

## 審査の結果の要旨

氏名 劉 明 哲

生体機能の人工制御は、今後医療や遺伝子工学分野だけでなく、分子材料や素子などの分野においてもますます重要な役割を果たすものと思われる。

本論文は、酵素反応の可逆的光制御を目的とし、従来とは異なる「アゾベンゼン導入 DNA を用いた酵素反応の光制御」という新しい方法を用いて、ファージ RNA polymerase による転写反応の可逆的光制御について論じている。アゾベンゼン導入 DNA を用いて、ファージ RNAP 反応の可逆的光制御に成功している。2 分子のアゾベンゼンを導入した T7 Promoter を用いることで、転写反応のほぼ完全な ON/OFF 制御を実現している。IASys バイオセンサーを用いて、T7 RNAP とアゾベンゼン導入 T7 promoter の相互作用を直接観測することに成功している。

論文の構成は以下のとおりである。

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、T7 RNAP 反応の光制御のためのモデル転写反応系を構築し、天然の T7 promoter を用いた場合に、UV 照射が酵素反応系に影響を与えないことを確認した。また、本研究で用いるアゾベンゼン残基の cis $\leftrightarrow$ trans 異性化について詳細に調べ、DNA 二重鎖中においても可逆的異性化が可能であること、ならびに熱異性化反応が十分に遅いことを確認した。

第 3 章では、1 分子のアゾベンゼンを T7 promoter 中で異なる機能を果たす酵素認識部位と TATA 部位に導入し、光制御効果を系統的に調べた。その結果、酵素認識部位と TATA 部位のいずれの部位においても光制御効果が認められた。暗条件下と比べて、UV 照射により転写反応が加速される現象を見出した。このような光制御効果は、Promoter 中の種々のサイトで見られ、UV 照射による加速効果は 1.2 ~ 3.0 倍程度であった。

第 4 章では、反応速度論的解析と構造解析に基づいて、1 分子アゾベンゼン導入系における光制御の機構解明を行った。Michaelis-Menten 型の酵素反応速度式に基づいて、酵素認識部位に導入したアゾベンゼンによる光制御は  $K_m$  の制御であり、TATA 部位に導入したアゾベンゼンは  $k_{cat}$  を光制御していることを明らかにした。光制御反応系中において、cis-Promoter がオン反応で、また trans-Promoter のオフ反応よりも 4 倍ほど反応速度が大きいことを明らかにした。更に、本研究で用いた 16 種類の 1 分子アゾベンゼン導入 Promoter のすべてに対して網羅的解析を行い、Promoter の光制御効果の差異は、アゾベンゼン導入位置の違いによるものであることを明らかにした。一方、二次元 NMR 構造解析から、アゾベンゼン周辺の DNA 局所構造について考察した。

第 5 章では、第 4 章で得られた光制御効果の機構に基づいて、アゾベンゼンを 2 分子導入した様々な光応答性 Promoter DNA を合成し、転写反応の光制御効果の更なる向上を目指した。2 分子のアゾベンゼンをそれぞれ T7 promoter の酵素認識部位と TATA 部位に 1 分子ずつ導入することで、UV 照射による加速効果を 7.6 倍まで引き上げることに成功した。このようなクリアカットな光制御は可視光と UV 光を交互に照射することで可逆的にスイッチングできることを確認した。更に、UV 照射の強度を上げることで、UV 照射による加速効果をさらに高め（約 10 倍）、転写反応のほぼ完全な ON/OFF 制御を実現した。

第 6 章では、バイオセンサーを用いて、「アゾベンゼンの光異性化による RNAP の結合と解離の光制御」をリアルタイムで観測した。アゾベンゼンを T7 promoter の酵素認識部位に 1 分子導入した DNA を用いて、UV または可視光照射後におけるアゾベンゼン導入 T7 promoter への RNAP の結合過程をリアルタイムで観測し、異なる光照射条件下における速度パラメーターを測定した。これらを比較検討した結果、DNA の局所構造の変化を光制御することで、「アゾベンゼンの光異性化による RNAP の結合と解離の光制御」が可能であることが分かった。

第 7 章では、T7 RNAP と異なる SP6 RNAP による転写反応の光制御を試みた結果、SP6 RNAP 反応も効率よく光制御可能であることを確認し、「DNA の局所構造変化の可逆的光制御」に基づいた本研究の戦略の汎用性を実証した。更に、T7 RNAP 反応の光制御と比較することで、SP6 RNAP 反応機構に関する情報も得た。

第 8 章では本研究の総括と展望について述べている。

第 9 章では本研究の結論について述べている。

以上、本論文では、酵素反応の可逆的光制御を目的とし、アゾベンゼン導入 DNA を用いて、ファージ (T7, SP6) RNAP による転写反応の可逆的光制御に成功した。今後、転写反応の光制御に関する本論文の研究成果を活用することで、タンパク質生産の光制御や細胞機能の光制御、ひいては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。