

様式 I

博士学位論文調査報告書

論文題目

Construction of biomacromolecular assemblies with spatially arranged functional units to assess the cellular functions

(機能性ユニットを空間的に配置した生体高分子組織体による細胞内機能プローブの構築)

申請者 Zhang Zhengxiao

最終学歴 令和 3年 3月

京都大学大学院エネルギー科学研究科エネルギー基礎科学専攻博士後期課程
研究指導認定退学

学識確認 平成 年 月 日 (論文博士のみ)

調査委員 京都大学大学院エネルギー科学研究科
(主査) 教授 森井 孝

調査委員 京都大学大学院エネルギー科学研究科
教授 片平 正人

調査委員 京都大学大学院エネルギー科学研究科
教授 佐川 尚

(続紙 1)

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	Zhang Zhengxiao
論文題目	Construction of biomacromolecular assemblies with spatially arranged functional units to assess the cellular functions (機能性ユニットを空間的に配置した生体高分子組織体による細胞内機能プローブの構築)		
(論文内容の要旨)			
<p>糖質、タンパク質、脂質、核酸などの生体高分子に、空間配置および分子数を制御して蛍光分子やタンパク質などの機能性ユニットを導入することにより、高機能な生体高分子集合体が構築できる。多糖類に機能性分子を導入すると、シグナル伝達や代謝などの様々な細胞内の活動を制御する手段となる。また、DNA ナノ構造体を足場として用いると、ナノメートル精度で空間的に酵素を配列させた人工代謝経路が構築できる。これらの機能性生体高分子集合体の構築には、生体高分子の特定の位置に機能性ユニットを導入する選択的な反応が必要であるが、多種類の機能性ユニットを生体高分子の特定の位置に導入するための反応間には高度な選択性が要求されるため、これまで限られた種類の化学反応しか用いることができなかった。</p> <p>本論文では、生体高分子上に選択的に機能性ユニットを導入する分子認識駆動型導入法と化学選択的導入法を利用して、代謝過程および細胞内環境を評価するための生体高分子集合体を構築した。近接したときにのみ反応性タンパク質とその基質が共有結合を形成する分子認識駆動型導入法を開発し、これにより DNA ナノ構造体の足場上の特定の位置に 4 種類の酵素を導入して人工代謝経路を構築する手法を確立した。また、生体高分子 DNA ナノ構造体やデキストランなどの足場上に、複数種類のセンサーを導入して、細胞内で複数種類の酵素活性と酵素周辺の局所 pH を、それぞれ独立した発光波長で同時に検出する蛍光センサー「分子内視鏡」を開発した。本論文は、生体高分子上に選択的に機能性ユニットを導入する分子認識駆動型導入法と化学選択的導入法を開発、応用して、代謝過程および細胞内環境を評価するための生体高分子集合体を構築したものであり、6 章からなっている。</p> <p>第 1 章は序論であり、本論文で実施した研究の背景を概説している。生体高分子は、選択的に機能性ユニットを導入することによって様々な機能を発揮する生体高分子集合体として利用できる。特に、DNA ナノ構造体や多糖類は機能化するうえでの理想的な生体高分子足場であり、それらを選択的に修飾する方法は、化学選択的修飾と分子認識駆動型修飾という 2 つの方法に大別できる。前者は、DNA ナノ構造体や多糖の官能基やそれらに導入した新たな反応性分子を利用した修飾によって、後者は DNA ナノ構造体の特定塩基配列を識別して選択的に機能性ユニットを導入する方法であり、それらの適用例と問題点を概説している。そのうえで、DNA ナノ構造体に機能性ユニットを導入する新たな分子認識駆動型の方法と、複数種類の化学選択的修飾によって DNA ナノ構造体などの生体高分子に機能性ユニットを導入する方法を開発し、それらに応用することを本論文の目的として論じている。</p> <p>第 2 章では、DNA ナノ構造体に分子認識駆動型修飾法によってタンパク質を導入するた</p>			

