

令和 4 年 10 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19145

研究課題名(和文)組成比を制御したヘテロ多量体調製技術による人工フィコビリソームの創製

研究課題名(英文)Construction of Artificial Phycobilisome assisted by DNA scaffold

研究代表者

中田 栄司(NAKATA, EIJI)

京都大学・エネルギー理工学研究所・准教授

研究者番号：70467827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質を分子レベルで制御して自在に配置することができればこれまでは達成が困難であった新たな機能の付与ができるようになることが期待される。本研究では、DNAナノ構造体の様々な機能性材料を並べる際に分子レベルで制御した足場となる利点と、我々が開発したDNAナノ構造体へのタンパク質配置技術(アダプター法)を駆使して、新規機能を獲得することを目指した。その標的として、フィコビリソームに代表される光捕集アンテナタンパク質複合体の量体制御を目指した。研究目的の一つであったアダプター法の拡充という点においては、良好な成果を得られており、今後も引き続き研究を継続していくことが望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質は高機能な生体高分子であり、この機能を自在に制御して温和な条件下で様々なシステムを構築して利用することは持続可能な社会において必要とされる技術です。本研究では、タンパク質を自在に配置することが可能なDNAナノ構造体を足場として、我々が開発したタンパク質配置技術を利用して高機能なシステムを構築することを目指しています。そのひとつとして、タンパク質本来の光捕集能を操作できる可能性について検討をおこなうのがこの研究の目的でしたが、これに限らず様々な応用展開が期待される拡張性の高い研究手法です。

研究成果の概要(英文)：DNA nanostructure was used as the scaffold to locate the functional molecules including proteins and enzymes. We recently developed the method "DNA binding adaptor" to locate protein and enzyme on the DNA scaffold. In this research, we would like to apply the method to construct the protein assembled state for appearing the new function. As a function, we would like to construct artificial phycobilisome by assembling the phycobiliprotein. Through this research, we developed the new adaptor series to assemble various proteins.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：ヘテロ多量体 DNAナノ構造体 DNA結合タンパク質 平衡制御

## 1. 研究開始当初の背景

生体内に存在する多くのタンパク質・酵素は、単量体として機能するだけでなく、多量体を形成することで特有の活性を発揮するものが多く存在する。特にホモ多量体の中には、部分的な変異を含んだ誘導体が生成することでヘテロ多量体を形成し、本来の機能・活性が大きく影響を受けるものが知られている。しかしながら、そのようなヘテロ多量体は、本来のホモ多量体と同程度のタンパク質間相互作用が維持しているため、天然型と変異型の単量体から成るホモとヘテロ多量体が平衡に従って混在している状態となり、単一のヘテロ多量体としての機能を評価するのは不可能であると考えられる。一方で、構造体を足場として、空間配置を制御した状態で、特定の誘導体を配置することができれば、近接効果により、目的のヘテロ多量体を優先的に調製できると期待される。これまでは、タンパク質を一分子レベルで制御して配置する技術そのものがなかったが、近年、DNA ナノ構造体を足場とすることで、DNA を結合部位としてナノの精度で配置できるようになった(総説として *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 12584)。一方、DNA ナノ構造体上の DNA の結合部位に対してタンパク質を正確かつ定量的に配置する技術は以前未発達であったが、最近、我々が開発した DNA 結合性アダプター法によって達成できるようになった(*Chem. Comm.* **2015**, *51*, 1016; *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3012; *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 8487 など)。この方法を利用すれば、アダプターと融合して調製したタンパク質を DNA ナノ構造体上に簡便に配置することができる。そこで、本手法を活用したヘテロ多量体を調製するための方法論の開発を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、様々な量体タンパク質がその対象となる。そのひとつとして、光捕集アンテナタンパク質複合体(フィコビリソーム)の構成要素のひとつであるアロフィコシアニン(APC)に注目した。APC はホモ 3 量体を形成し、単量体につき 2 分子の色素を発色団として有するタンパク質である (*J. Struct. Biol.*, **1998**, *124*, 311)。APC はホモ 3 量体を形成することで、発色団間での相互作用が生じ、3 量体特有の分光特性が生じる。最近では、その色素骨格や APC の色素結合部位近傍のアミノ酸配列への変異を施すことで、波長や量子収率の操作などの新たな分光学的特性が創出できることが示されている(*Nature Methods* **2016**, *13*, 763)。この知見を拡張して、それぞれが波長の異なる単量体を創出し、ヘテロ 3 量体を構築すれば、広範囲の波長を網羅的に吸収することができ、光捕集能が飛躍的に向上した APC ヘテロ 3 量体が構築できる。これは、天然のフィコビリソームでは、別の波長特性を有する光捕集アンテナタンパク質をわざわざ用意し、筒状に連結することで初めて達成されている機能であり、これをヘテロ 3 量体で達成できれば、高効率な光利用システムの構築に繋がる。

