

タンパク質のナノブロックを組み合わせて新規人工タンパク質複合体を創製 ～ナノテクノロジー・合成生物学研究等に役立つ新たな超分子ナノ構造複合体を創出～

信州大学 繊維学部応用生物科学科 新井亮一准教授（菌類・微生物ダイナミズム創発研究センター 部門長兼務）、小林直也博士（大学院総合工学系研究科博士課程修了、(現)自然科学研究機構 生命創成探究センター 研究員）らの共同研究グループは、独自の人工タンパク質を鎖状連結するタンパク質ナノブロック(ePN-Block)を新たに開発し、組み合わせて合体させることにより直鎖状複合体や超分子ナノ構造複合体を創り出すことに成功しました。本成果は、今後、ナノテクノロジーや合成生物学研究等への貢献が大いに期待できます。

<本研究成果のポイント>

- ・ 人工タンパク質 WA20 を鎖状連結させる新たなタンパク質ナノブロック(ePN-Block)を開発
- ・ 様々な測定解析により ePN-Block が自己組織的に様々な多量体構造を形成することを解明
- ・ 2種類のタンパク質ナノブロック(ePN-Block と sPN-Block)を組み合わせて合体させることにより、直鎖状複合体の構築に成功
- ・ さらに直鎖状複合体に金属イオンを添加することにより、タンパク質ナノブロックの超分子ナノ構造複合体を創出し、原子間力顕微鏡による観察に成功
- ・ タンパク質ナノブロック戦略は独自の分子技術としてナノテクノロジー、合成生物学研究などへの応用や、天然タンパク質では実現できないような構造や機能をもつ人工タンパク質の創製が期待

本研究成果は、米国化学会発行の学術雑誌 ACS Synthetic Biology の5月号(5月18日発刊)に掲載される予定であり、先行して同誌 Web サイトでオンライン公開されました。

<研究の内容>

タンパク質は、生体内において自己組織的にさまざまな複合体を形成し、複雑な生命現象を担っています。今後、これらのタンパク質複合体を自在にデザインし、望みの機能を実現することができるようになれば、バイオ医薬品開発や、環境負荷の少ない化学反応、さらにはナノバイオテクノロジー^{*1}等へ応用が期待され、人類の豊かな生活のために大きく貢献できると考えられます。

そこで、独自のタンパク質ナノブロック^{*2}戦略による人工タンパク質のデザイン開発に取り組み、目に見えないナノメートル(1ミリメートルの100万分の1)スケールの極めて微小な世界で、いわば、おもちゃのブロック遊びや超合金合体ロボのように、組み立て・合体・変形することを目指して、多様な人工タンパク質超分子複合体の創出に挑戦してきました。

大型のタンパク質を自在に設計構築するためには、まずブロックとなる小さなタンパク質を作り、それらを組み合わせて合体させ、望みのタンパク質複合体を組み立てていく方法が有力であると考えられます。私たちはタンパク質を組み上げるためのパーツとなる比較的小さな独自の人工タンパク質 WA20^{*}

³のクロスリンク型二量体の特徴的構造 (図 1) [[参考情報: WA20 立体構造解明プレスリリース](#)]を活かしたタンパク質ナノブロックの設計開発を行ってきました。これまでもこれらのパーツを組み合わせたタンパク質ナノブロックを開発し、多様な超分子ナノ構造複合体^{*4}を創出してきました (Kobayashi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11285–11293) [[参考情報: 人工タンパク質ナノブロックプレスリリース](#)]

