

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32641

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21108013

研究課題名(和文)蛋白質ナノチューブを用いた機能分子システムの創製

研究課題名(英文)Synthesis of Functional Molecular Systems using Protein Nanotubes

研究代表者

小松 晃之(Komatsu, Teruyuki)

中央大学・理工学部・教授

研究者番号：30298187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,100,000円、(間接経費) 10,230,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質を機能階層的に組織化する方法により、中空シリンダー構造のナノチューブやコア-シェル型のナノクラスターを合成し、その分子配置や配列を利用した新しい機能の創出、さらにはそれらを用いた機能分子システムの創製に成功した。人工金属蛋白質、蛋白質ナノチューブ、蛋白質クラスターに関する成果を研究論文22報として発表。成果内容は、新聞、英国化学会誌(Chemistry World)などで紹介され、注目を集めている。

研究成果の概要(英文)：We synthesized cylindrical hollow structured nanotubes and core-shell structured nanoclusters by function hierarchical organization of plural proteins. New functionalities based on molecular arrangements appeared, and functional molecular systems have been constructed. The results on (i) artificial metalloproteins, (ii) protein nanotubes, and (iii) protein clusters were published as 22 research papers. Topics were highlighted by newspapers and Chemistry World (Royal Society of Chemistry), and are attracted considerable attention.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：高分子錯体 蛋白質 金属蛋白質 ナノチューブ クラスター 交互積層 分子捕捉 人工酸素運搬体

1. 研究開始当初の背景

(1)はじめに

生命現象の根幹を支え多彩な機能をつかさどる蛋白質は、進化の過程を経て最適化されてきた究極の超構造体である。その蛋白質を機能材料創製の基本ユニットとして用いる戦略は、合理的な分子設計の一つであり、バイオナノテクノロジーのフロンティアといえる。蛋白質を機能階層的に組織化したナノチューブやナノクラスターでは、ユニークな高次機能の発現が期待できる。

(2)人工金属蛋白質

ヒト血清アルブミン(HSA, MW: 66,500 Da)は血漿蛋白質の約60%を占める補欠分子族を持たない単純蛋白質であり、血流中ではコロイド浸透圧維持のほか、各種内因性・外因性物質(代謝産物や薬物など)を貯蔵・運搬する役割を担っている。Fe-プロトポルフィリンIX(FePP)もHSAのサブドメインIB内にTyr-161との軸配位を介して結合する。HSAは高い水溶性を持つばかりでなく、光や熱に対する安定性もきわめて高い。もしHSA-FePP錯体に望みの酵素活性を付与することができれば、様々な環境で作用する新しい人工酵素の一群が合成できることになり、その応用範囲はきわめて広い。もちろん蛋白質ナノチューブの構成成分としても有用な材料となる。

(3)蛋白質ナノチューブ

2005年、C. Martinら(Florida Univ.)は、グルコースオキシダーゼを多孔性酸化アルミナ膜の細孔内に積み重ね、最後にテンプレートをリン酸水溶液中で除去する鋳型内交互積層法により中空シリンドラー構造のナノチューブを初めて合成した(*Nano Lett.* **2005**, *5*, 231)。その後、いくつかの蛋白質ナノチューブが報告されたが、いずれもテンプレートを溶解する際にチューブが崩れてしまう欠点を解決することができず、応用展開には至らなかった。つまり、蛋白質ナノチューブを効率よく調製し、それを先端材料として利用した例はなかった。

(3)蛋白質クラスター

複数個の蛋白質を有機的に連結した構造明確な組織体では、それぞれの機能が連携・協奏して発現するため、蛋白質単独では見ることのできない多彩な機能が発現する。最も効率的な形態は蛋白質Aを核として、その周囲にいくつかの異種蛋白質Bを共有結合したコア-シェル型 AB_m 構造と考えられる。しかし、これまでそのような人工蛋白質クラスターを系統的に合成し、機能解析した例はほとんどなかった。

2. 研究の目的

本研究は、蛋白質・金属蛋白質・金属ナノ粒子などを所望の序列で階層的に組織化する方法により、構造明確なナノチューブやナノクラスターを合成し、その分子配置や配列を利用した新しい機能の創出、さらにはそれらを用いた機能分子システムの創製を目的とした。