## 3. 研究の方法

APC を DNA ナノ構造体上に配置するために、APC の N 末端側または C 末端側に対して、DNA ナノ構造体上の結合部位である DNA 配列に対して高選択的なアダプターを遺伝子工学的に融合し、キメラタンパク質として調製する。この際のアダプターとしては、これまでに申請者らが開発してきた共有結合型アダプター(*Chem. Comm.* **2015**, *51*, 1016 など)を基本として適時

改良して用いる。キメラタンパク質は、大腸菌を宿主としたタンパク質発現システムによっておこなう。次に、アダプターの結合部位を配置したDNAナノ構造体を設計する。DNAナノ構造体の計上と結合部位の空間配置に関しては、APCの結晶構造に基づき、アダプターを介してDNAナノ構造体上に配置した場合に3量体形成が可能な空間配置を予測し設計する。DNAナノ構造体は、サイズ・形状・結合部位への位置などが自由度高く対応することができる。調整したDNAナノ構造体に配置し、分光学的手法や直接的な観察を含めておこなって評価する。また、注目した他の量体タンパク質についてもアダプターを遺伝子工学的に融合し、キメラタンパク質を調製し、その機能評価も視野に入れ研究をおこなった。

#### 4. 研究成果

本研究では、光捕集アンテナタンパク質複合体(フィコビリソーム)の構成要素の一つでホモ三量体を構築することが知られているアロフィコシアニン(APC)を利用して、合目的にヘテロ三量体をつくりわけて、新規な光機能をもったAPCヘテロ三量体を構築することである。そのための基本戦略としては、「異なる各単量体をナノ構造体の足場に配置してヘテロ三量体を形成させる。」ことと「ナノ構造体の設計によって様々なヘテロ三量体をつくりわける」ことが挙げられる。前半の戦略のために、共有結合型アダプターの拡張をおこない、後半の戦略のためにはDNAナノ構造体の設計をおこなった。また、他の多量体タンパク質を構築するために、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)にも注目した。RuBisCOは、光合成における炭酸固定反応(カルビン・ベンソン回路)をおこなう酵素である。

##### 4-1. 共有結合型アダプターの拡張

ナノ構造体上に異なる種類のタンパク質を配置するためのモジュール型アダプター戦略を拡張し、ヘテロ量体を含む複数種類のタンパク質を配置できるように展開した。モジュール型アダプターは「DNA結合性モジュール」と「共有結合形成モジュール」によって構成される。このうち、共有結合形成モジュールに関しては、利用できる種類が限られており、タンパク質サイズが大きく異なるためにヘテロ量体を配置する際に困難を伴うことが想定された。具体的には、同一のDNA結合性モジュールを持つ2種類のモジュール型アダプター(*J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 8487で報告済)であるAZ-CLIPとAZ-Haloは、それぞれ32 kDaと48kDaと分子量が大きく異なる。一方DNA結合性モジュールに関しては、ほぼ同一サイズでDNA塩基配列選択性が異なるものが知られており(例: AZ = 12 kDa, ZF = 12kDa, *Angew. Chem. Int. Chem. Ed.* **2012**, *51*, 2421. で報告済)、拡張性の点からも同一の共有結合形成モジュールを有するモジュール型アダプターが有用であることが期待された。しかしながら、以前の報告(*J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 8487)では、同一の共有結合形成モジュールを有するモジュール型アダプターは、塩基配列選択性が乏しく、厳格な配置制御が困難なことが明らかとなっていた。これを反応速度論に基づく合理的な設計を経ることで同一の共有結合形成モジュールを有するモジュール型アダプターを獲得することに成功した(*Chem. Sci.* **2019**, *10*, 9315.)。この知見をもとに更なるモジュール型アダプターの拡充についても引き続き検討しており、別報としての報告を予定している(2020年現在)。これについても報告済である(*Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 18118)。

