

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：63903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06837

研究課題名(和文)環境変化応答性人工蛋白質ナノブロック開発と自己組織化ナノ構造形成ダイナミクス解析

研究課題名(英文)Structural transition of de novo proteins and reconstruction of protein nanobuilding block complexes.

研究代表者

小林 直也 (KOBAYASHI, Naoya)

分子科学研究所・協奏分子システム研究センター・特任研究員

研究者番号：60781945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、人工蛋白質の環境変化に応答した会合状態及び構造の変化を詳細に調べることにより、単量体と二量体の間をダイナミックに構造変化する環境変化応答性人工蛋白質を設計開発すること、さらにそれらの環境変化応答性人工蛋白質を蛋白質ナノブロックとして応用し、自己組織化ナノ構造形成のダイナミクスを解析することを目的とする。特に、pH変化に応答する人工蛋白質や蛋白質ナノブロックの設計開発及び解析に取り組むことにより、環境変化に応答するナノ構造空間の創成及び制御を目指す。

研究成果の概要(英文)：The purposes of this research are to design environmental change responsive artificial proteins which dynamically changes the structure between monomer and dimer, to investigate association state of the proteins in response to environmental change, and to analyze the dynamics of self-assembled nanostructure formation by applying these environmental change responsive artificial proteins as protein nanobuilding blocks. In particular, we aim to create and control protein nanostructures responding to environmental changes by development and analysis of artificial proteins and protein nanoblocks responsive to pH changes.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：人工蛋白質 蛋白質ナノブロック 自己組織化 環境変化応答 ダイナミクス解析

## 1. 研究開始当初の背景

これまでにアミノ酸配列を新規に設計創製する新規人工蛋白質(*de novo protein*: デノボ蛋白質)の創製及び構造機能解析研究を行ってきた。2012年に、非常に安定で原始的な酵素活性を持つ新規人工蛋白質 WA20 の X 線結晶構造解析に成功し、ユニークで新奇なドメインスワップ4本ヘリックス二量体構造を形成することを発見した (Arai, R., et al. *J. Phys Chem. B* **116**, 6789-6797, 2012)。この WA20 は長い  $\alpha$  ヘリックス2本をループでつないだヌンチャク型構造の単量体が互いに相手を挟み込んで安定な二量体を形成する特長的構造を有していた。そこで、この構造特徴を活かして、自己組織化するブロック分子である人工蛋白質ナノブロックを開発した。

人工蛋白質ナノブロックの第一弾として、多面体構造を自己組織的に構築する「辺と頂点をつくる人工蛋白質ナノブロック」を開発した。この人工蛋白質ナノブロックは、多面体構造の辺となる部分に WA20 を持ち、頂点となる部分に T4 ファージの尾部繊維蛋白質由来の三量体形成 Foldon ドメインを持つ融合蛋白質である。Native PAGE や、ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製及び各種分子量測定や、小角 X 線溶液散乱解析を行ったところ、6 量体の樽型構造及び 12 量体の正四面体型構造を同時に形成することを明らかにした (Kobayashi, N. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 11285-11293, 2015)。

人工蛋白質ナノブロックの第二弾として「辺を伸長する人工蛋白質ナノブロック」タンデム WA20 を開発した。この人工蛋白質ナノブロックは、柔軟性と長さの異なる2種類のリンカーを介して人工蛋白質 WA20 を直列に2個連結した構造を持つ融合タンパク質である。タンデム WA20 は、環状の自己組織化ナノ構造の形成や、変性・リフォールディングによる複数種類の人工蛋白質ナノブロックの再構成から直鎖状の自己組織化ナノ構造複合体の形成を示した (Kobayashi, N. *ACS Synth. Biol.* **7**, 1381-1394, 2018)。

これらの人工蛋白質ナノブロックの会合・解離を自在に制御し、形成される自己組織化ナノ構造の形状をコントロールすることができるようになれば、ドラッグデリバリーシステムや自己組織化バイオナノデバイス等への応用が期待される。

