

2022年6月30日

第34シーズン サイエンスカフェ in 静岡

微生物の作るナノマシーン ~セルラーゼとキチナーゼ~

静岡大学農学部 応用生命科学科
准教授 中村 彰彦

ナノマシーン

December 29th 1959 at the annual meeting of the American Physical Society

There's Plenty of Room at the Bottom



Richard Feynman

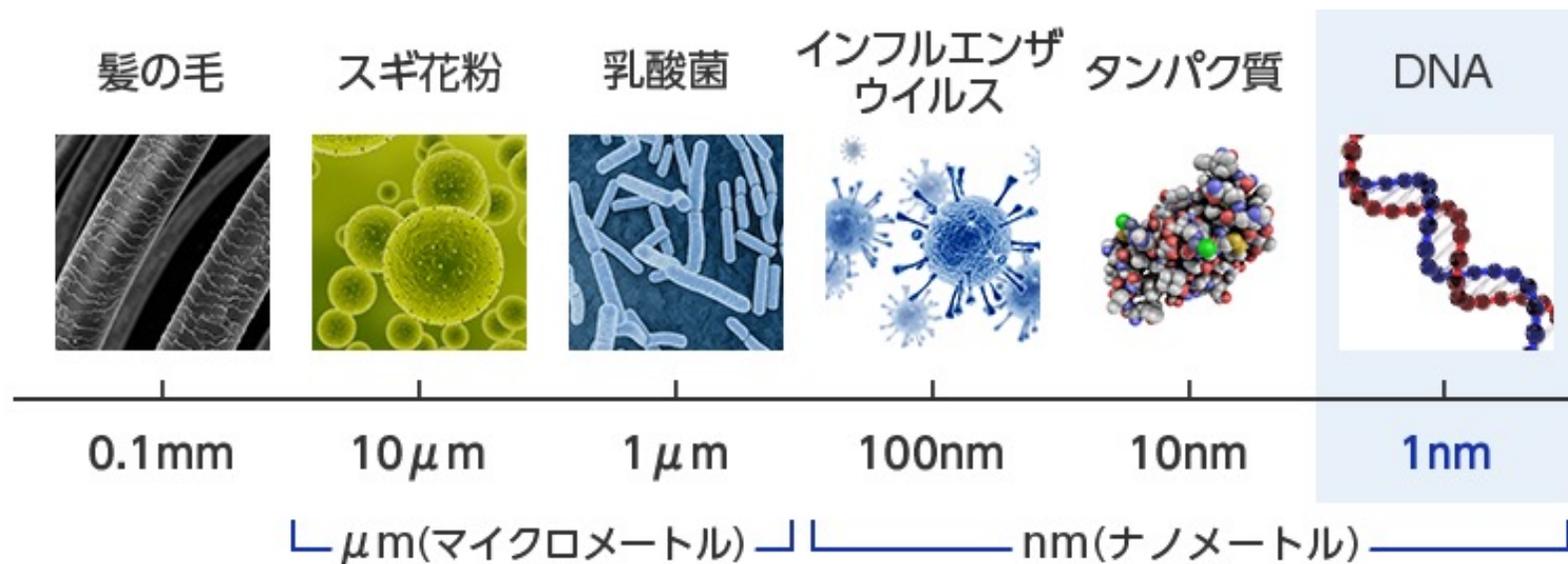
An invitation to enter a new field of physics.

by Richard P. Feynman

A friend of mine (Albert R. Hibbs) suggests a very interesting possibility for relatively **small machines**. He says that, although it is a very wild idea, it would be interesting in surgery if you could swallow the surgeon. You put the mechanical surgeon inside the blood vessel and it goes into the heart and "looks" around. (Of course the information has to be fed out.) It finds out which valve is the faulty one and takes a little knife and slices it out. Other small machines might be permanently incorporated in the body to assist some inadequately-functioning organ.

[The Nobel Prize in Physics 1965](#)

ナノってどのくらいの大きさ？



https://www.dnp.co.jp/media/detail/1188833_1563.html

1 m
1 mm = 10^{-3} m
1 μm = 10^{-6} m
1 nm = 10^{-9} m
1 Å = 10^{-10} m



金原子 約 3 Å
4つで1.2 nm



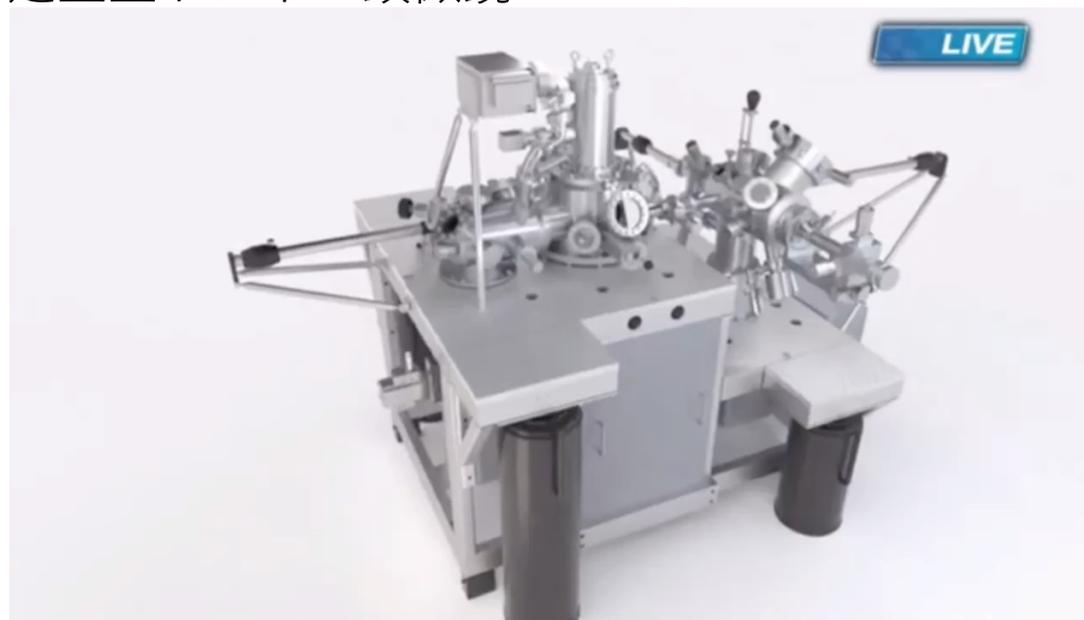
炭素原子 約 1.5 Å
7つで1.05 nm

最先端人工ナノマシン ナノカーレース

物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点チームが優勝

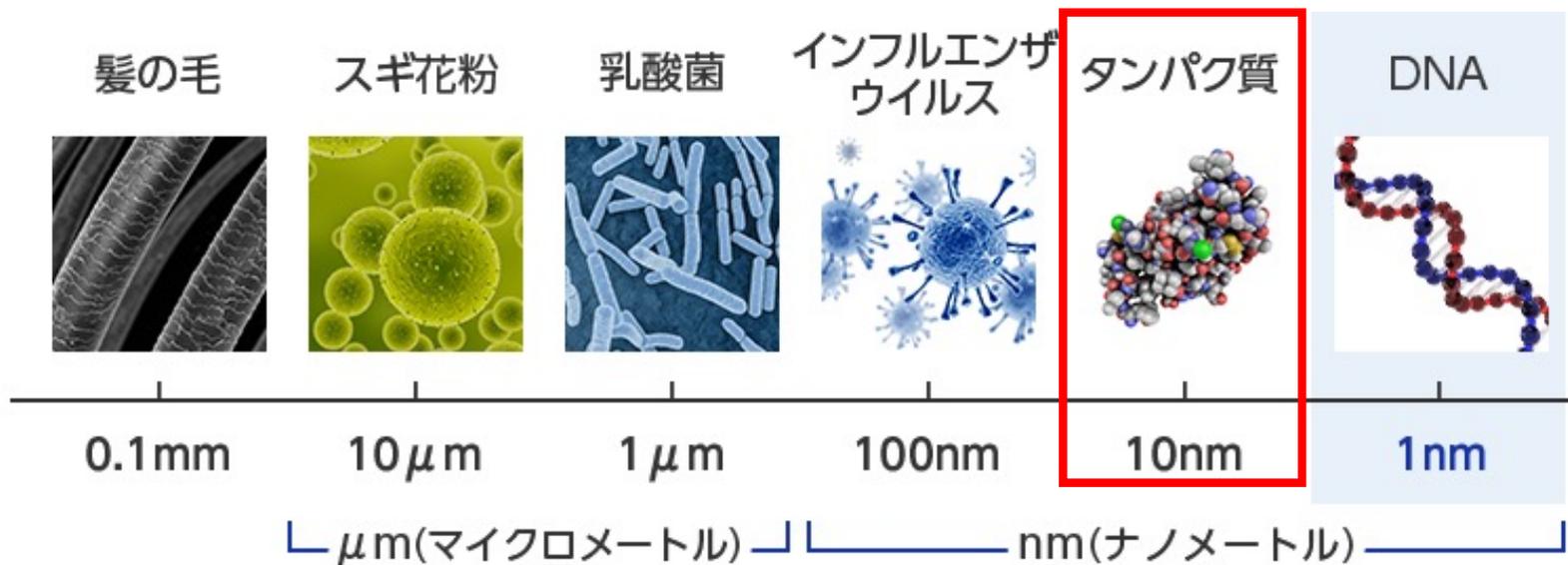


走査型トンネル顕微鏡



https://www.youtube.com/watch?v=2R_cTpaOn3U&t=929s

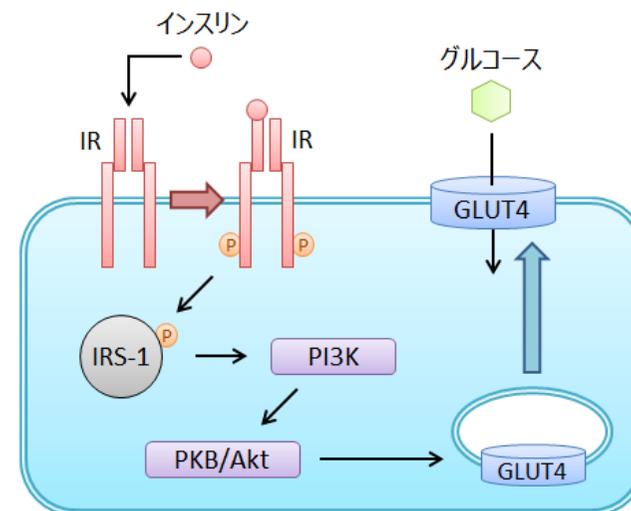
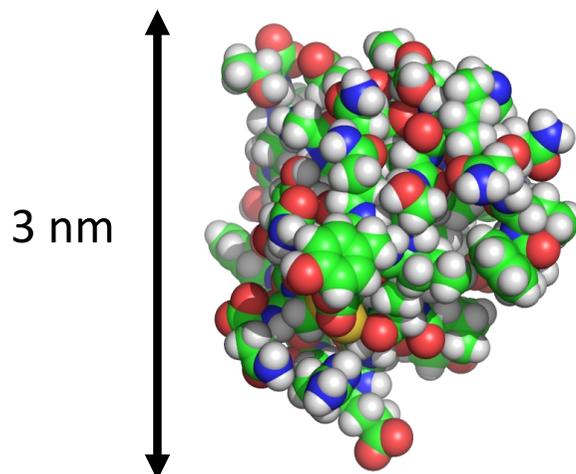
生体ナノマシン (= タンパク質) はすごい



https://www.dnp.co.jp/media/detail/1188833_1563.html

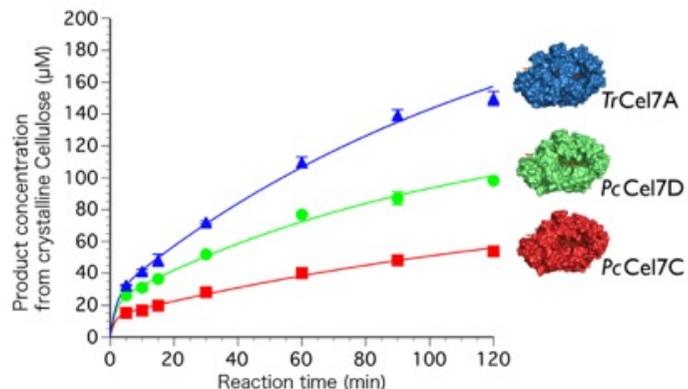
インスリン(PDB: 2HIU)

51アミノ酸
 炭素 257
 窒素 65
 酸素 76
 硫黄 6
 水素 387



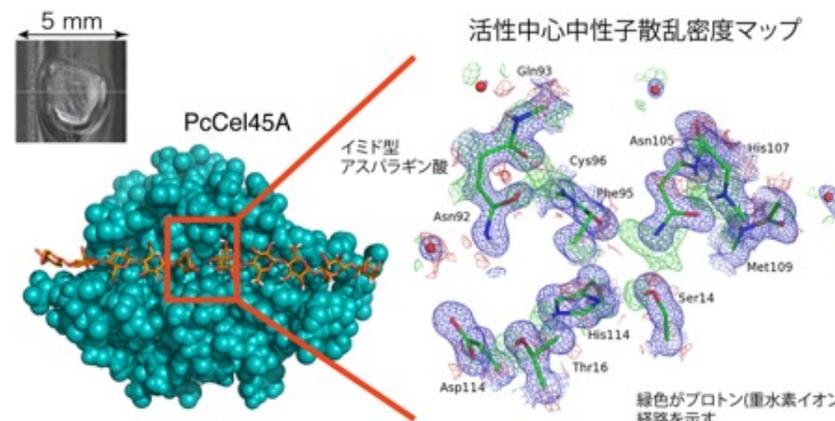
今までの研究内容例

①セルロース分解酵素の構造機能相関解析



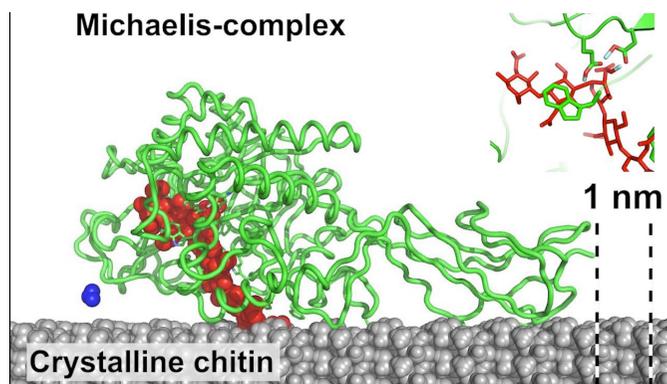
(A. Nakamura et al. JACS 2014)

②セルロース分解酵素の中性子/X線共構造解析



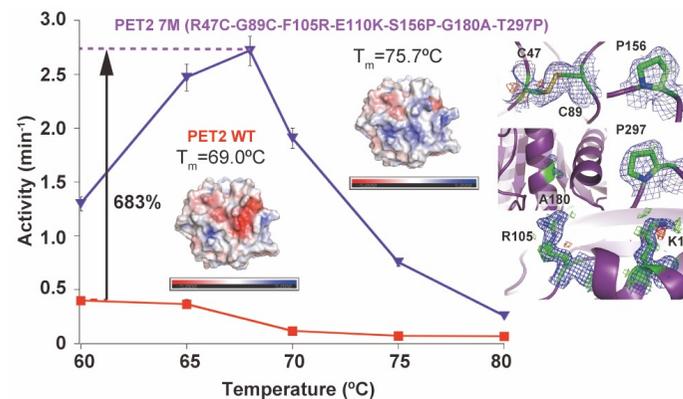
(A. Nakamura Sci Adv. 2015)

