

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05210

研究課題名(和文)クライオ電顕構造に基いた高機能超耐熱性ペプチドナノチューブの創製

研究課題名(英文)Creation of hyper-thermostable peptide nanotubes based on the cryo-EM structures

研究代表者

田村 厚夫 (Tamura, Atsuo)

神戸大学・理学研究科・准教授

研究者番号：90273797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：クライオ電顕の登場で、今まで他の手法で不可能であった非結晶性ナノファイバーの原子レベルでの構造解析が可能となった。申請者の独自技術によって創製してきた人工設計ペプチドナノチューブにこの構造解析法を初めて適用し、得られた構造に基いて新たな精密設計を行うことで、超耐熱性という形質を付与することを目指した。この結果、ペプチドの構造としては、らせん状のヘリックスを基本とし、自己集合によって会合したナノファイバー構造となることで、転移温度が測定不能となる130℃を超えるものの創製に成功した。また、この集合体が、中温域で協同的に液晶様の構造転移を起こすという新たな現象を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物中で機能を担っている生物物質であるタンパク質とペプチドは、自然環境や生物中で働くため、通常は10-40℃程度で安定な構造を取っている。高温環境では、一般的にはタンパク質構造が壊れ機能が失われてしまう。この欠点を補うため、タンパク質(ペプチド)分子を規則的に多数集合させてナノファイバーとして非常に高い熱安定性を獲得することに成功し、高温での機能化への道筋をつけることに至った。さらに、分子的には水素結合1つの有無によって、分子集合体の方向が一斉に変化する液晶様現象を生じることから、ペプチド分子集合体の新たな構造転移の発見につながった。

研究成果の概要(英文)：Cryo-EM can determine the structure of amorphous nanofibers. We have applied this technique to our peptide designing strategy to obtain hyper-thermostability. Several alpha-helical peptides were found to be assembled into nanofibers, resulting in the transition temperature over 130℃. Interestingly, liquid crystal-like cooperative transition was observed for some nanofibers.

研究分野：タンパク質設計

キーワード：ペプチド ナノファイバー 耐熱性 ヘリックス

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

2017年のノーベル化学賞は、クライオ電子顕微鏡の開発に関して授与された。生体物質を含むナノ構造を原子分解能で知ることが極めて重要であり、既存の二手法（X線回折法、核磁気共鳴法）では不可能であった結晶性のない高分子サンプルの構造解析を可能にするという面で画期的な手法となっている。実際、クライオ電顕によって決定された生体分子構造はここ数年で急速に増加している（*Nature*, 2016, 537, 339-346）。一方、大型の装置と解析システムが必要なため、測定への垣根は高いが、大阪大学の電子顕微鏡部門との共同研究を開始することとなり、クライオ電顕を中心とした構造解析で得られる新たな情報をフルに活用して本研究を推進することが可能となった。

今回、そのターゲットとなる物質を人工設計ペプチドナノチューブ/ファイバーとする。今まで申請者は「人工設計したペプチド」を用いて、自在に「ナノ構造や機能をデザイン」する機能性ペプチドデザイン技術を独自に開発し、その新規性の証明として数々の特許出願につなげて来た（出願特許16件（うち国際4件）、取得特許7件（うち国際1件））。この構造の例は、 α ヘリックスというらせん構造の間や β シートという平面構造の間に隙間をつくるもの、あるいは環状ペプチドで内部配位空間を形成させるものである。いずれも直径数ナノメートルで空隙を持ったチューブ構造を取り、内部に目的の金属等の物質を選択的に取り込むことが可能である。

これらの設計に際して用いた方法では、経験則が多くを占めており、相当の試行錯誤が必要であった。これは、得られたナノチューブの構造を決定する手法がなかったため、精密な構造情報に基づく設計が不可能であったからである。今回、クライオ電顕を初めて用いて原子レベルに近い構造を得ることで、より精度の高い合理的な設計が可能となった。これにより密にパッキングした安定な構造体を設計し、超耐熱化を目指すこととした。

