

(続紙 1)

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	小西宏明
論文題目	Organization and compartmentalization of functional molecules on DNA nanostructures (DNA ナノ構造体による機能性分子の組織化と区画化)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>生体内のクリーンで高効率なエネルギー利用・変換機構を担う代謝反応は、酵素が関与する並列した多段階の反応により成り立っている。生体内代謝反応では、反応に関わる酵素の位置や数、周辺環境が時空間的に制御されており、さらに一連の反応に関わる酵素が区画化されている場合もある。細胞中のオルガネラでは、脂質膜に覆われた区画でタンパク質が組織化されるとともに、膜中の酵素に適した pH の調整が行われていると考えられている。独立栄養生物内の二酸化炭素固定化反応を担う区画であるカルボキシソームでは、二種類の酵素ルビスコと炭酸脱水酵素が 100 nm ほどのタンパク質膜の内部に密集して充填されており、これによって反応が活性化されていると考えられているが、その詳細は明らかでない。</p> <p>このような生体内の複雑な代謝系を、細胞外で活用するためには、複数の酵素を含む区画を試験管内で再現して、区画環境の影響や効果を解明、理解することが重要である。機能性分子、特に酵素を区画の中に内包させる研究はこれまでも報告されている。脂質分子を用いたリポソームや両親媒性ポリマーを用いたポリマーソームの例では、膜上の輸送タンパク質で物質のやりとりをさせながら、内包させた溶液中の複数の酵素で逐次反応を進行させたと報告されている。タンパク質を用いた区画では、ウイルス様タンパク質を足場として活用して複数の酵素を内包した例が報告されている。しかしながら、いずれの区画でも内包する酵素の数や位置を制御することができないという問題点がある。リポソームやポリマーソームの場合は、マイクロメートルスケールの膜を作製することができる一方で、その体積は規格化できない。従って、これらの区画では、生体内の酵素反応系の様式や環境を模倣して、その影響を定量的に解析することが困難である。</p> <p>ルビスコはそれ自体の触媒反応性は低いため、カルボキシソームのタンパク質外殻内に高濃度で存在することで、炭酸脱水酵素との連続した酵素反応を活性化していると考えられている。これまでに報告で、これら二種類の酵素をタンパク質殻中に内包する、もしくは二次元平面の DNA ナノ構造体上で炭酸脱水酵素と近接させるだけではルビスコの触媒活性は上昇しないことが示されている。その一方で、天然のカルボキシソーム内のようなルビスコ同士が立体的に密接した膜のない区画の環境を構築して、その影響を定量的に解析した事例はない。</p> <p>本論文では、三次元 DNA ナノ構造体を用いると、目的分子の集積体が自由に設計できる点に着目して、対象とする分子の数や位置を制御して組織化、区画化する基盤技術の開発を目標とした。</p> <p>第 1 章では、生体内の組織化、区画化や DNA ナノ構造体を利用した機能性分子の修飾の事例を紹介し、本研究を遂行する上での学術的な背景を論じている。</p> <p>第 2 章では、Yang らが報告したリング状 DNA ナノ構造体の内径に、機能性分子を導入するための DNA 二重鎖を架橋した構造体を設計し、架橋した DNA 二重鎖を内包するリポソーム</p>			

を作製した。DNA 二重鎖に pH 応答性の蛍光色素 (CF) を導入し、リング状の DNA ナノ構造体自体と、リポソームを形成する脂質分子の一部には、それぞれ pH 非応答性の蛍光色素を修飾した。DNA 二重鎖を含めた DNA ナノ構造体が設計通りに作製できていることを、原子間力顕微鏡 (AFM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察で確認した。その後、構造体内径に沿ってリポソームを形成し、精製した画分の蛍光観察によって、DNA ナノ構造体、架橋した DNA 二重鎖およびリポソームが同じ構造体に共存する人工区画であることを確認した。水溶液中で CF の蛍光が消光する、また復元するように人工区画を含む溶液の pH を変化させたところ、10%程度の蛍光強度変化しか観測されなかった。これらの結果から、架橋した DNA 二重鎖上の CF はリポソームに内包され、外液からは遮蔽された状態にあることを実証した。