③キチン加水分解酵素の散乱1分子計測



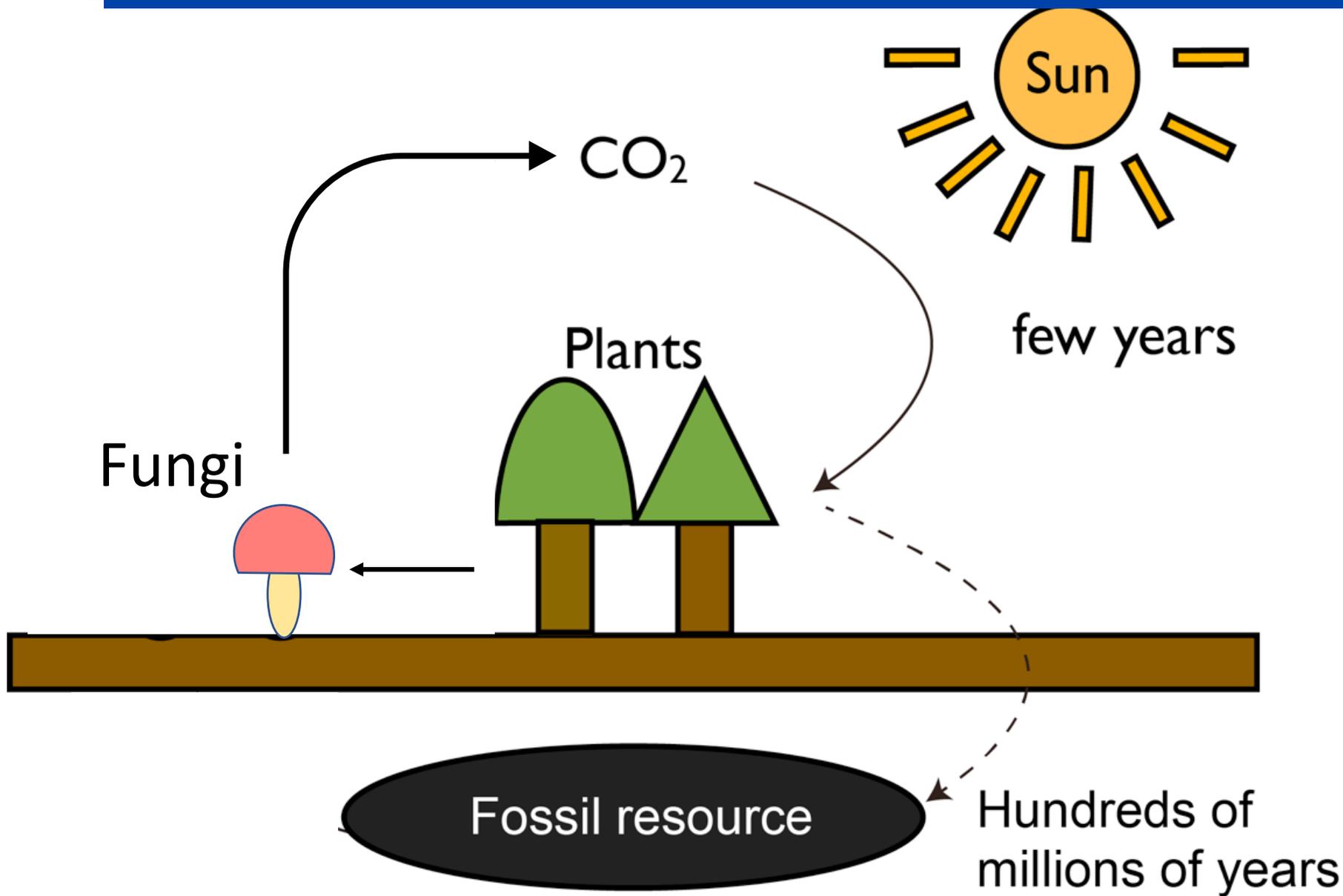
(A. Nakamura et al., Nat. Commun. 2018)

④PET分解酵素の開発

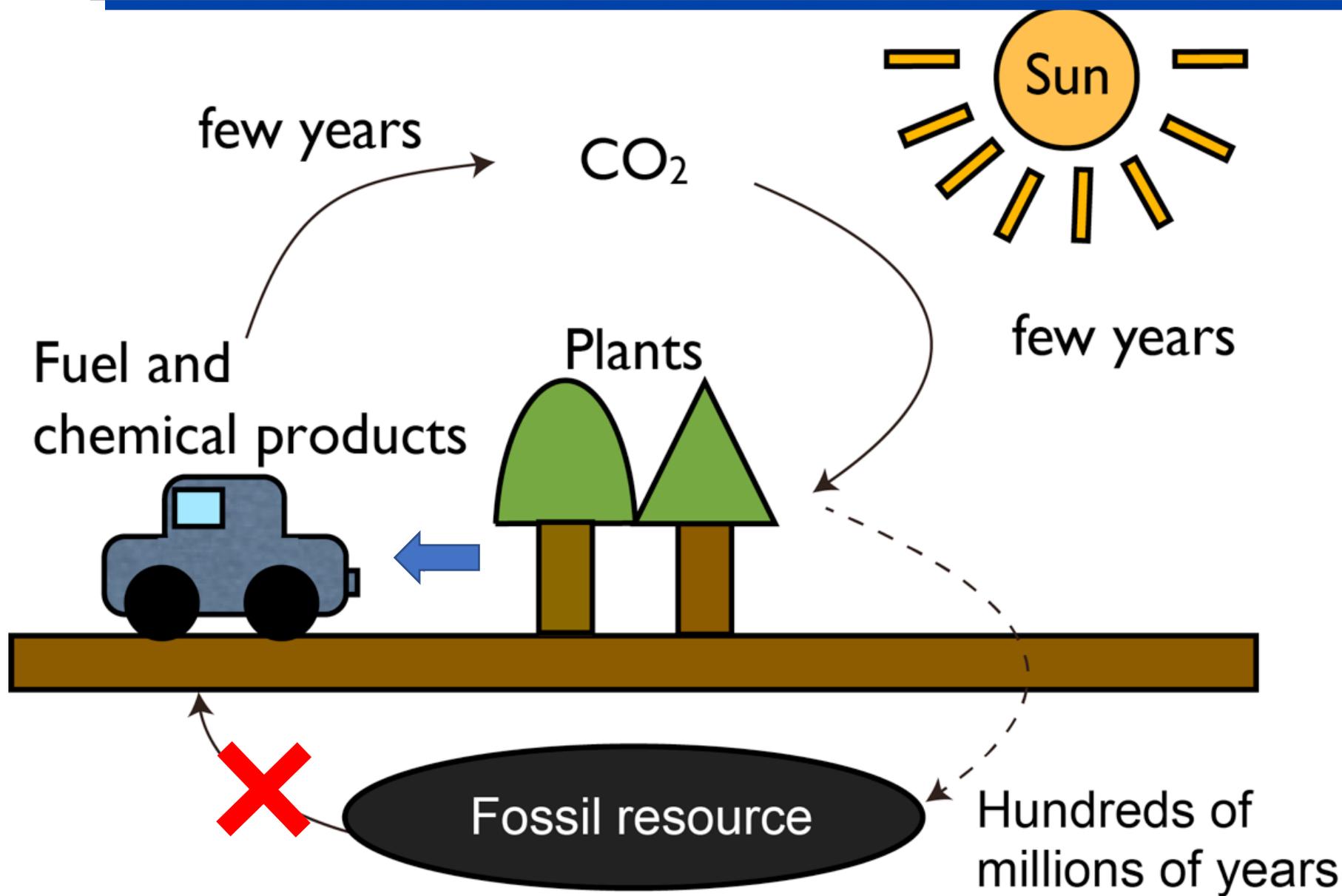


(A. Nakamura et al., ACS Catal. 2021)

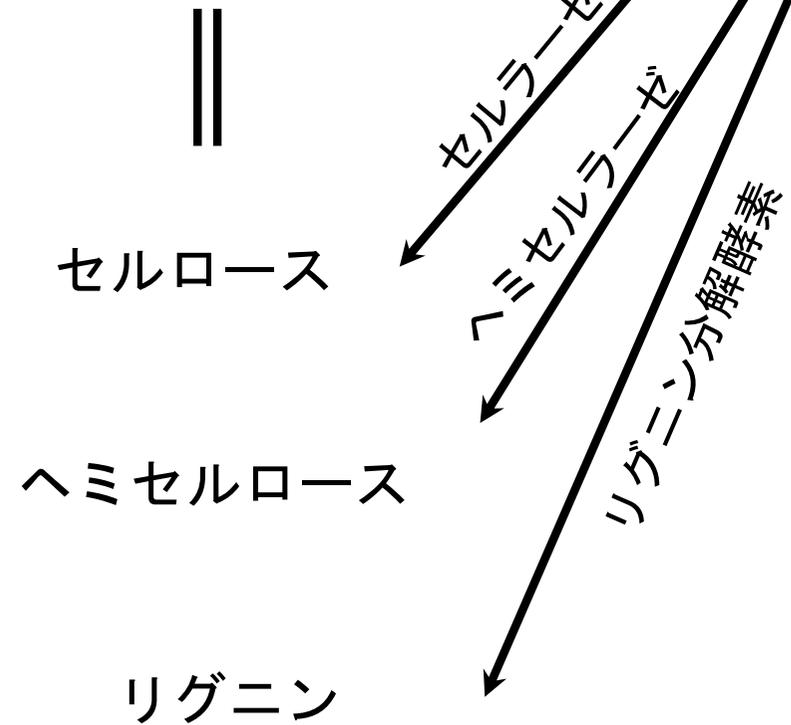
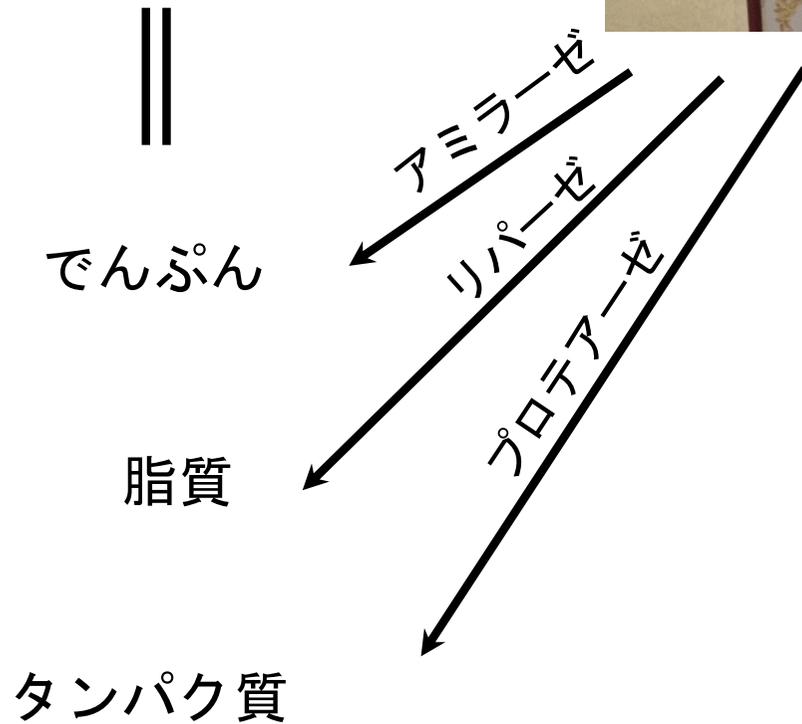
炭素・エネルギー循環



炭素・エネルギー循環

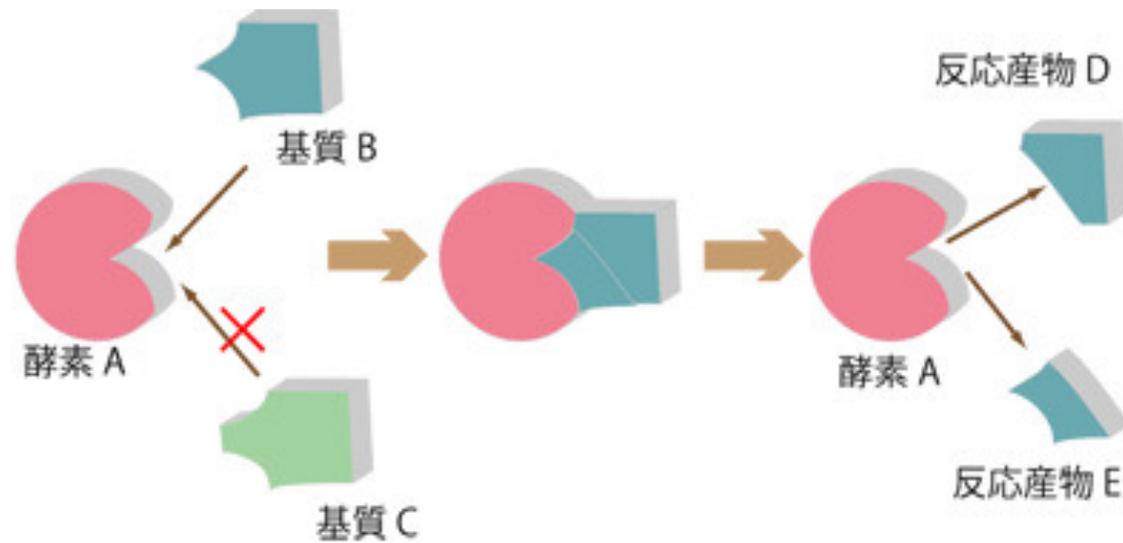


きのこはどうやって木を食べるか？



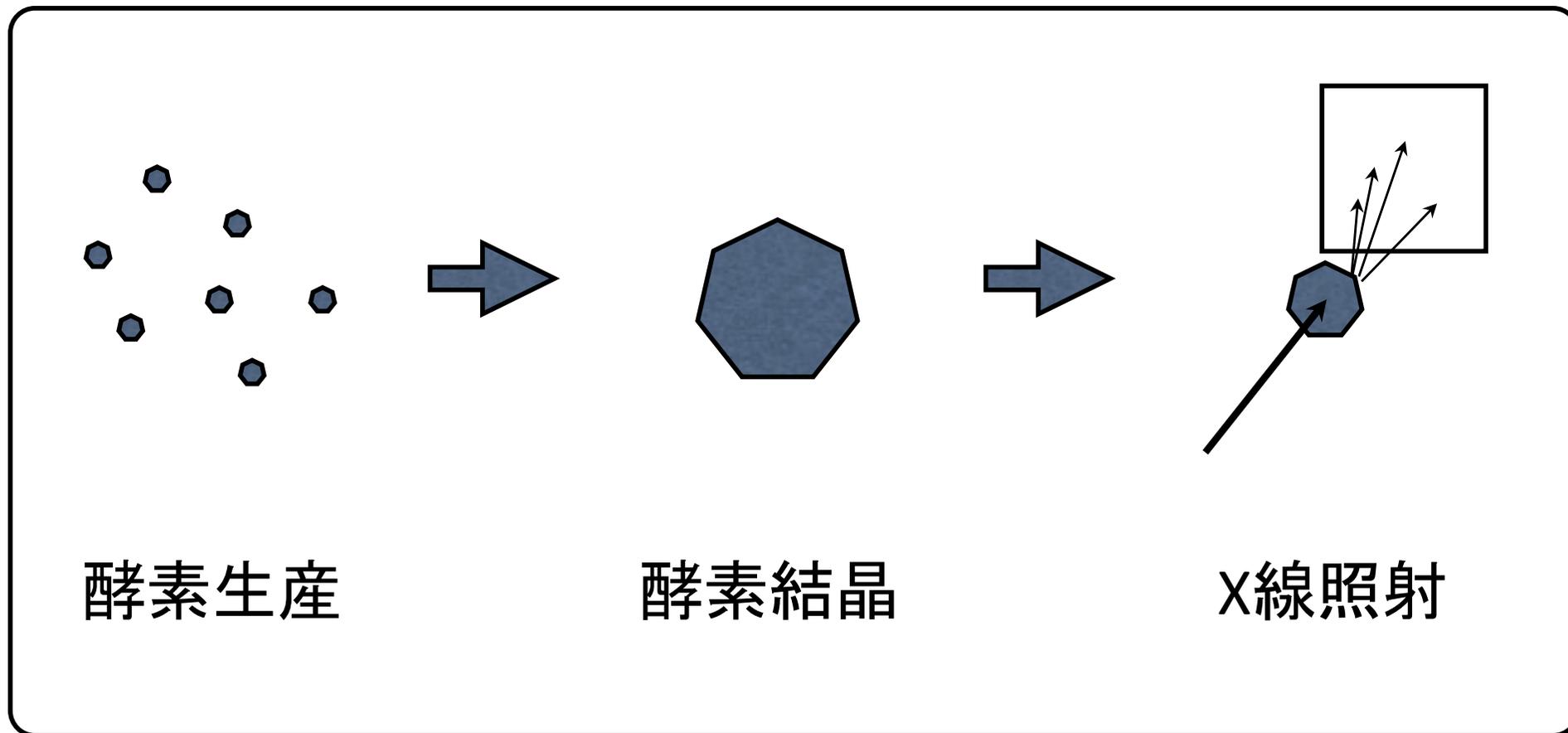
酵素って？

酵素 = 化学反応を触媒するタンパク質



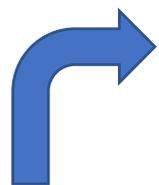
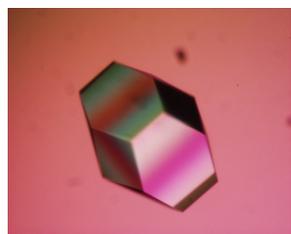
酵素の形によって反応する物質が決まる

