

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651150

研究課題名(和文) 核酸ナノ構造体で構築したタンパク質ネットワークを利用した新規ナノリアクターの開発

研究課題名(英文) Construction of protein network on DNA nanostructure as the novel nanoreactor

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・講師

研究者番号：70467827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：生体内では、複雑に組み合わさったネットワークが多数存在しており、その中で様々な物質が多段階に変換され、さらに相互に干渉しながら生命活動を営んでいる。このような生体内ネットワークに倣い、有用な部分を抽出して、試験管内で再構築することができれば、高機能な物質変換システム(ナノリアクター)の創製が期待される。そのための足場として、DNAナノ構造体を利用し、酵素などの機能性生体高分子をDNAナノ構造体上に分子レベルで精微かつ安定に配置固定化する技術を開発し、その機能評価をおこなった。集積化することで単純に混ぜ合わせただけのバルク中とは異なる機能を発揮することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Structural DNA nanotechnology, which includes DNA origami, enables the rapid production of self-assembled nanostructures. One of the key features of this technology is that fully addressable nanoarchitectures of various shapes and geometries are easily designed and constructed. By taking advantage of their addressable nature, DNA nanostructures have been used as scaffolds for the site-directed assembly of functional entities, such as small molecules and nanoparticles. As well as these functional entities, bio-macromolecules such as proteins are a particularly interesting class of molecules to assemble because of their huge functional variability. In this research, we arranged enzymes and on DNA-origami and the function and corabolation of them were confirmed on DNA-origami as the molecular switchboard or nano reactor.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：核酸ナノ構造体 タンパク質 ネットワーク ナノリアクター

1. 研究開始当初の背景

生体内では、複雑に組み合わさったネットワークが多数存在しており、その中で様々な物質が多段階に変換され、さらに相互に干渉しながら生命活動を営んでいる。このような生体内ネットワークに倣い、有用な部分を抽出して、試験管内で再構築することができれば、高機能な物質変換システムの創製が期待される。これまでもいくつかの方法論により、物質変換システムが構築されてきたが、これまでの研究例のほとんどは、ナノ空間を構築することで各要素が高密度化された状態を反映できているものの、生体内で見られるようなナノ空間内における構成要素の分子数や空間的配置・配向までの制御には至っていない。殊に、それ自身がナノメートルサイズを有する酵素などの生体高分子においては、複数のタンパク質・酵素をどのように配置して集積化させることで、高効率な物質変換反応が達成できるかなどの知見はほとんど皆無である。この要因としては、これらを精密に制御する方法論がこれまで存在しなかったためである。

2. 研究の目的

DNA origami法 (*Nature*, **2006**, 440, 297) に代表されるDNAナノ構造体が、高精度な集積を行うための足場として有用であることに着目し、DNA結合性タンパク質をアダプターとし、その結合を介してDNAナノ構造体上のアドレスに対し、複数のタンパク質を緻密に集積させたナノリアクターの構築することで、細胞内で見られる複雑なタンパク質ネットワークを模倣した高効率な物質変換反応を人為的に創製することを目的とした。

3. 研究の方法

DNA origami は、前述の論文に倣い、原子間力顕微鏡(AFM)においてその構造を評価しやすい形状をデザインし、AFMにて設計通り作成できていることを確認した。また、DNA origami 上の任意の場所にDNA結合性

タンパク質が認識するアドレス配列を導入した。DNA結合性タンパク質としては、亜鉛フィンガータンパク質やロイシンジッパータンパク質を採用し、DNAナノ構造体上に配列したい機能性タンパク質との融合タンパク質として、ベクターに組み込み、大腸菌を宿主細胞として発現させた後、単離精製した。DNA origami との結合はAFM観察および蛍光色素や蛍光タンパク質で標識したDNA結合性タンパク質を用いてゲル電気泳動によって評価した。

