

審査の結果の要旨

氏名 山本 陽治

遺伝情報を司る DNA を位置選択的に切断する技術は現在のバイオテクノロジーにおいて非常に重要な技術の 1 つであり、今後その重要性はますます大きくなるものと思われる。現在 DNA を位置選択的に切断するために主に用いられているツールは天然に存在する制限酵素である。天然の制限酵素が認識する配列は一般的に 4~8 塩基対前後と短く、高等生物の巨大な DNA を天然の制限酵素で切断した場合、非常に小さな断片が無数に生成してしまうという問題点がある。また、認識配列が長い制限酵素であれば巨大な DNA を 1 ヶ所で切断することも可能であるが、その認識配列が切断したい位置の配列と一致するとは限らない。つまり、天然に存在する制限酵素では高等生物の遺伝子操作は不可能と言っても良い。そのため、生命工学を高等生物の DNA を対象としたより高度な段階へ飛躍させるために i) 高い加水分解能と基質認識能をもち、ii) 認識配列を自由に設計できる人工制限酵素の開発が強く望まれていた。

本論文は、人工制限酵素の活性中心として Ce(IV)/EDTA 錯体を用い、一本鎖 DNA および二本鎖 DNA をターゲットとした位置選択的切断法の構築について論じている。一本鎖 DNA をターゲットとした場合には、切断したい部位をギャップ構造とし、オリゴアミンとアクリジンをコンジュゲートした化合物と Ce(IV)/EDTA 錯体とを併用することで高い活性でギャップ部位を選択的に切断することに成功している。また、二本鎖 DNA に対し配列特異的にインベージョンする性質をもつ pseudo-complementary PNA (pcPNA) を用いることで二本鎖 DNA の位置選択的加水分解を達成しており、さらに pcPNA に適当な配位子修飾を施すことで高い活性で二本鎖 DNA を位置選択的に切断する系の構築を実現している。

論文の構成は以下の通りである。

第 1 章は序論であり、研究の背景と目的について述べている。

第 2 章では、Ce(IV)/EDTA 錯体による DNA 加水分解反応を加速するオリゴアミンとスタッキング相互作用により DNA に強く結合するアクリジンをコンジュゲートした化合物が、Ce(IV)/EDTA 錯体による DNA のギャップ部位選択的切断のギャップ部位での切断活性を最大で 6 倍向上させることを見出している。この切断系に必要なコンジュゲートの濃度は μM オーダーの基質 DNA に対しわずか数十 μM であり、この事実はコンジュゲートが DNA のギャップ部位へ強く結合することを示唆している。

第 3 章では、コンジュゲートの DNA への結合様式について論じている。種々の二次構造を有する DNA とコンジュゲートの複合体形成を分光学的手法により解析し、コンジュゲートがギャップ部位へ非常に強く結合することを証明している。コンジュゲートのギャップ部位への結合の強さは二本鎖 DNA に対する結合強度に匹敵するほどであり、

ここで得られたコンジュゲートの DNA への結合に関する様々な知見は今後ギャップ部位選択的 DNA バインダーなど種々の DNA バインダーの分子設計に役立つと述べている。

第4章では、PNA のインベージョンを利用した二本鎖 DNA の位置選択的切断を目指した基礎研究として、PNA で形成したギャップ部位の Ce(IV)/EDTA 錯体による切断について検討している。その結果、PNA を相補鎖とした場合のギャップ部位の切断活性は DNA を相補鎖とした場合に比べ数倍高いことを見出している。これは、PNA が電気的に中性であることと、PNA で形成したギャップ部位の塩基のスタッキングが弱いことに起因すると結論づけている。

第5章では、二本鎖 DNA に対し配列特異的にインベージョンすることが知られている pcPNA を利用し、二本鎖 DNA 中に擬似的なギャップ構造をとらせることで Ce(IV)/EDTA 錯体による二本鎖 DNA の位置選択的な切断に成功している。

第6章では、配位子修飾を施した PNA と DNA で形成したギャップ部位が、高い活性で Ce(IV)/EDTA 錯体により切断されることを見出している。この切断系には複数の配位子を導入することが有効であり、複数の配位子が協同的に Ce(IV)触媒に配位することで効率よく EDTA と配位子交換が起き、触媒がギャップ部位へ濃縮されていることが示唆される。

第7章では、fluorescein と配位子とをコンジュゲートさせた新規蛍光プローブを開発し、複数の配位子を導入することで効率よく触媒が固定化されることを吸収・蛍光スペクトルにより明らかにしている。さらに、Ce(IV)の会合体形成と配位子交換を考慮に入れた新たなモデルを考えることにより、切断実験の結果とプローブを用いた滴定の結果を包括的に説明できることを示している。この fluorescein の蛍光を利用する手法は、今後より固定化能の高い配位子部を設計する上で威力を発揮すると述べている。

第8章では、配位子修飾を施した pcPNA を二本鎖 DNA に対しインベージョンさせ、Ce(IV)/EDTA 錯体を作用させることで高い活性で位置選択的な二本鎖 DNA の切断が実現することを示している。この系は、PNA 部の配列を設計することでほぼ全ての配列をターゲットとすることが可能であり、非常に汎用性の高い手法であると述べている。

第9章では本研究の総括と展望を述べている。

以上、本論文は、認識配列を自由に設計できる人工制限酵素の開発を目標とし、一本鎖 DNA および二本鎖 DNA を位置選択的に切断する手法を構築したものである。今後、これらの手法を長鎖 DNA へ適用するなどさらに発展させることで、遺伝子組み換え技術や遺伝子治療などへの応用が期待される。

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。