

博士学位論文審査要旨

2018年7月25日

論文題目： Double-Strand Breaks (DSBs) and Structure Transition on Genome-sized DNA
ゲノムサイズ DNA の二本鎖損傷と構造転移研究

学位申請者： MA YUE

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 吉川 研一

副査： ニューヨーク市立大学スタテンアイランド校化学科
教授 Chwen-Yang Shew

副査： 理工学研究科 教授 塩井 章久

要旨：

近年、DNA に関しての研究が大きく進展してきているが、数 kbp (キロ塩基対) 程度かそれ以下のサイズの DNA 分子を対象とした研究が多数を占め、100kbp を越えるサイズのゲノム DNA に関する研究は相対的に遅れている。本学位論文は、一分子観察の手法を基軸にして、ゲノムサイズ DNA の二本鎖損傷の定量的計測や、溶媒中での高次構造転移に関する研究結果を論述しているものとなっている。全体では5章で構成されており、第1章はゲノムサイズの DNA に関する研究の発展段階と課題を述べており、第5章では研究全体のまとめと学問的な意義を論じている。

第2章では、アスコルビン酸 (ビタミンC) による DNA 二本鎖切断の抑制作用についての研究結果を報告している。多様な細胞の損傷の中でも、ゲノム DNA の二本鎖切断は最も重篤であることが知られている。本申請者は、ゲノム DNA の一分子観察の手法を活用し、光増感剤存在下での光照射・ガンマ線・超音波といった異なる損傷源による、DNA 損傷の比較検討を行ない、損傷源の種類に依存して、アスコルビン酸 (ビタミンC) による二本鎖切断反応の抑制作用がどのように異なるのかを明らかにした。さらには、このようなアスコルビン酸の保護作用を、二本鎖損傷の分子論的なメカニズムと関連づけて論じている。

第3章では、dimethyl sulfoxide (DMSO) による DNA 二本鎖切断の抑制作用についての研究結果を報告している。光増感剤存在下での光照射・ガンマ線・凍結による損傷を、DNA 一分子観察の手法により定量的に計測している。その結果、いずれの損傷源に対しても、DMSO 濃度が2%で保護作用が最大になることを見出し、それ以上に濃度を増大させても保護効果が更に大きくなることはないことを明らかにした。

第4章では、ゲノムサイズの DNA に対するアルコールの作用について研究した結果を取りまとめている。本申請者は、ゲノムサイズ DNA の一分子観察により、ethanol や 1-propanol では、60-70% 程度の濃度のときに、凝縮構造をとるが、それ以上の濃度では脱凝縮する傾向 (reentrant) を示すことを発見した。それに対して、2-propanol では、濃度の増大に伴い単調に凝縮することを明らかにした。このように、アルコールの異性体が高濃度条件で、ゲノムサイズ DNA の高次構造に対して、著しく異なる作用を示すことを報告している。

以上のように、本論文では、DNA の一分子観察の手法を活用することにより、ゲノムサイズ DNA に関して、多くの重要な知見が得られている。DNA 損傷の中でも、細胞にとって最も危険性の高

い二本鎖損傷についての定量的な計測を可能とする実験手法を確立したことは、最も重要な成果であると言える。DNA の二本鎖損傷に対する、アスコルビン酸や DMSO の抑制作用について定量的な評価を行ったことは、これらの保護物質がこれまでは専ら経験に基づいて用いられてきたことを考えると、生命科学・工学分野へ貢献するものと期待される。よって、本論文は、博士（工学）（同志社大学）の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。

総合試験結果の要旨

2018年7月25日

論文題目： Double-Strand Breaks (DSBs) and Structure Transition on Genome-sized DNA
ゲノムサイズ DNA の二本鎖損傷と構造転移研究

学位申請者： MA YUE

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 吉川 研一

副査： ニューヨーク市立大学スタテンアイランド校化学科
教授 Chwen-Yang Shew

副査： 理工学研究科 教授 塩井 章久

要旨：

本論文提出者は、2013年9月本学大学院生命医科学研究科博士課程（前期課程）に入学、さらに2015年10月より博士課程（後期課程）に在学している。各年度において優れた研究成果を挙げている。また、本研究科修了に必要な所定の単位を修得するとともに、英語の語学試験にも合格しその能力が十分であることが認定されている。

本論文の主要部分は、Chemical Physics Letters（2015年掲載）および、Scientific Reports（2017年掲載）に出版されており、前者は筆頭著者、後者の論文は第二著者（筆頭著者と同等の貢献と論文に記載）となっている。さらに、Biophysical Society や International Conference of Biological Physics などの国際会議で発表し、高い評価を得ている。

2018年6月27日16時15分より約1時間にわたり提出論文に関する学術講演会（博士論文公聴会）が開催され、提出者の講演とそれに引き続き活発な質疑応答がなされた。提出者の説明により研究内容が学問的に優れていることを審査委員一同が確認した。公聴会終了後、提出論文に関係した学問的諸問題について、審査委員による口頭試問を実施し、提出者が博士課程（後期課程）修了にふさわしい能力を有することを確認した。よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目 : Double-Strand Breaks (DSBs) and Structure Transition on
Genome-sized DNA

ゲノムサイズ DNA の二本鎖損傷と構造転移研究

氏名 : Ma Yue

要旨 :

The protective effect of ascorbic acid (AA) and DMSO against double-strand breaks (DSBs) in DNA was evaluated by single-molecule observation of giant DNA (T4 DNA; 166kbp) through fluorescence microscopy. Samples were exposed to three different forms of radiation: visible light, γ -ray, and ultrasound or freeze/thawing.

Ascorbic acid, or vitamin C, is a representative antioxidant. With regard to irradiation with visible light, 1 mM AA reduced the damage down to ca.30%. Same concentration of AA decreased the damage done by γ -ray to ca.70%. However, AA had almost no protective effect against the damage caused by ultrasound. This significant difference is discussed in relation to the physico-chemical mechanism of double-strand breaks depending on the radiation source.

Dimethyl sulphoxide (DMSO) is widely used as a cryoprotectant for organs, tissues, and cell suspension in storage. To date, many in vitro assays using cultured cells have been performed for analysing the protective effect of DMSO against genomic DNA damage; however, there have been few reports on the direct and quantitative detection of DNA double strand breaks (DSBs) using single-molecule observation.

For the result of DMSO's protection on DSBs, we found that 2% DMSO conferred the maximum protective effect against all of the injury sources tested, and these effects were maintained at higher concentrations. Further, DMSO showed a significantly higher protective effect against freezing-induced damage than against photo- and γ -ray-irradiation-induced damage. Thus, the current data revealed that DMSO exhibits a protective effect in a dose dependent manner. Our study provides significant data for the optimization of DNA cryopreservation.

The change of the higher-order structure of genomic DNA molecules in the presence of alcohols by use of single DNA observation with fluorescence microscopy, by focusing our attention to unveil the different effect between 1-propanol and 2-propanol. We found that, with 1-propanol, the long-axis length exhibits minimum at 60% and then tends to increase with the increase of alcohol content. On the other hand, with 2-propanol the long-axis length exhibits almost monotonous decrease with the increase of alcohol content. These results indicate that DNA undergoes reentrant transition of coil-globule-coil with 1-propanol, whereas such reentrance phenomenon does not appear with 2-propanol.