2. 研究の目的

まずペプチドナノチューブ/ファイバー構造が100°Cに達する高温でも安定で機能するという、生体分子にとって過酷な超耐熱化を達成することを第一目標とする。この実現後高温下にて、高速メタル結合センシング機能の実現を目指す。これらの達成は、過酷な環境条件化で高速に機能する実用性も併せ持った新しい機能性生体ナノ材料の創製につながる事となる。

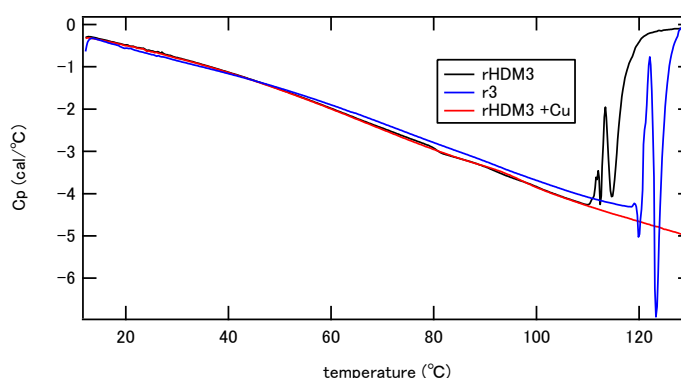
3. 研究の方法

設計後の実際の合成は、ペプチド合成機（現有設備：以下同様）を用いた固相法を行い、クロマトグラフィーでの精製と質量分析機での確認を経て、構造を核磁気共鳴装

置、各種分光装置および熱測定で精密観測し、活性は生化学的手法および原子間力顕微鏡観測で行う。この結果をフィードバックし、新たな設計を行う。このサイクルを繰り返すことで、望みの高選択性を持ったものを得る。研究の流れとしては、設計→合成と精製→構造解析→機能測定→評価および再設計、のサイクルを数回繰り返す。なお、環状ペプチドについては現有のペプチド合成機ではできないため、合成を外注し研究室で精製を行うこととする。

4. 研究成果

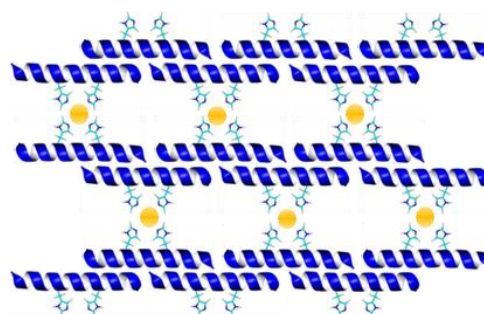
まず、ペプチドナノチューブ構造が100°Cに達する高温でも安定で機能するという、生体分子にとって過酷な超耐熱化を達成することを第一目標とし、その達成に至った。下図に、 α ヘリックス構造型のペプチド分子を集合させ、ナノファイバー化したものの熱容量 (C_p) 変化を温度に対して測定する示差走査型熱測定結果を示す。通常の集合体 (黒線) でも110°C付近で構造転移するという高い安定性を示し、さらに配列を工夫したペプチド (青色) で、その転移温度は120°Cを越えた。さらに、金属 (この場合は銅Cuイオン) との結合能を付与していたことで、転移温度は測定可能な130°Cを越えた (赤線) こと、即ち130°C以上まで構造が壊れないという超耐熱性の獲得に成功した。



100°Cを越える高い耐熱性

については、天然では温泉などの特殊な環境に適応した高度好熱菌が保有するタンパク質で見られることはあるが、このペプチドはわずか21アミノ酸残基で構成されたものであること、またそのピークが遥かにシャープであること (これは協同性が高いこと、即ち多分子が一斉に構造転移することを示唆する) ことが類を見ない現象であると言える。この結果をもとに、ペプチドでも分子集合させることで超耐熱化が可能であることを示した。