そこで、本研究では、独自の人工タンパク質 WA20 を直列に連結したタンパク質ナノブロック **extender Protein Nanobuilding Blocks (ePN-Block)** を新たに設計開発し、タンパク質ナノブロックを組み合わせて鎖状に合体させることにより新たなナノ構造複合体を構築することを目指しました。この新規人工タンパク質 **ePN-Block** を大腸菌により発現調製し、小角 X 線散乱^{*5}や多角度光散乱^{*6}、電子顕微鏡観察等、様々な実験解析を行ったところ、**ePN-Block** が自ら集合して高次構造を作り、多様な多量体構造を形成することがわかりました。次に、WA20 (**stopper Protein Nanobuilding Blocks: sPN-Block**) と混合して、2 種類のタンパク質ナノブロック (**ePN-Block** と **sPN-Block**) の組み合わせ合体を試みたところ、異種複合体 (**esPN-Block**) の構築に成功し、直鎖状構造へダイナミックに変形することが示唆されました (図 2)。さらに、この直鎖状複合体 (**esPN-Block**) に金属イオンを添加したところ、これらが集合して自己組織的に超分子ナノ構造複合体を形成し、ナノスケール構造を原子間力顕微鏡^{*7}で観察することにも成功しました (図 3)。これらの結果は、これまで制御することが難しかったタンパク質ナノブロックの組み合わせ・合体・変形を思うように実現することへ向けた第一歩であり、今後の発展が期待できます。

本研究成果によるタンパク質ナノブロック戦略は、今後、日本発の独自の先進的分子技術^{*8}の一環として、ナノテクノロジー^{*1}や合成生物学^{*9}研究等のさらなる発展につながることを期待されます。これらを自在に組み合わせることで、天然タンパク質では実現できないような多様な構造や機能を持つ人工タンパク質ナノ構造複合体のデザインや創製につながると考えられます。将来的には、例えば、タンパク質ナノブロックの自己組織化^{*10} 技術を活かして、ナノバイオプロセス^{*11} やナノバイオマテリアル開発、次世代医薬品のためのドラッグデリバリーシステム、人工ワクチン開発等への応用も期待されます。

本研究は、信州大学繊維学部応用生物科学科 新井亮一准教授 (菌類・微生物ダイナミズム創発研究センター 部門長兼務)、小林直也博士 (大学院総合工学系研究科博士課程修了生、(現) 自然科学研究機構生命創成探究センター 研究員) を中心とし、信州大学繊維学部化学・材料学科 佐藤高彰准教授、大学院理工学系研究科修士課程修了生 稲野紘一氏、総合理工学研究科修士課程学生 笹原健嗣氏、金沢大学自然科学研究科 福間剛士教授、宮澤佳甫氏、米国のプリンストン大学化学科 Michael H Hecht 教授、自然科学研究機構生理学研究所 村田和義准教授、宋致弘博士らとの国際共同研究の成果です。

本研究成果は、米国化学会発行の合成生物学分野の代表的な国際学術雑誌 *ACS Synthetic Biology* の 5 月号 (または 6 月号) に掲載されるのに先立ち、同誌 Web サイトにてオンライン公開されました。

<発表論文情報>

【著者】Naoya Kobayashi, Kouichi Inano, Kenji Sasahara, Takaaki Sato, Keisuke Miyazawa, Takeshi Fukuma, Michael H Hecht, Chihong Song, Kazuyoshi Murata, and Ryoichi Arai*

(*Corresponding Author)

【論文タイトル】“Self-assembling supramolecular nanostructures constructed from *de novo* extender protein nanobuilding blocks”

【掲載誌情報】*ACS Synthetic Biology*, **7**, 1381–1394 (2018). DOI: 10.1021/acssynbio.8b00007

掲載論文 Web サイトの URL : <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acssynbio.8b00007>

