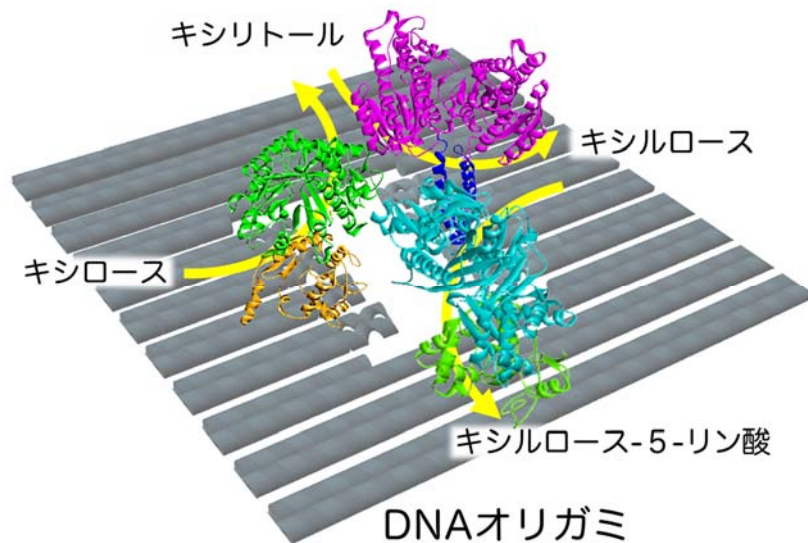


酵素を1分子ずつナノメートルの精度で狙い通りに並べる ～多段階の反応が効率的に進行する分子コンビナート～

<本研究成果のポイント>

- ・ 京都大学エネルギー理工学研究所の森井 孝 教授らの研究グループは、あらかじめ DNA ナノ構造体に設定した位置を読み取り結合するモジュールを作成し、複数種類の酵素を狙った場所へ1分子ずつ正確に並べることに成功。
- ・ 生体内の代謝反応のような、多段階の反応を触媒する複数種類の酵素を自在に配置した反応場「分子コンビナート」を創ることに成功。
- ・ 単純に酵素を混ぜ合わせたよりも高効率な多段階反応の進行を達成。空間配置を変えるとさらに反応効率が高まることを確認。
- ・ 開発した技術を用いて自在に酵素を組み合わせ、より複雑な連続反応の高効率化や、単に酵素を混ぜ合わせただけでは達成できない、新しい人工代謝経路を可能にする「分子コンビナート」の創製が期待できる。
- ・ 論文は5月18日、*Journal of the American Chemical Society* オンライン速報版に掲載された。



今回の研究で作成した分子コンビナート。

キシロース→キシリトール→キシロース→キシロース-5-リン酸の多段階反応を高効率に行う。

1. 背景

細胞の中は雑然としているようでありながら、酵素などの分子が、さながら製品を効率よく生み出すためのコンビナートのように、整然と並んでいます。この「分子コンビナート」を細胞の外で構築することができれば、効率のよい物質生産システムとしての利用が期待できます。分子コンビナートを試験管で構築するには、段階的な反応が効率よく連続して進むように、ナノメートルのサイズの酵素を1分子ずつ、決まった場所に並べる必要があります。そのために、それぞれの酵素を決まった位置に高い精度で並べる足場を用意する必要があります。今回の研究では、足場の構築にDNAによって成形されるナノ構造体「DNA オリガミ」を利用しました。DNA オリガミには、様々な配列のDNAを番地として導入することができます。これまでの研究で、DNA オリガミに導入した特定の「番地」へ酵素を運ぶための案内役（アダプター）の開発をおこなってきました。特定のDNA配列にのみ結合するタンパク質をアダプターとして利用し、目的の酵素にアダプターを融合することで、DNA オリガミ上の決まった番地に酵素を並べることに成功しています。さらに、ほぼ100%の割合で決まった番地に安定に配置できる、モジュール型アダプター¹を開発しました。しかし、これまでは1種類のモジュール型アダプターだけしか開発されていなかったため、多段階反応の再現に必要ないくつもの種類の酵素を狙った場所に並べることは困難でした。

