

令和元年6月11日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04177

研究課題名(和文)細胞内結晶化反応を利用した精密多層蛋白質材料の創成

研究課題名(英文)In cell synthesis of multy-layer protein crystals

研究代表者

上野 隆史 (Ueno, Takafumi)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：70332179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、蛋白質からなる分子集合体を生体機能材料のテンプレートとしたバイオテクノロジー応用が期待されている。本研究では、固体材料としての利用が注目されている蛋白質結晶の機能化に焦点をあて、従来の人工多孔性材料でも困難とされていた精密多層構造の構築を達成した。特に、細胞内結晶化反応で結晶を形成する昆虫ウイルス由来の蛋白質「多角体」にターゲットを絞り、多角体結晶への外来分子の精密多層集積から新しい生体機能材料合成の領域を開拓した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果の学術的意義や社会的意義は、細胞内結晶化を用いることにより、これまで解決が困難とされていた蛋白質の迅速・大量合成、安定化を劇的に改善し、精製した蛋白質からの結晶化が常識であった蛋白質結晶化の概念をも根本から変える材料作成法となる。従って、機能材料としての蛋白質結晶利用の可能性が格段に広がり、実用化にも近いバイオマテリアルとなりうる。具体的には、多角体結晶の安定性と生体適合性を生かした酵素の迅速合成と長期保存、ワクチンや細胞外マトリックスの開発等、複雑な医薬品合成の軽減や、我が国の課題である医療費負担の大きな削減を可能とする技術につながると確信する。

研究成果の概要(英文)：In recent years, biotechnological applications in which a molecular assembly consisting of proteins is used as a template for biofunctional materials are expected. In this study, we focused on the functionalization of protein crystals, which is attracting attention for use as a solid material, and achieved the construction of a precise multilayer structure that was considered difficult even with conventional artificial porous materials. In particular, we focused on the protein "polyhedra" derived from insect viruses that form crystals with the intracellular crystallization reaction and established a new biofunctional material synthesis with the precise multi-layer accumulation of foreign proteins in the polyhedron crystals.

研究分野：化学

キーワード：タンパク質結晶 タンパク質工学 超分子化学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ナノマテリアル分野の急速な発展により、蛋白質集合体の特異なナノ構造に着目した研究が盛んにおこなわれている。蛋白質をビルディングブロックとし、ケージやチューブ、リングに代表されるような多彩な集合体の合成が報告されているものの、ほとんどは機能材料には至らない。その理由は、蛋白質集合体の特徴的な構造を保持したまま、機能を発現する分子設計指針が確立されていないためである。一方、天然では、ウイルスに代表されるように、蛋白質の集合化により構築されるナノ空間を用いた核酸の貯蔵や輸送、さらには、マイクロコンパートメントのようにケージ内部に異なる酵素を集積した多層空間を構築し、円滑なカスケード反応を実現している。従って、蛋白質集合体が形成する特殊な反場を新しい物質合成につなげるには、**蛋白質集合体の精密な多層構造作成の設計指針の確立が、革新的な機能材料を生み出す大きな鍵を握る。**

近年、これまでの欠点を克服する蛋白質集合体として、蛋白質結晶が注目されている。蛋白質結晶は蛋白質が規則正しく配列した固体状態の蛋白質集合体であり、結晶内部には溶媒チャンネルと呼ばれるナノ細孔が形成され、その細孔特性はゼオライトやメソポーラスシリカに匹敵する。また、結晶化により、溶液中の蛋白質や、ランダム会合した状態に比べ、蛋白質の安定性が飛躍的に向上することが知られている。代表者は、それらの特徴を生かし、蛋白質結晶中の溶媒チャンネルを用いた無機材料の合成、光励起電子伝達、触媒反応、精密化学修飾等を報告しており、溶液中の蛋白質集合体では制御が難しい触媒反応を施すことによってはじめてリサイクルや非水溶液中の使用に耐えることができる。また、大量に入手できる安定な蛋白質結晶は限られており、リゾチームを含む数種類の蛋白質の利用にとどまっている。従って、既存の蛋白質機能化技術の融合だけでは、さらなる蛋白質結晶材料の作成は困難であり、これまでにない新概念の確立が急務となっている。つまり、**(1) 蛋白質の精製・結晶化操作が不要の蛋白質結晶化、(2) 化学処理が不要な安定な蛋白質結晶の作成、(3) 多様な蛋白質集積に対応できる結晶化プロセス**を満足する方法論の開発が必要不可欠となっている。この課題を克服する解決策の一つとして、**細胞内蛋白質結晶化反応**が挙げられる。昆虫ウイルスが昆虫細胞に感染する際、ウイルスと同時に、結晶性蛋白質である「**多角体**」が産生され、結晶化の際にウイルス粒子を包埋し、その保護の機能を担うことが知られている。この多角体結晶を機能材料として用いることができれば、結晶化に関わる煩雑な操作が不要となるばかりではなく、遺伝子工学的手法によって、蛋白質をはじめとする様々な分子を内包した機能化蛋白質結晶の作成が可能となる。代表者はすでに、多角体結晶内部への金属錯体から蛋白質まで幅広いサイズの外来分子の内包を実現してきた。そこで、本研究では、さらなる**蛋白質結晶の精密機能化に向けて、従来の人工の多孔性材料でも困難とされている精密多層構造を持つ機能化結晶の作成に焦点を絞った。**

