

様式 I

博士学位論文調査報告書

論文題目

Enhancing the stability of DNA origami nanostructures by enzymatic and chemical ligation methods

(酵素および化学ライゲーション反応による DNA オリガミナノ構造体の安定化に関する研究)

申請者 KIRAN KUMAR KRISHNA MURTHY
(キラン クマール クリシャナ ムルティ)

最終学歴 令和 4 年 9 月
京都大学大学院エネルギー科学研究科エネルギー基礎科学専攻博士後期課程
研究指導認定退学

学識確認 平成 年 月 日 (論文博士のみ)

調査委員 京都大学大学院エネルギー科学研究科
(主査) 教授 森井 孝

調査委員 京都大学大学院エネルギー科学研究科
教授 片平 正人

調査委員 京都大学大学院エネルギー科学研究科
教授 佐川 尚

(続紙 1)

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	KIRAN KUMAR KRISHNA MURTHY
論文題目	Enhancing the stability of DNA origami nanostructures by enzymatic and chemical ligation methods (酵素および化学ライゲーション反応による DNA オリガミナノ構造体の安定化に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>持続可能で効率的なエネルギーシステムを構築する上で、光合成や代謝など様々な生体エネルギープロセスを通じて、エネルギーを効率的に利用する生物のエネルギー利用法を学び模倣することは、必要不可欠である。生物のエネルギーシステムを再構築するうえで、DNA オリガミナノ構造体が新たな機能性材料として期待されている。DNA オリガミナノ構造体は、ナノメートル精度で複雑なナノ構造を自在に設計できる汎用性と、酵素分子などをあらかじめ設計した空間に配置できる制御性を合わせ持つため、エネルギーを伝達する、物質を変換する、様々な外部刺激に応答するなどの機能性材料を合目的に設計するうえで理想的な足場である。</p> <p>自然界の効率的な生体エネルギープロセスを模倣し、人工的に設計したエネルギー利用システムを構築することを目指して、これまでに DNA オリガミナノ構造体を分子スイッチボードとして利用して、複数種類の酵素を配置した多段階反応場を構築し、より生体に近い環境下での分子レベルでの代謝反応の研究が、ナノテクノロジー、構造生物学、生物物理学を駆使して行われてきた。一方で、このように幅広い応用可能性を持つ DNA オリガミナノ構造体には、構造安定性が低いという問題が存在する。温度や pH、高塩濃度などの環境下、さらに変性剤などの存在下での構造の不安定化や、ヌクレアーゼやそれを含む細胞内環境では、加水分解により DNA オリガミナノ構造が維持できないことが知られており、DNA オリガミナノ構造体の幅広い応用展開を目指す上で支障をきたしている。</p> <p>DNA オリガミナノ構造体の不安定性の主な要因の一つは、DNA オリガミナノ構造体を形成するうえで利用する短い鎖長の DNA (短鎖 DNA) の不連続性、即ち、リン酸主鎖のニック (切れ目) の存在である。この問題を解決するためには、DNA オリガミナノ構造体のニック部分を連結 (ライゲーション) してリン酸ジエステル結合を形成することによって、構造体を安定化することが考えられるが、これまでに DNA ナノ構造体に連結反応を施した研究報告例はほとんどなく、連結反応を実施する上での最適条件等に関する情報が不足している。</p> <p>リン酸ジエステル結合連結反応の一つである酵素連結反応 (酵素法) は、分子生物学実験では、日常的に行われている手法である。その一方で、DNA オリガミナノ構造体では、ほとんど報告例がない。また、別法として知られるリン酸ジエステル結合の化学連結法は、反応に小分子試薬を用いるため、反応点であるニックへの試薬の接近が阻害されにくい。通常の 2 本鎖 DNA では反応速度も速く反応収率も高いため、DNA オリガミ構造体において酵素法よりも高効率に連結反応が進行すると期待できる。</p> <p>本論文では、酵素 T4 DNA リガーゼによるニック部分のリン酸ジエステル結合連結反応に影響を与える重要な要因を理解し、DNA オリガミナノ構造体を酵素法によって効率的に連結</p>			

するための最適化条件と、改良手法を確立した。さらに、酵素法による DNA オリガミナノ構造体内でのリン酸ジエステル結合形成反応の限界を克服するために、ニックでの天然のリン酸主鎖骨格を維持した化学連結反応法を確立することを目的とした。2次元 (2D) および3次元 (3D) 構造を持つ DNA オリガミナノ構造体のニック部分を、天然のリン酸主鎖骨格として連結する3種類の方法を詳細に検討し、それらの特性を明らかにするとともに、DNA オリガミナノ構造体を機能性材料として応用展開するうえでの基礎的な知見を明らかにした。