3. 研究の方法

(1)人工金属蛋白質の合成と機能解析

HSA変異体(rHSA)は汎用の遺伝子組換え法により産生した。プラスミド(PHIL-D2 HSA)にQuikChangeを用いて変異を挿入後、ピキア酵母(GS115)内へ導入、rHSAを30°Cで培養した。精製は透析、Blue Sepharoseカラム処理により行い、目的のrHSAを単離した。得られたrHSAはSDS-PAGEにより単一バンドであることを確認。天然型HSA(HSA(wt))またはrHSAにFePPを包接し、各種HSA-FePP水溶液を調製した。

ペルオキシダーゼ活性はHSA-FePP錯体の水溶液に基質を加え、過酸化水素(H_2O_2)添加後の反応初速度(v_0)から K_m (Michaelis定数)、 k_{cat} (触媒速度定数)を算出し、評価した。スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)活性はシトクロームc法により評価した。さらに、カタラーゼ活性は残存する H_2O_2 濃度の定量、または発生酸素の定量により評価した。

(2)蛋白質ナノチューブの合成と機能解析

多孔性ポリカーボネート(PC)膜(直径: 25 mm, 孔径: 400 nm)にシリンジポンプを用いてポリ-L-アルギニン(PLA)水溶液を通し、純水で洗浄後、HSA水溶液を通過させ、再度純水で洗浄した。このサイクルを計3回行うことにより、細孔内に(PLA/HSA)₃の交互積層膜を作成した。PC膜をN,N-ジメチルホルムアミドで溶解後、沈殿物を素早く凍結乾燥することで、(PLA/HSA)₃ナノチューブを得た。同様な方法により、最内層に α -グルコシダーゼ、リパーゼ、コンカナバリンA、抗HBsAg抗体を配置したナノチューブ、さらにはフェリチン、金ナノ粒子を階層成分としたナノチューブを合成した。形態観察は、FE-SEM、TEM測定により行った。

最内層の酵素活性については、ナノチューブの水分散液に基質を入れ反応させた後、遠心分離でナノチューブを除去し、得られた上澄みに含まれる生成物を定量することにより評価した。

B型肝炎ウイルス(HBV)捕捉能は、ナノチューブを遠心分離で除去した後の上澄みに含まれるHBs抗原(HBsAg)量の測定(化学発光酵素免疫測定法)およびDNA量の測定(PCR法)により解析した。

(3) 蛋白質クラスターの合成と機能解析

ヘモグロビン(Hb)のリシン残基に α -(*N*-スクシンイミジル)- ω -マレイミド型架橋剤を反応させ、分子表面にマレイミド基を構築し、それを HSA 溶液中に滴下することにより(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(Hb-HSA₃)を合成した。HSA には還元型システインが1つ(Cys-34)しかないため、得られる分子は必ず Hb がコア、HSA がシェルのコア-シェル型構造となる。反応生成物は HSA 結合数の異なる多量体の混合物であったが、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によりクラスター成分を分取・単離した。酸素親和性は Hemox Analyzer を用いて測定し、 P_{50} (Hb の 50%に酸素が結合した際の酸素分圧)、Hill 係数(n)を決定した。

4. 研究成果

(1) 人工金属蛋白質の創製

HSA の内部に独自の精密化学空間を構築し、そこへ金属ポルフィリンや金属イオンを配位結合させることにより、機能デザインされた人工金属蛋白質の一群を合成した。

我々は部位特異的アミノ酸置換により HSA-FePP 錯体の軸配位子を Tyr から His に変換すると、得られた組換え HSA (rHSA)-FePP 錯体が Hb のように酸素を可逆的に吸脱着できることを見出している(*J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11286)。そこで、まずペルオキシダーゼ活性を有する rHSA-FePP 錯体の設計・合成を試みた。西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)のヘムポケット構造を模倣し、ポルフィリン環の真下にある Ile-142 を His(近位 His)に変換、さらに遠位 His を 182 位置に導入した(図 1A)。グアイアコール酸化反応における rHSA-FePP 錯体のペルオキシダーゼ活性は、天然型 HSA (wt)-FePP に比べ 17 倍に増大した。また、FePP を Mn-プロトポルフィリン IX (MnPP) に置き変えると、スーパーオキシド(O₂^{•-})不均化能(SOD 活性)を発揮することもわかった(図 1B)。HSA の N 末端に Cu²⁺イオンが結合することは古くから知られていたが、HSA-Cu 錯体が高い SOD 活性を有することも明らかにした。生体投与可能な O₂^{•-}消去剤として期待されている。