4. 研究成果

DNA結合性タンパク質をDNAナノ構造体上に導入した特定のアドレスに結合するアダプターとすることで、目的の機能性タンパク質とアダプターの融合タンパク質を調製するのみで簡便に任意の位置に配置できるようになった。また、配置したい蛋白質の構造的特徴にあわせてアダプターを選択できるように、アダプターの拡張にも成功した。具体的には、亜鉛フィンガー蛋白質を、単量体蛋白質用のアダプター(*Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 2421)として開発した。この系では、配列選択性の異なる亜鉛フィンガータンパク質を用意し、それぞれが対応するアドレス部位に高選択的に配置できていることを確認した。また、大腸菌で発現した融合タンパク質をDNA origami と単に混ぜるだけで、配置できることを実証した。

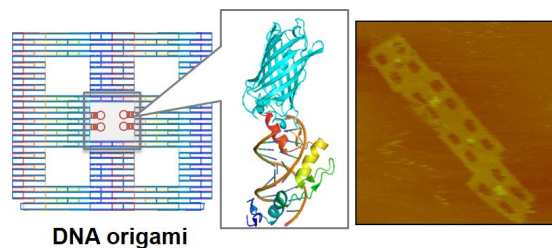


図. 亜鉛フィンガータンパク質を介した DNA origami 上への単量体タンパク質の高選択的配置

また、ロイシンジッパー蛋白質を2量体タンパク質用のアダプター(*Methods*, 2014, 67, 142.)として開発し、亜鉛フィンガータンパク質と併用してもそれぞれ干渉することなく、目的のアドレス部位に高収率・高選択的に配置す

ることができることを確認した。さらには、2量体として安定に存在している酵素とロイシンジッパータンパク質の融合タンパク質は、酵素単独よりも高い活性を有することが明らかとなり、狙い通り、ロイシンジッパータンパク質は2量体タンパク質を配置するためのアダプターとして適していることを確認した。そこで、DNA origami 上での酵素活性を評価したところ、DNA origami 上に配置された酵素は活性を保持していることが確認された。

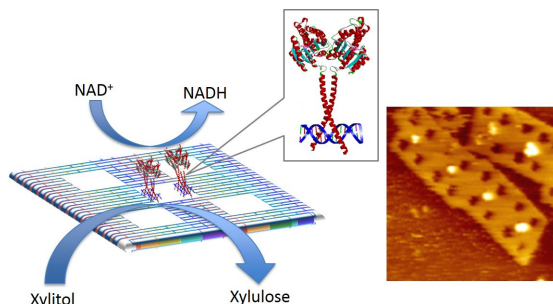


図. ロイシンジッパータンパク質で DNA origami 上に配置された同種 2 量体酵素

また、より強固に配置するための固定化戦略の開発をおこなった上で、複数の酵素を DNA origami 上に配置することに成功した。その結果、単にバルク溶液中で混ぜ合わせただけの場合よりも高効率な物質変換反応が達成できることが確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Tien Anh Ngo, Eiji Nakata, Masayuki Saimura, Tsutomu Kodaki, Takashi Morii "2A protein adaptor to locate a functional protein dimer on molecular switchboard", *Methods*, Vol.67, No. ,142-150, 2014(<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.031>)
2. Ngo Anh Tien, Eiji Nakata & Takashi Morii "Arranging enzymes and receptors with nanometer-scale precision on molecular switchboards", *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, Vol31, No. ,11-15, 2013.
3. E. Nakata, F.F. Liew, C. Uwatoko, S. Kiyonaka, Y. Mori, Y. Katsuda, M. Endo, H. Sugiyama, T. Morii "Zinc finger proteins for site-specific protein positioning on DNA origami", *Angew Chem. Int. Ed.*, Vol.51, No.10, 2421-2424, 2012. (10.1002/anie.201108199)

[学会発表](計 28 件)

1. Tien Anh Ngo・Eiji Nakata・Masayuki

Saimura・Tsutomu Kodaki・Takashi Morii, Construction of organized assembly of enzymes on DNA origami, 日本化学会第 94 春季年会(2014), 2014 年 03 月 26-29 日, 名古屋大学 東山キャンパス

2. Huyen Thi Thu Dinh・Eiji Nakata・Anh Tien Ngo・Hiroki Ashida・Akiho Yokota・Takashi Morii, Applications of sequence-specific DNA binding adaptors for assembling proteins on DNA origami, 日本化学会第 94 春季年会(2014), 2014 年 03 月 26-29 日, 名古屋大学 東山キャンパス

