

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17931

研究課題名(和文) タンパク質結晶への酵素固定化によるカスケード反応触媒の開発

研究課題名(英文) Development of cascade solid catalyst by immobilization of enzymes into protein crystals

研究代表者

安部 聡 (ABE, Satoshi)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：40508595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究により、昆虫細胞で形成される多角体結晶を用い、(1)多角体のアミノ酸残基の欠損により内部に大きな空間を有する多角体変異体を合成した。(2)外来タンパク質の取り込み制御により、正電荷を有するSfGFPが多角体内部に取り込まれやすいことがわかった。また、(3)リパーゼ内包多角体の合成が達成された。今後の課題として、カスケード反応を達成すべく、リパーゼとアルコールデヒドロゲナーゼを内包した結晶の合成とカスケード反応評価を進めていく。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have synthesized polyhedra mutant, which have a large pore in unit cell by deletion of amino acid residues. We found that positively charged SfGFP is largely encapsulated into Polyhedra crystals than negatively charged SfGFP. We have prepared polyhedra crystal including Lipase enzyme. In future, we will synthesize polyhedra crystals including two enzymes, lipase and alcohol dehydrogenase and investigate the cascade reaction.

研究分野：生体関連化学

キーワード：多角体 酵素

## 1. 研究開始当初の背景

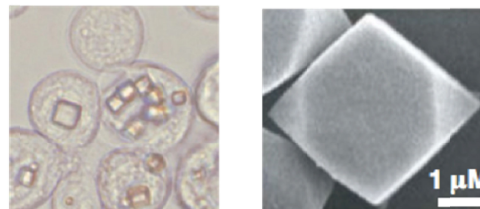
天然では、タンパク質や酵素が超分子複合体を形成し、高難度の物質変換や情報伝達を可能にしている。例えば、バクテリア内部で代謝反応を効率よく触媒するマイクロコンパートメントは、約 100nm の巨大なタンパク質集合体のシェル構造の内部に複数の酵素を内包し、カスケード反応を効率よく促進している。この反応システムの大きな特徴は、タンパク質シェル内で反応が進行するため、反応性や毒性の高い基質や中間生成物の外部への拡散が抑制される点にある。この反応システムにならい、近年、ウイルスケージやポリマーソームなどの高分子テンプレートに複数種類の酵素を内包したカスケード反応が報告されているものの、マイクロコンパートメントのような高効率な反応触媒の開発にはいたっていない。その理由は、複数の酵素を効率よく固定化する手法と安定保存を実現する担持材料の設計が困難なためである。

一方、我々は、これらの問題点が酵素を溶液中で扱っていることに起因すると考え、従来の手法とは全く異なる、タンパク質結晶を用いた酵素の固定化手法の開発を行ってきた。タンパク質結晶は、単量体が規則正しく集積した固体の集合体であり、溶液中のタンパク質と比較して、安定性が飛躍的に向上することが知られている。我々は、これまでにリゾチーム結晶内の一次元細孔チャネルを利用し、金属錯体の集積による不斉触媒の創成 (*Chem. Asian J.* 2014)、細孔空間での磁性金属微粒子の合成に成功してきた (*Small* 2012)。これらの研究成果からタンパク質結晶が反応活性中心の安定化、反応基質の選択的輸送、物質変換場として極めて有用な反応空間を提供することを見出した。しかしながら、タンパク質結晶の固体材料としての安定性や調整の煩雑さは依然として課題であり、タンパク質結晶を用いた新しい材料化学を切り開くことは困難である。そこで、本研究では、細胞内で結晶を形成する「多角体」タンパク質結晶に着目し (図 1) 細胞内で複数の酵素を結晶内部へ固定化することによりカスケード反応を促進する固体触媒を創

成する。

多角体は、昆虫ウイルスの一種である細胞質多角体病ウイルスが感染した細胞内で産出するタンパク質の結晶で、結晶化する際に自発的な内包によりウイルスの長期保存を可能とする。多角体は極めて高い安定性を有し、熱や幅広い pH(2-9)、乾燥に対して結晶性を保つため、様々な酵素やタンパク質の固定化、安定保存に有用である。これまで多角体結晶と高い親和性をもつタグペプチドを組み込んだ酵素を同じ細胞内で合成することにより酵素内包結晶を構築した。さらに、酵素の活性を維持したままの長期保存と結晶溶解による酵素の放出、活性化に成功した (*Adv. Mater.* 2015)。そこで、多角体に複数酵素を内包し、結晶状態のまま酵素反応を促進できれば、酵素の安定保存と中間生成物の外部への拡散が抑制され、カスケード反応の活性化ができると考えた。

