

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05835

研究課題名(和文) タンパク質工学的応用を目指したエンカプスリンナノ粒子の構造生物学的研究

研究課題名(英文) Structural studies on the encapsulin nanoparticle for its protein-engineering applications

研究代表者

平 大輔 (Hira, Daisuke)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：00569890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：エンカプスリンはタンパク質分子が自己集合して形成されるタンパク質ナノ粒子である。その粒子内部に特異的に別のタンパク質(荷物タンパク質)を内包する性質を有している。本研究では、エンカプスリンナノ粒子の応用を目指して、タンパク質発現系の構築、立体構造解析を進めた。まず、好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来のエンカプスリン(GkEnc)と外来の荷物タンパク質遺伝子を共発現する大腸菌発現系を構築し、外来の荷物タンパク質を自在に内包可能なGkEncナノ粒子の調製に成功した。さらにこの発現系を用いることで、ある種のリパーゼ等の難発現タンパク質を大腸菌で生産可能となることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスの外殻を形成するタンパク質などは、数十から数百という多くのタンパク質分子が自己集合して、数十から数百ナノメートルという、非常に大きな構造体を形成する。これらタンパク質構造体は、さまざまなカプセルとして応用可能であり、エンカプスリンについても、国内外で、その性質を利用した工学的応用研究が進められている。本研究では、元来は大腸菌において難発現性であるタンパク質が、GkEncナノ粒子に内包されることで可溶性発現可能となることが明らかとなった。今後さらに研究を進展させることで、エンカプスリンナノ粒子を難発現性タンパク質生産へと応用することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Encapsulin is a protein nanoparticle formed by the self-assembly of one type of protein. Encapsulin can precisely encapsulate another protein (cargo protein) inside the particle. In this study, we constructed the expression system of the encapsulin nanoparticle and analyzed its three-dimensional structure for its application. First, we constructed an *E. coli* expression system that co-expressed encapsulin (GkEnc) from the thermophilic bacterium *Geobacillus kaustophilus* and an exogenous cargo protein gene and successfully prepared GkEnc nanoparticles that can freely encapsulate exogenous cargo proteins. Furthermore, using this expression system showed that lipase and other difficult-to-express proteins can be produced in *E. coli*.

研究分野：金属蛋白質科学

キーワード：エンカプスリン ナノ粒子 タンパク質発現系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エンカプスリンは、細菌および古細菌由来で見られている細胞内構造体であり、タンパク質分子が多量化して形成されるナノ粒子タンパク質である。研究開始当初には、ホモ 60 量体およびホモ 180 量体のエンカプスリンが知られており、いずれも正二十面体構造を形成している (図 1, Giessen TW Curr. Opin. Chem. Biol. 34 1-10 (2016) より引用・改変して使用)。また、エンカプスリンは、その粒子内部に特異的に別のタンパク質 (荷物タンパク質) を内包する性質を有している。内包される荷物タンパク質は、その N 末端もしくは C 末端に特有の十~数十残基程度のアミノ酸配列 (ターゲットペプチドと呼ぶ) を有している。そのターゲットペプチドが認識されることで、荷物タンパク質が特異的にエンカプスリン内に取り込まれ、取り込まれた荷物タンパク質がエンカプスリン内で機能することで、鉄貯蔵や活性酸素の除去等の働きを担っていると考えられている。