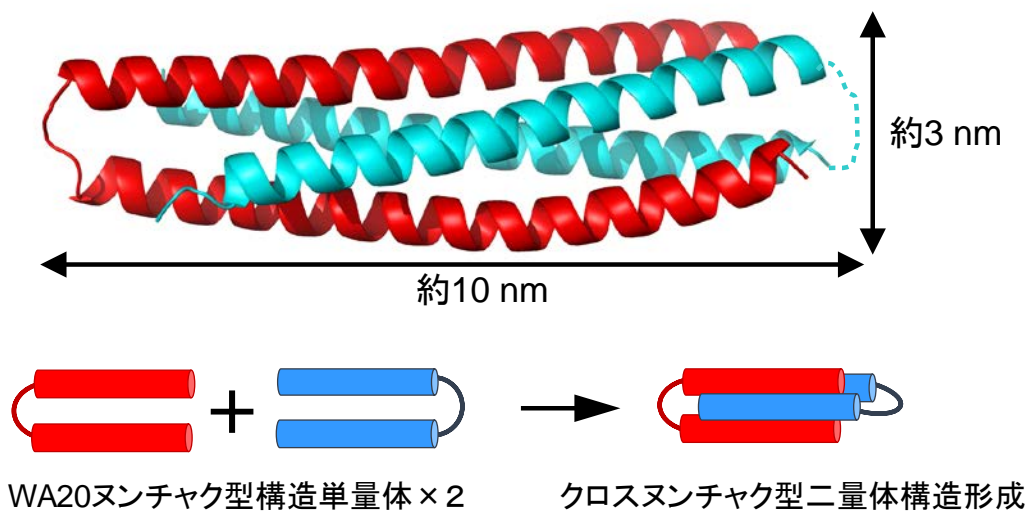


図1 人工タンパク質 WA20 のユニークなクロスヌンチャク型二量体構造

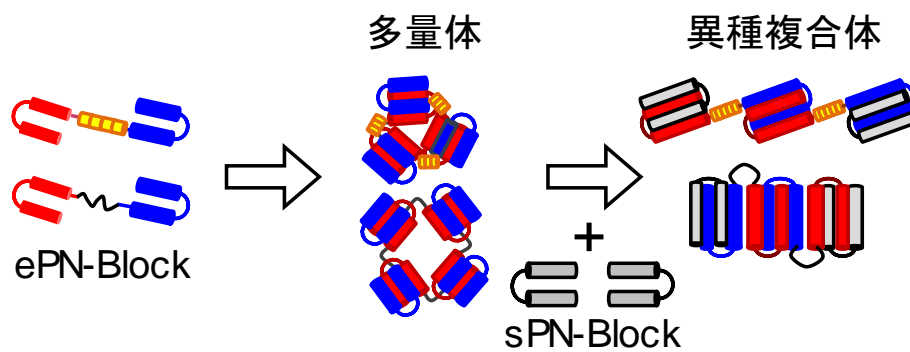


図2 タンパク質ナノブロック(PN-Blocks)の多量体及び異種複合体形成(組み合わせ・合体・変形)

