

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K04906

研究課題名(和文) センサータンパク質を駆動系とする人工タンパク質超分子マシンの構築

研究課題名(英文) Construction of an artificial protein supramolecular machine with a sensor protein as a driving core

研究代表者

山中 優 (Yamanaka, Masaru)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：60632825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：CO結合に伴い二量体が解離する常温菌センサータンパク質(AVCP)と閉環状3量体を形成する人工タンパク質ビルディングブロック(BBP19)を、ドメインスワップ構造をベースに、融合したAVCP/N-BBP19-AVCP/C(ABA)を構築した。ABAは、加熱またはエタノールにより処理することで超分子化し、超分子化したものはCOまたはイミダゾールのリガンド結合により、可逆的にサイズ変化した。以上によりセンサータンパク質の動きを駆動系として人工タンパク質超分子に組み込み、動きを持ったタンパク質超分子マシンを構築する方法論を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然タンパク質超分子はナノスケールで駆動する分子機械=ナノマシンとして機能する。近年、タンパク質を素材として、人工ナノ構造体の構築は可能になってきたが、天然のタンパク質のように駆動する人工タンパク質マシンの構築は、困難であった。本研究の成果は、センサータンパク質の動作機構を駆動系としてタンパク質超分子に組み込むことで、人工タンパク質超分子に動きを持たせナノマシンとする方法論の有効性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Based on a domain swapping structure, AVCP/N-BBP19-AVCP/C (ABA) was constructed by fusing the bacterial sensor protein AVCP, which dissociates dimer to monomer with CO binding, and the artificial protein building block BBP19, which forms a closed cyclic trimer. The ABA was formed supramolecules by heating or treatment with ethanol, and the supramolecules were reversibly changed its size by the ligand binding of CO or imidazole. In this study, we succeeded in demonstrating the method for constructing a protein supramolecular machine with movement by incorporating the sensor protein into the artificial protein supramolecule as a driving core.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：タンパク質超分子 センサータンパク質 ナノマシン タンパク質設計 ドメインスワッピング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天然タンパク質の多くは、生体内において超分子を形成する。タンパク質超分子は、協同的な基質分子結合、回転・並進運動、環境に応答したシグナル伝達など、ナノスケールで駆動する分子 = ナノマシンとして機能する。天然のタンパク質超分子のように機能するナノマシンを自由自在に構築できれば、医薬、工学のみならず様々な方面での革新が期待できる。近年、タンパク質を素材として、ワイヤー、チューブ、ケージなどの人工的なナノ構造体の構築が報告されており、タンパク質超分子の人工構築法は磨かれつつある。しかしながら、天然のタンパク質超分子のように駆動するタンパク質性人工ナノマシンの構築は、未だ困難である。

2. 研究の目的

本研究では、センサータンパク質の動きを利用した駆動型タンパク質超分子を構築を目的とした。タンパク質の構造と機能を維持したまま超分子化が可能なドメインスワッピング機構を利用した独自の設計手法により、センサータンパク質をタンパク質超分子の一部に組み込むことで、センサータンパク質に備わるセンシングと供役した構造変化を駆動系とする人工ナノマシンを構築することを試みた。

3. 研究の方法

C0 のセンシングによりサブユニット構造が変化するシトクロム c (CP)、O2 のセンシングにより二量体から単量体に解離するヤツメウナギヘモグロビン(LHb)、Ca²⁺ のセンシングにより屈曲するラットカルモジュリン(CaM)、ヘムのセンシングにより開閉する乳酸菌転写調節因子(HrtR)を材料に、標的物質に応答して駆動するタンパク質超分子の構築を目指した。以下の3つの課題を設定し、段階的に研究を展開していくことで、センサータンパク質を駆動系とする人工タンパク質超分子マシンの構築を試みた。

