

審査の結果の要旨

氏 名 任 斌知

SNP (Single Nucleotide Polymorphism ; 1 塩基多型) は遺伝子産物の質や量に直接影響を与え、また、疾患への罹りやすさや薬剤による重篤な副作用とも密接に関連している。その迅速かつ簡便な分析手法は重要である。現在、様々な SNP 検出方法が報告されているが、いずれも色々な欠点がある。本論文はこれらの問題を解決するために、ペプチド (PNA) をプローブとして、2つの酵素 (エキソヌクレアーゼ とヌクレアーゼ S 1) 反応より、二本鎖 DNA 中の SNPs の直接検出の新たなシステムを開発したものである。本論文は全 8 章で構成されている。

第 1 章は緒論で、SNP 研究の重要性及びこれまでの検出方法について概説し、四つの要素 (、必要なサンプルの構造 ; 、サンプルの処理量 ; 、感度/特異性及び精度 ; 、コスト) に基づいて、SNPs 検出手法の問題点や研究の方向性などを整理している。そして、二本鎖 DNA サンプルから SNPs の直接検出を対象とした本論文の研究目的、意義、そして、具体的な検討内容を述べている。

第 2 章では、二本鎖 DNA 中である SNPs を直接検出するエキソヌクレアーゼ /ヌクレアーゼ S 1 / P N A システムに関して述べている。人血から分離したゲノム DNA を PCR で増幅後、得られた二本鎖 DNA を allele 特異的な PNA プローブ (1つの SNP サイトに対して 1本) で保護し、エキソヌクレアーゼ 、ヌクレアーゼ S 1 酵素反応で処理し、生成した DNA 小断を MS で分析した。この手法は対応する SNP サイトにどんな塩基があるかを迅速かつ明確に判定できるという特徴を有する。本研究では、エキソヌクレアーゼ とヌクレアーゼ S 1 両方で処理することが必須である。また、本手法では、対応する SNP サイトに、ターゲット配列と one-base mismatch を含む PNA プローブを用いても、allele 特異的な DNA 小断片が十分に得られ、MS で明確的に分析できる。即ち、一本の PNA プローブを用いて、対応する SNP サイトが一つの反応で解析できる。或いは、それぞれの SNP サイトに対応する PNA プローブを一本ずつ用いて、同時に多数の SNP を検出することもできる。将来、この系が Microarray へ展開できるなどの特徴を明らかにしている。

第 3 章では、得た DNA 小断片の特徴を理解するために、四つの要素に関して、実験を行っている。その結果、DNA / PNA 二重鎖の末端部分での保護が不十分であること、さらに、DNA / PNA 二重鎖の 5'-末端が 3'-末端よりも、酵素によって分解されやすいことなどを明らかにしている。

第4章では、PNAの末端にアクリジンを結合したところ、DNA保護能が著しく増大することを見出している。この修飾PNAの存在下にヌクレアーゼS1処理を行うと、修飾PNAと相補的な部分が酵素から完全に保護され、予想通りのDNA断片が効率的に得られた。PNAプローブのC-末端へのアクリジンの導入は特に有効である。つまり、C-末端にアクリジンを修飾したPNAプローブを用いて、ヌクレアーゼS1を反応させると、対応するSNPサイトから一種類のDNA小断片しか得られず、DNA断片のMS分析が非常に簡素化されることを明らかにしている。

第5章では、実際の応用例を述べている。C-末端にアクリジンを修飾したPNAプローブを用いて、2つの酵素（エキソヌクレアーゼとヌクレアーゼS1）を併用し、高度選択的に得られたDNA断片を質量分析することによって、二本鎖DNAサンプルから複数のSNPサイトをone-pot反応で正確かつ簡便に検出できることを明らかにしている。

第6章では、構造と機能が類似のヌクレアーゼP1の結晶構造に基づいて、ヌクレアーゼS1の触媒メカニズムを提案し、この酵素は活性中心近くのbinding pocketに、水素結合やstacking相互作用により、DNA基質の5'側の塩基を認識し、3'側のP-O3' bondを分解する特徴を述べている。それに基づいて、DNA/PNA二重鎖のヌクレアーゼS1切断メカニズムを検討し、PNAプローブのN端側（DNAの3'端側）に比べて、C端側はPNAにより保護されにくいことを明らかにしている。

第7章では、蛍光スペクトルの研究により、C-末端にアクリジンを修飾したPNAプローブの効率的な保護特性を検討している。このアクリジンがDNA/PNA二重鎖5'—末端の塩基対の間にインターカレートすることにより、末端のbreathingが抑えられ同時に、アクリジンが競争的に酵素の結合を阻害するために、C-末端にアクリジン修飾したPNAを用いると、得た断片の選択性が高まり、MS分析が容易になることを明らかにしている。

第8章では、エキソヌクレアーゼ/PNAシステムを持つ二本鎖DNA中のSNPの検出に関し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、本研究は化学的手法と生化学反応とを融合することによりSNPを効率的に検出する手法を開発し、関連科学の発展に大いに寄与する。

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。