（ 続紙 １ ）

京都大学	博士（エネルギー科学）	氏名	LIEW FONG FONG
論文題目	Construction of Functional Assemblies of Fluorescent Peptides and Nucleic Acids （蛍光性ペプチドと核酸を用いた機能性複合体の作製）		

（論文内容の要旨）

本論文は、RNA-ペプチド複合体（RNP）を用いて分子認識能を合目的に制御したリセプターの作製方法論と高感度蛍光センサーを設計する汎用的な方法論、そして蛍光分子を特定の位置に配置したナノバイオ組織体を作製する方法の開発を論じた結果をまとめたものであり、全７章からなっている。

第１章は序論であり、生物の機能を模倣することによる標的の分子を特異的かつ定量的に検出する技術としてバイオセンサーの重要性を論じ、高機能なバイオセンサーを構築するためには、高い分子認識能を有するリセプターの分子設計と汎用性に富んだセンサー構築法が必要であると結論づけている。

第２章では、ドーパミンに選択的に結合するRNPリセプターおよびセンサーを作製した。様々なin vitroセレクションの条件のもとで、ドーパミンに対して高い親和性もしくは選択性を有するRNPリセプターを作製する事に成功し、in vitroセレクション条件と得られるRNPリセプターの分子認識能との相関を明らかにした。

第３章では、前章で作製したドーパミン結合性RNPリセプターおよびセンサーのカテコールアミン類に対する結合様式について熱力学的パラメータをもとに考察し、ドーパミンに対して高い基質選択性および親和性を有するRNPの結合様式に関する知見を得た。

第４章では、ATP結合性センサーをもとにして、蛍光強度変化比の高いRNPセンサーを簡便に作製する一般的な方法論を開発した。ATP結合性RNPの塩基配列および二次構造比較により、RNPセンサーの初期蛍光強度を効果的に消光するRNAモチーフを同定した。このRNAモチーフは、RRE配列とATP結合配列の間に存在するステムループ配列である。このステムループ構造およびその変異体を導入すると、ATP結合に伴うセンサーの相対的な蛍光強度変化が大きくなることがわかった。

第５章では、すでにGTPに結合することが報告されているRNAアプタマーに、第４章で作製したステムループ構造とRRE配列を導入し、蛍光性Revペプチドと複合体を形成することにより、基質GTPの結合に伴う蛍光強度変化比が大きい蛍光センサーの作製に成功した。これにより、特定の核酸構造を信号伝達モジュールとして導入することにより、蛍光強度変化比の大きなRNPセンサーを簡便に作製するモジュール設計法の汎用性を示した。

第６章では、DNA ナノ構造体上への機能性タンパク質の固定化技術の開発を行った。特定のDNA配列に結合する2種類のジンクフィンガータンパク質をDNAナノ構造体上に結合させる事に成功した。さらに、ジンクフィンガータンパク質をアダプター分子として用いることにより、蛍光タンパク質とジンクフィンガータンパク質の融合タンパク質がDNAナノ構造体の特定位置に結合する事も確認した。これにより種々の機能性タンパク質をDNAナノ構造体上に配置したデバイスを作製するための基盤技術を

確立した。

第７章は論文の総括である。In vitroセレクションに代表される生体高分子の試験管進化法おいて、得られる生体高分子リセプターの基質選択性および親和性を制御する条件を明らかにすることは、これらの方法論を応用した機能性生体高分子の作製において非常に重要な意味を持つ。本論文では、RNPセンサーのin vitroセレクションを行う際に競合基質を共存させる、もしくは結合溶液の塩濃度を変化させることによって、得られるRNPリセプターの基質選択性および親和性が大きく影響を受けることを示した。これによりリセプターの機能を合目的に制御するために重要な条件を明らかにした。

RNPリセプターを蛍光センサーへと機能改変する際には、必ずしも基質結合に伴って蛍光強度が大きく変化するセンサーが得られるわけではない。そこで、これまでに得られたRNPセンサーの塩基配列および二次構造と蛍光センサーの応答性を比較することにより、大きな蛍光強度変化を示すセンサーに共通して存在するRNAの構造的特徴を見出した。さらに、蛍光強度変化に乏しい蛍光センサーであっても、このRNA構造をモジュールとして導入することで大きく蛍光強度が変化するセンサーへと機能を改善できることを示した。これにより、すぐれた応答感度の蛍光RNPセンサーを簡便に作製するモジュール設計法を開発した。

また、DNAナノ構造体とタンパク質を用いた機能性生体高分子ナノ構造体の開発にも取り組んだ。これまでにもDNA折り紙上にDNA、RNA、タンパク質などを結合させた例は報告されているが、DNA結合タンパク質をアダプター分子として利用してタンパク質をDNA折り紙上の特定位置に配置した例は初めてである。本手法はさまざまな機能性タンパク質をDNAナノ構造体を利用して、特定の位置に配置させるための一般的な方法論となる。

以上、本論文では蛍光標識したペプチドおよびタンパク質を用いた組織体の作製を通して、核酸およびペプチド、タンパク質の複合体を用いた新しい機能性生体高分子作製法を開発し、その応用例を示す事に成功した。

（続紙 ２ ）

（論文審査の結果の要旨）

本論文は、RNA-ペプチド複合体（RNP）を用いたリセプターの分子認識能を制御する方法論と高感度蛍光センサーを設計する汎用的な方法論、そして蛍光分子を特定の位置に配置したDNAナノ構造体の新規作製法を論じた結果をまとめたものであり、得られた主な結果は以下の通りである。

1. ドーパミンに対するRNPリセプターおよび蛍光センサーを作製する事に成功し、in vitroセレクション法において競合分子を存在させるとRNPリセプターの分子認識能が向上することを明らかにした。

2. ATP結合性RNPセンサーの初期蛍光強度を効果的に消光するRNAモチーフとして、ATP結合配列の隣に存在するステムループ配列を同定した。このステムループ構造が存在すると、ATP結合に伴うセンサーの蛍光強度変化が大きくなる。

3. GTPに結合するRNAアプタマーにステムループRNAとRRE配列を導入し、蛍光性Revペプチドと複合体を形成することにより、GTPに対する高感度蛍光センサーが得られた。これにより、特定の核酸構造を導入することにより、蛍光強度変化比の大きなRNPセンサーを簡便に作製するモジュール設計法の汎用性を示した。

4. DNA ナノ構造体上の特定位置に機能性タンパク質を配列させる方法を開発した。特定のDNA配列に結合する2種類のジンクフィンガータンパク質をアダプター分子として用いることにより、2種類の蛍光タンパク質とジンクフィンガータンパク質の融合タンパク質がDNAナノ構造体の特定位置に結合した組織体を構築した。これにより種々の機能性タンパク質をDNAナノ構造体上に規則的に配置した組織体を作製するための基盤技術を確立した。

以上、本研究では、分子認識能の高いRNPを作製する方法を明らかにするとともに、モジュール法による合理的かつ汎用性のある蛍光センサー作製の実例を示した。また、DNAナノ構造体の特定の位置にタンパク質・蛍光分子を配置した組織体の作製法を開発した。これらの成果は、核酸、タンパク質、ペプチドを用いてリセプター、センサーなどの機能性バイオ素子を合理的に作製するための基礎的な知見として大きな貢献を行ったと評価する。

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、平成23年8月25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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、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：　　年　　月　　日以降