

研究主論文抄録

論文題目 Fundamental studies for gene analysis using functional DNA conjugates
(機能性 DNA コンジュゲートを用いた核酸分析に関する基礎研究)

熊本大学大学院自然科学研究科 産業創造工学専攻 物質生命化学講座
(主任指導 井原敏博 教授)

論文提出者 ペリン アースラン
(by Pelin Arslan)

主論文要旨

ゲノムケミストリーの中で注目されている技術の一つに核酸を化学的に繋げる化学的ライゲーションがある。これまでに DNA の末端に様々な置換基を導入し、付加反応や求電子置換反応など様々な有機化学的手法を用いた化学的ライゲーションが報告されている。酵素反応でないため、温度、pH、溶媒などの制約条件がなく、ヘアピン構造や三本鎖、PNA のような非天然核酸もライゲーションのターゲット(基質)にすることができる。本研究では、アントラセンの光二量化反応を利用した光化学ライゲーションを検討した。まず、DNA の 5'-または 3'-末端から、アントラセンに連結した DNA コンジュゲートを合成する。これらのコンジュゲートは鋳型 DNA 上でアントラセン部位が向かい合って二本鎖を形成するようにその塩基配列を設計している。この状態で光を照射すると、アントラセンの光二量化反応が起こり、コンジュゲート同士が連結する。光化学ライゲーションの特長は、他に試薬を加える必要がなく、照射する光の波長、強度および照射時間などの反応の制御が容易な点にある。また、アントラセンは 366nm の波長で光二量化反応が起こるため、DNA の光分解やチミンダイマーの形成など、短波長の光によって起こる副反応を抑え、効率よくライゲーション反応が進行すると考えられる。

本学位論文は、この DNA コンジュゲートを用いた光化学ライゲーションおよびその応用に関する研究の成果を記述したものである。本論文は四章から構成されており、以下各章の内容を列挙する。

第一章は序論であり、本研究の背景および目的を論述している。

第二章はアントラセン-DNA コンジュゲートの合成、および反応場である二本鎖の局所構造が二量化反応に及ぼす影響について述べている。一般の蛍光色素等でラベル化された DNA プローブは、完全相補鎖と一塩基の変異を含むターゲットを、一つのみスマッチから生じる二本鎖の熱安定性の差から区別する。この場合、完全に相補的な二本鎖と、一つのみスマッチを含む二本鎖のそれぞれの融解温度の間の狭い温度範囲で分析する必要がある。しかしながら、完全相補鎖であろうが変異体であろうがプローブを低温でハイブリダイズさせ、もしスマッチに帰因するアントラセン周辺の二本鎖の局所構造の乱れが二量化効率に影響を与えることがあれば、これは厳密な温度制

御の必要のない簡便な遺伝子判別法となる。この章では、アントラセン周辺に系統的にミスマッチを導入したモデルターゲットを調製し、ミスマッチを含む二本鎖を形成する条件で光照射実験を行った。その結果、特定のミスマッチに限定すれば、それによって生じた局所構造の乱れが、ライゲーション反応を著しく阻害することを明らかにした。

第三章ではアントラセンを両末端に導入した DNA コンジュゲートを調製し、テンプレートを利用した分子内環化反応およびその分析化学的応用について検討した。このコンジュゲートは二つ折り構造をとり一本鎖ターゲットとの間で（二分子から成る）三本鎖構造を形成する。熱安定性を測定した結果、アントラセン同士はスタッキングし、この三本鎖構造を安定化することが示唆された。この構造に対して光照射を行った結果、約 10 秒で反応が進行し、定量的に環状 DNA を得ることができた。また、312 nm の光により可逆的に線状型に戻ることも確認することができた。一本鎖核酸と環状 DNA の形成する三本鎖構造は、環化前（一本鎖核酸と線状 DNA によって形成する三本鎖構造）と比較してその熱安定性が向上していることがわかった。環化による preorganization の効果により三本鎖複合体がエントロピー的に安定化されたものと考えられる。すなわち、この反応は高い安定性を有する DNA リガンドの調製法と見なすこともできる。この環化反応をプローブ反応として遺伝子判別に応用した。本系では安定な三本鎖構造を利用しているため同じ熱安定性を得るために二本鎖の系より短い配列を使うことが可能である。そのため、一つのミスマッチが三本鎖構造の熱安定性に与える影響が大きくなることを反映して、二本鎖を利用した対照系と比較して高い配列特異性を示すことがわかった。

第四章は本研究の成果を総括するとともに今後の展開について記述している。

以上、本研究では、二量化効率に及ぼす二本鎖構造の局所構造の影響を明らかにした。また、従来の二本鎖構造と比較して、三本鎖構造上では、より高い塩基配列特性を観測できることがわかった。ここで示した DNA の光化学ライゲーションは、非常に反応性が高く、高い塩基配列選択性を有する。今後、迅速な遺伝子解析法やナノテクノロジー分野における新しい工学ツールとしての応用も期待することができる。