酵素の形を知るには。。。。

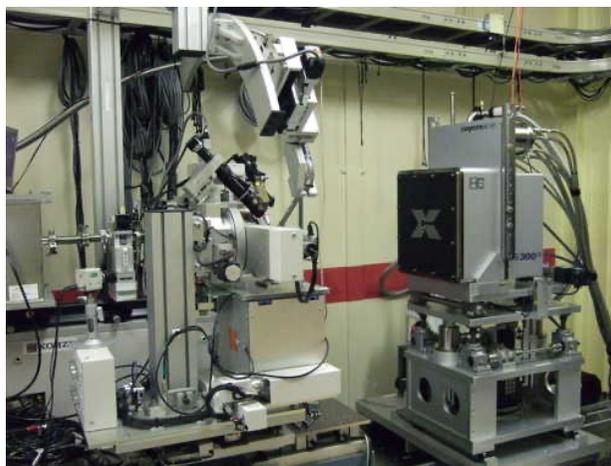


X線構造解析

X線結晶構造解析

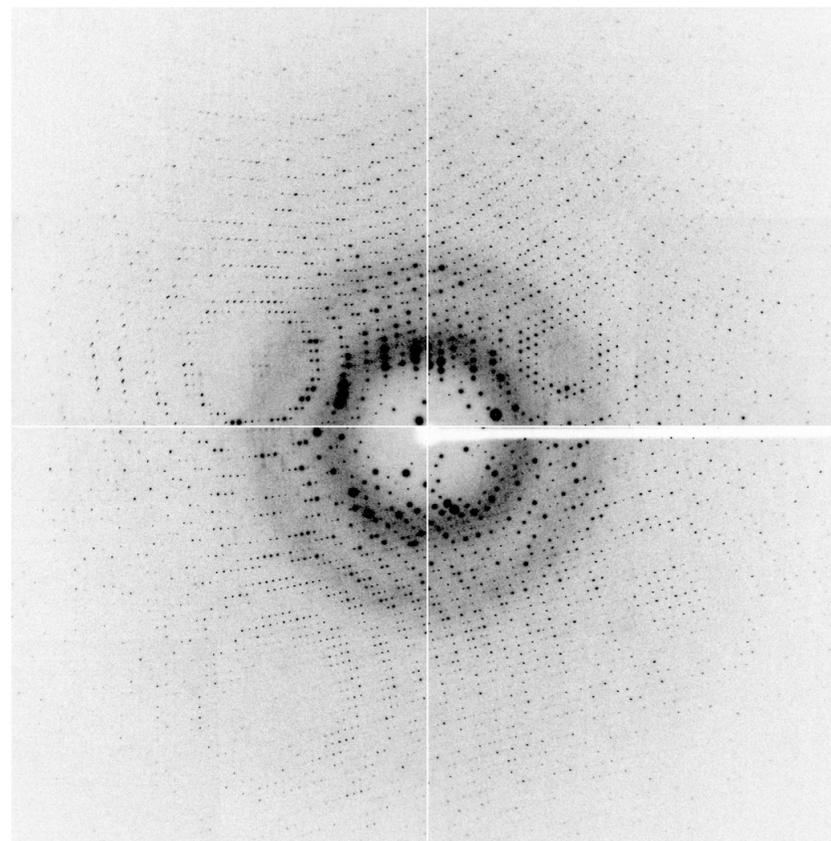


KEK (つくば)



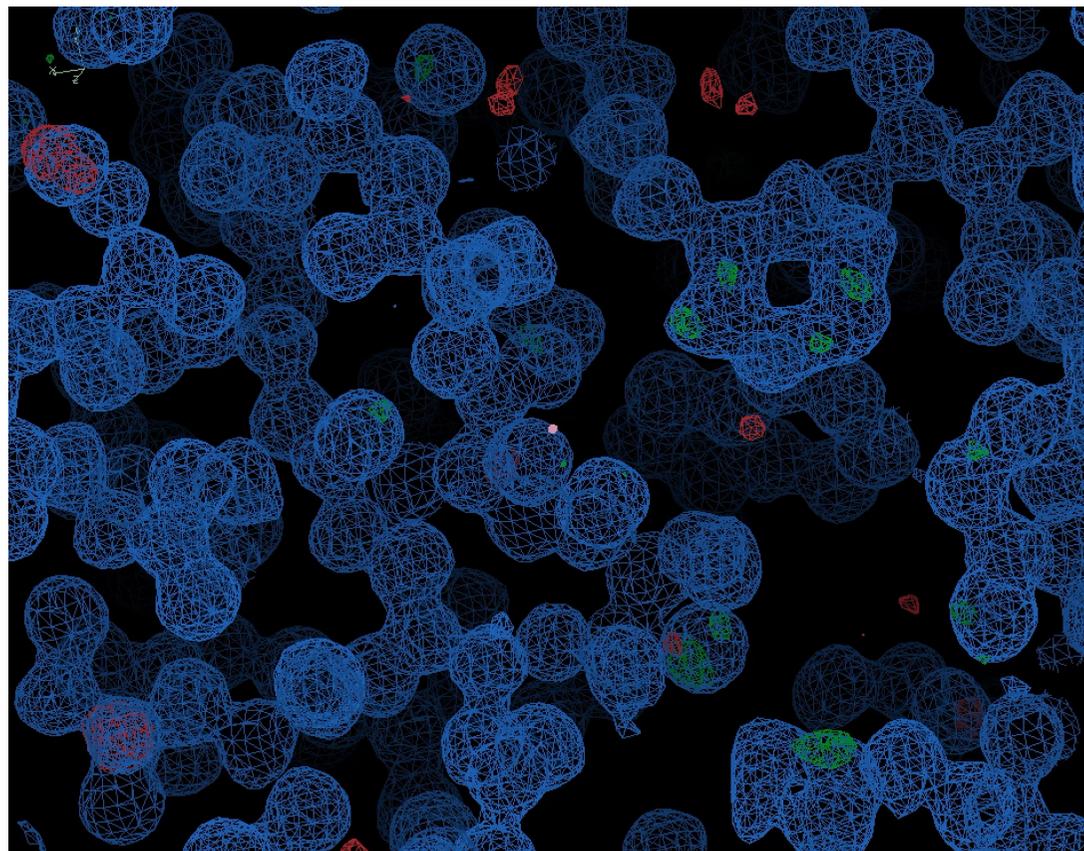
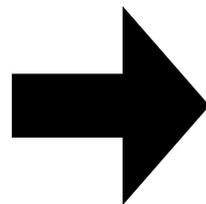
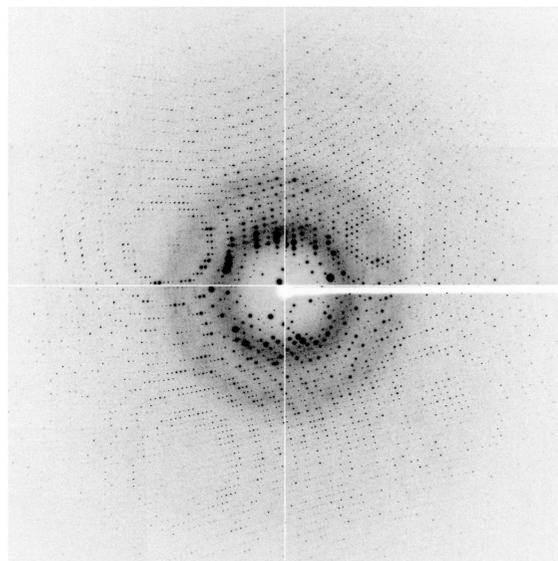
Spring-8 (兵庫) など

X線回折斑点計測

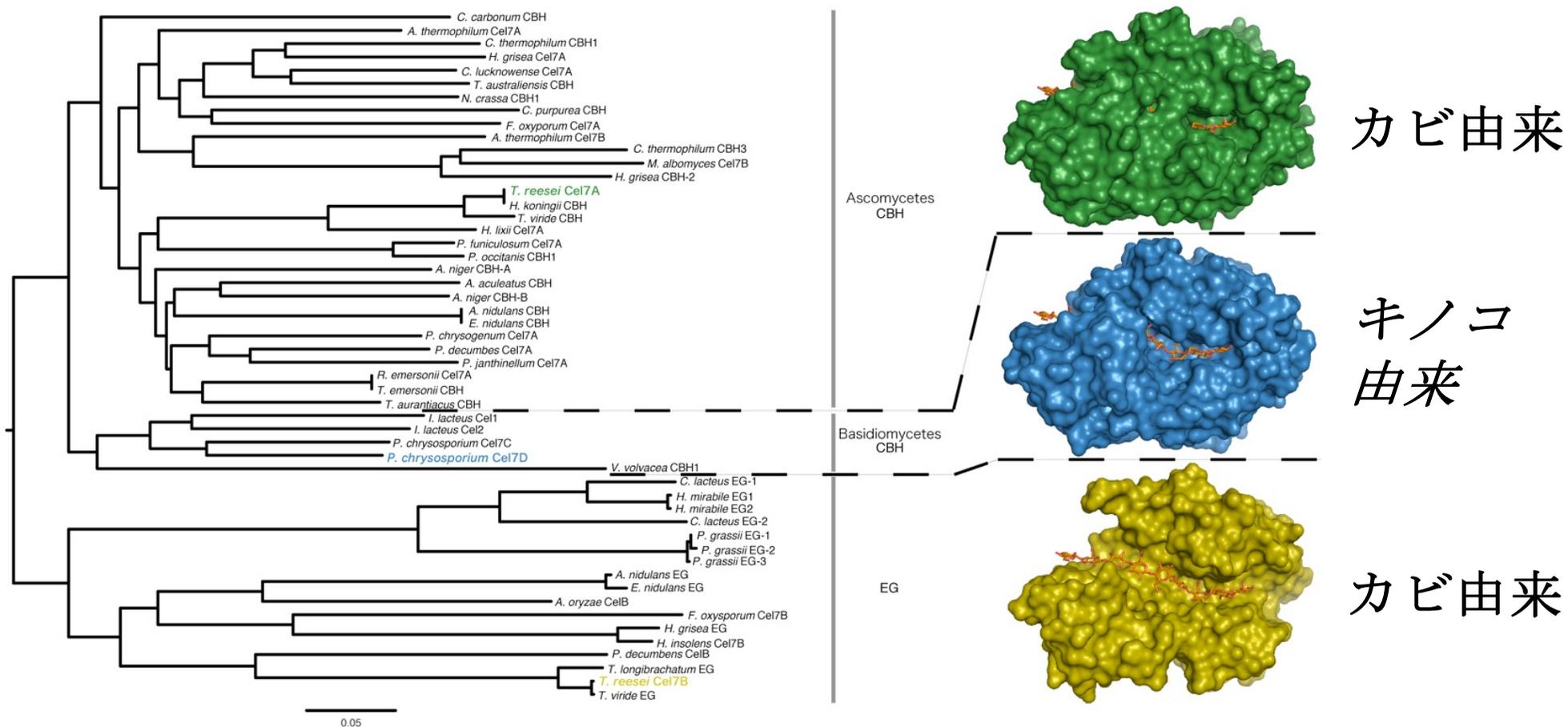


X線結晶構造解析

電子密度の解析と酵素モデルの作成



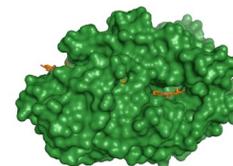
作る生物によって形が違う



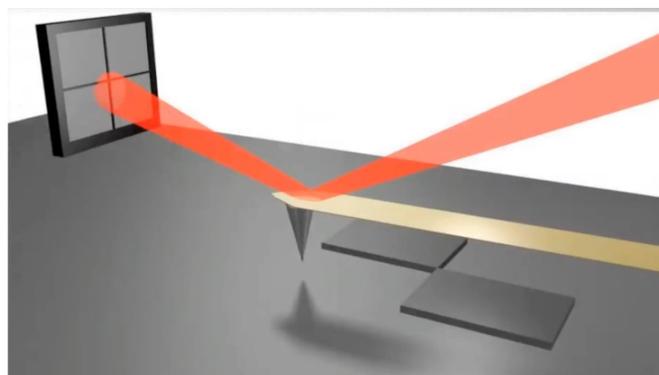
キノコがつくる酵素とカビが作る酵素は
ちょっと形が異なっている

酵素分子の動き観察

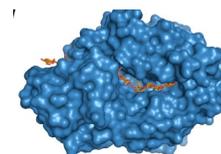
カビ由来



高速AFM



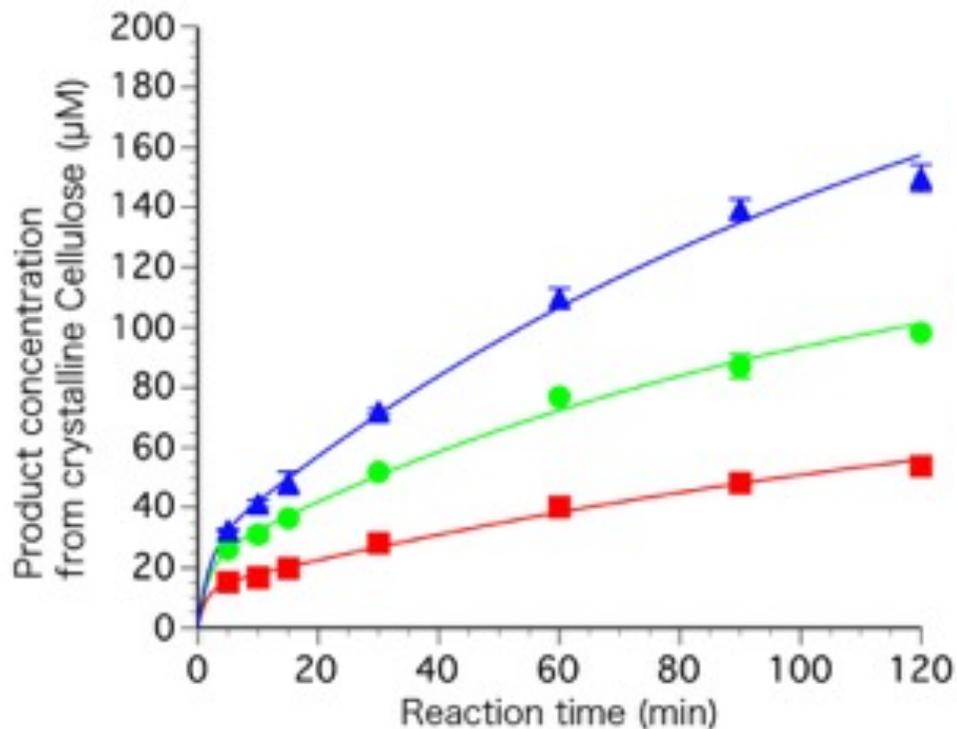
キノコ由来



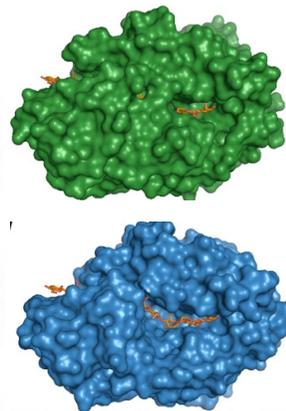
形が違くと分解の仕方も異なっている!

酵素分子の動き観察

結晶セルロース分解



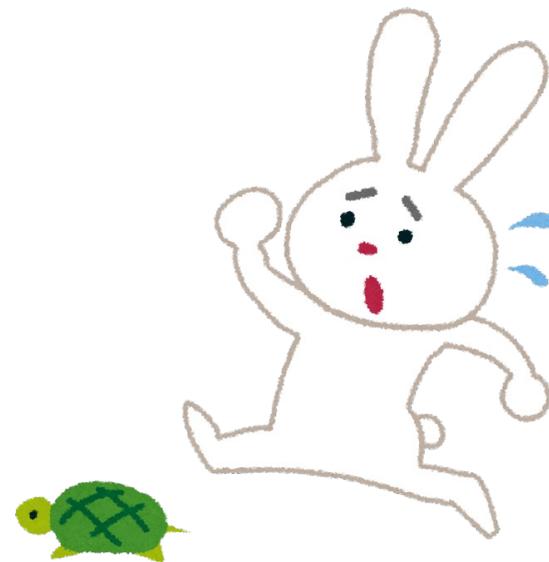

カビ由来



キノコ由来

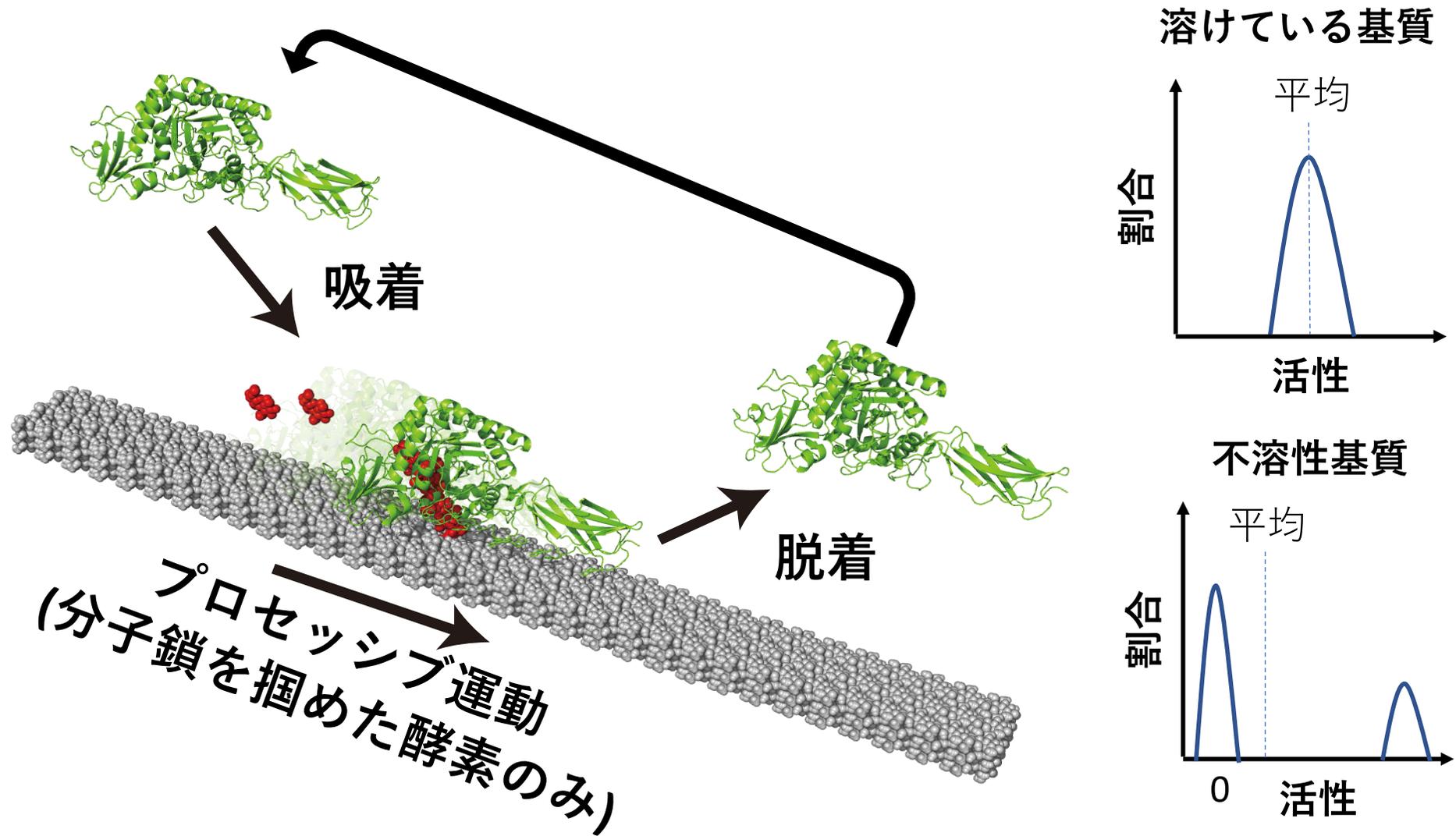


“うさぎとかめ”みたい?