第 3 章では、タンパク質が密接に集積した膜のない区画を構築するための足場として、舟形開状態から浅型六角柱の閉状態へと構造変換が可能な三次元 (3D) DNA ナノ構造体を作製した。開閉それぞれの状態の DNA ナノ構造体を AFM および TEM で観察し、それぞれ設計通りの構造であることを確認した。DNA ナノ構造体の上下面の縁の部分とそれぞれ二重鎖を形成するオリゴ DNA を加えると、構造体を閉状態に変換できる。さらに、構造体の上下面の縁に閉状態で近接するように配置した二つの蛍光色素 (Cy3、Cy5) の蛍光共鳴エネルギー移動による蛍光強度の変化によって、DNA ナノ構造体の開閉状態を実時間で測定した。構造体の構造変換に必要なオリゴ DNA を加えて 25°C で蛍光強度の継時変化を追跡した結果、12 時間で約 65% が閉状態になった。この開閉状態の変化は、AFM および TEM 観察でも同様の結果が得られた。オリゴ DNA の配列を伸長することで、同じ条件で閉状態が 80% まで増加し、さらに温度を 35°C に上昇させると 2 時間で 90% の閉状態構造が得られた。

第 4 章では、ルビスコが密集した膜のない区画を構築するために、第 3 章で構築した DNA ナノ構造体上へ配置可能なルビスコ誘導体を作製した。安定な 10 量体を形成する好熱菌由来のルビスコ (TkRBC) に特異的な DNA 配列に結合するモジュール型アダプターを融合した酵素 G-TkRBC を作製した。大腸菌で発現させた G-TkRBC は、細胞破碎液中の不溶性画分に存在し、尿素変性による可溶化したのちに単離、精製が可能であった。精製後の溶液から尿素を除去してリフォールディングする条件を最適化し、DNA 結合能と酵素活性を有する G-TkRBC を得た。

第 5 章では、第 3 章で作製した舟形開状態の DNA ナノ構造体に、第 4 章で作製したモジュール型アダプターを融合したルビスコ G-TkRBC を配置し、舟形から六角柱構造への構造変換を検証した。G-TkRBC10 量体の立体構造をもとにして、モジュール型アダプターが結合する DNA 鎖を DNA ナノ構造体の両面にそれぞれ 5 箇所導入し、G-TkRBC を結合させた結果、酵素活性はあるものの DNA ナノ構造体の片面にのみ G-TkRBC10 量体が配置された。アダプター結合部位の柔軟性を増すためにモジュール型アダプターが結合する DNA 鎖を伸長し、さらにその数を減らした結果、DNA ナノ構造体の両面に G-TkRBC が配置され、さらに DNA ナノ構造体上の G-TkRBC の酵素活性を確認した。舟形平面には、いくつかの G-TkRBC10 量体が結合しており、その六角柱型閉状態へ構造変換は認められなかった。

