

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H00888

研究課題名(和文) 計算機デザインと進化分子工学による新規人工膜タンパク質の創生

研究課題名(英文) Novel membrane proteins by combining computational design and in vitro directed evolution

研究代表者

松浦 友亮 (Matsuura, Tomoaki)

東京工業大学・地球生命研究所・教授

研究者番号：50362653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,200,000円

研究成果の概要(和文)：自然界が進化によって探索した配列空間はほんの一部である。合理的デザインにより、現在までに可溶性タンパク質については、未開拓配列空間に多くの構造・機能を持つ人工タンパク質が存在することが明らかになってきた。本研究では、膜タンパク質でも機能・構造を持つ人工膜タンパク質を持つ分子が存在すること示した。具体的には、2 nmのポアを持つ人工膜タンパク質を設計し、その機能を人工細胞リアクターを用いて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工細胞を構築する研究は、非生命から生命をどのように創り出せるかを明らかにする方法の一つである。現在までに、細胞の機能を模倣した様々な人工細胞が構築されてきた。本研究課題では、人工細胞が人工膜タンパク質の機能解析に用いること、更には、膜タンパク質進化分子工学に使えることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：Only a small fraction of the sequence space has been explored by nature through evolution. By rational design, it is now clear that for soluble proteins, there are many artificial proteins that possess structures and functions in the unexplored sequence space. In this study, we show that there are molecules with artificial membrane proteins that also have functions and structures in membrane proteins. Specifically, we designed an artificial membrane protein with a 2 nm pore and clarified its function using an artificial cell reactor.

研究分野：合成生物学

キーワード：膜タンパク質 リボソーム 進化分子工学

## 1. 研究開始当初の背景

100 アミノ酸から構成されるタンパク質には  $20^{100} \sim 10^{130}$  通りの配列が存在しうるのに対し、自然界には  $10^{12}$  種類程度の異なる配列しか存在しないと言われている。自然界が進化によって探索した配列空間はほんの一部である。従って未開拓の配列空間には従来は考えられなかった構造や機能を持つ配列が存在すると考えられている。未開拓配列空間の一つの探索方法として計算機による合理的デザインがある。これまでにタンパク質の構造予測、特定の構造に折りたたまれる配列デザインを可能とする Rosetta や ORBIT などのプログラムが開発され、天然配列とは全く相同性のない多くの新規タンパク質、例えば天然にはない立体構造を持つタンパク質や非常に安定性の高いタンパク質が創り出されてきた (Reviewed in Huang *et al.*, *Nature*, 2016)。

一方で、現時点で計算機による合理的デザインだけでは天然配列に匹敵する機能・活性を持つ配列を創り出すことが難しいことも明らかになってきた (Korendovych and DeGrado, *Curr Opin Struct Biol*, 2014)。例えば、低分子化合物に結合するようデザインされた人工タンパク質は、 $\mu\text{M}$  オーダーの解離定数でしか目的化合物に結合せず、変異と選択を繰り返す進化分子工学による最適化を経てはじめて  $\text{nM}$  や  $\text{pM}$  オーダーの結合を示す分子が得られた (Tinberg *et al.*, *Nature*, 2013)。Kemp elimination 反応を触媒するようデザインされた人工酵素の活性は非常に低く、進化分子工学による最適化を経てオリジナルのデザイン配列よりも約 1,000 倍触媒活性が高い酵素を作り出した (Blomberg *et al.*, *Nature*, 2013)。このように計算機による合理的デザインと進化分子工学を組み合わせることではじめて高機能性人工タンパク質が作り出されている。(ここで人工タンパク質は、天然配列と相同性をもたないものを指す。)

以上のように合理的デザインと進化分子工学による人工タンパク質の創生は可溶性タンパク質に適用され大きな成功を収めつつある一方、膜タンパク質に関しては例がない。多種多様な物質を認識するその機能からバイオセンサーやナノポアシーケンスへの応用も盛んに議論されている。しかし、以下の理由から少数の例を除いて、膜タンパク質はデザインの標的として扱われてこなかった。理由として、計算機によるタンパク質デザインは脂質分子との相互作用を考慮するため著しく難しいこと、一般に不溶性でありかつ異種細胞での発現が困難な膜タンパク質は調製や機能測定が困難であること、膜タンパク質の機能進化に適した進化分子工学的手法がないことなどが挙げられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、機能性人工膜タンパク質を計算機による合理的デザインと進化分子工学を組み合わせ創り出す。具体的には、研究代表者らが開発したりポソームディスプレイ法により計算機でデザインされた人工膜タンパク質のポア形成活性を計測する。更には進化させることで高機能性人工膜タンパク質を創生する。これにより天然とは異なる機能性人工膜タンパク質を作り、その方法論を確立することを目指す。

