

学位審査報告書

(ふりがな) 氏名	かつだ ようすけ 勝田 陽介
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第号
学位授与の日付	平成24年3月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科 化学専攻
(学位論文題目)	<p>Formulation of DNA Nanostructure Using DNA Origami Method and Direct Observation of Enzymatic Reaction Using High Speed Atomic Force Microscopy (DNAおりがみ法を用いたDNAナノ構造体の構築及び高速原子間力顕微鏡を用いた酵素反応の一分子観察)</p>
論文調査委員	(主査) 杉山 弘 教授 三木 邦夫 教授 藤井 紀子 教授

理学研究科

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	勝田 陽介
論文題目	Formulation of DNA Nanostructure Using DNA Origami Method and Direct Observation of Enzymatic Reaction Using High Speed Atomic Force Microscopy (DNA おりがみ法を用いた DNA ナノ構造体の構築及び高速原子間力顕微鏡を用いた酵素反応の一分子観察)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本主論文において、申請者は 2006 年にRothemundによって報告されたDNAおりがみ法と高速原子間力顕微鏡(高速AFM)を組み合わせることでDNAと酵素の反応の様子を直接一分子観察した。また、DNAおりがみ法により作成したDNAナノ構造体そのものを機能化し、それを同じく高速AFMにより観察した。まずDNAの張り方のDNA修飾酵素の反応への影響について検討を行った。DNA修飾酵素は基質となる 2 本鎖DNAを折り曲げ反応を引き起す場合が多い。したがってこれらの酵素反応は、基質となるDNA鎖の張り方により反応の効率が変化すると考えられる。そこで張り方の異なる 2 本鎖DNAを導入した 2 次元DNAナノ構造体の構築し酵素の反応を検討した。反応場である 2 次元DNAナノ構造体は、内部に 40 x 40 nmの空間を有する「DNAフレーム」構造を用いた。このDNAフレーム構造に、一方は空間と同じ長さ(64 bp:塩基対)のDNA鎖を、他方には 10 bpのゆとりをもたせたDNA鎖(74 bp)を架橋させた。これによって、きっちりと張った 64 bpと緩んだ 74 bpの基質DNAをDNAフレーム構造に導入した。基質DNAとの反応時に 55°-59°折り曲げることが知られているDNAメチル化転移酵素(M. EcoRI)が構築したナノ構造体に対して、基質の 2 本鎖DNAに結合する様子を高速AFMを使用して 1 分子の動的挙動を観察した。また、メチル化の反応への影響を見るため、メチル化後に制限酵素EcoRIで切断した。その結果 64 bpのDNA鎖に比べて 74 bpが切断されにくいことがAFMによる観察で明らかになった。これらの結果は、基質の 2 本鎖DNAの張り方を変化させることで、酵素反応の制御が可能であることを示している。また、損傷した塩基を修復除去するT4 pyrimidine dimer glycosylase と 8-oxoguanine glycosylaseに関しても同様のナノ構造体を作成し、反応の制御と高速AFMによる 1 分子の挙動の観察を行った。</p> <p>次に基質 DNA のトポロジーによる DNA 組み換え酵素反応の制御を行った。大腸菌由来の DNA 組み換え酵素 Cre は 2 本鎖 DNA を配列特異的に相同組み換えする。Cre が認識する LoxP 配列を含む 2 本鎖 DNA を DNA フレームに導入し、Cre による組み換え生成物と組み換え反応を原子間力顕微鏡により観察した。2 本の 2 本鎖 DNA を DNA フレームに固定した場合、基質となる LoxP 配列同士が、同じ向き(parallel)と逆向き(antiparallel)の構造を作成することが可能である。Parallel 配置の 2 本鎖 DNA に Cre を反応させると目的の生成物が得られた。一方、antiparallel 配置の 2 本鎖 DNA を Cre と反応させると、2 本鎖 DNA 同士が中央で接した構造が観察された。</p> <p>次に酵素反応を利用した DNA モーターの一分子観察についても検討を行った。DNA モーターは 1 本鎖 DNA が制限酵素の切断により、近接する相補鎖に移動する原理(分岐移動)を用いた。17 本の相補鎖を DNA ナノ構造上に導入したトラック(約 100 nm)を作成し、その末端(site 1)に移動する DNA モーターを導入した。その結果、酵素を加えることによって、モーター鎖が site 1 から site 17 へ移動することが確かめられた。さらに、モーター鎖がトラック上を移動する様子を高速 AFM によって実時間で可視化し、その運動を DNA ナノ構造体上で確認することに成功した。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

たんぱく質は 20 種類のアミノ酸により構成されており、高い選択性で反応を触媒したり、他の生体分子と相互作用をしている。中でも DNA-たんぱく質相互作用は生命活動を維持するために重要な役割を担っており、これらの反応の分子レベルでの詳細な検討は、多くの重要な知見をもたらす。しかしながら、従来の手法による DNA-たんぱく質相互作用の解析では、多数の分子の振る舞いを平均化した結果を表している場合が多い。細胞内ではたんぱく質分子が一分子で機能を発現していることを考えると、単分子計測による機能解析が重要であると考えられる。

本論文において、申請者は従来の蛍光顕微鏡などを用いた一分子観察という手法ではなく、2006 年に Rothemund によって報告された DNA おりがみ法と高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)を組み合わせて、DNA と酵素の反応の様子を直接一分子観察することを検討し、従来にないリアルタイムでの可視化に成功している。また、DNA おりがみ法により作成した DNA ナノ構造体そのものを機能化し、それを同様に高速 AFM により観察することにも成功している。まず申請者は DNA おりがみ法を用いて、DNA フレームと呼ばれる新しい一分子観測用の構造体を開発した。このフレームに長さの異なる DNA を架橋することにより、酵素反応への DNA の張力の効果を検討した。用いた反応はメチル化酵素および修復酵素であるが、どちらの場合も張力がすくない DNA が高い反応性を示した。これらの結果は修復酵素 - DNA 複合体の X 線結晶構造解析の結果とも対応しており、DNA の張力を変えた反応を行った画期的な実験的な系を開発したと言える。さらに組み替え酵素による反応においては、基質 DNA のトポロジーをコントロールし反応機構について考察することにも成功した。また、DNA おりがみ上にトラックをひいて、DNA モーターの移動の定量化や可視化にも世界に先駆けて成功した。

以上、本論文は DNA おりがみ法を用いた DNA ナノ構造体の構築と高速原子間力顕微鏡を用いた酵素反応の一分子観察について検討した画期的な結果である。分子生物学や構造生物学などの研究分野にも波及する新しい重要な知見を提供し、学術的に価値が高い研究である。また核酸の生物有機化学がこれらの学問分野に大きく貢献できることを示す結果である。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、平成 24 年 1 月 17 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果合格と認めた。

要旨公開可能日： 年 月 日以降