

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22252

研究課題名（和文）電子顕微鏡によるタンパク質折り畳み機構の解明：含重原子構造体による構造標識法

研究課題名（英文）Protein Folding Analysis:Protein Encapsulation within Heavy-Atom Containing Structures

研究代表者

藤田 大士（FUJITA, DAISHI）

京都大学・高等研究院・准教授

研究者番号：20713564

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質の近傍空間を化学構造体により取り囲む、すなわち空間的な修飾を施すアプローチにより、内部に包接したタンパク質を安定化、その構造解析を行う事を目指した。モデルタンパク質としてクチナーゼ様タンパク質を用いその安定化効果を検討したところ、熱、変性剤、有機溶剤に対して著しい安定化が得られた。特に有機溶剤に対しては1000倍を超える安定化効果が得られた。有機溶剤濃度を90%まで上昇させ室温で静置した所、内部のタンパク質の変性は観測されたものの、凝集等が生じることもなく、有機溶剤濃度を低下させれば再びフォールディングが生じた。すなわち仮説通り、フォールディングの中間状態安定化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質のフォールディング機構は、未だにわかっていないことが多い。研究の困難さの一つは、フォールディング途中の構造を、観測のために留め置くことができないためである。多くの場合、フォールディングの中途状態は疎水面が露出しているなど不安定なため、そのままでは凝集してしまう。自然界では、シャペロニンタンパク質と呼ばれる、正しいフォールディングを助ける役割のタンパク質が存在する。今回の研究は、合成した化学分子にて、シャペロニンタンパク質に相当する孤立空間を作成、狙い通りに中間状態を安定化することに成功した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to stabilize and analyze the structure of a protein encapsulated within a synthetic chemical cage, i.e., a spatial modification approach. Using a Cutinase-like enzyme as a model protein, we found that the stabilization effect was remarkable against heat, denaturing agents, and organic solvents. In particular, the effect for organic solvents was more than 1000-fold. When the organic solvent ratio was increased to 90% and left the sample at room temperature for a week, the caged proteins were denatured, but no aggregation was observed. Then the refolding of the structure occurred when the solvent conditions were restored. In summary, we succeeded in stabilizing the intermediate state of folding as hypothesized.

研究分野：化学

キーワード：タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

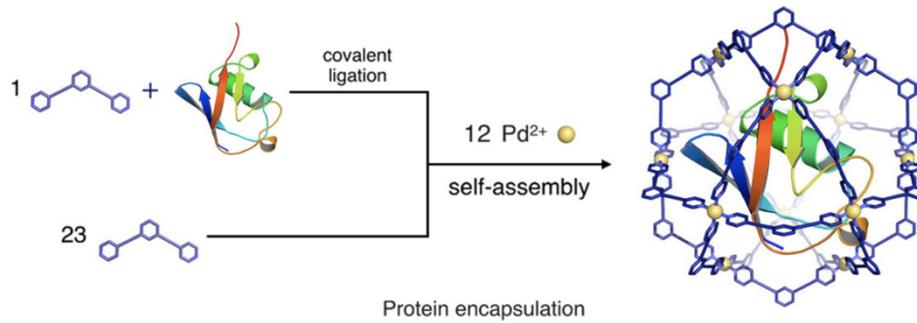
タンパク質の折り畳み機構に関する研究は、古くてかつ新しい研究課題である。この折り畳み問題は、タンパク質の立体構造が初めて解明された当初から学問的には興味ある問題として注目されてきたが、実験的にも理論的にも解くことが非常に難しく、未解明のまま40年以上の年月が経っている。他方で、1) タンパク質が本来あるべき立体構造が形成できないために発症するアミロイド疾患やプリオン病などに代表される疾患が知られてきたこと、2) 特に近年では、天然変性タンパク質（Intrinsically Disordered Proteins）のように形状が不安定で相互作用や自己凝集など形状変化を起こしやすいタンパク質種の存在が明らかになったこと、3) またコンピュータの発展により人工タンパク質の *de novo* 設計への足がかりが出来始めたことなどから、以前にも増して課題解決の重要性が高まっている。この課題解決へ繋がる測定手法の開発を試みるのが、本研究提案である。

## 2. 研究の目的

タンパク質のフォールディング機構研究の困難さの一つは、フォールディング途中の構造を、観測のために留め置くことができないためである。多くの場合、フォールディングの中途状態は疎水面が露出しているなど不安定なため、そのままでは凝集してしまう。自然界では、シャペロニンタンパク質と呼ばれる、正しいフォールディングを助ける役割のタンパク質が存在する。今回の研究は、合成した化学分子にて、シャペロニンタンパク質に相当する孤立空間を作成、中間状態を安定化することである。シャペロニンタンパク質は、巨大なタンパク質であるため、一般的な分析方法では内部に包接したタンパク質の構造情報まで迫るのは困難である。しかし必要最小限の骨格構造しかない合成分子で類似の機能を実現することができれば、現存する各種分析法にて構造解析を行うことが可能となる。

## 3. 研究の方法

本研究課題においては、タンパク質の近傍空間を化学構造体により取り囲む、すなわち空間的な修飾を施すアプローチにより（図参照）、上述した課題を乗り越える。このアプローチにより受けることができる恩恵は、以下の2点である。1) ターゲットとするタンパク質単分子の周辺空間に、多面体形状に重原子を配置することができる（図の例では、パラジウムイオンを立方多面体の形状で配置）。2) 化学構造体により作られる空間が、タンパク質単分子を他分子より隔離し、分子間相互作用を抑制する。これにより、例えば疎水部が露出した変性状態のタンパク質でも凝集・沈殿を起こすことなく安定に保持することが可能となる。



#### 4. 研究成果

包接するモデルタンパク質として、プラスチック分解酵素の一つであるクチナーゼ様酵素 (206 a.a., 21 kDa) を選択し、各種条件下での酵素活性評価を行った。その結果、第一にケージ化酵素も未修飾酵素とまったく同等の活性を有している事が示された。すなわちケージ化によるダメージ、運動の制限などはなく、また基質分子もケージの内外を拡散の制限なく行き来できていることを示している。またケージ化酵素は、例えば水:アセトニトリル=10:90 といった高有機溶媒濃度領域においても凝集、沈殿が生じない。熱や変性剤についても、著しい安定化効果がみられた。高有機溶媒濃度領域(水:アセトニトリル=10:90)で室温長時間静置した場合、酵素の反応プロファイルがシグモイド状に変化する事がわかった。詳細なフィッティング解析の結果、これは酵素リフォールディング過程が観測されている事がわかった。すなわち、隔離空間は分子シャペロンの様に働き、リフォールディングを促進していることがわかった。この 200 秒程度の時定数を有するリフォールディングの誘起は、タンパク質折り畳み機構の解明にとって非常に取り扱いやすい系である。すなわち狙い通り、フォールディングの中間状態安定化に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Daishi Fujita
2. 発表標題 Protein stabilization and refolding in a chaperonin-inspired synthetic cage
3. 学会等名 Academia Sinica / iCeMS Joint Symposium (国際学会)
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		
米国	ホワイトヘッド研究所		