## 3. 研究の方法

人工ポア形成膜タンパク質は、研究代表者らが開発したりポソームディスプレイ法により解析する (図1)。この手法では、膜タンパク質 DNA を人工脂質二重膜小胞リポソームに再構成型無細胞タンパク質合成系 (PURE system) と共に封入し、内部で膜タンパク質を合成する。これにより合成した膜タンパク質をリポソーム膜上へ配置する方法である。人工ポア形成膜タンパク質は、研究協力者の Baker らが Rosetta により (Huang *et al.*, *Nature*, 2016) デザインしたものをを用いる。

## 4. 研究成果

研究代表者らは、まず人工ポア形成膜タンパク質をリポソーム内部で合成し、ポア形成を計測する手法を確立した (図1)。内部に PURE system と共に streptavidin を加えて、細胞サイズのリポソーム (Giant Unilamellar Vesicle (GUV)) を調製する。その後、膜上に形成されるポアよりも小さい蛍光分子 (AlexaFluor488-biotin) を外部に加えると、蛍光分子は自由拡散によりリポソーム内部に入り、streptavidin と結合する。ポアが存在するリポソ-

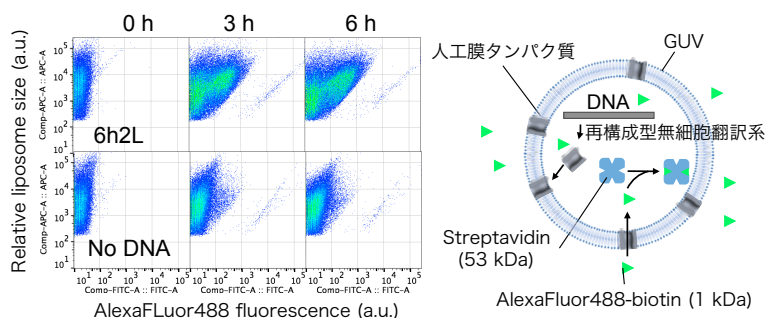


図1：ポア形成人工膜タンパク質の機能解析。リポソーム内で人工膜タンパク質 6h2L を合成後、外部の蛍光物質を加えリポソームをフローサイトメータ (FCM) で分析した結果。右が反応の模式図。左は FCM のデータ。6h2L は蛍光物質を加えてから時間を応じて AlexaFluor488 蛍光の上昇が見えている。

ムは緑色蛍光を有する。図1に示すように6回膜貫通タンパク質を合成した場合には、リポソーム内への蛍光物質の集積が観察された。この手法を用いて、次にその立体構造解析が可能であった12回と16回膜貫通人工ポア形成膜タンパク質 (TMHC6, TMH4C4) の二つの機能解析を行った (図2)。

TMHC6 と TMH4C4 をリポソーム内で合成後、サイズの異なる蛍光物質をリポソーム外部に加えた。その結果、1 kDa の小さい分子は TMH4C4 のポアを通過したが、4.6 kDa の分子は透過しなかった。また、TMHC6 はどちらの蛍光分子もリポソーム膜を透過しなかった。なお、タンパク質合成量

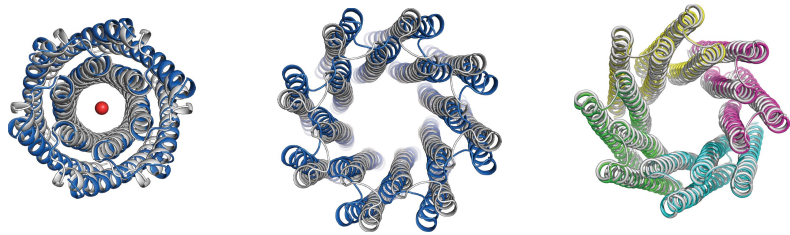


図2：ポア形成人工膜タンパク質のモデル構造と実際の構造。左が12回膜貫通人工ポア形成膜タンパク質で、右2つが16回膜貫通膜タンパク質の構造である。グレーが実験で決められた構造、カラーがモデル構造である。

や膜タンパク質の膜結合量に大差が無かったことは確認した。これらの結果は、図3で見られる差が、人工膜タンパク質が構造から予想されるポアを形成していることを示唆している。