【課題1】センサータンパク質のドメインスワップ超分子化と動作機構への影響評価

C0 の結合で構造変化する AVCP とその相同タンパク質の好熱菌 CP (PHCP)、O2 の結合で二量体から単量体に解離する LHb、Ca²⁺ の結合で屈曲する CaM、ヘムの結合で開閉する HrtR を、これまでの知見に基づき各種アルコール、酢酸、変性剤による処理によってドメインスワップ超分子化する。構築した超分子の標的物質応答性を、紫外可視吸収、円二色性、光散乱、Stopped-flow、フラッシュフォトリス(FP)、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)、電子顕微鏡(EM)、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて解析する。さらに超分子の立体構造を X 線結晶解析により決定し、交換領域の特定と超分子で動作機構を維持する条件を特定する。

【課題2】タンパク質改変による任意構造をもつ超分子構築と動作機構への影響評価

立体構造と課題1の知見に基づいて、ドメインスワップ超分子における交換領域を基準に、各タンパク質の配列順序を入れ替えて幾何的特性を改変することで、同種分子数個から成る任意構造に超分子化させる。構築した超分子の標的物質応答性と構造を課題1と同様に調べ、配列改変に伴う幾何的特性変化による超分子内の動作機構への影響を明らかにする。

【課題3】複数種タンパク質のキメラ化・超分子化によるナノマシンの構築

課題1、2で得た知見をもとに、動作機構が維持される条件で各タンパク質を配列改変・キメラ化することで、ヘテロな分子間のドメインスワッピングによる超分子を設計し、標的物質に応答して開閉するケージ、伸縮するコイル、解離会合するワイヤーなどの駆動する人工タンパク質超分子マシンを構築する。

4. 研究成果

LHb、CaM、HrtR の超分子化処理を試みたが、いずれのタンパク質においても多量体は得られなかったが、CP ベースの改変タンパク質で成果が得られた。

ドメインスワップ構造をベースに C0 結合に伴い二量体が解離する常温菌 CP(AVCP)と閉環状3量体を形成する人工タンパク質 BBP19 を融合した改変タンパク質 AVCP/N-BBP19-AVCP/C (ABA) について、超分子化およびリガンド応答性挙動を調べた。ABA は高濃度条件下で pH>6 での加熱処理およびエタノール処理により多量体を形成した。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 解析から、ABA 多量体は C0 またはイミダゾールの結合により可逆的にサイズの小さな成分(単量体、2~3 量体、4~5 量体に相当する溶出位置を示す成分)に解離した。絶対分子量を調べることができる多角度光散乱 (MALS) と SEC を組み合わせた SEC-MALS 測定により ABA 多量体の構成成分の詳細を調べたところ、ABA 多量体は単量体、2 量体、3 量体を構成成分とすることが分かった。リガンド結合により ABA 多量体が解離して得られる 2 量体を精製しリガンドを脱離させると、2x2 量体および 2x3 量体と推定される高次多量体を形成した。2x2 量体と 2x3 量体は平衡状態であり、pH<6 で平衡は抑制された。高速分子間力顕微鏡によりこれらの高次多量体の構造解析を行ったところ、2x2 量体はひし形状、2x3 量体は 3 角形状をしていた。また、これらの高次多量体は pH>6 でリガンド結合により小さなサイズの分子へと解離することも示された。リガンド結合により ABA 多量体が解離して得られる 3 量体を精製してリガンドを脱離させると、低濃度条

