

令和 4 年 4 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05324

研究課題名(和文)人工球状タンパク質超分子を用いたナノスケール相分離の実現とその応用

研究課題名(英文)Use of the artificial protein nanocage as nanoscale phase separator

研究代表者

川上 了史(Kawakami, Norifumi)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・講師

研究者番号：60566800

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):人工タンパク質ナノ粒子TIP60は中空構造を有する分子である。TIP60の内部空間を疎水化すれば、内部空間に水に溶けない難溶性分子を水中で分散できるカプセルとして、あるいは、外部表面を疎水化すれば有機溶媒に溶けるカプセルとして利用できるのではないかと考え、研究を進めてきた。その結果、内部空間の疎水化と疎水性分子の内包、水中での分散には成功した。外部表面については、疎水性分子ではなく、両親媒性ポリマーのPEGで修飾すると、アルコール溶媒中に分散ができるところまで確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質は高分子でありながら均一な構造を有するという魅力的な特徴を有する。しかし、生体由来の分子であることから、その利用は一般的に水中に限られる問題がある。本研究はそのような制約を乗り越えるために、我々が開発したタンパク質ナノ粒子TIP60を疎水性環境で利用できるように性質を改変することを目的として研究を行った。このような物質材料の開発は、タンパク質の新しい利用方法を切り開く基盤技術になりうるものである。

研究成果の概要(英文):The artificial protein nanoparticle TIP60 is a molecule with a hollow structure. We have been studying the possibility of using TIP60 as a capsule that can disperse insoluble molecules in water if its inner space is made hydrophobic or as a capsule that can dissolve in organic solvents if its outer surface is made hydrophobic. We succeeded in making the inner space hydrophobic, encapsulating hydrophobic molecules, and dispersing them in water. For the external surface, we have confirmed that it can be dispersed in alcohol solvents by modifying it with PEG, an amphiphilic polymer, instead of the hydrophobic molecules.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：ナノ粒子 自己組織化 化学修飾 相分離

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂質分子で囲まれた水滴が油中に分散した W/O エマルションは、内部水相に酵素を内包することで、有機溶媒中での酵素反応を実現するナノ/マイクロリアクターとして利用できる。しかし、膜の不安定性、脂質組成の最適化、サイズ制御の難しさなど、応用への課題も多い。

一方、天然には、バクテリアマイクロコンパートメント(BMC)と呼ばれるタンパク質ケージの中に酵素を内包する系がある。BMC は複数のタンパク質が自発的に組み上がった超分子構造体で、内外共に水系であるものの、リアクターとして機能する。我々は、有機溶媒中でも利用可能なタンパク質超分子ケージを人工的に設計できれば、ケージ内外を利用した有機相/水相の相分離とナノリアクターとしての利用の両者を実現できると考え、超分子設計を行ってきた。その結果、1.球状で、2.中空の、3.分子表面がアニオン性に偏った、4.システインがない、5.均質な、6. 22 nm の分子直径を有する、7.多孔質なタンパク質超分子(TIP60)の構築に成功した。

このように分子設計自体は狙い通りに進められたが、TIP60 は親水性の高い分子であるため、そのままでは相分離材料として利用できない点に課題があった。そこで、本研究では、TIP60 を相分離材料として利用するための手法の開発を行った。

2. 研究の目的

TIP60 のケージ内外を疎水化する技術の確立を目的として研究を実施した。内部を疎水化した場合には、内部空間に疎水分子を内包することで、本来水中で分散することがない分子を分散させられるか否かを検討することとした。さらに内部空間を修飾する分子の種類ごとに、内包分子に選択性が生じる可能性も検討することとした。また、外部を疎水化した場合に TIP60 を有機溶媒中に分散させられるか否かを検討した。

