

(続紙 1)

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	Zhang Shiwei
論文題目	Artificial Liposome Compartment with DNA Origami Scaffold for Size Exclusion Molecular Transport and Enzyme Cascade Reactions (DNA オリガミを骨格とするリポソーム人工区画による選択的分子輸送と酵素カスケード反応)		
(論文内容の要旨)			
<p>細胞内では、核、小胞体、ゴルジ複合体などのオルガネラとして知られる膜区画 (区画) 内に特殊な酵素が動的に組織化され、バイオエネルギーをつかさどる代謝経路での様々な酵素反応が進行する。細胞内の代謝経路を正常に進行させるうえでの、代謝中間体の不安定性代謝産物間の競合といった問題を克服するために、細胞内では様々な区画が進化したと考えられる。</p> <p>細胞内区画のように、人工区画の内側に外部と異なる pH、イオン強度、または極性の微小環境を作り出すことによって、酵素反応を促進するうえで最適な環境が構築できる。人工区画の構築により、細胞内区画での代謝反応がより深く理解できるだけでなく、細胞外での物質変換、センシングなど、機能性バイオマテリアルとして幅広い応用の可能性がある。これまでリポソームやタンパク質外殻を用いた人工区画が開発されてきたが、酵素導入収率が低く、位置と化学量論を制御して酵素を導入できないなどの問題があった。また、人工区画を酵素反応区画として機能させるためには、反応において基質と生成物を選択的に輸送する区画の膜の透過性が重要であるが、区画の膜に選択的な分子透過性を付加することは困難であった。多様な特性をもつ酵素を区画化する一般的な方法論は確立されておらず、これまでに報告された方法では酵素導入収率が低く再現性がないため、正確に位置と化学量論を制御した酵素の導入が困難であった。これらの問題は、DNA ナノテクノロジーの利用によって解決できる可能性がある。DNA オリガミ法で 2D および 3D 構造に折り畳んだ DNA ナノ構造体は、構造体の固有の場所を特定できるため、様々な機能性高分子を特定の位置に配置するうえでの理想的な足場である。さらに DNA ナノ構造体の特定の位置を脂質分子で修飾すると、DNA ナノ構造体を鋳型とした人工膜が構築できる。DNA 構造体の足場に酵素を 1 分子ずつ配置して、酵素間の距離依存的な代謝反応が精力的に研究されてきたが、区画内の特定の位置に分子数を制御して酵素を配置するとともに、配向を規制して膜タンパク質を導入した人工区画は、未だに構築されていない。</p> <p>本論文は、細胞内区画での酵素の空間配置に依存した代謝反応を理解し、さらに細胞外で人工代謝システムを構築するために、リポソームで封入した人工区画を開発し、その化学特性を明らかにすることを目的とした。3D 構造の DNA ナノ構造体を内部骨格として用いて、分子量選択的な分子輸送が可能な、均一の大きさのリポソームからなる人工区画を構築し、それらの機能を検証したものであり、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、天然の細胞内およびこれまでに合成された人工区画におけるタンパク質の空間的構成に焦点を当て概説している。タンパク質の足場、RNA/DNA ナノ構造や脂質を用いた人工区画として、リポソ-</p>			

ム、ポリマーソーム、タンパク質ケージなどに酵素などを内包させたこれまでの研究結果を概説し、酵素カスケード反応を促進するうえで重要な役割を担っている人工区画での物質輸送を制御する戦略について論じている。さらに、DNA オリガミ構造上にモジュール型アダプターを用いて配置した酵素による代謝反応において、酵素の空間的な配置がどのように酵素活性・代謝効率に影響するかについても詳しく論じている。そのうえで、DNA ナノ構造体が膜構造を構築するとともに、複数種の酵素を配置するための足場として有用な候補であると提唱し、それらをもとにした人工区画の構築を本論文の目的として論じている。

第2章では、ワイヤーフレーム DNA オリガミ骨格 (WS) を用いて、リポソーム内に目的の分子を封入できる人工区画を構築した。作製した DNA オリガミ骨格は、アガロースゲル電気泳動、原子間力顕微鏡 (AFM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) 測定によって同定した。AFM および TEM 画像から、WS の内包直径は 59 nm であり、設計通りの構造が確認できた。チオール基を介して脂質分子を共有結合させたオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) を WS の外表面に相補鎖形成させ、それらを起点として WS の外周にリポソームを形成させた。リポソームに内包された DNA オリガミ骨格 (lipo-WS) の形状を TEM 測定によって確認したところ、その外膜直径は 80 nm であった。また、lipo-WS の内部が外部緩衝液から十分に遮蔽されていることを、区画内部の pH を計測することによって確認した。これらの結果から、DNA オリガミ骨格 WS がリポソームに内包された人工区画の特性を明らかにした。

第3章では、大腸菌外膜タンパク質 OmpF を、第2章で作製した lipo-WS のリポソーム脂質二重膜に導入して、区画内部 pH を区画外部の pH に応じて効果的に変化させた。人工区画に導入された OmpF を定量し、lipo-WS あたり3分子の OmpF 三量体が導入されることを確認した。さらに、lipo-WS に導入した OmpF は、分子量 600 Da 以下の小分子を分子量選択的に透過させることを明らかにした。これらの結果から、lipo-WS の区画内部は外部環境から隔離されるが、OmpF を lipo-WS の膜に導入すると膜を介して特定の分子量の化学物質を区画内外に輸送できる人工区画が構築できることを明らかにした。