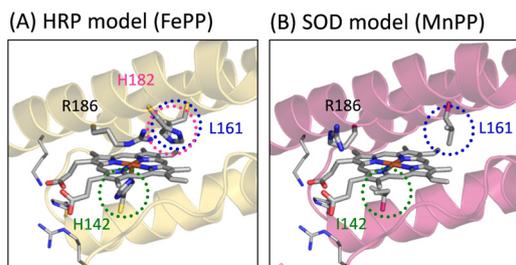


図 1. 人工金属蛋白質(rHSA-FePP 錯体)のヘムポケット構造 (A)ペルオキシダーゼモデル、(B)SOD モデル。

(2) 蛋白質ナノチューブの創製と機能展開

PC 膜をテンプレートとした鑄型内交互積層法により、蛋白質や金属蛋白質からなる中空シリンダー構造のナノチューブを合成した。得られたチューブの一次元内孔空間が、分子捕捉/酵素反応/物質合成に利用できることを実証した。さらに、金属ナノ粒子を階層成分として組み込んだナノチューブの微細構造と触媒能を解明。得られた中空管を基板表面に対して垂直に固定することで、高密度ナノチューブアレイを構築した。

多孔性 PC 膜(孔径: 400 nm)の内孔表面に HSA と PLA の交互積層(Layer-by-Layer)膜を作成し、最後にテンプレートを除去すると、均一で柔軟な蛋白質ナノチューブが得られた。チューブの外径は PC 膜の孔径により調節可能、複数の蛋白質を任意の順序で階層的に組織化することで、内孔/管壁/外表面にそれぞれ望みの機能が付与できる。例えば、最内層に α -グルコシダーゼを配置したナノチューブの内孔ではグルコピラノシドの加水分解、リパーゼを配置したナノチューブの内孔ではラクトンの開環重合が生起し、コンカナバリン A を配置したナノチューブの中にはデキストランが分子量依存的に取り込まれた。

フェリチン(Fr)は生体内で鉄イオンの捕捉・貯蔵の役割を担い、内部に直径 6 nm の酸化鉄コアを有する球殻状蛋白質(直径 12 nm)である。(PLA/Fr)₃ナノチューブを調製し、熱処理(500 °C)により有機成分を完全に除去すると、酸化鉄(α -Fe₂O₃)ナノ粒子(直径約 5 nm)のみからなるナノチューブが得られた。この赤褐色のナノチューブは超常磁性や高い光触媒活性を示す。また、Fr 内部の金属イオンを置換することで、酸化鉄以外の金属酸化物(CoO、CuO)ナノチューブも合成できることがわかった。

B型肝炎はHBVの感染により発症する肝疾患であり、肝硬変、肝癌へ進展する危険性を有する。感染能力のあるHBV(Dane 粒子: DP)は、直径42 nmのDNAウイルスで、その外殻はHBs抗原(HBsAg)から構成されている。最内層に抗HBsAg抗体を配置したナノチューブを調製、抗原-抗体反応を利用してDPのみをサイズ選択的に蛋白質ナノチューブの内孔へ捕捉することに成功した(捕捉率: 99.9%)。

これらの成果は、英国王立化学会誌 *Chemistry World* や新聞(日経産業新聞 2013.7.24)で紹介され、国内外から大きな注目を集めている。

ナノチューブの階層成分に金ナノ粒子(AuNP)を組み込むことも可能である(図 2)。HSA と AuNP からなるナノチューブを触媒として、NaBH₄による *p*-ニトロフェノールの還元反応を行ったところ、高い触媒活性が観測された。また、AuNP を含むナノチューブは比較的剛直なため、ガラス基板上に共有結合

で固定することもできる。内孔にチューブを保持した PC 膜を α, ω -ビス(スクシンイミジル)架橋剤を介してアミノ化ガラス上に密着させ PC 膜を溶解除去すると、ガラス表面に垂直かつ高密度に配列したナノチューブアレイが得られた。バイオチップ(リアクター、センサー)、分子捕捉素子としての応用が期待される。



図 2. 金ナノ粒子を階層成分とす蛋白質ナノチューブとその応用.

