

審査の結果の要旨

氏名 叶盛

ポストゲノム時代に入り一つ一つの遺伝子の役割が明らかになるにつれて、簡便かつ正確な核酸分析ツールの開発が注目されている。本論文では、化学的手法と生化学的手法とをハイブリッド化することにより、簡便かつ効率的な核酸分析法を開発した。すなわち、ペプチド核酸（PNA）プローブの存在下で核酸分解酵素がミスマッチ・ターゲットを選択的に切断することを見出し、種々の検出方法（染色、蛍光スペクトル、質量分析）を駆使して一塩基変異（SNP）を解析した。本論文は全7章で構成されている。

第一章は緒論であり、核酸分析の重要性と解析方法についてまとめ、本研究の背景、目的、ならびに意義を述べている。

第二章では、PNA プローブを用いた天然酵素の機能制御について述べている。PNAは天然酵素に対して耐性であり、しかもDNAと安定な二重鎖を形成する。そこで、DNA・PNA二重鎖を一本鎖特異的な核酸分解酵素で処理すると、プローブPNAと完全に相補的なDNAは分解されずに未反応のまま残るが、ミスマッチを含むDNAは完全に分解されることを見出した。つまり、核酸分解酵素が、DNA・PNA二重鎖の中のミスマッチを正確に認識し、ミスマッチがある場合のみにDNAを分解する。このように、PNAプローブの存在下では、核酸分解酵素はターゲットDNA中の一塩基の違いを正確に識別することを発見した。

第三章では、第二章の知見を発展させ、PNAプローブと酵素を併用し、さらにここに色素DiSC₂(5)を加えることにより肉眼によるSNP検出を実現した。DiSC₂(5)はDNA・PNA二重鎖に結合すると、青から紫に変色する。そこで、DNA・PNA二重鎖に核酸分解酵素を作用させた後に色素を加えると、フルマッチの場合には、酵素分解後にも溶液内にPNA・DNA二重鎖が残存するために、色素はこれと結合して青から紫に変色する（最大吸収波長は646 nmから534 nmにシフトする）。一方、DNAとPNAとの間にミスマッチが存在する場合には、DNAはほぼ完全にモノマーまで分解され、そのために色素は青色状態にとどまる。このように、DNAサンプル中の一塩基変異（SNP）の有無を、極めて簡便に視覚的に検出できる。

第四章では、SNP検出感度をさらに高めるために、第二章、第三章の知見を用いてPNA分子ビーコンを構築した。両末端に蛍光色素と消光色素を結合したPNA（分子ビーコン）をDNAと混合し、一本鎖特異的な核酸分解酵素で処理した。すると、分子ビーコンとDNAが完全に相補的な場合には強い蛍光が観察されるが、両者の間に一つでもミスマッチがあると蛍光は完全に消光される。ここで、分子ビーコンとDNAとの複合体をあらかじめ酵素で処理することがSNP検出には必須であり、この処理をしないと、フルマッチとミスマッ

チとの間に蛍光強度の差はほとんど認められない。分子ビーコンを導入した結果、第三章の方法と比べて検出感度は 1000 倍も向上し、nM オーダーの DNA の SNP 検出が可能となった。

第五章では、酵素反応後の DNA 断片を質量分析し遺伝子型を判定した。酵素反応条件を適切に設定することにより、1 種類だけの PNA プローブを用いて、SNP の遺伝子型を正確に決めることができる。

第六章では、ヌクレアーゼ S1 が PNA プローブ存在下でミスマッチ・ターゲットを選択的に切断するメカニズムを提案している。

第七章は本論文の総括であり、結論と意義を述べるとともに今後の展望について言及している。

以上のように、本論文では、天然酵素と PNA をハイブリッド化することにより核酸の微細な変異を正確に分析するツールを開発した。ここで開発した手法は、様々な場所、特に臨床現場での SNP 検出に有用であり、関連科学の発展に大いに寄与することが期待される。

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。