OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Developing DNA origami-based experimental systems for structural and functional analyses of super-complexes
Author(s)	福本, 紘大
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92184
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　福本 紘大　）	
論文題名	Developing DNA origami-based experimental systems for structural and functional analyses of super-complexes (生体超分子の構造・機能解析に向けた実験系の開発)

論文内容の要旨

DNAオリガミは、作製したナノ構造（DNA origami nanostructure; DON）上に任意の配置でタンパク質を結合できる技術であり、分子配置がタンパク質の機能に与える影響を解析するために有用である。加えて、DONは目的因子を設計通りの配置で結合し精製するための担体としても期待される。しかし、DONへのタンパク質の結合や、形成された複合体の精製における技術的な課題が、超分子の解析への応用を妨げている。

DONを用いた分子配置の解析が期待される分野の一つが、多分子のモータータンパク質による協調輸送である。ここでは、DON-モータータンパク質複合体の形成効率が悪いという問題があり、十分にタンパク質が結合しなかった不完全な複合体が、空間配置の影響を他の要素から分離して解析することを妨げていた。本研究では、ポリリシン配列によってタンパク質のDONへの結合速度を向上させることを見出した。リシン残基数を5, 10と増やすことで、$SNAP_f$-tagを融合させたモータータンパク質キネシンのDONへの結合速度が向上した。10残基のリシン配列は、二量体$SNAP_f$-tag融合タンパク質、単量体$SNAP_f$-tag融合タンパク質、二量体HaloTag融合タンパク質のDONへの結合をそれぞれ700倍、300倍、10倍速めた。10残基のリシン残基を融合させたタンパク質を用い、4個の結合部位を持つDON上で1部位当たり0.86の割合でタンパク質が結合したことを示した。次に、キネシン分子の配置が複合体の運動機能に与える影響を評価した。キネシン密度が低い複合体においては、DON上での二次元のキネシンの配置は運動に影響しなかった。一方、キネシンの分子間距離が短くなると、複合体の連続移動距離が短くなることが明らかとなった。これらの結果は、輸送複合体内の立体障害の影響を示唆する。本研究で確立した実験系は、モーター分子間の空間配置が運動活性に影響を与える分子機構を解析する上で有用である。

結合手の配置を制御できるDONは、超分子を精製するための担体としても理想的である。超分子の構造解析においては、天然の状態に近い複合体を細胞破砕液から精製し解析することが意義深い。しかし、細胞内で構成された超分子を細胞破砕液からDONを用いて精製した研究は報告されていない。そこで、格子状に結合部位を配置したDONを担体とし、モデル分子リボソームを細胞破砕液から精製しクライオ電子顕微鏡で解析する系を開発した。ショ糖密度勾配遠心を用いた精製法で、精製されたリボソームがクライオ電子顕微鏡で観察され、単粒子解析で三次元構造が再構成できることが示された（1画像当たり平均35粒子）。DONでは複数の結合手を用いた多価精製が期待されることを踏まえ、DON上に配置した抗体を介しタグペプチドやGFPを結合できることも示した。これらの結果は、分子配置を制御できるDONを精製の担体として用いた精製手法の将来性を裏付ける。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　福本 紘大　）

	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	原田 慶恵
	副 査　教授	昆 隆英
	副 査　教授	栗栖 源嗣
	副 査　上海科技大学 助理教授	多田隈　尚史

論文審査の結果の要旨

超分子は生命現象の根幹を担う反応を制御する。その重要性にも関わらず、不均一な超分子の解析手段は限られていた。近年開発されている DNA オリガミ技術は、機能性のある DNA ナノ構造の設計、およびナノ構造の足場を基に超分子を再構成することを可能にする技術であり、古典的な技術では困難な解析が可能であり、その発展が期待されている。しかし、技術的な問題点から、その応用は限られていた。本論文では、DNA オリガミ技術の問題点の解決に取り組み、モデル分子の構造・機能解析を行い、超分子の解析のための実験系を示した。

（1）超分子の機能解析を実現する方法の開発と、キネシン協調輸送機構の解析

DNA オリガミナノ構造（DNA origami nanostructure; DON）を担体とした超分子では、DON 上の特定の位置にタンパク質を集積させる。しかし、これまで、タンパク質の DON 上への集積速度が遅く、また、収率も高くなかった。申請者は、DON が負電荷を持つ DNA から形成されているため、静電反発により、負電荷を帯びたタンパク質の集積が遅くなっているという仮説を立て実験を行った。正電荷を帯びたペプチド（ポリリシン配列）を目的タンパク質に付加した結果、DON-タンパク質複合体の形成速度が最大 700 倍向上することを見出した。ポリリシン配列の効果は二量体、単量体、および異なるタグタンパク質の二量体で評価され、いずれも効果があることが示された。また、DON へのタンパク質の結合は 1 分子の褪色解析によって裏付けられた。この実験系を用いて、モータータンパク質キネシンの協調輸送における分子配置の影響が評価された。二量体キネシンの配置は輸送速度には影響しにくい一方、キネシン間距離が近い場合に連続移動距離が短くなることが示された。この性質は、本研究において、輸送体における分子配置の影響を厳密に調べることで、初めて明らかになった。また、得られた結論は、過去の結果と矛盾せず、キネシンの協調性に関する理解を深めたといえる。ポリリシン配列の効果および 1 分子観察の結果に関してデータの質は申し分なく、論理的に構成されている。

（2）超分子の細胞内構造の解析を実現する方法論の開発

超分子の構造を知ることは、作動機構を理解する上で重要である。これまで、解析対象の超分子は、主に試験管内で再構成する手法がとられてきた。しかし、超分子が複雑になるにつれ、サンプルが不均一になるという技術的な問題や、再構成された構造が実際に細胞内の構造を反映しているのか、といった問題点があった。多数の結合手を精密配置できる DON は、担体として優位な性質を持つが、従来、細胞内の超分子を精製し・構造解析した例はなかった。申請者は、DON を用いることで、細胞破砕液から目的とするリボソームの精製と、クライオ電子顕微鏡による構造解析が可能であることを示した。これは、DON を担体として用いることが可能であることを実証した、分野のさきがけとなる研究である。今後、この技術を発展させることで、細胞内での特定超分子複合体の標識や、超分子複合体形成などの応用が期待される。

以上、生体分子を結合させた DON の精製および形成に関する技術的な問題点に取り組み、解決策を示した。この取り組みにより、分子配置がモータータンパク質の協調輸送に与える影響の評価、細胞破砕液からの超分子の精製を実現し、DNA オリガミ技術を使うことの優位性を実験的に示した。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。