3. 研究の方法

TIP60 の内部表面にシステイン残基を提示した変異体、外部表面にシステイン残基を導入した変異体をそれぞれ設計し精製条件の確立から行った。変異導入箇所を反応点として、内外表面を化学修飾によって疎水化することを検討した。内側表面の修飾には、芳香族のピレニルマレイミドや、脂肪族のオクチルマレイミドを用いた。この際反応条件の最適化も行った。修飾の確認には、MALDI-TOF-MS の分析やピレンの蛍光を利用した方法を採用した。内部空間に疎水分子が内包できることを示すために、水溶性の低いナイルレッドや、水にほとんど溶解しない亜鉛フタロシアニンの分散の有無を確認した。内包の確認の方法は主に、内包分子の吸収および蛍光スペクトル測定により実施した。また、水中で内包分子の機能を確認できるか否かも検討した。具体的には、ナイルレッドはその蛍光波長が溶媒の環境によって変化する性質(ソルバトクロミズム)を示すため、その変化の観察を、一方、亜鉛フタロシアニンは光増感剤として利用できることが知られているため、光照射に伴う一重項酸素発生を観察を行った。

外部表面の疎水化については、疎水化にともなう TIP60 同士の凝集が懸念されたことから、両親媒性高分子のポリエチレングリコール(PEG)を用いた化学修飾から実施することとした。これを、アルコール溶媒中に添加し溶解・分散の有無を検証した。さらに、内外どちらにもシステインを導入した二重変異体を作成し、表面を PEG で修飾した後に、内側のシステインを小分子で修飾する 2 段階修飾の手法の開発も行った。最後に、一連の実験データを分子構造レベルで説明可能かどうかを確認するため、TIP60 の立体構造についてクライオ電子顕微鏡で解析した。

4. 研究成果

設計した内部表面、外部表面にシステインを導入した変異体および両面にシステインを導入した変異体全てについて精製条件を確立し化学修飾実験に用いることができた。

内部表面にシステインを導入したものに、ピレニルマレイミドやオクチルマレイミドを添加し、その修飾率を検討したところ、最大で 80%程度のシステインが狙ったとおりに修飾されていることが明らかになった。この結果は、多孔質な表面を有する TIP60 の性質から考えると、小分子が孔を通過して内部に到達したと考えられる。次に、修飾された TIP60 を用いて、疎水性のソルバトクロミック分子であるナイルレッドを添加したところ、TIP60 の存在下で明らかに水中への分散量が増加することを突き止めた。さらに、ナイルレッドの蛍光波長を観察したところ、修飾した化合物に応じた最大蛍光波長シフトが観察された。このことは、TIP60 の内部空間を修飾する分子の種類によって性質を制御できる可能性を示唆している。さらに、ピレニルマレイミドを修飾した TIP60 については、亜鉛フタロシアニンの内包も同様に検討した。亜鉛フタロシアニンは水中には全く分散しない化合物であるが、修飾 TIP60 存在下ではやはり分散するようになることを明らかにした。また、本来凝集してしまうことから水中では観察することができなかった光増感剤としての機能も確認したところ、確かに亜鉛フタロシアニンを励起することで、一重項酸素が発生することを明らかにした。この実験では、一重項酸素の存在の確認に 1,3-ジフェニルイソベンゾフランと呼ばれる化合物を用いた間接的な検出方法を利用した。一方で、長時間の光照射は亜鉛フタロシアニ人と修飾したピレンとの相互作用に影響を与えるためか、

その活性が徐々に低下することも明らかになった。

続いて、外部表面の化学修飾実験を行った。この際、疎水化は TIP60 同士での沈殿形成を促進する懸念があったことから、まず有機溶媒に分散できるようにするという目的を達成することを優先し、両親媒性高分子の PEG で外部表面を修飾することとした。修飾率は PEG の長さによって異なるが、概ね 80%以上の外部表面のシステインが修飾されることがわかった。これを用いてエタノール中に分散したところ、沈澱などを形成することなく維持できることがわかった。通常の TIP60 では同様の条件下では速やかに沈殿を形成することから、溶媒中でも一定程度安定にその構造を維持できる可能性があることを明らかにした。また、直接溶媒に分散させる研究の目的とは少し異なるが、PEG 修飾の仕組みの確立過程からさらなる発展が期待できる修飾手法に気が付き、その反応系の確立も検討した。具体的には、両面システインを導入した変異体に、まず高分子量 PEG で修飾を行う。この際、PEG が十分に大きいと TIP60 の孔を通して内部空間に侵入することができず、内側のシステインはフリーのままである。そこで小分子化合物を添加すれば、内部空間に到達できるため、内外表面を異なる分子で修飾することができる考えた。実際に実験を行ったところ、確かに外部表面に PEG を提示し、内部空間を小分子で修飾することができた。さらに小分子に酸化還元反応に反応して結合、解離が起こせるジルスמיד結合を用いた修飾を行ったところ、任意のタイミングで修飾分子を放出する仕組みの開発にも成功した。