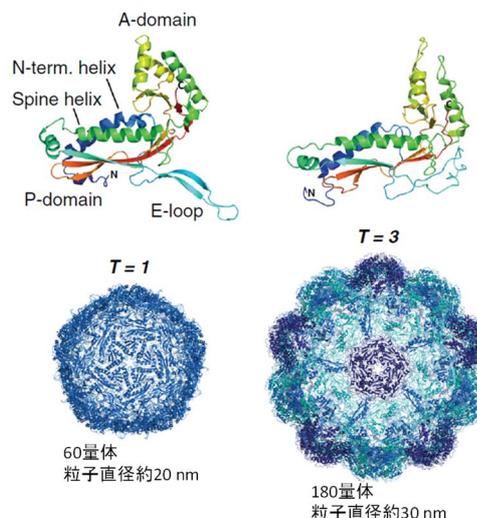


図 1 エンカプスリン単量体および、その 60 量体・180 量体のナノ粒子構造

エンカプスリンは、その性質を利用して、内部に触媒・酵素を取り込ませたナノ粒子触媒やドラッグデリバリーシステムのカプセルとしての工学的応用研究も進められている (Sonotaki S et al., Biomater Sci. 5(6) 1082-1089. (2017) など)。一方、近年の様々な生物のゲノム解析研究の進展により、非常に多くのエンカプスリン遺伝子とその荷物タンパク質遺伝子のペアの例が推定されているが (Giessen TW and Silver PA Nat Microbiol 2 17029 (2017))、多くはタンパク質としての生化学的な研究が実施されていない。例えば、内包される荷物タンパク質が有するターゲットペプチドについて、アミノ酸配列が大きく異なる複数の種類が予測されているが、それらの構造的・機能的な違いはほとんどわかっていない。これらを明らかにするためには、研究例および構造生物学的知見が不足しているのが現状であり、特に、ゲノム解析研究で推定に留まっているエンカプスリン・荷物タンパク質遺伝子について、生化学的・構造生物学的研究が必要と考えられた。

2. 研究の目的

上述した研究開始当初の背景を踏まえ、いくつかの生物由来のエンカプスリン遺伝子およびその荷物タンパク質遺伝子について、大腸菌発現を試みたところ、好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来のエンカプスリン (GkEnc) を用いて、高収量・高純度でエンカプスリンナノ粒子が得られる発現系を構築することに成功した。さらに、GkEnc は既知のホモ 60 量体もしくはホモ 180 量体の正二十面体構造よりも、サイズの大きなナノ粒子を形成することが強く示唆された。そこで本研究では、GkEnc を研究対象として、(1) GkEnc を用いた荷物タンパク質内包性の制御法を確立し、応用を試みること、(2) その立体構造をクライオ電子顕微鏡法により解明すること、以上の 2 点を研究目的とした。これら生化学的・構造生物学的研究を通して、エンカプスリンナノ粒子のタンパク質工学的応用への基盤を構築することが可能になると考えた。

3. 研究の方法

(1) GkEnc とその荷物タンパク質の遺伝子構造を模倣して、GkEnc 遺伝子上流にターゲットペプチド (アミノ酸配列: TRRQLTVGSLKKG) を指定する塩基配列を大腸菌発現用プラスミド pET-20b(+) 上に配置した発現用プラスミドを作成した。これを用いて、任意のタンパク質にターゲットペプチドを融合して荷物タンパク質とし、GkEnc と共発現することを可能とした。モデルタンパク質として、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、ミオグロビン、チオレドキシン遺伝子を用いて、GkEnc と共発現することで、荷物タンパク質として内包発現することが可能か検討した。共発現は大腸菌 BL21 (DE3) 株を用いて行い、IPTG の添加によってタンパク質発現を誘導した。集菌して得た菌体を緩衝液で懸濁し、超音波破碎・遠心分離によって可溶性画分を回収した。これをニッケルアフィニティカラムクロマトグラフィーにより精製し、さらにゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。また、GFP をモデルタンパク質として、融合するターゲットペプチドのアミノ酸配列を削った変異体 (13 残基からなる野生型ターゲットペプチドを TP13 とし、C 末端から配列を削った、TP12, TP11, TP10, TP9, TP7) を作成し、それぞれを GkEnc と共発現させ、上記同様に GkEnc ナノ粒子を精製し、内包量がどうなるかを SDS-PAGE で確認した。また、大腸菌に毒性を有することが知られているある種の細菌由来のリパーゼについて、同様の共発現系を構築して、

