

(続紙 1)

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	LIN PENG
論文題目	Enzyme cascade reactions on a 3D DNA scaffold with dynamic shape transformation (動的形状変換を伴う 3D DNA 足場での酵素カスケード反応)		
(論文内容の要旨)			
<p>細胞内の代謝反応が効率的に進行するためには、代謝に関わる酵素群が効率良く逐次反応を触媒する必要がある。逐次反応に関わる酵素を近接させると逐次反応が高効率で進行する現象は報告されているが、細胞内で見られるような区画化された環境にある酵素による代謝反応の詳細は明らかでない。本論文は、DNA ナノ構造体を用いて形状が変化する足場を構築し、3 次元的に区画化された空間に配置したキシロース代謝酵素による代謝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 章は序論であり、生体内代謝経路において発見された階層的な酵素組織体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・エネルギー利用について論じている。細胞内代謝経路の高い反応効率と選択性を支配する化学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ことを指摘するとともに、これまでの細胞外で代謝経路を構築した研究を概説している。なかでも酵素を特定の空間に配置する足場として 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、さらにはこれまでに DNA ナノ構造体を用いて構築された代謝経路の特徴とそれらの問題点を論じている。さらに、その方法により酵素を特定空間に配置して、人工的に構築した区画内での代謝経路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、二つの四角錐台が繋がった舟形 DNA ナノ構造体上の特定位置に、至適 pH が異なるキシロース還元酵素 (XR) とキシリトール脱水酵素 (XDH) をモジュール型アダプターと融合することによって個別に配置した。両酵素ともにナノ構造体上に配置することによって反応速度が 4 倍に上昇した。これまでに、DNA ナノ構造体に配置した酵素の反応が加速される理由として、①負に帯電した足場への基質吸着、②足場付近の局所 pH 変化による酵素活性の向上、③足場もしくは足場近傍の高密度水層による酵素安定化が提唱されている。本反応では基質および補酵素は中性もしくは負に帯電しているため①の仮説は成立しない。蛍光性 pH 指示薬を用いたナノ構造体上の局所 pH を測定すると、XR と XDH の至適 pH がそれぞれ 6.0、8.0 であることから、②の仮説にある DNA ナノ構造体表面に由来する局所 pH 変化は、ナノ構造体に配置された両酵素の反応速度増大の原因ではないことを明らかにした。さらに③の仮説を発展させて、酵素周辺で親水性基質の濃度が上昇する機構を提唱した。</p> <p>第 3 章では、第 2 章で構築した舟形 DNA ナノ構造体を、四角錐台間での二本鎖 DNA 形成により六角柱構造体へと変換する方法を開発した。それぞれの四角錐台に導入した蛍光分子間の蛍光共鳴エネルギー移動を利用して、両構造体の存在比を求めるとともに、構造変換を実時間で観測した。XDH を配置した舟形 DNA ナノ構造体を、室温で 12 時間反応後、90% 以上の収率で六角柱構造体へと変換し、六角柱構造体内部に配置した酵</p>			

素の反応速度は、舟形構造体上の酵素と同等であることを明らかにした。

第4章では、第3章で開発した舟形 DNA ナノ構造体を六角柱構造体へと変換する方法を利用し、2種類の酵素 XDH およびキシルロースキナーゼ (XK) を配置した舟形 DNA ナノ構造体の構造変換によって XDH と XK 間の酵素間距離を変化させた。これらの足場上で特定の酵素間距離にある2段階逐次反応と、それぞれ別の足場に配置した XDH および XK を用いた逐次反応の効率を評価したところ、20 nm から 1110 nm の酵素間距離で第2段階の代謝回転数は 10% しか減少しなかった。これは 10 nm から 250 nm へと酵素間距離を変化させると代謝回転数が 90% 以上減少する XR と XDH の代謝反応とは大きく異なっていた。これらの結果から、2段階目の反応に関与する酵素のミカエリス定数 (K_m) が1段階目より遙かに小さい場合、もしくは代謝回転数 (k_{cat}) が遙かに大きい場合には、第1段階と第2段階の反応に関与する酵素間距離は逐次反応速度に大きくは影響しないことを明らかにした。この結果は多段階の人工代謝経路を作製する上での重要な設計指針となる。

