

様式 I

博士学位論文調査報告書

論文題目

Study of enzyme reactions in the ordered assembly states

(空間的に規制された配置にある酵素の反応解析)

申請者

DINH THI THU HUYEN

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

京都大学大学院エネルギー科学研究科

(主査)

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	DINH THI THU HUYEN
論文題目	Study of enzyme reactions in the ordered assembly states (空間的に規制された配置にある酵素の反応解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>細胞内ではさまざまな分子が高密度で混在しており、酵素もまた密集した分子環境にある。そのため、細胞内の酵素反応は、これまでに研究されてきた希薄溶液中での反応とは異なると考えられている。しかし、通常の溶液中でこのような酵素の高密集状態をつくることはできないため、細胞内類似環境での酵素反応を実験的に検証することは困難であった。本論文は、DNA オリガミ法によって構築した足場に、共有結合を介して酵素をナノメートル精度で定量的に固定する方法により、単一もしくは複数種の酵素を様々な密集度で配置し、酵素が密接または離散した状態での反応を解析した結果を論じたもので、6章からなっている。</p> <p>第1章では、生体に見られる階層的な組織体の形成と細胞内区画の特徴、そして細胞区画内での酵素による物質生産・エネルギー利用、特に植物や光合成細菌による二酸化炭素固定化の第一段階を担うリブローズ 2 リン酸カルボキシル基転移酵素/酸素添加酵素 (RuBisCO) がカーボニックアンヒドラーゼ (CA) など共に形成するカルボキシソームについて論じている。カルボキシソーム内での RuBisCO の反応を詳細に解析するためには、細胞外で酵素が密接した環境を構築する必要がある。そのための足場として DNA ナノ構造体に注目し、活性を保ったまま定量的に酵素を1分子ずつナノメートル精度で固定する方法を論じるとともに、その方法によりカルボキシソームを形成する酵素を特定空間に配置して反応を解析するという本論文の目的を述べている。</p> <p>第2章では、RuBisCO とともにカルボキシソームを形成する酵素 CA を、モジュール型アダプターと融合することによって DNA ナノ構造体上にあらかじめ設計した位置で共有結合を形成させ、約 1 nm 間隔の密接状態もしくは約 23 nm 間隔の離散状態に配置した。それぞれの状態で、ひとつの DNA ナノ構造体に配置された CA の分子数を定量し、化学量論的に酵素反応が解析できる CA 集合体を構築した。</p> <p>第3章では、第2章で構築した密接もしくは離散状態にある CA のエステル加水分解反応を解析した。その結果、最大 4 分子の CA が密接した状態では、同濃度の離散状態にある CA もしくは溶液中に拡散した CA よりも高い初期反応速度が観測された。さらに 2 分子の CA が様々な配向で近接した場合にも、同様の反応加速効果が観測された。以上の結果から、最低でも 2 分子の CA が配向に寄らず密接した配置にある場合に、CA のエステル加水分解反応が加速されることが明らかになった。</p> <p>第4章では、第3章で見出した密接状態にある酵素 CA の反応が加速される機構を検証した。密接状態にある CA の反応加速は、分子クラウディング試薬の添加によるタンパク質構造安定化によるものではなく、密接状態と離散状態での CA の熱的安定性の違いによるものでもなかった。木下らによって提唱された水のエン트로ピー効果をもとにして考えると、理論的には接近した二つの酵素間に挟まれた領域</p>			

内における基質分子濃度は単一の酵素近傍におけるそれよりも高くなる。この効果がより大きくなるように、エステル加水分解反応の基質のアシル基をより疎水性の高いものに変化させると、密接状態での CA による加水分解反応はより顕著に加速された。また、水のエン트로ピー効果を増強する硫酸ナトリウムを添加すると離散状態の酵素・密接状態の酵素共に見かけ上活性が上がり、両状態の酵素の活性の差が大きくなった。これらの結果をもとにして、密接状態にある酵素の方が離散状態にある酵素よりも見かけ上活性が高くなることを水のエン트로ピー効果で説明する理論モデルを提唱した。