その発現が可能となるか検討した。さらに、大腸菌で発現した際に、封入体を形成することが知られている一本鎖抗体(scFv)も同様にGkEncと共発現し、エンカプスリンに内包させることで可溶性画分へと発現できないか、検討した。

(2)(1)で構築したGkEnc発現系(GkEncを単独で発現させる系)を用いて、GkEncナノ粒子の発現・精製を行った。得られた試料について、酢酸ウランを用いたネガティブ染色による電子顕微鏡観察を行った。この観察結果を基に、緩衝液の条件を決定し、Titan Kriosによるクライオ電子顕微鏡観察を行った。得られた顕微鏡像を用いて単粒子解析法による立体構造解明を試みた。

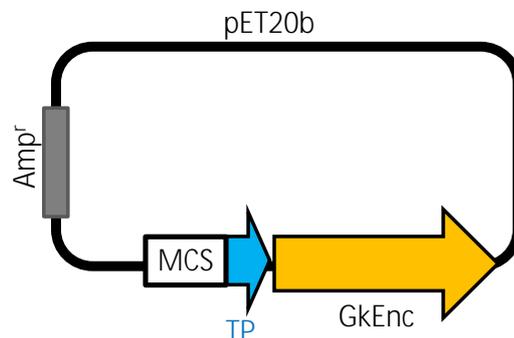


図2 GkEncと荷物タンパク質の共発現用プラスミド MCS: マルチクローニングサイト、TP: ターゲットペプチド配列

4. 研究成果

(1) GkEncと任意のタンパク質遺伝子を荷物タンパク質として共発現可能なプラスミドベクターを構築した(図2)。このプラスミドベクターを用いて、ミオグロビンやGFP等をGkEncと共発現、精製することができた。また、GFPを共発現した場合には緑色蛍光が、ミオグロビンを共発現した際には、ヘム特有の吸収スペクトルが確認でき、これら外来の荷物タンパク質の少なくとも一定割合がGkEnc粒子内部でフォールディング、機能していることが示された。さらに、GFPに融合させたターゲットペプチドをC末端から削った変異体をGkEncと共発現させることで、それらが同時に精製されるか、即ち、GkEncに内包されるかどうかを検討した。その結果、図3に示したように、TP13~TP10までは、GFPが同時に精製されたが、それ以上削ったTP9、TP7ではGFPのバンドがほとんど確認できなかった。また、TP13~11まではGkEncのバンド強度に対してGFPのバンド強度はほとんど変化していないように見えるが、TP10では約半分程に低下していた。即ち、GkEncへの外来荷物タンパク質の内包にはターゲットペプチドが必須であること、ターゲットペプチドの配列を変化させることで、GkEncとの結合性を換え、内包量を調整できる(減少させることが可能である)と考えられた。

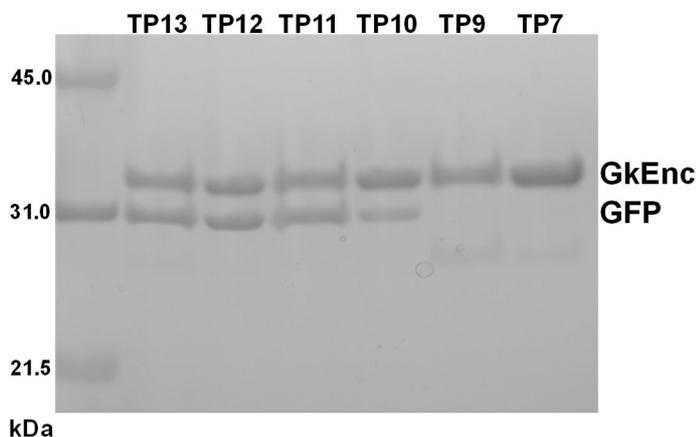


図3 GkEncとターゲットペプチド変異体を融合させたGFPを共発現、精製した試料のSDS-PAGE

さらに、大腸菌に毒性を有する細菌由来のリパーゼおよび、大腸菌発現の際に封入体を形成するscFvについて、GkEncと共発現することで、それぞれを可溶性画分に回収することができた。