DNA オリガミナノ構造体のニック部分での効率的な連結反応が達成されることで、DNA オリガミナノ構造体の安定性が飛躍的に向上し、機能性材料として様々な応用展開を目指す際にも安定な足場を提供できるようになる。本論文は、8章からなっている。

第1章は序論であり、DNA ナノテクノロジーの紹介と、本論文に関連する DNA オリガミナノ構造体の現在に至るまでの発展について議論した。特に、DNA オリガミナノ構造体の安定性に影響するさまざまな因子と、構造の不安定性によるその応用展開の制限について述べ、これまでに報告されている DNA オリガミナノ構造体の安定性化戦略の限界について議論した。また、その解決策の一つとして考えられている DNA のリン酸ジエステル結合形成に関して、既存の研究を系統的にまとめ、それぞれの問題点を議論した。最後に、上述の点を踏まえ本研究の目的と意義を論じた。

第2章では、T4 DNA リガーゼによる DNA オリガミナノ構造体のニック部分での連結反応を詳細に検討した。形状、大きさ、短鎖 DNA の長さが異なる4種類の2D DNA オリガミナノ構造体に、様々な条件で酵素法を適用した際の短鎖 DNA 連結収率を比較して、2D DNA オリガミナノ構造体での酵素法による連結反応を最適化した。また、短鎖 DNA の連結によって引き起こされる DNA オリガミナノ構造体の構造変化について詳細に議論し、DNA リガーゼ反応機構をもとにして、DNA オリガミナノ構造体の構造的特徴に関する新しい知見を得た。

第3章では、特徴的なトポロジーを有する DNA 構造について簡単に紹介し、DNA トポロジーの生理的な役割や、それらの DNA とタンパク質との相互作用を理解するための足場としての DNA オリガミナノ構造体の役割を概説した。トポロジー的に連結されたミニサークル、ロタキサン、およびカテナン構造 DNA を有する DNA オリガミナノ構造体を設計し、それらが実際に DNA オリガミ上に構築されたことを確認した。また、単独のミニサークルおよび DNA オリガミ上でのニックの酵素法による連結反応を、アガロースゲル電気泳動分析および原子間力顕微鏡イメージングによって評価した。

第4章では、共溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いる酵素法を開発した。T4 DNA リガーゼによる DNA オリガミナノ構造体のニック連結反応への様々な有機溶媒の影響を検討した結果、DMSO を共溶媒として使用した際に、2D DNA オリガミナノ構造体内で、ほぼ定量的に短鎖 DNA が連結されることを明らかにした。さらに、様々な反応因子を評価することによって、反応条件を最適化し、核酸や酵素の安定性とコンフォメーション変化に対する有機溶媒の影響について考

察した。それをもとに、DMSO を添加することで、DNA オリガミナノ構造体のニックへの酵素の接近が促進され、ニックをほぼ定量的に連結できる機構を提唱した。

第 5 章では、臭化シアン (CNBr) による DNA オリガミナノ構造体の化学連結法を詳細に検討した。2D DNA オリガミナノ構造体のニックを効率的に連結するために、バッファーの種類と濃度、pH、CNBr 濃度、反応時間などを詳細に検討し、最適の反応条件を確立した。さらに、化学連結法条件での蛍光色素修飾短鎖 DNA の安定性を評価したところ、色素によっては反応条件下で分解した。また、DNA オリガミ構造体に対して化学連結法を適用した場合に生じる DNA オリガミ構造体の多量化について検討し、化学連結法の適用制限について詳細に検証し、議論した。

第 6 章では、第 2 章、4 章、および 5 章で確立した 3 種類の連結法を 3D DNA オリガミナノ構造体に適用し、それぞれの連結反応収率を比較した。4 種類の 3D DNA オリガミナノ構造体を調整し、各連結法の最適条件で反応させ、3D DNA オリガミナノ構造体の安定性を評価した。その結果、酵素法では、共溶媒の有無に関わらず、連結反応がほとんど進行しなかった。その一方で、化学連結法では 3D DNA オリガミナノ構造体の形状の違いに関わらず、効率的に連結反応が進行した。

