

令和 4 年 4 月 21 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14337

研究課題名(和文) 光感受性ナノポア形成能をもつ人工BAXタンパク質の構築

研究課題名(英文) Semi-synthesis of photo-switchable nanopore BAX protein

研究代表者

朝比奈 裕子 (Asahina, Hiroko)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90808461

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)：本研究では光照射による可逆的なナノポア形成を可能とする人工BAXタンパク質を構築する。人工BAXタンパク質はN末端側のタンパク質断片とC末端側のアゾベンゼンアミノ酸を含むペプチドセグメントをNative Chemical Ligation法で縮合することによって調製する。C末端側ペプチドセグメントに関しては化学合成し、アゾベンゼンの光照射によるCis/Transコンフォメーションの変化をUV/Visにて観測できた。しかしながら、既知の大腸菌発現によるBAXの調製で十分な量は得られず、人工BAXタンパク質の調製に至っていない。現在も引き続き、人工BAXタンパク質の構築に向け、研究を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノマシンの駆動原理を用いてナノポアの開閉を行う先行研究はあるが、いずれも小分子化合物が通過する程度であり、また、その孔は脂質二重膜に開いたままで閉ざすものではない。本研究の光感受性人工BAXはタンパク質が通過する十分な大きさを持つナノポアを形成することが可能であり、閉孔と膜からの解離を制御することができると考えられる。まだ完成には至っていないが、この光感受性人工BAXは人工脂質二重膜や生体細胞膜の開閉分子として、細胞生物学や構造生物学など様々な分野のケミカルツールとして活用できるだけでなく、新たなドラッグデリバリーシステムとしても役立つと期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to semi-synthesize photo-switchable nanopore BAX protein. The protein is semi-synthesized by Native Chemical Ligation of the N-terminal BAX protein segment and the C-terminal peptide segment including azobenzene amino acid. The C-terminal peptide segment was chemical synthesized and its Cis/Trans conformation change using LED light source was detected by UV/Vis measurement. However, the enough amount of BAX protein segment for ligation was not obtained by E.coli expression which was established before. Now, we continue to prepare and analyze the sample.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：ナノポア 半合成 BAX ペプチド化学 タンパク質工学 膜タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体膜にポアを形成するタンパク質が存在し、それらは細胞内外の物質移動を促す。様々なポアの大きさはそれぞれ形成するタンパク質により異なり、ポア内を通過する物質の大きさも異なる。このポア形成するタンパク質を利用し、近年では DNA シーケンシングやドラッグデリバリーなどのナノテクノロジーへの応用が進んでいる(Ayub et al. *Current Opinion in Chemical Biology* 2016, Howorka et al, *Nat. Nanotech.* 2017)。しかし、それらのほとんどは小分子や直鎖 DNA、直鎖ペプチドが通り抜けるくらいの比較的小さなポアを形成するタンパク質の研究が主に進んでおり、フォールディングしたタンパク質など大きな分子が通過できるポアの研究は進んでいない。タンパク質が通過可能なポアの形成ができれば、ポア形成タンパク質のナノテクノロジーへの応用がより幅広くなる。

さらにほとんどのポア形成タンパク質は脂質二重膜や他のタンパク質・ペプチドとの相互作用により、ポアを形成する。た、一度ポア形成するとポアは開いたままであり、閉まることはない。ポアの開閉を制御することができれば、ドラッグデリバリーなど新たなナノテクノロジーへの応用が期待できる。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、生体内において Cytochrome c のミトコンドリアのマトリックスから細胞質内への放出を促す BAX タンパク質で形成されるナノポアを使用し、大きな物質の通過可能なポアを開発することにした。また、BAX は他のタンパク質由来の BH3 ドメインが結合することによって BAX の $\alpha 9$ ドメインが動き、膜に挿入される形になり、多量体化することでポアを形成する。このことから、ナノマシンでよく使用されているアゾベンゼンの光感受性 Cis/Trans コンフォメーション変化を利用し、BAX の構造変化部分にアゾベンゼンを導入し、光の波長変化により、ポアを形成できるような光感受性ナノポア形成能をもつ人工 BAX タンパク質を構築することとした。このアゾベンゼンを導入した人工 BAX タンパク質は 2 つの異なる波長でナノポア形成可能な構造と遊離する BAX の 2 つの構造を繰り返すことが可能となることが考えられる。このことから、これまで不可逆であったナノポア形成が可逆的なナノポア形成が可能となり、異なる光照射によってナノポアの開閉ができると期待できる。

3. 研究の方法

本研究では半合成法を用いてアゾベンゼンを配列内にもつ BAX の調製を行い、調製した BAX のナノポア形成と多量体化の評価を蛍光実験により行う。

①アゾベンゼンを配列内にもつ BAX の調製

非天然構造であるアゾベンゼンアミノ酸が導入された BAX を調製するため、化学合成法と生化学的を組み合わせた半合成法により、目的のタンパク質を得る。まず、BAX の $\alpha 8$ - $\alpha 9$ 間のリンカー部分で、N 末端、C 末端セグメントに分割して、それぞれ調製することとした。天然アミノ酸のみで構成される N 末端セグメントは既知の方法である大腸菌発現系により得る (Suzuki et al., *Science* 2000)。この際、インテイン法を利用して、C 末端にチオエステルを導入し、後のライゲーション反応に利用する。一方、アゾベンゼンアミノ酸が導入された C 末端セグメントは、末端に Cys 残基をもつ必要がある。C 末端セグメントに関しては Fmoc 固相合成法により化学合成する。これらの N 末端セグメントと C 末端セグメントを Native Chemical Ligation 法により、目的の光感受性人工 BAX タンパク質を調製する(図 2(A))。

