

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510131

研究課題名(和文) フラーレン様構造を持った機能スイッチング型ペプチド立体の創製

研究課題名(英文) Designing fullerene-like peptide structures with switching capability of functions

研究代表者

田村 厚夫 (TAMURA, ATSUO)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90273797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：自然界に存在するタンパク質等の生体分子の多くは、自己集合により規則的な構造体を形成することでその機能を発揮している。本研究では、らせん型のヘリックス構造を骨格としたタンパク質(ペプチド)を人工設計し、新たな立体構造体や新機能の創製を目指した。機能として酵素機能、アミロイド線維分解能、細胞凝集能、レアメタル結合能など自然界には存在しないものを含む新機能の獲得に成功した。これらは、高齢化に伴う病気や資源の有効活用など現代社会の多くの問題解決の糸口になるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Various biomolecules, especially proteins, form nano structures by self-assembly, resulting in unique functions in nature. Here we have artificially designed tertiary structures, e.g. the fullerene-like cage, by combining helical units. Then we have succeeded in obtaining novel functions such as enzymatic activity, digestion of amyloid fibrils, aggregating cells without cytotoxicity, and binding to rare metals. These functions are expected to resolve serious issues such as diseases and depletion of natural resources, which address the needs of the modern aging society.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノ構造 ペプチド ナノチューブ ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

自然界に存在しているタンパク質は、生命を維持し種々の生体機能をバランス良く果たすように進化したものである。逆にみると、1つの機能のみが最高の活性を示すように最適化された分子ではない。その証拠に、既存タンパク質をアミノ酸置換によって人工的に高機能化することが可能である。また、人工デザインでタンパク質を創出した場合は、ある特質（例えば安定性）のみを取り上げ、それに適った分子とすることが可能である。例えば、私共は新しい概念で安定なタンパク質の分子を新規にデザインすることに、成功している(De novo design of foldable proteins with smooth folding funnel: Automated negative design and experimental verification, *Structure* 11, 581-590)。これは、タンパク質内の相互作用を物理化学的に正確に理解し、その原理を適用して実際に「人工タンパク質構造を作ってしまう」ことができたということである。さらに、この概念を分子間に拡張することで、小型ペプチド分子を整然と集合させ、直径10nm程度のナノファイバーおよびナノチューブを形成させる技術およびタンパク質分子の機能向上技術を開発してきた(国際特許を含む関連特許出願取得12件)。これらの技術を基に、さらに高度なナノ構造体の設計に挑みたいと考えるに至った。

ナノレベル構造体の代表例としてC₆₀フラレーンが良く知られている。サイズは大きくなる(炭素1原子がアミノ酸1分子に相当)が、このような構造をタンパク質分子の集合体で形成し内部空間を活用できれば、生体分子特有の機能性によって新しい生体材料として利用可能であり、自然界で分解され合成にエネルギーはほとんど要しないなど環境にやさしいという点も併せて、非常に有用な物質となり得ると考えられる。

2. 研究の目的

C₆₀フラレーン様のナノ構造体を、人工設計したヘリックス小型ペプチド分子を自己集合させることで構築する。この構造体の集合離散を、外部環境(具体的にはpH変化及びイオン添加)によって単位構造形成のON/OFFをスイッチングすることで制御し、内部空間に取り込んだ物質の「貯蔵 放出」可能な新しい機能性生体ナノ材料を創製する。この新材料は、生成時には水中常温下で収率ほぼ100%で進行するためエネルギー付与及び有害副産物がゼロ、生成物も微生物の分泌するタンパク質分解酵素で生分解されるなど自然に負荷をかけない環境調和型材料となる。高い選択性と効率性をもったセンサー等として利用できるこの新規材料で新分野を切り拓きたい。

分子レベルのデザインをナノレベルの集合体構造へ持つていくための具体的な設計

原理としては、上記論文で示したようなヘリックス型の相互作用を用いる。また、構造スイッチングを可能とするためpH感受性または金属配位性のアミノ酸を配し、結合に伴って化学的性質が変化し、構造形成のON/OFFが可能となるようにする。内包させる機能分子として、小型タンパク質、蛍光性分子、および薬剤を用い、ターゲットの封じ込めと放出の制御を目指す。

分子集合させる主鎖間の相互作用としては、一般にヘリックス型とシート型の2種類が存在する。良く知られているアミロイド線維はシート型であるが、その形成は遅いことが知られている。一方、ヘリックス型は、フォールディングの速さ(nsec~μsec)から、バンドルの形成が高速で、長さの制御が行いやすいため、これを用いることとする。鎖長はらせん3回転分のアミノ酸21個(長さ3.5nm)を基本とし、中心に三角形のジャンクションを配し、その角度、長さ、および柔軟性などを工夫することで、この構成単位を三次元に展開することが達成できると予想する。

生命科学分野において、タンパク質のフォールディング問題の解明は、構造予測および構造デザインへと繋がる点で最重要視されるものの一つである。一方、近年、タンパク質は1つの分子だけでなく、分子間で集合する性質があり、これは構造形成の上でも進化の上でも重要だと認識されてきている。本研究のように、高度に組織化された人工タンパク質集合体の設計に成功することは、集合時の構造形成および分子間相互作用という重要な因子の本質的な理解につながると考える。また、機能発現とその制御を行うことができれば、ナノ材料分野や医療まで至る幅広い分野で有用な新素材となるはずである。このようなタンパク質の人工設計によるナノ構造体の創出は世界的に見て萌芽的な研究が散発的に見られるだけである。その少ない報告例でも、なぜ集合するのかという最も基本的な形成理由が全般的な外れである。例えば、ナノファイバーになるには電荷が少ないと良いとか、親水性と疎水性が交互になるパターンが良いなどの説が報告されているが、我々は既に反例を持っている。この原理的な点を含めて、この研究の独創性・新規性は明らかであり、現時点は新たな構造体形成の成功につながるチャンスであると考えられる。