件下では 2x3 および 4x3 と推定される高次多量体が形成し、高濃度条件下ではゲル化した。ゲルに再度リガンドを添加するとゲルは溶解した。以上から、ABA は AVCP 部分の CO 応答性構造変化を維持して 3 量体・2 量体に超分子化し、これらが会合することでリガンド応答性を示す高次多量体が形成したことが示された。目的とした構造の構築には至らなかったが、本研究によってセンサータンパク質の動きを駆動系として人工タンパク質超分子に組み込むことで、動きを持ったタンパク質超分子マシンを構築する方法論の有効性は示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamanaka Masaru, Nakayama Ryoko, Fujii Sotaro, Wakai Satoshi, Sambongi Yoshihiro, Hirota Shun	4. 巻 92
2. 論文標題 Conferment of CO-Controlled Dimer-Monomer Transition Property to Thermostable Cytochrome c by Mutation in the Subunit-Subunit Interface	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 702 ~ 709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20180311	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 Yamanaka Masaru, Mashima Tsuyoshi, Ogihara Michio, Okamoto Mei, Uchihashi Takayuki, Hirota Shun	4. 巻 16
2. 論文標題 Construction of ferritin hydrogels utilizing subunit-subunit interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0259052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0259052	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 Shiga Shota, Yamanaka Masaru, Fujiwara Wataru, Hirota Shun, Goda Shuichiro, Makabe Koki	4. 巻 20
2. 論文標題 Domain Swapping Design by Polyproline Rod Insertion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 2454 ~ 2457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900179	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14件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Masaru Yamanaka, Takayuki Uchihashi, Shun Hirota
2. 発表標題 Construction of Structure-Switchable Protein Supramolecules using Fusion Proteins Designed Based on 3D Domain Swapping
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shota Shiga, Masaru Yamanaka, Wataru Fujiwara, Shun Hirota, Shuichiro Goda, Koki Makabe
2. 発表標題 The Design of Artificial Domain-Swapped Dimers by Polyproline Rod Insertion
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田充希、山中優、廣田俊
2. 発表標題 センサータンパク質を駆動系として組み込んだビルディングブロックタンパク質の超分子化
3. 学会等名 日本化学会第101春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山中優、内橋貴之、廣田俊
2. 発表標題 センサータンパク質を駆動系として組み込んだビルディングブロックタンパク質の二量体の性質と挙動
3. 学会等名 日本化学会第101春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaru Yamanaka, Ryoko Nakayama, Sotaro Fujii, Satoshi Wakai, Yoshihiro Sambongi, Shun Hirota
2. 発表標題 Conferment of CO-Controlled Dimer-Monomer Transition Property to Thermostable Cytochrome c by Mutation in the Subunit Interface
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC15) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Chunguang Ren, Mohan Zhang, Akiya Oda, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota
2. 発表標題 Construction of Protein Supramolecules Based on Domain Swapping
3. 学会等名 第19回蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Chunguang Ren, Mohan Zhang, Akiya Oda, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota
2. 発表標題 Construction of Protein Supramolecules Based on Domain-Swapping Mechanism
3. 学会等名 33rd Annual Symposium of the Protein Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中優
2. 発表標題 ドメインスワップ機構を利用した駆動型人工タンパク質超分子の構築
3. 学会等名 農芸化学会関西支部ミニシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中優、廣田俊
2. 発表標題 ドメインスワップ構造を基に設計した融合タンパク質による可動型超分子の構築
3. 学会等名 日本化学会第100春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山中優、中山諒子、藤井創太郎、岩井暁、三本木至宏、廣田俊
2. 発表標題 サブユニット界面変異による耐熱性シトクロムc _h へのCO依存的2量体-単量体遷移特性の付与
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中優、中山諒子、若井暁、藤井創太郎、三本木至宏、廣田俊
2. 発表標題 耐熱性シトクロムc _h のサブユニット界面変異によるCO応答性2量体-単量体変換特性の付与
3. 学会等名 日本化学会第99春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Shun Hirota
2. 発表標題 Formation of Cytochrome c' tetramer Using Domain-Swapping and Carbon Monoxide-Dependent Control of Oligomer Association/Dissociation
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Chunguang Ren, Mohan Zhang, Akiya Oda, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota
2. 発表標題 Construction of Protein Supramolecules Based on Domain Swapping
3. 学会等名 第19回蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Chunguang Ren, Mohan Zhang, Akiya Oda, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota
2. 発表標題 Construction of Protein Supramolecules Based on Domain-Swapping Mechanism
3. 学会等名 33rd Annual Symposium of the Protein Society (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