

審査の結果の要旨

氏名 宮島佳孝

ヒトゲノムに代表されるゲノム DNA のマニピュレーションが実現すれば、工学、医学、薬学をはじめとする広範な分野において様々なパラダイムシフトが起こると予想される。しかし、現状のバイオテクノロジーの中心をなす天然の制限酵素は、認識配列が 4~6 塩基程度と短いため、巨大なゲノム DNA を望みの位置のみで切断できない。そのため、ポストゲノム時代と言われる現在であっても、ゲノム DNA を、直接、マニピュレートすることは困難を極めている。

巨大なゲノム DNA をマニピュレートするためには、認識配列ならびに長さ自在にチューニング可能な人工制限酵素の開発が不可欠である。この観点からすると、近年、開発された人工制限酵素 ARCUT (Artificial Restriction DNA CUTter) は大きな可能性をもつ。ARCUT では、二本鎖 DNA 中の特定配列を、ペプチド核酸 (Peptide Nucleic Acid; PNA) のインベージョンを用いて認識し、その部位を DNA 加水分解触媒である Ce(IV)/EDTA 錯体により切断する。配列認識に用いる PNA は合成核酸であり、配列・長さを目的に応じて設計できる。そのため、天然の制限酵素とは異なり、ARCUT を用いれば、望みの配列を切断できるうえ、PNA の長さを長くすることで、ゲノム DNA 切断に応用可能な高い位置特異性が実現する。

今後 ARCUT に求められるのは、時代のニーズに応じて、ヒトゲノムをはじめとするゲノム DNA を、位置選択的に切断することである。過去の研究では、およそ 460 万塩基対からなる大腸菌のゲノム DNA を ARCUT により切断することに成功しており、巨大 DNA 切断のツールとしての有用性が示された。しかし、ARCUT が巨大なゲノム DNA 中に必然的に存在する類似配列を識別して、望みの配列のみを設計通りに切断できるかどうかは、全く検討されていない。

この現状を踏まえ本論文では、ARCUT が目的配列とわずかに一塩基対のみ異なる類似配列を識別し、望みの配列のみを切断できるかが体系的に検討されている。また同時に、ARCUT による切断配列認識の機構についても詳細な検討が行われた。その結果、ARCUT は 14~16 塩基配列を厳密に認識できることが論証

された。また ARCUT による DNA 切断反応が、インベージョンにより支配されることも明らかにされた。これらの知見は、いずれも非常に基礎的な研究成果であると同時に、今後 ARCUT を用いた巨大 DNA のマニピュレーションを実現する上で不可欠な研究成果である。

本博士論文は全 5 章から構成されている。まず、第 1 章では、現在のポストゲノム時代において人工制限酵素が必要となる背景ならびに ARCUT の開発・過去の研究成果等がまとめられている。また、本論文の研究目的について、簡潔に述べられている。

第 2 章では、ARCUT の切断反応におけるミスマッチ認識について詳細な検討が行われている。系統的な解析の結果、非対合部位をもつ 15-mer の pcPNA をインベージョンに用いる ARCUT では、14~16 塩基配列を厳密に認識できることが明らかにされた。この配列認識能は、多くのゲノム DNA を位置選択的に切断できることを示唆する。

第 3 章では、切断実験条件下におけるインベージョン複合体形成に焦点をあて、ARCUT による配列認識の機構について詳細な検討がなされている。その結果、インベージョン複合体形成と、第 2 章で検討した DNA 切断反応との間には、明確な相関関係が成立することが明らかにされた。これは ARCUT による DNA 切断の選択性が、インベージョンの選択性によって支配されることを意味する。また、インベージョンの Fidelity が、系中に存在する塩濃度に大きく依存することも、明らかにされた。

第 4 章では、第 3 章で得た結論をさらに論理的に検証するために、非対合部位をもたない二本の pcPNA をインベージョンさせる場合のミスマッチ認識について検討されている。その結果、ARCUT で用いる非対合部位をもつ二本の pcPNA をインベージョンさせた場合と同様に、低塩濃度条件下ではインベージョンの Fidelity が低いことが明らかにされた。また、塩濃度をあげることで、インベージョンの Fidelity を改善できることも示されている。しかし、その場合であっても、用いる pcPNA の長さによっては認識配列の末端の一塩基対が異なる類似配列をインベージョンで識別できないことが述べられている。

第 5 章では、第 2 章から第 4 章までの実験結果についての総括ならびに本論文の結論が述べられている。

以上のように本論文では、人工制限酵素 **ARCUT** による **DNA** 切断ならびに **PNA** の配列認識に関して、基礎的な知見が極めて詳細に検討されている。そのため、今後、**ARCUT** による巨大 **DNA** のマニピュレーションの実現に大きく寄与するといえる。

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。