

氏名(本籍)	わらしなまさき 藁科雅岐(静岡県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第2,051号		
学位授与年月日	平成11年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	Mechanism of Action of Catalytic Nucleotides and Specific Inhibition of Expression of L6 <i>BCR-ABL</i> mRNA by Catalytic Nucleotides (機能性核酸によるRNAの切断反応機構及び <i>BCR-ABL</i> 遺伝子の発現制御)		
主査	筑波大学教授	Ph.D. (理学)	多比良和誠
副査	筑波大学教授	理学博士	宗像英輔
副査	筑波大学教授	農学博士	田仲可昌
副査	筑波大学助教授	農学博士	深水昭吉

論文の内容の要旨

生体内の化学反応を触媒する酵素がタンパク質であるという概念は、常に定説として受けられてきた。しかし、1980年代に Cech ならびに Altman により RNA 分子でありながら触媒活性をもつリボザイムが発見され、当時の常識が根底から覆された。この発見により、それまで DNA とタンパク質の間の遺伝情報の仲介屋程度にしか認識されていなかった RNA が、酵素作用を持つ機能性分子として一躍生化学界の主役へとおし上げられた。またそれと同時に、癌やエイズなどを標的とした遺伝子治療へ、リボザイムの応用研究も盛んに行われるようになった。

リボザイムによる RNA 鎖の切断には、 Mg^{2+} イオンなどの 2 価金属イオンが必須である。これまでのリボザイムの切断反応メカニズムに関する研究により、実際に RNA 鎖の切断を行っているのは金属イオンであり、リボザイムはその金属イオンを基質 RNA の切断部位に近づける役割を担っているにすぎないということが明らかとなってきた。ハンマーヘッド型リボザイムでは、Catalytic core と呼ばれるループ領域がこの金属イオンをとらえる領域でありリボザイムの触媒活性に非常に重要であることがわかっている。それに対し、基質となる RNA 鎖を認識する基質結合領域が触媒活性自体に与える影響については殆ど理解されていなかった。そこで、ハンマーヘッド型リボザイムの基質認識部位であるシステム I とシステム III 領域を様々に改変したリボザイムを作制し、その触媒活性を与える影響について調べた。その結果、この基質認識部位は単に基質を認識しているだけでなく触媒活性自体にも影響を与えるということが明らかとなった。特に、基質認識部位を DNA に置換した場合、リボザイムの触媒活性は上昇し、その高活性化はエントロピー効果によるものであることが明らかとなった。

また、リボザイムによる RNA 鎖切断反応を実際触媒しているのは金属イオンであり、リボザイムはその金属イオンを基質 RNA の切断部位に近づける役割を担っているにすぎないため、DNA 分子でもリボザイムと同じように、金属イオンをうまくとらえて触媒として働かせることができるのではないかと考えられ、多くの研究者がその開発に取り組んできた。その結果、最近、Joyce らのグループが、*in vitro* selection 法と呼ばれる方法によって、 Mg^{2+} 存在下で RNA 鎖を切断できる一本鎖 DNA 分子 (DNA エンザイム) を発見し、大きな反響を呼んだ。機能性核酸を用いた遺伝子治療を考えた場合、RNA であるリボザイムは、発現ベクターを用いて細胞内で持続的に転写させることができる。一方、化学合成したものを細胞外から導入する場合、DNA は RNA よりも細胞内の分解酵素に対して安定で、しかもより簡単に大量調整できるというメリットを持っている。このことか

ら、これまで遺伝情報を記録しておくだけの分子という認識だったDNA分子も、機能性核酸の一つとして、幅広い応用が可能となった。

機能性核酸等を用いて、慢性骨髄性白血病の原因である *BCR-ABL* mRNA のような、染色体相互転座の結果生じる癌原遺伝子のキメラ型 mRNA の発現抑制を試みる場合、正常型 mRNA である *ABL* 及び *BCR* mRNA に影響を与えることなく異常型のキメラ型 mRNA の発現抑制を行うことが必要である。DNA エンザイムはこれまでのリボザイムと比較して、切断部位の自由度が高く、このようなキメラ型 mRNA に対する遺伝子発現抑制剤として非常に有効であると考えられる。本研究では、従来のリボザイムやアンチセンス等では特異的な発現抑制がほとんど不可能であった L6 *BCR-ABL* mRNA (b2a2 type) を標的とし、従来のリボザイムやアンチセンス等とその基質特異性および細胞内活性を比較した。その結果、DNA エンザイムは従来のアンチセンスと比較して高い基質特異性と発現抑制を示すことが明らかとなった。また、細胞内での安定性を増すために施す修飾の種類によっても基質特異性は大きく影響され、非特異的に正常細胞にアポトーシスを誘導してしまうものもあった。細胞に非特異的なダメージを与えないような修飾を施した DNA エンザイムは、非常に高い標的 mRNA の発現阻害効果、基質特異性を示し、遺伝子治療への応用に高い期待が持てることが示唆された。

審査の結果の要旨

本研究は、ハンマーヘッド型リボザイム基質認識部位が触媒活性に与える影響の解明、及び *in vitro* selection 法によって開発された RNA 鎖切断活性を持つ DNA エンザイムを用いて、慢性骨髄性白血病の原因となる悪性遺伝子である *BCR-ABL* 遺伝子の発現制御を目的としたものである。DNA 置換等の改変を加えたりボザイムを用いた反応速度論的解析では、DNA 置換したキメラ型リボザイムが高活性化することを示すとともに、その原因を速度論的に解明した点で評価される。また、これまで特異的な発現制御が不可能であった慢性骨髄性白血病の原因である *BCR-ABL* 遺伝子を、*in vitro* selection 法によって開発された DNA エンザイムを用いて培養細胞レベルで特異的に発現抑制することに成功した。その過程において、機能性核酸の基質特異性をレポーター遺伝子を用いて効果的に調べるアッセイ系を確立し、DNA エンザイムは従来のアンチセンス等に比べ、その細胞内活性および基質特異性が飛躍的に高いことを明らかにした。またこのアッセイ系は、修飾塩基が与える基質非特異的な影響を定量的に調べることを可能にし、これまで一般的に用いられてきたホスホロチオエート化の非特異的な影響を明らかにした。さらに、細胞に非特異的なダメージを与えないような修飾塩基を用い、高い基質特異性と細胞内のヌクレアーゼに対する抵抗性を合わせ持つ DNA エンザイムを開発した。本研究は DNA エンザイムを用いた遺伝子発現制御、及び遺伝子治療に高い期待が持てることを示した極めて意義深い成果である。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。