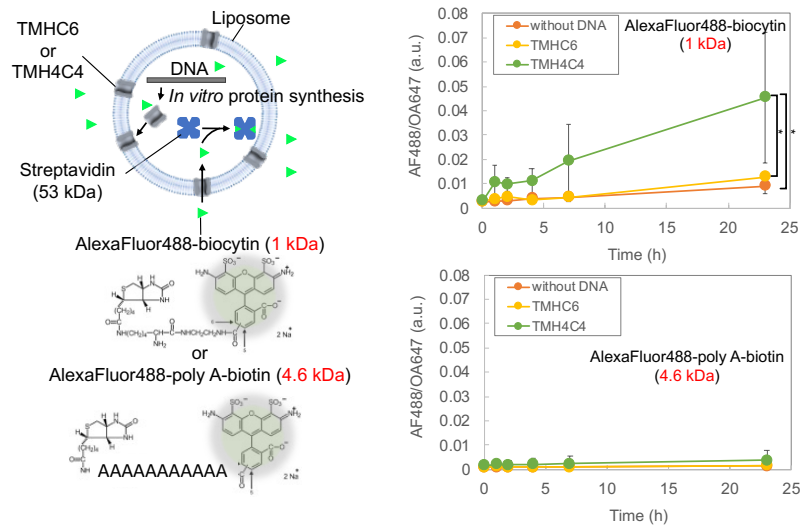


図3：ポア形成人工膜タンパク質の機能解析。左が模式図。TMHC6 と TMH4C4 がそれぞれ 0.4 と 3 nm のポアを有することが予想される。

この2つの人工膜タンパク質のリポソーム膜への膜挿入効率は天然タンパク質のそれよりは低いことが明らかになった (図4)。つまり、デザインした膜タンパク質は、ポアを形成する能力はあるが、リポソーム膜への挿入効率をデザインすることが困難であることが示唆された。そこで、代表者らが開発した進化分子工学的手法であるリポソームディスプレイ法を用いて、ポア形成能力、膜挿入効率ともに向上した変異体を取得し、人工膜タンパク質のデザイン原理を明らかにすることを目指した。

TMH4C4 の遺伝子にランダムに変異を導入した遺伝子ライブラリーからより沢山の蛍光分子を取り込める変異体分子を選択する実験を進めた。その結果、オリジナル配列よりも高い機能を有する分子は得られなかった。そこで、膜とタンパク質の境界部位に塩基性のアミノ酸を導入することで1.5倍蛍光分子の取り込み能力の向上が見られた。今後、品質の高い変異型ライブラリーを作製・デザインする必要があると予想される。

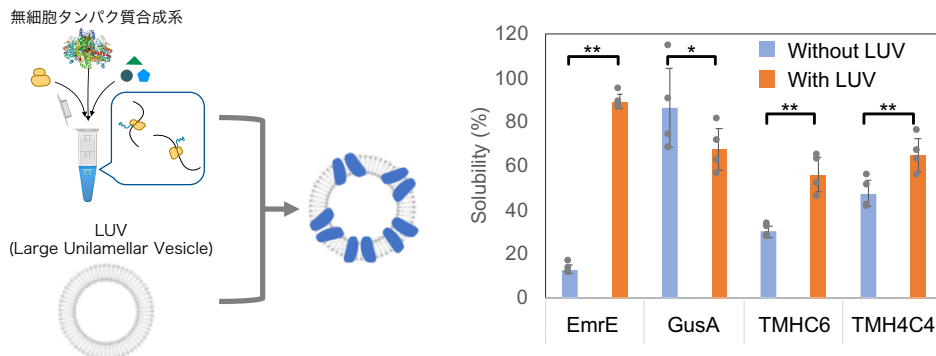


図4：ポア形成人工膜タンパク質の機能解析。左が模式図。TMHC6 と TMH4C4 がそれぞれ 0.4 と 3 nm のポアを有することが予想される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 10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 Dwidar Mohammed, Seike Yusuke, Kobori Shungo, Whitaker Charles, Matsuura Tomoaki, Yokobayashi Yohei	4. 巻 141
2. 論文標題 Programmable Artificial Cells Using Histamine-Responsive Synthetic Riboswitch	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 11103 ~ 11114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.9b03300	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 Noba Kosaku, Ishikawa Masahito, Uyeda Atsuko, Watanabe Takayoshi, Hohsaka Takahiro, Yoshimoto Shogo, Matsuura Tomoaki, Hori Katsutoshi	4. 巻 141
2. 論文標題 Bottom-up Creation of an Artificial Cell Covered with the Adhesive Bacterionanofiber Protein AtaA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 19058 ~ 19066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.9b09340	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 -
1. 著者名 Ogawa Marin, Uyeda Atsuko, Harada Kazuo, Sato Yu, Kato Yasuhiko, Watanabe Hajime, Honda Kohsuke, Matsuura Tomoaki	4. 巻 20
2. 論文標題 Class III Polyphosphate Kinase $\gamma$ 2 Enzymes Catalyze the Pyrophosphorylation of Adenosine 5 Monophosphate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 2961 ~ 2967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900303	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 -
1. 著者名 Okamura Kosuke, Matsushita Shuhei, Kato Yasuhiko, Watanabe Hajime, Matsui Aiko, Oka Toshihiko, Matsuura Tomoaki	4. 巻 127
2. 論文標題 In vitro synthesis of the human calcium transporter Letm1 within cell-sized liposomes and investigation of its lipid dependency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 544 ~ 548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2018.11.003	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 -