②ナノポア形成と多量体化の評価

①で得られた人工 BAX を蛍光実験や電気泳動などにより評価を行う。蛍光実験に関しては図 2(B)に示すように蛍光物質が包埋されたリポソームを用いて人工 BAX がナノポアを形成するかを確かめる。蛍光物質が包埋されたリポソームに人工 BAX を加え、光照射により人工 BAX のナノポアが形成すれば、リポソーム内部に存在する蛍光物質が外部に放出されて、蛍光が検出される。

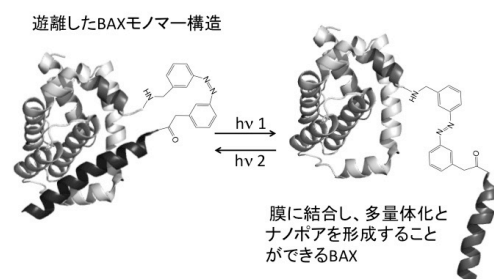


図 1. 光感受性人工 BAX タンパク質の模式図

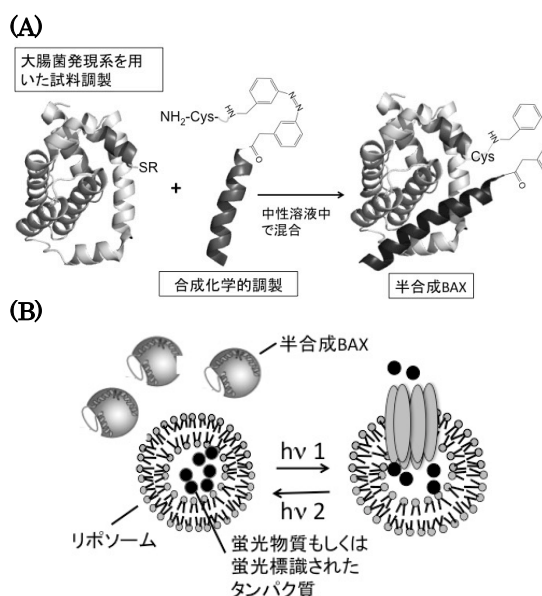


図 2.(A)Native Chemical Ligation 法を用いた半合成 BAX の調製(B)蛍光物質を用いた評価方法

包埋する蛍光物質の大きさをかえることで、人工 BAX が形成するナノポアの大きさを評価する。また、ナノポアを形成したリポソームを回収し、Native PAGE で解析することで多量体化を評価を行う。

4. 研究成果

3. 研究の方法に示した①アゾベンゼンを配列内にもつ BAX の調製と②ナノポア形成と多量体化の評価についての結果は以下のとおりである。

①アゾベンゼンを配列内にもつ BAX の調製

アゾベンゼンアミノ酸を合成後、C 末端セグメントを Fmoc 固相合成法により化学合成を行い、逆相 HPLC にて精製を行った。質量分析とアミノ酸分析で目的である C 末端セグメントの純度も確認し、調製を完了した。N 末端セグメントに関しては既知の BAX タンパク質の大腸菌発現系の方法をもとにベクター設計を行い、大腸菌を用いて N 末端セグメントの前駆体を発現した。しかしながら、次の反応に必要な量の N 末端セグメントは得られなかった。BAX タンパク質の大腸菌発現に関して、新たな報告があり、既知の方法では十分な量は得られないことが報告され、新たな報告を参考に新たなベクターを設計し、大腸菌を用いた発現を確認した (Digeldein et al. *Protein Expr Purif.* 2019)。しかし、この方法でも十分な量は得られず、ライゲーションに必要な量の N 末端セグメントを得るため、再度ベクター設計を行っている。

②ナノポア形成と多量体化の評価

未だ試料調製が完了していないため、本研究の本質である光感受性人工 BAX の評価は行えていない。しかしながら、蛍光物質を包埋したリポソームに関しては Extruder と超遠心を使用し、調製できているため、光感受性人工 BAX が得られたら、直ちに蛍光実験での評価を行う準備はできている。

本研究は光感受性人工 BAX の調製と評価を目指し、引き続き研究を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Qing Yujia, Tamagaki-Asahina Hiroko, Ionescu Sandra A., Liu Mira D., Bayley Hagan	4. 巻 14
2. 論文標題 Catalytic site-selective substrate processing within a tubular nanoreactor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Nanotechnology	6. 最初と最後の頁 1135 ~ 1142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41565-019-0579-7	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 該当する

1. 著者名 Takechi-Haraya Yuki, Ohgita Takashi, Kotani Mana, Kono Hiroki, Saito Chihiro, Tamagaki-Asahina Hiroko, Nishitsuji Kazuchika, Uchimura Kenji, Sato Takeshi, Kawano Ryuji, Sakai-Kato Kumiko, Izutsu Ken-ichi, Saito Hiroyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of hydrophobic moment on membrane interaction and cell penetration of apolipoprotein E-derived arginine-rich amphipathic α -helical peptides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-08876-9	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiroko Tamagaki-Asahina
2. 発表標題 Conserved tyrosine residues involve in the orientation of the transmembrane region in FGFR3
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 朝比奈(玉垣)裕子
2. 発表標題 FGFR3の膜貫通部位に存在するチロシン残基と膜貫通部位の配向
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉垣(朝比奈)裕子
2. 発表標題 線維芽細胞増殖因子受容体3の膜貫通部位に存在するチロシンによる配向決定
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 玉垣(朝比奈)裕子
2. 発表標題 ペプチド化学を用いた線維芽細胞増殖因子受容体3の構造機能解析
3. 学会等名 蛋白研セミナー(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------