

東邦大学審査学位論文（博士）の要旨

論 文 要 旨

氏名 寺岡 葵 ㊞

論文題目 親和性タグを導入したケージド DNA を用いた遺伝子の機能発現の光制御

論文要旨

現在、機能が分かっていない遺伝子は多数存在し、その中には病気に関連する遺伝子も含まれている。これらの遺伝子の発現部位や発現時期を自由に制御できれば、生命科学や医学、薬学などの様々な研究分野の進展に貢献する、新しい実験手法を提供できるようになると考えられる。そこで本研究では、遺伝子の機能発現を効率よく光制御できるケージド DNA の開発を目的とした。

光分解性保護基を用いた、ケージド DNA またはケージド RNA を用いる遺伝子の機能発現の光制御は、これまでに複数例の報告がある。私の研究室においても、光分解性保護基である Bhc 基のジアゾ体である Bhc-diazo を用いて、プラスミド DNA のリン酸基をランダムに修飾することにより、プラスミド DNA の Bhc-ケージド化合物を作成し、その機能を解析してきた。その結果、2 つの問題があることが分かってきた。一つ目は、ケージング反応がランダムに起こるため、ケージングされたプラスミドと未反応のプラスミドの混合物が生成し、分離できないことである。二つ目はケージング基が結合する部位がプラスミドの発現に関係のない配列の場合に発現を抑制できないことである。そこで、本研究では、ビオチンとアビジンの親和性を利用するアフィニティー精製によってケージド DNA を分離精製することで、その機能発現を効率よく光制御できるのではないかと考え研究を行った。

まず、私は、ビオチンタグを導入したケージド化合物である、Bio-Bhc-diazo の合成を行った。その中で、光分解性保護基をモジュール化し、実験目的に合わせて 1 級アミノ基を持つ機能性分子を光分解性保護基に導入可能な Key Building Block となる分子を合成することにも成功した。

得られた Bio-Bhc-diazo を用いて、dsDNA の caging と、光照射による uncaging を確認し、アビジンでコーティングされた Magnetic Beads とビオチンの相互作用を利用して、プラスミドや dsDNA 分離精製を試みた。その結果、Bio-Bhc-diazo によって dsDNA (50 bp) がケージングできることを確認した。そしてケージド dsDNA の UV 照射によるアンケージングは、照射時間に依存してアンケージングされていることを確認した。また Magnetic Beads による分離精製では、pRL-SV40 (プラスミド DNA)、linear RL (直鎖の二本鎖 DNA) のどちらにおいても、未反応 DNA とケージド DNA を分離する条件を見出すことができた。最後に、HeLa 細胞でのトランスフェクション実験により、ケージングされた DNA の発現が未処理 DNA と比較して 20%程度まで抑制されていることが確認できた。同時に、5 分間の光照射によって、ケージド DNA の発現が 60~90%程度まで回復することも確認できた。このトランスフェクションにおける、ケージド linear RL の発現抑制と、光照射後の発現回復は再現性も高いことが分かった。さらに、ケージド linear RL の UV 照射によるアンケージング実験から、UV 照射によってアンケージングが起こっていることが確認できた。

以上の結果から、ケージング前後、光照射前後で、非常に高い発現比で目的の遺伝子の発現を制御する方法が確立された。本研究により、遺伝子解析の新たな手法が提供できたとと言える。