(3) 蛋白質クラスターの創製

Hb を核として、その分子表面に HSA を結合したコア-シェル型の(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(Hb-HSA₃)を合成した(図 3)。その構造と酸素配位能を明らかにするとともに、HSA ユニットに仕掛けた機能により Hb の酸素結合能を制御することに成功した。

Hb-HSA₃ クラスターの蛋白質定量、CD スペクトル測定から HSA/Hb 比 = 3 を確認。クラスターの等電点(pI)は 5.1 と低く、HSA の値とほぼ同等であったことから、分子表面は HSA で覆われていると考えられる。

Hb-HSA₃ クラスターの AFM 像(水中)には多くの三角形構造が見られ、Hb の周囲に HSA が 3 分子結合した形状が確認された(図 3)。さらに、TEM 像(6,567 個)からクラスター分子の三次元再構成を行い、立体構造を解明した。Hb-HSA₃ の P_{50} は 9 Torr、Hill 係数(n)は 1.5 (37°C)と低く、ヒト赤血球($P_{50} = 27$ Torr、 $n = 2.7$)に比べ酸素親和性は高い。

一般に赤血球内部で自動酸化した metHb は、フラビン蛋白質を介する metHb 還元系により還元される。Hb-HSA₃ クラスターの HSA ユニットにフラビン誘導体を包接し、外部添加した NADH から内部への電子伝達経路を構築すると、中心 metHb が徐々に還元された。

また、HSA ユニットに活性酸素消去能を有する白金ナノ粒子(直径 1.8 nm)や MnPP を結合させたハイブリッドクラスターは、H₂O₂ 水溶液中でも酸素化 Hb 部位が安定に保たれることがわかった。

本研究で得られた Hb-HSA₃ クラスターは、安全性・有効性の高い新しい人工酸素運搬体(赤血球代替物)として期待され、現在、実用化に向けた開発が進んでいる。これらの成果は、新聞(日経産業新聞 2013.5.14)で報道され、医療分野から大きな関心を集めている。

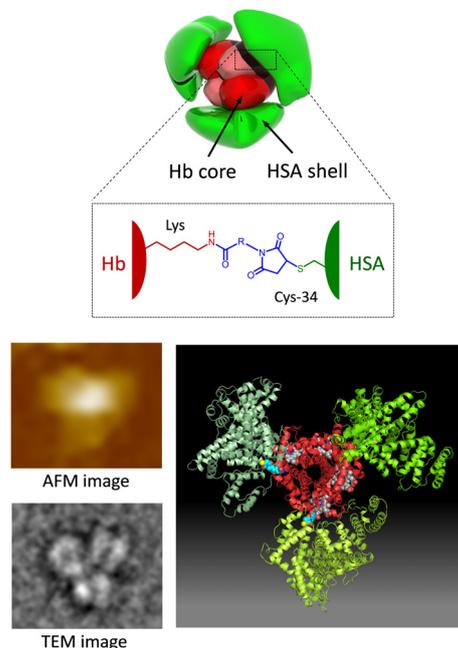


図 3. (ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(Hb-HSA₃)の構造.

以上、蛋白質ナノチューブや蛋白質ナノクラスターの基礎化学を確立するとともに、それらを用いた機能分子システムの創製に成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 22 件)

- ① “Fluorescent Dimer and Fiber of *meso*-Tetrakis{*o*-(isonicotinoylamino)phenyl}porphyrin Connected by Pd(II) Coordinations”, S. Kasuya, Y. Yamazawa, N. Sugimura, T. Shibue, T. Komatsu, *Chem. Lett.* **2014**, 43, 掲載決定 (査読有)
DOI: 10.1246/cl.140243
- ② “Superoxide Dismutase Activity of the Naturally Occurring Human Serum Albumin-Copper Complex without Hydroxyl Radical Formation”, R. Kato, M. Akiyama, H. Kawakami, T. Komatsu, *Chem. Asian J.* **2014**, 9, 83-86. (査読有)
DOI: 10.1002/asia.201301285
- ③ “Gold Nanoparticle Inclusion into Protein Nanotube as a Layered Wall Component”, S. Goto, Y. Amano, M. Akiyama, C. Böttcher, T. Komatsu, *Langmuir* **2013**, 29, 14923-14930. (査読有)

