

審査の結果の要旨

氏名 北村佳仁

ゲノムを研究していく上で最も基本的で不可欠な技術は遺伝子の切断と結合であり、それらを駆使した遺伝子操作技術により我々が得る情報は極めて重要なものである。現在、そのような切断ツールとして天然に存在する制限酵素が用いられているが、この酵素は高等生物のような巨大な DNA を扱う上で致命的とも言える欠点をもつ。制限酵素が認識する塩基配列は非常に短く、巨大な DNA を切断すると無数の切断断片が生じる。さらに認識配列の種類も限定されたものであり、現在の技術では遺伝子を任意の位置で選択的に切断することは不可能である。このような理由から、認識配列を自由に設計することのできる人工制限酵素の開発が熱望されている。本論文では、Ce(IV)/EDTA を利用して DNA を位置選択的に切断する技術の構築することに成功し、さらにその切断法が遺伝子の組み換え操作へ応用できることも明らかにしている。論文は全 8 章で構成されている。

第 1 章は序論であり、DNA を切断する人工制限酵素の構築の重要性及び DNA を切断する触媒分子について切断機構により分類して整理し、それぞれの問題点を述べている。そして、触媒分子として Ce(IV)/EDTA を利用した DNA 切断技術の構築についての研究目的、意義等を述べている。

第 2 章では、Ce(IV)/EDTA による DNA 切断における基質選択性について考察している。ここでは、Ce(IV)/EDTA が一本鎖 DNA を非常に効率よく切断する一方で、二本鎖 DNA をほとんど切断しないことを見出している。また、基質 DNA に部分的に二本鎖を形成させると一本鎖部分が優先的に切断されること、基質 DNA が G カルテット構造を形成した場合には一本鎖 DNA と比較して Ce(IV)/EDTA による切断活性が低下することなどを明らかにしている。

第 3 章では、Ce(IV)/EDTA が二本鎖 DNA と比較して一本鎖 DNA を極めて効率よく切断することを利用して、ギャップ構造やバルジ構造を利用して DNA を標的部位で選択的に切断することに成功している。また、ギャップおよびバルジ切断は相補鎖 DNA の塩基配列を変化させるだけで標的部位を容易に設定できることを明らかにし、標的部位であるギャップ部位やバルジ部位の長さや配列を変化させた場合の切断活性や選択性についても述べている。

第 4 章では、「Ce(IV)/EDTA がなぜ DNA 切断において基質選択性を示すのか」という問題について、Ce(IV)/EDTA の粒径に着目して考察している。DLS による粒径測定から Ce(IV)/EDTA は数 nm のクラスターを形成していること、その粒径が切断活性や選択性に大きく影響すること等を明らかにしている。

第5章では、第4章で考察した点について基質 DNA の種類に着目して考察を行っている。ここでは様々な基質 DNA の Ce(IV)/EDTA による切断の速度論的解析を行い、DNA が堅い高次構造を形成することが Ce(IV)/EDTA と DNA との相互作用を弱くし、切断活性を著しく低下させる原因となっていることを明らかにしている。

第6章では、ここまで示してきたギャップ選択的切断の活性が十分に高くないことから、その活性化に関する検討を行っている。その結果、ギャップ部位の末端にリン酸を配置することにより切断活性を著しく上昇させることに成功している。ここでは、ギャップ部位の片側に一つだけリン酸を配置しても活性は大きく上昇し、ギャップ部位の両端にリン酸を二つ配置すると切断活性はさらに上昇することが示されている。また、リン酸を配置することにより選択性が低下することがないことが明らかにされている。

第7章では、Ce(IV)/EDTA を利用した切断技術により得た DNA 断片を、鋳型 DNA を利用して望みの外来 DNA と設計通りに結合できることを明らかにしている。さらに、遺伝子情報を含むような巨大な DNA を対象として切断反応と結合反応を行い、遺伝子を設計通りに組み換えることができることを示している。さらに、この手法により得られた組み換え DNA からは正常なタンパク質を発現することができ、組み換え操作中に塩基の欠失といった予期せぬ副反応が起きていないことも明らかにされている。

第8章では、Ce(IV)/EDTA を利用した DNA の位置選択的切断及びそれを利用した遺伝子組み換えについて得られた知見を総括し、今後の展望を述べている。

以上のように本研究は、今後のバイオテクノロジーの発展に大きな影響を与えると思われる切断ツールの構築を行ったものである。得られた技術はどのような塩基配列をもつ DNA でも標的部位を選択的に切断でき、相補鎖 DNA の塩基配列を変化させるのみで容易に標的部位を変化させられるという大きな利点をもつ。このことから、今後、バイオテクノロジーや遺伝子工学だけでなく医学、農学といった広い分野の発展に大きく寄与すると考えられる。

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。