

令和元年6月18日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14494

研究課題名（和文）タンパク質を材料とした革新的繊維素材開発のための技術基盤の構築

研究課題名（英文）Establishment of an innovative technology to develop artificial protein fibers

研究代表者

赤沼 哲史（Akanuma, Satoshi）

早稲田大学・人間科学学術院・准教授

研究者番号：10321720

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質は優れた分子認識、環境変化に対する鋭敏な応答、アミノ酸への分解によって容易にリサイクルできる環境負荷の低さ、化学合成が必要なペプチドや有機化合物と異なり、様々な種類のタンパク質が、同一の異種発現系を用いて大量合成できる等、素材として大きな魅力を持つ。本研究では、本来は繊維化しない2種類のタンパク質間に特異的結合面を作製し、2種類のタンパク質が交互に繰り返した、触媒機能を有する人工タンパク質繊維を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、本来は繊維化しない天然の球状タンパク質の表面を遺伝子工学的に改変し、材料とするタンパク質が持つ機能が集積した繊維を開発する技術基盤を確立した。本研究で確立した技術を適用することによって、多くの有用な機能を持つタンパク質を、あるいは、目的の性質を持つようあらかじめ改変したタンパク質を人工的に重合化することが可能となり、新たな機能性タンパク質繊維を人工的に構築できる可能性が高まった。したがって、本研究の成果が産業界へもたらす波及効果は大きいはずである。

研究成果の概要（英文）：Proteins have superior characteristics including strict molecular recognition, high sensitivity to change in environment, environmentally friendliness and simplicity of mass production. Therefore, proteins are considered as attractive materials. In this study, we created specific binding surfaces on the surfaces of two proteins so that the proteins would co-polymerize to form fibrous nanostructures. Eventually, we created artificial protein nano-fibers that showed the catalytic activity.

研究分野：生体触媒工学

キーワード：人工タンパク質繊維 金属含有繊維 触媒繊維 タンパク質間相互作用 アミノ酸置換 原子間力顕微鏡 電子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は無機素材を圧倒する機能・性質を持ち、次世代の機能性素材として期待度が高い。実際、「コラーゲン」、「クモの糸」等、天然の繊維形成タンパク質の産業化を推進するための研究が盛んにおこなわれている。天然のタンパク質繊維に加えて、本来は繊維化しないタンパク質を人工的に繊維化する技術を確立することができれば、タンパク質繊維の用途拡大を全面的に推進できるはずである。研究開始当初以前にも、30 残基以下のペプチドを材料としたアミロイド繊維やコイルドコイル繊維の作製が他グループから報告されていた^{1,2}。しかし、このようなペプチドの重合体は、繊維構造を形成はするが、特別な機能を持たない場合が多い。繊維形成ペプチドにリンカーを介して機能性タンパク質を融合させた例や、DNA 結合タンパク質を、DNA を介して繊維化させた例も他グループから報告されていたが³、本来は繊維化しないタンパク質を直接繊維化するように改変することは未だ困難であった。

繊維形成の基本要素はユニット間の特異的結合である。我々は、人工コイルドコイルタンパク質の合成に使われていたアイデアをユニット間結合に応用し、タンパク質重合化繊維を開発するための研究を開始した。すなわち、超好熱菌由来鉄貯蔵タンパク質であるスレリスリンタンパク質の両端に、複数の疎水性アミノ酸を導入することで疎水性パッチを作り、周りに負電荷アミノ酸を配置したスレリスリン改変体を作製した。さらに、研究代表者らが過去の研究で人工合成した4ヘリックスバンドルタンパク質であるLARFHタンパク質の両端に疎水性パッチを作り、周りに正電荷アミノ酸を配したLARFH改変体も合成した。両改変体を混合し、原子間力顕微鏡で観察したところ、短く、分岐も生じているが、繊維構造が観察できていた⁴。

2. 研究の目的

以上の観察から、本来は繊維を形成しないタンパク質の表面を遺伝子工学的に改変したことで、人工タンパク質繊維を構築するための足がかりが得られたことが分かった。そこで、研究期間内には、より実用的なタンパク質繊維を開発するための技術基盤を構築することを、本研究の当初の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究開始当初の課題として、作製された人工タンパク質繊維に枝分かれが生じていたことが挙げられた。枝分かれの生成は、スレリスリン分子表面の正電荷アミノ酸による静電相互作用に起因すると推定されたため、このスレリスリンの正電荷アミノ酸を負電荷アミノ酸へと置換することで、繊維の枝分かれ構造の解消を試みた。

(2) スレリスリンとLARFHの表面に設計したタンパク質間結合面の最適化にも取り組んだ。スレリスリン改変体とLARFH改変体の結合面を最適化するためには、結合面の作製のために、スレリスリンとLARFHとにアミノ酸置換によって導入した疎水性残基の形状相補性を改善することが効果的であると考えた。そこで、LARFH改変体の結合面に導入した3つのロイシン残基を、他の疎水性アミノ酸であるメチオニン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニンに置換した変異体を網羅的に作製した(合計125種)。次いで、これらのLARFH変異体とスレリスリン改変体との結合親和性を評価した。

