

京都大学教育研究振興財団助成事業
成果報告書

2024 年 2 月 6 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 助教

氏 名 Lin Peng

助成の種類	令和5年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究課題名	細胞内生体分子凝集体をDNAナノ構造体で模倣して酵素反応を調節する			
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	(1) Peng Lin, Hui Yang, Eiji Nakata, Takashi Morii. Three-dimensional DNA hexagonal prisms for cascaded enzyme reactions. 50th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, November 1-3, 2023, Miyazaki, Japan. (2) Peng Lin, Eiji Nakata, Takashi Morii. Enhanced catalytic activity of an enzyme assembled on a DNA nanostructure, Asia 3 Roundtable of Nucleic Acids, November 11-13, Chengdu, China			
成果の概要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
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	
		実験消耗品、物品費	616,511円	
		旅費(国内・海外)	246,730円	
		ピペットマン修繕費	48,862円	
諸会費		76,017円		
委託費(解析料)	11,880円			
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。) 本研究助成によって、本研究計画を推進する上で不可欠な酵素-DNA高濃度凝集体の構築に必要な実験資材を提供していただくとともに、国際学術会議に出席して、成果の一部を発表する事ができました。			

成果の概要 / Lin Peng

研究目的

細胞内で、核酸およびタンパク質によって形成される高度に濃縮された会合体（高度濃縮会合体）は、液-液相分離状態もしくは凝縮状態をとって、細胞代謝を効率的に調節すると考えられている。このような会合体は、細胞内で代謝反応を含む多くの酵素反応に関与していると考えられている。しかし、このような会合体が酵素反応を調節する化学的な機構は未だに解明されていない。本研究計画の目的は、生体分子高度濃縮会体内での酵素反応を、細胞外で解析し、それを模倣するための一般的な分子システムを確立することにある。そのための戦略として、申請者は DNA ナノテクノロジーを応用し、高度濃縮会合体を模した酵素の空間配置を構築するために、DNA ナノ構造体を足場として利用する。この研究によって、細胞内の膜のないオルガネラの機能に関する基礎的な知見、さらに人工代謝システムと創薬のための新しい戦略が得られる。

研究内容

カルボキシソームは、炭素固定において中心的な役割を果たす細胞内区画である。2つの酵素、リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) と炭酸脱水酵素 (CA) は、カルボキシソームのタンパク質外殻に封入されている (図 1a) [1]。そこでは RuBisCO が液液相分離状態を形成し、それが基質の局所濃度を調節すると推定されている。

(1) DNA 折り紙法による DNA 足場の構築

得られた DNA 足場は、原子間力顕微鏡 (AFM)、アガロースゲル電気泳動、透過型電子顕微鏡 (TEM) により評価した。測定された寸法は設計寸法とよく一致した。これらの足場は、開いた状態から閉じた状態へとダイナミックに形状が変化するように設計した [2, 3]。開いた状態から閉じた状態への形状変換はフェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) の計測によって追跡した。2次元 DNA 足場と比較して、3次元 DNA 足場は、酵素の配向、酵素の位置、酵素間の距離を制御することで、酵素の空間的組織化のバリエーションを増やすことができる。本研究の結果をもとにして、3次元 DNA 足場を用いた人工カルボキシソームの構築に焦点を当て、RuBisCO の環境を模倣した *in vitro* での効率的な CO₂ 固定を目指す。

(2) DNA 足場上での RuBisCO の構築

開いた状態から閉じた状態まで動的に形状を変化させることができる浅い DNA 六角柱を、酵素の空間的組織化に用いた (図 1b)。 *Rhodospirillum rubrum* 由来の二量体 RuBisCO を、塩基性ロイシンジッパータンパク質 GCN4 と融合し、G-RuBisCO を得た (図 1c) [4]。GCN4 は特定の DNA 配列と非共有結合によって複合体を形成した。まず、開いた状態で G-RuBisCO を足場上に配置し、その後、閉鎖キー (短い DNA) によって足場が閉じた状態へと変換することを試みた。SHP が閉じた状態では、RuBisCO 分子が接触するように設計したため、密接状態での RuBisCO の CO₂ に対する活性と特異性を解析することができる [5]。

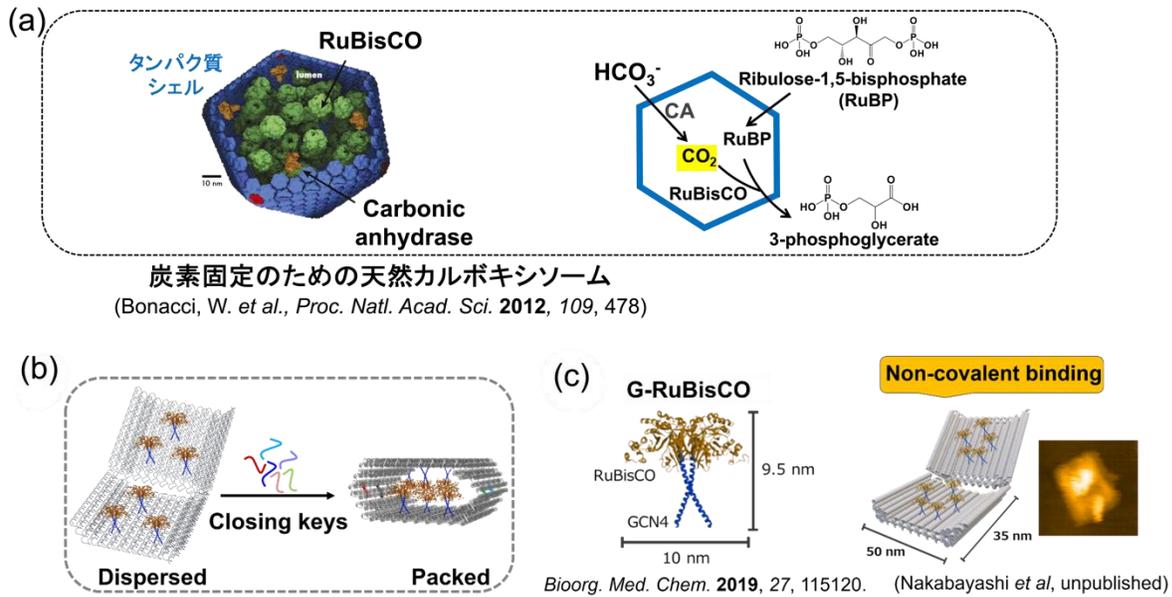


図1 (a) RuBisCO (緑) と CA (オレンジ) から形成されるカルボキシソームの模式図[1]。(b) 酵素を担持した DNA 足場の形状変換。(c) DNA 足場上の G-RuBisCO の集合体[5]。

今後の展望

人工カルボキシソームの構築と機能評価

炭酸脱水酵素共存下での RuBisCO が密集状態の二酸化炭素固定効率を測定する。モジュラーアダプターの結合位置と数を変えると、さまざまな分子数の RuBisCO と CA を特定の空間的位置に配置できる。

引用文献

[1] Bonacci, W.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, 109, 478; [2] Rothemund P.W.K. *Nature* **2006**, 440, 297; [3] Lin, P.; et al. *Adv. Func. Mater.* **2023**, 33, 2215023; [4] Dinh, H.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, 27, 115120; [5] Yang, H.; Nakabayashi, M.; Konishi, H.; Lin, P.; Nakata, E.; Morii, T., unpublished.