

Organization and compartmentalization of functional molecules on DNA nanostructures

(DNA ナノ構造体による機能性分子の組織化と区画化)

小西 宏明

研究背景

生体内のクリーンで高効率なエネルギー利用・変換機構を担う代謝反応は、酵素が関与する並列した多段階の反応により成り立っている。生体内代謝反応では、反応に関わる酵素の位置や数、周辺環境が時空間的に制御されており、さらに一連の反応に関わる酵素が区画化されている場合もある。細胞中のオルガネラでは、脂質膜に覆われた区画上でタンパク質が組織化されたり、膜中の酵素に適した pH の調整が行われたりしている。独立栄養生物内の二酸化炭素固定化反応を担う区画であるカルボキシソームでは、二種類の酵素ルビスコと炭酸脱水酵素が 100 nm ほどのタンパク質殻の内部に密集して充填されており、これによって反応が活性化されていると考えられている。このような生体内の複雑な代謝系を、細胞外で活用するためには、複数の酵素を含む区画を試験管内で再現して、区画環境の影響や効果を解明、理解することが重要である。そこで、機能性分子を特定の空間に配置、集積させる基盤として DNA ナノ構造体に着目した。DNA ナノ構造体は、核酸やタンパク質の分子認識能を利用して、対象とする分子の数や位置を制御しながら配置可能な基盤として機能する。

機能性分子、特に酵素を区画の中に内包させる研究はこれまでも報告されている。脂質分子を用いたりリポソームや両親媒性ポリマーを用いたポリマーソームの例では、膜上の輸送タンパク質で物質のやりとりをさせながら、内包させた溶液中の複数の酵素で連続した反応を進行させたと報告されている。タンパク質を用いた区画では、ウイルス様タンパク質を足場兼膜として活用して複数の酵素を内包した例が報告されている。これらの膜分子は、膜内外を分ける区画を構築し、反応系を閉じ込めることができる。しかしながら、いずれの区画でも内包する酵素の数や位置を制御することができないという課題がある。リポソームやポリマーソームの場合は、マイクロメートルスケールの膜を作製することができる一方で、その体積も大まかにしか規格化できない。これらの問題点から、これらの区画では、生体内の酵素反応系の様式や環境を模倣して、その影響を定量的に解析することが困難である。近年、リング状の DNA ナノ構造体を作製し、その内側にナノスケールの半径の揃ったリポソームのサイズ制御技術が報告されており、この構造体はナノサイズの反応区画に利用できると考えられる。

ルビスコはそれ自体の触媒反応性は低いため、カルボキシソームのタンパク質膜内

に高濃度で存在することで、炭酸脱水酵素との連続した酵素反応を活性化していると考えられている。これまでの報告で、これら二種類の酵素をタンパク質殻中に内包する、もしくは二次元平面の DNA ナノ構造体上で炭酸脱水酵素と近接させるだけではルビスコの触媒活性が変化しないことが示されている。その一方で、カルボキシソーム内のようなルビスコ同士が立体的に密接した環境を構築して、その影響を定量的に解析した事例はない。

本研究の目的と経過

本研究では、三次元 DNA ナノ構造体の特徴である目的分子の集積体の設計自由度に着目した。対象とする分子の数や位置を制御して組織化、区画化する基盤技術の開発を目標として、膜内に酵素位置を制御して配置した人工区画および酵素同士が密接して組織化した人工区画を構築するための技術開発を研究した。

第一章では、生体内の組織化、区画化や DNA ナノ構造体を利用した機能性分子の修飾の事例を紹介し、本研究を遂行する上での背景の概略を記載した。

第二章では、Yang らが報告したリング状 DNA ナノ構造体の内側に、機能性分子を導入するための DNA 二重鎖を架橋した構造体を設計し、架橋した DNA 二重鎖を内包するリポソームを作製した。DNA 二重鎖に pH 応答性の蛍光色素 (CF) を導入し、リング状の DNA ナノ構造体自体と、リポソームを形成する脂質分子の一部には、それぞれ pH 非応答性の蛍光色素を修飾した。DNA 二重鎖を含めた DNA ナノ構造体が設計通りに作製できていることを、原子間力顕微鏡 (AFM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察で確認した。その後リポソームを形成し、精製した画分の蛍光観察によって、DNA ナノ構造体、架橋した DNA 二重鎖およびリポソームが同じ構造体に共存することを確認した。脂質分子がない場合に CF の蛍光が完全に消光する、さらに復元する様に構造体を含む溶液の pH を変化させたところ、10%程度の蛍光強度変化しか観測されなかった。この結果は、架橋した DNA 二重鎖上の CF がリポソーム内水層に存在するため、外液の pH 変化の影響を免れたことによるものと考えられる。

