

様式 I

博士学位論文調査報告書

論文題目

Arranging multiple types of enzymes in defined space by modular adaptors

(モジュール型アダプターを利用した複数酵素の特異的空間配置)

申請者

NGUYEN MINH THANG

最終学歴

平成 29 年 9 月

京都大学大学院エネルギー科学研究科エネルギー基礎科学専攻博士後期課程  
研究指導認定退学

学識確認

平成 年 月 日 (論文博士のみ)

調査委員

(主査)

京都大学大学院エネルギー科学研究科

教授 森井 孝

調査委員

京都大学大学院エネルギー科学研究科

教授 木下 正弘

調査委員

京都大学大学院エネルギー科学研究科

教授 片平 正人

( 続紙 1 )

|   |  |    |                   |
|---|--|----|-------------------|
| 京都大学  | 博士 (エネルギー科学)   | 氏名 | NGUYEN MINH THANG |
| 論文題目  | Arranging multiple types of enzymes in defined space by modular adaptors<br>(モジュール型アダプターを利用した複数酵素の特異的空間配置) |    |                   |
| (論文内容の要旨)   |  |    |                   |
| <p>本論文は、DNA ナノ構造体を足場として利用して、定量的かつ迅速に 3 種類以上の酵素を配置するモジュール型アダプターの開発と、それらを用いて構築した分子コンビナートで、酵素間の空間的配置が連続する酵素反応にどのように影響するのかを論じた結果をまとめたもので、5 章からなっている。</p> <p>第 1 章は序論で、生体内で酵素などが形成する超分子組織体による物質生産・エネルギー利用系を模して、多種類の酵素をそれぞれ特定の位置にナノスケールの精度で配置すれば、それらの酵素を単純に混ぜ合わせただけでは達成できない高効率な物質変換系を細胞外で構築できると論じている。現状では、細胞内のように酵素を個別に配置した超分子組織体は実現できておらず、その理由は、多種類の酵素を単一分子の精度でそれぞれ特定空間に配置する技術が未成熟な点にあることを指摘している。それを踏まえて、ナノ構造体の足場に、定量的かつ迅速に多種類の酵素を個別に配置する方法論の開発と、その方法により多種類の酵素を特定空間に配置して連続反応を行うという本論文の目的を述べている。</p> <p>第 2 章では、同時に使用した場合でもナノ構造体上の個別の位置と反応する、即ち直交性のある、モジュール型アダプターの開発をおこなった。モジュール型アダプターは、ナノ構造体上の特異的な DNA 配列を認識して結合する DNA 認識部位と DNA 上に導入した基質と共有結合を形成する共有結合形成部位から構成される。DNA 認識部位として、配列選択性が異なる 2 種類の亜鉛フィンガータンパク質を、また、共有結合部位として、異なる基質選択性を持つ 3 種類のタグタンパク質を用いた。これらを組み合わせて構築したモジュール型アダプターから高い直交性を発揮する 3 種類のモジュール型アダプターを得た。また、モジュール型アダプターの反応過程を反応速度論に基づいて詳細に解析して、直交性を有するモジュール型アダプターの設計原理を見出した。</p> <p>第 3 章では、第 2 章で提唱した設計原理をもとにして、同じタグタンパク質を用いても、DNA 塩基配列を区別してタグタンパク質と DNA 間に架橋を形成するモジュール型アダプターを開発した。亜鉛フィンガータンパク質とロイシンジッパータンパク質 GCN4 を DNA 認識部位とし、タグタンパク質 CLIP-tag と融合したモジュール型アダプターを設計した。3 種類のモジュール型アダプターは、いずれも DNA ナノ構造体上に設計した位置に 90% 以上の収率で反応し、設計原理により高い反応性を有する DNA 塩基配列選択的アダプターが得られることが明らかとなった。</p> <p>第 4 章では、第 2 章で開発した直交性を持つモジュール型アダプターを利用して、森井らがこれまでに評価してきたキシロース代謝に関わる 2 段階の酵素連続反応系</p> |  |    |                   |

を拡張した。3種類の酵素キシロースリダクターゼ、キシリトールデヒドロゲナーゼ、キシロースキナーゼによりキシロースからキシロース-5-リン酸を生産するまでの3段階の酵素連続反応系をDNAナノ構造体上に構築し、3段階反応の酵素間距離依存性を評価した。これら3種類の酵素が同一DNAナノ構造体上、様々な配置にある場合を構築して連続反応を評価したところ、酵素間距離が10 nmの場合に最も高い効率で3段階反応が進行することを明らかにした。

第5章は総括で、本論文で得られた成果が、試験管内で3種類の酵素の空間配置を制御することで、生体内にも存在する代謝反応の効率を制御できることを示した初めての例であること、また、モジュール型アダプターの種類を今後さらに拡張するうえでの重要な設計指針を見出したことについて要約している。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

生体内では、多種類の酵素群が過渡的に超分子組織体を形成して、高い効率で物質を生産し、エネルギーを変換する。細胞外でも、多種類の酵素をナノスケールの精度で特定の位置に配した分子コンビナートは、それらの酵素を混合しただけでは達成できないような高い効率で物質を変換すると期待される。しかしながら、生体内のような酵素の超分子組織体を試験管内で構築することは実現していない。本論文は、DNA オリガミ法によって構築した足場に、多種類の酵素を定量的かつ短い反応時間で1分子ずつ配置する方法論を開発し、それを利用して3種類の酵素を配置した分子コンビナートを構築、その反応を研究した結果をまとめたものであり、得られた主な成果は次の通りである。

(1) 多種類の酵素を、それぞれ狙った位置に定量的かつ迅速に配置するモジュール型アダプターを開発した。モジュール型アダプターは、特定のDNA配列に結合するDNA認識部位と、DNA上に導入した基質と共有結合を形成する共有結合形成部位から構成される。DNA認識部位として、DNA配列選択性が異なる2種類のジンクフィンガータンパク質、共有結合部位として、異なる基質選択性を持つ3種類のタグタンパク質を組み合わせた中から、お互いに高い直交性を発揮する3種類のモジュール型アダプターを得た。

(2) DNA認識部位のDNAとの結合速度と共有結合形成の反応速度をもとにして設計し、高い直交性を発揮するモジュール型アダプターを構築する原理を見出した。それをもとにして、DNA認識に依存してDNAとタグタンパク質間に共有結合を形成する、直交性のあるモジュール型アダプター群を作製した。

(3) 直交性のあるモジュール型アダプターを活用して、キシロース代謝に関わる3種類の酵素、キシロースリダクターゼ、キシリトールデヒドロゲナーゼ、キシルロースキナーゼを用いて、キシルロースからキシルロース-5-リン酸を生産する3段階の人工代謝経路を構築し、酵素間距離とキシルロース-5-リン酸生成量の関係を明らかにした。

以上、本論文では、特定の位置にナノスケールの精度で酵素を1分子ずつ配置する方法論を開発し、多種類の酵素による人工代謝経路を作製した。これらの成果は、多種類の酵素を用いて効率的に物質生産・エネルギー変換が可能な分子コンビナートの一般的な構築法を確立する上で大きく貢献したと評価できる。以上の内容により、本論文は博士の学位審査の請求に値すると認める。また、修了に必要な単位を修得済みであることを確認した。

よって、本論文は博士(エネルギー科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成31年2月28日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降