

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02832

研究課題名(和文) 外部刺激応答性バイオナノマシンの創成を目指したタンパク質デザイン工学

研究課題名(英文) Protein design and engineering toward the creation of external stimuli-responsive bionanomachines

研究代表者

鈴木 雄太 (Suzuki, Yuta)

京都大学・高等研究院・特定助教

研究者番号：00827743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではバイオナノロボットの創成を目指し、複数の外部刺激に応答するバイオナノマシン、筋肉を模倣したバイオナノマシン、及びヘテロ二量体コネクターの作製を推進した。天然由来の機能性タンパク質と接続タンパク質パーツを組み合わせた融合タンパク質の設計・発現系の確立・精製を行い、集合体形成条件を検討した。初期の成果として集合体形成が示唆されたが、想定通りの構造体の形成には至らなかった。しかし、最終的にはヘテロ二量体コネクターを活用することで、多様な次元の集合体形成に成功した。これらの研究により、新しいタンパク質デザイン技術の基盤を構築し、バイオナノロボットの実現に向けた重要な知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、タンパク質デザインの新たな基盤を築くものである。バイオナノマシンや新規コネクターの作製により、従来のタンパク質デザインの枠を超えた高機能な集合体の構築が可能となる。この成果は将来的に、タンパク質の多様な機能を人工的にデザインし制御する技術の進展を促進し、生体材料科学やバイオテクノロジーの分野で新たな研究方向性を示すことが期待される。また、医療や環境モニタリング分野で、外部刺激に応答するナノデバイスの実用化に貢献することが考えられる。さらに、持続可能な社会の実現に向け、新しい機能性マテリアルの創出を通じた新たなソリューションの提供が可能となる。

研究成果の概要(英文)：This research aimed at the creation of bionanorobots, advancing the development of bio-nanomachines responsive to multiple external stimuli, muscle-mimicking bio-nanomachines, and heterodimer connectors. We designed fusion proteins by combining functional proteins of natural origin with connector protein parts, established protein expression systems, and conducted purification and assembly condition investigations. Initial results suggested the formation of assemblies, but the expected structures were not achieved. However, we eventually succeeded in forming assemblies of various dimensions by utilizing heterodimer connectors. Through these studies, we established a new foundation for protein design, obtaining crucial insights towards the realization of bionanorobots.

研究分野：タンパク質デザイン

キーワード：タンパク質デザイン タンパク質工学 バイオマテリアル バイオナノロボット 自己集合

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、必要な時、必要な機能を自発的に発動する「バイオナノロボット」の作製を将来的な目標とし、その構築に繋がる「バイオナノマシン」の作製を行う。また、バイオナノマシンの構築に際して必須となる新規コネクターの作製も並行し推進することで、バイオナノマシンの更なる高機能化を目指した研究も展開する。さらに、作製したバイオナノマシンと新規コネク터를融合することで、バイオナノロボット構築を目指した、より高度な設計を手がけるタンパク質デザインの基盤を本研究にて構築する。

## 2. 研究の目的

本研究では、シンプルかつ合理的なデザインによる外部刺激応答性バイオナノマシンの構築を目指した「タンパク質デザインの創成」を目的とし、以下の3項目の研究を推進する。

①複数の外部刺激に応答するワイヤー状及び2Dバイオナノマシンの作製

②筋肉を模倣した伸縮性を有するバイオナノマシンの作製

③ヘテロ二量体コネクターの作製とその使用

これらの研究項目を通して「天然由来の機能性」を「人工的なタンパク質集合体デザイン」と融合することで、これまでにない新しいタンパク質デザインの構築を目指す。

## 3. 研究の方法

目的 および ①では、天然由来の機能性タンパク質と集合体形成に必須となる接続タンパク質パーツを組み合わせた融合タンパク質の設計を行う。目的 ②では、ヘテロ二量体コネクターとなる融合タンパク質の設計を行う。設計後、各融合タンパク質の遺伝子の設計・作製、大腸菌による発現系を確立し、目的となる融合タンパク質を精製する。精製した融合タンパク質を組み合わせることで集合体形成の条件検討を行う。目的となるタンパク質集合体の形成は、Native PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー、電子顕微鏡観察、原子間力顕微鏡などを用いて解析する。その後、形成した集合体に各々の機能に対応した外部刺激を加えることで、その構造変化を観察し、本目的の機能性タンパク質集合体（バイオナノマシン）を構築する。

## 4. 研究成果

① 複数の外部刺激に応答するワイヤー状及び2Dバイオナノマシンの作製

天然由来の機能性タンパク質と集合体形成に必要な接続タンパク質を組み合わせた融合タンパク質を設計、その遺伝子を作製した後、タンパク質の大腸菌による発現系を確立した。その後、精製したタンパク質を組み合わせることで集合体形成条件の初期検討を行ったが、当初想定していた集合体の形成は確認できなかった。そこで、遺伝子工学によりタンパク質パーツを改変し、集合体形成を試みた。Native PAGE などにおける初期検討を行い、集合体形成の傾向が見られたため、電子顕微鏡による詳細な構造解析を開始した。しかし、はっきりとした構造体の形成には至っていないため、再度、タンパク質パーツの改良を行ったが、顕著な進展は得られなかった。この目的と並行して推進していた研究計画③の進展があり、本目的における構造形成にも使用可能であることから、計画③の検討に注力することとした。