3. 佐々木 謙太・戸田 昂人・中田 栄司・森井 孝, DNA オリガミへの機能性タンパク質の 1 分子固定化 : 共有結合型 DNA 結合アダプターの開発, 日本化学会第 94 春季年会(2014), 2014 年 03 月 26-29 日, 名古屋大学 東山キャンパス

4. 吉村 祐輝・ANNONI Chiara・仲野瞬・中田 栄司・GELMI Maria LUISA・森井 孝, DNA オリガミを用いた RNA アプタマーの集積効果の評価, 日本化学会第 94 春季年会(2014), 2014 年 03 月 26-29 日, 名古屋大学 東山キャンパス

5. 戸田 昂人・Ngo Anh Tien・Huyen Thi Thu Dinh・佐々木 謙太・中田 栄司・森井 孝, DNA オリガミへの機能性タンパク質の 1 分子固定化: DNA 結合アダプターと DNA オリガミとの共有結合形成, 日本化学会第 94 春季年会(2014), 2014 年 03 月 26-29 日, 名古屋大学 東山キャンパス

6. Tien Anh Ngo・Eiji Nakata・Masayuki Saimura・Tsutomu Kodaki・Takashi Morii, Construction of a Molecular Switchboard by Using Monomeric and Homodimeric Protein Adaptors, 2014 Kyoto-Ajou Joint Symposium, 2014 年 02 月 25 日, Kyoto University

7. (招待講演)Eiji Nakata・Takashi Morii, Molecular Switchboard: Assembling Multiple Proteins on DNA Origami, The second Kyoto-Bristol symposium 2014, 2014 年 01 月 09 日, Kyoto University

8. Eiji Nakata, Huyen Thi Thu Dinh, Tien Anh Ngo, Masayuki Saimura, Takashi Morii, Site-specific covalent modification of DNA origami by functional proteins, The 40th International Symposium on Nucleic

