

審査の結果の要旨

氏名 堅田 仁

2003年にヒトゲノムの解読が終了して以来、個々の遺伝子の機能解析や、遺伝子治療を目的とした研究が盛んに行われており、プラスミドからウイルスベクター、さらにはゲノムにいたるまで様々なサイズのDNAを組換える技術が必要となる。しかしながら既存のバイオテクノロジーはこのような多様なニーズに対応できていないのが現状である。まずプラスミドなどの *in vitro* での遺伝子組換えでは、天然の制限酵素とDNAリガーゼを併用したDNAの切り貼りによる遺伝子組換えが用いられる。しかしながら、天然の制限酵素は、(1)認識配列が限られるために目的の場所で切断できない場合がある、(2)認識配列が4-8塩基対と短いため、大きなサイズのDNAを切断した場合に目的以外の場所でも切断されてしまう、という致命的な欠点が存在する。またゲノムの組換えでは相同組換えが用いられるが、哺乳類細胞での相同組換え頻度が極めて低いという大きな問題が存在する。そのため標的部を切断し、二本鎖切断(DSB: double strand break)を導入することで相同組換え修復系を活性化させる必要がある。このように、どちらの遺伝子組換えにおいてもDNAを目的の場所で位置特異的に切断する技術が必要不可欠となっている。

このようなニーズに応えるため、当研究室では二本鎖DNAを位置特異的に切断できる人工制限酵素ARCUT (Artificial Restriction DNA Cutter)の開発を行ってきた。ARCUTの特長として、(1)切断機構が天然の制限酵素と同じ加水分解機構である、(2)人工核酸であるペプチド核酸(PNA)を用いて配列を認識するため、標的配列を自在に変更できる、(3)20塩基対という高い配列認識能をもつ、という3点が挙げられる。これらの特長から、ARCUTはいかなるサイズのDNAをも扱うことができる人工DNA切断ツールであると言える。本論文では、ARCUTを遺伝子操作に応用することで、ポストゲノム時代のニーズに見合った汎用的な遺伝子組換えツールへと発展させることを目的とした。まず、*in vitro*でのDNAの切り貼りによる遺伝子組換えへの応用では、二種類の遺伝子組換え実験を通してさらにサイズの大きなベクターへの応用が可能な、汎用的で新しい遺伝子組換え法を構築した。また、相同組換えを利用した遺伝子組換えへの応用では、*in vitro*でヒトゲノムを位置特異的に切断すること、およびARCUTを用いてDNAを切断することでヒト細胞内での相同組換えを促進することに成功した。

本論文は全7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、既存の遺伝子組換えツールの特徴と利用例、および問題点について論じている。また、ARCUTの特徴について解説し、遺伝子組換えに応用するため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 で切断した断片の末端をヌクレアーゼにより平滑化することで、PCR で作製した遺伝子発現カセットを挿入することに成功している。この手法は、天然の制限酵素を一切用いない遺伝子操作法であり、さらにサイズの大きなベクターの遺伝子操作にも応用できるものである。

第 3 章では、ジョイントとなるオリゴヌクレオチドを利用することで、天然の制限酵素で作製した突出末端を持つ断片と、ARCUT で切断した断片とを結合し、位置特異的な遺伝子操作に成功している。これは、第 2 章で用いた手法の欠点である、平滑化部位を厳密に制御できないという点を克服した遺伝子操作であり、蛍光タンパク質のセレクションという極めて精密な遺伝子操作を ARCUT で行ったものである。

第 4 章では、ARCUT を用いてヒトゲノムを *in vitro* で位置特異的に切断することに成功した。また、非特異切断によって他の部位が切断されていないことも証明している。これは、ARCUT を利用した DSB の導入による相同組換えの促進に向けて必要不可欠な知見である。

第 5 章では、細胞抽出液を用いてプラスミドの組換え実験を行うことで、ARCUT により導入した DSB に対してヒトの相同組換え修復系が有効に機能し、相同組換えが促進されることを証明している。また、この手法を応用して、核抽出液内でヒトゲノムを相同組換えにより組換えることにも成功している。

第 6 章では、第 5 章で行った実験をヒト培養細胞内で行い、副反応等について詳細に解析することで、より高効率に相同組換えを誘起するための検証を行った。これにより、細胞内での DSB は大半が非相同末端結合とよばれる経路によって修復されるが、細胞周期の同調や RNAi によりこの経路を抑制することで相同組換え効率を向上させられるという知見が得られた。

第 7 章では、本研究で得られた知見を総括し、その重要性和今後の展望について論じている。

以上のように本論文は、人工制限酵素 ARCUT の遺伝子操作への応用を目的とし、DNA の切り貼りによる遺伝子操作法の構築と、相同組換えによるゲノムの遺伝子操作に向けた各種検証を行ったものである。本論文において得られた知見は、今後巨大なベクターの遺伝子組換えや、細胞内でのゲノムの組換えに大きく寄与することが期待される。

よって本博士論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。