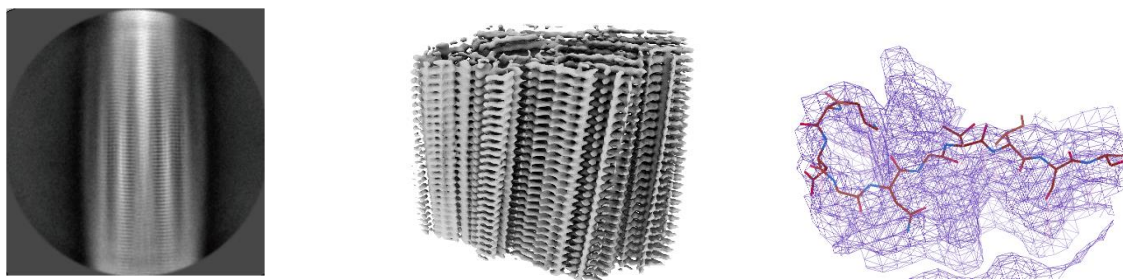
また、円二色性測定から、二次構造 (この場合、 α ヘリックス構造) の転移と分子集合を伴う協同的転移であることを明らかにした。つまり、右下図の通り、これらは、 α ヘリックス構造を骨格構造とし、分子の自己集合によって高分子化し、ペプチドナノファイバーとなること、さらに黄色で示す金属イオンと結合することでバンドル化してより耐熱性が高まることを示すものである。さらに、原子間力顕微鏡でそれぞれの温度範囲で



の形態を観測した所、線維状である温度域と超えると、球状凝集体が形成していることがわかった。つまり、100°Cを超える耐熱性は、分子の集合形態が関与していると推察される。以上より、分子の構造と集合との相関が明らかになった。

このようなペプチドナノファイバーは、そのままではクライオ電顕で必要とされる高い均一性を備えていなかった。そこで、形成条件および形成法に多くの工夫を加え、非常に均一度の高いファイバーを生成させ、クライオ電顕の観測に資することを旨とした。クライオ電顕による構造解析は、以下の二次構造単位のナノファイバーについて行った。即ち、1) β シート型のナノファイバー、2) α ヘリックス型のナノファイバー、3) α 型から β 型へ転移するナノファイバー、の3種である。原子間力顕微鏡を用いて観察したところ、繊維形成のしやすさに違いは見られたものの、どのペプチドも繊維化することが分かった。これらのペプチドの円偏光二色性測定を行い二次構造を調べた。さらに、pH依存性およびアルコール依存性なども調べ、どのような相互作用が働くことによって繊維化しているかを考察した。最後に、繊維がどのような構造をしているのかを調べるために透過型電子顕微鏡およびクライオ電子顕微鏡を用いて構造解析を行った。

まず、透過型電子顕微鏡観察を行ったところ、AFMで観察されたのと同様に長さが数マイクロメートル、幅が10nmほどの繊維であることが分かった。1) 3) について、ピッチが140nm前後から100nm前後のらせん状になっていることも分かった。次に、1) についてクライオ電顕による観測を行い、二次元平均画像および三次元構造の再構築を行った(下図)。まず、6 Åほどの分解能で解析を行い、二次元平均画像をフーリエ変換したところ、分子間の水素結合が4.9 Åと4.8 Åであることが分かった(下図左)。これは β シート構造の水素結合の距離と一致しており、ペプチド分子間が β シート構造と同じであることが分かった。さらに、解析を進め、三次元像は分解能3.3 Åで得られ(下図中央)、これに、ペプチド分子をモデリングすることで、各アミノ酸の配置座標が判明した(下図右)。このことから、これらは共に構造単位のペプチド分子が β ストランドから構成される繊維がバンドル化した構造に近いことが示唆された。また、分子間の疎水相互作用および静電相互作用の様式が明らかになり、安定なナノファイバー形成に必要な因子が明らかになった。以上のように、このレベルで解析を行うことで、当初の設計通りの構造か否かを明らかにし、次世代の設計に十分生かすことが可能となることが示された。

