴヌクレオチドに核局在化シグナルペプチド又は核外輸送シグナルペプチドをコンジュゲートすることで核内、又は細胞質内にそれぞれ選択的に局在化制御できる技術を開発した点である。この細胞内での局在化制御は後述の遺伝子発現制御効率の向上に非常に大きな影響があり、オリゴヌクレオチドを用いる遺伝子発現制御法における画期的な成果と言える。また、ペプチドとコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドは細胞内でヌクレアーゼに耐性で、細胞毒性はほとんどなく、RNase Hを活性化することも証明している。これら、薬理的な特性の向上はオリゴヌクレオチドの医薬化に向けて大変重要な知見と言える。さらには、これらの技術を用いてリンパ性白血病細胞に発現するテロメラーゼ、および、骨髄性白血病細胞のフィラデルフィア染色体上に発現する bcr/abl 遺伝子 mRNA の発現を従来法に比べて著しく高い効率で抑制することに成功している。ヒト細胞において、細胞内での局在化制御、それによる遺伝子発現抑制効率の向上を実証したことで、本手法の重要性が益々高まったと言える。これらの成果は平成 13 年

日本化学会第 79 春季年会（神戸，平成 13 年 3 月 28 日～3 月 31 日）および，第 41 回化学関連支部合同九州大会（北九州，平成 16 年 7 月 17 日）においてポスター発表賞を受賞している。

以上，本論文は有機化学的手法により，独自のオリゴヌクレオチドコンジュゲート合成法を確立し，その手法により合成した様々なオリゴヌクレオチドコンジュゲートを応用して，分子生物学的知見を元にヒト細胞における特定の標的遺伝子の発現制御を達成している点で，研究分野の壁を越えた卓抜した学際領域研究であると評価できる。実際の研究は綿密な実験計画の下に正確な実験とデータを集積した優れた研究成果であり，遺伝子医薬実用化に向けての大きなブレークスルーをもたらす可能性のある研究として，工学博士の学位論文として値するものと評価できる。

氏 名	古 屋 武 志
学位の種類	博 士 (工学)
学位記番号	産 第 18 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	独立成分分析に基づく耐高残響雑音除去法に関する研究
論文審査委員 (主 査)	教 授 五 反 田 博
(副主査)	教 授 久 良 修 郭
(副主査)	教 授 中 野 吉 正