

令和 6 年 10 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2023

課題番号：17KK0107

研究課題名（和文）リポソーム内での効率的な逐次酵素反応をめざした酵素重合高分子の構築

研究課題名（英文）Construction of enzymatic polymers for efficient sequential enzymatic reactions in liposomes

研究代表者

神谷 厚輝（Kamiya, Koki）

群馬大学・大学院理工学府・助教

研究者番号：70612315

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 1ヶ月

研究成果の概要（和文）：3本の1本鎖DNAで三又構造を形成する1本鎖DNAを各酵素(3種類)に付加し、3種の酵素-DNAを混ぜることで酵素複合体の形成を動的な光散乱や電気泳動に確認した。また、酵素複合体の方が、最終産生物量がなくなったことを明らかにした。次に、3種類のmiRNAの存在を検出できるように、miRNAの相補配列をもった1本鎖DNAを設計し、この1本鎖DNAを酵素に付加した。酵素複合体に3本のmiRNAを加えると、酵素複合体の粒径が減少することを動的な光散乱法で確認した。さらに、透過型電子顕微鏡にて酵素複合体の崩壊の様子を観察に成功した。そして、3本のmiRNAの存在によって、最終産生物量が減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1つの酵素に2本以上の1本鎖DNAを付加させることにより、酵素がネットワーク的に結合することで酵素複合体が形成された。miRNAやRNase等の外部刺激によって、複合体の形成や解離の制御に成功した。これは、酵素による産物のON/OFFに繋がる。また、この酵素複合体システムは高効率な物質生産のみならず、疾患診断にも応用可能である。

研究成果の概要（英文）：The formation of enzyme-DNA complexes was confirmed by dynamic light scattering and electrophoresis after mixing three distinct enzyme-DNAs. These complexes demonstrated an increased yield of the final product. The subsequent introduction of three miRNAs to the complexes reduced their particle size, as established by dynamic light scattering. Transmission electron microscopy provided evidence of the complexes' disintegration. Additionally, the presence of the three miRNAs decreased the amount of the final product.

研究分野：生体関連化学

キーワード：酵素 逐次反応 DNAナノテクノロジー バイオセンサ

1. 研究開始当初の背景

細胞サイズリポソームは、細胞膜と同じリン脂質二重膜から構成されているため人工細胞モデルや分子ロボット構築に有益な素材と目されている。細胞サイズリポソームを用い、膜タンパク質の機能解析やマイクロドメインの形成などの膜上で生じる現象についての多くの研究が報告されている。細胞内では、多くの種類の酵素の逐次反応によって細胞の重要な機能を発現している。細胞内では、酵素等の水溶性タンパク質が高密度に存在しているため、シグナル伝達等の反応が迅速に進行する。リポソーム内には、細胞内のように高濃度な酵素の封入は困難である。そこで、リポソーム内で効率的な酵素逐次反応の起動させる仕組みを構築することが求められる。

2. 研究の目的

リポソーム内の酵素濃度を高めるのではなく、酵素同士を近接させ酵素の局所を高めることで、酵素反応の効率化を目指す。酵素の局所濃度を高める方法としては、スイス連邦工科大学(ETH)チューリッヒ校の Peter Johann Walde 教授研究室が考案したポリエチレングリコール鎖に、末端にアミノ基を持つデンドリマーを付加しアミド結合により酵素を結合させ、酵素のカスケード反応に成功している。Walde 教授と共同研究をすることで、酵素近接手法を習得し、リポソーム内で効率的な酵素カスケード反応再現をおこなうことを目的とした。当初は、デンドリマーに酵素を化学修飾することで、酵素近接と反応の効率化を達成しようとしたが、コロナ禍となり思うように ETH に赴くことが困難になった。デンドリマーへの酵素修飾は酵素を化学的に結合させるため、酵素を近接させた状態のみである。細胞内のように外部刺激によって酵素反応の ON/OFF を、Walde 教授の研究から着想を得て酵素に化学的に修飾した一本鎖 DNA のハイブリダイゼーションを利用することで、酵素の近接と解離を制御することで実現できないかと考えた。さらに、miRNA や RNase などの生体分子を加えることで、酵素反応の ON/OFF の制御が可能になる。

