

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 葛谷 明紀

本論文は RNA を配列選択的に切断する手段として、「RNA 切断活性を有する触媒分子を基質と相補的な DNA に共有結合的に固定化し、RNA の切断を目的とする部位の近傍に局在化させる」という従来の方法とは全く異なった手法を提案した。具体的には、インターカレーター的一种であるアクリジンを導入した修飾 DNA が、金属イオンによる加水分解反応に対する RNA の反応性を、狙った位置で大幅に上昇させるという新発見に基づいている。これにより、ランタニドイオンを始めとする様々な遊離の金属イオンを後から系中に加えるだけで、アクリジンによって配列選択的に活性化された RNA を効率的、かつ選択的に切断することができる。

序論である第 1 章は、リボザイムなどの天然に存在する RNA 切断系を応用した配列選択的 RNA 切断法、これまでに報告されている人工的な RNA 切断分子の開発の歴史、RNA 切断分子の局在化を利用した従来の配列選択的 RNA 切断法の実例、基質 RNA の配列選択的活性化を利用した新しい RNA 切断法の内容などを簡潔にまとめ、本研究の背景と目的について述べている。

末端にアクリジンを導入した修飾 DNA と二本目の未修飾の DNA を組み合わせて使用することで、アクリジンによる RNA 活性化の有効性を検証した第 2 章では、効率的に RNA を活性化するために必要な条件として、以下の三つの点を明らかにしている。(1)基質 RNA とアクリジン修飾 DNA によってできる複合体において、狙った位置の RNA は塩基対を形成してはならない(すなわち、RNA/DNA 複合体中にギャップ構造を形成する)。(2)アクリジンは DNA と共有結合的に結合し、ギャップに配置しなければならない(遊離のアクリジンでは効果がない)。(3)ギャップに配置するアクリジンは一分子である必要がある。さらに本章では、可視紫外光吸収スペクトルなどの分光学的測定から配置されたアクリジンがギャップ内に選択的にインターカレートしていることを確認し、これが RNA 活性化の主要因であるとしている。

第 3 章では、新たにアクリジンを鎖内に導入した修飾 DNA を合成することにより、RNA の配列選択的活性化能、およびその結果である配列選択的 RNA 切断活性を向上させることに成功している。さらにこのアクリジンを鎖内に導入した DNA を使用して、RNA-DNA キメラの配列選択的切断、切断の配列依存性など、基質の構造、性質に視点を置いて、アクリジンによる RNA 活性化の機構を理解するための非常に興味深い試みを行っている。

同様に第 4 章では、RNA 切断を担う金属イオンに視点を移し、様々な金属イオンによる選択的 RNA 切断を検討している。その中で、重希土類と軽希土類、亜鉛イオンとマグネシウムイオンなど、同じアクリジンによって活性化された RNA でも、金属イオンごとに

優先的に切断する位置が異なることを見出している。

続く第 5 章では、RNA の活性化を担うアクリジンの構造に着目し、異なる置換基をもった様々なアクリジン修飾 DNA を合成した結果を報告している。そして、RNA 活性化能が最も高いアクリジンは、DNA とアクリジンを結合するリンカーがアミノ基であり、さらに環外にクロロ基とメトキシ基を持つものであると結論づけている。

第 6 章では、アクリジンによって活性化された RNA の切断活性をさらに高める方法として、切断分子を DNA に結合して目的部位への局在化を図る従来の RNA 切断法との融合を検討している。ランタニドイオンを固定化する効果的な配位子であるイミノニ酢酸を導入した修飾 DNA とアクリジン修飾 DNA を組み合わせて使用することで、アクリジン修飾 DNA を単独で使用した場合の約 4 倍の反応加速を実現し、既に報告されている同種の研究の中でも最も迅速な配列選択的 RNA 切断に成功している。

第 7 章は研究の総括として、研究の全体を通じて得られた知見を総合した考察が述べられている。アクリジンによる基質の活性化を利用した新規な RNA 切断法の要点、応用例などの今後の展望、アクリジンによる RNA 活性化の推定機構などについて明確に記述されており、アクリジンのインターカレートに伴う RNA の構造変化が活性化の原因であるという結論を提起している。

以上の様に、DNA に導入したアクリジンによる配列選択的な RNA 活性化という全く新しい現象を報告し、これを利用して非常に効率的に RNA を切断することに成功した本論文は、審査会で高い評価を得た。アクリジンのインターカレーションに伴う構造変化を利用して RNA を配列選択的、かつ効率的に活性化することができるという知見は、全く独創的なものであり、RNA の立体化学とその反応性を関連づける新たな研究分野を創出したといえる。また本論文で提示された RNA 切断法は、試薬類の調製、反応の操作なども従来の手法と比較して非常に簡便であり、ポストゲノムシーケンシング時代において最も注目される一塩基多型解析への応用が容易に可能である。RNA 活性化機構のより詳細な解析、RNA 活性化能、および切断活性の今後のさらなる向上が実現できれば、遺伝子治療や分子生物学における重要な技術として広範な応用研究が期待される。本論文の化学、生化学、医学などの諸分野に対する波及効果は十分に大きい。

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。