論文審査の要旨及び審査結果の要旨

2011年入学	研究分野 分子科学	氏名 寺岡 葵
審査委員	(主査) 東邦大学理学部 教授 古田寿昭 (副査) 東邦大学理学部 教授 渡辺直子 (副査) 東邦大学理学部 准教授 岸本利彦 (副査) 東邦大学理学部 准教授 渡邊総一郎	
(論文題目) 親和性タグを導入したケージド DNA を用いた遺伝子の機能発現の光制御		
(論文審査の要旨及び審査結果の要旨) <p>論文提出者 寺岡 葵は、遺伝子の機能発現を効率よく光制御するケージド DNA の開発を目的に研究を行った。生きた細胞や組織あるいはモデル生物個体内で、目的遺伝子の機能発現する時期と場所を自由に制御できれば、生理的な条件を再現してその機能を解析する従来にない実験手法を提供できる。これを機能未知遺伝子に適用して、その機能を明らかにすることができれば、生命科学や基礎医学・創薬の進展に貢献することが期待される。</p> <p>ケージド DNA を調製するには2つの方法が考えられる。全長 DNA を適切なケージング試薬でランダムに修飾する方法と、塩基修飾ケージドモノマーから化学合成してオリゴ DNA にする方法である。このうち、ランダム修飾による方法は、操作が簡単で誰でも利用できる点と、適用できる DNA の配列および長さに制限がない点で優れている。しかし、未修飾 DNA を分離する方法がないため、光照射前に目的遺伝子が発現してしまう発現漏れが問題になっていた。これを回避するために、大過剰のケージング試薬でケージングすると、1分子の DNA が大量の光分解性保護基で修飾されるため、光照射によって発現するタンパク質の量がごく少量であることも未解決の問題であった。</p> <p>そこで、論文提出者は、精製用のビオチンタグ付きのケージング試薬 Bio-Bhc-diazo を合成し、ケージング反応によって修飾された DNA だけをアフィニティー精製することでこの問題の解決を試み、以下の成果を達成した。</p> <p>(1) モデル化合物に選んだ 50 bp の dsDNA を Bio-Bhc-diazo でケージングできること、さらに、光照射でアンケージングできることを確認した。また、導入したビオチンを検出することで、ケージングされていることの有無を高感度に確認できることも明らかにした。</p>		

(2) ウミシイタケルシフェラーゼをコードするプラスミド pRL-SV40 を用いて、Bio-Bhc-diazo でケーシングしたプラスミド DNA の分離精製を試みた。コントロールの未修飾プラスミド DNA はアビジンビーズにほとんど結合しないのに対し、ケーシングしたプラスミド DNA は Bio-Bhc-diazo の濃度依存的にビーズに結合すること、またホルムアミドと加熱することでビーズに結合したプラスミドがリリースされることを確認した。精製したケージド pRL-SV40 を哺乳動物細胞にトランスフェクトしたところ、ルシフェラーゼの発現を一部しか抑制できなかったことから、Bio-Bhc 基で修飾される、プラスミド上の位置が重要であるという仮説を提示した。

(3) その仮説を検証するために、pRL-SV40 から発現に必要な最小領域を切り出した直鎖 DNA である linear RL を調製して実験に用いた。Bio-Bhc-diazo でケーシングした linear RL をアビジンビーズで精製後、HeLa 細胞にトランスフェクトすると、ルシフェラーゼの発現量は 25%程度に抑えられることを見出した。さらに、光照射によって発現量が 90%程度まで回復することも明らかにした。

(4) Bio-Bhc-caged DNA 上のビオチンタグ、電気泳動、およびドットプロットを巧妙に組み合わせて、1 分子の DNA 中に存在する Bio-Bhc 基の数を見積もる実験法を考案した。ルシフェラーゼの発現が 25%程度まで抑制されているケージド linear RL (1975 bp) は、2~8 個の Bio-Bhc 基で修飾されていることを明らかにした。

(5) アビジンビーズで精製して未修飾 DNA を完全に除いた Bio-Bhc-caged linear RL を用いても、ルシフェラーゼの発現が完全に抑制されない原因の考察、仮説の提唱、およびその検証を行った。その結果、光照射前の目的遺伝子発現を完全に抑制するために必要な要件を絞り込むことに成功した。

論文審査の席上で論文の内容および周辺知識に関して質疑応答を行った。生きた細胞内で目的遺伝子の機能発現を高い時空間分解能で制御する新手法の開発という当初の目的を達成できたこと、また、今後の発展も充分期待できる研究成果を挙げたということで審査員の意見は一致した。また、本研究の内容は、2 編の原著論文 (*Org. Lett.* **2012**, *14*, 6182-6185. ACS Virtual Issue “Nucleic Acids” に選出; *Chem. Commun.*, **2014** *50*, 664-666), 4 件の国際会議 (ICPOC20, Busan, Korea, August 22-28, 2010; Pacificchem 2010, Honolulu, USA, December 15-20, 2010; 17th International Biophysics Congress, October. Beijing, China, October 30-November 3, 2011, Young Investigator Travel Award 受賞; 13th Tetrahedron Symposium Asian Edition, Taipei, Taiwan, November 27-30, 2012), および、5 件の国内学会で論文提出者自身によって発表され、博士論文として充分完成していると判断された。

以上の結果から、審査員全員一致で論文提出者 寺岡 葵は、博士 (理学) の学位を得るに十分な資格を有するものと認めた。

