

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名 加藤 輝

標的分子に特異的に結合する一本鎖 RNA および DNA はアプタマーと呼ばれる。本研究は、これまでアプタマーの標的分子として検討されていないステロイドの一種であるコール酸に結合する DNA アプタマーの調製に関するものであり、7章により構成されている。

第1章は緒論であり、本研究の行われた背景について述べ、本研究の目的と意義を明らかにしている。

第2章では、コール酸に結合する DNA アプタマーの一次構造を明らかにしている。2つのコール酸固定化カラムを用いてアフィニティー分離を13回繰り返し、アプタマーの19個のクローンの塩基配列を決定している。各クローンの塩基配列を比較したところ、共通の保存配列はみられなかったと述べている。これらの結果から、コール酸に結合する共通の高次構造が、それぞれ異なる配列により形成されている可能性があるかと述べている。

第3章では、DNA アプタマーの19個のクローンに含まれる共通の2次構造を解析している。はじめにクローン1、2について、結合に必須の部分配列を決定している。この部分配列の2次構造予測から、部分配列が分子内で three-way junction を形成していることを示唆している。他の17個のクローンについても2次構造予測を行い、そのうち4個のクローンが three-way junction を形成しうる配列を持つことを見いだし、実際にその配列がコール酸と結合することを示している。つぎに残りの13個のクローンについて、独自のコンピュータプログラムを作成し、これを用いて、three-way junction を形成しうる配列を検索している。その結果、13個のクローンすべてに three-way junction を形成しうる配列を見いだししている。また、これらの three-way junction 構造に対応する各クローンの部分配列が実際にコール酸に結合することを示している。これらの結果から、特定の高次構造、すなわち three-way junction がアプタマーとコール酸の結合に必須であると述べている。

第4章では、アプタマーの分子内での three-way junction の形成を確認し、さらにアプタマーのコール酸結合部位を探索している。Mung bean nuclease による酵素切断解析と四酸化オスミウムによる化学修飾の結果から、アプタマーの部分配列による three-way junction の形成が示唆されたと述べている。さらにクローン

2、9、および16に対する変異体解析の結果も three-way junction の形成を支持していると述べている。部分配列の変異体解析および四酸化オスミウムによる化学修飾により、コール酸が three-way junction の分岐点付近に結合することが示唆されたと述べている。また、アダプターがコール酸以外の胆汁酸やその他の飽和ステロイドと結合することを示している。

第5章では、コール酸と three-way junction の結合様式を推定している。はじめに、3本の1本鎖DNAにより形成される three-way junction が、分子内で形成される three-way junction と同様にコール酸と結合することを示している。つぎに、CPK モデルにより分岐点上の3つの塩基対により形成される環状のコール酸結合部位の構造を推定している。分岐点上での塩基対置換における親和性の維持、および分岐点上のチミンのコール酸結合時の四酸化オスミウムに対する反応性の低下が同推定構造を支持すると述べている。また、three-way junction がコール酸以外の様々な飽和ステロイドと結合することも同推定構造を支持すると述べている。環状の同推定構造は、シクロファンなどの環状ホストの構造と類似しており、空孔の形状に適した構造をもつ様々なステロイドと結合する点も類似していると述べている。

第6章では、three-way junction とコール酸との相互作用を利用した2つの新規アッセイ法を構築している。はじめに、DNA アダプターを検出用分子認識素子とした簡便なステロイドのアッセイ法の構築を試みている。アッセイ結果から、酵素を直接連結したDNAアダプターを用いたELISA型アッセイ法の有用性が示されている。また、標的DNAとプローブ間での three-way junction の形成を指標とする1塩基変異の検出を行っている。本検出法により、通常のハイブリダイゼーションアッセイよりはるかに明確に標的DNAの1塩基変異が識別されたと述べている。

第7章は総括であり、本研究を要約して得られた研究成果をまとめている。

以上、本論文は、コール酸などのステロイドと結合するDNAアダプターの取得にはじめて成功し、その2次構造やコール酸との結合部位を化学修飾法や変異体解析により明らかにしている。さらに、three-way junction を利用した2つの新規アッセイ法を構築している。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。