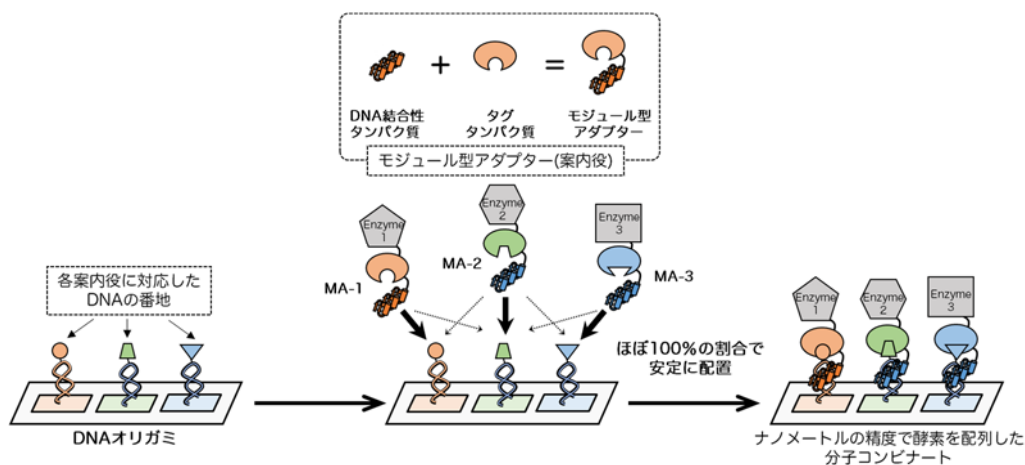


図 1. DNA オリガミに設定した番地へモジュール型アダプターを融合した酵素を配置

2. 研究手法・成果

何種類もの酵素をそれぞれ狙った場所に配置するためには、多くの種類のモジュール型アダプターが必要です。そこで、モジュール型アダプターを構成するDNA結合性タンパク質とタグタンパク質を3種類ずつ用意し、それらを組み合わせた9種類のモジュール型アダプターを設計しました。それらの中から、狙った番地だけに迅速かつ100%近くの収率で安定に配置できる、3種類のモジュール型アダプターを選びました。DNAナノ構造体上の番地に配置されたモジュール型アダプターを、実際に原子間力顕微鏡で観察すると、これら3種類のモジュール型アダプターは理論上の上限値の90%以上がDNAナノ構造体の決められた番地に配置され

¹ モジュール型アダプターは、特定の基質と共有結合を形成することができるタグタンパク質とDNA結合性タンパク質を融合したものの。DNA結合性タンパク質が番地のDNA配列を読み取り、タグタンパク質がDNA番地に導入された基質と共有結合を形成する。

ていました(図2)²。また、モジュール型アダプターがどの番地に近づきやすいか、そして、決められた番地に安定な結合によって配置される速度を解析することで、決められた番地にのみ安定に配置できるモジュール型アダプターの設計原理を見出しました。これにより、今後、あらかじめ設計することによって、モジュール型アダプターの種類を増やすことが可能になります。

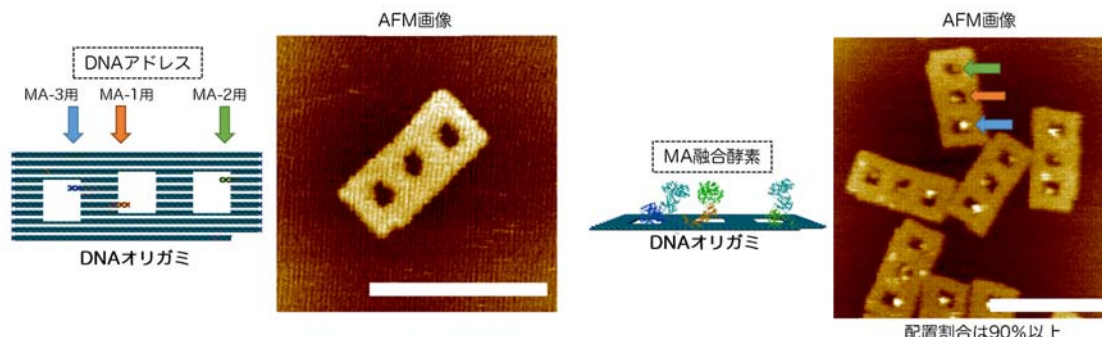


図 2. DNA オリガミにモジュール型アダプター融合酵素を配置した際の原子間力顕微鏡(AFM)画像。
(スケールバーは、200 nm)

新たに開発したモジュール型アダプターを利用して、キシロースからキシリトール、キシリトールからキシロース、そしてキシロースからキシロース-5-リン酸への代謝反応を触媒する 3 種類の酵素を並べた「分子コンビナート」を構築しました(図3)。また、それぞれの酵素に別々のモジュール型アダプターを融合し、番地を導入した DNA ナノ構造体に 3 種類の酵素を配置した場合の 3 段階の酵素反応の効率を、同じ濃度の酵素を単に混ぜ合わせた場合と比較しました。その結果、DNA ナノ構造体上に 3 種類の酵素を配置することで、単に混ぜ合わせた時よりも 3 段階の酵素反応は最大で 33%程効率よく進行しました。