第 5 章では、光合成細菌などで見出されている細胞内区画カルボキシソーム中の主要酵素 RuBisCO を DNA ナノ構造体上に配置し、CA 共存下での反応を検証した。二量体 RuBisCO を配置するために、アダプターとして二量体 DNA 結合タンパク質を RuBisCO に融合して DNA ナノ構造体上に配置した。また、第 2 章の方法によって CA を RuBisCO と共に DNA ナノ構造体上に配置した。これらの酵素集合体のリブローズ 2 リン酸への二酸化炭素の付加反応を検証したところ、CA の添加によって RuBisCO 集合体の反応が加速されることはなく、CA が RuBisCO の近傍に配置された場合には反応速度がわずかに遅くなった。これらの結果から、カルボキシソーム中の RuBisCO による二酸化炭素の付加反応速度は、単に CA と RuBisCO との距離に依存するものではないことを結論づけた。

第 6 章は総括で、本論文で得られた成果は、試験管内で酵素の集合状態を変化させることで、同一の酵素の反応効率を制御できることを示した初めての例であり、細胞内の酵素反応を理解するうえでの新しい知見を与えたこと、そして、細胞内酵素反応を理解し、人工代謝経路を設計するうえでの新たな要因として酵素の集合状態に注目すべき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)

細胞内では、さまざまな分子が高密度に混在し、酵素もまた密集した分子環境にある。そのため、細胞内の酵素反応は、これまでに研究されてきた希薄溶液中での反応とは異なると考えられてきたが、通常の溶液中でこのような酵素の高密集状態をつくることはできない。本論文では、DNA オリガミ法によって構築した足場に酵素を共有結合を介して定量的に固定する方法により、光合成細菌などの細胞内区画カルボキシソームを形成する酵素を密接状態もしくは離散状態に配置し、それらの酵素反応速度を解析した。得られた主な結果は以下の通りである。

(1) カーボニックアンヒドラーゼ (CA) とモジュール型アダプターの融合タンパク質を DNA ナノ構造体上の特定位置で定量的に共有結合を形成させ、1 nm 間隔の密接状態もしくは 23 nm 間隔の離散状態に最大 4 分子の CA を配置した。ナノ構造体に配置された酵素分子数を定量し、化学量論的に酵素反応が解析できる CA 集合体を構築した。

(2) 密接もしくは離散状態にある CA のエステル加水分解反応を解析したところ、密接状態にある CA の反応速度は離散状態にある CA よりも大きいことがわかった。

(3) 木下らが提唱した水のエントロピー効果と密接状態にある CA の反応速度が疎水性の高い基質に対してより増大した実験結果に基づいて、接近した二つの酵素間に挟まれた領域内における基質分子濃度は単一の酵素近傍におけるそれよりも高くなることにより反応速度が増大するという理論モデルを提唱した。

(4) 二酸化炭素の固定化に重要な役割を果たしているリブローズリン酸カルボキシル基転移酵素/酸素添加酵素 (RuBisCO) と CA をそれぞれアダプターを介して DNA ナノ構造体上に配置し、リブローズ 2 リン酸への二酸化炭素の付加反応を検証した。その結果、カルボキシソーム内の RuBisCO 反応速度は CA との酵素間距離に直接は依存しないと結論づけた。

以上、本論文では、酵素を 1 分子ずつナノメートル精度で配置し、細胞内を模した酵素の密接状態を細胞外で構築した。これによって、これまで希薄溶液中では不可能だった密接状態にある酵素の反応を定量的に解析し、希薄溶液中での酵素と比較すると密接状態にある酵素がより反応性が高いことを明らかにした。これらの成果は、細胞内の酵素反応を理解するうえでの新しい知見を与えただけでなく、細胞外で効率的に物質生産・エネルギー変換が可能な分子コンビナートの開発に大きく貢献したと評価できる。

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 8 月 23 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： 2021 年 3 月 31 日以降