

審査の結果の要旨

氏名 金 完起

本論文は、正電荷を持つ物質の結合によって誘起される DNA 凝縮を熱分析の対象とし、カチオン性物質の DNA への結合力や DNA 凝縮の程度などに関する熱力学変数に基づく評価が、遺伝子治療における非ウイルス性遺伝子ベクターの設計・開発指針を与えることを示している。以下、章ごとにその内容を解説し、本論文の審査結果を述べる。

第1章では、序論として DNA 凝縮に関する先行研究を研究手法や凝縮剤の種類、DNA 凝縮機構などの主題別にまとめ、DNA 凝縮と凝縮構造の研究の重要性が述べられている。ここでは、DNA 凝縮が一種の相転移現象であるため、熱測定が重要な研究手法であるにも関わらず、凝縮 DNA 同士の二次凝集や沈殿形成の効果を単一 DNA 分子レベルで生じる DNA 凝縮と区別して検証する実験的方法論が未確立であったため、凝縮転移の詳細は未解明であったこと、熱分析による特性解析も十分な検討がなされていなかったことが指摘されている。また、遺伝子キャリアとして開発されたブロック共重合体を凝縮剤として用いることにより、二次凝集の生じない実験系が得られ、DNA 凝縮機構の解明や遺伝子キャリアと DNA との結合様式の研究が可能になることとともに、本論文の主題である熱分析による DNA 凝縮機構解明の意義が述べられている。

第2章では、本研究の主たる実験的方法論として位置づけた熱分析手法についての解説がなされている。ここでは様々な熱分析測定法の中で、特に本研究で用いた等温滴定法の測定原理や優位性が述べられている。この方法の利点として、研究対象とする系の化学量論比やエンタルピー、エントロピー、自由エネルギーなどの熱力学変数が得られるだけでなく、凝縮剤の DNA への結合に伴って生じる DNA 凝縮転移を追跡出来る点が挙げられている。また、熱力学変数を得るために用いられる解析手法、すなわち等温滴定曲線を解析する3つの従来法を紹介すると共に、それらが DNA 凝縮の系に適用できないことを指摘し、新しいフィッティング法を開発する必要があることが述べられている。

第3章では、DNA 凝縮過程を考慮した新しいフィッティング法の開発について述べられている。具体的には、DNA に対する凝縮剤の二種類の結合過程、すなわち DNA 凝縮を伴わない結合過程と DNA 凝縮を伴う結合過程を仮定し、必ず後者が前者の後に起こることをフィッティング法に反映させた。二つの結合過程はどちらも第2章で述べられたフィッティング法の一つである Single Set of Identical Sites Model (1種類の結合サイトモデル)を用いており、この基本モデルを組み合わせることによって新しいフィッティング法が成り立つことが明らかにされている。

第4章では、凝縮 DNA 同士の二次凝集の効果を熱的に評価することを試みた結果が述べら

れている。二次凝集が抑えられない凝縮剤であるポリリシン(PLL)ホモポリマーと二次凝集を抑える凝縮剤であるポリエチレングリコール(PEG)とポリリシン(PLL)から成るブロック共重合体(PEG-PLL)をそれぞれ DNA に添加しながら熱測定を行った。その結果、両者の差は明らかであり、この差を二次凝集の生成に起因するものと仮定すれば二次凝集は発熱過程であること、また二次凝集を生成する系が単一 DNA 分子の凝縮に対して誤った解析結果をもたらすことを指摘している。

第5章では、ブロック共重合体(PEG-PLL)のプラスミド DNA への結合に伴う熱測定を行い、PLL の重合度や溶液の塩濃度が結合に与える影響が調べられている。得られた等温滴定曲線に対して第3章で開発した新しいフィッティング法を適用し熱力学変数が求められている。全体的な傾向として、重合度の減少と塩濃度の増加に伴い PEG-PLL の DNA への結合力が減少することが示されている。また、結合に伴うエンタルピー変化は小さく、自由エネルギーとエントロピーの変化は同程度で大きいことから、自由エネルギー減少に伴って本来系の外に出るはずの熱が系の内部でのエントロピー増加に用いられることが明らかにされている。さらに、純粋な DNA の構造変化に対応する熱力学変数を、DNA 凝縮を伴う結合過程における熱力学変数から凝縮を伴わない初期の結合過程における変数の差によって表されることを示し、この結果からもエントロピー効果に関して同様の結論を得ている。

第6章では、総括として PEG-PLL を用いることにより二次凝集による熱の影響を取り除き、DNA 凝縮に関する熱力学変数を得ることが出来、その結果に基づき PEG-PLL の DNA への結合力、DNA 凝縮程度に対する PLL 重合度や塩濃度の影響を議論している。さらには、この熱力学変数をエネルギー計算に還元することにより、結合構造や結合状態などの予測や解析に援用できることを指摘している。

上記の通り、本論文では構造変化を伴う DNA と凝縮剤との結合における熱測定のための試料溶液の調製法および熱力学変数を得るための熱分析手法が確立されている。また DNA 凝縮過程と凝縮の程度に関する熱分析による解析結果は、既存の遺伝子ベクターの最適化やより優れた新規遺伝子ベクターの材料設計・開発に対して新規な指針を与えるものとなっている。

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。