第5章では、より短時間で舟形 DNA ナノ構造体を六角柱構造体へと変換する方法を開発し、その方法を利用して熱的に不安定な酵素を含む人工代謝経路を作製した。舟形から六角柱への DNA ナノ構造体の構造変化は、短鎖 DNA の鎖交換と二重鎖形成に依存している。短鎖 DNA の鎖交換に toehold 機構を利用して、第3章の方法では 12 時間を要した構造変換を 2 時間以内に完了する方法を開発した。 K_m と k_{cat} の均衡がとれている XR と XDH の逐次反応を評価したところ、舟形構造体よりも六角柱構造体内部に配置した場合の方が代謝回転数は高かった。さらに、六角柱構造体内部に配置した XR と XDH の逐次反応は、平面状 DNA ナノ構造体と同じ酵素間距離で配置した場合よりも効率が高かった。これらの結果から、逐次代謝反応の効率は、 K_m と k_{cat} の均衡がとれている二つの酵素でも、酵素間距離だけでなく酵素の周辺環境にも依存すると結論づけた。

第6章は総括であり、細胞外で酵素を1分子ずつ3次元可動空間に配置して、細胞内を模した環境にある酵素の代謝反応を検証した結果を要約している。3次元空間に区画化された逐次反応に関与する酵素は、同じ酵素間距離で2次的に配置された場合よりも、逐次反応速度が大きいことを明らかにし、その原因として区画化された酵素の周辺環境の水分子層の役割を指摘している。さらに、細胞内の酵素反応を理解する新しい知見として、そして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設計指針として、酵素間距離が逐次反応速度に影響を及ぼす上での酵素特性について要約している。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

細胞内の代謝反応が効率的に進行するためには、代謝に関わる酵素群が効率良く逐次反応を触媒する必要がある。逐次反応に関わる酵素が近接すると逐次反応が高効率で進行するが、細胞内のように区画化された環境にある酵素による代謝反応の詳細は明らかでないため、細胞外で人工代謝経路を構築するうえでの支障となっている。本論文では、DNA ナノ構造体を用いて形状が変化する足場を構築し、3次元的に区画化された空間に配置したキシロース代謝酵素による代謝反応を解析した。得られた主な結果は以下の通りである。

(1) 二つの四角錐台が繋がった舟形構造体から六角柱構造体へと変化する DNA ナノ構造体を構築し、両四角錐台間での二本鎖 DNA 形成によって両構造体間の変換を制御する方法を開発した。

(2) 舟形構造体に個別に配置したキシロース還元酵素とキシリトール脱水酵素は、ともに反応速度が増大した。蛍光性 pH 指示薬を用いてナノ構造体上の局所 pH を測定し、従来 DNA ナノ構造体に配置された酵素の反応速度が増大する原因として提唱されてきた構造体表面の局所 pH 変化は、至適 pH が異なる両酵素の反応速度が DNA ナノ構造体上で増大する現象の主たる原因ではないことを明らかにした。さらに、DNA ナノ構造体表面の水分子高密度層での親水性基質の濃度上昇により酵素反応速度が増大する機構を提唱した。

(3) 2段階目の酵素のミカエリス定数が1段階目より遙かに小さい、もしくは代謝回転数が遙かに大きい場合には、2段階逐次反応の速度は酵素間距離に大きくは依存しないことを明らかにした。

(4) 2種類の酵素を舟形構造体上または六角柱構造体内に配置した場合、六角柱構造体内の方が逐次反応速度は高い。さらに六角柱構造体内での逐次反応は、同じ酵素間距離にある平面構造体上での反応よりも速度が高いことが明らかになった。

以上、本論文では、細胞内を模した3次元可動空間に配置した酵素の反応を検証し、3次元空間に区画化された2種類の酵素の逐次反応速度は、2次元的に配置された場合よりも高いことと、酵素間距離が逐次反応速度に影響を及ぼし得る酵素の反応特性を明らかにした。これらの成果は細胞内代謝反応を理解する上での新しい知見となるだけでなく、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設計指針に大きく貢献するものと評価できる。

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、令和3年6月22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