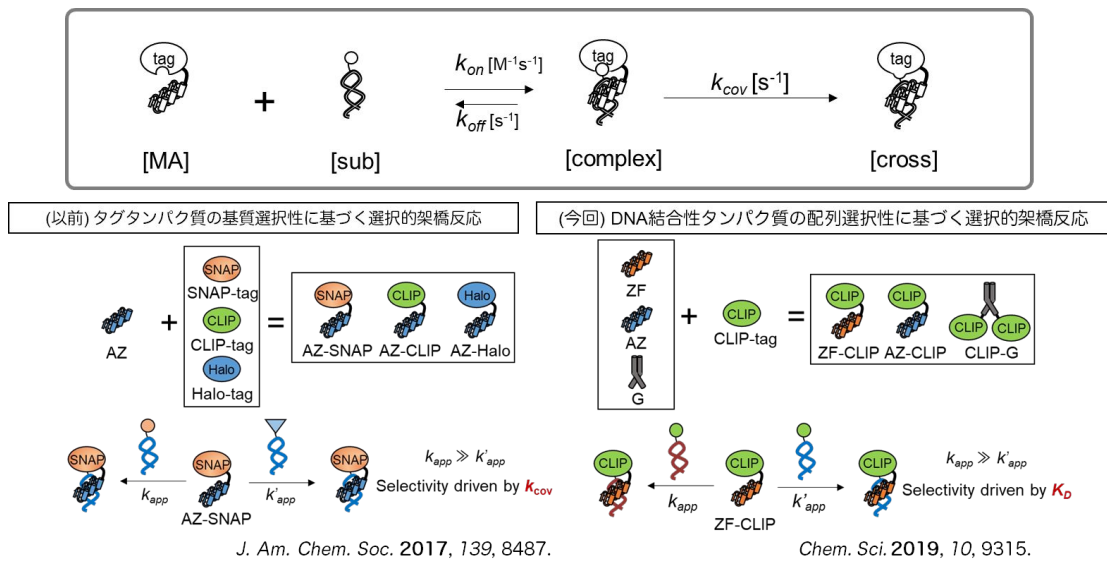


図1. モジュール型アダプターの拡張

#### 4-2. モジュール型アダプター融合APCの調製とDNAナノ構造体の調製について

4-1.で示したモジュール型アダプターを融合したAPCについてプラスミドを構築し、融合タンパク質として獲得することを試みた。APCについては、APCの結晶構造(PDB ID:1B33)に基づくモデリングの結果、C末側にモジュール型アダプターを導入するのが適当であった。そこで、実際にプラスミドを構築し、大腸菌を宿主として発現を試みたが、可溶性の成分として獲得するに至らなかった。これには、APCとモジュール型アダプター間の導入位置の検討、リンカー等の構造の最適化などの引き続きの検討が必要である。一方、色素を導入する際に酵素(リアーゼ)が必要となる等の知見から、宿主をAPCを生来発現しているシアノバクテリアに変更しておこなっており、継続検討している。

DNAナノ構造体に関しては、過去の文献(*Nature Chem.* 2016, 8, 476)を参考にサイズを自在に変更可能なリング状のDNAナノ構造体を調製し、種々の測定(原子間力顕微鏡(AFM)や透過型電子顕微鏡(TEM)・ゲル電気泳動)によって調製できていることを確認している。

#### 4-3. アダプター融合RuBisCOの調製とDNAナノ構造体上での機能評価

RuBisCOは、光合成における炭酸固定反応(カルビン・ベンソン回路)をおこなう酵素であり、重要な酵素の一つである。生体内では、その反応を効率よく進行させるため、脱炭酸酵素(Carbonic anhydrase : CA)などと共に集積した小構造体、カルボキシソームを形成している。これをDNAナノ構造体を鋳型とし、試験管内で集積させた人工カルボキシソームの構築について検討した(*Bio. Med. Chem.* 2019, 27, 115120)。RuBisCOは、2量体を形成して活性を発揮すること、C末端側の機能が活性発揮に必須であることなどを含め、N末端側に二量体形成用のアダプターとして開発したGCN4 (*Methods* 2014, 67, 142)を導入したG-RuBisCOを調製した。G-RuBisCOは天然のRuBisCOと比較してほぼ同等の活性を示し、アダプターを導入した影響は確認されなかった。次に、試験管内でカルボキシソームを構築することを目的とし、その構成要素であるCAに対して前述のモジュール型アダプターを導入したZS-CAを調製した。図2に示すようにG-RuBisCO及びZS-CAを同一のDNAナノ構造体上に配置し、ZS-CAが存在しない場合や溶液中にZS-CAが混在し

た場合とRuBisCO活性を比較評価した。G-RuBisCOとZS-CAを同時に配置した場合にG-RuBisCO活性が高くなることが期待されたが、逆の結果となった。