- DOI: 10.1021/la403283x
- ④ “Human Serum Albumin Mutants Complexed Mn(III) Protoporphyrin IX as Superoxide Dismutase Mimics”, R. Kato, Y. Kobayashi, M. Akiyama, T. Komatsu, *Dalton Trans.* **2013**, 42, 15889–15892. (査読有)
DOI: 10.1039/C3DT51418H
- ⑤ “Covalent Core-Shell Architecture of Hemoglobin and Human Serum Albumin as an Artificial O₂ Carrier”, D. Tomita, T. Kimura, H. Hosaka, Y. Daijima, R. Haruki, Kai Rudwig, C. Böttcher, T. Komatsu, *Biomacromolecules* **2013**, 14, 1816–1825. (査読有)
DOI: 10.1021/bm400204y
- ⑥ “Human Serum Albumin-Based Peroxidase Having an Iron-Protoporphyrin IX in Artificial Hemepocket”, K. Watanabe, N. Ishikawa, T. Komatsu, *Chem. Asian J.* **2012**, 7, 2534–2537. (査読有)
DOI: 10.1002/asia.201200373
- ⑦ “Protein-Based Nanotubes for Biomedical Applications”, T. Komatsu, *Nanoscale* **2012**, 4, 1910–1918 (*Feature Article, Inside Front Cover*) (査読有)
DOI: 10.1039/C1NR11224D
- ⑧ “Human Serum Albumin Nanotubes with Esterase Activity”, T. Komatsu, T. Sato, C. Böttcher, *Chem. Asian J.* **2012**, 7, 201–206. (査読有)
DOI: 10.1002/asia.201100606
- ⑨ “Protein Nanotubes Arrays Immobilized on Solid Substrates: Molecular Trap in Aqueous Medium”, R. Kato, T. Komatsu, *Chem. Lett.* **2011**, 40, 1338–1339 (査読有)
DOI: 10.1246/cl.2011.1338
- ⑩ “Virus Trap in Human Serum Albumin Nanotube”, T. Komatsu, X. Qu, H. Ihara, M. Fujihara, H. Azuma, H. Ikeda, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 3246–3248. (査読有)
DOI: 10.1021/ja1096122
- ⑪ “Protein Nanotubes with an Enzyme Interior Surface”, T. Komatsu, H. Terada, N. Kobayashi, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 1849–1854. (査読有)
DOI: 10.1002/chem.201001937
- ⑫ “Solid Nanotubes Comprising α -Fe₂O₃ Nanoparticles Prepared from Ferritin Protein”, X. Qu, N. Kobayashi, T. Komatsu, *ACS Nano* **2010**, 4, 1732–1738. (査読有)
DOI: 10.1021/nn901879d
- ⑬ “Molecular Capture in Protein Nanotubes”, X. Qu, T. Komatsu, *ACS Nano* **2010**, 4, 563–573. (査読有)
DOI: 10.1021/nn901474y
- ⑭ “The Role an Amino Acid Triad at the Entrance of the Heme Pocket in Human

Serum Albumin for O₂ and CO Binding to Iron Protoporphyrin IX”, T. Komatsu, A. Nakagawa, S. Curry, E. Tsuchida, K. Murata, N. Nakamura, H. Ohno, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 3836–3841. (査読有)

DOI: 10.1039/B909794E

- ⑮ “Structural and Mutagenic Approach to Create Human Serum Albumin-Based Oxygen Carrier and Photosensitizer”, T. Komatsu, A. Nakagawa, X. Qu, *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2009**, 24, 287–299. (査読有)
DOI: 10.2133/dmpk.24.287
- ⑯ “Artificial Oxygen Carriers, Hemoglobin Vesicles and Albumin-Hemes Based on Bioconjugate Chemistry”, E. Tsuchida, K. Sou, A. Nakagawa, H. Sakai, T. Komatsu, K. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 1419–1440. (*Review, Cover Image*) (査読有)
DOI: 10.1021/bc800431d

その他、雑誌論文 6 件(査読有)