第6章では本研究を総括し、本研究の意義と独創性、将来の展望を論じている。本研究では、DNA ナノ構造体の設計の自由度と分子修飾の場所指定能力の高さを利用して、機能性分子を組織化、区画化するための汎用的な手法を開発した。リング状 DNA ナノ構造体を外骨格として、機能性分子を配置する鋳型としての DNA 二重鎖を内包したリポソームを作製し、鋳型 DNA が外液から遮蔽された空間に配置できることを示した。これによって、直径 50 ナノメートルのリポソーム内に距離を制御しながら機能性分子配置できることが可能になった。また、舟形開状態から六角柱閉状態へと構造変換が可能な三次元 DNA ナノ構造体を新たに作製した。これにより、機能性分子を距離や位置を制御して配置する鋳型 DNA ナノ構造体の多様性を拡張した。三次元 DNA ナノ構造体の構造変換を実時間で追跡することにより、鋳型 DNA ナノ構造体に配置する分子の熱安定性に応じて、構造変換の条件を選択できることを明らかにした。さらに、好熱菌由来のルビスコにモジュール型アダプターを融合したルビスコ誘導体を作製した。このルビスコ誘導体は、三次元 DNA ナノ構造体に配置した状態で酵素活性を示した。本研究で作製したこれらの 3D DNA ナノ構造体は、様々な機能性分子を分子の数や位置を制御して配置して、酵素組織体や人工区画を構築するための基盤技術となる。リング状 DNA ナノ構造体を外側の骨格とし、架橋した DNA 二重鎖を内包するリポソームは、複数の酵素を膜で内包した人工区画の構築に応用できる。また、舟形開状態から六角柱閉状態へと構造変換が可能な 3D DNA ナノ構造体を用いると、様々な機能性分子が密接した組織化状態、さらには膜のない酵素の人工区画を構築できる可能性がある。これらの人工区画作製法は、カーボンニュートラル社会での物質変換技術として期待される人工代謝経路「分子コンビナート」を構築するための基盤技術である。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

生体内のクリーンで高効率なエネルギー利用・変換を担う代謝反応では、反応に関わる酵素の位置や数、周辺環境が時空間的に制御されており、さらに一連の反応に関わる酵素群が区画化されている場合がある。生体内の複雑な代謝系を細胞外で活用するためには、複数の酵素を含む区画を試験管内で再現して、区画環境の影響や効果を解明、理解することが重要である。酵素をリボソームなどに内包させる研究はこれまでも報告されているが、内包する酵素の数や位置を制御できないなどの問題点があった。

本研究では、三次元 (3D) DNA ナノ構造体の特徴である、分子集積体が自由に設計できる点に着目して、対象とする分子の数や位置を制御して組織化、区画化する基盤技術を開発し、以下の結果を得た。

(1) リング状 DNA ナノ構造体を外骨格として用い、構造体に架橋した DNA 二重鎖を内包するようにリボソームを作製し、架橋した DNA 二重鎖を外液から遮蔽された空間に配置した。これにより、直径 50 ナノメートルのリボソーム内の DNA 二重鎖上に、分子数と距離を制御しながら機能性分子を配置することが可能になった。

(2) 舟形の開状態から六角柱閉状態へと構造変換が可能な 3D DNA ナノ構造体を新たに作製して、機能性分子を距離や位置を制御して配置するための 3D DNA ナノ構造体の多様性を拡張した。3D DNA ナノ構造体の構造変換を実時間で追跡することにより、鋳型 DNA ナノ構造体に配置する分子の熱安定性に最適な構造変換の条件を選出できる。

(3) 好熱菌由来の二酸化炭素固定化酵素ルビスコに、特異的な DNA 配列に結合するモジュール型アダプターを融合したルビスコ誘導体を作製した。このルビスコ誘導体は、3D DNA ナノ構造体に配置した状態で二酸化炭素固定活性を示した。

本研究で作製した 3D DNA ナノ構造体は、様々な機能性分子を分子の数や位置を制御して配置して、酵素組織体や人工区画を構築するための基盤技術である。リング状 DNA ナノ構造体を外骨格とするリボソームは、酵素を膜に内包した人工区画、また、舟形開状態から六角柱閉状態へと構造変換が可能な 3D DNA ナノ構造体は、酵素を含有する膜のない人工区画の構築に応用できる。これらの成果により、カーボンニュートラル社会での新しい物質生産法として期待される人工代謝経路「分子コンビナート」を、人工区画を用いて構築する新たな方法を提示した。

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 6 年 2 月 22 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： 2024 年 6 月 24 日以降