細胞内で合成される多角体結晶



3量体構造



単量体構造

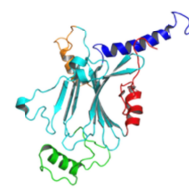


図 1. 細胞内で形成される多角体とその結晶構造 (PDB ID : 2OH6)

## 2. 研究の目的

本研究では、2種類の酵素を内包するタンパク質結晶を作成し、結晶内部でカスケード反応を触媒する固体材料の創成を行う。本手法を実現するために、本研究では、細胞内で結晶を形成する「多角体」を用いて、リパーゼとアルコールデヒドロゲナーゼを多角体内部に固定化し、加水分解反応とアルコールの酸化反応のカスケード反応を試みた。その

ために、まず、(1) 多角体結晶内細孔空間設計を行い、(2) 多角体内包における外来タンパク質の表面電荷の影響、(3) リパーゼ内包多角体結晶の合成を試みた。

### 3. 研究の方法

#### 1. 多角体結晶内細孔空間設計

多角体結晶内での基質の拡散や酵素の固定化を制御するために、多角体結晶の細孔空間を設計する。具体的には、アミノ酸欠損により細孔空間を広げた変異体を作成する。多角体タンパク質の H3 ヘリックス周辺の 38 残基を欠損した変異体を作成した。得られた変異体の結晶構造解析を SPring-8 BL32XU にて行なった。

#### 2. 多角体内包における外来タンパク質の表面電荷の影響

多角体結晶へのタンパク質内包を制御するために、様々な表面電荷をもつ SfGFP を作成し、多角体への固定化を試みた。多角体は野生型 (WTPHC) と変異体 (PhC) を用いた。

#### 3. リパーゼ内包多角体の合成

加水分解酵素である *Candida antarctica* 由来リパーゼ (CalB) の N 末端に多角体タンパク質の H1 ヘリックスを融合した H1-CalB を発現するウイルスを作成した。多角体タンパク質と H1-CalB を昆虫細胞内で共発現することにより、H1-CalB を内包した多角体を合成した。

### 4. 研究成果

#### 1. 多角体結晶内細孔空間設計

多角体タンパク質の Ala67-Ala104 の計 38 残基のアミノ酸を欠損した変異体 (PhC) を昆虫細胞で発現したところ、結晶が観察された (図 2)。細胞を破碎して単離精製し、MALDI TOF MS の結果、欠損した変異体が合成されていることを確認した。結晶構造解析の結果、 $1.95\text{\AA}$  での構造解析に成功し、野生型と同じ空間群であることがわかった。また、分子構造は、欠損領域以外はほとんど変化していないことがわかった。また、集積構造で

は、ユニットセルの中心領域が欠損のため空洞になっていることが明らかとなった (図 3)。

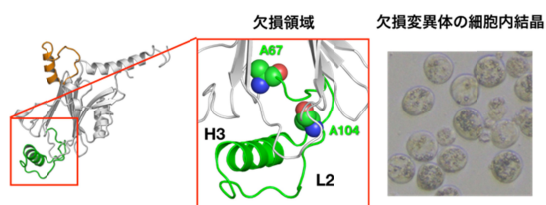


図 2. 多角体変異体の設計と合成

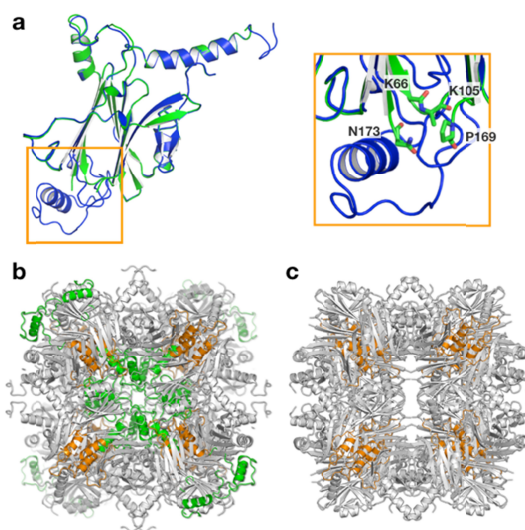


図 3. 変異体の結晶構造 (a) 単量体の構造、WTPHC (青色) と PhC (緑色) の重ね合わせ図、(b) WTPHC の集積構造、(c) PhC の集積構造

