

**京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書**

2019 年 4 月 30 日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 エネルギー理工学研究所

職 名 准教授

氏 名 中田 栄司

助 成 の 種 類	平成 30 年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	反応速度を指標にした塩基配列選択的な架橋形成タンパク質の創製			
上記以外で助成金を 充 当 した 研 究 内 容				
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) 1. 張 正宵・中田 栄司・Thang Minh Nguyen・森井 孝, Design of sequence specific modular adaptors by tuning the reactivity of protein-tag substrate, 第12回バイオ関連化学シンポジウム, H.30.9.9-11. 2. Eiji Nakata, Thang Minh Nguyen, Zhengxiao Zhang, Huyen Dinh, Peng Lin, Masayuki Saimura, Takashi Morii, DNA Binding Adaptors for Locating Multiple Enzymes on DNA scaffold, ISNAC 2018, H30.11.7-9. 3. Zhengxiao Zhang, Eiji Nakata, Thang Minh Nguyen, Takashi Morii, Design of sequence specific modular adaptors by tuning the reactivity of protein-tag substrates, ISNAC2018, H30.11.7-9. 4. Zhengxiao Zhang, Eiji Nakata, Thang Minh Nguyen, Takashi Morii, Tuning the reactivity of crosslink formation for sequence-selective DNA-protein conjugation, 日本化学会第99春季年会 H31.3.16-19.			
成 果 の 概 要	別紙のとおり			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		AFM用カンチレバー	421,200	
		生化学実験用アイソトープ	39,960	
		その他消耗品(カラム等)	538,840	
当財団の助成に つ い て	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 科研費申請課題が不採択となり、研究費が不足しておりました。そんな状況の中で、貴財団からのご支援をいただいたことで、研究を円滑に推進することができました。心より感謝申し上げます。今後も同様のご支援を継続していただけるようお願いいたします。			

1. 緒言

迅速かつ高選択的に標的分子と反応し、安定な共有結合(架橋構造)を形成することは、架橋反応性分子の設計における理想である。DNA の架橋形成反応を想定すると、特定の DNA 塩基配列に対してのみ高選択的に架橋できる分子となる。しかし実際は、架橋形成反応の反応性が高いと標的とは違う配列の DNA とも反応してしまう。一方、選択性を確保しようとすると、架橋形成反応は遅くなる。つまり、高い反応性と高い選択性はトレードオフの関係にあり、その両立は非常に困難である。¹本研究では、「高い反応性と高い選択性の両立のために、速度論的パラメータに基づいてどのように設計すればよいか？」をタンパク質と DNA の架橋形成反応を基盤として取り組んだ。DNA 認識過程と架橋形成過程の反応速度の相関関係を理解した上で、それらの速度論的パラメータをもとに、同一の架橋形成反応を用いても高い反応性と高い選択性を両立できるような合理的設計戦略を導くことを目指した。

2. 研究成果

我々はこれまでに、タンパク質を DNA ナノ構造体²上に一分子レベルで配置する技術「DNA 結合性アダプター法」を開発してきた³。特に、「共有結合型アダプター」^{4,5}は、DNA 認識部位(DNA 結合性タンパク質)と架橋形成部位(タグタンパク質)(特定の基質と架橋するタンパク質)からなる融合タンパク質(図 1(a))であり、反応部位を修飾した DNA 配列と迅速かつ定量的に架橋を形成する(図 1(b))。

