

審査の結果の要旨

氏名 石塚 匠

2003年のヒトゲノム計画が完了されてから現在まで、DNAをはじめとする核酸研究は科学における一大分野へと発展している。現在は解読された様々なゲノム DNA の塩基配列情報を活用し、応用する“ポストゲノム時代”に突入している。事実、様々な生物種の全ゲノム情報から生命現象を理解するために遺伝子の特定部位の機能解明に関する研究は枚挙にいとまがない。その中でもヒトゲノムのような巨大 DNA 中の特定部位を“生のまま”切り出し、その断片のエピジェネティクス解析することや巨大 DNA の特定部位を切つてつなぐようなゲノムの直接的な遺伝子工学、あるいはゲノムの特定部位のみを標的としてイメージングすることは、現状では不可能である。このようにこれからバイオの現場では、巨大なゲノム DNA を直接的に扱う機会は確実に増すものと予想される。

このような背景がある中で、本論文で着目したのは、PNA の特性である。それは、二本の PNA 鎖が二本鎖 DNA 中のそれぞれの DNA 鎖と Watson-Crick 塩基対を形成し、二本鎖 DNA に配列特異的にインベージョンする（潜り込む）ことである。この手法の最大の特徴は、二本鎖 DNA の望みの部位を配列選択的に認識し、その部位の構造を設計通りに変形させ、物理的特性を制御できることである。従って、遺伝子の抑制のみならず、発現の活性化をも選択的に制御することが可能となるため、将来のバイオテクノロジーツール開発の基礎技術として注目されている。事実、これまでこの非常に高い配列認識能を有する PNA を利用することで、二本鎖 DNA 中の任意の位置にギャップ部位を形成させ、Ce(IV)/EDTA により二本鎖 DNA の望みの位置を切断する ARCUT (Artificial Restriction DNA Cutter) を開発してきた。この手法は PNA の核酸塩基認識能を上手く利用し、二本鎖 DNA 中の望みの位置を加水分解するものであり、次世代の遺伝子工学ツールとして実用化を目指している。

これらの現状を踏まえ、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、二本鎖 DNA を認識する合成分子に関する背景・関連事項ならび PNA の認識能に関する研究など、本論文において必要な背景について述べている。また、PNA の認識能を応用したバイオテクノロジーツール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、pcPNA (pseudo-complementary PNA) の配列特異的認識および一本鎖 DNA 選択的加水分解能を有する Ce(IV)/EDTA の2つで構成される ARCUT を単一染色体のテロメア長測定に応用した。Xp/Yp および 11q 染色体のテロメア部位を標的として位置特異的切断を試み、設計通りに切断が生じさせ、そのテロメア長を測定することに成功している。即ち、ARCUT が、単一染色体のテロメア長を測定する強力なツールであることが見出し、またその有用性を実証している。

第3章では、pcPNA の配列特異的認識は、第2章で述べたように次世代のバイオテクノロジーの発展には必要不可欠であるが、現状の認識手法では、GC-rich な配列を認識することが不可能であり、その改善が求められていた。ここでは、PNA 骨格に *N*-(2-aminoethyl)-D-lysine を用いた正電荷導入 pcPNA とすることで、標的配列が 80%ほどの GC-rich な配列の効率的な認識を達成した。また、本系は静電相互作用による PNA の機能化であったため、標的配列以外における非特異的な結合が危惧されたが、検討の結果、厳密な認識能を保持していることも示している。

第4章では、通常核酸塩基を有する conventional PNA で達成可能な duplex invasion に着目した。現状、この duplex invasion は形成する複合体が不安定であるために達成することは困難である。ここでは、duplex invasion の際に生じる複合体の一本鎖部位を SSB (single-stranded DNA binding protein) の結合で補うことにより、安定化の効果を寄与し、二本鎖 DNA の配列特異的認識を実現している。この系は汎用性の高い conventional PNA を用いるため、PNA による二本鎖 DNA の任意配列を選択的に認識する系が大幅に簡便化された。

第5章では、*c-myc* ガン遺伝子のプロモーター配列の GC-rich 配列を標的として、G-rich PNA を用いる新しい概念を導入することで、簡便かつ効率的に認識を達成している。また、この G-rich PNA を細胞内に導入させ、下流遺伝子の転写抑制を実現している。さらに、形成した複合体に対して Ce(IV)/EDTA 錯体を作用させることで、その部位を位置特異的に切断することにも成功している。

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、PNA の認識能を基盤として、その応用研究ならびに PNA の高機能化を目的とし、次世代のバイオテクノロジーのニーズにあった基礎技術または手法を構築したものである。今後これらの手法を用いることで、次世代のバイオテクノロジーツールの創成のみならず、巨大なゲノム DNA を直接的に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。