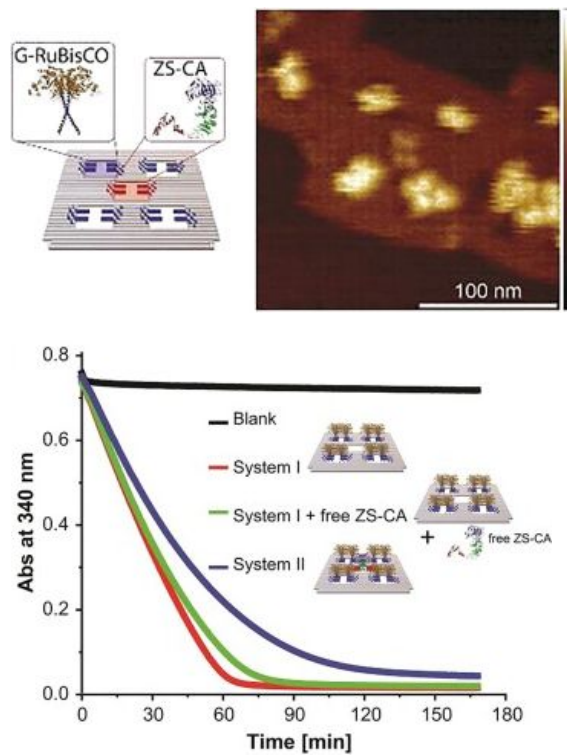


図2 . G-RuBisCO及びZS-CAを配置したDNAナノ構造体

#### 4-4.まとめ

タンパク質の集合状態を任意に操作することで新たな活性を発揮することを期待し、そのための技術であるモジュール型アダプターの拡充と、その技術を利用したフィコビリソーム構成タンパク質であるアロフィコシアニン(APC)誘導体およびカルボキシソーム構成タンパク質であるリブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO)誘導体を調製した。特にRuBisCOに関しては、カルボキシソーム構成タンパク質(CA)と同一のDNAナノ構造体上に配置し、その機能がどのように変化するかについて評価した。このような評価は分子レベルで操作して構造体を構築することができる本手法ならではの評価であることから、今後も様々な事例に対して応用展開していくことが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nakata Eiji, Dinh Huyen, Nguyen Thang Minh, Morii Takashi	4. 巻 617
2. 論文標題 DNA binding adaptors to assemble proteins of interest on DNA scaffold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 287 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mie.2018.12.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakata Eiji, Nakano Shun, Rajendran Arivazhagan, Morii Takashi	4. 巻 1
2. 論文標題 Covalent Bond Formation by Modular Adaptors to Locate Multiple Enzymes on a DNA Scaffold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kinetic Control in Synthesis and Self-Assembly 2019, pp.163-183	6. 最初と最後の頁 163-183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nguyen Thang Minh, Nakata Eiji, Zhang Zhengxiao, Saimura Masayuki, Dinh Huyen, Morii Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Rational design of a DNA sequence-specific modular protein tag by tuning the alkylation kinetics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 9315 ~ 9325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9sc02990g	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Dinh Huyen, Nakata Eiji, Lin Peng, Saimura Masayuki, Ashida Hiroki, Morii Takashi	4. 巻 27
2. 論文標題 Reaction of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase assembled on a DNA scaffold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115120 ~ 115120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.115120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ngo Tien Anh, Dinh Huyen, Nguyen Thang Minh, Liew Fong Fong, Nakata Eiji, Morii Takashi	4. 巻 55
2. 論文標題 Protein adaptors assemble functional proteins on DNA scaffolds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 12428 ~ 12446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9CC04661E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Zhengxiao, Nakata Eiji, Dinh Huyen, Saimura Masayuki, Rajendran Arivazhagan, Matsuda Kazunari, Morii Takashi	4. 巻 27
2. 論文標題 Tuning the Reactivity of a Substrate for SNAP Tag Expands Its Application for Recognition Driven DNA Protein Conjugation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 18118 ~ 18128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202103304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Dinh Huyen, Nakata Eiji, Mutsuda-Zapater Kaori, Saimura Masayuki, Kinoshita Masahiro, Morii Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Enhanced enzymatic activity exerted by a packed assembly of a single type of enzyme	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 9088 ~ 9100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0SC03498C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Eiji Nakata, Takashi Morii
2. 発表標題 DNA Binding Adaptors to Locate Multiple Enzymes on DNA scaffold
3. 学会等名 理研・CSRS融合研究セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中田 栄司・森井 孝
2. 発表標題 DNAナノ構造体上に複数種類の酵素を配置した分子コンビナート
3. 学会等名 東京大学薬学研究科天然物化学教室 講演会#121 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 LIN Peng・Dinh Huyen・Thang Minh Nguyen・Nakata Eiji・Morii Takashi
2. 発表標題 Construction of a 3D DNA nanostructure for assembling enzyme cascade reaction