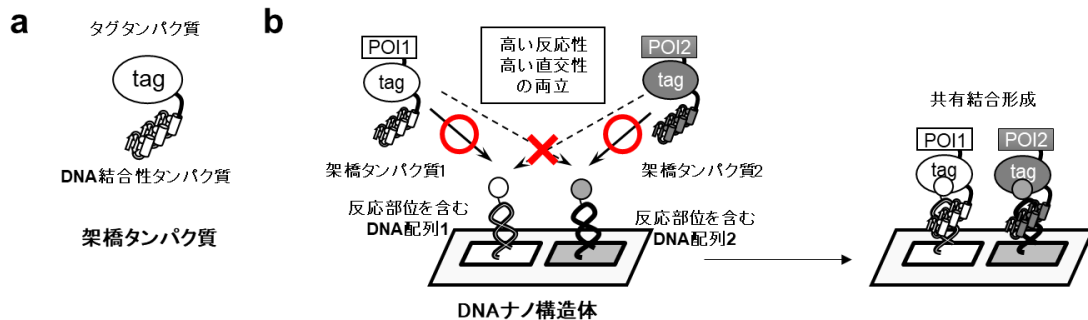


図 1. DNA 結合性アダプター法 (a)共有結合型アダプターの構成
(b) DNA ナノ構造体上で達成すべき「高い反応性と高い選択性の両立」

この方法では、DNA 結合性タンパク質が DNA 配列を認識し、タグタンパク質が DNA 上の反応部位(基質)と架橋する(図 2(a))。この技術を複数種類の酵素を配置するために展開する場合に、高い反応性と高い選択性が両立することが必須となる。

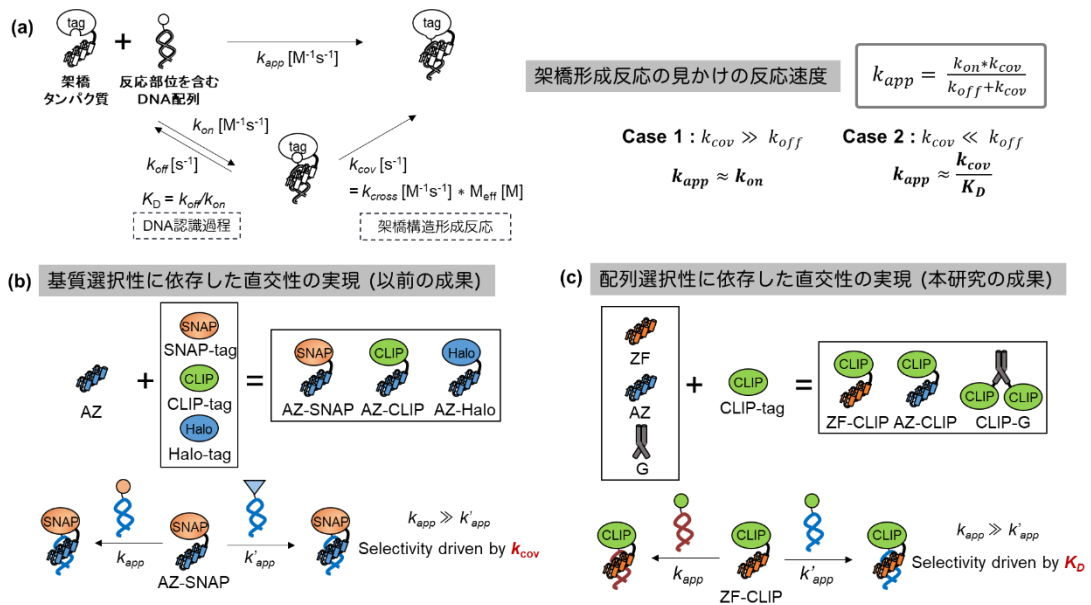


図 2 (a) DNA と架橋タンパク質間での架橋構造形成反応の反応速度論的解釈

(b) 基質選択性に依存した直交性の実現

(c) 配列選択性に依存した直交性の実現

これまでに、異なる種類のタグタンパク質と DNA 結合性タンパク質を組み合わせた場合には、タグタンパク質の基質選択性に依存した高い選択性を持つ複数種類の DNA 結合性アダプターの獲得に成功している(図 2(b))。⁶ 一方で、同じタグタンパク質と別の配列選択性を持つ DNA 結合性タンパク質を組み合わせた場合には、期待したような高い選択性が得られなかった。これは、DNA 結合性タンパク質が、認識過程で最初は非特異的に DNA と結合するためと推察された。しかしながら、「DNA 結合性タンパク質の認識過程」と「反応部位間の架橋形成過程」の速度論的パラメータ(図 2(a)中の式)をもとにすると、各部位を適切に選択することで、塩基配列選択的な架橋反応が実現可能であることが予測されていた(図 2(c))。⁶