第三章では、タンパク質が密接に集積するための足場となりうる、舟形開状態から浅型六角柱の閉状態へと構造変換が可能な三次元 DNA ナノ構造体を作製した。また、その開状態から閉状態への構造変換をリアルタイムに解析して、開閉条件を最適化した。DNA ナノ構造体の上下面の縁の部分とそれぞれ二重鎖を形成するオリゴ DNA を加えて構造体を閉状態に変換することができ、さらに閉状態で近接するように配置した二つの蛍光色素 (Cy3, Cy5) の蛍光共鳴エネルギー移動による蛍光強度の変化によって開閉状態を測定できる DNA ナノ構造体を作製した。まず、開閉それぞれの状態の DNA ナ

ノ構造体を AFM および TEM で観察し、それぞれ設計通りの構造であることを確認した。次に構造体の変形に必要なオリゴ DNA を加えて 25 °C で蛍光強度の継時変化を追跡した結果、12 時間で約 69%が閉状態になることが確認された。オリゴ DNA の配列を伸長することで、同じ条件で閉状態が 80%まで増加し、さらに温度を 35 °C に上昇と 2 時間で 90%まで閉状態が増加することが確認できた。この開閉状態の変化は、AFM および TEM 観察でも同様の結果が得られた。

第四章では、密集したルビスコを構築するために、DNA ナノ構造体上へ集積可能なルビスコ変異体を作製した。DNA ナノ構造体上でルビスコの密接状態を形成するために、10 量体を形成する好熱菌由来のルビスコに着目した。このルビスコに特異的な DNA 配列を認識するタンパク質アダプターを融合した酵素 G-TkrBC を構築した。大腸菌で発現させた G-TkrBC は、細胞破砕液中の不溶性画分に存在し、尿素変性による可溶化したのちに単離可能であることが確認された。単離後の溶液から尿素を除去してリフォーリングする条件を最適化し、G-TkrBC の DNA 結合能と酵素活性を確認した。

第五章では、第三章で作製した舟形開状態の DNA ナノ構造体に、第四章で作製した DNA 結合部位をもつルビスコ G-TkrBC を配置し、舟形から六角柱構造への構造変換を検証した。まず、G-TkrBC10 量体の立体構造に対応するように、アダプターが結合する DNA 鎖を DNA ナノ構造体の両面にそれぞれ 5 箇所導入し、G-TkrBC を結合させた結果、酵素活性はあるものの DNA ナノ構造体の片面にのみ G-TkrBC10 量体が配置されたことが確認された。アダプター結合部位の柔軟性を増すために DNA 鎖を伸長し、さらにアダプター結合部位の数を減らした結果、DNA ナノ構造体の両面に G-TkrBC が結合し、さらに酵素活性があることが確認された。舟形平面には、いくつかの G-TkrBC10 量体が結合しており、その六角柱型閉状態へ構造変換は認められなかった。

総括

本研究では、DNA ナノ構造体の設計の自由さや分子修飾の場所指定能力の高さを利用して、機能性分子を組織化、区画化するための汎用的な手法を開発した。まず、リング状 DNA ナノ構造体を外側の骨格として、機能性分子を配置する鋳型としての DNA 二重鎖を内包したリポソームを作製し、鋳型 DNA が外液から遮蔽された空間に配置できることを示した。これによって、直径数十ナノメートルのリポソーム内に機能性分子を距離を制御しながら配置できることが可能になった。また、舟形開状態から六角柱閉状態へと構造変換が可能な三次元 DNA ナノ構造体を新たに作製した。これにより、機能性分子を距離や位置を制御して配置する鋳型 DNA ナノ構造体の多様性を拡張した。三次元 DNA ナノ構造体の構造変換をリアルタイムに追跡することにより、鋳型 DNA

ナノ構造体に配置する分子の熱安定性に応じて、構造変換の条件を選択できることを明らかにした。さらに、好熱菌由来のルビスコに特異的な DNA 配列に結合するアダプタータンパク質を融合したルビスコ誘導体を作製した。このルビスコ誘導体は、三次元 DNA ナノ構造体に配置した状態で酵素活性を示した。

本研究で作製した三次元 DNA ナノ構造体は、様々な機能性分子を分子の数や位置を制御して配置して、酵素組織体や人工区画を構築するための基盤技術となる。リング状 DNA ナノ構造体を外側の骨格とし、架橋した DNA 二重鎖を内包するリポソームは、酵素を距離を制御して配置することによって、酵素を膜に内包した人工区画の構築に応用できる。また、舟形開状態から六角柱閉状態へと構造変換が可能な三次元 DNA ナノ構造体を用いると、様々な機能性分子が密接した組織化状態、さらには膜のない酵素の人工区画を構築できる可能性がある。これらの人工区画作製法は、カーボンニュートラル社会での物質変換技術である分子コンビナートを構築するために必須の技術である。