The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies on PCR with Enantiomeric DNA and Regulation of RNA Structure and Function
Author(s)	林, 剛介
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49745
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【44】

氏　　名	林（はやし）　剛介（ごうすけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２２６７８　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科化学専攻
学　位　論　文　名	Studies on PCR with Enantiomeric DNA and Regulation of RNA Structure and Function （鏡像体DNAを用いたPCRに関する研究とRNAの構造・機能の制御研究）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　中谷　和彦 （副査） 教　授　加藤　修雄　　教　授　深瀬　浩一

論　文　内　容　の　要　旨

本論文は３つの章から構成されており、それぞれの研究は異なった目的に対して行われたものである。以下にそれぞれの研究に対する要旨を述べる。

（１）鏡像体DNA（L-DNA）によるPCR産物のラベル化とSNPタイピングへの応用

L-DNAは天然に存在するDNA(D-DNA)の鏡像体であり、ユニークな性質を持っている。一つは、そのキラリティーのため、天然の酵素に認識されないということである。また、互いに相補的な配列を持つL-DNAとD-DNAは相補鎖形成をすることができない。我々はこのようなL-DNAの特徴を活用し、PCR産物をL-DNAでラベル化することに成功した。まず、L-DNAのホスホロアミダイト４種類を化学合成し、続いてDNA合成機による固層合成でL-DNAとD-DNAからなるキメラオリゴマーを得た。このキメラDNAのD-DNA部分はPCRのプライマー配列となるように設計し、L-DNA部分の配列はPCR産物をコードする特異的な配列に設計した。このキメラDNAをプライマーとしてPCRを行うと伸長反応はL-DNAとD-DNAの間で止まり、L-DNAタグでラベル化されたPCR産物を得た。このラベル化されたPCR産物はタグ配列に相補的な配列を持つL-DNAを固定化したSPRアレイ上に流すとアレイ上でのハイブリダイズをSPRイメージングによって観察された。さらにアレル特異的PCRをこのプライマーを用いて行うことでSPRアレイ上での迅速なSNP検出を実現した。

（２）光応答性リボスイッチ開発を目指したRNA-リガンド間の結合制御

リボスイッチの発見以来、人工的に新たな機能を持つリボスイッチを開発しようとする研究が盛んになっている。我々は光照射によって遺伝子発現を制御できる人工リボスイッチの構築を目指し、第一段階として、光応答性のアゾベンゼン骨格を含む分子を用いて*in vitro*セレクションを行うことで、トランス体にしか結合しないRNAアプタマーを取得した。得られたRNAアプタマーを、アゾベンゼン含有ペプチドを固定化したセンサーチップを用いてSPR測定したところ、数種類のアプタマーはトランス体ペプチドと強い相互作用を示した。センサーチップに360 nmの光を当てて、シス体ペプチドとした後RNAアプタマーを分析するとほとんど相互作用しなかった。再び430 nmの光をあててから分析するとシグナルは回復した。また、ペプチドとアプタマーの複合体に直接光を当てると、複合体の解離が観察された。

（３）無細胞翻訳系中でのアンチセンス核酸を用いた遺伝子発現の活性化

従来のアンチセンス法ではアンチセンスオリゴがmRNAと相補鎖を形成した後、タンパク質の翻訳を抑制する。遺伝子発現を翻訳段階で抑制する方法論は確立されてきているが、逆に、遺伝子発現を翻訳段階で促進させる方法論はまだほとんどない。我々は、無細胞翻訳系で、GFPmRNA の翻訳領域に相補的なアンチセンスオリゴが、翻訳反応を促進させることを見出した。反応系中に、GFPmRNA に対するアンチセンスオリゴを加えると、翻訳開始領域にハイブリダイズするものは、翻訳されるGFPタンパク量の低下を示したのに対し、より下流にハイブリダイズするアンチセンスオリゴのいくつかは、1.5~2倍程度の翻訳量の上昇を促す事が確認された。これは、アンチセンスオリゴのmRNAの複合体形成が、より翻訳開始複合体の形成に有利なmRNA構造を誘起したためだと考えられる。Mfoldを用いたRNAの２次構造から、翻訳を活性化するアンチセンス核酸が翻訳開始領域を覆うRNA配列を相補鎖形成により引きはがす可能性が示唆された。

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

本論文は、有機化学と核酸化学の知識と技術を融合し、L型DNA、光応答性ペプチドとRNAアプタマー、新規アンチセンス核酸を用いた新たなバイオテクノロジーの創出を目標とした研究結果についてまとめたものである。

主な成果は次の３点に要約される

１）　L型DNAをタグ配列とするPCR産物の標識に関する研究。

天然に存在するDNAの鏡像体であるL-DNAを有機化学的に合成し、その特徴を用いてPCR産物を標識、アレイ上で検出する方法論を開発した。また、この方法論を応用して、ヒトゲノム配列の一塩基多型をハイスループットに検出する手法を開発した。

２）　光応答性ペプチドとそれに結合するRNAアプタマーとの相互作用に関する研究。

リボスイッチと呼ばれる遺伝子発現調節機構に着目し、光照射によって遺伝子発現のオン／オフ制御を目指した。光応答性分子に対するRNAアプタマーの取得と、金表面でのリガンド-RNA相互作用の詳細な解析を行い、金表面へのRNAの結合と解離を光で自在に制御出来ることを明らかにした。

３）　遺伝子発現を翻訳段階で活性化する新たな方法論の開発に関する研究。

メッセンジャーRNA の翻訳領域に結合して、翻訳を活性化させることのできるアンチセンス核酸が存在することを提案、実証した。

以上のように、本論文は有機化学に基づいた新しいバイオテクノロジーツールの提案・実証しており、高く評価できる。本研究の成果は、核酸化学や遺伝子科学の研究分野の発展に貢献すると期待される。

よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。