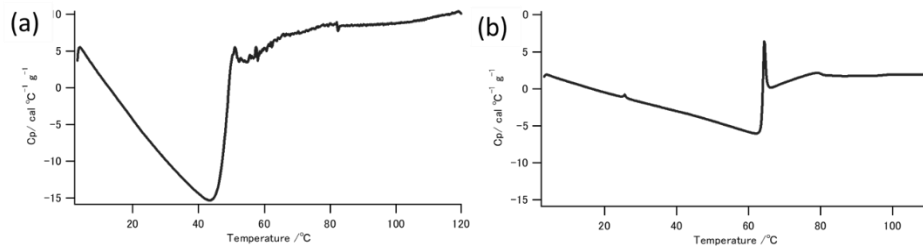


図：人工設計ペプチドナノファイバーのクライオ電顕観測：（左）cryo-EMの二次元像（径67 Å），（中央）三次元像，（右）ペプチドをモデリングにより重ねた構造

一方、2）については、ピッチが明確ではなく、2次元像の獲得までで、3次元像の取得に至る事は困難であることが判明した。

最後に、熱力学と分子論の両面から、ペプチドナノチューブの超耐熱化機構の解明を目指した。超精密な熱測定により、この安定性は分子間集合の際に生じる相互作用によることを明らかにした。特に、1つのペプチドについて、新たな水素結合が生じ、極めて鋭敏な熱吸収を伴う熱転移を示すことを初めて明らかにした（下図の右、60°Cでの転移）。この転移は、一般にペプチドやタンパク質で生じるものとは大きく異なり、むしろ液晶の相転移に近いことから、分子に方向性を有する構造が、特別な水素結合ネットワークを形成した場合に起こす協同的転移であることを明らかにした。ペプチドナノファイバー構造について、原子間力顕微鏡や各種分光法、特に新たに二次構造を判別するため赤外分光法も適用した。この結果、生じた熱転移は、25°Cの中温域で

の小さいが
シャープな
ピークとと
もに、ファ
イバー構造



形成と崩壊に同期していることが示された。

以上のように、超熱耐性ペプチドナノファイバーの創製に成功し、メタル結合機能を付与することで、より安定性が高まることを示した。このことは、超高温でペプチドを機能させること、また得られたメタルペプチド複合体を、新しい機能性生体ナノ材料とする可能性を拓いたものとする。