一つの分子は遅くても全体では速く分解する
なぜ?

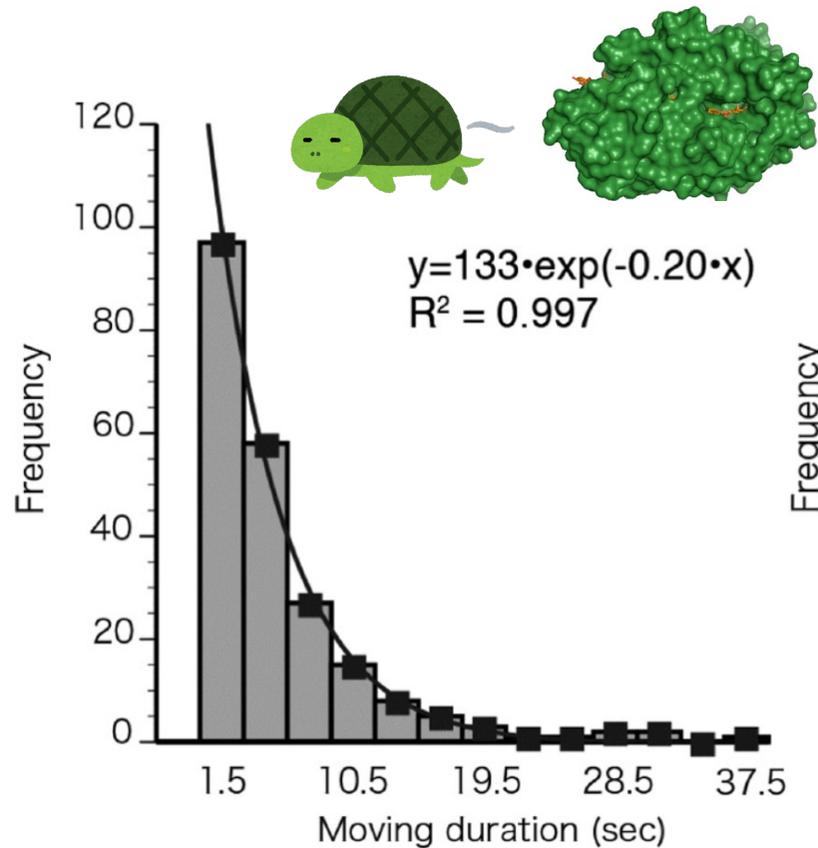
セルロース分解酵素は超格差社会



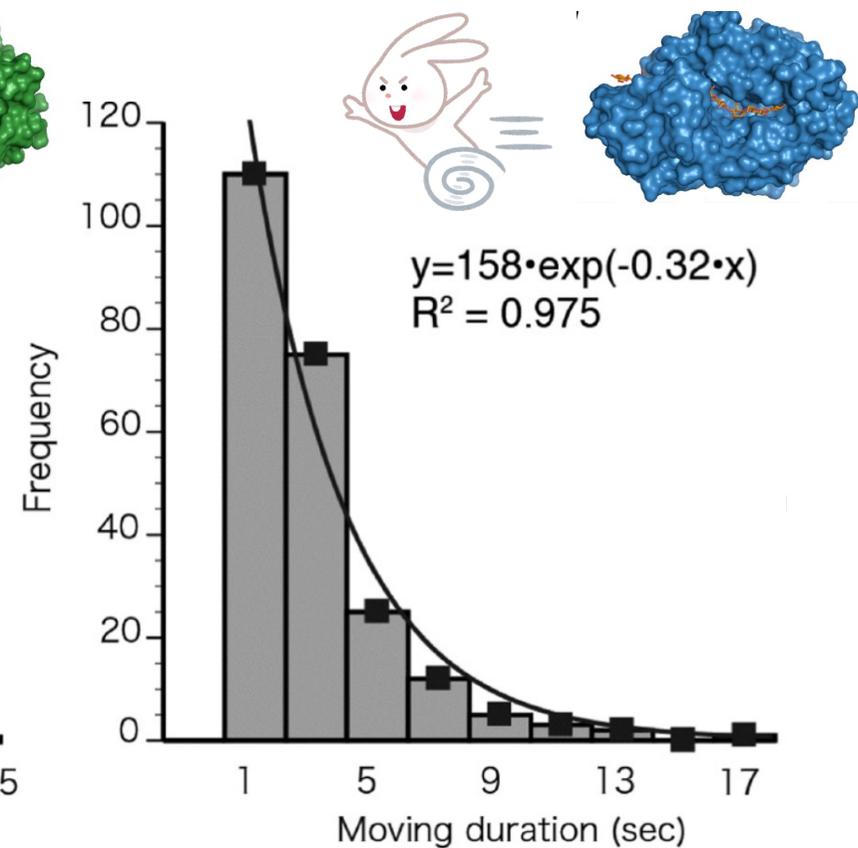
酵素1つの速さだけではなく、働いている酵素の数も重要

働いている時間が重要

カビ由来



キノコ由来



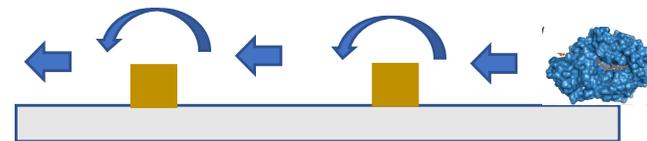
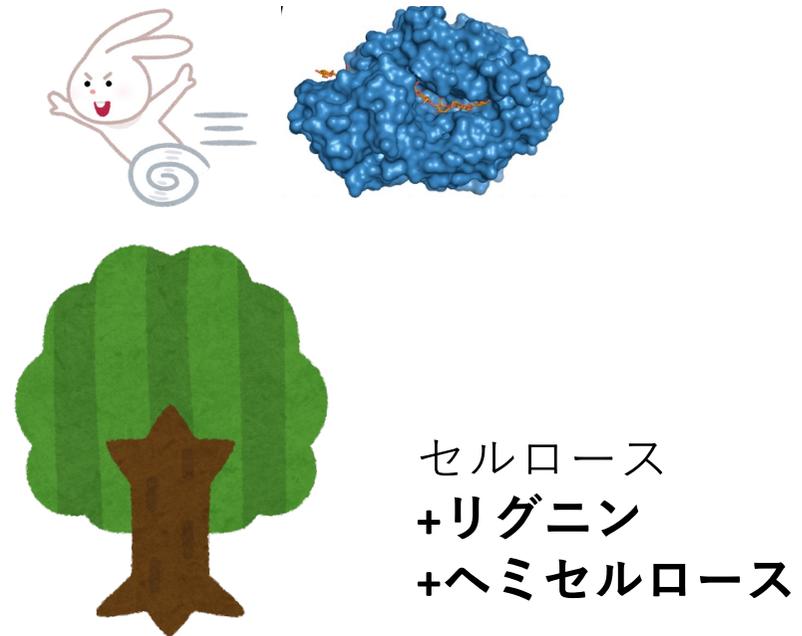
カビ由来酵素の方が一度動き出したら
長く働いてくれるので、全体としては高活性

みんなちがって、みんないい

カビ由来

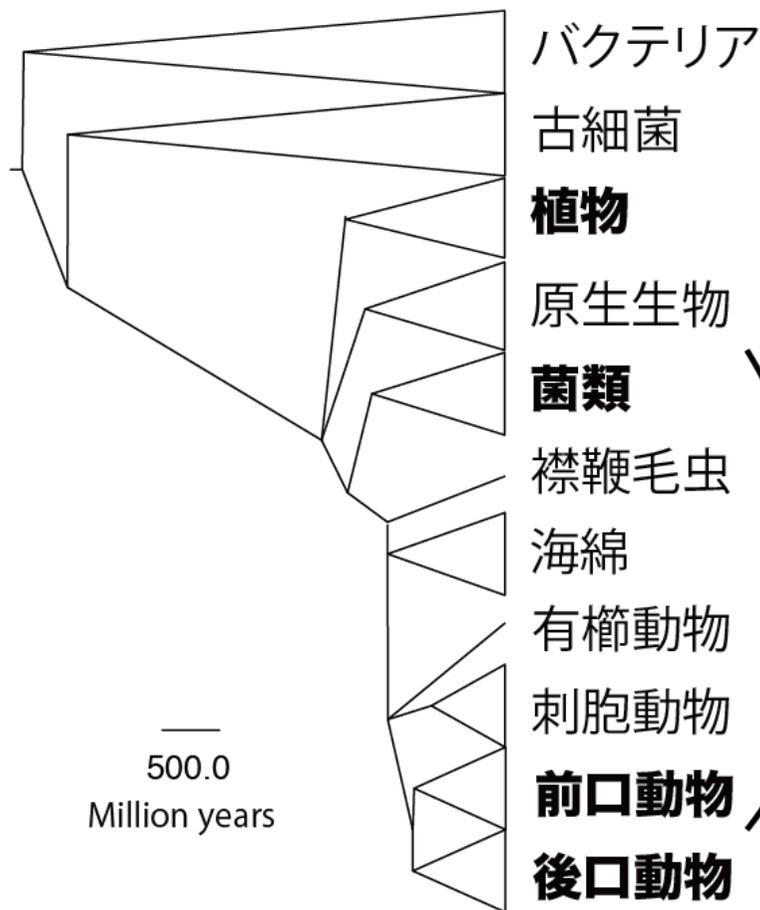


キノコ由来



生物の生育環境に合わせた酵素をもつ生物が生き残るので自然界においてはそれぞれがそれぞれに合わせた性質を持つ

セルロースとキチンは丈夫!



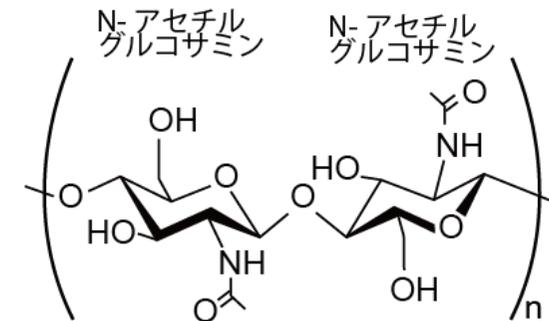
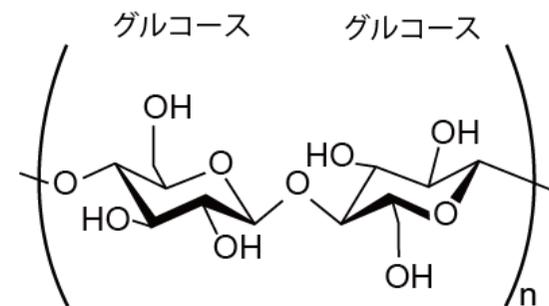
主にペプチドグリカン

主にタンパク質

セルロース

セルロースや
β-1,3 グルカン等

キチン



分子鎖が並び結晶化

セルロース結晶

キチン結晶

脱結晶化条件

320°C 25 MPa

380°C 25 MPa

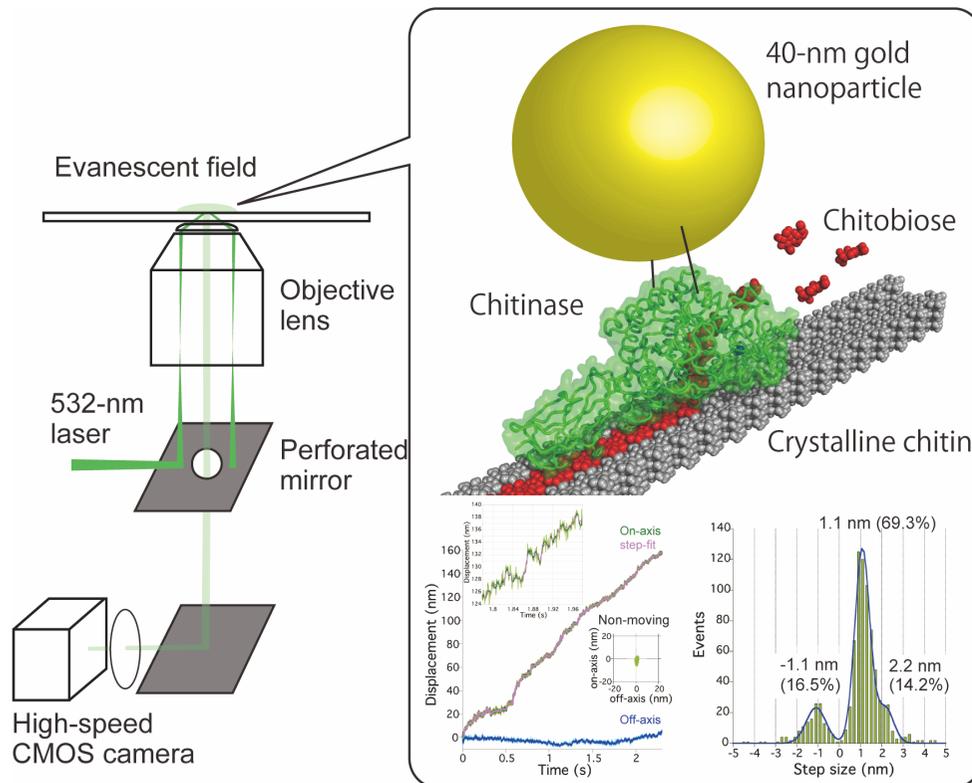
(Deguchi. et al., 2013, Chem. Comm.) (Deguchi. et al., 2015, Sci. rep.)

