

## 論文審査の結果の要旨

氏名 西山 康太郎

DNA は、構成要素である核酸塩基が相補的な水素結合を介して対合することで、配列特異的に二重鎖構造を形成する。核酸塩基対が一次元方向に集積したナノサイズの高分子であることから、DNA はナノテクノロジー分野における分子基盤として注目を集めている。一方で、DNA と金属錯体の性質を掛け合わせた「金属錯体型人工 DNA」の開発がなされてきた。金属錯体型 DNA は、天然の水素結合型塩基対の代わりに、金属配位子として振舞う人工核酸塩基と金属イオンとの 2:1 錯体である「金属錯体型人工塩基対」をもつ。金属錯体型塩基対は特定の金属イオンに応答して形成され、DNA 二重鎖構造の熱的な安定化や、動的な DNA 構造の変換、特異な物性の発現が可能になる。そのため、新規なナノマシンやナノ材料の分子基盤として期待されている。

本研究では、水素結合型塩基対と金属錯体型塩基対が動的に切り換わる「金属応答性二面型 DNA 塩基対」の開発を目指した。具体的には、ウラシルの 5 位に水酸基を修飾した 5-ヒドロキシウラシル ( $\text{U}^{\text{OH}}$ ) 塩基を用いた。 $\text{U}^{\text{OH}}$  塩基は、天然のアデニン (A) 塩基と水素結合を介した塩基対 ( $\text{U}^{\text{OH}}\text{-A}$ ) を形成する。一方で、 $\text{U}^{\text{OH}}$  塩基の 4 位のカルボニル基と 5 位の水酸基が二座配位子として機能し、DNA 二重鎖中で向かい合う  $\text{U}^{\text{OH}}$  塩基同士を金属イオンが架橋した金属錯体型塩基対 ( $\text{U}^{\text{OH}}\text{-M-U}^{\text{OH}}$ ; M = 金属イオン) を形成すると考えた。もし、 $\text{U}^{\text{OH}}$  塩基と金属イオンとの錯体形成により、これら 2 種類の塩基対の相対的な安定性を逆転させることができれば、各塩基対が動的に入れ換わる「金属配位駆動型 DNA 鎖交換反応」が可能になると考えた。金属イオンの滴下と除去のみで可逆的な鎖交換反応を達成できれば、アニーリング操作や段階的な DNA 鎖の添加を必要とせず熱力学的に安定な DNA 二重鎖を動的に得ることができる。また、生体機能の人為的制御を目指し、 $\text{U}^{\text{OH}}$  塩基を用いた金属応答性三重鎖形成オリゴヌクレオチド (TFO) の開発を目指した。 $\text{U}^{\text{OH}}$  塩基を有する TFO は、 $\text{U}^{\text{OH}}$  塩基の水素結合部位による DNA 二重鎖構造の認識と、金属配位部位と金属イオンとの錯体形成に基づく三重鎖構造の制御が可能になると期待した。

本論文は全 6 章からなり、第 1 章では DNA の自己集合特性や外部刺激応答性核酸の意義、二面型核酸塩基の展望が述べられ、本研究の目的と意義を議論している。

第 2 章では、5-ヒドロキシウラシル ( $\text{U}^{\text{OH}}$ ) 塩基を用いた金属錯体型塩基対の形成を報告している。 $\text{U}^{\text{OH}}\text{-U}^{\text{OH}}$  塩基対を 3 対導入した DNA 二重鎖と各種金属イオンとの錯体形成を、紫外吸収分光法などの各種分光法や質量分析法により検討した。その結果、DNA 二重鎖中において、3 対の金属錯体型塩基対 ( $\text{U}^{\text{OH}}\text{-M-U}^{\text{OH}}$ ; M =  $\text{Zn}^{\text{II}}$ ,  $\text{Gd}^{\text{III}}$  etc) が

定量的に形成することを明らかにした。 $\text{U}^{\text{OH}}\text{-M-U}^{\text{OH}}$  塩基対の形成に基づき、金属イオンに応答した DNA 二重鎖の熱的な安定化と、金属イオンの集積化に成功している。

第 3 章では、金属イオンに応答した  $\text{U}^{\text{OH}}$  塩基を含む DNA 鎖の二重鎖形成選択性の制御を議論している。 $\text{U}^{\text{OH}}$  塩基が  $\text{Gd}^{\text{III}}$  イオンと錯体を形成することによって、水素結合を介した  $\text{U}^{\text{OH}}\text{-A}$  塩基対が熱的に不安定化することを見出した。その結果、 $\text{Gd}^{\text{III}}$  非存在下では水素結合を介した  $\text{U}^{\text{OH}}\text{-A}$  塩基対を含む DNA 二重鎖が熱的に最も安定である一方で、 $\text{Gd}^{\text{III}}$  存在下では  $\text{U}^{\text{OH}}\text{-M-U}^{\text{OH}}$  塩基対を含む DNA 二重鎖がより安定になることを実証した。また、 $\text{Zn}^{\text{II}}$  イオンと  $\text{U}^{\text{OH}}$  塩基との錯体形成が pH に依存し、 $\text{Zn}^{\text{II}}$  と pH の両方に応答して DNA 二重鎖の安定化と不安定化が起こることを明らかにした。

第 4 章では、 $\text{U}^{\text{OH}}$  塩基の塩基対スイッチングを介した可逆的な金属配位駆動型 DNA 鎖交換反応の開発を報告している。 $\text{Gd}^{\text{III}}$  イオンの滴下および等量の EDTA による  $\text{Gd}^{\text{III}}$  イオンの除去により、DNA 鎖交換反応が可逆的に進行することを実証した。種々の検討の結果、 $\text{U}^{\text{OH}}$  塩基の数と  $\text{Gd}^{\text{III}}$  イオンの当量を増やすことで、交換反応の収率が最大 80% まで上昇することを明らかにした。この鎖交換反応は、追加の DNA 鎖を必要とせず、金属イオンの滴下と除去のみで可逆的に進行するため、DNA ナノマシンなどの動的なシステムにおける原動力として期待される。

第 5 章では、金属イオンに応答して二重鎖への結合能を制御可能な  $\text{U}^{\text{OH}}$  塩基含有三重鎖形成オリゴヌクレオチド ( $\text{U}^{\text{OH}}\text{-TFO}$ ) の開発を報告している。 $\text{U}^{\text{OH}}\text{-TFO}$  が標的の天然 DNA 二重鎖を認識し、三重鎖構造を形成することを確認した。さらに、 $\text{Gd}^{\text{III}}$  イオンを作用させることで、 $\text{U}^{\text{OH}}\text{-TFO}$  の二重鎖への結合能を減少させることに成功した。DNA 三重鎖構造の形成は RNA ポリメラーゼの機能を阻害するため、 $\text{U}^{\text{OH}}\text{-TFO}$  は金属応答性の人工転写因子としての利用が期待される。

第 6 章では、本論文の総括と今後の展望が述べられている。

以上のように、本博士論文では、5-ヒドロキシウラシル ( $\text{U}^{\text{OH}}$ ) 塩基を用いた金属応答性二面型 DNA 塩基対の開発に成功した。本研究成果は、金属イオンを外部刺激とした DNA の構造と機能を動的に制御する新手法であり、理学の発展に大いに貢献するものである。なお、本論文における各章の研究は他の複数の研究者との共同研究によるものであるが、論文提出者が主体となって実験、解析および考察を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (理学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。