これまでに開発してきた人工蛋白質ナノブロックでは、蛋白質ナノブロックの構成要素として WA20 を使用してきた。この WA20 にはファミリー人工蛋白質が複数あり、そのファミリー人工蛋白質の1つに S-824 (Wei Y, et al. 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 13270) がある。この S-824 は、WA20 と異なり、酸性条件の NMR 構造解析により単量体の4本ヘリックスバンドル構造であることが知られている。しかし、この S-824 は、本研究の予備実験により、pH 変化に伴って会合状態が変化することを示唆する結果が得られていた。このことは、これらの人工蛋白質が、適切な環境変化を引き金に二量体と単量体の間でダイナミックに会合状態変化及び構造変化を引き起こす可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、人工蛋白質 WA20 と S-824 の溶媒環境変化による会合状態変化や構造変化を詳細に調べ、単量体と二量体の間をダイナミックに構造変化する環境変化応答性人工蛋白質を開発すること、さらに、それらを蛋白質ナノブロックとして応用し、自己組織化ナノ構造形成のダイナミクスを解析することを目的とした。特に、本研究では pH 変化に応答する人工蛋白質の開発と人工蛋白質ナノブロックの pH 変化への応答性の解析に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

### (1) 環境変化応答性人工蛋白質の開発

環境変化応答性人工蛋白質として、人工蛋白質 WA20 や S-824 について、溶媒 pH 条件を酸性 (pH4)・中性 (pH7)・塩基性 (pH9) の3条件に変化させた際の会合状態の変化及び会合平衡状態の有無をゲルろ過クロマトグラフィーと超遠心分析により調べた。また、各溶媒条件での溶液構造を調べるために円二色性スペクトル測定と熱安定性測定、SAXS 実験を行った。

### (2) 人工蛋白質ナノブロック自己組織化ナノ構造形成のダイナミクス解析

辺を伸長する人工蛋白質ナノブロックタンデム WA20 について、溶媒 pH 変化に応答した自己組織化ナノ構造の構造変化をゲルろ過クロマトグラフィーと native PAGE により解析した。

## 4. 研究成果

### (1) pH 環境変化応答性人工蛋白質の解析

人工蛋白質 WA20 と S-824 について酸性溶媒・中性溶媒・塩基性溶媒の3条件において、ゲルろ過クロマトグラフィー解析を行った。その結果、WA20 と S-824 のいずれの蛋白質も、中性溶媒条件と塩基性溶媒条件の溶出ピーク位置に比べて、酸性溶媒条件での溶出ピークは遅くなり、コンパクトな形状へと構造変化したことが示唆された。S-824 は酸性溶媒条件では1つの溶出ピークしか検出されないが、中性溶媒条件と塩基性溶媒条件においては溶出ピークが2つ検出された。このことより、S-824 は中性及び塩基性溶媒条件において、2つの構造状態を持つことが分かった。さらに、中性及び酸性溶媒条件での S-824 の2つの溶出ピークのうち、一方の溶出ピークのフラクションを回収し、再度ゲルろ過クロマトグラフィーを行うと、再び同程度の比率で2つの溶出ピークが検出された。このことより、中性及び塩基性条件で検出された S-824 の2つの溶出ピークに対応する構造は、平衡状態にあることが示された。

WA20 と S-824 の溶媒 pH 条件変化に伴う構造及び会合状態の変化についてより詳細に調べるため、超遠心分析を行った。その結果、ゲルろ過クロマトグラフィーで溶出ピーク的位置に大きな変化が見られた酸性溶媒条件下の WA20 は、酸性・中性・塩基性のいずれの溶媒条件においても二量体を形成していることが分かった。一方、S-824 は酸性溶媒条件では単分散の単量体であり、中性及び塩基性溶媒条件では単量体と二量体の平衡状態にあることが分かった。興味深いことに、S-824 の単量体-二量体の平衡は、塩基性になるほど二量体の割合が増えるという結果を示した。

さらに、これらの溶媒条件において、WA20 と S-824 の溶液中での構造を調べるために、小角 X 線散乱実験を行い、二体間距離分布関数から溶液中における蛋白質の形状を評価した。その結果、WA20 は酸性・中性・塩基性のいずれの溶媒条件においても、ほとんど構造変化が見られなかった。一方で S-824 は、酸性溶媒条件においてコンパクトな球状の形状をしており、中性及び塩基性条件では伸長した形状をとることが分かった。この S-824 の各溶媒条件での二体間距離分布関数の形状と、S-824 の NMR 構造や WA20 の結晶構造か

ら計算機シミュレーションにより求まる二体間距離分布関数の形状を比較した結果、酸性溶媒条件の S-824 の構造は、S-824 の NMR 構造と一致することが分かった。一方、中性及び酸性溶媒条件の S-824 の構造は S-824 の NMR 構造とは大きく異なり、S-824 の散乱体最大長  $D_{\max}$  は WA20 結晶構造のそれに近い値を示したが、WA20 の結晶構造に比べて細い棒状の形状をしていることが示唆された。