* 系統樹は<http://www.timetree.org>を簡略化

生体の構造を支える構造多糖

キチン分解酵素

散乱1分子計測でもっと詳しく！



(A. Nakamura, *Nat. Comm.*, 2018)

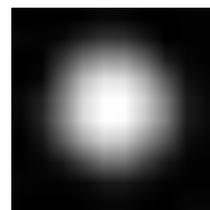
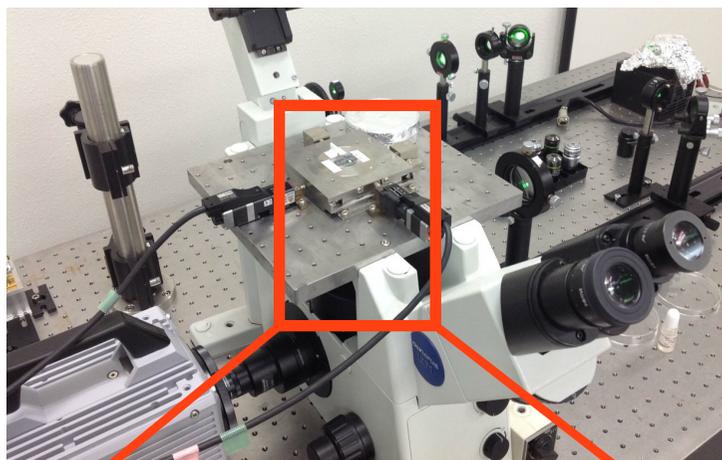
高速AFM x5 play



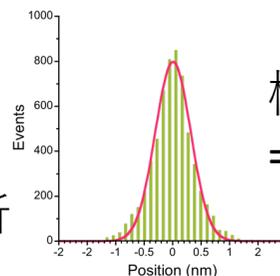
(Igarashi K. et. al. *Nat. Comm.* 2014)

なぜ動けるのか
なぜ壊せるのか 知りたい！

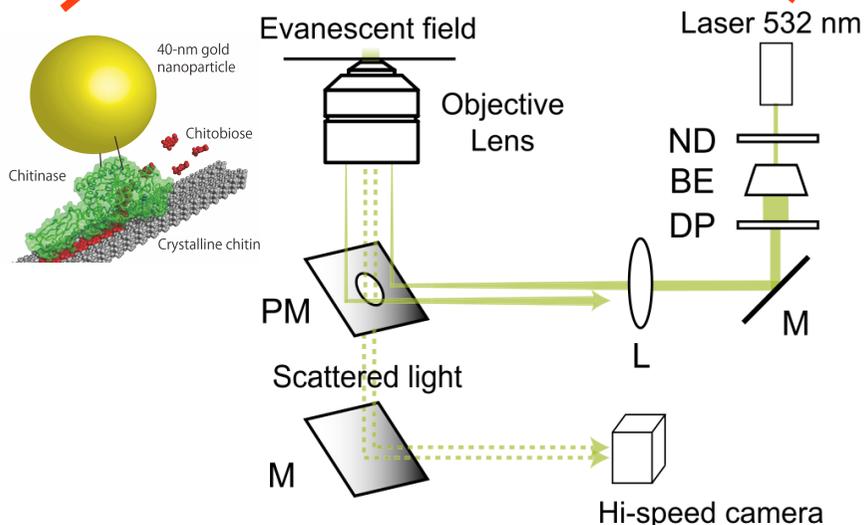
全反射暗視野顕微鏡



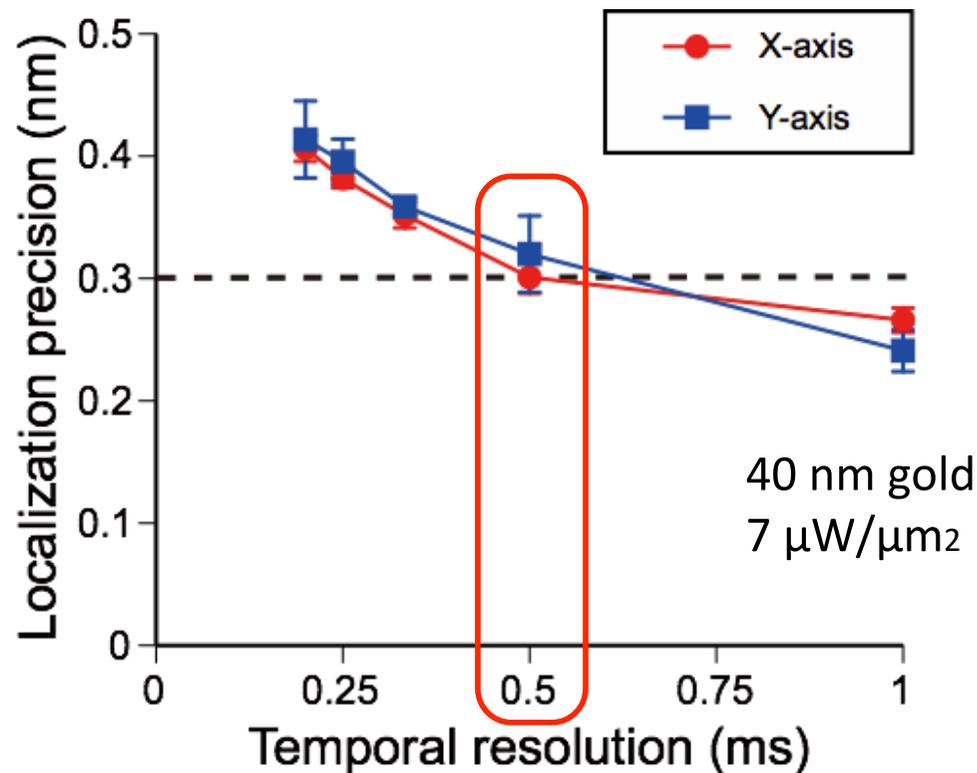
重心解析



標準偏差
= 位置決定精度

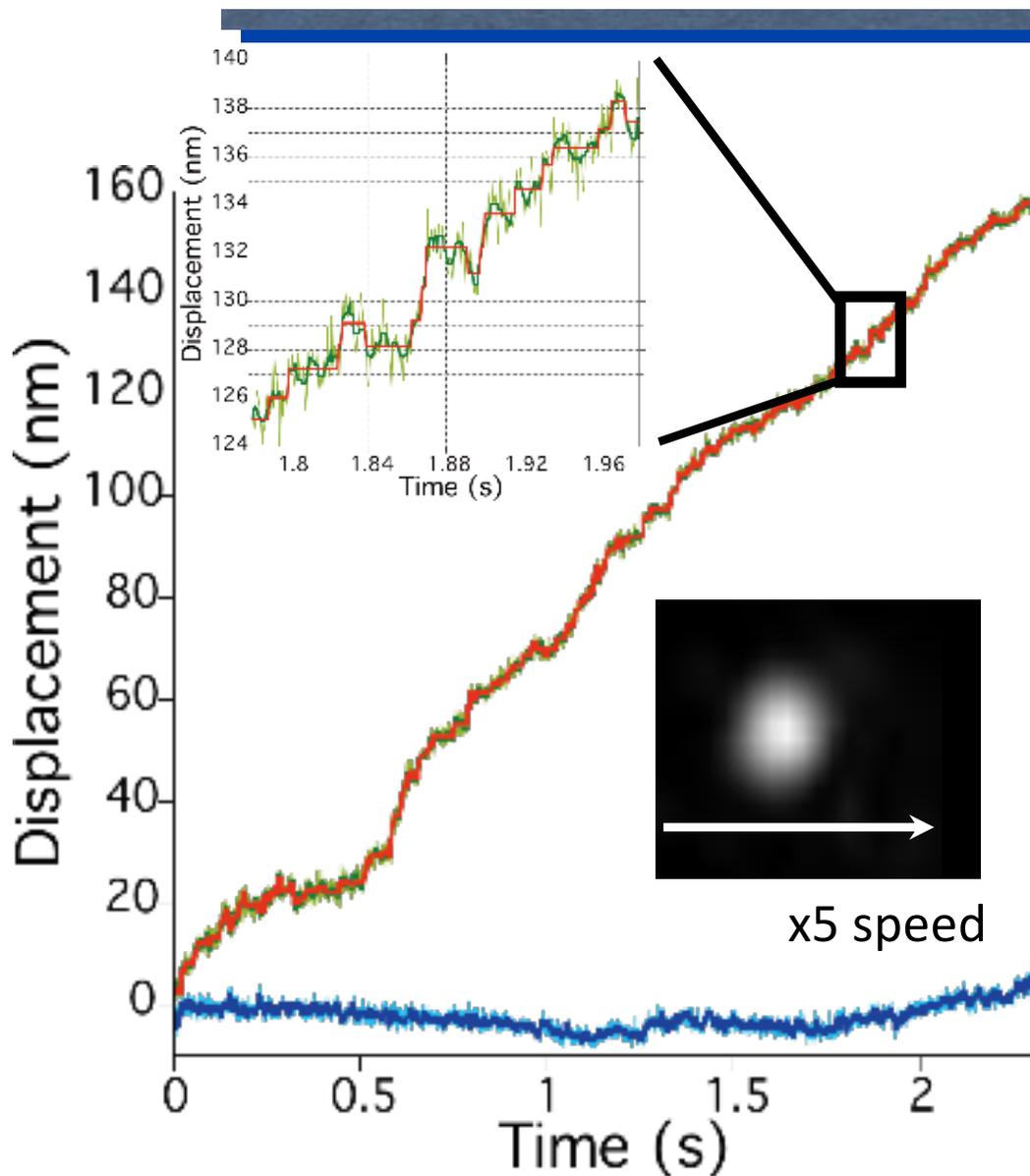


(Ueno H. et al., *Biophysical J.*, 2010)

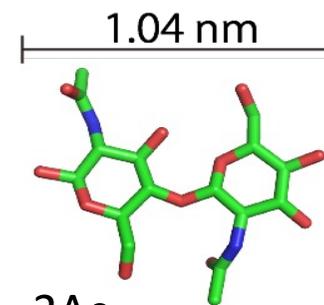


0.5 msの時間分解能で0.3 nmの位置決定精度

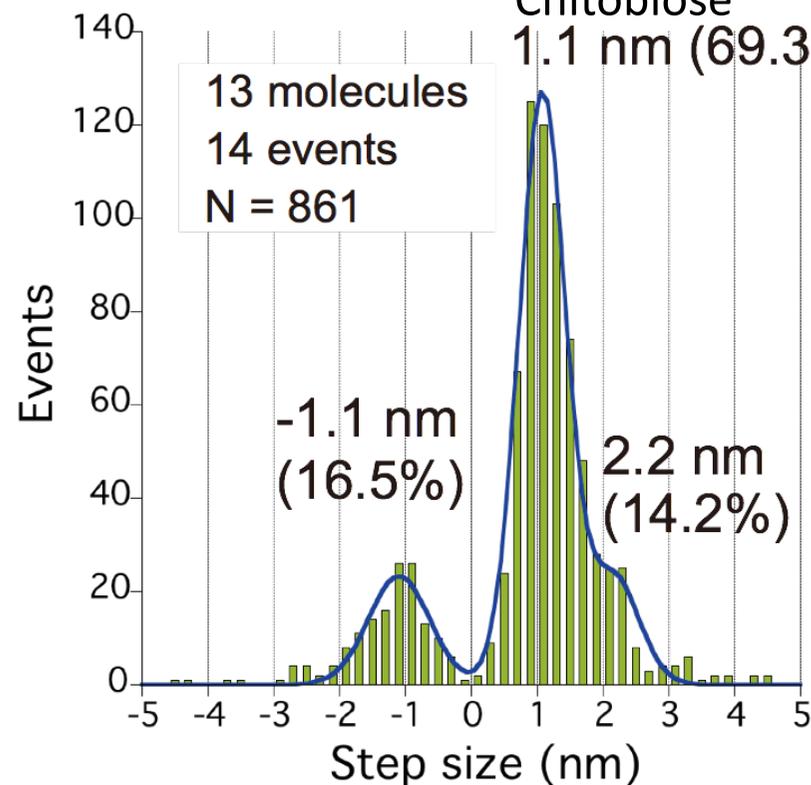
運動解析結果



前進: 83.5%
後退: 16.5%



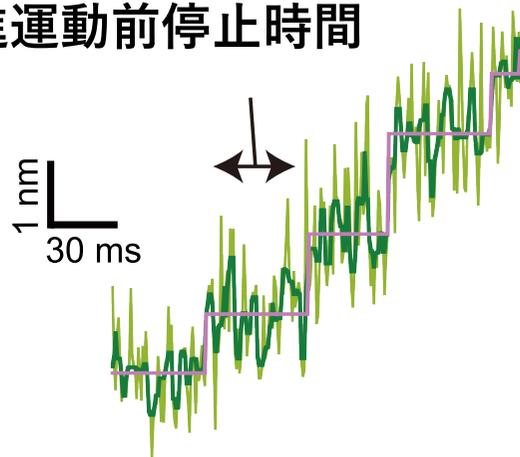
2Ac-Chitobiose
1.1 nm (69.3%)



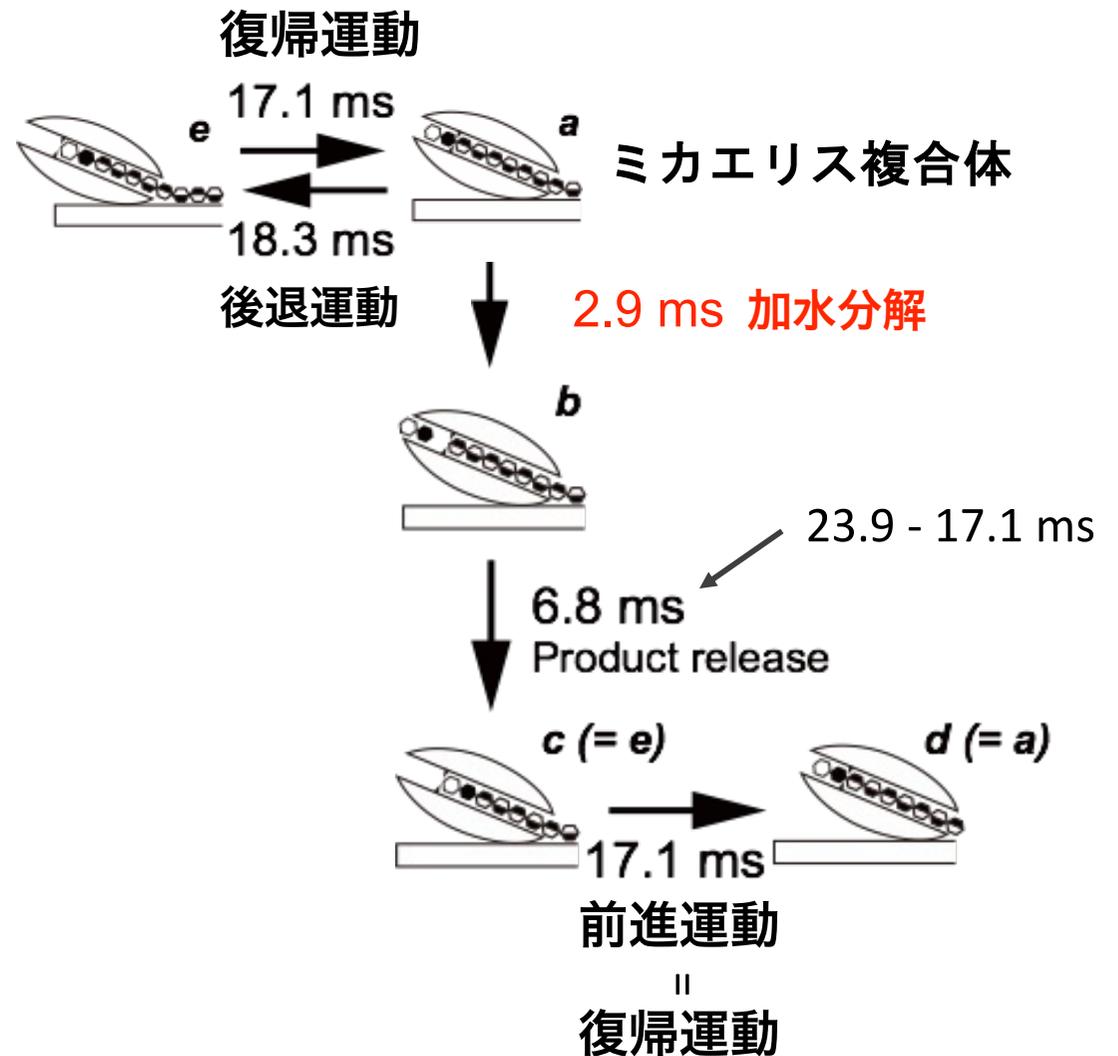
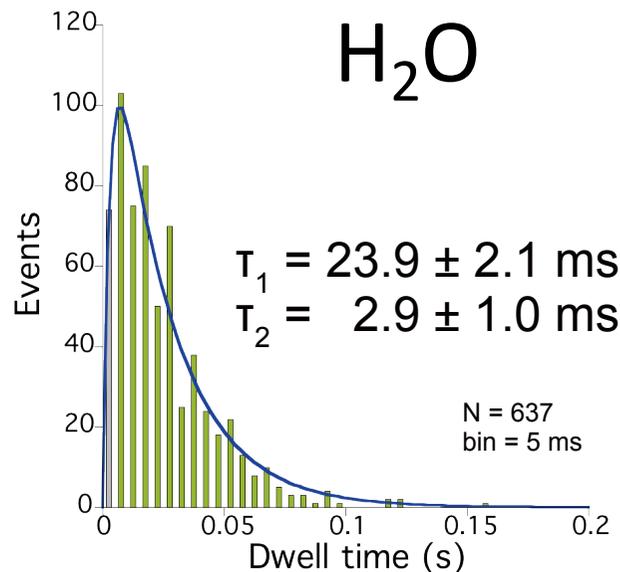
大体1 nm間隔で動いたり止まったりを繰り返している