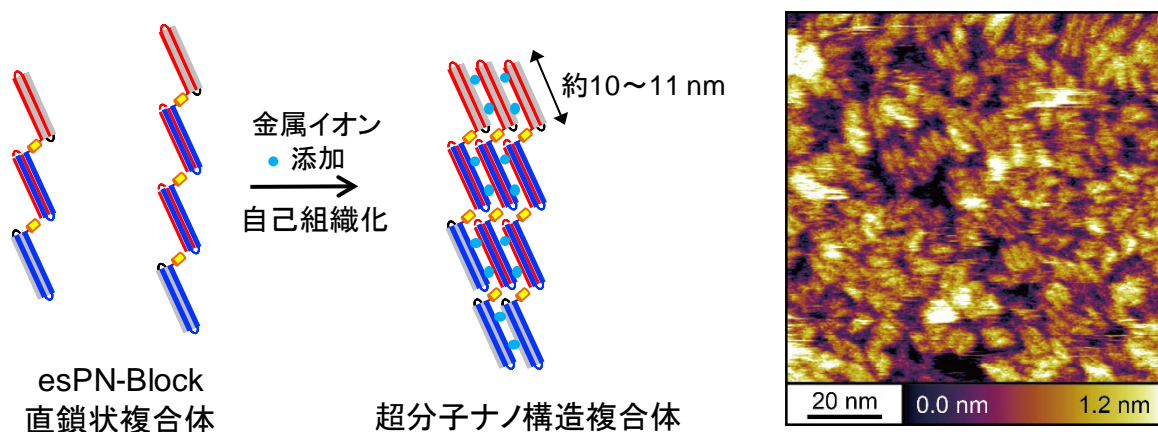


図3 タンパク質ナノブロックによる超分子ナノ構造複合体の創出及び原子間力顕微鏡写真

(米国化学会より許諾を得て、上述の *ACS Synthetic Biology* 掲載論文より図を改変して転載
© 2018 American Chemical Society)

<謝辞>

本研究における多角度光散乱実験は、分子科学研究所において、古賀信康准教授、小杉貴洋助教、古賀理恵博士の御協力のもとに行われました。小角 X 線散乱実験は、高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設の清水伸隆准教授、五十嵐教之准教授をはじめスタッフの皆様の御協力のもとに行われました。また、信州大学 林田信明教授や産業技術総合研究所 本田真也博士をはじめ多くの先生方に御指導や御助言を頂きました。心より感謝申し上げます。

本研究は、新学術領域「動的秩序と機能」公募研究等の JSPS 科研費 (JP16H00761, JP16K05841, JP16H06837, JP14J10185, JP24780097, JP24113707, JP22113508) や日本学術振興会特別研究員制度(DC2)、及び分子科学研究所協力研究等の助成・支援を受けて行われました。また、本研究の小角 X 線散乱実験は高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設(Photon Factory)共同利用実験(No. 2014G111, 2016G153, 2016G606; PF 小角散乱ビームライン BL-10C)として行われました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

<問い合わせ先>

【責任著者】

信州大学 繊維学部応用生物科学科 准教授

新井 亮一

〒386-8567 長野県上田市常田 3-15-1

TEL&FAX: 0268-21-5881

E-mail: rarai@shinshu-u.ac.jp

研究室 HP: <http://fiber.shinshu-u.ac.jp/arai/index.html>

信州大学 菌類・微生物ダイナミズム創発研究センター(CFMD)

超分子複合体部門 部門長 (兼務)

センターHP: <http://www.shinshu-u.ac.jp/institution/cfmd/index.html>

<用語解説>

※1 ナノテクノロジー、ナノバイオテクノロジー

ナノテクノロジーとは、ナノメートル（1 nm は 1 mm の 100 万分の 1）の領域、すなわち原子や分子のスケールにおいて、物質を自在に制御する技術のことである。そのようなナノスケールでの新素材開発や、ナノスケールのデバイスを開発するための技術等がすべて含まれる。また、タンパク質や核酸等も、ナノスケールの機能性生体分子である。ナノバイオテクノロジーとは、ナノテクノロジーとバイオテクノロジーが融合した技術領域である。幅約 2 nm の DNA・RNA 分子や、大きさがおおよそ数 nm～数十 nm 程度のタンパク質分子などの生体分子（バイオ分子）は、生命現象を担うナノマシン・ナノマテリアルと考えられる。ナノバイオ分子は精巧な認識能力、均質性、自己組織化などの特徴を示し、このようなナノマシン・ナノマテリアルは、現在の工学技術では製造不可能であり、ナノバイオテクノロジーは新しい技術分野となりうる。病気の診断や治療などの医療分野、環境汚染モニタリングなどの環境分野、化学・電子材料分野などで盛んに研究が進められている。

※2 タンパク質ナノブロック(Protein Nanobuilding Block: PN-Block)

