

Title	疎水性官能基を導入したDNAナノ構造と脂質膜の相互作用に関する研究
Author(s)	真喜志, 紳吾
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/52306
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (真喜志 紳吾)

論文題名 疎水性官能基を導入したDNAナノ構造と脂質膜の相互作用に関する研究

論文内容の要旨

細胞膜は脂質二重膜からなる細胞内外の区画であり、その細胞膜の表面および疎水的な内部には多様な機能を持つ膜タンパク質が存在している。膜機能の改変あるいは新しい機能の付加を目指して、膜と相互作用する多様な人工分子の開発が行われてきた。その多くは、膜タンパク質、ペプチド、膜貫通分子を基盤としており、複雑な構造を持つため、その構造制御・改変は容易でない。我々は、膜上で働く機能性分子として、近年ナノテクノロジーにおいて盛んに研究が行われているDNAに注目した。DNAはワトソンクリック塩基対形成による高度な分子認識能をもち、配列設計によって2次元・3次元的に制御可能な自己組織化能を有する。本研究では、DNAの高度な自己組織化能を膜上で活用することによって、天然タンパク質では困難な自在に設計可能な機能性膜ドメインの構築を指向した。

第1章

DNAを脂質膜のような親水性-疎水性界面で使用可能にするため、我々はドデシルホスホトリエステル構造を持った両親媒性DNA (dod-DNA) を設計・合成した。本章では、さまざまな部位へ疎水基を導入したdod-DNAの結合能を評価した。結果、両末端に3つのドデシル基を導入したdod-DNAが表面プラズモン共鳴法(SPR)において膜からの解離速度が遅く、蛍光顕微鏡によって励起エネルギー移動(FRET)を膜表面で観測できたことから、脂質膜と強く相互作用していることが示された。

第2章

dod-DNAの結合性は疎水基の導入部位に依存しており、DNAヘリックスの末端に導入したときのみ、脂質膜へ強固に結合する。脂質膜は親水性の表面を、内部に疎水性コアを持つ。そこで、脂質膜の構造に合わせた親水性のジエチレングリコール(DEG)をリンカーとして導入した疎水基(dod-DEG)へと改良した。その相互作用をSPR法とDNA二本鎖の熱安定性により評価した。結果、SPRにおいて脂質膜への結合の改善が示された。また、二本鎖の熱安定性も向上した。

第3章

小さなユニット構造により2次元的なDNA構造体を構築する手法を利用し、一つの小さなユニット構造にdod-DEG基を導入することで脂質膜と結合可能な構造体を調製した。結果、未修飾のDNA構造体はゲル相の脂質膜へ結合するが、疎水基を修飾したDNA構造体は流動層とゲル相のどちらにも結合可能であることを示した。また、流動層とゲル相の混合脂質膜においては、ゲル相(DPPC)にのみ結合した。両親媒性脂質膜(POPC)との相互作用はMgイオン濃度やDNA構造体に修飾した疎水基の密度に大きく依存した。

第4章

我々は、DNA構造体と脂質膜との相互作用について調査した。疎水基を導入した面、または構造体の曲率等の違いによって、その結合能にどのように影響するかを原子間力顕微鏡(AFM)やSPR法を用いて詳細に調べた。結果、低Mg濃度条件下において、すべての構造体は疎水基の導入面で結合した。

第5章

生体膜は様々な突起構造や陥入構造を持つ。また、膜変形によって外部の物質は内部に取り込まれ、細胞内で作られたタンパク質分子などは外へ運び出される。これらの膜変形は膜変形タンパク質によって誘起される。膜変形タンパク質は細胞膜と相互作用して、3次元ナノ構造体(チューブ型複合体、ボール型複合体)を形成する。そこで我々は膜ダイナミクスを担うタンパク質の3次元ナノ構造と機能をDNAによって再構築し、*dod*-DEG-DNAによる膜表面での高次構造体の構築、さらには膜変形の誘起を行った。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (真喜志 紳吾)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 中谷 和彦
	副 査	教授 村田 道雄
	副 査	教授 小川 琢治
	副 査	准教授 堂野 主税

論文審査の結果の要旨

申請者は、疎水性官能基を導入した DNA ナノ構造と脂質膜の相互作用に関する研究に取り組み、以下の成果を上げている。

1) 脂質膜表面に結合する両親媒性 DNA の合成と評価

脂質二重膜の表面に効果的に結合することのできる DNA の創製を指向して、疎水性官能基を導入した両親媒性 DNA を新規に設計・合成した。両親媒性 DNA が脂質膜表面に結合することを明らかにし、脂質膜に結合した DNA を足場として一次元的な分子配列が可能であることを示した。さらに、結合評価実験の結果をもとに疎水性官能基の化学構造と両親媒性 DNA の配列の最適化をすすめ、結合能の向上に成功している。

2) 二次元 DNA 構造体の流動相・ゲル相脂質膜への結合制御

平面型 DNA ナノ構造 (DNA タイル) に両親媒性 DNA を組み込むことにより、脂質二重膜表面上に DNA ナノ構造を構築できることを実証した。液中 AFM により、脂質膜表面上に DNA タイル由来の周期構造の観測に成功している。また、DNA タイルの脂質膜への結合条件を種々検討し、二価金属イオンとゲル相を形成する脂質膜が、DNA ナノ構造の結合を促進することを示した。

3) 曲率をもつ DNA 構造体の脂質膜への結合評価

曲率をもつ平面型 DNA ナノ構造を用いて、脂質膜の結合に三次元構造が与える影響を評価した。曲率をもつ DNA ナノ構造の 2 つの面、即ち凹面と凸面に選択的に疎水性官能基を導入することにより、曲率を持つ DNA ナノ構造の脂質膜への結合能を比較した。その結果、凸面での結合が疎水性官能基導入に関わらず有利であること、疎水性官能基で修飾することにより凹面での結合が有利になることを明らかにした。

4) 三次元 DNA 構造体の結合により誘起されるリポソームの変形

チューブ形の DNA ナノ構造を脂質膜に結合させることにより、リポソームの形状変化が誘起できることを電子顕微鏡観察により明らかにし、DNA ナノ構造の形状に応じた脂質膜変形が可能であることを示した。

上記の成果は、両親媒性 DNA を用いることで、DNA ナノ構造を脂質膜表面に導入できることを実証し、さらに、そのナノ構造の形状に応じて脂質膜形状を制御しうる可能性を明示しており、高く評価できる。よって本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。

