

## 審査の結果の要旨

氏名 愛場 雄一郎

ヒトゲノム解読の終了に代表されるように、「ポストゲノム時代」に突入している昨今、研究対象となる DNA のサイズは飛躍的に増大してきている。また、近年 iPS 細胞の作製技術が樹立されたことなどからも、ゲノムを対象とした研究に対して諸処の分野から非常に大きな注目、期待が寄せられている。一方、分子生物学の中核を担う DNA 切断技術は、依然として天然の制限酵素に依存している。しかしながら、このような酵素はゲノム等の巨大 DNA を対象とした次世代のツールとしては応用が困難である。というのも、制限酵素には、「切断可能な配列が限られており、どこでも切断できるわけではない」・「認識する配列が短いために、巨大な DNA に用いると無数の断片が生じてしまう」といった問題点が存在するためである。

これらの現状を踏まえ、高等生物などの巨大 DNA の遺伝子操作を実現するには、天然の制限酵素を超える高い位置選択性を持ち、認識配列を自由に設計できる人工制限酵素が必須となる。このような観点から、活性中心として Ce(IV)/EDTA 錯体を用いた人工制限酵素 ARCUT (Artificial Restriction DNA Cutter) の開発がこれまで進められてきた。ARCUT は高い位置特異性を有すると同時に、その認識配列を自由に変更可能である。また、ARCUT を利用したキメラタンパクの調製に成功するなど、次世代の遺伝子操作のツールとしての高い可能性が実証されている。本論文では、さらに高度な遺伝子操作に向けて、この ARCUT をより汎用的なツールとして完成させるべく検討を行った。その結果、リンカー導入という新規修飾法を用いて配列認識部位の PNA の mismatches 識別能を向上させることに成功した。また、標的部近傍にリン酸系配位子を導入することで高効率な切断を達成し、さらにその切断法を遺伝子組み換えに応用し、実用レベルでの有用性を実験的に証明している。

本論文は全 6 章で構成されており、詳細は以下の通りである。

第 1 章は序論であり、DNA を切断する人工制限酵素の構築の重要性及び、人工的な DNA 切断に関する研究など研究の背景を紹介している。また、人工制限酵素 ARCUT について過去の研究例を挙げながら、現状の課題とそれに対する本研究の位置づけについて述べている。

第 2 章では、ARCUT の配列認識を担うペプチド核酸・PNA に骨格へのリンカー導入を施すことで、その mismatches 識別能を向上させることに成功してい

る。また詳細な検討から、PNA の配列全体としてミスマッチ識別能が向上していることを明らかにした。このことは今後 ARCUT を類似配列が多数存在するゲノムなどの巨大 DNA へと応用する場合に、非常に重要な知見となる。

第 3 章では、第 2 章で用いた新規 PNA 修飾手法をさらに発展させ、ジスルフィドリンカーを用いて、PNA へ DNA 認識のスイッチング能を付与することに成功している。ここで、還元的処理によりこのジスルフィド結合は容易に開裂し、PNA は短く断片化されることになる。これにより、DNA を十分に認識できるほどの安定性を保てず、PNA は自発的に解離することを見出した。また、本手法を用いて ARCUT の切断断片を回収へと応用することも示している。

第 4 章では、EDTP 配位子を標的部近傍に導入することで、ARCUT の切断の高効率化に向け検討を行っている。その結果、EDTP による強力な Ce(IV)/EDTA の濃縮効果により、切断効率とその選択性が大幅に向上することを明らかにしている。さらに、実用的なレベルでの評価を行うために、長鎖 1 本鎖 DNA を対象とした遺伝子組み換え実験を行い、EDTP 導入による大幅な選択性の向上を実験的に証明している。さらに、本手法で得られた組み換え DNA からは正常なタンパクの発現が確認され、非天然分子からなる本系が予期せぬ副反応を DNA に及ぼすことはないことを示している。

第 5 章では、EDTP 配位子上への Ce の固定化に向けて検討を行った。この際、従来の Ce(IV)では水酸化物ゲルを形成してしまうため、Ce(III)に着目した。この Ce(III)を EDTP 上で空気酸化し Ce(IV)を生成させることで、Ce(IV)/EDTA に比べて非常に低濃度の Ce 量で効率的な切断が達成されることを見出した。また、生理的条件下で切断実験を行い、Mg などの 2 価カチオンが存在しても反応が阻害されないことを証明している。

第 6 章では、本研究で得られた知見を総括し、その重要性と波及効果について述べている。

以上のように、本論文は、認識配列を自由に設計可能な人工制限酵素 ARCUT の高機能化を目的とし、その配列認識能と切断効率とを向上させる手法を構築したものである。今後これらの手法を基に、次世代の遺伝子操作のツールへと ARCUT を展開していくことで、バイオテクノロジーだけでなくゲノム等の巨大な DNA を扱う広い分野の発展に大きく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。