3. 研究の方法

1. DNA のハイブリダイゼーションによる酵素複合体の形成と酵素活性の向上

3 種類の 1 本鎖 DNA を用い、ハイブリダイゼーションすることで 3 つ又構造を形成する 3 種類の 1 本鎖 DNA を設計した。そして、それぞれの 1 本鎖 DNA を 1 種類の酵素(β ガラクターゼ (β Gal)、グルコースオキシダーゼ(GOx)、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP))に化学的に修飾した。カラムクロマトグラフィー等で酵素に結合していない 1 本鎖 DNA を除去し、1 つの酵素に 2 本以上の 1 本鎖 DNA が結合するようにした。そして、3 種の DNA-酵素を混ぜ、室温でインキュベートすることで 1 本鎖 DNA のハイブリダイゼーションによって酵素が近接しネットワークを形成する。このネットワーク形成はタンパク質電気泳動によるバンドシフトや動的散乱による粒形の変化で検討した。さらに、ラクトースを基質として Amplex Red が Resorufin に変換させる酵素カスケード反応によって resorufin 産生量の向上を観察した(図 1)。

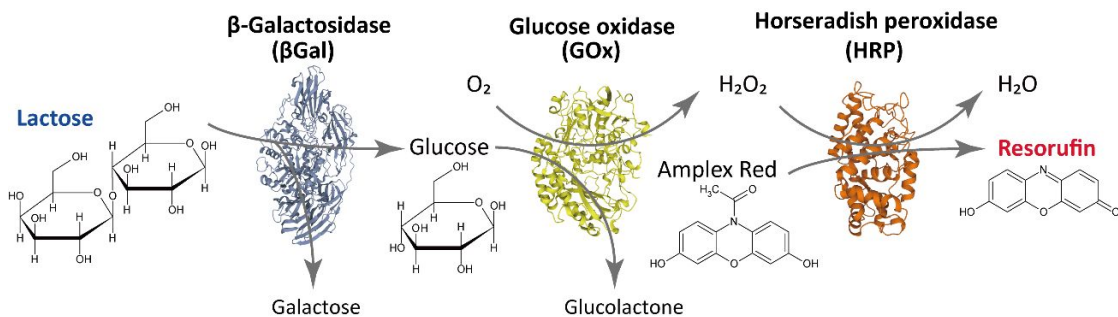


図 1. β Gal, GOx, HRP のカスケード反応の概略図

2. 酵素複合体による 3 種の miRNA の検出

3 種の microRNA(miRNA)の相補配列を持った 1 本鎖 DNA で酵素複合体ネットワークを形成させ、この 3 種の miRNA を加えることで、酵素複合体 (β Gal, GOx, HRP)ネットワークが崩壊するかを検討した。ネットワークの崩壊は、動的散乱法、透過型電子顕微鏡観察や酵素反応によっておこなった。さらに、この酵素複合体による miRNA の検出限界を酵素反応によって検討した。

4. 研究成果

1. DNA のハイブリダイゼーションによる酵素複合体の形成と酵素活性の向上

3 種類の酵素 β Gal, GOx, HRP にそれぞれに、異なる配列の一本鎖 DNA を 2 本以上が付加される条件を、Maleimide-PEG4-NHS やアミノ基付加 1 本鎖 DNA の量を振ることで検討した。今回使用した 1 本鎖 DNA は 3 本の 1 本鎖 DNA がハイブリダイゼーションすることで、3 又構造を形成する。そして、限外濾過等を行うことで、DNA が付加されていない酵素や酵素に付加されていない 1 本鎖 DNA を除去した。電気泳動によって酵素に 2 本以上の DNA が付加されていることが明らかになった。1 本鎖 DNA が酵素に結合しているかを、動的光散乱によって確認した。DNA が付加された酵素の流体力学直径は若干大きくなった。次に、3 種類の DNA-酵素を加え、流体力学直径を測定した。3 種類の DNA-酵素を混合すると、流体力学的直径は、 74.4 ± 4.18 nm であった。このサンプルに DNase I を加えると、流体力学的直径は、 20.8 ± 5.25 nm に減少した。したがって、この酵素複合体は、DNA のハイブリダイゼーションによって形成されることがわかった。この酵素複合体の酵素カスケード反応を行った。3 種類の酵素を DNA によって集積させることで、この酵素カスケード反応の最終産物の resorufin が DNA を持たない 3 種類の酵素の resorufin の産生量に比べて増大した。また、DNA 未修飾の GOx と 1 本鎖 DNA を修飾した Gal と HRP を加えたところ、DNA を持たない 3 種類の酵素の resorufin の産生量と同程度であった。したがって、この結果より、3 種類すべての酵素が DNA によって近接化することで酵素活性の増大が確認された。