より詳細に検討した結果、それぞれの酵素の距離を変化させると、3 段階酵素反応の効率が変化しました(図4)。それぞれの酵素を約 10 nm 間隔に配置すると、約 50 nm 間隔で配置した時に比べて、さらに効率よく酵素反応が進行しました。このことから、複雑な 3 段階の酵素反応においても³、反応の効率をあげるためには酵素の空間配置が重要であることがわかりました。

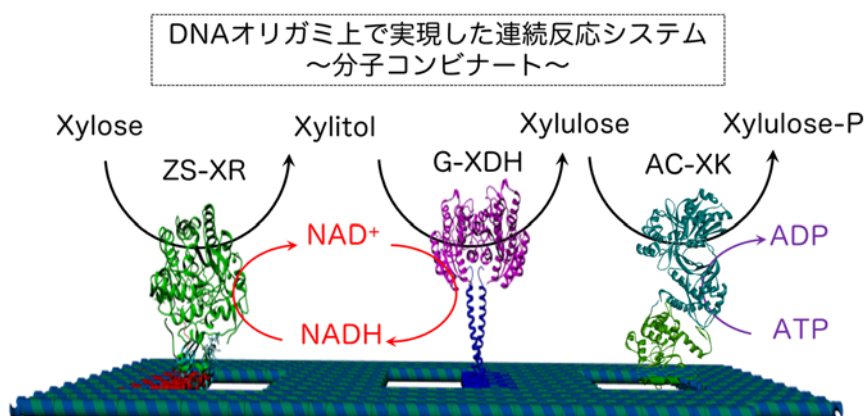


図 3. DNA オリガミ上に連続する代謝反応を触媒する 3 種類の酵素(XR, XDH, XK)を配置した「分子コンビナート」(※ZS, G, AC はモジュール型アダプターの名称)

² これまでの報告では、DNA ナノ構造体上に 3 種類のタンパク質を並べた際の効率は理論上の上限値の 8%程度。

³ 2 段階の酵素反応では 2 種類の酵素の空間配置が段階的な反応の効率向上に重要であることが明らかになっている。

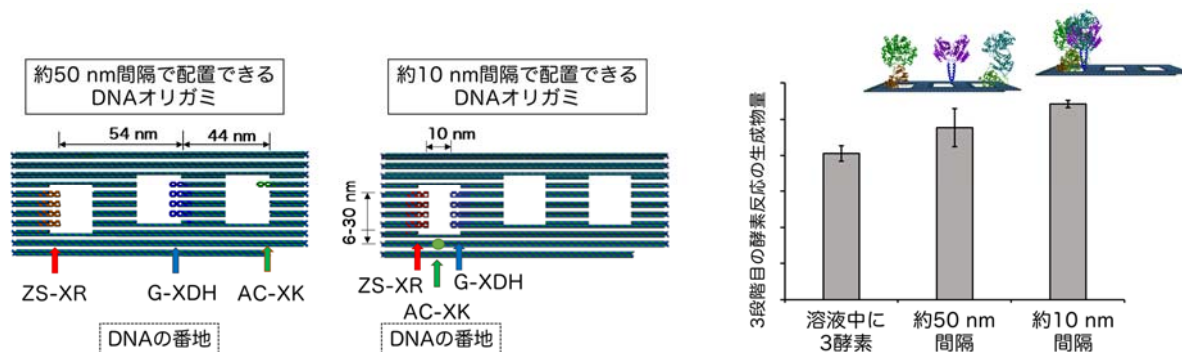


図 4.(左・中) 約 10 nm と約 50 nm の間隔で酵素を配置できる DNA オリガミの模式図。(右) 3 段階目の酵素反応で生成する ADP 量を比較して、3 段階の酵素反応の効率を比較評価した結果。

3. 波及効果、今後の予定

今回の研究では、モジュール型アダプターの種類を増やすことで DNA ナノ構造体上に 3 種類の酵素を 1 分子ずつナノメートル精度の距離で並べることができるようになりました。本研究の成果を応用して、今後さらにモジュール型アダプターの種類を増やすことで、より複雑な多段階反応を「分子コンビナート」で実現できます。また、単に複数の酵素を混ぜ合わせただけでは進行しないような多段階の反応が「分子コンビナート」で達成できると期待できます。さらには、細胞内の連続する代謝反応を効率よく細胞の外で再現するだけでなく、生物にはできない反応を組み合わせた人工代謝反応を実現することも可能だと考えています。

4. 研究プロジェクトについて

・本研究は JSPS 科学研究費補助金 (森井 孝: 25248038、15H01402、17H01213; 中田 栄司: 15H05492、17H05440) の支援を受けました。

<論文タイトルと著者>

タイトル : Design of Modular Protein-Tags for the Orthogonal Covalent Bond Formation at Specific DNA Sequences

著者 : Thang Minh Nguyen、中田 栄司、才村 正幸、Huyen Dinh、森井 孝

掲載誌 : *Journal of the American Chemical Society*