運動解析結果

前進運動前停止時間



前進運動前の停止時間分布

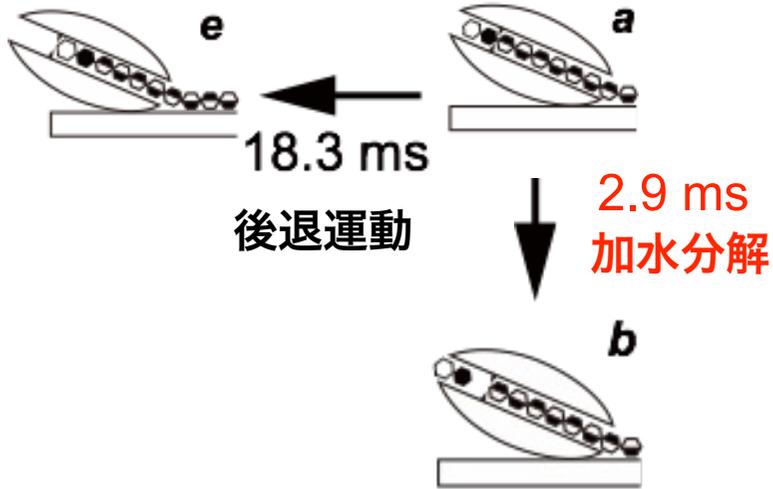


運動している時にどのくらいの時間がかかっているのか判明

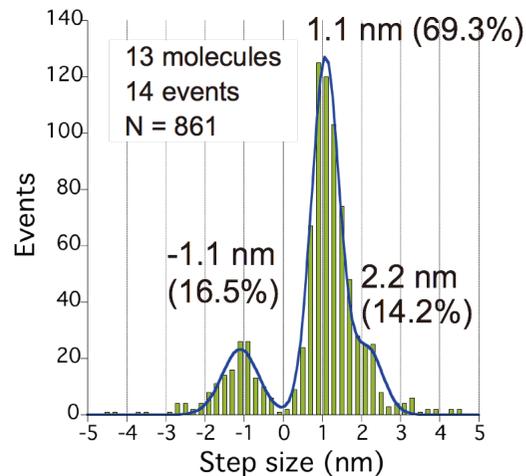
なぜ1方向に運動できるのか？

Competitive reaction

ミカエリス複合体



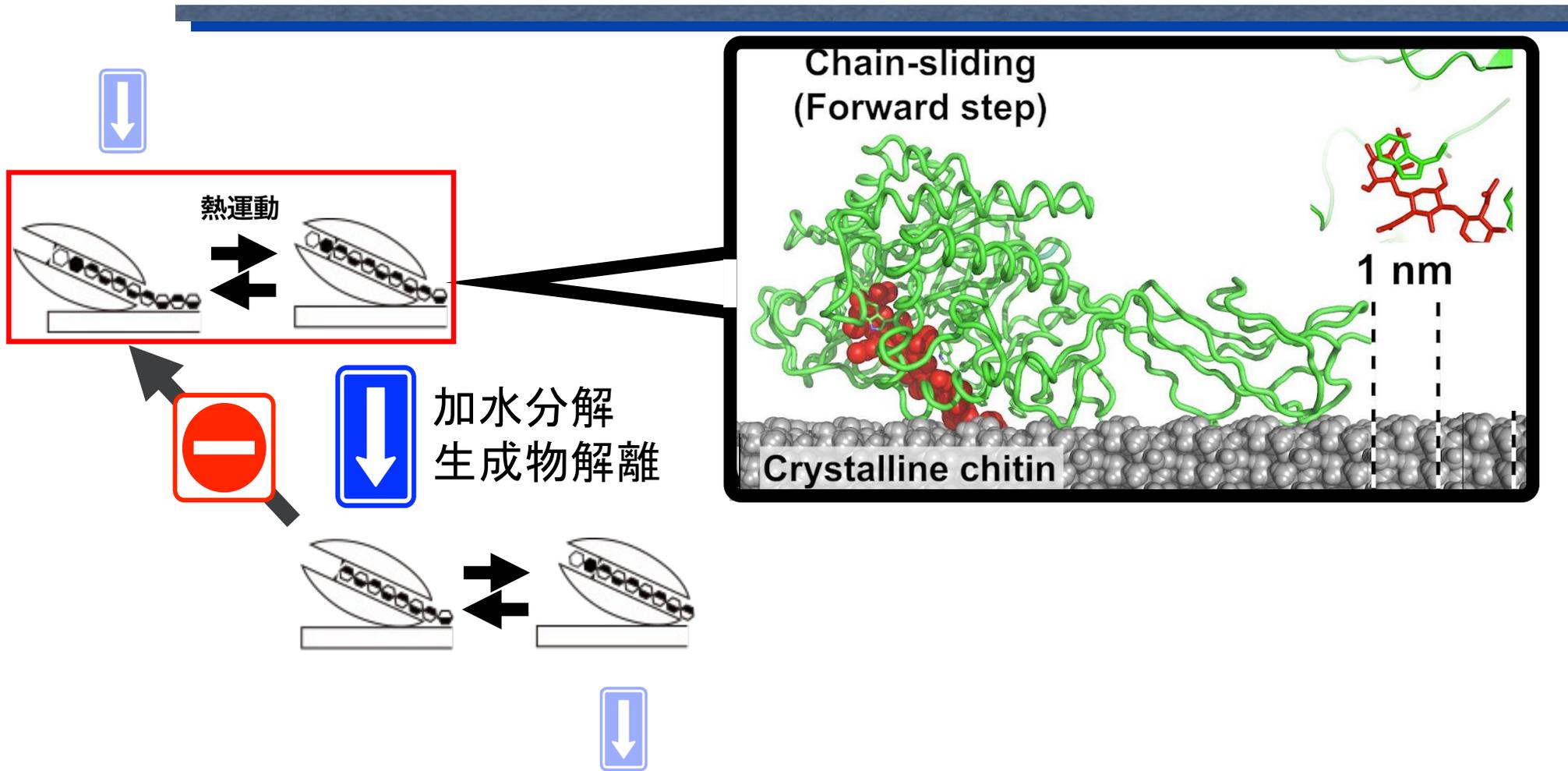
加水分解: 86.3%
後退運動: 13.7%



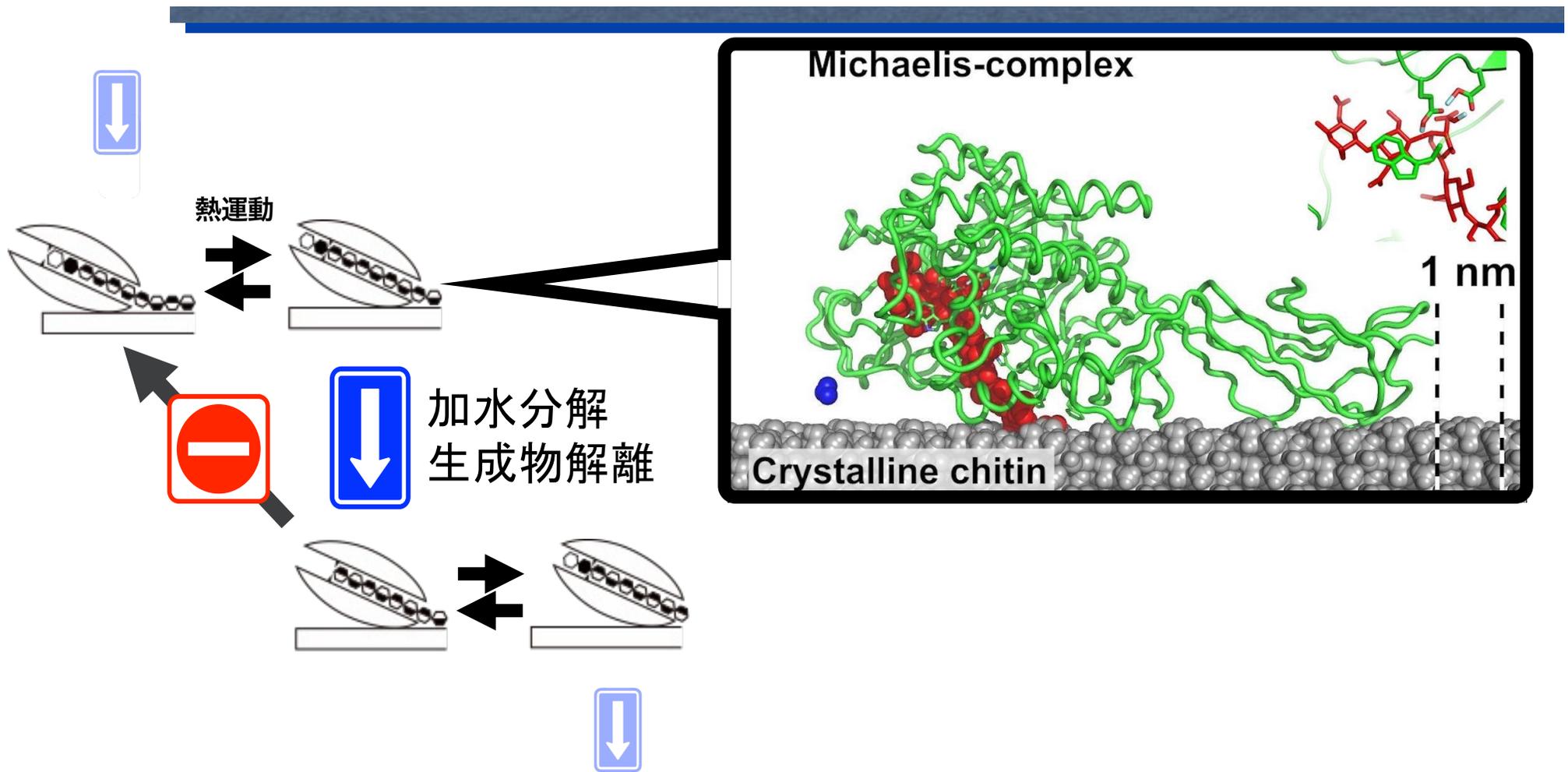
前進運動: 83.5%
後退運動: 16.5%

加水分解により前進運動を行っている

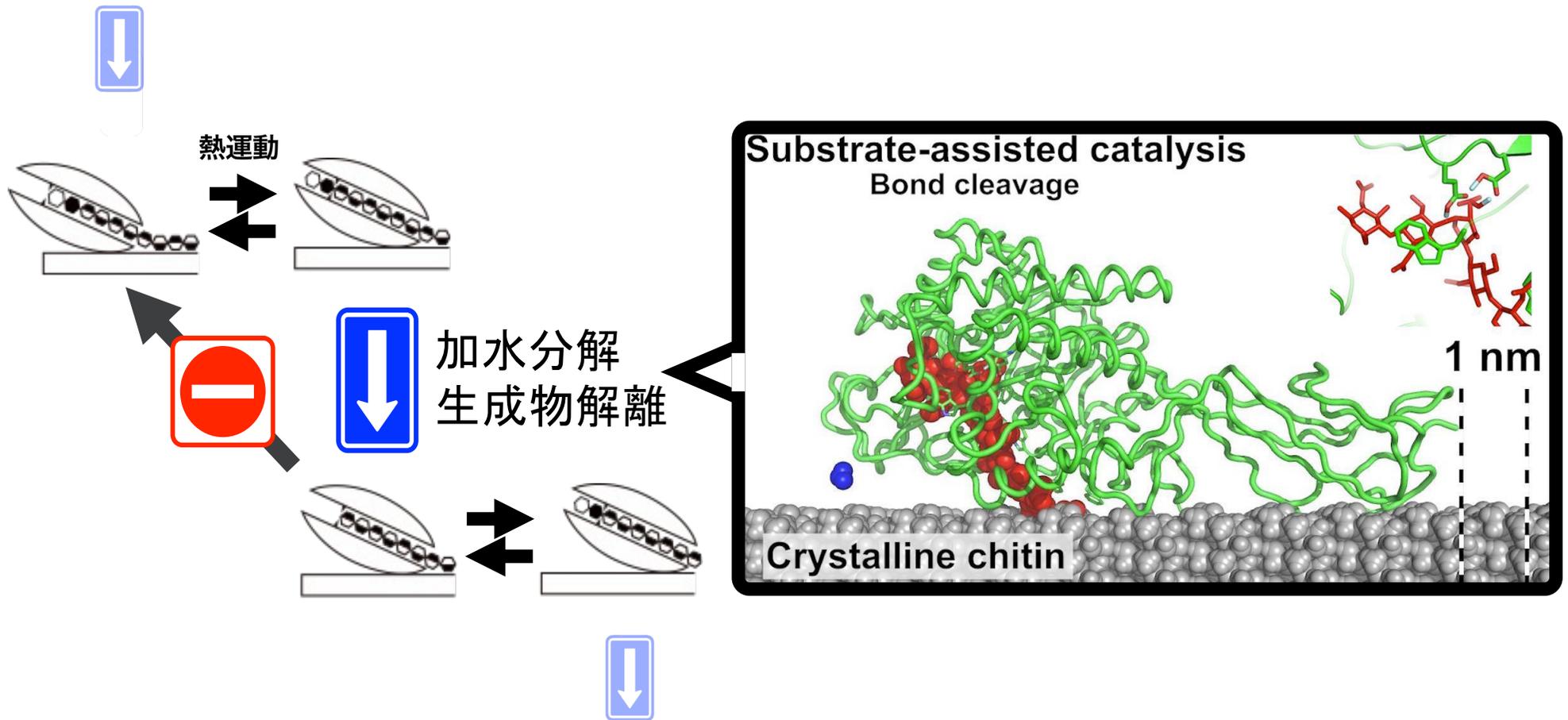
運動機構モデル



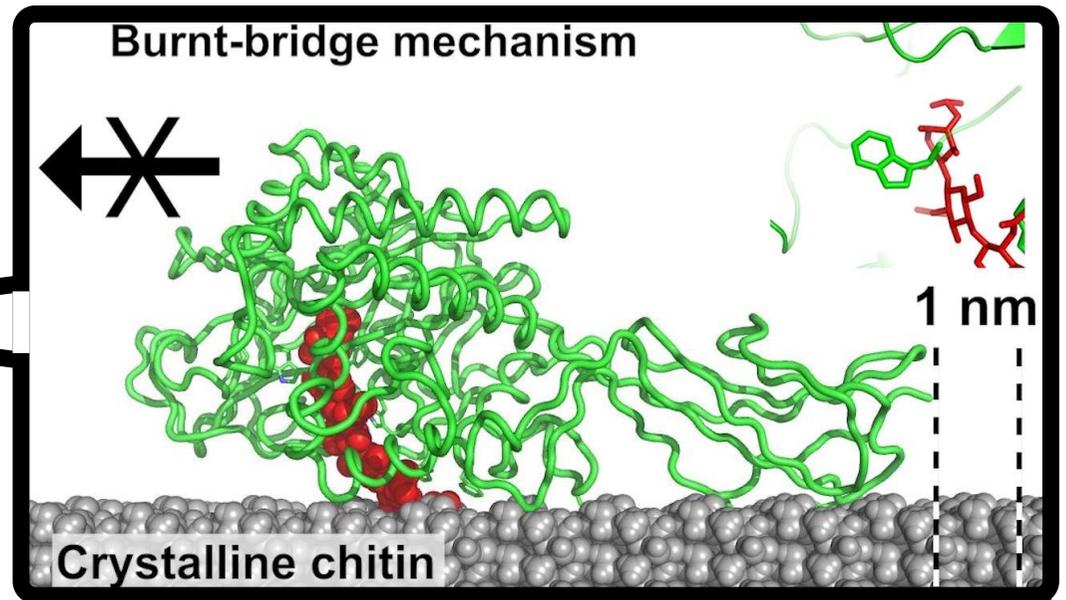
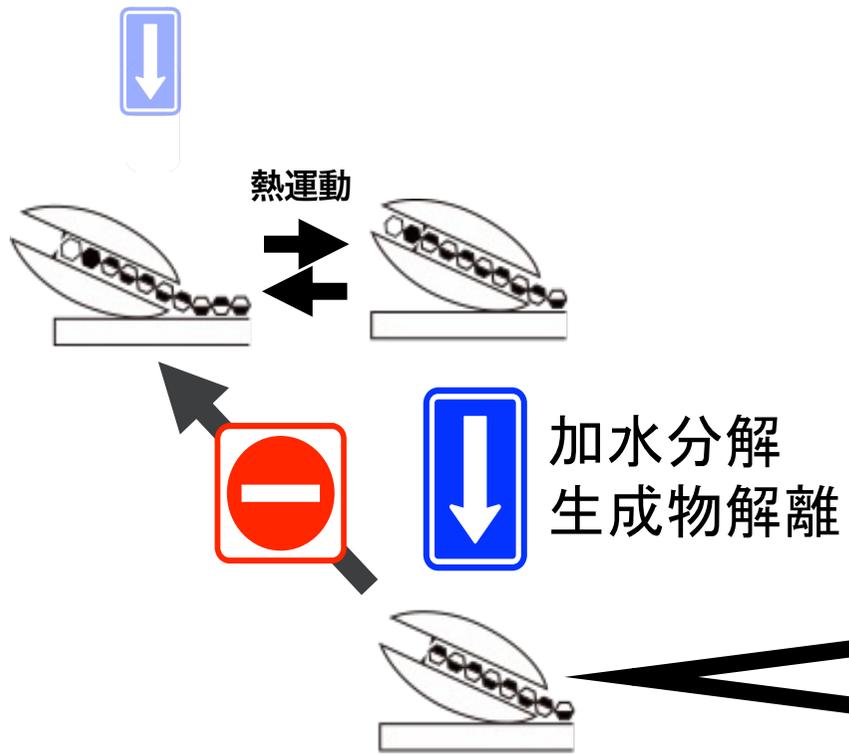
運動機構モデル



