

氏名（本籍） 猪股 梨華
学位の種類 博士（医科学）
学位記番号 博甲第 9994 号
学位授与年月 令和 3 年 3 月 25 日
学位授与の要件 学位規則 第4条第1項該当（昭和28年4月1日文部省令第9号）
審査組織 グローバル教育院
学位論文題目 Identification and Characterization of Zn²⁺-Dependent DNAzymes
（亜鉛依存的 DNAzyme の同定と特性解析）

	（職名）	（学位）	（氏名）
主査	筑波大学教授（協働大学院）	博士（人間科学）	大石 勝隆
副査	筑波大学教授（協働大学院）	博士（学術）	宮岸 真
副査	筑波大学准教授	博士（工学）	平川 秀彦
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	宮前 友策

論文の要旨

第1章では、本研究の背景が詳細に述べられている。機能性核酸分子が最初に発見されてからおよそ40年が経過し、これまでに生体またはインビトロ選択法により多くの機能性核酸が報告されてきた。従来のインビトロ選択法では、30塩基以上のランダム配列ライブラリーが用いられることが多かったが、著者は、20塩基未満のライブラリーを用いたインビトロ選択法と次世代シーケンサーを用いたディープシーケンシングにより、新たな機能性核酸の獲得を目指して研究を行った。

第2章では、これまでに報告された中で最も小さな DNA ザイムの発見に関して述べられている。最初に、著者が考案したスクリーニング手法の合理性を確認するために、Breaker らによって報告された10塩基の触媒中心領域を有する DNA ザイム I-R3 が、10塩基のランダム配列を触媒中心とする N10-DNA ライブラリーによって獲得できることを示した。次に、前述の N10-DNA ライブラリーと、I-R3 の基質の切断部位の3塩基を RNA に置換した基質を用いることにより、RNA 切断活性を有する新たな DNA ザイムの探索を行った。その結果 RNA を含む7塩基を基質として10塩基の触媒中心を有する DNA ザイムを獲得した。さらに著者は、切断活性を測定しながら段階的に DNA ザイムのサイズの絞り込みを行い、5'-AC-3'の2塩基を触媒中心として、5'-rArArG-3'の3塩基を基質中心とする DNA ザイム、minGAA を発見した。minGAA は、1 mM Zn²⁺、pH 7.5、37°C の条件下において、 $k_{\text{obs}} = 0.20$ の反応速度を示す DNA ザイムであり、Zn²⁺ に対する高い選択要求性を有していた。触媒中心配列の至適化を目指し、minGAA と 5'-NN-3' の15種類の変異酵素を用いて切断活性を比較したところ、minGAA を超える活性を示す DNA ザイムは得られなかった。基質特異性を明らかにするために、3rN 基質ライブラリーを用いた活性測定を行ったところ、minGAA は、rArArG と rCrArG の2種類の基質に活性を示すことが判明

し、minGAA には、rHrArG に対する基質特異性があることが示された。

第 3 章では、ピリミジン塩基間を効率的に切断する新たな DNA ザイムの発見に関して述べられている。これまでに報告されたピリミジン塩基間の切断活性を有する DNA ザイムは、一般的な DNA ザイムに比べて活性が弱いものであった。著者は、N16-DNA ライブラリーと基質 5'-rCrCrA-3'を用いたインビトロ選択法とディープシーケンシングにより、ZincDz1 と ZincDz2 という 2 種類の DNA ザイムを得た。それぞれの DNA ザイムに対して、基質切断部位およびその化学構造を明らかにするために、電気泳動や LC-MS 解析を行った結果、ZincDz1 及び ZincDz2 が、それぞれ 5'-rCrCrA↓-3'、5'-rC↓rCrA-3'の切断活性を示すことが判明した。ピリミジン塩基間の切断活性を示す ZincDz2 に絞って切断配列の特異性について検討したところ、これまでに知られていた DNA ザイムに比べて高い 5'-rN↓rNrPu-3'の切断活性を示すことが判明した。さらに、第 2 章と同様に、触媒中心配列の変異体を用いた活性比較を行った結果、ZincDz2 よりも高い活性を示す ZincDz2-v2 を得た。ZincDz2-v2 は、ZincDz2 に比べて 2 箇所の T が C に変異していることから、ZincDz2-v2 が高い活性を示すことに対して、構造上の安定性が増加したためではないかと結論付けている。

第 4 章では総合考察と結論が述べられている。2 章および 3 章で記述された成果を総括するとともに、本研究で見出された DNA ザイムやスクリーニング手法の特徴ならびに利点について記述されている。さらに本研究の波及効果として、RNA ワールド仮説の検証や医薬品開発に向けた展望について言及している。

審査の要旨

【批評 Review】

申請者は、新たな機能性核酸の探索を目指し、従来のインビトロ選択法とは異なる手法を考案して、その手法の有効性を緻密に検証するところから研究を始めている。研究成果としては、これまでに報告されている中で最もサイズの小さい 2 塩基を触媒中心とする DNA ザイム minGAA の発見と、ピリミジン塩基間を効率的に切断する活性を有する世界で初めての DNA ザイム ZincDz2 及び ZincDz2-v2 の発見が挙げられる。いずれにおいても、発見した DNA ザイムの触媒中心や基質の塩基置換を網羅的に実施し、それぞれの DNA ザイムが現時点で探索目的に最も合致した分子であることを証明している。機能性核酸分子が発見されて以来 40 年の間、様々な手法により多くの分子が開発されてきたが、本研究では、通常よりも短いランダム配列を探索源として、次世代シーケンサーを用いたディープシーケンシングを組み合わせた新規探索手法を確立している。これにより、既存には見られない特徴や新しい機能を有する核酸分子の取得に成功しており、今後の構造解析の結果などを踏まえ、広く生命科学や医科学分野に貢献し得る独創的な研究として高く評価できる。

【最終試験の結果 Result】

令和 3 年 1 月 15 日、専門委員会において、専門委員会委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、専門委員会委員全員が合格と判定した。

【結論 Conclusion】

上記の学位論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士（医科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。