次に DNA の配列特性を生かし、1 本鎖 DNA を酵素に付加させたあとに、この 1 本鎖 DNA の相補配列の RNA を設計した。その相補 RNA 鎖を DNA-酵素に加え、DNA に RNA をハイブリダイゼーションさせ、DNA 同士のハイブリダイゼーションを阻害させた。RNA 鎖を結合させた DNA を付加した三種の酵素を混ぜ、動的光散乱にて流体力学直径を計測したところ、 20.6 ± 1.47 nm であった。そこに、RNase A を加えると、流体力学直径が 76.9 ± 4.04 nm と増加した(図 2 左)。したがって、この結果は、RNA 鎖によって、DNA 同士のハイブリダイゼーションが阻害され、酵素複合体が形成されない状態になった。そこに、RNase A を加えると、DNA と結合した RNA が分解し、DNA 同士がハイブリダイゼーションすることで、酵素複合体が形成されたと推測される。次に、この RNA を含む酵素カスケード反応の resorufin の産生量を観察した。RNA 鎖で DNA 同士のハイブリダイゼーションをブロックした場合は、resorufin の産生量は低かった。RNase A を加え、RNA が分解されることで、1 本鎖 DNA 同士のハイブリダイゼーションによって、酵素が近接され resorufin の産生量は増大した。これらの結果は、外部刺激を RNase A として、酵素複合体の解離と近接を制御することで、resorufin の産生量の制御に成功した。

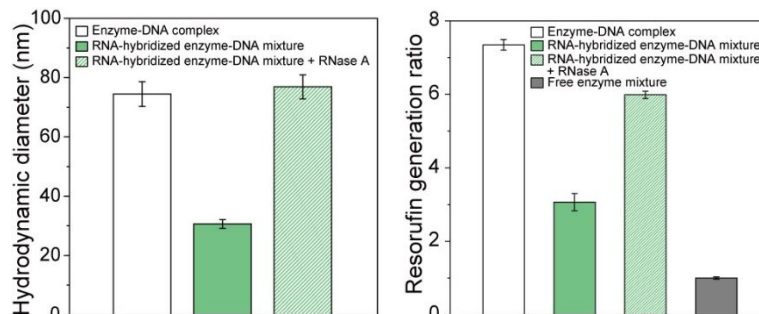


図 2. RNA と RNase A によって制御された酵素複合体の流体力学直径(左)と酵素活性(右)
(Anal. Chem. 2023, 95, 25, 9548–9554 を改変)

2. 酵素複合体による 3 種の miRNA の検出

過去の研究では、1 種類の miRNA の検出は、様々方法で行われてきた。しかし、疾病では 1 種類の miRNA が発現しているわけではなく複数種の miRNA が発現しているため、一度に複数種の miRNA が検出できる系が求められる。今回の DNA による酵素複合体形成システムを応用し、3 種類の miRNA を検出できるシステムを構築した。miRNA の相補配列を含みなおかつ 3 種の 1 本鎖 DNA で 3 又構造を形成できる 1 本鎖 DNA を形成した。そして、前述と同じように、3 種の 1 本鎖 DNA をそれぞれの酵素(β Gal, GOx, HRP)に付加した。そして、3 種の酵素-DNA を混ぜ、酵素同士を近接させた。前述同様に、動的光散乱による流体力学直径の増大と酵素カスケード反応による resorufin の産生量の増大を観察した。そして、3 種類の miRNA を DNA の 15 倍、20 倍と加えると、流体力学直径が減少した(図 3 左)。この結果は、3 種類の miRNA を酵素複合体に加えると、鎖置換が起き酵素複合体が崩壊したことが推測される。したがって、酵素複合体と miRNA を加えた酵素複合体の形状を透過型電子顕微鏡にて観察を行った。酵素複合体の形成が確認された。DNA に対して 20 倍量の miRNA を添加すると酵素複合体が崩壊している様子が観察された。NA に対して miRNA の量を 10 倍、15 倍、20 倍、25 倍と増加させるにつれて、酵

素カスケード反応による resorufin の産生量は低下した。20 倍以上では低下度に変化はなかった (図 3 右)。

また、3 種の miRNA の内 1 種類あるいは 2 種類の miRNA を加えたときの酵素カスケード反応による resorufin の産生量の変化を観察した。その結果、どの組み合わせに関しても、3 種類の miRNA を加えたときよりも酵素カスケード反応による resorufin の産生量の低下は観察されなかった。したがって、今回のシステムは、3 種の miRNA が存在しているときに、resorufin の産生量が大きく低下していることから、AND 演算メカニズムの構築が示された。さらに、このシステムによる miRNA の検出限界を検討したところ、60 nM 以上の miRNA 濃度で検出可能であった。

