

京都大学	博士（理学）	氏名	山本 清義
論文題目	Design and Evaluation of DNA Nano-devices Using DNA Origami Method and Fluorescent Nucleobase Analogues		
(論文内容の要旨)			
<p>DNA is well known as the carrier of genetic information. Nucleic acid molecules can be utilized as excellent pieces for constructing nano-size structures and devices by using their unique structural motifs, physical robustness and self-assembling features. For constructing desired structure, DNA nano-technologies require elaborate designs and oligonucleotides. The establishment of DNA solid phase synthesis method enables us to readily prepare oligonucleotides which have desired sequences and dramatically advanced DNA-nanotechnologies. In this study, we have constructed a DNA origami tubular structure using a novel method, observed DNA-protein complex formation at single molecule-level using DNA origami template, synthesized and utilized a new emissive nucleoside analogue.</p>			
<u>Helical DNA Origami Tubular Structures with Various Sizes and Arrangements</u>			
<p>We developed a novel method to design various helical tubular structures using the DNA origami method. The size-controlled tubular structures which have 192, 256, and 320 base pairs for one turn of the tube were designed and prepared. We observed the formation of the expected short tubes and unexpected long ones. Detailed analyses of the surface patterns of the tubes showed that the short tubes had mainly a left handed helical structure. The long tubes mainly formed a right handed helical structure and extended to the directions of the double helical axes as structural isomers of the short tubes. The folding pathways of the tubes were estimated by analyzing the proportions of short and long tubes obtained at different annealing conditions. Depending on the number of base pairs involved in one turn of the tube, the population of left-/right handed and short/long tubes changed. The bending stress caused by the stiffness of the bundled double helices and the non-natural helical pitch determine the structural variety of the tubes.</p>			

Single Molecule Visualization and Characterization of Sox2–Pax6 Complex Formation on a Regulatory DNA Element Using a DNA Origami Frame

We report the use of atomic force microscopy (AFM) to study Sox2–Pax6 complex formation on the regulatory DNA element at a single molecule level. Using an origami DNA scaffold containing two DNA strands with different levels of tensile force, we confirmed that DNA bending is necessary for Sox2 binding. We also demonstrated that two transcription factors bind cooperatively by observing the increased occupancy of Sox2–Pax6 on the DNA element compared to that of Sox2 alone.

Development of a Visible Nanothermometer with a Highly Emissive 2'-O-Methylated Guanosine Analogue

We have synthesized a fluorescent base analogue, 2-aminothieno[3,4-d]pyrimidine based G-mimic deoxyribonucleoside, 2'-OMe-thG, and investigated its photophysical properties and DNA incorporation. The 2' methoxy group of 2'-OMe-thG effectively induces the Z-form DNA. Finally we have achieved to construct nanothermometer based on the B-Z transition of DNA using 2'-OMe-thG.

Development of Distance and Orientation Controlled FRET System Using Emissive dG-dC Analogue Pair

We report the new type of Förster Resonance Energy Transfer (FRET)-pair using isomorphous nucleobase analogues. This FRET-pair consists of thdG¹⁻³ as an energy donor and the tC⁴, 1,3-diaza-2-oxophenothiazine, as an energy acceptor. The designed FRET-pair successfully shows distances of one turn of the DNA duplex as the difference in color. A combination of oligonucleotides containing the thG-tC FRET-pair at chosen positions enables to accurately distinguish the distance between donor and acceptor by using fluorescent spectra. In addition, this FRET-pair could form Watson-Crick base pair between thG and tC. This new FRET-pair based on emissive nucleobase analogues will have a great advantage in the study of DNA super organizations.

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

DNA は、A—T と、G—C という Watson-Crick 塩基対を形成によって、相補的な二本の DNA 鎖からなる二重螺旋構造をとっている。近年、DNA は化学的安定性や配列特異性による自己組織化能力が注目され、DNA オリガミ法を用いた DNA を用いたナノ構造体、ナノデバイスの構築が盛んに試みられている。DNA オリガミ法では、長い一本鎖 DNA(template)と相補的な短い一本鎖 DNA(staple)と二重鎖形成させることにより、任意の構造を持った DNA ナノ構造体を得ることが可能である。また蛍光性核酸分子は、生体内での DNA の振る舞いを調べる上で利用することができ、また DNA の構造変化を利用したナノデバイスの材料としても有用である。

申請者は DNA オリガミ法を用い、新たな DNA ナノ構造体として螺旋状 DNA ナノチューブの構築を行い、その詳細な構造について検討を行った。チューブ状構造は単純であるが丈夫であることから構造材料として優れ、また内部の中空構造を利用した物質輸送も可能であり、ナノ構造体として注目されている。申請者は様々な螺旋状 DNA ナノチューブを合成することにより、ゆっくりとしたアニーリング条件では目的とする左巻きの螺旋構造が収率よく形成できることを明らかにした。

さらに DNA フレームと呼ばれる DNA ナノ構造体を用いて、転写因子 SOX2 および Pax6 の DNA への結合を高速原子間力顕微鏡により観測した。その結果 SOX2 が DNA に結合する際、DNA 二重螺旋構造の軸を曲げ、また SOX2 と Pax6 は協奏的に DNA に結合することを一分子レベルで初めて観察することに成功した。

また蛍光性グアノシン類縁体である 2'-OMe-チエノグアノシンを用いた DNA の B-Z 遷移の可視化および DNA ナノ温度計の開発を行った。従来のデオキシチエノグアノシン(³dG)の場合では syn コンホメーションをとりにくいため限られた条件でしかみられなかった B-Z 遷移の可視化に成功した。さらにチエノグアノシンを用いた新たな FRET 対の開発も行った。FRET は分子間の距離を知るためのプローブとして多く用いられている。申請者は ³dG をドナーとして、シトシンの蛍光類縁体であるサイクリックシトシン(tC)をアクセプターとして用いた新たな FRET 対を構築し、その FRET 効率の距離および方向依存性について検討を行った。この新たな ³dG-tC 対はそれぞれグアノシン、シトシンの類縁体であるため Watson-Crick 塩基対を形成することができ、塩基対形成可能な FRET 対はこの ³dG-tC 対が最初の例である。また核酸類縁体であるため厳密に距離と方向を制御することが可能となった。

以上、本論文は DNA オリガミ法を用いた新たなナノ構造体の構築と DNA-タンパク質間の相互作用の一分子解析法の開拓、さらに新規蛍光性核酸類縁体による DNA 高次構造の遷移の可視化、機能化について述べており極めて独創的なものである。これらの申請者の成果は DNA ナノ構造体の構築と解析、機能性核酸類縁体の研究において非常に重要なものであると考えられる。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られる。また、平成28年1月12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、合格と認められた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降