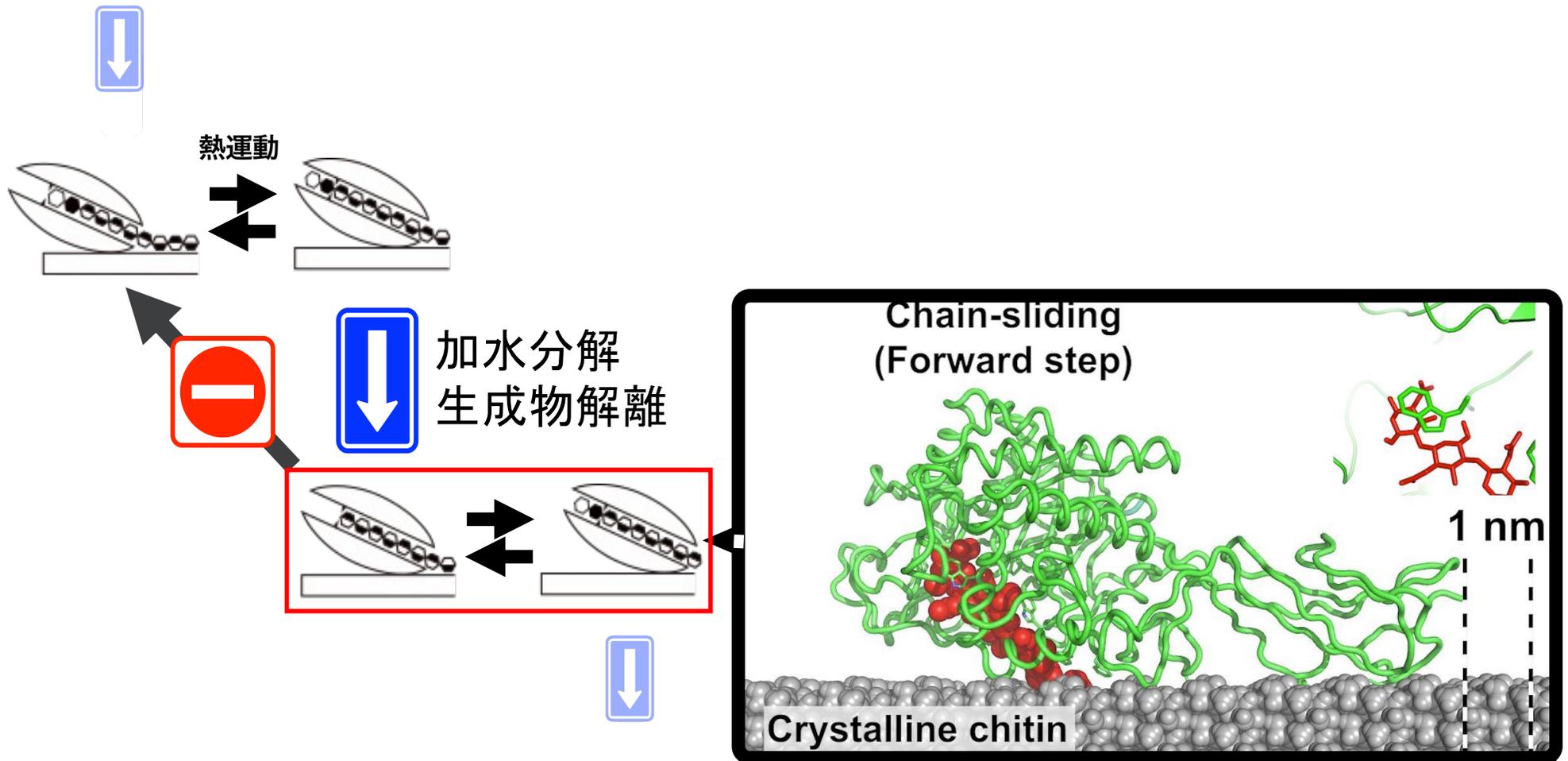
運動機構モデル



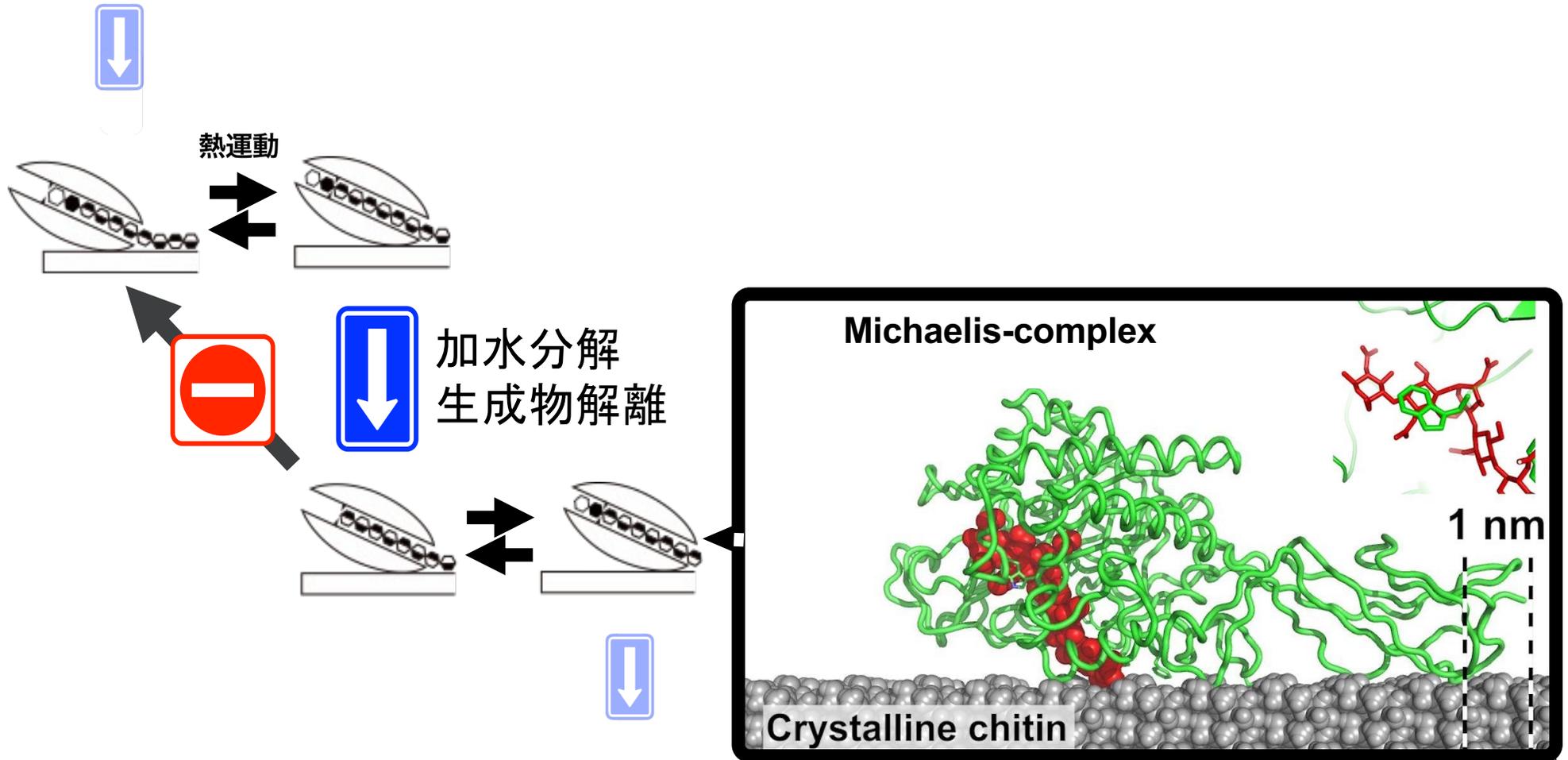
運動機構モデル



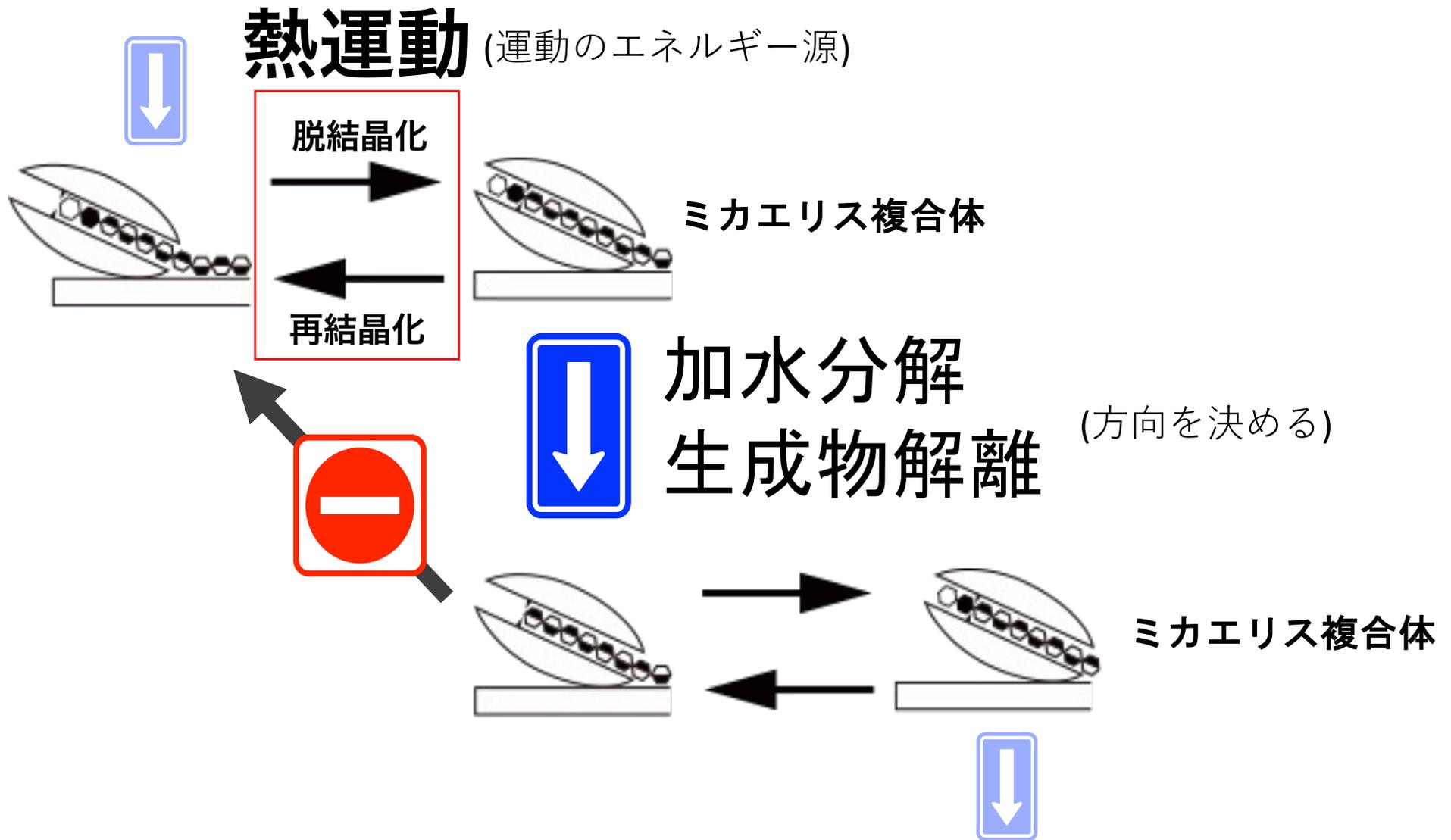
運動機構モデル



運動機構モデル

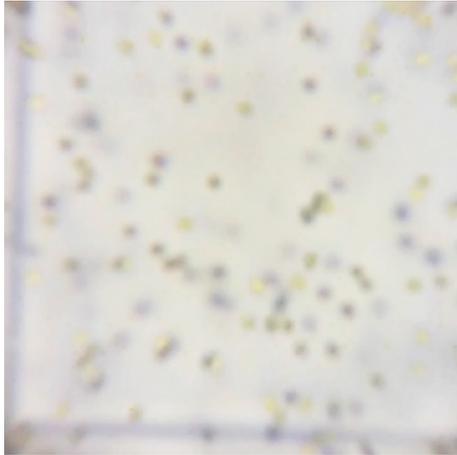


運動機構まとめ



SmChiAは”Burnt-bridge”ブラウニアンラチェット酵素

ナノの世界は忙しない



ポリスチレンビーズ
a = 500 nm, 25°C, 水中

例えば水中 25°Cだと

$$D = \frac{25 \times 10^{-20}}{a} \text{ (m}^2\text{/s)}$$



タンパク質を5 nmの球体とすると
1秒で10 μm動く計算できる

$$(x - x_0)^2 = \frac{2 R T}{N_A 6\pi\mu a} t = 2Dt$$

$(x - x_0)^2$: 初期位置からのずれの2乗 (m²)

R: 気体定数 (J K⁻¹ mol⁻¹)

T: 温度 (K)

N_A: アボガドロ定数 (mol⁻¹)

μ: 溶媒粘度 (mPa s)

a: 粒子半径 (m)

t: 時間 (s)

D: 拡散係数 (m²/s)

単位変換

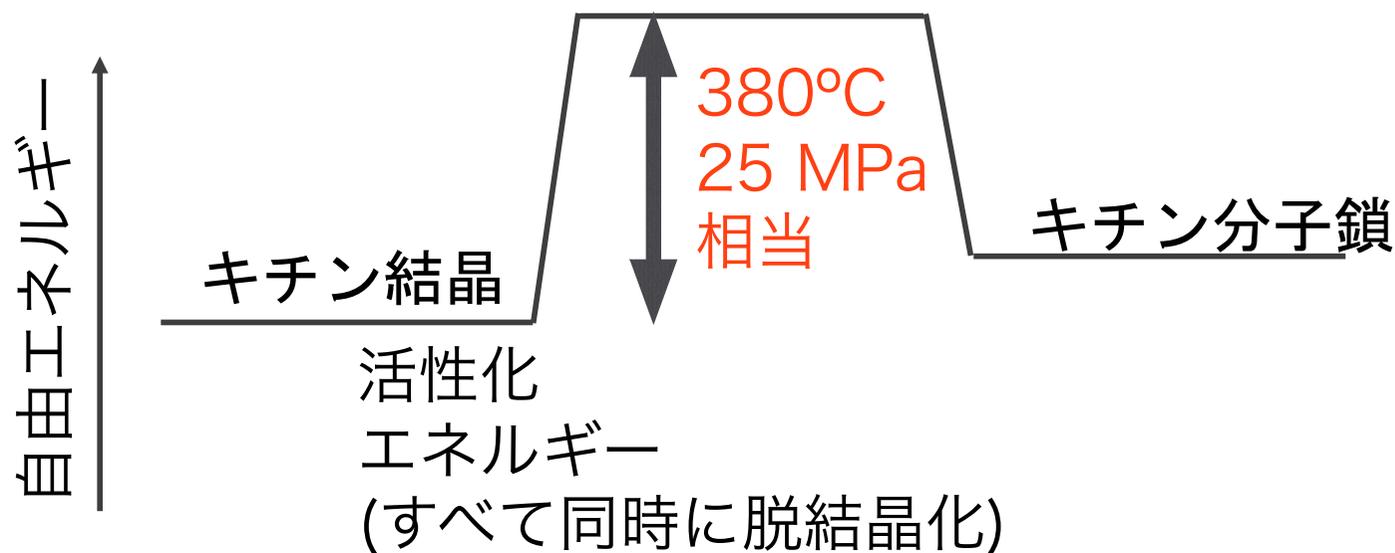
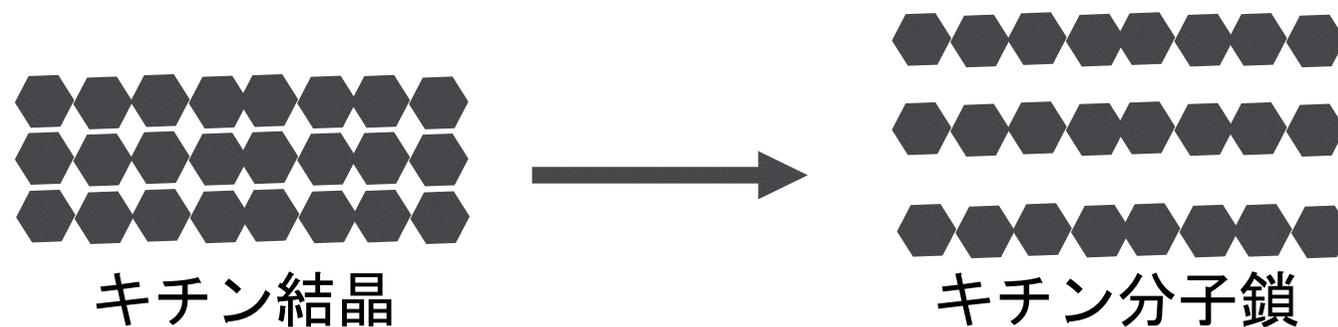
J = N m