めに、SNAP タンパク質をもとにしたモジュール型アダプター (MA) とその基質を開発した。SNAP や CLIP などの反応性タンパク質と DNA 結合タンパク質を組み合わせた MA は、DNA 結合タンパク質の分子認識に依存して DNA ナノ構造体の特定塩基配列を識別し、その塩基配列上の基質と反応性タンパク質との間に共有結合を形成する。しかし、SNAP タンパク質とその基質であるベンジルグアニン (BG) の反応速度が非常に速いため、SNAP を含む MA と BG で修飾した DNA との反応は、必ずしも塩基配列選択的な DNA 結合に支配されては進行しない。そこで、SNAP タンパク質との反応性を低下させるために、2 種類の BG 誘導体 benzylinosine (BI) と 7-deaza-benzylguanine (deBG) を基質として設計、合成した。実際に SNAP タンパク質との反応性を調べたところ、両基質とも SNAP タンパク質との反応速度定数が BG よりも低下した。SNAP と BI の反応速度定数 (k_{cov}) と MA と DNA の複合体解離速度定数 (k_{off}) は、 $k_{\text{cov}} \ll k_{\text{off}}$ の関係を満たしており、SNAP を含む MA と BI を修飾した DNA との反応解析によって、配列選択的な共有結合形成の見かけの反応速度定数 (k_{app}) と MA と DNA の複合体解離定数 (K_{D}) が比例関係にあることを実証した。これらの結果から、MA の標的 DNA 配列での分子認識駆動型の共有結合形成反応には、 k_{cov} が重要な要素であることを立証した。

第 3 章では、第 2 章で開発した SNAP タンパク質の基質 BI を用いて、DNA ナノ構造体上に 4 種類の MA を個別に配置できることを実証した。CLIP タンパク質もしくは SNAP タンパク質と、3 種類の塩基配列選択的な DNA 結合タンパク質とを組み合わせると、6 種類の配列選択的な MA が得られる。BI は CLIP タンパク質とはほとんど反応しないため、BI で修飾した DNA は MA-CLIP と非特異的に反応しなかった。BI および CLIP タンパク質の基質 benzylcytosine (BC) で修飾した 3 種類の DNA 結合配列には、6 種類のうち 1 種類の MA のみ、すなわち DNA 結合タンパク質の認識配列に標的基質が修飾されている場合のみ、特異的かつほぼ定量的に反応した。以上の結果から、BI と BC を基質として用いると、それぞれ 3 種類の MA-SNAP と MA-CLIP を同時に使用できる。実際、MA-SNAP と MA-CLIP を 2 種類ずつ使用すると、4 種類の MA が DNA ナノ構造体のそれぞれの標的部位とのみ反応した。この結果から、少なくとも 4 種類の酵素からなる人工代謝経路を DNA ナノ構造体上に構築する技術を与えるものである。

第 4 章では、細胞内酵素反応を検出するセンサーを構築した。細胞内リソソーム中のタンパク質分解酵素カテプシン D (CtD) は、同じくリソソーム中に存在するシステインプロテアーゼであるカテプシン B (CtB) などによる分解切断を経て活性を発揮する。カテプシン B と D のセンサーを構築して、それらを細胞内で同時に用いると、CtB と CtD の活性の相関を明らかにできる。CtB と CtD のペプチド基質を合成し、CtB と CtD の活性を検出するために、それらを同時に利用しても異なる波長で Förster 共鳴エネルギー移動 (FRET) を検出できる色素対で修飾して、二種類のカテプシンプローブを合成した。合成した CtB および CtD カテプシンプローブは、

そのままでは CtB および CtD に対する反応性が低かったが、両プローブを短鎖 DNA で修飾すると、それぞれのカテプシンに対する反応性が劇的に改善された。これは短鎖 DNA が、疎水性色素対で修飾されたプローブの水溶性を向上させたためと考えられる。カテプシンプローブに短鎖 DNA を導入すると、DNA ナノ構造体等への位置選択的な導入が可能だけでなく、様々な用途に用いられている疎水性色素対で修飾されたプローブの難溶性を軽減するために有用である。また、カテプシンセンサーと pH センサーを同時に使用するために、レシオ型蛍光 pH プローブとして利用できる蛍光色素 SNARF をマレイミドで修飾し、それを介して短鎖 DNA を導入した。短鎖 DNA 修飾 SNARF を DNA ナノ構造体上に導入した pH センサーによって、細胞内の pH 変化を実時間で計測することに成功した。

第 5 章では、リソソームで活性化された CtB を細胞内で視覚化するとともに、周辺 pH を同時に検出するセンサーを作製した。リソソーム中での CtB の活性化は、CtD の活性化と相関があることが示唆されている。したがって、細胞内局所環境 pH と CtD 活性を計測するセンサーによって、CtB の活性に関する有用な情報が得られる。デキストランに 2 種類の蛍光色素を結合させてレシオ型蛍光 pH センサーを作製し、さらに第 4 章で作製したカテプシンセンサーを導入することにより、細胞内で二種類のカテプシン活性とその周辺 pH を、それぞれ独立した発光波長で同時に検出する「分子内視鏡」を開発した。

