

論文 / 著書情報
Article / Book Information

| | |
|-------------------|---|
| 題目(和文) | |
| Title(English) | Development of a site-selective photooxidation method to target genome DNA by biphenyl photosensitizer-PNA conjugates |
| 著者(和文) | DUYaoyao |
| Author(English) | Yaoyao Du |
| 出典(和文) | 学位:博士(理学), 学位授与機関:東京科学大学, 報告番号:甲第243号, 授与年月日:2025年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:湯浅 英哉,川井 清彦,清尾 康志,中村 浩之,大窪 章寛 |
| Citation(English) | Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Institute of Science Tokyo, Report number:甲第243号, Conferred date:2025/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,, |
| 学位種別(和文) | 博士論文 |
| Category(English) | Doctoral Thesis |
| 種別(和文) | 審査の要旨 |
| Type(English) | Exam Summary |

(博士課程)

論文審査の要旨及び審査員

| 報告番号 | 甲第 | 号 | 学位申請者氏名 | Yaoyao DU | |
|-------------|-----|-------|---------|-----------|-----|
| 論文審査 審査員 | | 氏名 | 職名 | 氏名 | 職名 |
| | 主査 | 湯浅 英哉 | 教授 | 大窪 章寛 | 准教授 |
| | 審査員 | 清尾 康志 | 教授 | | |
| | | 川井 清彦 | 教授 | | |
| 中村 浩之 | | 教授 | | | |

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「Development of a site-selective photooxidation method to target genome DNA by biphenyl photosensitizer - PNA conjugates」と題し、ビフェニル光増感剤 (NBP) とペプチド核酸 (PNA) で構成される光ノックアウトデバイスの開発について述べた 5 章より構成されている。

第一章「Introduction and Background」では、この論文の概要、背景、分子設計について説明している。まず、DNA 二本鎖切断 (DSB) を誘発するヌクレアーゼベースの技術と、CRISPR/Cas9 技術の欠点の 1 つである、大きなヌクレアーゼに対する望ましくない免疫反応について述べられている。この問題に対処するために、酸化損傷の修復を通じて DNA の一本鎖切断を部位選択的に誘発する戦略が提案されている。次に、これまでの研究が要約されている。小型のタイプ II 光増感剤 NBP と、DNA 二重らせん内の G の距離依存的な酸化を引き起こすことができる短いリンカーを持つ NBP-DNA コンジュゲートの開発、および最適な酸化距離は NBP から G まで 8~10 塩基対などについて解説が行われている。さらに、二本鎖 DNA (dsDNA) を標的とするために、PNA の dsDNA への部位特異的侵入と、NBP から生成される一重項酸素 (1O_2) による G の選択的酸化という 2 つの要素に依存するこの論文の設計について概説されている。

第二章「Synthesis and Characterization of NBP-PNA Oligomers」では、NBP-PNA 複合体の設計と合成について得られた結果を述べている。所属研究室による NBP-DNA 複合体による光酸化研究に基づき、NBP-PNA 複合体は、短いエチレンリンカーを介して チミン塩基 (T) の α -メチル位に NBP グループを共有結合し、相補 DNA 内のターゲット G から 9 核酸塩基離れた位置に配置するように設計されたと述べている。まず、8 段階の合成ルーチンを通じた新規 NBP-チミン-PNA モノマー合成について記述されている。次に、Fmoc ベースの固相ペプチド合成によって N 末端に親水性リジンを持つ 6 つの PNA オリゴマー合成の最適化について述べられている。最後に、合成した PNA 誘導体の PNA/DNA 二重鎖について T_m 値と CD スペクトルの測定が行われ、NBP の添加によってハイブリダイゼーションがほとんど妨げられず、予想される右巻きらせんが形成されたと述べている。

第三章「Photooxidation of ssDNA and dsDNA by NBP-PNAs」では、上記の NBP-PNA を用いた一重鎖 DNA (ssDNA) と二重鎖 DNA (dsDNA) の光酸化について述べられている。まず、 1O_2 プロブ分子フルフリルアルコール (FA) の消費率から、NBP-PNA の 1O_2 生成能力は、所属研究室で以前検討された NBP-DNA と同等であると述べている。続いて、3 つの NBP-PNA/DNA 二重鎖の光酸化効率が調査され、対応する NBP-DNA/DNA 二重鎖よりも大幅に低いことが判明したと記述されている。さらに、PNA に結合させず、外部から加えた NBP 誘導体による PNA/DNA の G 光酸化を行ったところ、dsDNA に比べ大幅に低い効率だったと述べている。これらの結果は、DNA と複合した PNA が G の酸化を抑制することを示唆しているとし、2 つの仮説を提唱している。最初の仮説は、PNA/DNA 二重鎖内の塩基のスタッキングによって 1O_2 の G へのアクセス性が低下するというものであり、これは非塩基性 PNA/DNA 二重鎖の光酸化効率によって裏付けられたと述べている。2 番目の仮説として、NBP-PNA から生成された 1O_2 が PNA/DNA 骨格に沿って拡散する際、アミド結合によって消光される可能性を提案し、外部添加の NBP 誘導体による PNA/DNA の光酸化が NBP-PNA/DNA による光酸化より高効率であることを証拠として挙げている。最後に、ゲル電気泳動実験により、dsDNA の粘着末端に結合した NBP-PNA によって DNA 二重鎖領域内の G が部位選択的に光酸化されることが確認されたと述べている。ここで、NBP は相補鎖中の 2 つの G から等距離に配置され、1 つは PNA 領域内に、もう 1 つは DNA 二重鎖領域内にあると述べている。光照射により、dsDNA 領域にある G のみが酸

化され、粘着末端の G は影響を受けなかったと述べている。NBP-DNA を用いて対照実験を行うと、2つの G が光酸化され、NBP-PNA が dsDNA 領域内の G のみを光酸化できることを確認したと述べている。以上より、NBP-PNA は dsDNA 内の G の酸化を部位選択的に誘導する潜在的なツールであることを論じている。

第四章「End-invasion and Photooxidation of dsDNA by NBP-PNA」では、まず非変性ゲル電気泳動実験から、PNA と dsDNA の化学量論比が 80 または 100 の場合に NBP-PNA/dsDNA 末端侵入複合体が形成されることが判明したと述べている。そして、侵入のために必要な大量の PNA を dsDNA とインキュベートすると、疎水性 PNA オリゴマーの自己凝集体が dsDNA と非特異的に相互作用し、疎水性表面に吸着することが判明したと述べている。次に、(PNA)_n-dsDNA 凝集が DNA の酸化に及ぼす影響を調べるため、外部 NBP 誘導体による dsDNA と PNA 混合物の光酸化を行った結果、想定どおり PNA の当量が増加するにつれ光酸化効率が低下したと述べている。

第五章「Summary」では、この論文の要約と、大量の PNA の使用を避けながら dsDNA に効果的に侵入する NBP-PNA コンジュゲートのさらなる開発について展望を述べている。

以上を要するに、本論文は、NBP 修飾 PNA の設計と合成、および ssDNA と dsDNA における光酸化特性の調査など、dsDNA 光ノックアウトに対する NBP-PNA コンジュゲートの可能性を示したものであり、理學上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士（理學）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」は、東京科学大学リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。