

氏名	重森 康司
授与した学位	博士
専攻分野の名称	理学
学位授与番号	博乙第4033号
学位授与の日付	平成17年 3月25日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第4条第2項該当)
学位論文の題目	RecA-mediated Triple-stranded DNA Formation and Its Application to DNA Analysis (RecAによる三本鎖DNA形成とDNA解析への応用)
論文審査委員	教授 山本 泰 教授 杓掛 和弘 助教授 阿保 達彦

#### 学位論文内容の要旨

相同組換えは異なる2つのDNA間における遺伝的情報の再編成機構で、生物界で普遍的に観察される基本的現象のひとつである。この相同組換えには、膨大な数の塩基配列をもつ2つのDNAの中から相同な配列を見つけだし、DNAの相同鎖どうしの交換を行うという2つの重要な過程が含まれている。大腸菌でこれらの相同組換え反応を担うRecA組換えタンパクは、二本鎖DNAと一本鎖DNAとの間の塩基配列の相同性を探索し、それら相同鎖間の組換え反応を行う酵素活性を有している。この相同組換えにおいて、組換え中間体としての三本鎖DNAの研究が始まってすでに40年以上が過ぎたが、ここ数年間でその研究は基礎的研究にとどまらず、バイオテクノロジーへの応用研究にも向けられてきている。

これまで、大腸菌のRecAとオリゴヌクレオチドを用いた三本鎖DNA形成法について研究を行ってきた。その中で、RecAを利用して二重鎖DNAとその相補的デオキシオリゴヌクレオチドから部分的三本鎖DNAを高い効率で形成させることに成功し、さらに、この三本鎖DNAにおいてRecAを除いた後も安定に三本鎖構造を維持させることにも成功した。

本研究では、これまで行ってきた三本鎖DNAのDNA解析への応用技術として、二本鎖DNAの任意の部位で合成オリゴヌクレオチドを使って三本鎖DNAを形成し、その構造に特異的に作用するヌクレアーゼを組み合わせて用いることでDNA分子中のいかなる部位の塩基配列でも切断を可能にする手法、三本鎖DNA構造を安定化させることにより、特定DNA配列をDNAを変性させずに二本鎖DNAのまま直接検出する手法と二本鎖DNAのまま直接クローニングする手法、ヒトゲノム情報解析の分野への応用を考えて、三本鎖DNA形成反応の高い塩基配列特異性を利用して1塩基変異(SNP)を検出する手法、更に、生体機能に結びつく遺伝情報を担うcDNAの網羅的解析に役立つツールとして、相同な塩基配列をもつDNA鎖どうしを三本鎖DNAを介して連結させることで完全長cDNAを得る手法を開発した。

## 論文審査結果の要旨

本申請者は、大腸菌の相同組換え酵素 RecA とオリゴヌクレオチドを用いた三本鎖 DNA 形成法について研究を行い、その中で、RecA を利用して二重鎖 DNA とその相補的デオキシオリゴヌクレオチドから部分的三本鎖 DNA を高い効率で形成させることに成功し、さらに、この三本鎖 DNA において RecA を除いた後も安定に三本鎖構造を維持させることにも成功した。

本研究では、これまで行ってきた三本鎖 DNA の DNA 解析への応用技術として、二本鎖 DNA の任意の部位で合成オリゴヌクレオチドを使って三本鎖 DNA を形成し、その構造に特異的に作用するヌクレアーゼを組み合わせることで DNA 分子中のいかなる部位の塩基配列でも切断を可能にする手法、三本鎖 DNA 構造を安定化させることにより、特定 DNA 配列を DNA を変性させずに二本鎖 DNA のまま直接検出する手法と二本鎖 DNA のまま直接クローニングする手法、ヒトゲノム情報解析の分野への応用を考えて、三本鎖 DNA 形成反応の高い塩基配列特異性を利用して 1 塩基変異 (SNP) を検出する手法、更に、生体機能に結びつく遺伝情報を担う cDNA の網羅的解析に役立つツールとして、相同な塩基配列をもつ DNA 鎖どうしを三本鎖 DNA を介して連結させることで完全長 cDNA を得る手法を開発した。これらの結果はバイオテクノロジーへの応用研究に活用され、当該分野への寄与は大きい。従って本研究は学位に値すると判定する。