タンパク質ナノブロックとは、本研究で開発した人工タンパク質(protein)によるナノ(nano)スケールのブロック(building block)のことで、英語(Protein Nanobuilding Block)の頭文字を取って、PN-Block の略称で呼ぶ。PN-Block 戦略とは、おもちゃのブロック遊びのように、少ない種類のシンプルで基本的なブロック(PN-Block)を開発して自己組織的に組み合わせることにより、多種多様な自己組織化ナノ構造を創り上げる革新的なナノテクノロジー分子技術戦略である。タンパク質ナノブロック(PN-Block)では、WA20 のような安定でシンプルな円筒状概形の分子間フォールディング（ドメインスワップ）型二量体構造を構成要素としていることにより、ナノ構造のデザインや構築が比較的容易であること、さらに、バイナリーパターン法を用いて、さらなる再設計・改良が比較的容易であることなどが特徴として挙げられる。（参考 HP：人工タンパク質ナノブロックプレスリリース <http://www.shinshu-u.ac.jp/institution/iccer/topics/iccer/post-21.html>）

※3 新規人工タンパク質 WA20

新規人工タンパク質 WA20 とは、天然タンパク質のアミノ酸配列をもとにしないで、新規にアミノ酸配列をデザインした人工タンパク質の一つである。タンパク質の目的構造に応じて、親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸の 2 種類の繰り返し配列パターンを半合理的にデザインするバイナリーパターン法により設計開発された。以前の新井研究室を中心とした立体構造解析により、“クロスヌンチャク型”二量体構造（図 1）とも呼ばれる新奇な分子間フォールディング 4 本ヘリックスバンドルバンドル二量体構造^{#補足1}を形成することを解明した（Arai, R., et al., *J. Phys. Chem. B*, 116, 6789–6797, 2012）。このユニークな円筒状二量体の構造的特徴は、タンパク質ナノブロックを構成するパーツとして好適である（参考 HP：WA20 立体構造解明プレスリリース <http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/textiles/news/2012/03/46854.html>）

#補足1 分子間フォールディング 4 本ヘリックスバンドルバンドル二量体構造

分子間フォールディングとは、複数のタンパク質分子どうしが、分子間で相互作用しながら絡み合うように折りたたんで（フォールディングして）会合体構造を形成することを表している。分子間フォールディング型 4 本ヘリックスバンドル二量体構造とは、図 1 の WA20 の立体構造のように、2 本の長い α ヘリックス^{#補足2}が連結したヌンチャク型の WA20 分子 2 つが、お互いに挟みこむように絡み合いながら組み合わせることで、全体として 4 本の α ヘリックスを束ねた（バンドル）形状の二量体（2 つの分子が組み合わせあって形成される複合体）の立体構造を表現している。

#補足2 α ヘリックス

α ヘリックス構造は、タンパク質の立体構造を構成する基本的な共通骨格構造である 2 次構造の 1 つで、バネに似たような右巻きらせん形状をしている。骨格となるアミノ酸のアミノ基は 4 残基離れたカルボニル基と水素結合を形成し、構造を安定化している。

※4 超分子ナノ構造複合体

超分子とは、複数の分子が共有結合以外の結合（配位結合、水素結合など）や比較的弱い相互作用により秩序だって集合した化合物・単体のことである。クラウンエーテル、シクロデキストリンなど、分子間相互作用によって分子やイオンを内包する「ホストゲスト」化合物や、近年では、複数ユニットから構成されるタンパク質複合体や自己組織化膜、液晶なども超分子に含まれる。

超分子ナノ構造複合体とは、上記のような超分子により作製したナノスケールの構造をもつ複合体である。たとえば、タンパク質サブユニットを組み合わせ会合させて作製したナノスケールのタンパク質複合体も超分子の一種であり、超分子ナノ構造複合体の代表例の一つと考えられる。

※5 小角 X 線散乱法

X線を溶液状態の物質に照射して散乱されるX線のうち、散乱角が小さいもの(約 10° 以下)を測定することにより 1~100 nm スケールの微細構造に関する情報を得る手法である。溶液中のタンパク質の概形構造や分子量を解析する目的等によく利用される。