② 筋肉を模倣した伸縮性を有するバイオナノマシンの作製

スプリット GFP テクノロジーを利用した集合体形成パーツを設計し、その遺伝子を作製した後、タンパク質の大腸菌による発現系を確立した。その後、精製したタンパク質を用い集合体形成の初期検討を行った。Native PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー、電子顕微鏡観察などを

用いて解析を行った結果、集合体形成が示唆される結果を得た。並行して、伸縮性を有する機能性タンパク質を集合体形成パーツに取り入れた融合タンパク質の設計、発現系の確立および精製を推進した。しかし、機能を取り入れた融合タンパク質を用いた集合体の形成がうまく促進されなかった。そのため、タンパク質の改変および条件の検討を行ったが、改善が見られなかった。この目的と並行して推進していた研究計画③の進展があり、新たな集合体形成手法であるヘテロ二量体コネクターを本目的にも取り入れることが可能であるため、計画③の検討に注力することとした。

#### ヘテロ二量体コネクターの作製とその使用

必要となる融合タンパク質の遺伝子作製、大腸菌による発現系の確立、タンパク質精製を行った。作製した融合タンパク質を組み合わせることで、初期検討段階ながら想定していたタンパク質集合体の形成を確認することができた。この結果をもとに、融合タンパク質の変更、また条件検討を重ねた結果、様々な次元の集合体形成を確認することにも成功した。さらに、融合タンパク質に遺伝子工学を用いて機能を搭載し、その集合体の形成にも成功した。このデザインにより、本研究の目的である機能を有した集合体の構築が可能である結果を得ることができた。

上述の通り、当初の研究計画①は難航したが、本研究を通じて今後の研究基盤を構築することができた。代表研究者である鈴木は、本研究基金を採択された2019年度より、「バイオナノロボットの創成」という将来的な目標に向けた研究を京都大学白眉プロジェクトにて独立して開始した。採択時は研究スペースの獲得から1人で研究室を立ち上げる状態であったため、本基盤研究の助成を受けて研究機器の充足や研究員の雇用が可能となり、研究をスタートすることができた。本研究の申請時には、本研究計画の予備データがなかったこともあり、本研究期間中に予定していた研究計画通りに進めることは難航してしまっていたが、目的①において想定以上にさまざまな構造の集合体の形成を実現することができた。現在、本研究成果をもとに論文作製を行なっている。本研究期間中の上記結果を踏まえ、将来目標であるバイオナノロボットにつながる機能性タンパク質集合体の構築を目指し、研究を継続する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zou Yajuan, Ito Shinji, Yoshino Fumi, Suzuki Yuta, Zhao Li, Komatsu Naoki	4. 巻 14
2. 論文標題 Polyglycerol Grafting Shields Nanoparticles from Protein Corona Formation to Avoid Macrophage Uptake	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 7216 ~ 7226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.0c02289	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 Subramanian Rohit H., Suzuki Yuta, Tallorin Lorillee, Sahu Swagat, Thompson Matthew, Gianneschi Nathan C., Burkart Michael D., Tezcan F. Akif	4. 巻 60
2. 論文標題 Enzyme-Directed Functionalization of Designed, Two-Dimensional Protein Lattices	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1050 ~ 1062
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00363	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 該当する
1. 著者名 鈴木雄太	4. 巻 72-8
2. 論文標題 バイオナノロボット創生を目指したタンパク質デザイン工学	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学と工業	6. 最初と最後の頁 707-708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 鈴木雄太	4. 巻 12
2. 論文標題 タンパク質デザインによる機能性2Dバイオマテリアルの創生および今後の展開	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 蛋白質科学会アーカイブ	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Noji Masahiro, Sugita Yukihiro, Yamazaki Yosuke, Miyazaki Makito, Suzuki Yuta	4. 巻 -
2. 論文標題 Protein design of two-component tubular assemblies like cytoskeletons	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2024.04.17.589732	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 鈴木雄太
2. 発表標題 タンパク質デザインによるバイオナノロボットの創成を目指して
3. 学会等名 第33回生物無機化学夏季セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 Yuta Suzuki
2. 発表標題 Protein Design and Engineering Toward the Functional Biomaterials
3. 学会等名 SPIRITS International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 Yuta Suzuki
2. 発表標題 Chemical Design of 2D Protein Self-Assembly
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回 日本細胞生物学会大会 合同年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 鈴木雄太
2. 発表標題 機能性バイオマテリアルの創生を目指したタンパク質デザイン工学
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yuta Suzuki
2. 発表標題 Protein Design and Engineering Toward the Functional Biomaterials
3. 学会等名 SPIRITS International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yuta Suzuki
2. 発表標題 Rational Design of Protein Assembly
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Yuta Suzuki
2. 発表標題 Rational Design of Functional Protein Assembly Toward the Creation of Bionanorobots
3. 学会等名 The 25th iCeMS International Symposium "Self-Assembly Science for Unlocking Life 's Secrets" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Yuta Suzuki
2. 発表標題 The Creation of Protein Assembly by Nature-Inspired Protein Assembly Design
3. 学会等名 Pre-symposium of ISBC2024 in Nara (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 タンパク質集積構造体	発明者 鈴木雄太, 野地真広	権利者 国立大学法人京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、2024-65760	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------