

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05250

研究課題名(和文)光駆動型ロールアップナノシートによるタンパク質フォールディング制御

研究課題名(英文)Protein Folding Control by Light-Driven Roll-Up Nanosheets

研究代表者

亀田 直弘(Kameta, Naohiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・上級主任研究員

研究者番号：20517297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：光刺激応答性官能基を組み込んだ合成糖脂質を水中で自己集合させることによりロールアップナノシート(=ナノチューブ)の構築に成功した。ナノチューブの空孔内に変性タンパク質を包接後、光照射によってナノチューブのロールアップ化を進行させると(ナノチューブの空孔を収縮させると)、タンパク質がバルク水中に放出されると同時に生理・酵素触媒活性を回復することを見出した。光によって駆動するロールアップナノシートが、タンパク質のリフォールディングを著しく促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体医薬や酵素センサー等の利用拡大に伴い、製造工程で生じる変性・凝集タンパク質を正常な立体構造へとリフォールディングさせる技術が求められている。一方、生体系では、分子シャペロンと呼ばれるタンパク質群が、その内部に備えたATPの加水分解反応に連動して構造変化する筒状のナノ空間を活かし、変性タンパク質の選択的包接、リフォールディングの補助、リフォールディングしたタンパク質の放出を司っている。本研究は、生体系を模倣した人工分子シャペロンを構築することで、リフォールディング効率に関わる因子の解明に貢献するだけでなく、タンパク質の製造コスト削減に波及効果をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Synthetic glycolipids functionalized with photo-responsive moieties self-assembled in water to form roll-up nanosheets, i.e., nanotubes. The nanotubes were able to encapsulate denatured proteins in their nanochannels. Narrowing of the nanochannels induced by photo irradiation resulted in a rapid squeezing out of the encapsulated proteins into the bulk aqueous solution and remarkable assistance of the recovery of the biological or enzymatic activities of the proteins. The nanotubes acted as artificial chaperones, which accelerate refolding of proteins.

研究分野：ナノ構造化学

キーワード：糖脂質 自己集合 ナノシート ナノチューブ 光駆動 タンパク質 酵素 リフォールディング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、生命科学の基礎研究対象としてだけでなく、その生理活性や酵素触媒活性に基づき、医薬品や化粧品分野への産業応用、バイオセンサーとしての活用が急速に進んでいる。特にタンパク質を成分とするバイオ医薬品は、化学合成で製造される低分子医薬品と比較して効能が高く、その世界市場は 2020 年には 15 兆円に達すると言われている。タンパク質の生産には、DNA 組換え技術が工業的に用いられているが、発現過程で変性タンパク質の凝集体が生じてしまう。この凝集体を可溶化した後、正常に折り畳まれた立体構造へとリフォールディングさせ、活性を有するタンパク質を得る効率は極めて低い。またリフォールディングしたタンパク質の分離精製には、各種クロマトグラフィーが用いられるが、強酸・強塩基性条件下でカラムから溶離しなければならない場合が多く、この工程でのタンパク質の変性、凝集体形成も問題となっている。

生体系では、分子シャペロンと呼ばれるタンパク質群が、その内部に備えた筒状のナノ空間を活かし、変性タンパク質の選択的包接、リフォールディングの補助、リフォールディングしたタンパク質の放出を司っている。近年、分子シャペロンを模倣すべく、正常タンパク質を安定化することが可能な無機多孔質や金属有機構造体の開発だけでなく、次項で述べるように、変性タンパク質の凝集を抑制することが可能なナノ空間材料の開発も盛んに行われている。

2. 研究の目的

両親媒性ポリマーからなる高分子多孔質体やゼオライトのような無機多孔質体は、表面に疎水性アミノ酸残基が露出した変性タンパク質を吸着し、タンパク質間の凝集を抑制することが報告されている。そこに溶離液 (pH 緩衝液や塩の他、糖、アミノ酸、ポリエチレングリコール、シクロデキストリン、界面活性剤などの安定化剤・可溶化剤を含む) を添加すると、多孔質体から脱着したタンパク質が自発的にリフォールディングする場合がある。リフォールディング効率は、溶離液の化学組成のみならず、脱着過程における温度・時間等にも支配される。多品種化したタンパク質それぞれに対応した条件探索やタンパク質を単離する際の溶離液成分の除去が大きな課題となっている。