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 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakurai Haruka, Nishimura Kanon, Yamamoto Shota, Maruyama Tatsuo, Tamura Atsuo	4. 巻 4
2. 論文標題 Molecular Design of pH-Responsive Helix Peptides That Can Damage Tumor Cells Selectively	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 2442 ~ 2452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsabm.0c01407	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 Yamamoto Shota, Nishimura Kanon, Morita Kenta, Kanemitsu Sayuki, Nishida Yuki, Morimoto Tomoyuki, Aoi Takashi, Tamura Atsuo, Maruyama Tatsuo	4. 巻 22
2. 論文標題 Microenvironment pH-Induced Selective Cell Death for Potential Cancer Therapy Using Nanofibrous Self-Assembly of a Peptide Amphiphile	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 2524 ~ 2531
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biomac.1c00267	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25件（うち招待講演 1件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 森下梨佳子、田村厚夫
2. 発表標題 Design of cyclic and linear peptides interacting with transition metal ions
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Minami Kurokawa, Mika Hirose, Kodai Kawamoto, Atsuo Tamura
2. 発表標題 Secondary structure transformation of artificially designed peptide nanofibers
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒川南、田村厚夫
2. 発表標題 人工設計ペプチドナノファイバーの構造・熱力学的解析
3. 学会等名 バイオインタラクション研究会第11回ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒川 南, 田村 厚夫
2. 発表標題 人工設計ペプチドによるナノファイバーの形成とその構造制御
3. 学会等名 第66回 日本生化学会 近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森下 梨佳子, 廣瀬 未果, 川本 晃大, 岩崎 憲治, 田村 厚夫
2. 発表標題 EF-handモチーフを導入したカルシウム結合型ペプチドの設計とそのナノファイバー化
3. 学会等名 第66回 日本生化学会 近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井 遥, 田村 厚夫
2. 発表標題 種々の脂質に対するpH 応答性ヘリックス型人工設計ペプチドの膜破壊能の評価
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 永瀬 陽望,田村 厚夫
2. 発表標題 Molecular design of peptide enzymes intended to form fibers
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of 71st JSCB & 19th PSSJ (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒川 南,田村 厚夫
2. 発表標題 Designing an α -helical peptide nanofiber with β -conformational switching ability
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of 71st JSCB & 19th PSSJ (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯田 禎弘,田村 厚夫
2. 発表標題 Artificially designed peptides that bind rare metals selectively
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of 71st JSCB & 19th PSSJ (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川 祐樹,山本 直樹,井上 倫太郎,杉山 正明,田村 厚夫,茶谷 絵理
2. 発表標題 Trapping and structural analysis of nucleation intermediates aimed at clarifying amyloid nucleation mechanisms
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of 71st JSCB & 19th PSSJ (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯田 禎弘, 田村 厚夫
2. 発表標題 Designing artificial peptides that hydrolyze amyloid beta protein
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井遥, 西村香音, 山本翔太, 丸山達夫, 田村厚夫
2. 発表標題 Artificially designed pH-responsive helical peptides that damage tumor cells selectively
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 黒川 南, 田村 厚夫
2. 発表標題 人工設計ペプチドによる繊維状ナノ構造体の形成
3. 学会等名 第10回サイエンスフロンティア研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒川 南, 田村 厚夫
2. 発表標題 構造転移能を有するペプチドナノファイバーの人工設計
3. 学会等名 若手フロンティア研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森下梨佳子, 田村厚夫
2. 発表標題 遷移金属イオンと相互作用する環状及び鎖状ペプチドの設計
3. 学会等名 若手フロンティア研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本多紘, 田村厚夫
2. 発表標題 亜鉛結合能を持つペプチドの人工設計
3. 学会等名 若手フロンティア研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井遥, 西村香音, 山本翔太, 丸山達夫, 田村厚夫
2. 発表標題 腫瘍細胞破壊能を有するpH応答性人工設計ペプチド
3. 学会等名 若手フロンティア研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒川南, 廣瀬未果, 川本晃大, 田村厚夫
2. 発表標題 Thermal Behavior of Artificially Designed Peptide Nanofibers
3. 学会等名 第一回蛋白質科学会若手の会研究交流会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒川南、廣瀬未果、川本晃大、田村厚夫
2. 発表標題 Artificially Designed α -helical Peptide Nanofibers Showing Liquid-crystal Like Thermal Behavior
3. 学会等名 第58回日本ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒川南、田村厚夫
2. 発表標題 人工設計 α ヘリックスペプチドナノファイバーの熱分析
3. 学会等名 第 57 回熱測定討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Minami Kurokawa, Mika Hirose, Akihiro Kawamoto, Atsuo Tamura
2. 発表標題 The potential of artificially designed α -helical peptide nanofibers
3. 学会等名 第 59回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本多紘、田村厚夫
2. 発表標題 ヒスチジン含有設計ペプチドの亜鉛依存的な構造形成
3. 学会等名 若手フロンティア研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本夢弓、後藤早由、菰田悦之、田村厚夫
2. 発表標題 ゲル化能を有する人工設計ペプチドの構造及びレオロジー解析
3. 学会等名 若手フロンティア研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小倉 実夏、田村厚夫
2. 発表標題 レアメタルと結合する環状ペプチドの設計及び構造解析
3. 学会等名 若手フロンティア研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村厚夫
2. 発表標題 人工設計ペプチドを用いたレアメタル回収技術の開発とその事業化
3. 学会等名 DEMO DAY 2022 (主催：神戸大学、大阪工業大学) (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本熱測定学会 (田村厚夫分担)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 392
3. 書名 熱量測定・熱分析ハンドブック 第3版 (5.4.6項「タンパク質の低温変性」担当)	

〔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
---------	---------