WA20 と S-824 の溶媒 pH 変化に伴う  $\alpha$  ヘリックス含量と熱安定性の変化を調べるため、円二色性スペクトル測定と熱変性測定を行った。その結果、WA20 は酸性溶媒条件と中性溶媒条件において、非常によく似たスペクトル形状を示し、十分な  $\alpha$  ヘリックス含量が観察された。しかし、塩基性溶媒条件においてはスペクトル強度の低下が見られ、 $\alpha$  ヘリックス含量の低下が示唆された。WA20 の熱安定性 ( $T_m$  値) は、中性条件に比べて、酸性溶媒条件では 20°C 低下し、塩基性溶媒条件では 10°C の低下が見られた。S-824 は、いずれの pH 条件においても十分な  $\alpha$  ヘリックス含量が観察された。S-824 の熱安定性を測定した結果、興味深いことに、酸性溶媒条件において、95°C までの温度上昇では変性構造への転移が明確に観察されなかった。

以上の実験結果より、S-824 は、酸性溶媒条件においてコンパクトな形状の単量体であるが、中性・酸性条件では単量体と二量体の平衡状態にあり、細長い棒状の形状をしていることが示唆された。WA20 は酸性・中性・塩基性の溶媒条件に依らず、二量体を維持するが、二次構造や構造安定性は溶媒条件に応じて変化することが分かった。まとめを図 1 に示す。

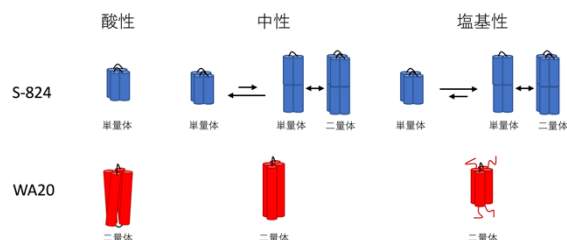


図 1 S-824 と WA20 の pH 変化に応答した構造変化のイメージ

### (2) 人工蛋白質ナノブロック自己組織化ナノ構造形成のダイナミクス解析

辺を伸長する人工蛋白質ナノブロックのタンデム WA20 について、酸性溶媒条件、中性

溶媒条件、中性溶媒条件から酸性溶媒条件に溶媒交換し再度中性溶媒条件に交換した条件の3条件におけるゲルろ過クロマトグラフィー解析と native PAGE 解析を行った。その結果、酸性条件にした後、再度中性条件に戻した場合、自己組織化ナノ構造が再構成され、会合数の大きいナノ構造から複数の会合数の少ないナノ構造が生じることを確認した。

以上の成果は、人工蛋白質ナノブロックの構成要素の pH 依存性が自己組織化ナノ構造の構造形成制御技術に応用できることを示唆しており、この成果をさらに発展させていくことで、今後より複雑な構造を持つ自己組織化ナノ構造の創出と制御が可能になると考えられる。

現在、以上の成果をまとめた学術論文を執筆中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① **Kobayashi, N.**, Inano, K., Sasahara, K., Sato, T., Miyazawa, K., Fukuma, T., Hecht, M. H., Song, C., Murata, K., and Arai, R. Self-Assembling Supramolecular Nanostructures Constructed from *de Novo* Extender Protein Nanobuilding Blocks *ACS Synth. Biol.* **7**, 1381-1394 (2018). DOI: 10.1021/acssynbio.8b00007 (査読有)
- ② **Kobayashi, N.**, Arai, R., Design and Construction of Self-Assembling Supramolecular Protein Complexes Using Artificial and Fusion Proteins as Nanoscale Building Blocks. *Curr. Opin. Biotech.* **46**, 57-65 (2017). DOI: 10.1016/j.copbio.2017.01.001. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

- ① **Kobayashi, N.**, Sengoku, T., Sato, T., Arai, R. pH-dependent structural transition of dimeric *de novo* protein WA20 and reconstruction of protein nanobuilding block complexes. 第17回日本蛋白質科学会年会, **3P-138**, 仙台(宮

城), 2017年6月20-22日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 直也 (KOBAYASHI, NAOYA)

分子科学研究所・協奏分子システム研究センター・特任研究員

研究者番号: 60781945