※6 多角度光散乱法

高分子溶液に光を照射するとその光と同じ波長で散乱(レイリー散乱)を生じ、その散乱の強さ(散乱強度)はその分子の分子量や分子サイズに関係している。そこで、多角度光散乱 (Multi-Angle Light Scattering: MALS)検出器を用いて複数の角度で光散乱を測定し、それらの関係式から、分子量標準サンプルを用いることなく高分子試料の絶対分子量及び分子サイズを測定する方法である。特に、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)システムに接続して、タンパク質等の生体高分子の絶対分子量及び分子サイズ分布、会合状態等を迅速かつ正確に測定することが可能である。

※7 原子間力顕微鏡

原子間力顕微鏡は、走査型プローブ顕微鏡の一種で、試料と探針の原子間にはたらく力を検出して画像を得る装置である。原子間力はあらゆる物質の間に働くため、絶縁性試料の測定も可能であり、導電性コーティングなどの前処理や装置内の真空を必要とする事もない。このため、大気中や液体中、または高温~低温など様々な環境で、生体試料などを自然に近い状態で測定できる。他の走査型プローブ顕微鏡と同様に空間分解能は探針の先端半径 (nm 程度) に依存し、現在では、ナノメートル(nm)レベルから原子レベルの分解能が実現されている。

※8 分子技術

「分子技術」とは、物理学、化学、生物学、数学等の科学的知見を基に、分子を設計、合成、操作、制御、集積することによって、分子の特性を活かして目的とする機能を創出し、応用に供するための一連の技術である。文部科学省において、平成 24 年度の戦略的創造研究推進事業の戦略目標として「環境・エネルギー材料や電子材料、健康・医療用材料に革新をもたらす分子の自在設計『分子技術』の構築」が定められた。蓄電デバイス、有機薄膜太陽電池等の分子を用いた超低消費電力・超軽量デバイスの実現や、ドラッグデリバリーシステム、機能性医療材料などの革新的な治療方法の確立等の基盤技術となる以下の「分子技術」体系を構築することを目指している。

(参考 HP (文部科学省) : http://www.mext.go.jp/b_menu/houdou/24/02/attach/1316324.htm)

※9 合成生物学

合成生物学とは、新しい遺伝子やタンパク質等の生体分子、細胞・代謝系等の生体機能システムなどを人工的に創ることに挑戦することで生命機能の理解を深めるアプローチを主流とする比較的新しい研究分野である。生物学のみならず化学や工学分野からの複合的な領域横断的なアプローチで、近年、先端的研究が展開されている。多くの生命機能を担う機能性生体分子であるタンパク質を人工的にデザイン・創製する研究を含むタンパク質工学分野も合成生物学研究の一端を担っている。

※10 自己組織化

自己組織化とは、自律的・自発的に秩序を持つ構造を作り出す現象のことである。タンパク質複合体における自律的・自発的な集合・構造形成も自己組織化の一種である。

※11 バイオナノプロセス

バイオナノプロセスとは、タンパク質をはじめとするバイオ分子によってナノ構造を作製するプロセスのことである。従来の半導体加工技術のトップダウン的技術では、ナノスケール微細加工の限界が近く、装置が高価等の問題もある。そこで、ボトムアップ的技術の開発が求められており、特に、タンパク質による自己組織化ナノ構造をテンプレートとして、バイオミネラリゼーションを組み合わせることにより、水溶液中で有機無機ハイブリッドナノ材料等を比較的簡単に作製するバイオナノプロセスの研究開発が進められている。この手法では、極めて小さなナノ構造ができるだけでなく、これまでに無い量子効果などの可能性もあり、次世代半導体デバイス開発技術として期待されている。（参考書籍：「バイオナノプロセス」溶液中でナノ構造を作る ウェット・ナノテクノロジーの薦め（山下一郎、芝清隆監修、シーエムシー出版））