一方、生体系の分子シャペロンでは、ATP の加水分解反応に連動して構造変化する筒状ナノ空間が、タンパク質のリフォールディングの場となる。また、1つの分子シャペロンが、複数のタンパク質のリフォールディングを担うことも知られている。本研究では、上述したような溶離液、及び温度・時間等の精密な条件設定を必要としない、人工分子シャペロンの構築に挑む。外部刺激を駆動力としてロールアップする脂質分子膜ナノシートを開発する。外部刺激として、タンパク質の安定性や水和構造に影響を及ぼさない「光」を選択する。ナノシートのロールアップ化によって生じるナノチャンネルを変性タンパク質を包接する場として機能させる。そして、光刺激によりロールアップナノシートの形状やナノチャンネルのサイズを変化させることで、タンパク質のリフォールディングの促進、ロールアップナノシートからのタンパク質の放出・分離回収を試みる。リフォールディング効率に及ぼす種々の因子を明らかにする。

3. 研究の方法

<光駆動型ロールアップナノシートの調製> 光構造異性化基としてアミノ-アゾベンゼン-カルボン酸、その N 末端にグリシン残基、C 末端に長鎖炭化水素を介してグルコース残基を導入した糖脂質 1 を設計・合成した。また、光重合性部位としてジアセチレン長鎖アルキルジカルボン酸、その片末端にグルコースアミン、もう一方の末端にグリシンをアミド結合させた糖脂質 2 を設計・合成した。さらに、糖脂質 2 のグリシン残基にウレア型官能基を修飾した糖脂質 2(-C(=O)NH₂) と糖脂質 2(-C(=NH)NH₂) も合成した。合成したそれぞれの糖脂質を水中で加熱還流後、室温まで徐冷することで糖脂質の自己集合体からなるロールアップナノシートを調製した。

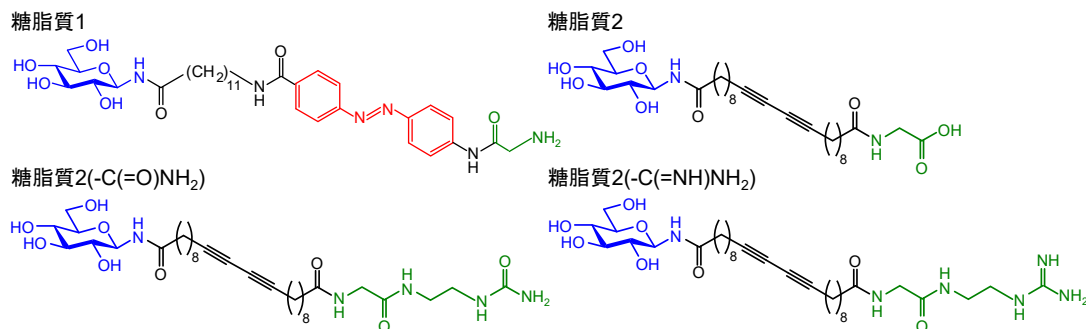


図 1 合成糖脂質の化学構造

<タンパク質の包接・リフォールディング・放出> 緑色蛍光タンパク質、炭酸脱水酵素、クエン酸合成酵素、リゾチームそれぞれを 6 mol/L 塩酸グアニジンで化学変性させた。ロールアッ

プナノシートと変性タンパク質を水溶液中で混合した後、ポアサイズ $0.2\ \mu\text{m}$ のメンブランフィルターを用いてろ過し、ロールアップナノシートに包接されたタンパク質と未包接のタンパク質を分離した。前者を水又は酸化還元剤などを含む水溶液に再分散させ、塩酸グアニジン $6\ \text{mmol/L}$ 以下とした。照射によるロールアップナノシートの形状変化やナノチャンネルのサイズ変化に伴い放出されたタンパク質を前述のメンブランフィルターを用いて分離回収し、タンパク質の蛍光活性や酵素触媒活性の回復率を算出した。

4. 研究成果

<ロールアップナノシートの創製> 原子間力顕微鏡観察により、糖脂質 1 は水中での自己集合により厚み約 $2.0\sim 2.4\ \text{nm}$ のナノシートを形成することが分かった。ナノシートの水分散液を凍結乾燥した後、粉末 X 線回折 (XRD) 測定を行ったところ、膜周期間隔 $d = 2.4\ \text{nm}$ が得られ、ナノシートが糖脂質 1 の単分子膜構造からなることが明らかとなった。ナノシートに紫外光を 8 分間照射すると、糖脂質 1 内アゾベンゼンの *trans-to-cis* 構造異性化に伴い、ナノシートが内径約 $7\sim 9\ \text{nm}$ のナノチューブへと形態変化した。ナノチューブも単分子膜構造 ($d = 2.0\ \text{nm}$) を維持しており、ナノシートのロールアップ化によりナノチューブが形成されたことが示唆された。また、ナノチューブに可視光を 8 分間照射すると、糖脂質 1 内アゾベンゼンの *cis-to-trans* 構造異性化に伴い、ナノチューブがナノシートへと戻ることが分かった。