(3) 金属含有繊維の開発のため、既に得られていた、金・白金と結合するLARFH改変体の詳細な解析をおこなった。

(4) 開発した結合面は分子表面の α ヘリックスを足場とするため、他の表面に α ヘリックスを持つタンパク質に対しても適用できると期待できた。そこで、LARFHの表面に設計したのと同様の結合面を、ホモダイマータンパク質である3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(以下IPMDH)の表面にある α ヘリックス上に作製し、得られたIPMDH改変体がスレリスリン改変体と結合するか評価した。

(5) スレリスリン、IPMDH共にホモダイマータンパク質であるため、両者の間で高い結合力が生じた場合、両者を混合することによって長いタンパク質繊維が形成されると期待できた。そ

ここで、(4)で作製した改変体の結合面に、さらにそれぞれ一つずつシステイン残基を導入し、両者を混合した際に分子間ジスルフィド結合が形成されるようにした。実際に作製したスレリスリン、IPMDH 両改変体を精製した後に混合し、繊維形成を顕微鏡観察した。加えて、IPMDH 酵素活性を解析することで、触媒活性を有するタンパク質繊維の構築も検証した。

4. 研究成果

(1) スレリスリン分子表面の3つのリジン残基による非特異的な分子間相互作用が、LARFH—スレリスリン共重合繊維の枝分かれの原因だと推定された。この3つのリジン残基のうちの2つを負電荷アミノ酸であるグルタミン酸へと置換した改変体を作製し、結合面を分子両端にもつ LARFH 改変体と混合した後、原子間力顕微鏡を用いて観察した。その結果、枝分かれ構造が見られる頻度は有意に減少した。つまり、結合面を持つスレリスリン改変体どうしの非特異的相互作用を抑制することで、枝分かれが少ない繊維を作することに成功した。ただし、繊維長は短くなっているように観察された。

(2) 設計した結合面の最適化のために、LARFH 表面に導入した3つのロイシン残基を他の疎水性アミノ酸へと網羅的に置換し、125種類の LARFH 改変体を得た。次いで、それらの改変体とスレリスリン改変体との結合力を調べた。その結果、元の Leu-Leu-Leu の組み合わせよりも強くスレリスリン改変体と結合する疎水性残基の組み合わせを複数見出した。特に、Leu-Phe-Ile、Leu-Met-Val、Leu-Leu-Phe を含む結合面を持つ LARFH 改変体は、元の LARFH 改変体よりも、それぞれ 5.4 倍、4.7 倍、3.6 倍高い結合親和性を示した。すなわち、これらの LARFH 改変体は疎水性結合面の形状相補性を改善することで、スレリスリン改変体との結合力が強化されたのではないかと推定した。

(3) これまでに、LARFH タンパク質を構成する4本の α ヘリックスを連結する3つのループのうちのも N 末端側のループに含まれる Ser-Gly-Gln-Gly-Gly-Ser 配列を、ランダム配列から T7 ファージディスプレイ法によって選択した Tyr-Lys-Arg-Gly-Tyr-Lys (YKRGYK) 配列に置換した LARFH 改変体が白金結合能を獲得することを見出していた。そこで、YKRGYK 配列を持つ LARFH 改変体を精製し、白金との結合をフロー型水晶振動子マイクロバランス (F-QCM) 測定によって解析した。その結果、YKRGYK 配列を持つ LARFH 改変体の白金との解離定数は 10 nM であった。また、金との相互作用を F-QCM を用いて解析したところ、YKRGYK 配列を持つ LARFH 改変体は同様に金とも結合することが観察された。この改変体は、さらにニッケルイオンとも結合することを明らかにした。

(4) LARFH 上に設計した結合面と同様の結合面を、IPMDH の表面の α ヘリックス上に作製した。作製した 12 個の IPMDH 改変体のうちの3つの改変体が、スレリスリン改変体と結合することを見出した。さらに、そのうちの2つの改変体は、野生型 IPMDH と同程度の比活性を示し、触媒機能を維持していることが分かった。すなわち、LARFH タンパク質の α ヘリックス上に作製した結合面は、他の表面に α ヘリックスを持つタンパク質にも適用可能である可能性が示された。また、表面に結合面を作製した IPMDH 改変体が、酵素活性を保持していることも分かった。

(5) (4)で作製した IPMDH 改変体のうち、スレリスリン改変体と最も強く結合した改変体とスレリスリン改変体の疎水性結合面中に一つずつシステイン残基を導入した。作製したスレリスリン改変体と IPMDH 改変体を精製し混合したところ、両改変体間でジスルフィド結合形成が認められ、Native-PAGE の結

