

氏 名	まつ だ しげ お 松 田 成 夫
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2068 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 合 成 ・ 生 物 化 学 専 攻
学位論文題目	Studies on the Photochemical Ligation of DNA and the Synthesis of Functionalized Oligonucleotides (DNA の光連結法の開発ならびに機能性オリゴヌクレオチドの合成に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 齋 藤 烈 教 授 北 川 進 教 授 今 中 忠 行

論 文 内 容 の 要 旨

化学的アプローチにより、核酸の生物学的役割を解明することや、簡単な化学修飾によって新しい性質を賦与した人工核酸を創製することは、医学の分野や遺伝子産業へ応用することができ、非常に重要である。本論文は、新しい修飾核酸塩基を合成し、これを用いて可逆的に DNA を光で連結する手法を初めて開発し、この方法を酵素ではできないさまざまな DNA 操作に応用した結果と、損傷塩基を含む DNA を効率的に合成した研究結果をまとめたものであり、序論と7章からなっている。

序論では、修飾 DNA を用いて核酸の構造や機能を化学的に追究し、新しい性質を賦与した人工核酸を設計し、遺伝子工学のツールとして利用することを目指した最近の研究の背景がまとめられている。

第1章では、5-ビニルウラシル (^VU) を含む DNA の合成とその光連結反応性の結果について述べられている。^VU を 5' 末端に含む DNA は、テンプレート存在下、366nm の光照射によって、3' 末端がシトシンの DNA と効率よく連結し、また、その連結生成物は 302nm の光照射で可逆的に原料に戻ることを見出した。この連結生成物を酵素分解し、分光学的に解析したところ、連結反応は、^VU のビニル基とシトシンの 5 位と 6 位の炭素間二重結合で [2+2] の光環化を起こし、反応が進行することが明らかとなった。

第2章では、5-ビニルシトシン (^VC) を含む DNA の合成とその光連結反応性の結果について述べられている。^VC は ^VU と比較した場合、チミンとの可逆的光連結反応に効果的な塩基であり、一本鎖環状 DNA を鋳型としてパドロック体を合成できることを示した。

第3章では、^VC を含む DNA が、一本鎖 DNA テンプレートと三本鎖を形成し、光で可逆的に分子内環化する反応と、三本鎖の安定性を熱力学的に解析した結果について述べられている。^VC の 5 位のビニル基が 5' 側の隣接塩基と効果的にスタッキングしたことによるエンタルピーの寄与で三本鎖を安定化させることを見出した。

第4章では、5-カルボキシビニルウラシル (^{CV}U) を含む DNA を用いた光連結反応と枝分かれ核酸の合成について述べられている。^{CV}U を用いて DNA の連結反応を行ったところ、3' 末端がシトシンの DNA と定量的に光連結し、^VU と比べて反応性は大きく改良され、酵素にはできない枝分かれ核酸の合成を効率よく達成することに成功した。

第5章では、可逆的光連結反応を用いて、DNA 中のシトシンをウラシルに変異させる方法について述べられている。光照射によって ^{CV}U とシトシンが連結した枝分かれ型 DNA を 90 度で加熱することで連結部位のシトシンはデアミネーションし、光照射によって開裂させることで、位置選択的に効率よくシトシンをウラシルに変異できることを示した。

第6章では、二本鎖 DNA 上での可逆的光パドロック法について述べられている。^{CV}U を含む DNA は二本鎖 DNA テンプレート存在下、光照射によって、効率よく分子内で環化反応を起こし、環状 DNA を生成した。この二本鎖 DNA を組み込んだ環状プラスミドに対して、配列特異的なパドロック体の形成と酵素との相互作用について調べたところ、プラスミドに対してカテナン構造で連結したパドロック体を可逆的に得ることができた。その複合体を制限酵素で処理してもプラス

ミドの切断は起こらず、パドロック体の形成によって、酵素の活性を制御できることを示した。

第7章では、チミンの酸化損傷塩基である 5-ホルミルウラシル (5-foU) を含む DNA の新規合成法について述べられている。ウラシルの 5 位に 1,2-ジヒドロキシエチル基を含む前駆体 DNA を NaIO_4 で処理するポストモディフィケーション法を用いることで、効率よくかつ簡便に 5-foU を含む DNA を得ることに成功した。

論文審査の結果の要旨

化学修飾により新しい機能を賦与した人工核酸を創製することは非常に重要である。本論文は、新しい修飾核酸塩基を合成し、これを用いて可逆的に DNA を光で連結する手法を初めて開発し、この方法を酵素ではできないさまざまな DNA 操作に応用した結果をまとめたものである。得られた成果は以下の通りである。

1) 5-ビニルウラシルを 5' 末端に含む DNA は、テンプレート存在下、光照射によって、3' 末端がシトシンの DNA と効率よくかつ可逆的に連結することを示した。

2) 5-ビニルシトシンはチミンとの可逆的光連結反応に有効であり、一本鎖環状 DNA を鋳型としてパドロック体を合成できることを示した。また、三本鎖を経由し可逆的に光で DNA を環化させることができ、ビニル基のスタッキング効果が三本鎖を安定化させることを見出した。

3) 5-カルボキシビニルウラシルを用いると、連結反応の効率を改良でき、効率よく枝分かれ核酸を合成できることを示した。

4) 可逆的光連結反応を利用して、DNA 中のシトシンをウラシルに変異させる効率の良い手法を開発し、また、環状二本鎖 DNA に対して光可逆的にパドロック体を形成させ、酵素活性を光で制御できることを示した。

5) 損傷塩基である 5-ホルミルウラシルを位置特異的に DNA に導入する簡便な合成法の開発に成功した。

以上、本論文は、修飾核酸塩基を用いて光可逆的に DNA を連結させる効率よい手法を開発し、この方法を酵素にはできないさまざまな DNA 操作に応用した結果をまとめたものであり、学術上、實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13年2月19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。