走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察により、糖脂質 2 は水中での自己集合によりナノシートがロールアップ化した内径約 $60\ \text{nm}$ のナノチューブを形成することが分かった。XRD 測定により、ナノチューブは、膜周期間隔 $d = 6.4\ \text{nm}$ の二分子膜構造からなることが示唆された (図 2a)。ナノチューブに紫外光を 3 時間照射すると、糖脂質 2 の分子間でジアセチレン部位の光重合が二分子膜構造 ($d = 5.1\ \text{nm}$) を維持しながら進行すること、そしてそれに伴いロールアップの曲率が増大し (図 2b)、ナノチューブの内径が $10\ \text{nm}$ 以下へと収縮することが明らかとなった (図 2c)。SEM 観察により、糖脂質 2 ($-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$) と糖脂質 2 ($-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$) も水中での自己集合によりナノチューブを形成することを確認した。

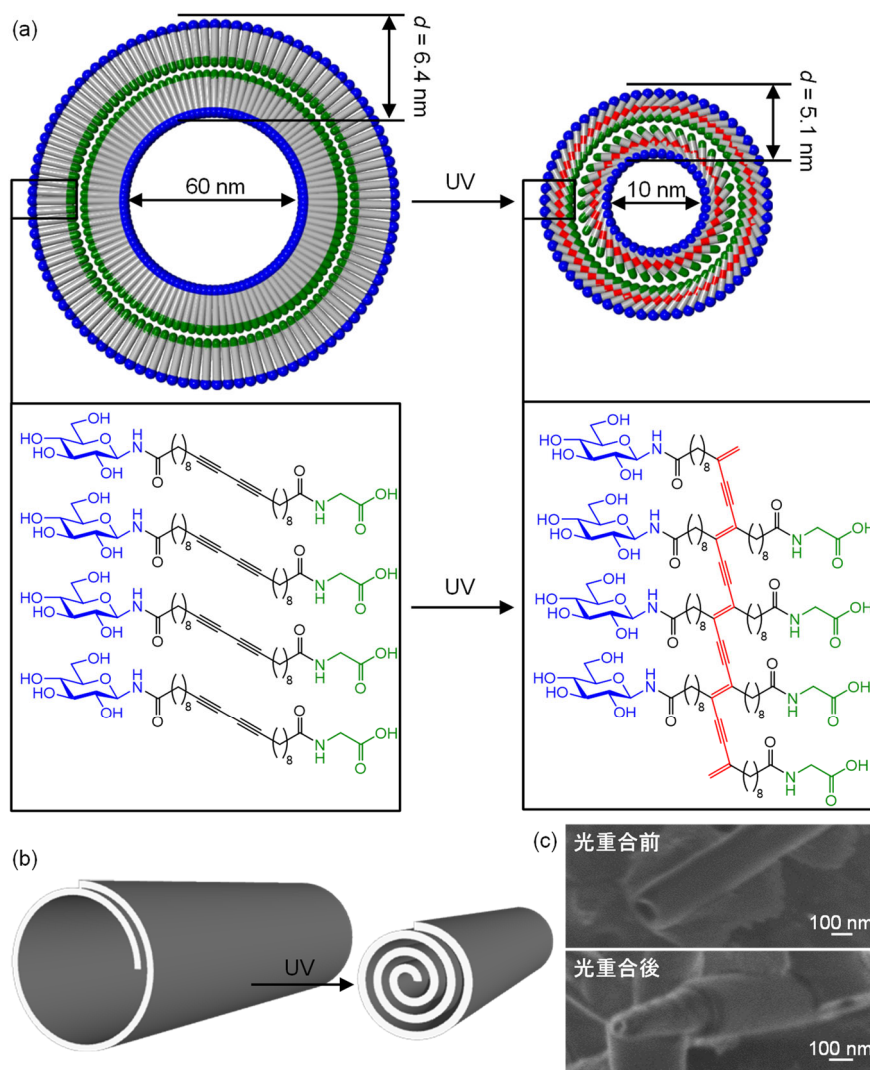


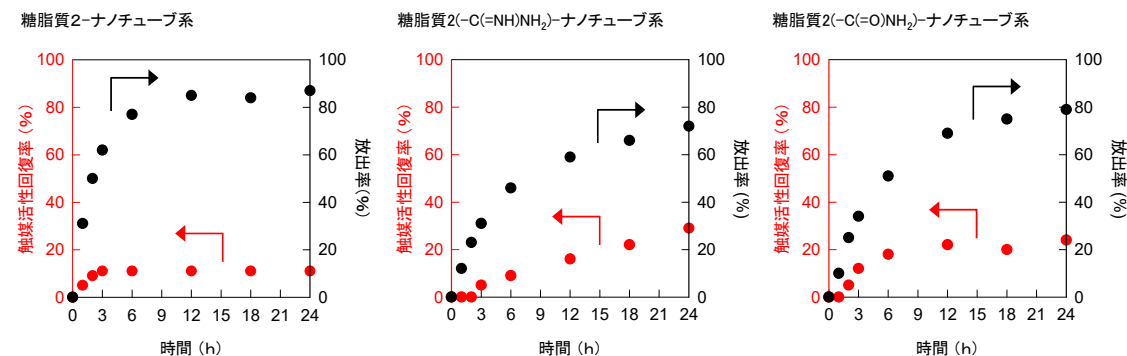
図 2 (a) 糖脂質 2 の二分子膜構造からなるナノチューブ及びジアセチレン部位を光重合した後のナノチューブの分子パッキング様式図 (b) 光重合前後のナノチューブの模式図 (c) 光重合前後のナノチューブの走査型電子顕微鏡像

<ロールアップナノシートによるタンパク質のリフォールディング促進> 6 mol/L 塩酸グアニジンによる化学変性で蛍光活性を失活させた緑色蛍光タンパク質 GFP (50 μg) 共存下、糖脂質 1 のナノシート (5 mg) を紫外光照射によりロールアップ化し、ナノチューブへと形態変化させた。この操作により、変性 GFP (約 20 μg) をナノチューブに包接することができた。また、包接と同時に GFP の蛍光が回復したことから (回復率は約 70%)、リフォールディングが起きることが明らかとなった。紫外光を照射せずナノシートの状態を維持したままでは GFP の蛍光は全く回復せず、ナノチューブのナノチャンネルが、生体分子シャペロンの筒状ナノ空間のように GFP のリフォールディングを促進する場として機能することが示された。可視光照射によりナノチューブをナノシートへ戻すと、従来用いられていた前述の溶離液を必要とすることなく、リフォールディングした GFP を高純度で速やかに回収することができた。