mPa = mN m⁻²

つまり動くということは難しくないが、その方向を制御することが難しい世界

キチナーゼはエネルギーを使って向きの制御をし1方向に運動する

安定な結晶はどう壊しているのか？

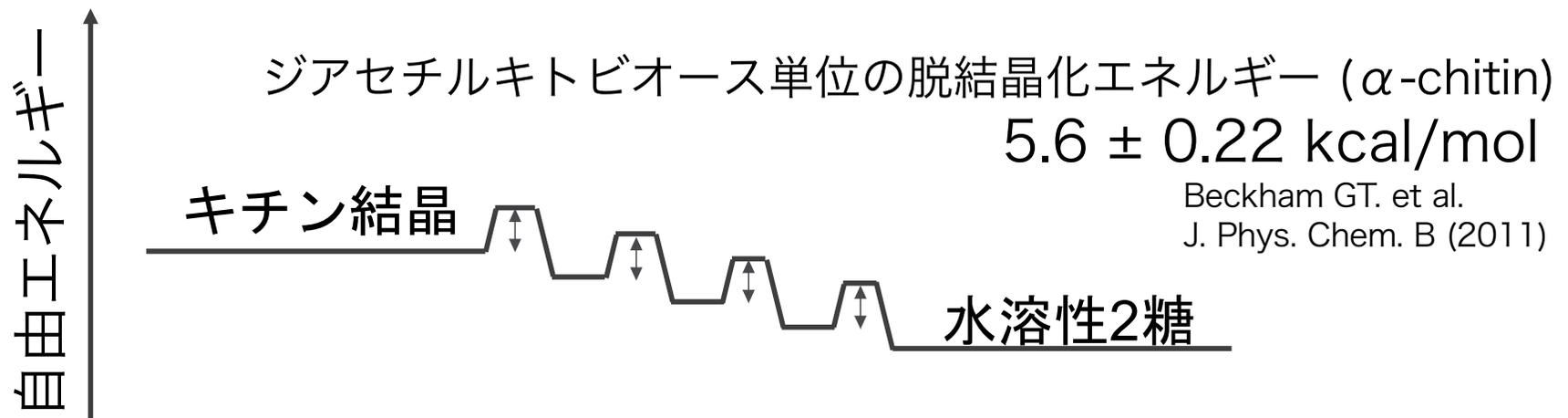


安定な結晶はどう壊しているのか？

キチナーゼは脱結晶化単位を制御している！



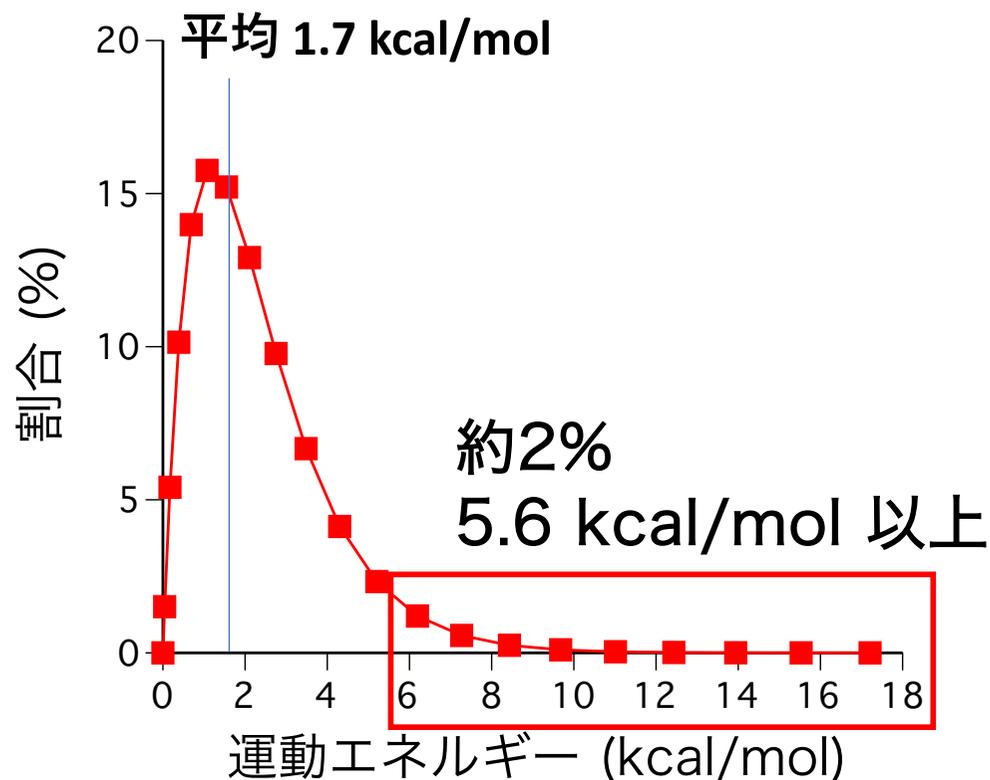
2糖(1 nm)単位で脱結晶化することにより
反応一回辺りの活性化エネルギーを低減



ナノの世界はメートルの世界と常識が違う

25°Cにおける水分子の運動エネルギー分布

(並進+回転, 簡略化のため相互作用なしと仮定)



因みに2 nm分だと

11.2 kcal/mol

0.02%以下

-> 2 nmは無理!!

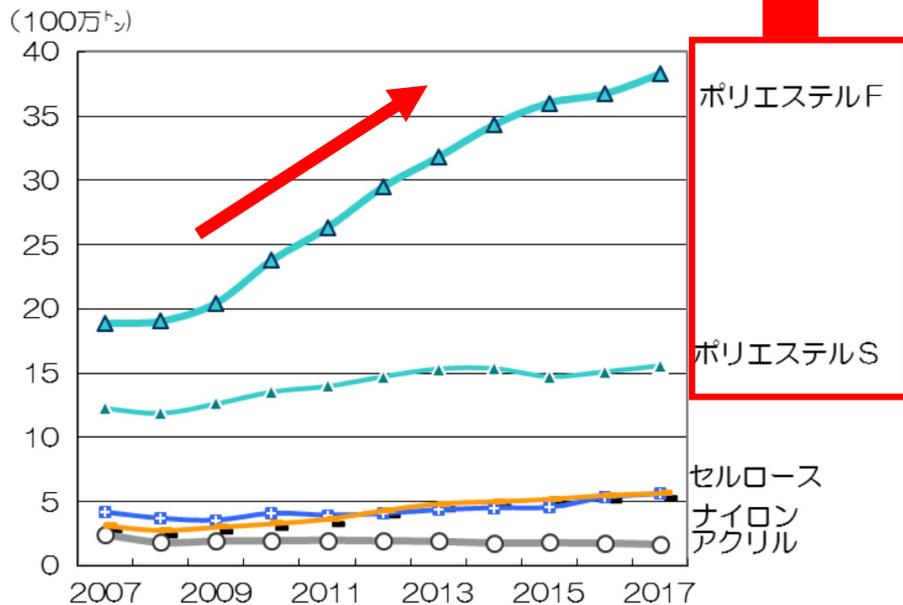
観測される2 nm運動は
アセチル基の欠落由来の
結晶の欠陥に起因する

平均では脱結晶化に十分ではないが、1nm分は反応可能!

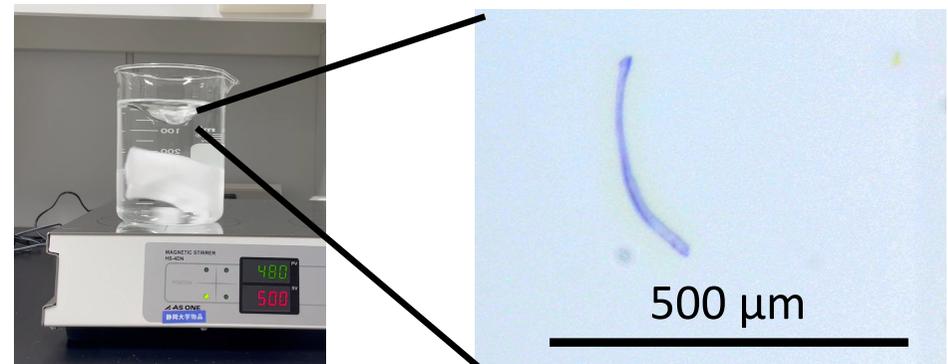
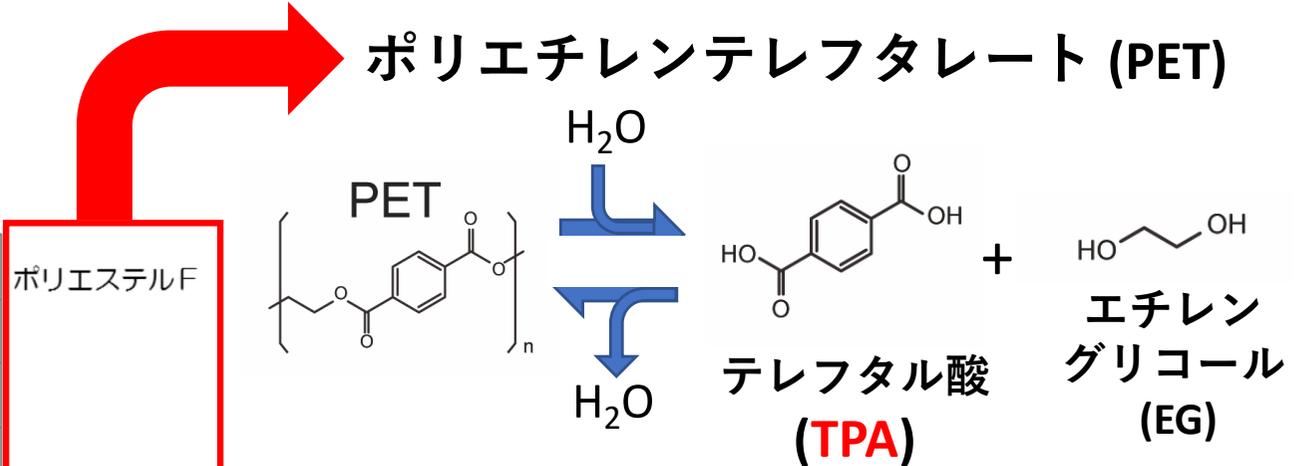
→室温でも反応可能

おまけ 私たちはプラスチックを纏っている

図-4 世界の主要化繊品種の生産推移



内外の化学繊維生産動向 - 2017年 -
(日本化学繊維協会)



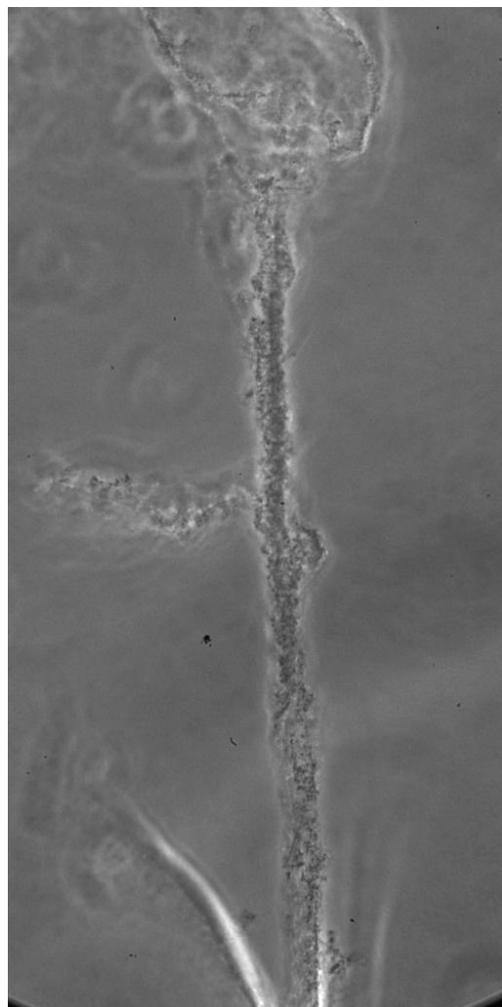
服1着の洗濯1回で約2000本生成する

Browne M.A. et al., *Environ. Sci. Technol.*, 45, 9175–9179 (2011)

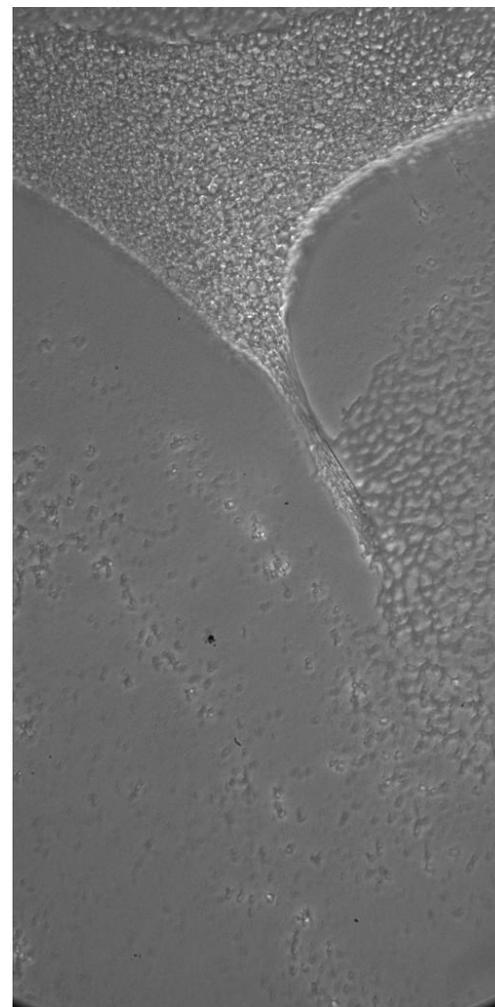
洗濯するだけで多量のプラスチックを排出している

プラスチックも酵素で壊れる

+1 μ M PETase



without PETase

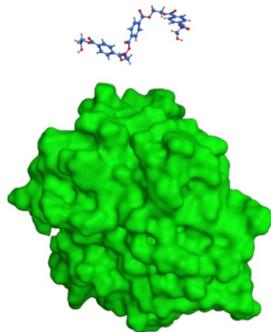


50 mM Na-phos pH 7.2 at 25 °C 0 min -> 7min

おまけ 酵素でプラスチックリサイクル

“酵素でペットボトルをリサイクル” PET分解酵素の産業応用に向けた共同研究を開始 ～環境負荷の低いリサイクルを促進する技術～

  2022/01/18  プレスリリース



▲「PET 2」と基質(PETの一部)の図

キリンホールディングス株式会社（社長 磯崎功典 以下キリン）のキリン中央研究所（所長 吉田有人）、国立大学法人静岡大学（学長 日詰一幸、以下静岡大学）および大学共同利用機関法人自然科学研究機構（機構長 小森彰夫、以下NINS）は、2022年1月より酵素によるPET※1リサイクル技術の確立に向けた共同研究を開始します。

※1 ポリエチレンテレフタレート

近年、プラスチックの問題が注視されている中、容器包装資源が循環する持続可能な仕組みを作っていくことは喫緊の課題で、解決策としてケミカルリサイクル技術への関心が高まっています。

ケミカルリサイクル技術とは、廃ペットボトルを選別、粉碎、洗浄して汚れや異物を取り除いた上で化学分解処理を行い、PETの中間原料まで分解、精製したものを再びPETに合成する方法です。最近では、“分解”の工程で酵素を用いる「酵素分解法」が注目されています。「酵素分解法」とは、耐熱性PET分解酵素を用いてPETをモノマー分子単位まで分解する方法で、より環境負荷を下げることができます。

目指すのは海で働くバイオマイクロロンバ*

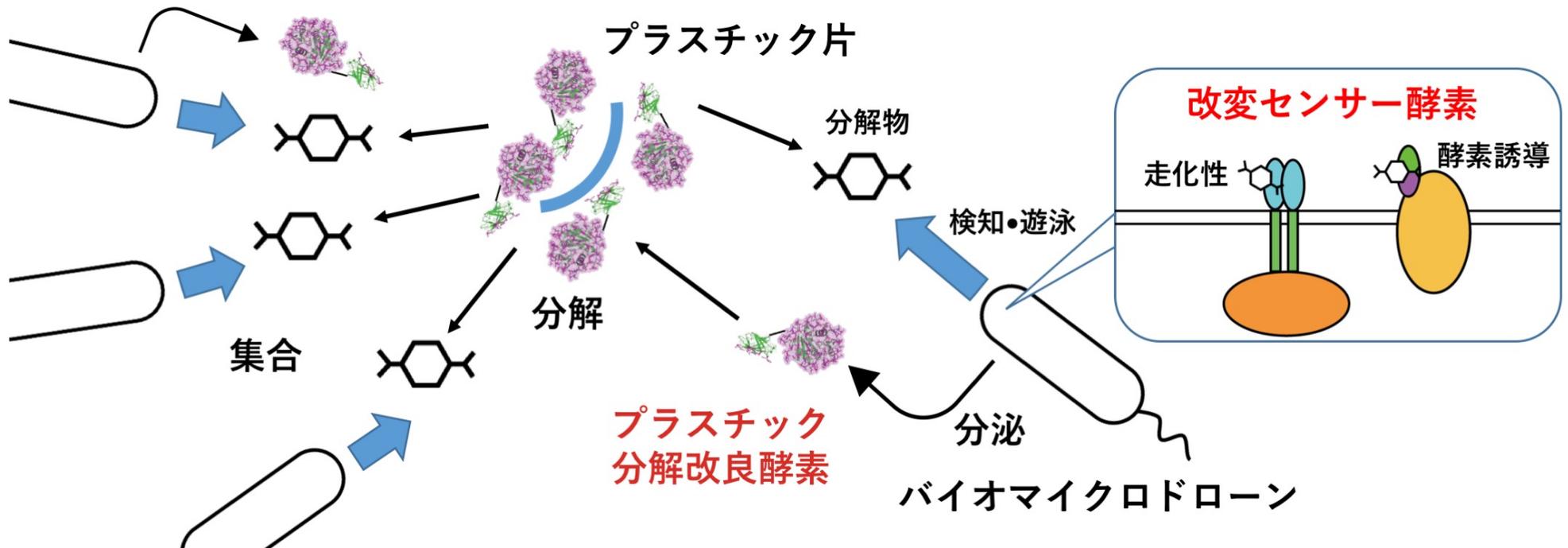


創発的研究支援事業

Fusion Oriented REsearch for disruptive Science and Technology

<研究概要>

マイクロプラスチックによる海洋汚染が深刻化していますが、そのサイズゆえ物理的に除去するコストが高く解決策がありません。一方で海洋中では微細甲殻類が生産する大量のキチンが分解代謝されています。そこで微生物のキチン探索分解システムのキチン分解酵素をプラスチック分解酵素に置き換え、またキチン分解物検出酵素をプラスチック分解物が結合するように改変することで自律的にプラスチック片を探索し、集まって分解する微生物を作成します。



*ロンバは、アイロボットの登録商標です。