

## 論文審査の結果の要旨

氏名 小林 輝樹

生体高分子である DNA は、水素結合型塩基対形成に基づく配列特異的な自己組織化により様々な高次構造を形成するため、二次元または三次元の機能性超分子構造体を構築するための材料として注目を集めている。近年、人工 DNA の新しい構造体として、金属錯体型塩基対を導入した人工 DNA の合成研究が盛んに行われている。金属錯体型塩基対は、金属配位子を核酸塩基部位として有する 2 つの人工ヌクレオチドが一つの金属イオンを挟む形で対を形成するものである。例えば、ヒドロキシピリドン型ヌクレオチド(**H**)は、Cu<sup>II</sup>イオンと 2:1 錯体を形成して **H**-Cu<sup>II</sup>-**H** 塩基対を構築する。金属錯体型人工塩基対を DNA 構造に導入することで、金属錯体形成による DNA 構造の安定化や変換、DNA 鎖を鋳型とした集積型金属錯体の構築などが可能となり、DNA を基本骨格とした超分子構造体のさらなる機能化が期待される。本研究は、金属錯体型人工 DNA を合成する新しい手段として、酵素合成法の開発を目的とした。従来の化学合成法とは異なり、酵素合成法は高効率で DNA を合成でき、さらに DNA 構造体を部位選択的に合成後修飾できる可能性を秘めている。本研究では、鋳型非依存性 DNA 合成酵素 (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) に着目した。TdT は、一般の DNA 合成酵素とは異なり、一本鎖 DNA 選択的にヌクレオチド伸長反応を触媒する酵素である。非天然型基質に対する許容性が高く、標的 DNA の選択的標識やプローブ合成に活用されてきた。この TdT の特性を活用するために、TdT によるヒドロキシピリドン型ヌクレオチド(**H**)の縮合反応による配位子型人工 DNA の合成を検討した。次に、酵素合成した配位子型人工 DNA と Cu<sup>II</sup>イオンの錯体形成により、金属錯体型人工 DNA の構築を行った。

本論文は全 5 章からなり、第 1 章では金属錯体型人工 DNA の研究背景および酵素による人工 DNA 合成の研究が述べられ、本研究の目的および意義が述べられている。

第 2 章では、酵素 TdT の基質となるヒドロキシピリドン配位子型人工ヌクレオチド三リン酸(dHTP)の合成について述べられている。dHTP は、定法である Eckstein 法を用いたリン酸化反応により合成した。陰イオン交換樹脂と逆相 HPLC による 2 段階の精製により、酵素反応に十分な純度の dHTP を得ることができた。特に、陰イオン交換樹脂による精製により、副生成物と目的物 dHTP を容易に分離することが可能になった。

第 3 章では、TdT による配位子型人工 DNA の酵素合成と、その錯体形成による金属錯体型人工 DNA の構築について述べられている。まず一本鎖 DNA プライマーに対し、dHTP の TdT による縮合反応を検討した。生成物を電気泳動法により解析したところ、

天然型基質 dNTP (N = A, T, G, C)と比較して反応の進行は遅いものの、dHTPは TdT の基質として働き、平均鎖長 5 mer の配位子型人工 DNA を与えたことが明らかになった。さらに、dHTP を基質として用いた場合、平均 5 mer 以上の伸長反応が抑制される結果を得た。この主たる要因は、生成物である人工 DNA オリゴマーの酵素に対する親和性が、低下したためと考えられた。この仮説は、5つの Hヌクレオチド部位を有する配位子型人工 DNA(ODN-1)が、酵素反応のプライマーとして機能しないという実験結果により支持されている。

次に紫外吸収スペクトル分光法により、この ODN-1 の錯体形成挙動を調べた。ODN-1 は  $\text{Cu}^{\text{II}}$  イオン存在下で定量的に金属錯体型塩基対 ( $\text{H-Cu}^{\text{II}}\text{-H}$ )を形成し、金属錯体型人工 DNA 二重鎖を構築したことが示された。観察された ODN-1 の錯体形成挙動は、先行研究で化学合成により得られた配位子型人工 DNA と同様であることから、酵素 TdT を利用することにより、金属錯体型人工 DNA が構築できることが明らかになった。

第 4 章では、本研究で開発した酵素合成法が DNA 構造体の修飾法として有用であることを確認するために行った、DNA 二重鎖への Hヌクレオチド導入、および  $\text{Cu}^{\text{II}}$  イオンの添加による修飾 DNA 二重鎖の会合挙動について述べられている。TdT 存在下 dHTP を基質とする酵素反応により、DNA 二重鎖の突出末端に対し平均 5 つの Hヌクレオチドが縮合することが明らかになった。次に、得られた修飾 DNA 二重鎖の  $\text{Cu}^{\text{II}}$  イオンとの錯体形成の挙動を調べた。 $\text{Cu}^{\text{II}}$  イオンの滴定実験から、(1)  $\text{H-Cu}^{\text{II}}\text{-H}$  塩基対の形成により修飾 DNA 二重鎖の二量体が定量的に生成すること、(2) 過剰量の  $\text{Cu}^{\text{II}}$  イオンを添加しても二量体構造が維持されることが明らかになった。また、得られた二量体は、EDTA の添加により  $\text{Cu}^{\text{II}}$  を除去することで単量体に解離した。以上から、 $\text{Cu}^{\text{II}}$  イオンの有無に応答して可逆的に会合・解離が起こることに明らかにした。さらに平滑末端部位を有する二重鎖 DNA では、TdT による dHTP の縮合反応は進行しなかったことから、本研究で開発した酵素合成法は DNA 構造体の一本鎖部位選択的な合成後修飾に応用できることが期待される。

第 5 章では本論文の総括と今後の展望が述べられている。

以上のように、本博士論文では、鋳型非依存性 DNA 合成酵素(TdT)による金属錯体型人工 DNA の酵素合成法を開発した。本研究成果は、DNA を基本骨格とした超分子構造体の新たな構築法・修飾法のための新たな方法論を与えるものであり、理学の発展に大いに貢献するものである。なお、本論文における各章の研究は他の複数の研究者との共同研究によるものであるが、論文提出者が主体となって実験、解析および考察を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。