2. 研究の目的

昆虫ウイルスが宿主昆虫細胞内に作るタンパク質微結晶である多角体は、その高い化学的・物理的安定性によって、中に内包したウイルス粒子の増殖能を保持しながら、ほかの昆虫個体にまで運搬をすることができる。本研究で用いたカイコ細胞質多角体病ウイルスの多角体を構成する polyhedrin の N 末端にある α -ヘリックス(H1)を付加したタンパク質は、多角体への内包化と、安定化が可能となることから、この多角体はタンパク質の活性を保護し運搬するためのコンテナとしての利用が期待できる。これまでのところ複数種の H1 付加タンパク質を意図的に配置して内包化することはできていない。もし、H1 付加タンパク質を多角体のより深い部分にまで内包させることでその内包量を増やし、さらに、複数種の H1 付加タンパク質を多角体の深層部と表層部に分けて内包化することができれば、その多角体を溶解した際、溶解の度合いによって放出される H1 付加タンパク質が段階的に切り替わる新たなタンパク質のコンテナを開発できると考えた。本研究では、蛍光タンパク質である EGFP や DsRed に H1 を付加し、これらの細胞内での蛍光タンパク質の結晶内包を制御し多層構造多角体形成を検討した。

3. 研究の方法

1. H1-EGFP 発現ウイルスと polyhedrin 発現ウイルスの共感染

H1-EGFP 発現ウイルスを昆虫細胞である Sf21 細胞に接種した後に polyhedrin 発現ウイルスを接種することで H1-EGFP 内包多角体を作製した。EGFP の確認は共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた。

2. H1-EGFP、polyhedrin、H1-DsRed 発現ウイルス共感染

Sf21 細胞への H1-EGFP 発現ウイルス接種後に polyhedrin ウイルスを接種し、さらに H1-DsRed 発現ウイルスを接種することで多角体を作製した。作製条件の異なる多角体の形態を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

3. H1-EGFP 安定発現 Sf21 細胞を用いた多角体作製

H1-EGFP 安定発現 Sf21 細胞に polyhedrin 発現ウイルスを接種することで得られる多角体を観察した。いずれの観察も共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた。

4. 研究成果

1. H1-EGFP 発現ウイルスと polyhedrin 発現ウイルスの共感染

H1-EGFP 発現ウイルス接種と polyhedrin 発現ウイルス接種の時間差が大きくなるほど形成される多角体の大きさは小さくなり、形成個数も少なくなる傾向が見られた。

2. H1-EGFP、polyhedrin、H1-DsRed 発現ウイルス共感染

H1-EGFP、H1-DsRed いずれか一方のみ内包したもの、いずれも内包していないもの、あるいはいずれも内包することで黄色の蛍光を発するものなどが見られた。

3. H1-EGFP 安定発現 Sf21 細胞を用いた多角体作製

H1-EGFP 安定発現 Sf21 細胞に polyhedrin 発現ウイルスを感染させて得た多角体を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察したところ、H1-EGFP と H1-DsRed 両方を内包したものは内側が緑色、外側が赤色を呈していた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件) 全て査読あり