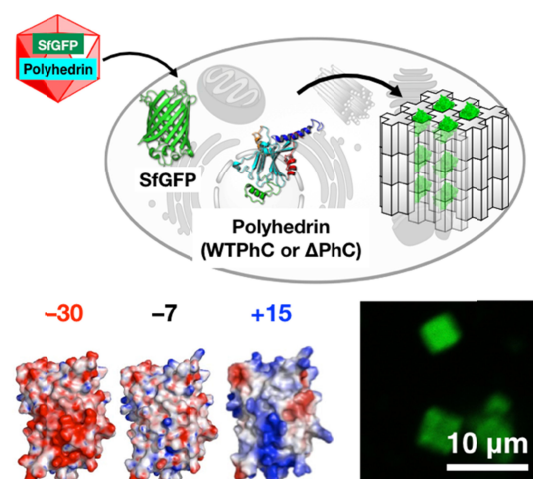


図 4. SfGFP の多角体への内包と +15 SfGFP・PhC の共焦点顕微鏡像

#### 2. 多角体内包における外来タンパク質の表面電荷の影響

表面電荷が-30、-7、+15 の多角体を合成し、WTPhC と PhC を昆虫細胞内で共発現することにより SfGFP を内包した多角体を合成した(図4)。SfGFP の固定化量を定量した結果、+15SfGFP が最も内包されることがわかった。

さらに、PhC は、WTPhC より表面電荷に関わらず、多くの SfGFP を内包することがわかった。

### 3. リパーゼ内包多角体の合成

H1 ヘリックスを N 末端に融合したリパーゼを多角体タンパク質と昆虫細胞 Sf21 で発現することによりリパーゼ内包多角体を合成した。この結晶は、加水分解反応を促進することが見られた。

### 4. まとめ

今回の研究により、(1) 多角体のアミノ酸残基の欠損により内部に大きな空間を有する多角体の合成と、(2) 正電荷の外来タンパク質が内包されやすい、(3) リパーゼ内包多角体の合成が達成された。しかしながら、リパーゼの多角体結晶への固定化量の定量にはいたっていない。今後、ELSA により固定化リパーゼの定量を行うために、His-tag をリパーゼに融合した融合タンパク質を作成し、His-tag 抗体によるリパーゼ固定化量の定量を試みる。また、複数酵素によるカスケード反応を目指し、アルコールデヒドロゲナーゼとリパーゼを固定化した多角体の細胞内合成を行う。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計 3 件)

H. Negishi, S. Abe, K. Yamashita, K. Hirata, K. Niwase, M. Boudes, F. Coulibaly, H. Mori and T. Ueno, "Supramolecular protein cages constructed from a crystalline protein matrix" *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 1988-1991. 査読有, DOI : 10.1039/C7CC08689J

S. Abe, B. Maity and T. Ueno, "Functionalization of protein crystals with metal ions, complexes, and nanoparticles" *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2018, 43, 68-76.

B. Maity, S. Abe and T. Ueno, "Observation of gold sub-nanocluster nucleation within a crystalline protein cage" *Nature Communications*, **2017**, 8, 14820. 査読有, DOI : 10.1038/ncomms14820

#### [学会発表](計 4 件)

安部 聡「機能性タンパク質集合体の分子設計と構造観察」第6回大学連携研究ネットワーク研究成果報告会 千葉、2018年3月1日

安部 聡、笠松 誠、森 肇、上野隆史「Encapsulation Mechanism of Exogenous Proteins into Polyhedra Crystals in Living Cells」第66回高分子年次大会 千葉、2017年5月31日

安部 聡「細胞内結晶化を利用したタンパク質固体材料の開発」生命工学融合セミナー2016 横浜、2016年8月29日  
安部 聡、笠松誠、森 肇、上野隆史「細胞内結晶工学によるタンパク質結晶性細孔材料の構築」第10回バイオ関連科学シンポジウム 金沢、2016年9月9日

#### [図書](計 2 件)

安部 聡、上野隆史「超分子タンパク質の分子設計によるバイオハイブリッド材料の開発」有機合成化学協会誌、**2017**, 75, 1264-1273.

安部 聡、上野隆史「金属錯体による細胞機能制御」フロンティア生物無機化学(錯体化学会フロンティア選書、三共出版) **2016**, 476-496.

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
安部 聡 (ABE SATOSHI)  
東京工業大学 生命理工学院・助教  
研究者番号 : 40508595