第 6 章は総括である。本研究では、生体高分子に機能性分子を導入することによって、細胞外で人工代謝経路を構築するための基盤となる方法を開発するとともに、細胞内での酵素反応と酵素周辺の環境を同時に計測するセンサーを構築した。DNA ナノ構造体上の特定の位置に酵素を導入する汎用的な方法を、モジュール型アダプターの分子認識駆動型反応を反応動力学から検討して開発した。この方法によって、4 種類の酵素からなる人工代謝経路を構築できることを立証した。また、細胞内酵素カテプシンの基質を FRET がおきる色素対で修飾し、二種類のカテプシンの活性を個別の蛍光発光によって計測するセンサーを構築した。その際に、センサーに短鎖 DNA を導入することにより、酵素反応の検出感度が飛躍的に上昇することを見出した。これらのカテプシンセンサーと pH センサーを DNA ナノ構造体およびデキストランに導入して、細胞内で二種類のカテプシン活性とその周辺の局所 pH を、それぞれ独立した発光波長で同時に検出する蛍光センサー「分子内視鏡」を開発した。本論文で開発した分子認識駆動型反応と化学選択的反応とを組み合わせることで、生体高分子に蛍光分子、ペプチド、酵素などの様々な機能性ユニットを位置選択的に導入できる。本研究で開発した、DNA ナノ構造体に 4 種類の酵素を空間的に制御して導入する方法は、カーボンニュートラル社会における新しい物質生産法として期待される人工代謝経路を、細胞外で構築するための基盤技術となる。さらに、生体適合性に優れた「分子内視鏡」は、疾病診断のための有用な手法として医薬・臨床研究への貢献が期待できる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

糖質、タンパク質、脂質、核酸などの生体高分子に、空間配置および分子数を制御して蛍光分子やタンパク質などの機能性分子を導入することにより、高機能な生体高分子集合体が構築できる。多糖類に機能性分子を導入すると、細胞内で代謝やシグナル伝達などの反応を制御する手段となる。また、DNA ナノ構造体にナノメートル精度で酵素を特定の位置に導入すると、人工代謝経路が構築できる。これらの機能性生体高分子集合体の構築には、生体高分子の特定の位置に機能性分子を導入する方法が必要であるが、多種類の機能性分子を、同一の生体高分子のそれぞれ特定の位置に導入する反応には高度な選択性が要求される。そのため、これまで限られた種類の反応しか用いることができず、導入できる機能性分子の種類には制限があった。本論文では、生体高分子上に選択的に機能性分子を導入する分子認識駆動型導入法と化学選択的導入法を開発、利用して、人工代謝経路および細胞内環境を評価するための生体高分子集合体を構築し、以下の結果を得た。

(1) 複合体形成によって近接したときにのみ反応性タンパク質とその基質が共有結合を形成する分子認識駆動型共有結合形成反応を開発した。

(2) 上記の手法を用いて DNA ナノ構造体の特定の位置に 4 種類の酵素を導入して人工代謝経路を構築する手法を確立した。

(3) 細胞内酵素カテプシンの基質を用いて、二種類のカテプシンの活性を個別の蛍光発光によって計測するセンサーを構築した。

(4) 生体高分子 DNA ナノ構造体およびデキストランに多種類のセンサーを導入して、細胞内で二種類のカテプシン活性とその周辺 pH を、それぞれ独立した発光波長で同時に計測する蛍光センサー「分子内視鏡」を開発した。

これらの成果は、分子認識駆動型反応と化学選択的反応とを組み合わせることで、生体高分子に蛍光分子、ペプチド、酵素などの様々な機能性ユニットを位置選択的に導入できる方法論を提示するものである。本研究で開発した、DNA 足場上に 4 種類の酵素を空間的に制御して導入する方法は、カーボンニュートラル社会における新しい物質生産技術となり得る人工代謝経路を、細胞外で構築する上での基盤技術となる。さらに、生体適合性に優れた「分子内視鏡」は、新たな疾病診断手法として医薬・臨床研究への貢献が期待できる。

よって、本論文は博士(エネルギー科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 4 年 7 月 27 日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 2022 年 12 月 25 日以降