上記の成果に加えて、TIP60 の立体構造をクライオ電子顕微鏡で決定した。分子デザイン時の構造解析データから予測された構造と概ね一致する結果が得られ、開発した化学修飾系が TIP60 の分子構造をよく反映した結果であることを裏付けることができた(図)。

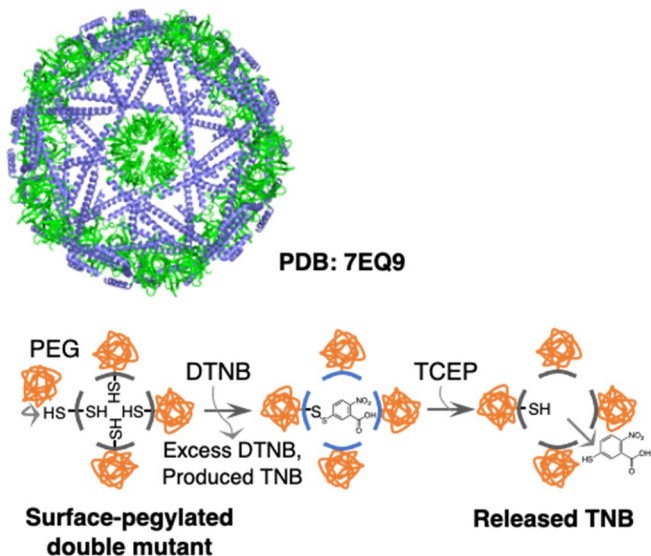


図 クライオ電子顕微鏡で決定した TIP60 の立体構造(上)とその多孔質性を利用した、内外表面のヘテロ修飾系(下)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Junya Obata, Norifumi Kawakami, Akihisa Tsutsumi, Erika Nasu, Kenji Miyamoto, Masahide Kikkawa, Ryoichi Arai	4. 巻 79
2. 論文標題 Icosahedral 60-meric porous structure of designed supramolecular protein nanoparticle TIP60	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 10226-10229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d1cc03114g	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nasu Erika, Kawakami Norifumi, Miyamoto Kenji	4. 巻 4
2. 論文標題 Nanopore-Controlled Dual-Surface Modifications on Artificial Protein Nanocages as Nanocarriers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 2434 ~ 2439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnm.0c02972	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Norifumi Kawakami, Ryoichi Arai	4. 巻 1
2. 論文標題 An Approach to Produce Uniform Artificial Protein Supramolecules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photon Factory Highlights 2018	6. 最初と最後の頁 38-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 小林 直也、川上 了史、新井 亮一	4. 巻 91
2. 論文標題 人工タンパク質ナノブロック複合体の設計開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 255 ~ 259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910255	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawakami Norifumi, Kondo Hiroki, Matsuzawa Yuki, Hayasaka Kaoru, Nasu Erika, Sasahara Kenji, Arai Ryoichi, Miyamoto Kenji	4. 巻 57
2. 論文標題 Design of Hollow Protein Nanoparticles with Modifiable Interior and Exterior Surfaces	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 12400 ~ 12404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201805565	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 川上了史
2. 発表標題 形から入るタンパク質ナノ粒子の設計と機能化
3. 学会等名 SICE分子ロボティクス研究会 第1回オンライン定例研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Norifumi Kawakami, Maika Yamashita, Kenji Miyamoto
2. 発表標題 Incorporation of Hydrophobic Small Molecules in the Artificial Protein Nanoparticle TIP60
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoya Ohara, Norifumi Kawakami, Kenji Miyamoto
2. 発表標題 Metal Inducive Assembly of a Newly Designed Protein Cage TIP60
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Erika Nasu, Norifumi Kawakami, Kenji Miyamoto
2. 発表標題 Dual-Surface Functionalization of an Artificial Protein Nanocapsule Based on Molecular Sieving Effect of its Porous Surface
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下舞佳、川上了史、宮本憲二
2. 発表標題 中空タンパク質ナノ粒子TIP60の内部疎水化と疎水性小分子の内包
3. 学会等名 第22回生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下舞佳、川上了史、宮本憲二
2. 発表標題 中空タンパク質ナノ粒子TIP60への疎水性光増感剤の内包
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会、2021年3月
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大原直也、川上了史、新井亮一、宮本憲二
