

氏名	た なべ かず ひと 田 邊 一 仁
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学位記番号	論 工 博 第 3742 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Design of Functionalized Peptide Nucleic Acids and the Applications to Gene Detection and Photochemistry (機能性ペプチド核酸のデザインと遺伝子解析ならびに光化学への応用)
論文調査委員	(主 査) 教 授 齋 藤 烈 教 授 西 本 清 一 教 授 青 山 安 宏

論 文 内 容 の 要 旨

ヒトゲノム配列がほぼ明らかとなった現在、遺伝子の簡便な診断、解析法の開発が課題となっている。近年、こうした遺伝子診断や解析に人工核酸を利用する研究が盛んに行われている。ペプチド核酸(PNA)は、核酸に特徴的な糖鎖骨格をペプチド骨格に置き換えた人工核酸であり、DNAやRNAと非常に高い親和性を持つ。本論文は、新しい機能を付与したPNAの設計と新しい遺伝子解析ならびに光化学への応用についてまとめたものであり、序章と6章からなっている。

序章では、PNAのもつ特性と飛躍的に開発が進められている遺伝子診断および解析に関する最近の研究についてまとめられている。

第一章では、ソラレン含有ペプチド核酸(P-PNA)の合成とその物性について述べられている。まず、ソラレン含有PNAモノマーを設計し、ソラレン含有PNAオリゴマー(P-PNA)を合成した。P-PNAの蛍光が近接するグアニン残基により消光されることを見出し、ついで、P-PNAがDNA中の一塩基変異の検出に応用可能であることを示した。

第二章では、PNA-DNA錯体における電荷移動反応について述べられている。まず、PNA-DNA錯体において一電子酸化反応が進行することを明らかにした。ついで、特定部位に光増感剤を導入したPNA-DNA錯体における電荷移動反応を検討した。その結果、一電子酸化反応は進行するものの、電荷移動反応はほとんど進行しないことを見出した。

第三章では、PNAを用いた二重鎖DNA中のシトシンと5-メチルシトシンの識別について述べられている。まず、PNAを二重鎖DNAへ侵入(P-loop)させ、ついで蛍光分子と消光分子を両末端に導入した一本鎖DNAとP-loopとの錯体(PD-loop)を形成させた。このPD-loopを制限酵素で処理すると、DNA中に5-メチルシトシンが存在しない場合はPD-loopの切断とともに発光するが、5-メチルシトシンの存在下では切断が起こらず、蛍光は発光しないことを見出した。すなわち、PNAを用いて塩基配列特異的に二重鎖DNA中のシトシンと5-メチルシトシンを簡便に識別するシステムの開発に成功した。

第四章では、PNA-DNA錯体の制限酵素による切断反応の詳細について述べられている。PD-loopを制限酵素で処理すると、P-loopと相補的な一本鎖DNA(PO)がP-loopに対して過剰に切断されることを示し、P-loopは制限酵素による切断に触媒として関与していることを明らかにした。さらに、POの構造をダンベル型に変換することにより、より効率良く制限酵素による切断が進行することを見出した。

第五章では、DNAの構造変化を利用した光ドラッグリリース反応の制御について述べられている。両末端に光照射下でドラッグを遊離するユニットと光反応を消光するユニットを導入したヘアピン型DNAを設計・合成した。光照射下におけるこのヘアピン型DNAからのドラッグ遊離は、相補鎖の存在下で非常に効率良く進行する一方で、相補鎖の非存在下では、ほとんど進行しないことを示した。すなわち、標的とするDNAが存在する時のみドラッグが遊離するシステムの開発に成功した。

第六章では、エンイン構造と共役したジケトンの新規光環化反応について述べられている。光DNA切断分子の光照射下での挙動を追跡する過程で、エンイン構造と共役したジケトンからフラン誘導体が生成することを見出した。さらにこの

環化反応の中間体としてフリルカルベンが生成することを示し、このカルベンを捕捉することによりピフラン誘導体が定量的な収率で生成することを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

ペプチド核酸（PNA）は、核酸の糖鎖骨格をペプチド骨格に置き換えた人工核酸であり、DNA や RNA と塩基配列特異的に結合する。本論文は、新規な機能を有する PNA を設計・合成するとともに、PNA が有する極めて高い DNA 配列認識能を遺伝子解析ならびに光化学へ応用した結果についてまとめたもので、得られた成果は以下の通りである。

1. 蛍光分子であるソラレンを含有する PNA (P-PNA) を設計・合成し、ソラレンの蛍光が近接するグアニン残基により消光されることを見出した。この P-PNA の蛍光特性を DNA の一塩基変異の検出に応用することが可能であることを示した。
2. PNA-DNA 二重鎖および三重鎖上における一電子酸化反応および電荷移動反応について検討し、PNA-DNA 錯体では、一電子酸化反応は進行するものの電荷移動反応は抑制されることを明らかにした。
3. 二重鎖 DNA と PNA との錯体 (P-loop) が、その相補的な一本鎖 DNA 部分の制限酵素による切断に、触媒として関与していることを見出した。さらに、両末端を蛍光分子と消光分子でラベル化した DNA 上の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用することによって、二重鎖 DNA 中のシトシンと 5-メチルシトシンを配列特異的に識別することに初めて成功した。
4. 光照射によりドラッグを遊離するユニットと光反応を消光するユニットを両末端に持つヘアピン型 DNA を設計・合成した。このヘアピン型 DNA の構造変化を利用することによって、標的とする DNA が存在する時のみ、ドラッグを遊離するシステムの構築に成功した。

以上要するに、本論文は機能性ペプチド核酸の設計と遺伝子解析ならびに光反応への応用についてまとめたもので、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成15年2月17日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。