6 mol/L 塩酸グアニジンによる化学変性で触媒活性を失活させた炭酸脱水酵素 CAB (50 μg)、クエン酸合成酵素 CS (50 μg) それぞれの水溶液と凍結乾燥した糖脂質 2 のナノチューブ (10 mg) を混合し、一晚攪拌した。この操作により、変性 CAB (約 15 μg)、変性 CS (約 10 μg) をナノチューブに包接することができた。紫外光照射による光重合を介してナノチューブの内径を収縮させたところ、当該酵素がバルク水中に放出されると同時に触媒活性が回復した。その回復率 (CAB で約 60%、CS で 45%) は、紫外光を照射せずナノチューブの内径を収縮させなかった場合の回復率 (CAB で約 15%、CS で 10%) よりも著しく高かった。内径が収縮する際、ナノチューブの膜壁が酵素に接触することで力学的作用が働き、リフォールディングが促進された可能性も考えられる。

同様に、6 mol/L 塩酸グアニジンで化学変性させたリゾチーム LS (50 μg) と糖脂質 2 のナノチューブ (10 mg)、糖脂質 2 の末端にウレア型官能基を修飾した糖脂質 2(-C(=O)NH₂) 及び糖脂質 2(-C(=NH)NH₂) のナノチューブ (10 mg) を混合し、変性 LS をそれぞれのナノチューブに包接した。糖脂質 2(-C(=O)NH₂) 及び糖脂質 2(-C(=NH)NH₂) のナノチューブへの LS の包接量は約 39 μg、約 46 μg となり、糖脂質 2 のナノチューブへの包接量約 22 μg より多く、ウレア型官能基が変性 LS の表面に露出した疎水性アミノ酸残基に対して特異的に相互作用することが示唆された。上記の CAB 系と CS 系と同様、いずれの場合も紫外光照射による光重合を介したナノチューブの内径収縮が LS の触媒活性回復率を増大させることが分かった (図 3、上段と下段の比較)。回復率の増大は、特に糖脂質 2(-C(=NH)NH₂) のナノチューブの系で顕著であり (図 3、下段中央)、そのウレア型官能基が LS の凝集を抑制しながらリフォールディングに対しても有効に機能することが明らかとなった。

