

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	韓 知勳 (Ji Hoon Han)
論文題目	Fluorescent Nucleobases for Studying DNA Structure, Protein Interaction and Metal Binding (蛍光性核酸類縁体の合成と応用 : DNA-タンパク質複合体の構造及びメタルセンシングに関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>Nucleic acids are the biopolymers that play a crucial role in vital cellular function such as storage, transfer of genetic information, catalysis and regulation of gene expression. The lack of intrinsic emission of nucleic acids triggered the development of fluorescent nucleic acids. Since Stryer reported 2-aminopurine (2AP) in 1969, development of fluorescent nucleobases has been rapidly growth. A large number of fluorescent nucleobases have been synthesized and employed in broad range of chemical, structural, biophysical and biochemical implementations. Among various applications, Förster resonance energy transfer (FRET) method using fluorescent nucleobases as a donor and an acceptor is a very useful and powerful tool to study for DNA structural dynamics and DNA-protein interactions. The development of the orientation- and distance-dependent FRET system is very challenging task due to conventional FRET methods rely on only distance.</p> <p>During my PhD studies, I synthesized a series of fluorescent nucleosides based on thieno[3,4-d]pyrimidine core and developed nucleic acid-based FRET system which was applied to investigate nucleosomes. I also synthesized a new fluorescent thymine analogue, ^{diox}T, and investigated the utility of ^{diox}T-containing oligonucleotides as a DNA-based metal sensing system which selectively detects Hg²⁺ and Ag⁺ in aqueous solution.</p> <p><u>Chapter 1: Development of a Vivid FRET System Based on a Highly Emissive dG-dC Analogue Pair</u></p> <p>In this study, I focused on the versatility of the fluorescent G surrogates thdG and 2'-OMe-thG as FRET donors for the establishment of a new FRET system based on nucleobase analogues. Here I demonstrate Watson-Crick base-pairable FRET pair that consists of the highly emissive DNA analogues thdG as the energy donor and tC as the energy acceptor.</p> <p>I also investigated the orientation- and distance-dependent FRET efficiency using a DNA scaffold in which the distance and orientation factors were systematically controlled using donor and acceptor separations of 0 to 14 base pairs. I applied new nucleic acid-based FRET pair to monitor DNA topological changes, B-Z transition, and achieved the visualization of the conformational change of DNA.</p>			

Chapter 2: Approach to the Investigation of Nucleosome Structure by Using Highly Emissive Nucleobase thdG-tC FRET Pair

I devised a novel approach to investigate nucleosomes via the application of a nucleobase analogue thdG-tC FRET system. For previous conventional methods, fluorophore attached to nucleobases or histone proteins via carbon linkers to monitor and detect DNA modulation during genetic processes. However, random rotation of dyes leads to a difficulty in the interpretation of orientation-dependent FRET signal. In this study, I successfully incorporated a nucleobase FRET pair into 601 nucleosomal DNA sequences DNA by PCR and reconstituted the nucleosome using the modified DNA. I prepared the systems for two scenarios that predicted different FRET values and calculated their FRET efficiencies by ensemble fluorescence measurement. As a result, different FRET efficiencies were obtained for the designated donor and acceptor positions in the nucleosome.

Chapter 3: New Size-Expanded Fluorescent Thymine Analogue: Synthesis, Characterization and Application

I synthesized the new size expanded thymine nucleoside, ^{diox}T, with high quantum yield and observed solvatochromic emissions in different polar solvents. Furthermore, I found that the photophysical properties of ^{diox}T could be affected by nearest neighboring bases. The combination sets of nearest neighboring bases, AA, AT, AC, TA, TC and TT, showed distinguishable photophysical characteristics including quantum yields. Interestingly, the fluorescence of ^{diox}T-containing oligonucleotide increased upon hybridization to the complementary strand. For further application using ^{diox}T, I investigated metal binding modes of ^{diox}T-containing duplexes and observed the significant fluorescence quenching with DNA duplexes containing ^{diox}T-Hg²⁺-T or ^{diox}T-Ag⁺-C base pair. This result suggests the potential of ^{diox}T to develop DNA-based metal sensor.

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

蛍光プローブはタンパク質や核酸など生体分子の検出やそのふるまいを調べるため非常に強力な手段であり、有用な蛍光プローブの開発を目指した研究が活発に行われている。中でも、蛍光性核酸類縁体の開発は天然核酸塩基が蛍光を持たないため、ケミカルバイオロジー領域の重要な挑戦課題となっている。

本論文で申請者は、蛍光性核酸類縁体を用いたFRETシステムを構築し、DNA やDNA-タンパク質複合体の構造変化を検出する方法を開発した。また、蛍光性チミン類縁体を合成し、メタルセンサーとしての評価を行った。

第1章では、蛍光性グアニン及びシトシン類縁体であるthdGとtCを用いたWatson-Crick塩基対を形成可能なFRETシステムについて報告した。申請者は、実験で得られたFRET効率を理論値と比較・評価することにより、このシステムのエネルギー移動効率がDNA内での距離と配向の両方に依存していることを明らかにした。さらに、FRETの配向依存性を利用し、DNAのB型-Z型コンフォメーション変化の可視化に成功した。

第2章では、蛍光性核酸FRET対thdGとtCを含むDNAをヒストンタンパク質と複合体を形成させることによりヌクレオソームを構成し、FRET効率を調べた。ヒストンオクタマーに強い親和性を持つことが知られている147塩基対の601配列がテンプレートとして選択され、PCR反応により合成された。FRET効率はヌクレオソーム内部のドナーとアクセプターの距離と配向に依存していることを明確に示唆する結果が得られた。これにより、ヌクレオソームの構造変化と修飾反応の関係などメカニズムの解明を目指す有望な戦略が示された。

第3章では、1,3-ジオキソロン骨格を有する新しい共役系拡張型蛍光性チミジン類縁体^{dioxT}を合成し、その光物理的特性を評価した。^{dioxT}は可視光領域に強い蛍光を持っており、DNA二重鎖融解実験の結果、天然のチミンと同様な熱力学的安定性と塩基対選択性を示した。さらに^{dioxT}-Tのミスマッチを含むDNA二重鎖の場合、水銀イオン特異的に蛍光のクエンチングが観測され、水銀イオンデバイスとしての応用が示された。

以上、本論文では、蛍光性核酸類縁体を合成し、その光物理的特性を評価するとともにFRETシステムの構築やメタルセンサーとしての応用研究を行った。申請者が確立したFRETシステムと分析技術はヌクレオソーム研究に限らず、核酸の高次元構造変化やタンパク質との相互作用などを可視化する有用な基盤技術として生物化学分野の発展に大きく寄与すると考えられる。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る。また、平成31年1月15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。

要旨公表可能日： 年 月 日以降