

Title	Studies on Membrane-Bound Nucleic Acids
Author(s)	柴田, 知範
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/60099">https://hdl.handle.net/11094/60099</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

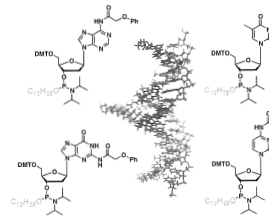
【42】

氏名	柴田知範
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第25823号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科化学専攻
学位論文名	Studies on Membrane-Bound Nucleic Acids (膜結合性核酸に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 中谷 和彦 (副査) 教授 村田 道雄 教授 深瀬 浩一 准教授 堂野 主税

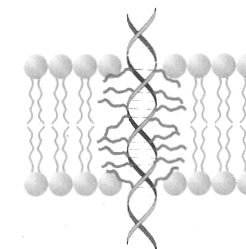
## 論文内容の要旨

本論文は、脂質二重膜に結合する核酸を利用することで、DNAの特性を活かした脂質二重膜上での機能創発を目的とした論文である。DNAのリン酸部位に疎水性官能基を導入した修飾核酸を利用して、DNAを脂質二重膜中に導入することに成功した。本論文では、膜結合性核酸の合成、二重鎖及び四重鎖構造を形成する膜結合性核酸の有機溶媒及び脂質二重膜を含む疎水性環境下における高次構造形成に関する結果を示す。このような膜結合性核酸は、核酸の配列情報に基づいた構造・機能の設計が可能であり、脂質二重膜上で核酸を介したシグナル伝達、小分子・イオン輸送などの機能発現が期待できる。

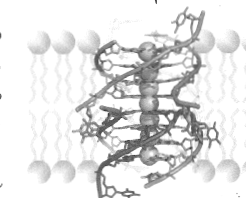
第1章は、膜結合性核酸の合成法の確立及びそのDNAの基本物性に関する報告である。膜結合性核酸として、DNAのリン酸部位に疎水性官能基を導入したドデシルリン酸トリエステル構造を有するDNA(dod-DNA)を設計し、合成を行った。dod-DNAを合成するために対応する核酸塩基4種類のモノマーユニットを合成した後、DNA合成機を用いて目的とするDNAの合成を達成した。この合成法の確立により、任意の配列を有するdod-DNAを合成することが可能になった。dod-DNAの二重鎖形成に対して、二本鎖融解温度、等温滴定カロリメトリーなどを用いて熱力学パラメーターを算出することにより定量的に評価を行った結果、dod-DNA二重鎖は、疎水性相互作用によって強く安定化することが明らかになった。



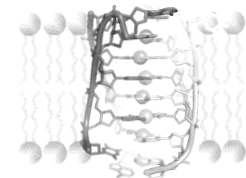
第2章は、dod-DNA二重鎖と脂質二重膜の相互作用に関する報告である。DNAを脂質二重膜に埋め込むために、脂質二重膜の厚さに相当する疎水領域を有するdod-DNAを設計・合成した。dod-DNAと脂質二重膜の相互作用を評価するために、dod-DNAを蛍光標識し、脂質二重膜との結合評価を行った。蛍光測定の結果からdod-DNAの疎水性領域が脂質二重膜の内部に埋め込まれていること及びdod-DNAの親水性領域が膜表面に存在していることが明らかとなった。



第3章は、非極性環境下における疎水性G-quadruplex形成に関する報告である。疎水性G-quadruplexを構築するために、DNAのすべてのリン酸部位にドデシル基を導入したTGGGGT配列を有するDNA(dod-TG<sub>4</sub>T)を合成した。dod-TG<sub>4</sub>Tは、有機溶媒に可溶性DNAであり、有機溶媒中においてG-quadruplexを形成することが明らかになった。さらに脂質二重膜中においてもG-quadruplex構造を形成することが示唆された。また脂質二重膜中に導入されたdod-TG<sub>4</sub>Tから構成されるG-quadruplexがイオンチャンネルとして機能することが示唆された。



第4章は、非極性環境下における疎水性i-motif形成に関する報告である。第3章と同様に、疎水性i-motifを構築するためにACCCCA配列を有するdod-AC<sub>4</sub>Aを設計・合成した。dod-AC<sub>4</sub>Aは、有機溶媒中において適切な酸で処理することにより、i-motifを形成することがCD及びNMR測定により明らかになった。また脂質二重膜中においてもdod-AC<sub>4</sub>Aがi-motifを形成する事が示唆された。



第5-6章は、修飾核酸プローブを用いたDNAメチル化識別プローブに関する報告である。メチル化塩基を識別する修飾核酸プローブとして、アデニンの6位及びシトシンの4位のアミノ基と求電子種との反応に着目し、ホルミル基含有修飾核酸(G)を設計した。修飾核酸の合成は、対応するGホスホロアミダイトを合成し、DNA自動合成機を用いてG含有DNAを合成した。G含有DNAを二重鎖形成させると、Gのアルデヒドと相補鎖中のアデニン及びシトシンのアミノ基の間で、鎖間クロスリンク体が生成することを確認した。一方、それぞれのメチル化体であるN<sup>6</sup>-メチルアデニン、N<sup>4</sup>-メチルシトシン、5-メチルシトシンを用いた場合、いずれの場合もクロスリンク体の生成は大幅に減少し、非メチル化塩基とメチル化塩基の識別に成功した。この反応は、既知の配列上のアデニンとシトシンのメチル化を識別できる新しい方法である。

## 論文審査の結果の要旨

申請者は、膜結合性核酸に関する研究に取り組み、以下の成果を上げている。

### 1) 膜結合性 DNA の合成及び二重鎖形成

脂質二重膜に結合する核酸を合成するために、DNA 合成機を用いた固相自動合成に必要なモノマーユニットであるドデシルホスホロアミダイトを4種類合成した。これらのモノマーユニットを用いた合成法の確立により多種多様な疎水性部位を持つ核酸が合成可能であることを示した。また合成した DNA は水溶液中において、ドデシル基間の疎水性相互作用による二重鎖の安定化を示した。

### 2) 膜結合性 DNA と脂質二重膜の相互作用

蛍光標識された膜結合性 DNA を用いて脂質二重膜との相互作用を明らかにした。また環境応答性の蛍光色素を導入した膜結合性核酸を用い、誘電率による蛍光波長の変化から脂質二重膜のどの部位に DNA が結合しているかを見積もることに成功した。

### 3) 非極性環境下における疎水性 G-四重鎖の形成

グアニン連続配列を有する膜結合性核酸を用いて、有機溶媒中及び脂質二重膜存在下における G-四重鎖の形成を明らかにした。また平面二重膜を用いたボルテージクランプ法によるイオンチャネル活性試験において、疎水性 DNA が形成した G-四重鎖がイオンチャネル活性を有する示唆を得た。

### 4) 非極性環境下における疎水性 i-motif 形成

シトシン連続配列を有する膜結合性核酸を用いて、有機溶媒及び脂質二重膜などの非極性環境下における i-motif の形成を見いだした。

上記の成果は、膜結合性核酸を利用した疎水環境下や脂質二重膜中での構造形成及び機能発現の可能性を示し、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。