紫外光照射による光重合を介した内径収縮なし



紫外光照射による光重合を介した内径収縮あり

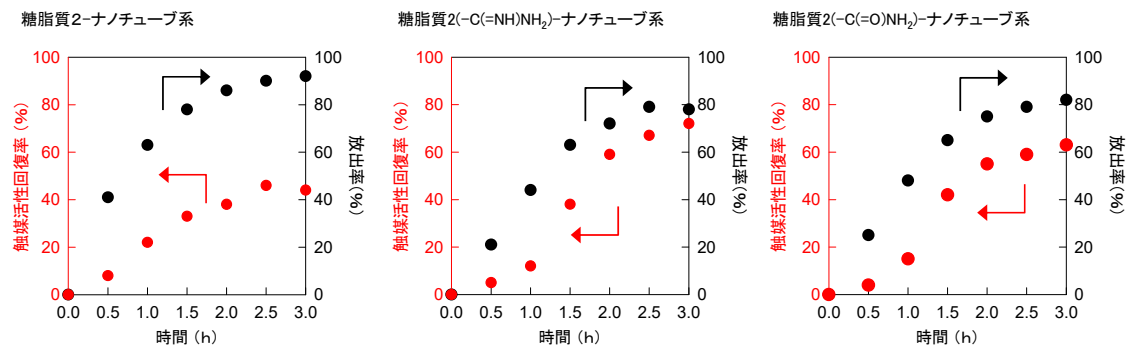


図 3 糖脂質 2-ナノチューブ、糖脂質 2(-C(=NH)NH₂)-ナノチューブ、糖脂質 2(-C(=O)NH₂)-ナノチューブからのリゾチームの放出と触媒活性回復

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Kameta Naohiro, Ding Wuxiao, Uzawa Hiroataka	4. 巻 34
2. 論文標題 Supramolecular Nanotubes Functioning as Morphology Regulators for Fluid-State Molecular Assemblies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry of Materials	6. 最初と最後の頁 9425 ~ 9436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemmater.2c01722	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 Kameta Naohiro, Ding Wuxiao	4. 巻 6
2. 論文標題 A supramolecular nanotube used as a water-degradable template for the production of protein nanotubes with high thermal/chemical stabilities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Materials Chemistry Frontiers	6. 最初と最後の頁 3174 ~ 3178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2qm00661h	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 Kameta Naohiro, Kogiso Masaki	4. 巻 27
2. 論文標題 Self Assembly of a Pyridine Based Amphiphile Complexed with Regioisomeric Dihydroxy Naphthalenes into Supramolecular Nanotubes with Different Inner Diameters	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry-A European Journal	6. 最初と最後の頁 12566 ~ 12573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202101354	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 Kameta N., Kikkawa Y., Norikane Y.	4. 巻 4
2. 論文標題 Photo-responsive hole formation in the monolayer membrane wall of a supramolecular nanotube for quick recovery of encapsulated protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nanoscale Advances	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) 10.1039/d2na00035k	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 Kameta Naohiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Stimuli Responsive Transformable Supramolecular Nanotubes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Chemical Record	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) 10.1002/tcr.202200025	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 Kameta N., Ding W.	4. 巻 13
2. 論文標題 Stacking of nanorings to generate nanotubes for acceleration of protein refolding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 1629 ~ 1638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0nr07660k	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 Kameta Naohiro, Ding Wuxiao, Masuda Mitsutoshi	4. 巻 57
2. 論文標題 Glycolipid nanotube templates for the production of hydrophilic/hydrophobic and left/right-handed helical polydiacetylene nanotubes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 464 ~ 467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc07387c	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 Kameta Naohiro, Ding Wuxiao, Masuda Mitsutoshi	4. 巻 94
2. 論文標題 Effect of Glycine Position on the Inner Diameter of Supramolecular Nanotubes Consisting of Glycolipid Monolayer Membranes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1172 ~ 1178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20200394	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 亀田直弘、吉川佳宏、則包恭央
2. 発表標題 光刺激によって生体分子を放出可能な超分子ナノチューブ
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 亀田直弘、丁武孝
2. 発表標題 内径制御が可能な脂質単分子膜ナノチューブの創製とそのナノチャンネルを利用した高分子合成
3. 学会等名 第73回コロナおよび界面化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 亀田直弘
2. 発表標題 非共有結合型高分子からなる分子集合性ナノチューブの開発
3. 学会等名 埼玉大学大学院高分子工業化学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------	---------