

論文審査の結果の要旨

氏名 平尾（木本）路子

本論文では、核酸が遺伝情報分子としての機能に加えて多様な高次構造を形成することでいろいろな機能を発揮することができるという特性に着目し、タンパク質間相互作用を制御する核酸分子および非天然型塩基をもつ核酸分子の創製について II 部形式で論じている。

第 I 部では、細胞情報伝達における Ras と Raf-1 キナーゼの相互作用を選択的に制御する新規 RNA 分子の創製をめざし、Raf-1 の Ras 結合ドメイン(RBD) に結合するアプタマーの *in vitro* セレクションについて述べられている。60 残基のランダム配列を含むプールから得られたアプタマーは、Raf-1 RBD・Ras 相互作用を阻害し、ターゲット分子として Raf-1 RBD を用いた手法が妥当であることが示されている。そして、この結果を元にセレクション法を一部改良し、新たにデザインした 45 残基のランダム配列を含むプールからさらに阻害能の高い 2 種類のアプタマー(9A と 9B)を単離し、このアプタマーが無細胞系で Ras による Raf-1 活性化を阻害することを明らかにしている。

阻害能が高かった 9A は、Raf-1 のアイソフォームである B-Raf の RBD と Ras の相互作用は阻害せず、Raf-1・Ras 相互作用に対する阻害が特異的であることが示されている。また、RNase による限定分解等の二次構造解析結果から、9A はシュードノット構造を形成することが示唆されている。化学修飾を用いたフットプリント法からは、9A 中の特定のループ部分が Raf-1 RBD との結合表面に位置することが示唆されている。

第 II 部では、天然の核酸には 2 種類の特異的な塩基対 (A · T/U, G · C) だけしか存在せず核酸分子の化学的・物理的多様性に限界があることに言及し、核酸分子のさらなる機能拡張を念頭に、新規人工塩基対の評価及びその塩基対を利用した酵素反応の取り込みによる非天然型塩基をもつ核酸分子の創製について論じている。

A · T, G · C 塩基対の大きな特徴はその塩基対間の水素結合様式にあるが、水素結合が関与しない疎水性塩基対を Klenow フラグメントが取り込むという最近の報告をうけ、種々の水素結合様式をもつ非天然型塩基対の DNA 中への取り込み効率を調べ、複製反応における塩基対間の水素結合の重要性の再評価を行っている。その結果、塩基間水素結合が DNA の複製反応における塩基対形成に関与していること、そして水素結合と同様に塩基間のシェイプフィッティングも複製反応において重要な因子であることを明らかにしている。この結果をもとにデザインされた人工塩基対 s · y については、複製反応における塩基対の選択性を調べるために DNA 中への取り込み実験を行い、鋳型中の s に対して y は相補的に取り込まれ、その取り込み効率はどの天然型塩基よりも高いことが示されている。

RNA 合成では、s を含む DNA を鋳型として T7 転写反応を行うことにより、第 I 部で得られたアプタマー 9A 中にヨウ素原子を置換基として導入した y の誘導体(5Iy)を位置選択的に導入できることが示されている。そして、5Iy を位置選択的に含む 9A と N 末端に GST を融合させた RBD の存在下で光照射による架橋反応を行うことにより、RBD への結合能を保持したまま 9A の二量体が形成されることが示されている。この結果は、5Iy の導入によりアプタマーに

光架橋反応性を付与できることを示しているだけでなく、5ly を分子間相互作用の解析等に応用できることを示唆している。

以上の研究において、第 I 部の *in vitro* セレクションによるアプタマーの単離、各アプタマーの調製、アプタマーの Ras ・ RBD 相互作用に対する阻害実験と無細胞系での Ras による Raf-1 活性化に対する阻害実験、アプタマーの二次構造解析とフットプリンティング解析、第 II 部の非天然型塩基の DNA 中への取り込み反応の速度論的解析、DNA シークエンシングや伸長反応による定性的な解析、人工塩基対 s ・ y を利用した y 誘導体(5ly)の T7 転写反応による位置選択的な導入、それらの転写産物の塩基組成分析と光架橋反応は全て論文提出者が主体となって行ったものである。

なお、本論文第 I 部は、東京大学の横山茂之教授、坂本健作助手、理化学研究所の白水美香子博士、科学技術振興事業団(JST)の平尾一郎博士、東京工業大学の上代淑人教授、小出寛博士、水谷伸博士との共同研究であり、本論文第 II 部は、横山茂之教授、平尾一郎博士、JST の石川正英博士、藤原健志博士、三井雅雄博士、理化学研究所の大槻高史博士、東京医科歯科大学の杉山弘教授との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、審査委員会は本論文提出者に博士（理学）の学位を授与できると認める。