そこで反応性の異なるタグタンパク質とその基質の組み合わせを採用し、比較することで、ある組み合わせにおいて、高い反応性を維持しつつ DNA の配列選択性を維持できる DNA 結合性アダプターと基質を修飾した DNA の組み合わせを見出すことに成功した(図 3)。

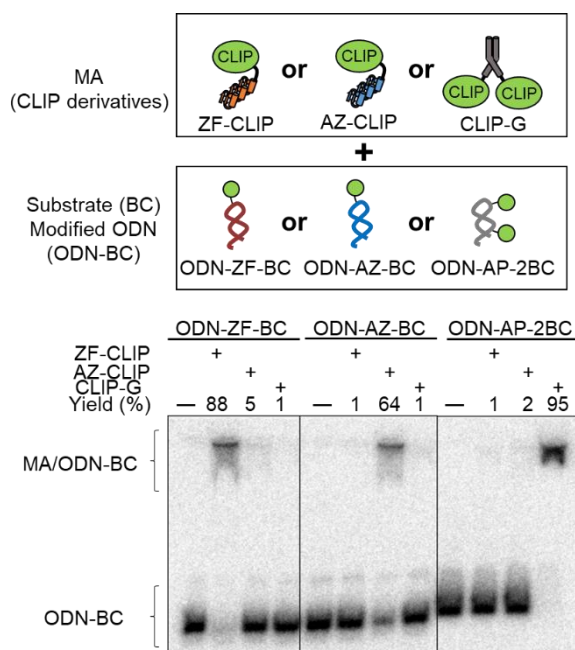


図 3.高い反応性と高い選択性を両立可能な DNA 結合性アダプター(共有結合型)。ここでは、3 種類の DNA 結合性タンパク質にタグタンパク質(CLIP-tag)を融合した 3 種類の共有結合型アダプター(ZF-CLIP, AZ-CLIP, CLIP-G)を用意した。それぞれの DNA 結合性タンパク質に特異的な配列とタグタンパク質の基質(BC)を修飾した DNA(ODN-ZF-BC, ODN-AZ-BC, ODN-AP-2BC)を用いて架橋反応をゲルシフトアッセイにて評価した。それぞれ対応した組み合わせの場合にのみ架橋構造に由来するシフトしたバンドが確認される(ゲル中 MA/ODN-BC に対応)。⁷

3. まとめと今後の見通し

本研究においては、あらかじめ予測されたタグタンパク質と基質の組み合わせを評価することで、反応性を調整し、高い反応性を維持しつつも DNA の配列選択性を維持できる組み合わせを見出した。これを水平展開することで、さらに異なるタグタンパク質と基質の組み合わせにより、直交性を発揮する DNA 結合性アダプターの構築も可能と考えられる。さらに本研究を通じて、各パラメータを算出して、反応性と選択性の関係性について詳細に評価することで、反応速度パラメータに基づいた合理的設計を可能とする設計指針を得られることが示唆された。この方向性については引き続き検討していく予定である。

4. 参考文献

- [1] T. Bando and H. Sugiyama, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 935.
- [2] (a) P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297. (b) F. Hong, F. Zhang, Y. Liu, H. Yan, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 12584.
- [3] (a) A. Rajendran, E. Nakata, S. Nakano, T. Morii, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 696. (b) T. A. Ngo, H. Dinh, T. M. Nguyen, F. F. Liew, E. Nakata, T. Morii, *Chem. Commun.* **2019**, *10*, 9315.
- [4] E. Nakata, H. Dinh, T. A. Ngo, M. Saimura, T. Morii, *Chem. Comm.* **2015**, *51*, 1016.
- [5] T. A. Ngo, E. Nakata, M. Saimura, T. Morii, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3012.
- [6] T. M. Nguyen, E. Nakata, M. Saimura, H. Dinh, T. Morii, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 8487.
- [7] T. M. Nguyen, E. Nakata, Z. Zhang, M. Saimura, H. Dinh, T. Morii, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 9315.