1. 著者名 Elfaramawy Maie A., Fujii Satoshi, Uyeda Atsuko, Osaki Toshihisa, Takeuchi Shoji, Kato Yasuhiko, Watanabe Hajime, Matsuura Tomoaki	4. 巻 54
2. 論文標題 Quantitative analysis of cell-free synthesized membrane proteins at the stabilized droplet interface bilayer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 12226 ~ 12229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8cc06804f	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 -

1. 著者名 Iwamoto Masayuki, Elfaramawy Maie A., Yamatake Mariko, Matsuura Tomoaki, Oiki Shigetoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Concurrent In Vitro Synthesis and Functional Detection of Nascent Activity of the KcsA Channel under a Membrane Potential	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 1004 ~ 1011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.7b00454	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 -

1. 著者名 Matsuura Tomoaki, Hosoda Kazufumi, Shimizu Yoshihiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Robustness of a Reconstituted Escherichia coli Protein Translation System Analyzed by Computational Modeling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 1964 ~ 1972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.8b00228	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 -

1. 著者名 Okamura Kosuke, Matsushita Shuhei, Kato Yasuhiko, Watanabe Hajime, Matsui Aiko, Oka Toshihiko, Matsuura Tomoaki	4. 巻 127
2. 論文標題 In vitro synthesis of the human calcium transporter Letm1 within cell-sized liposomes and investigation of its lipid dependency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 544 ~ 548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2018.11.003	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 -

1. 著者名 Uyeda Atsuko, Watanabe Takayoshi, Hohsaka Takahiro, Matsuura Tomoaki	4. 巻 3
2. 論文標題 Different protein localizations on the inner and outer leaflet of cell-sized liposomes using cell-free protein synthesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 ysy007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/synbio/ysy007	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 -

1. 著者名 Iwamoto Masayuki, Elfaramawy Maie A., Yamatake Mariko, Matsuura Tomoaki, Oiki Shigetoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Concurrent In Vitro Synthesis and Functional Detection of Nascent Activity of the KcsA Channel under a Membrane Potential	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 1004 ~ 1011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.7b00454	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 -

1. 著者名 Xu Chunfu, et al.	4. 巻 585
2. 論文標題 Computational design of transmembrane pores	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 129 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-2646-5	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Nakai Hiroki, Isshiki Kinuka, Hattori Masato, Maehira Hiromasa, Yamaguchi Tatsumi, Masuda Keiko, Shimizu Yoshihiro, Watanabe Takayoshi, Hohsaka Takahiro, Shihoya Wataru, Nureki Osamu, Kato Yasuhiko, Watanabe Hajime, Matsuura Tomoaki	4. 巻 94
2. 論文標題 Cell-Free Synthesis of Human Endothelin Receptors and Its Application to Ribosome Display	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 3831 ~ 3839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.1c04714	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Uyeda Atsuko、Reyes Sabrina Galíñanes、Kanamori Takashi、Matsuura Tomoaki	4. 巻 133
2. 論文標題 Identification of conditions for efficient cell-sized liposome preparation using commercially available reconstituted in?vitro transcription-translation system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 181 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.10.008	査読の有無 無
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7件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Tomoaki Matsuura
2. 発表標題 Evolutionary engineering and characterization of membrane proteins using liposome display
3. 学会等名 Protein Engineering Canada 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoaki Matsuura
2. 発表標題 Engineering and characterizing membrane proteins using artificial cells
3. 学会等名 New Frontier in Protein Design & Engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松浦友亮
2. 発表標題 人工細胞リアクターの創生と応用
3. 学会等名 白鷺セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松浦友亮
2. 発表標題 再構成型セルフリータンパク質合成系を用いたタンパク質配列空間と成分濃度空間探索
3. 学会等名 2018年度日本農芸化学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松浦友亮
2. 発表標題 リボソームディスプレイ法を用いた膜タンパク質の創生と解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomoaki Matsuura
2. 発表標題 Decorating liposome surface with biological molecule and its application
3. 学会等名 IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions 2017（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomoaki Matsuura
2. 発表標題 In vitro membrane protein engineering by liposome display
3. 学会等名 The 17th KIAS Conference on Protein Structure and Function（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017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
研究 分担者	大崎 寿久  (Osaki Toshihisa)  (50533650)	地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・人工細胞膜システムグループ・サブリーダー   (82718)	
研究 分担者	藤井 聡志  (Fujii Satoshi)  (60619005)	公益財団法人神奈川県立科学技術アカデミー・人工細胞膜システムグループ・研究員   (82704)	

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
---------	---------