第4章では、配向と分子数を規制して OmpF を DNA オリガミ骨格 WS に導入したリポソーム区画を作製した。そのために、N 末端にモジュール型アダプター ZF-SNAP を融合した OmpF 誘導体 (ZF-SNAP-OmpF) を作製した。大腸菌破碎液の不溶性画分に存在する ZF-SNAP-OmpF を尿素で可溶化して精製し、その後リフォールディングした ZF-SNAP-OmpF は DNA 結合活性を保持していた。ZF-SNAP-OmpF の WS への導入収量は 40% 程度であり、lipo-WS あたり 1 分子の OmpF 三量体が導入されたものと推定された。ZS-OmpF を配置した DNA オリガミ骨格 WS をもとにしてリポソームを形成させ、SDS-アガロースゲル分析および区画内の pH 変化の観察により、導入した ZS-OmpF の分子輸送活性を確認した。

第5章では、酵素キシロース還元酵素 (TeXR) とキシリトール脱水酵素 (XDH) を

DNA オリガミ骨格 WS に位置と分子数を規制して配置した。モジュール型アダプター ZF-SNAP と Halo-GCN4 を融合した TeXR (ZS-TeXR) と XDH (HG-XDH) を作製し、WS の特定の場所に作製したそれぞれのモジュール型アダプターの結合場所と反応させた。その結果、ZS-TeXR は 83%、XDH は 95% の収率で WS に導入された。どちらの酵素も、遊離の酵素反応と比較すると、触媒活性が 1.5 倍向上した。以上の結果から、モジュール型アダプターによって特定の分子数の TeXR と XDH を配置した DNA オリガミ骨格 WS を用いると、膜に内包した人工区画の構築が可能になった。

第 6 章は総括である。本研究では、3D 構造の DNA オリガミ骨格を足場として用いて、骨格の外周にリポソームを形成した人工区画を作製し、区画内部が外部環境から効果的に隔離されることを実証し、さらに膜タンパク質 OmpF を区画のリポソーム脂質二重膜に導入して、特定の分子量以下の分子のみが透過できる人工区画を開発した。これにより、区画内への特定の化学物質の輸送が制御できる。また、モジュール型アダプターを融合した膜タンパク質を用いて、DNA オリガミ骨格の特定の場所、さらにはリポソームに分子数を規制して膜タンパク質を配置する方法を開発した。本手法は、膜タンパク質を配向と分子数を規制して膜に導入するうえで有用な方法である。本研究で開発した特定の位置に分子数を制御して酵素を導入した 3D DNA オリガミ骨格は、代謝経路をリポソームに内在した人工区画を構築するための基本骨格となる。本研究で開発した、3D DNA ナノ構造体に酵素および膜タンパク質を空間的に制御して導入する方法、さらにはそれらを膜で内包した人工区画を作製する方法は、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「分子コンビナート」を、細胞外で構築するための基盤技術となる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

細胞内では、オルガネラとして知られる膜区画内に特定の酵素が動的に組織化されて、代謝経路を構成する様々な酵素反応が進行する。細胞内の代謝経路を正常に進行させるうえでの代謝中間体や代謝産物間の競合といった問題を克服するために、細胞内では区画機能が進化したと考えられる。細胞内区画を模倣するため、これまでリポソームやタンパク質外殻を用いた人工区画が開発されてきたが、区画内への酵素導入収率が低い、位置と化学量論を制御して酵素を区画内に導入できないなどの問題があった。さらに、区画に選択的な分子透過性を付加することは困難であった。DNA オリガミナノ構造体は、複雑なナノ構造を自在に設計できる汎用性と、特定の分子をあらかじめ設計した空間に配置できる制御性を合わせ持つ。さらに DNA ナノ構造体の特定の位置を脂質分子で修飾すると、大きさの揃った人工リポソームが構築できる。本論文では、DNA ナノ構造体を特定の酵素、輸送体を 1 分子ずつ配置する鋳型としてだけでなく、その外周にリポソームを形成する鋳型として用いて、人工区画を作製する方法論を開発し、以下の結果を得た。

- (1) ワイヤフレーム型 DNA オリガミ (WS) を内部骨格として用いて、均一の大きさのリポソームを形成し、区画内部環境が外液から隔離されることを実証した。
- (2) 膜タンパク質 OmpF を (1) で作製した区画のリポソーム膜に導入すると、区画内部の pH が外液 pH に従って変化すること、さらに OmpF がプロトンだけでなく分子量 480 Da 以下の小分子を区画内部に透過させることを実証した。
- (3) モジュール型アダプターを融合した OmpF を導入した DNA オリガミ WS を利用して、配向と分子数を規制して OmpF をリポソーム膜に導入する方法を開発した。
- (4) キシロース代謝に関与する 2 種類の酵素キシロース還元酵素 (TeXR) とキシリトール脱水酵素 (XDH) にモジュール型アダプターを融合させ、TeXR と XDH の分子数と位置を制御して WS 骨格に導入すると、それぞれ遊離の酵素と比べて代謝反応が効率よく進行した。

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