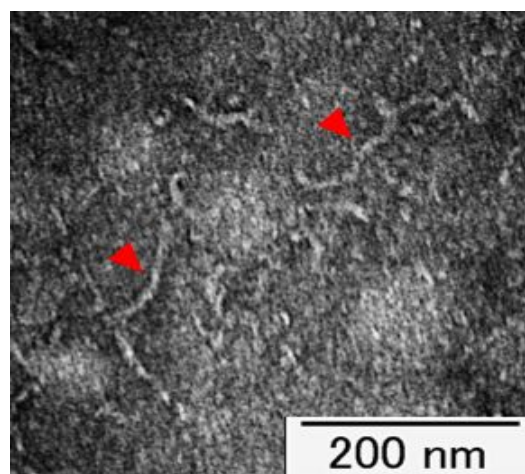


図1.スレリスリンと IPMDH からなる繊維の電子顕微鏡観察像。赤い矢印が繊維を示している。

果、巨大な複合体が生じていることが分かった。この IPMDH とスレリスリンの混合液を電子顕微鏡で観察したところ、直径が約 9 nm、最長で約 1 mm 程の繊維構造が認められた(図 1)。さらに、この混合液を用いて IPMDH 活性を測定したところ、酵素活性も保持されていることが分かった。つまり、IPMDH はスレリスリンと共繊維化してもその酵素活性は失わず、触媒機能を有するタンパク質繊維が開発できた。

以上の成果から、本来繊維とならないタンパク質を繊維化させる技術基盤および、繊維の枝分かれや繊維長の長さ等の問題点を克服する技術開発を達成した。さらに、触媒機能を有するタンパク質繊維の構築にも成功した。したがって、本研究の当初の研究目的である革新的繊維素材開発の技術基盤の確立は十分に達成できたと考えている。

<引用文献>

López *et al.*, De novo designed peptide-based amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16052-16057 (2002)

Dong *et al.*, Self-assembly of alpha-helical coiled coil nanofibers. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 13691-13695 (2008)

Mou *et al.*, Computational design of co-assembling protein-DNA nanowires. *Nature* 525, 230-233 (2015)

Yagi *et al.*, De novo design of protein-protein interactions through modification of inter-molecular helix-helix interface residues. *Biochim. Biophys. Acta* 1864, 479-487 (2016)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Yagi Sota, Akanuma Satoshi, Yamagishi Akihiko. Creation of artificial protein-protein interactions using α -helices as interfaces. *Biophys. Rev.* 10(2), 411 - 420 (2018) 査読有
DOI: 10.1007/s12551-017-0352-9

Yagi Sota, Akanuma Satoshi, Kaji Asumi, Niuro Hiroya, Akiyama Hayato, Uchida Tatsuya, Yamagishi Akihiko. Selection of a platinum-binding sequence in a loop of a four-helix bundle protein. *J. Biosci. Bioeng.* 125: 192 - 198 (2018) 査読有
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.09.006

[学会発表] (計 11 件)

八木創太, 新規人工タンパク質繊維の開発、アストロバイオロジーセンター・サテライト研究シンポジウム「深海底から宇宙へ、過去から未来へ、分子から社会へ」、2019

八木創太, 赤沼哲史, 山岸明彦, 人工タンパク質間相互作用の開発と新規人工タンパク質繊維の創出、東京薬科大学生命科学部創立 25 周年記念シンポジウム、2018

八木創太, 赤沼哲史, 山岸明彦, Testing the universality of an artificial protein-protein interface designed on an α -helix, 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) , 2017

八木創太, 赤沼哲史, 内田達也, 山岸明彦, 人工設計タンパク質間結合面の移植による新規タンパク質間相互作用の創出、第 55 回日本生物物理学会年会、2017

八木創太, 梶亜純, 新納寛也, 内田達也, 赤沼哲史, 山岸明彦, 4 ヘリックスバンドルタンパク質上への金属およびタンパク質間結合面の設計、第 39 回分子生物学会年会、2016

八木創太, 赤沼哲史, 山岸明彦, 新規タンパク質分子間結合面の創成と人工タンパク質繊維の作成、第 54 回日本生物物理学会年会、2016

八木創太, 梶亜純, 新納寛也, 内田達也, 赤沼哲史, 山岸明彦, 白金結合アミノ酸配列の創出と解析、第 89 回生化学会大会、2016

Sota Yagi, Satoshi Akanuma, Tatsuya Uchida, Akihiko Yamagishi, Construction of a Co-assembled Protein Fiber Composed of the Protein Derived from *Sulfolobus tokodaii* and the Artificial Thermostable Protein, *Extremophiles*2016, 2016

Sota Yagi, Satoshi Akanuma, Tatsuya Uchida, Akihiko Yamagishi, Creation of an artificial protein fiber by an easy-to-use designing of a protein-protein interaction, The 30th Annual Symposium of Protein Society, 2016

八木創太、梶亜純、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、バイオナノテクノロジー：タンパク質—タンパク質結合とタンパク質-金属結合の創成、第5回医薬工3大学包括連携推進シンポジウム、2016

八木創太、赤沼哲史、山岸明彦、簡便なタンパク質間相互作用設計法を利用した非アミロイド型タンパク質繊維の構築、第16回日本蛋白質科学会年会、2016

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：八木 創太

ローマ字氏名：Yagi Sota

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命機能科学研究センター

職名：研究員

研究者番号(8桁)：10779820

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。