

審査の結果の要旨

氏名 水越利巳

本学位論文は、ヒトの色素性乾皮症と関連が深いヌクレオチド除去修復 (NER) 機構の解明など、DNA 修復分野の研究に必須な基質である(6-4) photoproduct を含む DNA の合成と構造に関する研究結果を述べたものである。(6-4) photoproduct は紫外線によりゲノム上のジピリミジン配列、主に TT 配列 (T(6-4)T) と TC 配列 (T(6-4)C)、に生じる事が知られている。(6-4) photoproduct を含む DNA ((6-4) DNA) は変異原性が高く、生成頻度も高いため、DNA 修復機構解明や突然変異解析を目的とした生化学実験に多く用いられている。従って、(6-4) DNA の効率的な調製法が確立されれば、NER 機構等の機能解析に大きく貢献できると期待される。また、(6-4) DNA の構造情報は DNA 修復機構の第一ステップである、損傷 DNA 認識機構を解明するための有用な情報となると考えられる。

本論文は(6-4) DNA の合成に関する研究 (第一章、第二章) と構造に関する研究 (第三章) から構成されている。第一章では、主要な二つの(6-4) photoproduct のうち、まだ固相合成による効率的な調製法が確立されていなかった、T(6-4)C オリゴヌクレオチドの調製法を検討している。第二章では、前章までの方法をより価値の高いものにするため、長鎖の(6-4)オリゴヌクレオチドを調製する際に不可避であった副生成物を抑えるための改良法を検討している。第三章では、損傷 DNA 修復機構を解明する上で重要である、(6-4) photoproduct を含む DNA の全体構造を、蛍光共鳴エネルギー移動法で検証している。

第一章ではまず、チミジリル(3'-5')2'-デオキシシチジン誘導体への紫外線照射条件を検討して T(6-4)C photoproduct 構造へ変換し、ゲノム中で形成される T(6-4)C photoproduct と同じ立体配置をもつ鍵中間体を得ている。続く数行程で適当な保護基で修飾し、DNA 合成機で用いる事のできる T(6-4)C photoproduct building block への誘導に成功している。次に、DNA 合成機を用いて T(6-4)C photoproduct building block を挿入した T(6-4)C オリゴヌクレオチドの合成を行い、DNA 合成機のプログラムも検討してその調製法を確立した。最後に、調製した T(6-4)C オリゴヌクレオチドの生化学への応用例として、(6-4) photolyase が光回復反応の後に、T(6-4)C オリゴヌクレオチドを損傷の無いオリゴヌクレオチドに修復する事を初めてヌクレオシドレベルで証明した。以上の検討の結果、既に固相合成法による調製法が確立している T(6-4)T オリゴヌクレオチドと共に、DNA 修復研究に重要な T(6-4)C オリゴヌクレオチドも効率的に調製できる様になった。

第二章では先ず、第一章までに確立した方法で長鎖の T(6-4)T 及び T(6-4)C オリゴヌクレオチドを合成する際に生じる副生成物の生成機構を考察し、副反応を回避するために近年報告された新しい固相合成の活性化剤、benzimidazolium triflate を用いた方法を検討している。その結果、長鎖の 49-mer T(6-4)T オリゴヌクレオチドが以前の方法より純度良く調製できた事を示した。次に、上記の改良法で調製できるようになった、長鎖の(6-4)オリゴヌクレオチドの生化学実験での有効性を検証している。Hela 細胞抽出液中の T(6-4)T photoproduct に結合するタンパク質を、T(6-4)T DNA 30-mer と T(6-4)T DNA 49-mer で検出したところ、T(6-4)T DNA 30-mer では核抽出物からしか検出できなかった DDB タンパク質 (NER の損傷 DNA 認識因子) が、T(6-4)T DNA 49-mer では細胞質成分からも検出する事ができ、また T(6-4)T DNA 30-mer では全く検出できなかった、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase と推測されるタンパク質が T(6-4)T DNA 49-mer では検出できた。以上の検討から、本章で改良した長鎖の(6-4)オリゴヌクレオチドを効率良く調整法が、生化学実験に大きく貢献できる事を示した。

第三章では、NER の最初のステップである損傷 DNA 認識を理解するために、生化学実験で最も多く利用されている T(6-4)T DNA の全体構造を FRET 法で解析した。これまで T(6-4)T DNA の全体構造に関して、結果の矛盾する二つの報告がある。一方は NMR の解析結果で 44°の大きな折れ曲がりが見られており、DNA 修復因子による認識に関与すると考えられて来た。一方 unrestrained molecular dynamics を用いた報告では同じ配列の T(6-4)T DNA で大きな折れ曲がりはないとしていた。本章の FRET 解析で、T(6-4)T DNA には損傷部位周辺に DNA 二本鎖の巻き戻しや伸長が存在するが、全体構造としては折れ曲がっていない事を示し、後者の報告を支持する結果を得ている。またこの結果と、DDB タンパク質が複合体中で T(6-4)T DNA を約 55°折り曲げるといふ、以前に得た知見も併せて考察し、DDB タンパク質が認識するのは損傷による大きな構造変化ではなく、(6-4) photoproduct の形成によって生じた、局所的な構造変化を見知して結合し、結果として 55°DNA を折り曲げるといふ新しい機構を提唱した。

以上、ヒトの色素性乾皮症などの原因解明に重要で、近年盛んに行われている NER 等の DNA 修復機構解明に有用な基質である、(6-4) DNA の効率的な調製法の確立に貢献し、また DNA 修復因子の損傷 DNA 認識機構を考える上で重要な、(6-4) DNA の構造情報を提供した。このように遺伝性疾患の XP の原因解明研究など、DNA 修復分野の研究に大きく貢献する技術や情報を提供するものであり、本研究は博士 (薬学) の学位を授与に値すると判断した。