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eiji Nakata, Takashi Morii
2. 発表標題 DNA Binding Adaptors to Locate Multiple Enzymes on DNA scaffold
3. 学会等名 ACeND 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eiji Nakata, Thang Minh Nguyen, Zhengxiao Zhang, Huyen Dinh, Peng Lin, Masayuki Saimura, Takashi Morii
2. 発表標題 DNA Binding Adaptors for Locating Multiple Enzymes on DNA scaffold
3. 学会等名 ISNAC2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Peng LIN, Huyen Dinh, Nguyen Minh Thang, Eiji Nakata, Takashi Morii
2. 発表標題 Assembling cascade enzymes on a 3D DNA nanostructure
3. 学会等名 ISNAC2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Zhengxiao Zhang, Eiji Nakata, Thang Minh Nguyen, Takashi Morii
2. 発表標題 Design of sequence specific modular adaptors by tuning the reactivity of protein-tag substrates
3. 学会等名 ISNAC2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eiji Nakata, Takashi Morii
2. 発表標題 DNA Binding Adaptors to Locate Multiple Enzymes on DNA scaffold
3. 学会等名 ISNM2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中田栄司・森井 孝
2. 発表標題 酵素を“1分子ずつ”狙った場所に配置する 生物から学んだ分子コンピナートへの挑戦
3. 学会等名 東京農業大学 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ZHANG, Zhengxiao; NAKATA, Eiji; THANG, Nguyen Minh; MORII, Takashi
2. 発表標題 Tuning the reactivity of crosslink formation for sequence-selective DNA-protein conjugation
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 DINH, Huyen; NAKATA, Eiji; KINOSHITA, Masahiro; MORII, Takashi
2. 発表標題 Enhanced enzymatic activity with a packed assembling of enzyme
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 LIN, Peng; DINH, Huyen; THANG, Minh Nguyen; NAKATA, Eiji; MORII, Takashi
2. 発表標題 Reaction of enzyme cascades assembled in 3D DNA nanostructure
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中田栄司・森井 孝
2. 発表標題 DNAナノ構造体上に複数種類の酵素を配置した分子コンビナート
3. 学会等名 東京大学薬学研究科天然物化学教室 講演会#121 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eiji Nakata, Takashi Morii
2. 発表標題 DNA Binding Adaptors to Locate Multiple Enzymes on a DNA scaffold
3. 学会等名 暨南大学 講義（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eiji Nakata, Takashi Morii
2. 発表標題 DNA Binding Adaptors to Locate Multiple Enzymes on a DNA scaffold
3. 学会等名 武漢大学 講義（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中田 栄司, 張 正宵, Nguyen Minh Thang, 才村正幸, 松田 一成, 森井 孝
2. 発表標題 反応速度論に基づいたDNA配列選択的なモジュール型アダプターの設計
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eiji Nakata, Takashi Morii
2. 発表標題 DNA Binding Adaptors to Locate Multiple Enzymes on DNA scaffold
3. 学会等名 第10回日英シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Z. Zhang, E. Nakata, T.M. Nguyen, T. Morii
2 . 発表標題 Design of sequence specific modular adaptors by tuning the reactivity of protein-tag substrate
3 . 学会等名 ISNAC2019 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 E. Nakata, T. Morii
2 . 発表標題 DNA Binding Adaptors to Locate Multiple Enzymes on a DNA scaffold
3 . 学会等名 The 2nd International Symposium of Biofunctional Chemistry ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Z. Zhang, E. Nakata, T.M. Nguyen, T. Morii
2 . 発表標題 Tuning the reactivity of crosslink formation for sequence-selective DNA-protein conjugation
3 . 学会等名 日本化学会 第100春季年会
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 H. Dinh, E. Nakata, K. Mutsuda-zapater, M. Saimura, M. Kinoshita, T. Morii
2 . 発表標題 Enhanced enzymatic activity with a packed assembly on DNA scaffold
3 . 学会等名 日本化学会 第100春季年会
4 . 発表年 2020年

1. 発表者名 P. Lin, H. Dinh, Y. Morita, E. Nakata, T. Morii
2. 発表標題 A dynamic DNA scaffold for enzyme cascade reaction
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------