- (9) T. K. Nguyen, H. Negishi, S. Abe, and T. Ueno*
Construction of Supramolecular Nanotubes from Protein Crystals
Chem. Sci., 10, 1046-1051 (2019). DOI: [10.1039/C8SC04167A](https://doi.org/10.1039/C8SC04167A).
- (8) F. Hyodo,* T. Sho, B. Maity, K. Fujita, Y. Tachibana, S. Akashi, M. Mano, Y. Hishikawa, M. Matsuo, T. Nakaji, and T. Ueno *
Photo-induced In Vivo MRI Imaging with Rapid CO Release from an MnCO-Protein Needle Composite
Chem. Euro. J., 24, 11578-11583 (2018).
- (7) H. Mori, N. Oda, S. Abe, T. Ueno, W.L. Zhu, C. Pernstich, G. Pezzotti
Raman spectroscopy insight into Norovirus encapsulation in Bombyx mori cypovirus cubic microcrystals
Spectrochim. Acta A, 203, 19-30 (2018).
- (6) H. Negishi, S. Abe*, K. Yamashita, K. Hirata, K. Niwase, M. Boudes, F. Coulibaly, H. Mori, and T. Ueno *
Supramolecular protein cages constructed from a crystalline protein matrix
Chem. Commun., 54, 1988-1991 (2018).
- (5) H. Tabe, H. Takahashi, T. Shimoi, S. Abe, T. Ueno *, Y. Yamada*
Photocatalytic hydrogen evolution systems constructed in cross-linked porous protein crystals
Appl. Catal., B, 237, 1124-1129 (2018).
- (4) S. Ryu, Y. Matsumoto, T. Matsumoto, T. Ueno, Y. R. Silberberg, and C. Nakamura*
Improved efficiency of nanoneedle insertion by modification with a cell-puncturing protein
Jpn. J. Appl. Phys., 57, 03EB02 (2018).

- (3) S. Abe*, K. Atsumi, K. Yamashita, K. Hirata, H. Mori, and T. Ueno *
Structure of in cell protein crystals containing organometallic complexes
PCCP, 20, 2986-2989 (2018).
- (2) B. Maity, S. Abe, and T. Ueno*
Observation of gold sub-nanocluster nucleation within a crystalline protein cage
Nat. Commun., 8,14820 (2017).
- (1) S. Abe*, H. Tabe, H. Ijiri, K. Yamashita, K. Hirata, K. Atsumi, T. Shimoi, M. Akai, H. Mori, S. Kitagawa and T. Ueno *
Crystal Engineering of Self-Assembled Porous Protein Materials in Living Cells
ACS Nano, 11, 2410-2419 (2017). DOI:[10.1021/acsnano.6b06099](https://doi.org/10.1021/acsnano.6b06099)

〔学会発表〕 (計 18 件)

- (18) T. Ueno, Bioinorganic Design of Protein Assembly
2019 KAIST School of Molecular Science BK21 Workshop, KAIST, Korea,
18/Feb/2019 (Keynote lecture)
- (17) T. Ueno, Protein crystals for designing biosupramolecular materials
Tokyo Tech NCCR Molecular Systems Engineering Joint Symposium, Basel,
Switzerland, 11/Feb/2019 (Invited Lecture)
- (16) T. Ueno, Artificial metalloproteins constructed with protein assemblies for bionano
applications
The 9th Asian Biological Inorganic Conference, Singapore, 11/Dec/2018
(Invited Lecture)
- (15) T. Ueno, Artificial metalloproteins constructed with protein assemblies for
bioinorganic materials
The 18th Japan-Korea Joint Symposium on Organometallic and Coordination
Chemistry, Yokkaichi, Japan, 1/Nov/2018 (Invited Lecture)
- (14) T. Ueno, Dynamic Function of Crystalline Protein Assembly
ACSIN-14 & ICSPM26, Nanobiology, Sendai, Japan, 23/Oct/2018 (Invited Lecture)
- (13) T. Ueno, Dynamic Process of Proteins Observed in Crystalline Cages
The 79th Okazaki Conference Synthetic, Biological, and Hybrid Molecular Engines,
Okazaki, Japan 2/Sep/2018 (Invited Lecture)
- (12) T. Ueno, Functions designed in Crystalline Protein Assembly
JST Fujita ACCEL International Symposium, Coordination Chemistry for Structural
Elucidation, ICC2018, Sendai, Japan, 4/Aug/2018 (Keynote lecture)
- (11) T. Ueno, Metal Coordination and Function Designed in Protein Assembly
2018 Korea-Taiwan-Japan Bioinorganic Chemistry Symposium
KAIST, Korea, 1/June/2018 (Invited Lecture)
- (10) T. Ueno, Metal Coordination Functions Designed in Protein Cage
3rd Japan-UK Joint Symposium on Coordination Chemistry, Univ. of St Andrews,
Scotland, 1/May/2018 (Invited Lecture)
- (9) T. Ueno, “Construction of Protein Needle and the Application for In Vivo MRI
imaging”
KAIST-Tokyo Tech Bio Joint Workshop, KAIST, Daejeon, Korea, 22/Feb/2018
(Invited Lecture)
- (8) T. Ueno, “Design of Protein Assembly for Supramolecular materials”
Post-Mini workshop of Tokyo Tech Life Science and Technology International
Symposium, “New Frontiers of Supramolecular Chemistry in Non-equilibrium
Systems”, Tokyo Tech, Tokyo 11/Jan/2018 (Invited Lecture)
- (7) T. Ueno, “DESIGN OF PROTEIN ASSEMBLY FOR BIOINORGNIC MATERIALS”
11th Japan-China Joint Symposium on Metal Cluster Compounds, Nagoya Univ.,