[学会発表] (計 68 件)

- ① T. Komatsu, “Core-Shell Architecture of Hemoglobin and Human Serum Albumin as an Artificial O₂ Carrier”, International Symposium on Coordination Programming 2014, Tokyo, 2014 年 1 月 21 日 (招待講演)
- ② T. Komatsu, “Protein Nanotubes for Biomedical Applications”, 12th International Conference on Polymers for Advanced Technologies, Berlin (Germany) 2013 年 10 月 2 日 (招待講演)
- ③ T. Komatsu, “Protein Nanotubes for Biomedical and Catalytic Applications”, IUPAC 15th International Symposium on Macromolecular Complexes, Greenville, SC (USA) 2013 年 8 月 15 日 (招待講演)
- ④ T. Komatsu, “Artificial Hemoproteins Comprising Human Serum Albumin Mutants Complexed with Iron Protoporphyrin IX”, 7th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, Jeju (Korea) 2012 年 7 月 7 日 (招待講演)
- ⑤ T. Komatsu, “Artificial Hemoproteins Comprising Human Serum Albumin Complexed with Iron Protoporphyrin IX in a Tailor-Made Heme Pocket”, 12th Eurasia Conference on Chemical Sciences, Corfu (Greece) 2012 年 4 月 21 日 (招待講演)
- ⑥ T. Komatsu, “Biomolecular Capture in Protein Nanotubes”, 2011 East Asian Symposium on Polymers for Advanced Technology, Jeju (Korea) 2011 年 6 月 14 日 (招待講演)
- ⑦ T. Komatsu, X. Qu, “Protein Nanotubes for Biomolecular Separation”, 5th IUPAC International Conference on Novel Materials and their Synthesis 19th International

Symposium on Fine Chemistry and Functional Polymers, Shanghai (China) 2009年10月21日 (招待講演)

その他、招待講演 5 件、依頼講演 4 件、国内一般発表 45 件、国際会議発表 7 件

[図書] (計 1 件)

- ① “Albumin-Heme Oxygen Carriers”, T. Komatsu, *Hemoglobin-Based Oxygen Carriers as Red Cell Substitutes and Oxygen Therapeutics*, Eds. H. W. Kim, A. G. Greenburg, p. 339–348 (Chapter 18), Springer-Verlag (Berlin Heidelberg, 2013).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：ヘモグロビン-アルブミン複合体、並びに該複合体を含む人工血漿増量剤及び人工酸素運搬体

発明者：小松晃之、富田大樹

権利者：中央大学

種類：特許

番号：PCT/JP2012/001118

出願年月日：2012年2月20日

国内外の別：PCT

[その他]

(1) ホームページ

研究代表者が中央大学へ異動(2010年度)したのを契機に、中央大学理工学部応用化学科の web サイト内に「小松研究室」ホームページ(日本語版と英語版)を開設、本研究で得られた成果を随時国内外に向け発信している。

<http://www.chem.chuo-u.ac.jp/~komatsu-lab/index.html>

(2) 研究紹介・記事

- ① 日経産業新聞 2013年7月24日
“たんぱく質からナノチューブ -中大が作成技術-”
② 日刊工業新聞 2013年5月14日

“人工酸素運搬体新たに合成”

- ③ 日経バイオテク 2013年5月14日
“中央大の小松晃之教授ら、ヘモグロビンをアルブミンで包み込んだ人工酸素運搬体の成果を論文発表”
④ マイナビニュース 2013年5月14日
“中央大、製造しやすく常温で長持ちして血液型を選ばない人工血液を開発”
⑤ プレスリリース(中央大学)2013年5月13日
“酸素を輸送できるタンパク質クラスターの合成に成功”
⑥ *Chemistry World* (Royal Society of Chemistry), 2011, February.
“Protein nanotubes traps viruses”

など

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 晃之 (KOMATSU, Teruyuki)
中央大学・理工学部・教授
研究者番号：30298187

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

秋山元英 (AKIYAMA, Motofusa)
中央大学・理工学部・助教
研究者番号：90467697
(2012~2013年度)

CURRY, Stephen
Imperial College London・教授
(2009~2013年度)

BÖTTCHER, Christoph
Freie Universität Berlin・博士
(2010~2013年度)