

(論文内容の要旨)

これまで、植物および動物(ヒト)において病気を引き起こす様々なウイルスが知られており、ウイルスに対する感染予防法や治療法の開発が行われてきた。しかし、これまで開発されてきた感染予防法や治療法ではまだ十分ではなく、新たなウイルス感染予防法および治療法の開発が強く望まれている。そこで本論文では、人工 DNA 結合タンパク質(artificial zinc-finger protein: AZP)誘導体を用いた新規ウイルス阻害法を開発した。本論文は 4 章から構成されており、第 1 章および第 2 章では AZP のみを用いたウイルス DNA 複製阻害、第 3 章および第 4 章では人工制限酵素(zinc-finger nuclease: ZFN)を用いたウイルス DNA 複製阻害について述べている。

序論では、本研究実施の背景となった現在の抗ウイルス剤の問題点、ZFP を用いた細胞内機能制御の有用性、および本研究の位置づけと目的などがまとめられている。

第 1 章では、AZP のみを用いたウイルス DNA 複製阻害を行った。ウイルス DNA 複製のためには、ウイルス複製タンパク質がウイルスゲノム上の複製起点に結合することが重要であることに着目し、AZP による子宮頸癌を誘発させるヒトパピローマウイルス(human papillomavirus: HPV)の DNA 複製阻害を試みた。すなわち、HPV のウイルスゲノム上の複製起点に結合する AZP をデザインし、AZP によってウイルス複製タンパク質の複製起点への結合を阻害することで、HPV の DNA 複製阻害に成功している。このアプローチは、同じメカニズムで複製する DNA ウイルス(临床上重要なウイルスとして単純ヘルペスウイルスやサイトメガロウイルスなど)の DNA 複製阻害にも有効であり、また耐性ウイルスが出現しづらいことなどの特長を有するため、効果的なウイルス阻害法に成り得ると考えられる。

第 2 章では、AZP に基づく抗ウイルスタンパク質製剤の開発を試みた。第 1 章で行った AZP の遺伝子導入によるウイルス DNA 複製阻害は、恒常的に AZP を細胞内で発現し続けることが出来るため長い期間の治療に有効と考えられる。一方、迅速に機能させたい場合や限られた期間でのみ機能させたい場合などは、AZP のタンパク質導入によるウイルス DNA 複製阻害が有効と考えられる。そこで、AZP のタンパク質導入による HPV の

DNA 複製阻害を行った。すなわち，第 1 章でデザインした AZP タンパク質に細胞膜透過能を付与するために，AZP に細胞膜透過ペプチド(cell-penetrating peptide: CPP)を融合させた CPP-AZP を作製し，CPP-AZP のタンパク質導入による HPV の DNA 複製阻害に成功している。更に，この CPP-AZP はウイルス複製タンパク質の DNA 結合部位のみに CPP-AZP と同様に CPP を融合させたドミナントネガティブ体よりも少量で効果的に HPV の DNA 複製を阻害し，また CPP-AZP の安全指数($SI = IC_{50}/EC_{50}$)が 300 以上であり，有効な抗ウイルスタンパク質製剤に成り得る事を明らかにしている。

第 3 章では，ZFN を用いたウイルス DNA 切断によるウイルス DNA 複製阻害を行った。すなわち，第 1 章でデザインした AZP に nuclease を融合させた ZFN による HPV の DNA 複製阻害を試み，ZFN が細胞内で HPV ゲノムを切断し，効果的に HPV の DNA 複製を阻害することを明らかにしている。この ZFN を用いたアプローチは，ウイルス DNA 複製メカニズムが解明されていなくても，ウイルスゲノムの配列が同定されている DNA ウイルスに対して適応可能であり，有用なウイルス治療法に成り得ると考えられる。

第 4 章では，1 つの ZFN によって効果的に 2 本鎖 DNA を切断できる新たな FokI の DNA 切断ドメインを作製した。DNA 切断ドメインとして FokI を用いた従来の ZFN は，効果的な 2 本鎖 DNA 切断のために FokI の 2 量化が必要であるため，1 つの target site の切断のために 2 つの ZFN をデザインしなければならない。しかし，全ての DNA 配列に対して ZFN をデザインできるわけではないため，従来の方法ではターゲットサイトが大幅に制限されていた。そこで，本章では 1 つの ZFN のみで効果的な 2 本鎖 DNA 切断を生じる新たな FokI ドメインとして，2 つの FokI をペプチド鎖で繋いだ single-chained FokI (scFokI)を開発した。そして，scFokI を融合した 1 つの ZFN が従来の 2 つの ZFN を用いた場合と同等以上の DNA 切断活性を有することを明らかにしている。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は，人工 DNA 結合タンパク質 (artificial zinc-finger protein: AZP) 誘導体を用いた新規ウイルス阻害法の確立を目標に研究した成果についてまとめたものであり，得られた成果は次の通りである。

1. ウイルス DNA 複製のためには，ウイルス複製タンパク質がウイルスゲノム上の複製起点に結合することが重要であることに着目し，AZP によるウイルス DNA 複製阻害を行った。すなわち，ウイルスゲノム上の複製起点に結合する AZP をデザインし，AZP によってウイルス複製タンパク質の複製起点への結合を阻害することで，子宮頸癌を誘発させるヒトパピローマウイルス (human papillomavirus: HPV) の DNA 複製阻害に成功している。
2. 上述の研究では，AZP の遺伝子導入によるウイルス DNA 複製阻害に成功した。本研究では，AZP のタンパク質製剤の開発を行った。すなわち，AZP に細胞膜透過ペプチドを融合させ，AZP のタンパク質導入による HPV の DNA 複製阻害に成功している。
3. 上述の研究では，AZP のみによるウイルス DNA 複製阻害に成功したが，本研究では人工制限酵素によるウイルス DNA 複製阻害を行った。すなわち，AZP に nuclease として SNase を融合させた人工制限酵素 AZP-SNase による HPV の DNA 複製阻害に成功している。
4. Nuclease として FokI を用いた従来の人工制限酵素は，1 つの target site の切断のために 2 つの人工制限酵素が必要である。そこで，本研究では 1 つの人工制限酵素のみで効果的な 2 本鎖 DNA 切断を生じる新たな FokI ドメインとして 2 つの FokI をペプチド鎖で繋いだ single-chained FokI (scFokI) を開発した。そして，AZP に scFokI を融合させた人工制限酵素 AZP-scFokI による HPV の DNA 複製阻害に成功している。

本論文は，上記の通り，AZP 誘導体を用いた効果的なウイルス阻害法の開発に成功しており，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 21 年 2 月 20 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。