Nagoya, 09/Oct/2017 (Invited Lecture)

- (6) T. Ueno, “Design of Bioinorganic Materials Constructed by Coordination Chemistry”
6th Asian Conference on Coordination Chemistry Melbourne, Australia, 25/Jul/2017
(Invited Lecture)
- (5) T. Ueno, “Functional Design of Protein Cage for Sustainable Bionanomaterial”
ASPIRE FORUM 2017, NTU, Singapore, 13/July/2017 (Invited Lecture)
- (4) T. Ueno, “Artificial Protein Architectures Designed by Crystal Engineering”
Session: Science of mobility-coupled functional molecular machines, The 17th Annual
Meeting of the Protein Science Society of Japan, Sendai, 22/Jun/2017
- (3) T. Ueno, “Design of Protein Assemblies as Molecular Templates”
10th China-Japan Joint Symposium on Functional Supramolecular Architectures,
Wuhan University, Wuhan, China, 16/May/2017 (Invited Lecture)
- (2) T. Ueno, “Design of Protein Assemblies as Supramolecular Platforms”
Frontier Bioorganization Forum 2017, “Dynamical ordering and integrated functions
of biomolecular systems”, Academia Sinica, Taipei, 25/Apr/2017 (Invited Lecture)
- (1) T. Ueno, “CO Releasing Bioinorganic Nanomaterials for CO Gas Biology”
The International Advanced Drug Delivery Symposium 2017
Taipei, 06/Apr/2017(Invited Lecture)

〔図書〕(計 1 件)

上野隆史

人工金属酵素の次世代設計

生命機能に迫る分子化学 (CSJ カレントレビュー30、化学同人) 204 ページ.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 5 件)

- (5) 発明者：上野隆史、亀山志織
発明の名称：融合タンパク質及びその使用
権利者：国立大学法人東京工業大学
種類：特許、出願番号：特願 2018-088420, 出願日：2018年5月1日 国内
- (4) 発明者：金丸周司、上野隆史、岩崎博史
発明の名称：ヘテロタンパク質ケージ
権利者：国立大学法人東京工業大学
種類：特許、出願番号：特願 2017-227140, 出願日：2017年11月27日 国内
- (3) 発明者：上野隆史、吉川健吾、真野恵、片山和彦、三木元博、戸高 玲子
発明の名称：複合ポリペプチド単量体、細胞浸透機能を有する当該単量体の会
合体、及び、当該会合体を有効成分とする免疫賦活剤
権利者：デンカ株式会社
種類：特許、出願番号：特願 2016-207417, 出願日：2016年10月23日 国内
- (2) 発明者：上野隆史、安部聡、笠松誠
発明の名称：改変ポリヘドリンタンパク質及びその使用
出願人：国立大学法人東京工業大学
種類：特許、出願番号：特願 2016-171201, 出願日：2016年9月1日 国内
- (1) 発明者：田中 良和、松野 明日香、北村 朗、金城 政孝、姚 閔、上野 隆
史、安部 聡
発明の名称：ヘモシアニン会合体を用いた包摂体の製造方法
権利者：国立大学法人北海道大学
種類：特許、出願番号：特願 2016-110309, 出願日：2016年6月1日 国内

○取得状況（計 2 件）

- (2) 発明者：上野 隆史、田部 博康、藤田 健太
発明の名称：多角体一標的分子複合体の製造方法、多角体一標的分子複合体、タンパク質及び核酸
権利者：国立大学法人東京工業大学
種類：特許、出願番号：特願 2014-35149, 出願日：2014 年 2 月 26 日
登録日：2018 年 12 月 28 日
国内
- (1) 発明者：上野 隆史、稲葉 央、深井 俊宏、有坂 文雄、金丸 周司
発明の名称：標的タンパク質の細胞内導入剤及び標的タンパク質の細胞内導入方法
権利者：国立大学法人東京工業大学
種類：特許、出願番号：特願 2014-39644, 出願日：2014 年 2 月 28 日
登録日：2018 年 3 月 16 日
国内

〔その他〕
ホームページ等 <http://www.ueno.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：古田 忠臣
ローマ字氏名：FURUTA TADAOMI
所属研究機関名：東京工業大学
部局名：生命理工学院
職名：助教
研究者番号（8桁）：10431834

研究分担者氏名：森 肇
ローマ字氏名：Mori Hajime
所属研究機関名：京都工芸繊維大学
部局名：応用生物学系
職名：教授
研究者番号（8桁）：80201812

(2)研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。