- Acids Chemistry, 2013 年 11 月 14 日, Kanagawa University
9. Tien Anh Ngo, Eiji Nakata, Masayuki Saimura, Tsutomu Kodaki, Takashi Morii, Development of a homodimeric adaptor for constructing an artificial protein assembly on molecular switchboard, The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2013 年 11 月 14 日, Kanagawa University
 10. Chiara ANNONI・Fong Fong Liew・Shun Nakano・Eiji Nakata・Maria Luisa GELMI・Takashi Morii, Construction of a molecular switchboard by assembling ribonucleopeptide biosensors, The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2013 年 11 月 13 日, Kanagawa University
 11. 森井 孝・中田 栄司・仲野 瞬, アダプターを用いた DNA オリガミへのタンパク質 1 分子配置, 戦略目標「プロセスインテグレーションによる次世代ナノシステムの創製」, 2013 年 10 月 17 日, コクヨホール 東京ショールーム 2 階
 12. 中田 栄司・Ngo Tien Anh・仲野 瞬・才村 正幸・小瀧 努・森井 孝, DNA origami 上に機能性タンパク質を固定化した分子スイッチボードの開発, 第 7 回バイオ関連シンポジウム, 2013 年 09 月 27 日, 名古屋大学
 13. Tien Anh Ngo, Eiji Nakata, Masayuki Saimura, Shun Nakano, Tsutomu Kodaki, Takashi Mori, Development of an artificial protein assembly on molecular switchboard, 第 7 回バイオ関連シンポジウム, 2013 年 09 月 27 日, 名古屋大学
 14. Eiji Nakata, Takashi Morii, Development of an artificial protein assembly on molecular switchboard by using DNA binding adaptors, 2013NNBS, 2013 年 09 月 20 日~2013 年 09 月 21 日, Kyushu University
 15. Tien Anh Ngo, Eiji Nakata, Masayuki Saimura, Shun Nakano, Tsutomu Kodaki, Takashi Morii, Construction of a molecular switchboard by using monomeric and homodimeric protein adaptors, Gordon Research Conference, 2013 年 06 月 09 日~2013 年 06 月 14 日, Proctor Academy
 16. 森井 孝・中田 栄司・仲野 瞬, アダプターを用いた DNA オリガミへのタンパク質 1 分子配置, CREST「プロセスインテグレーションに向けた高機能ナノ構造体の創出」領域, 2013 年 06 月 04 日, コクヨホール 東京ショールーム 2 階
 17. 中田 栄司, 生物から学んだ分子コンビナートへの挑戦, 第 18 回エネルギー理工学研究所公開講演会, 2013 年 05 月 12 日, 京都大学
 18. 中田 栄司, 核酸ナノ構造体を利用した高効率な物質変換システムの構築, 平成 24 年度 附属エネルギー複合機構研究センター共同研究成果報告会, 2013 年 04 月 05 日, 京都大学
 19. 西口泰裕, 中田 栄司, 上村昇平, N.A. Tien, 才村正幸, 森井孝, 亜鉛フィンガータンパク質を用いた DNA オリガミへのタンパク質 1 分子固定化技術の開発, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 03 月 22 日~2013 年 03 月 25 日, 立命館大学 びわこ・くさつキャンパス、滋賀県草津市
 20. T.A. Ngo, 中田 栄司, 才村正幸, 森井孝, 二量体タンパク質を分子スイッチボードに配置するアダプターの開発, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 03 月 22 日~2013 年 03 月 25 日, 立命館大学 びわこ・くさつキャンパス、滋賀県草津市
 21. 小山祥平, 清中茂樹, 中田 栄司, 鈴木勇輝, 日高久美, 森恵美子, 遠藤政幸, 森井孝, 杉山弘, 森泰生, DNA origami を用いたイオンチャンネル複合体の高度集積化, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 03 月 22 日~2013 年 03 月 25 日, 立命館大学 びわこ・くさつキャンパス、滋賀県草津市
 22. 劉芳芳, C. Annoni, 田村友樹, 仲野瞬, 中田 栄司, 森井孝, リボヌクレオペプチドリセプターを用いたナノ集成体の構築, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 03 月 22 日~2013 年 03 月 25 日, 立命館大学 びわこ・くさつキャンパス、滋賀県草津市
 23. 中田 栄司, 森井孝, アダプターを用いた DNA オリガミへのタンパク質 1 分子配置, 「プロセスインテグレーションによる次世代ナノシステムの創製」3 領域合同会議, 2012 年 10 月 05 日~2012 年 10 月 05 日, 科学技術振興機構 東京本部、埼玉県川口市
 24. (招待講演) E. Nakata, T. Morii, Using DNA binding proteins for site-specific positioning on DNA origami, The 5th “MEXT Project of Integrated Research on Chemical Synthesis” Forum, 2012 年 09 月 15 日~2012 年 09 月 15 日, 京都大学 宇治キャンパス、宇治市
 25. E. Nakata, N.A. Tien, F.F. Liew, T. Morii, Using DNA binding proteins for site-specific positioning of proteins on DNA origami, ACBC2012, 2012 年 07

月 04 日～2012 年 07 月 06 日, サザンビ
ーチホテル&リゾート沖縄、沖縄県糸満
市

26. 中田栄司, 森井孝, アダプターを用いた
DNA オリガミへのタンパク質配置, 「ナ
ノ構造体」第 2 回公開シンポジウム,
2012 年 06 月 12 日～2012 年 06 月 12 日,
コクヨホール, 東京都港区
27. T.A. Ngo, E. Nakata, T. Morii,
Development of an Adaptor for
Locating Functional Proteins on DNA
Nanoarchitectures., 4th G-COE
International Symposium, 2012 年 05 月
22 日～2012 年 05 月 23 日, Bankoku,
Thailand
28. T.A. Ngo, 中田栄司, 森井孝,
DNA-binding Proteins as the Adaptor
for Locating Functional Proteins on
DNA Nanostructure, 第 59 回日本生化学
会近畿支部例会, 2012 年 05 月 12 日～
2012 年 05 月 12 日, 京都大学 宇治キャン
パス、宇治市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
京都大学・エネルギー工学研究所・生物機
能科学研究分野・森井研究室
http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/material/a-12_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 栄司(NAKATA EIJI)

京都大学・エネルギー工学研究所・講師
研究者番号：70467827