2. 発表標題 人工タンパク質ナノ粒子TIP60の金属イオン応答性可逆的アセンブル手法の構築
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会、2021年3月
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 那須英里圭、川上了史、宮本憲二
2. 発表標題 人工タンパク質ナノ粒子 “ TIP60の表面孔の分子ふるい効果を利用した内外表面の機能化
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会、2021年3月
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小幡隼也、川上了史、包明久、宮本憲二、吉川雅英、新井亮一
2. 発表標題 切頂二十面体型人工タンパク質ナノ粒子 TIP60 のクライオ電子顕微鏡解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上了史、早坂薫、宮本憲二
2. 発表標題 円順列変異とコイルドコイル構造を組み合わせた蛋白質超構造の設計
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 那須英里圭、川上了史、宮田健、宮本憲二
2. 発表標題 アニオン性タンパク質ナノ粒子TIP60 とカチオン性タンパク質の静電的相互作用 を利用した高次複合体の構築
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大原直也、川上 了史、宮本 憲二
2. 発表標題 新規人工タンパク質超分子 TIP60 のアセンブリ制御に向けたサブユニット間相互作用の解析
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 那須英里圭、川上了史、宮本憲二
2. 発表標題 中空・多孔構造を有する人工タンパク質ナノ粒子 TIP60 の機能化
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上了史、早坂薫、宮本憲二
2. 発表標題 酵素を鋳型とした超構造設計とその酵素活性評価
3. 学会等名 第21回生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 那須英里圭、川上了史、宮本憲二
2. 発表標題 人工タンパク質ナノ粒子 TIP60 の表面ポアサイズを利用した内 外システインのヘテロ修飾
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 慶一・川上了史・宮本憲二
2. 発表標題 人工中空タンパク質ナノ粒子(TIP60)への異種タンパク質内包系の構築検討
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norifumi Kawakami, Hiroki Kondo, Yuki Matsuzawa, Erika Nasu, Kenji Miyamoto
2. 発表標題 Design of a fusion protein forming mutation tolerant and chemically modifiable hollow nanoparticle
3. 学会等名 32nd Annual Symposium of The Protein Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川上了史、那須英里圭、宮本憲二
2. 発表標題 人工中空蛋白質超分子TIP60と外部添加分子の相互作用解析
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹原健嗣、川上了史、宮本憲二、新井亮一
2. 発表標題 切頂二十面体型人工タンパク質ナノ超分子TIP60のX線小角散乱解析
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川上了史
2. 発表標題 中空蛋白質ナノ粒子TIP60の構築
3. 学会等名 第31回生物無機化学夏季セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Matsuzawa, Norifumi Kawakami, Kenji Miyamoto
2. 発表標題 Catalytic activity of the alcohol dehydrogenase immobilized by the protein supramolecule, TIP60
3. 学会等名 第20回生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Norifumi KAWAKAMI
2. 発表標題 Enzyme immobilization in protein aggregates composed of a protein nanoparticle, TIP60
3. 学会等名 The International Symposium on Bioinorganic Chemistry 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川上了史、那須英里圭、宮田健、宮本憲二
2. 発表標題 アニオン性タンパク質ナノ粒子 TIP60 とカチオン性タンパク質 の相互作用解析
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 那須英里圭・川上了史・宮本憲二
2. 発表標題 人工タンパク質ナノ粒子 TIP60 の可逆的な化学修飾
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Research Spotlights #08 https://www.st.keio.ac.jp/education/research/201901.html タンパク質でナノスケールのサッカーボール型分子を創出 https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2018/9/6/28-47911/ Creating Nanoscale Soccer Ball-shaped Molecules https://www.keio.ac.jp/en/press-releases/2018/Oct/5/49-48663/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------