

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	安倍 克彦
論文題目	DNA Nanotechnology and Atomic Level Understanding for a Complex of DNA and a DNA Minor Groove Binder (DNAナノテクノロジーとDNAおよびDNAマイナーグループバインダーから成る複合体の原子レベルでの理解)		
(論文内容の要旨)			
1. 序論			
<p>DNA origamiやDNA tensegrity triangleは、近年注目を集めている生体ナノテクノロジー分野で用いられる生体ナノ構造体の一つである。これまでナノ構造体の機能と構造を解析評価する研究や、ナノ構造体のドラッグデリバリーシステム(DDS)としての生体内機能評価まで、多種多様な幅広い実験が実施されている。また、X線結晶構造解析技術の革新によって、1953年の歴史的なDNA二重らせん構造の解析をはじめ、生体分子やその結合分子に関する原子レベルでの知見が得られている。人工的なDNA副溝結合分子として開発されたピロールイミダゾールポリアミド(PIP)は、興味深いDNAに対する配列特異的な結合性を有している。</p> <p>申請者は、DNAナノ構造体を用いた分子機能や配置の制御技術に関する研究や、PIPとDNAの複合体のX線結晶構造解析に関する研究を進めた。それらの反応機構を補完する多くの実験結果を基にして、DNA結合に起因する構造変化を確認している。</p>			
2. <u>Construction of an optically controllable CRISPR-Cas9 system using a DNA origami nanostructure</u>			
<p>近年、DNAナノテクノロジーの分野は急速に発展しており、様々な応用研究、特に生体応用を指向する研究が進んでいる。その中でもDNA origami技術は設計した配列をもつDNA群を準備すれば、簡便にワンポット反応で設計に基づいたナノ構造体を形成できることから、注目を集めている。申請者は、DNA origami技術と光制御の融合研究への展開に向けた最初のステップとして、非細胞系でDNA origami内のタンパク質の放出を光によって制御する研究を行なった。実際に、光によってDNA origami ナノ構造体上で、CRISPR-Cas9システムをon/off制御する実験を行い、高速AFM測定によって構造や機能の変化を確認した。今後、これらの成果を基にして、細胞内での光制御が可能になれば、関連分野の更なる発展に寄与できると考える。</p>			

### 3. Creation of crystals containing metal-bipyridine chelate based on the tensegrity triangle

DNA tensegrity triangleはDNAナノ構造体の一種であり、自己組織化により三次元の結晶格子を形成することで構築できる。このナノ構造体は規則的な格子を形成するため、様々なゲスト分子をその格子内に内包できる可能性を有している。申請者は、金属ビピリジン錯体をゲスト分子としてDNA tensegrity triangle内に導入し、X線結晶構造解析によってゲスト分子の内包を確認する実験を行った。同様に、配置できる金属イオンの多様性を実証するために、 $\text{Ni}^{2+}$ や $\text{Fe}^{2+}$ などの異なる金属イオンを導入する実験も行った。それらの結果、結晶構造の分解能はやや低いものの、設計に基づいた位置に金属由来の異常分散効果の信号を観測することに成功した。

### 4. X-ray Crystal Structure of a Cyclic-PIP-DNA Complex in the Reverse Binding Orientation

DNA結合分子の結合メカニズムを正確に理解するためには、X線結晶構造解析による詳細な結合様式の解明が鍵となる。PIPは、ピロールとイミダゾールの分子内の配置を変えることで、二本鎖DNA構造内の任意の塩基配列に対して特異的に結合する機能分子として設計することが可能である。申請者は、これまで報告がなかったDNA副溝内で既知の配向とは逆向きに結合した環状PIP (cPIP) -DNA複合体の結晶化に成功した。そして、得られたDNA複合体のX線結晶構造を解析した結果、1.5Åの分解能でDNA複合体の構造を報告した。既知の正配向に結合したcPIP-DNA複合体の結晶構造との比較を行い、cPIPと二本鎖DNAとの間の結合様式の解明を行った。

### 5. Structural studies of a complex of a CAG/CTG repeat sequence-specific binding molecule and A-A-mismatch-containing DNA

CAG/CTGリピート配列の異常伸長によって、ハンチントン病などの先天性異常疾患が引き起こされることが知られている。しかしながら、これらの先天性疾患の根本的な治療法は現在も確立されていない。申請者は、CAG/CTGリピート配列に結合するcPIPを用いて、A-Aミスマッチ塩基対を含むCAGヘアピンDNA複合体の結晶化に成功した。得られたDNA複合体のX線結晶構造解析を行い、その結合様式を含めた構造解析結果を報告した。この構造の有効性については、コンピューターモデリングや量子化学計算、ゲル電気泳動によって確認している。加えて、cPIPがCAG/CTGリピート配列を持つ二本鎖DNAに対して結合する動態を調べるために、DNA origamiと高速AFM測定を用いた直接観察によってダイナミックなヘアピン-二本鎖間の構造変化を捉えることにも成功した。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

様々な疾患において、原因の解明や新規治療法の開発を目指す多くの研究が行われており、生体ナノテクノロジーの分野はそれら研究を支える技術の一翼を担っている。X線結晶構造解析によって、これまで数多くの生体分子やその結合分子の結晶構造が解明されており、生体反応のメカニズム解析に役立っている。DNA配列特異的な結合性をもつピロールイミダゾールポリアミド (PIP) の原子レベルでの結合様式の解明や構造に関する研究成果は、将来的な薬剤応用を目指す上で重要である。

DNA origami技術の特性は生体ナノ構造体の構築において有用である。特に生体関連物質をorigami構造内の設定した位置に配置することが可能であり、DNA origamiに対する細胞への輸送体、ドラッグデリバリーシステム(DDS)としての基盤材として近年利用されている。また、生体分子の光制御の研究分野は、その高い波長選択性と透過性によって多くの応用例が報告されている。将来的に、光によってDNA origami ナノ構造体上で様々な遺伝子機能を、細胞内でon/off制御することが可能になれば、申請者の報告した光制御研究の意義が高まると考える。また、申請者は、X線結晶構造解析によって、ゲスト分子である金属ビピリジン錯体のナノ格子内での存在を確認することに成功しており、これはDNA tensegrity triangleにゲスト分子を導入した例として希少な報告例である。

また、PIPとDNAの複合体のX線結晶構造解析に関する研究成果に関して、申請者はこれまで報告されていなかった環状PIP (cPIP) -DNA複合体の結晶の逆配向結合様式を詳細に解析することに成功した。加えて、PIPとDNAの間での配向性を制御する要因について実験結果に基づいて考察し、cPIPの配向選択性の機構の解明を進めた。

様々な先天性のトリプレットリピート疾患が存在しており、3塩基からなるリピート配列の異常伸長によって病態が進行することが知られている。申請者が解析したCAG/CTGリピート配列に結合するcPIPは、優れた配列特異的結合性を持っている。また、マウス実験によってリピート病の原因となる異常遺伝子の発現を抑制した結果も既に報告されており、薬剤候補として興味深い可能性を示している。そのため、申請者によってA-A mismatches塩基対を含むCAGヘアピンDNA複合体のX線結晶構造が解明されたことは、cPIPの薬剤機構の解明を進めるために重要である。

以上の研究において、申請者は origami技術と光制御の融合研究とcPIPを用いた様々な配列を持ったDNA複合体のX線結晶構造解析を行った。本研究から得られた知見は将来的な生体ナノテクノロジー研究において基礎となり、cPIP、特にCAG/CTGリピート配列を標的とする機能分子の開発を促進させると考える。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6年1月16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