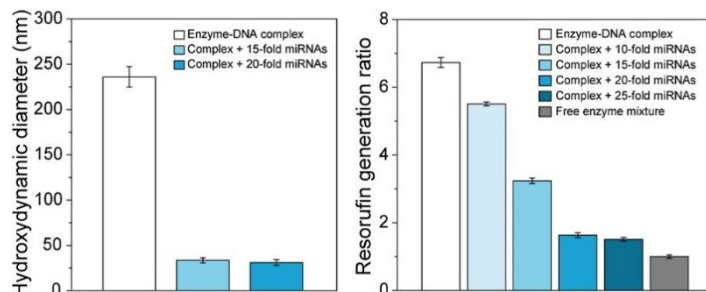


図 3. 3 種の miRNA 添加時の酵素複合体の流体力学直径(左)と酵素活性(右)
(Anal. Chem. 2023, 95, 25, 9548–9554 を改変)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kamiya Koki	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of Artificial Cell Models Using Microfluidic Technology and Synthetic Biology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 559 ~ 559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi11060559	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 Mameuda Aoi, Takinoue Masahiro, Kamiya Koki	4. 巻 95
2. 論文標題 Control of Reversible Formation and Dispersion of the Three Enzyme Networks Integrating DNA Computing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 9548 ~ 9554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.3c00924	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Aoi Mameuda, Koki Kamiya
2. 発表標題 CONTROL OF CASCADE REACTION BY PROXIMITY OF ENZYMES
3. 学会等名 67th Biophysical Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 豆生田葵衣、神谷厚輝
2. 発表標題 DNAを介した酵素複合体を用いたカスケード反応の観察
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第45回研究会 (CHEMINAS 45)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豆生田葵衣、神谷厚輝
2. 発表標題 カスケード反応における酵素複合体形成の寄与
3. 学会等名 第60回生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豆生田葵衣、神谷厚輝
2. 発表標題 酵素複合体を用いた効率的なカスケード反応場の構築
3. 学会等名 細胞を創る研究会 15.0
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豆生田葵衣、神谷厚輝
2. 発表標題 DNAを介した酵素複合体の触媒効率への寄与
3. 学会等名 日本化学会秋季事業 第12回 CSJ化学フェスタ2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豆生田葵衣、神谷厚輝
2. 発表標題 三又DNAを介した3種酵素複合体による触媒反応
3. 学会等名 令和4年度 日本化学会関東支部群馬地区 研究交流発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豆生田葵衣、神谷厚輝
2. 発表標題 逐次反応における酵素の近接効果
3. 学会等名 第8回サイボウニクス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豆生田葵衣、神谷厚輝
2. 発表標題 生体触媒反応の制御に向けた3種酵素複合体の作製と効率評価
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木允人、神谷厚輝
2. 発表標題 両親媒性タンパク質とリン脂質から構成された非対称小胞の形成
3. 学会等名 第59回生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木允人、神谷厚輝
2. 発表標題 脂質-タンパク質非対称小胞を用いた膜タンパク質の機能と細胞分裂モデルの構築
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豆生田葵衣、神谷厚輝
2. 発表標題 カスケード反応効率化のためのDNAを介した酵素複合体の作製
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aoi Mameuda, Koki Kamiya
2. 発表標題 miRNA detection based on reversible network formation and dispersion of enzymes via DNA motifs
3. 学会等名 DNA29 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 豆生田葵衣、瀧ノ上正浩、神谷厚輝
2. 発表標題 酵素-DNA複合体の可逆的な近接・分離を利用したmiRNA検出
3. 学会等名 化学とマイクロ ナノシステム学会 第47回研究会 (CHEMINAS 47)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 豆生田葵衣、瀧ノ上正浩、神谷厚輝
2. 発表標題 DNAコンピューティングを用いたカスケード酵素の可逆的空間制御系を応用したmiRNA検出
3. 学会等名 第61回生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 豆生田葵衣、神谷厚輝
2. 発表標題 DNAの可逆的会合に基づく酵素ネットワーク化システムが可能にする触媒反応制御と生体分子検出
3. 学会等名 第7回分子ロボティクス年次大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学大学院 理工学府分子科学部門 神谷研究室 http://kamiya.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/index.html

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ピーター ウォルデ (Peter Johann Walde)	スイス連邦工科大学チューリッヒ校・Department of Materials・Professor	

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			
スイス	スイス連邦工科大学(ETH)チュー リッヒ校			