第 7 章では、上記 3 種類の連結法を適用した 2D または 3D DNA オリガミナノ構造体について、ヌクレアーゼに対する安定性、および細胞破碎液中での安定性を評価した。連結反応を施していない、もしくは通常の酵素法で処理した 2D DNA オリガミナノ構造体は、ヌクレアーゼや細胞破碎液で処理することによってすみやかに分解されたが、DMSO 共存下での酵素法および化学法で連結した 2D DNA オリガミナノ構造体のそれらの条件での安定性は有意に向上した。一方、3D DNA オリガミナノ構造体は、化学連結法においてのみ、有意な安定性の向上が確認された。これらの結果を踏まえて 3 種類の連結法の適用条件を総括した。

第 8 章は、本論文の総括である。DNA オリガミナノ構造体は、比較的剛直かつ 2 本鎖 DNA が密集した構造であるため、酵素法では、立体障害により、単独の 2 本鎖 DNA との反応よりも反応効率が低い。DMSO 共存下の酵素法では、反応速度が向上し、より少量の酵素を用いても、上述した酵素法と比べて格段に連結収率を高める。酵素法は、2D DNA オリガミナノ構造体に対して効果的であったが、3D 構造体に対しては有効ではない。3D 構造体は 2D 構造体よりも立体的に混んでいるため、反応点に酵素が接近することが困難になるためと考えられる。一方、化学連結法は、非常に短い反応時間でほぼ定量的に連結反応が進行する。しかも、2D DNA オリガミナノ構造体のみならず、3D DNA オリガミナノ構造体も有意に安定化できる。

これらの連結法を適用することによって、高温下、およびヌクレアーゼ存在下や細胞破碎液中でも、有意に DNA オリガミナノ構造体の安定性を向上できる。本論文の研究成果は、安定化した DNA オリガミナノ構造体を様々な目的で応用展開するうえで、画期的な技術を提供するものである。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

DNA オリガミナノ構造体は、複雑なナノ構造を自在に設計できる汎用性と、特定の分子をあらかじめ設計した空間に配置できる制御性を合わせ持つため、エネルギーを伝達する、物質を変換するなどの機能をもったナノ材料を構築できる。酵素の空間配置を制御した人工代謝経路の構築など、DNA オリガミナノ構造体には幅広い応用が期待されるが、一方で、高温や低 pH 溶液中で構造を維持できないという問題が、その応用を展開するうえでの大きな障害となっている。DNA オリガミナノ構造体が不安定である主な要因は、構造体を構成する短鎖 DNA 間でのリン酸ジエステル結合の切れ目（ニック）の存在にある。そのため、ニック部分で短鎖 DNA を連結すると、構造体の安定性が向上することが考えられるが、DNA ナノ構造体中での短鎖 DNA 連結反応は、これまでにほとんど報告されていない。

本論文では、DNA オリガミナノ構造体の安定化を目指して、構造体中の短鎖 DNA をリン酸ジエステル結合によって連結する反応を詳細に検討し、DNA リガーゼを用いた酵素連結法、共溶媒存在下での酵素連結法、および臭化シアン (CNBr) による化学連結法を開発した。異なる特徴を有するこれら 3 種類の方法を、構造体内の短鎖 DNA 連結収率を基準にして最適化し、反応の特徴を詳細に検証、比較評価することで、それぞれの方法を適用するうえでの以下の重要な知見を得た。

(1) DNA リガーゼを用いた酵素連結法の条件を最適化し、2次元 (2D) DNA オリガミナノ構造体では、50%程度の連結収率を得た。この反応を利用して、安定な DNA トポロジー構造、カテナンとロタキサンを 2D DNA オリガミナノ構造体上で構築した。

(2) 共溶媒としてジメチルスルフォキシド (DMSO) を用いた酵素連結法により、2D DNA オリガミナノ構造体では、ほぼ定量的に連結反応が進行した。

(3) CNBr 法では、2D DNA オリガミナノ構造体だけでなく 3次元 (3D) DNA オリガミナノ構造体でも、非常に短い反応時間でほぼ定量的に連結反応が進行した。

(4) 連結反応を施した 2D および 3D DNA ナノ構造体は、熱的安定性が向上するとともに、スクレアーゼ存在下や細胞抽出液中でも安定性が向上した。

これらの成果は、カーボンニュートラル社会での新しい物質生産法として期待される人工代謝経路をはじめとしたエネルギーシステムを細胞外で構築するうえで、DNA オリガミナノ構造体の利用を促進するものである。

よって、本論文は博士 (エネルギー科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 5 年 6 月 23 日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。

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。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 2023 年 10 月 23 日以降