以上の結果より、GkEncナノ粒子に外来荷物タンパク質を内包発現させる発現系を構築することができ、この発現系を用いて、荷物タンパク質の内包量の調整、さらに難発現性タンパク質の可溶性発現を実施できることが示された。この系を、有用なタンパク質・酵素の生産システムとして利用することが可能かもしれない。そのためには、GkEncナノ粒子に内包した荷物タンパク質を簡便に取り出すことが必要であり、今後、ナノ粒子の破壊・再構築等の方法を確立させたいと考えている。

(2) 大腸菌発現・精製したGkEncナノ粒子について、ネガティブ染色による電子顕微鏡観察、およびクライオ電子顕微鏡観察を行ったところ、図4のようなナノ粒子像が確認された。これらの顕微鏡像をもとに単粒子解析を行うことで、GkEncナノ粒子の電子密度マップを求めることができた。この電子密度マップをもとに、GkEncナノ粒子の4次構造を推定すると、2019

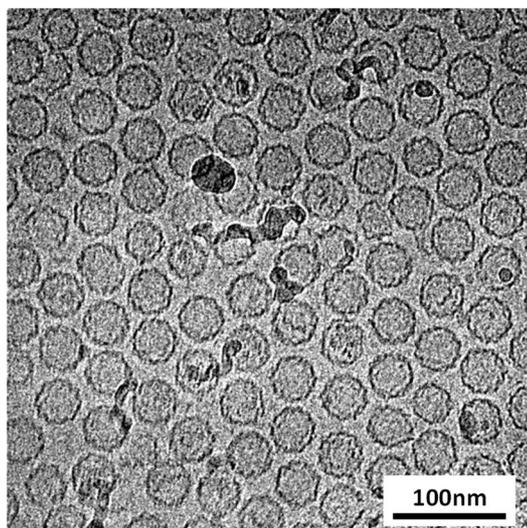


図4 GkEncのクライオ電子顕微鏡像

年に報告された *Quasibacillus thermotolerans* 由来のエンカプスリンと同様の単量体 240 個からなる正二十面体構造を形成していることが推定され、その立体構造モデルの構築を行った。エンカプスリンは、そのアミノ酸配列に応じて、60, 180, 240 量体を形成するものが存在することが明らかとなった。今後、構築した立体構造をもとに、単量体同士の相互作用や荷物タンパク質との相互作用を改変し、ナノ粒子の特性を改変することが可能であると考えられた。

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 1件）

1. 著者名 Hira Daisuke, Onoue Takuya, Oka Takuji	4. 巻 295
2. 論文標題 Structural basis for the core-mannan biosynthesis of cell wall fungal-type galactomannan in <i>Aspergillus fumigatus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 15407 ~ 15417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013742	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 Hira Daisuke, Matsumura Misa, Kitamura Ryuji, Furukawa Kenji, Fujii Takao	4. 巻 526
2. 論文標題 Unique hexameric structure of copper-containing nitrite reductase of an anammox bacterium KSU-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 654 ~ 660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.144	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 隈元詩織、平大輔
2. 発表標題 エンカプスリンナノ粒子カプセルを用いた難発現性タンパク質の精製
3. 学会等名 令和4年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石原沙季、立田祐琳亜、岡拓二、平大輔
2. 発表標題 外来タンパク質を内包するナノ粒子タンパク質発現系の構築
3. 学会等名 第71回 (2019年) 日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木旭、岡拓二、平大輔
2. 発表標題 タンパク質内包発現用カプセルとしてのエンカプスリンの改変
3. 学会等名 日本生物工学会九州支部長崎大会 (2019)
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
---------	---------