

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	廉 知恵
論文題目	Investigating Advanced Properties of Modular DNAs as Biohybrid Catalyst and Aptamer (高度な特性を有するモジュラーDNAのバイオハイブリッド触媒及びアプタマーとしての応用)		
(論文内容の要旨)			
序論			
<p>核酸分子は、A-T(U), G-C塩基対の持つ相補的対合性と自己組織化能を備えるバイオマテリアルとして利用されている。特に、近年の核酸領域研究の中では、核酸分子の有する触媒活性が注目されており、数多くの報告例が挙げられている。とりわけ、固相合成法などの有機化学的な手法の開発によって、核酸に様々な化学修飾を行うことが可能になっており、化学修飾が施されたDNA構造体の生体機能分子としての応用研究が進んでいる。実際に様々な機能性分子の導入によって、天然核酸への新たな特性の付与や機能向上が可能である。例えば、金属イオンに対する配位子構造を組み込んだ核酸分子は、金属イオンと配位することで特定の化学反応に対する触媒活性が向上することが知られている。また、不斉炭素と様々な極性を持つアミノ酸を核酸に導入することで、ある種の酵素活性を模した機能性核酸システムの構築が可能になると考えられている。本研究では、様々な化学修飾を施した独自のDNA構造体を合成開発することで、新たなDNA触媒やDNAアプタマーを実現し、修飾核酸関連の研究領域における多様性を広げることに成功した。</p>			
1. 不斉マイケル反応を触媒するモジュラーG4—二本鎖DNAバイオハイブリッド触媒			
<p>DNAは、二本鎖構造やグアニン四重鎖 (G4) 構造などの多様な高次構造を持つことが知られている。これまでに二本鎖構造やG4構造を足場として利用したDNA触媒から優れた触媒能をもつシステムが報告されている。特に、G4構造は溶液状態によって高次構造が大きく変化するため、不斉反応のキラルを制御する重要な足場として数多く報告されている。本研究では、二重鎖とG4を組み合わせた新しいDNA構造体を合成評価し、不斉マイケル付加反応の触媒として応用した結果を報告した。まず、NMRによる天然DNA構造体の解析結果から不斉反応のメカニズムを考察し、その塩基配列内に化学修飾 (ビピリジンやウレアなどの金属イオンを配位可能な化合物) を導入した各種DNA構造体を合成し、熱安定性、金属結合能、触媒能を詳細に解析した。その結果、化学修飾を導入したDNA構造体は安定なアンチパラレルG4構造を形成しており、特にウレアを導入したDNA構造体が不斉マイケル付加反応に対して効率的な触媒活性を有していた。ウレアを導入したDNA構造体は、他の多くの不斉マイケル付加反応に対しても有効に機能しており、二重鎖とG4を組み合わせた新しいDNA構造体を用いたDNA触媒システムの実験結果をまとめ、論文として報告した。</p>			

2. トロンビンを標的とするアミノ酸核酸ハイブリッドアプタマーの合成

タンパク質や小分子などと強く特異的に結合する核酸として、アプタマーは開発されたシステムである。本研究では、DNAにアミノ酸残基を組み込む新しいアプタマーシステムを提唱し、高次構造や特性が既知であるトロンビン結合DNAアプタマー (TBA15) をコントロールのアプタマーとして用いた。実際に、標的のトロンビンとの結合領域に各種アミノ酸残基を導入することで、化学修飾したTBA15のアプタマーライブラリーを合成した。そのライブラリーを用いてトロンビンに対するアプタマー活性を測定した結果、疎水的なフェニルアラニン残基を導入したTBA15において、2~3倍の結合性と抗凝固性の向上が観察された。DNAアプタマーの分子モデリングやEMSAの結果からも、活性の向上を示唆する実験データが得られた。本研究で開発を進めたアミノ酸残基を組み込む新しいアプタマーシステムは、核酸アプタマーの特性に加えて、導入したアミノ酸に由来する特性も有していた。本研究から天然核酸のアプタマーより優れた性能を持つものが確認されており、将来的には診断や検出に関連する応用研究が期待される。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

DNAは、水溶液中で自己相補的に2本鎖を形成するバイオ素材として魅力的な可能性を持っている。この2本鎖構造はいわゆる不斉反応場を形成しており、これまで様々な不斉反応の触媒としての機能が報告されている。また、グアニンに富むDNAは4重鎖構造を形成することが知られており、2本鎖構造とは異なる不斉反応場と不斉反応の触媒機能が報告されている。加えて、DNAは固相合成法による化学合成技術が確立しており、任意の化学的特性を持つ官能基を決まった配列内に導入することができ、試験内進化法によって様々な基質に対して特異性のある核酸アダプターも取得されている。

申請者は、まず2本鎖構造とグアニン4重鎖構造から特異な高次構造(QD構造)を形成するために、様々なピリジン配位子やウレア誘導体を導入した修飾核酸誘導体(モジュラーQDハイブリッド)を合成した。それらの高次構造の熱力学的な安定性や、金属配位能を分光学的な手法で評価した結果、モジュラーQDハイブリッドは化学修飾の影響を受けず、熱力学的に安定な構造を取ることが明らかになった。次いで、不斉マイケル付加反応に対して、モジュラーQDハイブリッドを不斉反応場として用いて検討を進めた。様々なモジュラーQDハイブリッドを用いる検討の結果、ウレアを導入した誘導体の中から、高い収率とエナンチオ選択的に反応が進行することが示され、DNAハイブリッド触媒の優れた機能性を明らかにした。

さらに、申請者は血液凝固因子であるトロンビンに対するアダプターに対して、様々なアミノ酸ユニットを導入した修飾核酸誘導体を合成し、それらの血液抗凝固性の機能評価を進めた。その結果、グアニン4重鎖構造のループ部分に疎水性のアミノ酸を導入した修飾アダプターは、未修飾のものと比較して、標的分子に対する高い結合能と抗凝固能を有していることが明らかとなった。加えて、分子モデリングや生化学実験からも高い抗凝固能を支持する結果が得られており、新しいペプチド修飾アダプターのバイオテクノロジーとしての可能性が示された。

以上、天然の核酸構造に対する金属配位子や様々な官能基、アミノ酸側鎖等の核酸配列への位置特異的な導入は、修飾核酸誘導体の効果的な特性変化や、化学的特性、反応活性の向上を実現させており、各種修飾核酸誘導体の研究開発に大きく寄与している。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和4年1月18日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 年 月 日以降