本研究のアイデアとしては、狂牛病やアルツハイマー病で見られるアミロイド線維として知られている1次元的なナノファイバー構造の形成にとどまらず、二次元から三次元空間まで拡張した構造体へ発展させた点が斬新である。この結果、立体的なサイズや形状を制御することで、目的物質の選択的な取り込みを促進し、タンパク質の特徴であるアミノ酸の多様性と併せて、高度に特異的な機能を持った分子の創出につながることを考える。ペプチドで構成するメリットとして、

生分解性である点も含め、高機能で環境負荷の少ない新物質として多種多様な用途が期待されると考える。さらに、タンパク質は酵素を筆頭として生体の機能を司る物質であるが、人工設計した今回のペプチドにも機能を、それも自然界では実現困難な新機能を付与することを目指したい。アルファヘリックス型の構造体を用いるということのみを「縛り」として、どのような多機能性を持たすことができるのか、その限界を取り払うことが可能なのかトライしていく。環境問題の解決や高齢化社会における疾病の克服など現代社会が抱える諸問題の解決につながる新機能獲得の可能性を示すことは、社会的意義も大きいと考えられる。

3. 研究の方法

設計 合成 構造測定 構造解析 再設計 というスパイラルループを繰り返すことでケージ構造を創る。この際、設計では申請者が開発してきたペプチドナノファイバーおよびチューブ構造設計のノウハウを活用する。合成および測定は、既存設備を活用し、測定ではナノメートルレベルでのマクロな形態観測、および原子レベルのミクロな情報を抽出する分光測定の両方を行う。これより、ペプチドの立体構造情報と集合体形成との相関を見出す。次に、構成単位タンパク質に機能を持たせるため、機能性のアミノ酸、即ち活性部位や結合部位で最重要の役割を果たすアミノ酸を最適な位置に配して、機能を観測する。

平成23年度は「基本構造の構造解析と目的構造の創出」を行う。まず、現在までに得られたヘリックスおよびシート型のファイバー、チューブ構造の固体状態での構造解析を赤外分光装置で行い、固体NMRで得られたデータおよびCD等で得られた溶液状態でのデータと比較する。用いる装置と必要な試薬等は、合成のためにペプチド合成機（現有設備）、精製のために液体クロマトグラフィー（現有設備）、構造解析のためにNMR、CD、IR等の分光器（現有設備）である。CDは2次構造解析に用いるが、独立して2次構造解析が行うことができるIR装置を相補的に用いる。NMRは原子レベル分解能での構造決定に用いる。IR装置の利点として、同位体ラベルしたタンパク質について部位特異的な情報を得られる点、さらに固体状態でも測定可能である点などが挙げられ、CDでは獲得困難な情報を得ることができる。ヘリックス間相互作用に関するノウハウに、得られた構造情報を加えることで、より微細で精密な分子設計を行う。得られた設計物について、原子間力顕微鏡（AFM:現有設備）や電子顕微鏡（学内共同利用設備）の観測を含めてマクロな形態解析を行う。目的構造と異なった場合は、その要因を特定して新たな設計につなげる。この設計から構造解析というループを繰り返す

ことで、フラレン様ケージ構造の形成を行う。

具体的には、角度、長さ、柔軟性を最適化した三叉路ジョイントにヘリックスを結合させ、別の特定のヘリックスとのみバンドルを形成できるように設計する。ジョイントの1例としてはまずTris(2-maleimidoethyl)amineを用い、これにMichael付加反応によって設計ペプチドのCys残基を結合させる。バンドル形成可能な直線状ヘリックスに、ジョイント結合した2種類のヘリックスを混合すると、中央図のような蜂の巣（ハニカム）構造となる。三叉路が平面的ではなく、角度を持たせたものを用いると、立体的な多面体構造になると予測されるので、ジョイントもこの他種々のものを用いていく。ヘリックスのアミノ酸配列は、私共がバンドル化に成功したものの出発とし、Asnの位置などを工夫する。

平成24年度以降は、構造スイッチング制御および機能化を行う。構造転移に基づくスイッチング制御に関して具体的には、水素イオン結合（pH）で誘起される構造変化や構造形成、金属、蛍光物質、およびタンパク質への特異的結合能を付与することを行う。このために、pHで荷電状態が変化するアミノ酸（His, Asp, Gluを利用）を複数配置し、中性溶液中では正電荷を持つアミノ酸（LysまたはArg）との静電的引力によってフラレン様構造を保持するが、酸性では静電相互作用の反発により可逆的に壊れる分子を設計する。

次に結合部位の立体構造を保持させたタンパク質分子をデザインすることで、金属との結合を起こす結合型機能を織り込んだものへ発展させる。この際、自然界で金属結合するタンパク質では、His, Cys, Glu, Aspの4種類の側鎖が相互作用していることが知られている。そこで、決定した立体構造をもとに、空間的に最適配置で金属と相互作用するようにこれらのアミノ酸側鎖を導入する。また、芳香族環を有する蛍光物質を取り込むために、ケージ構造内部の疎水性と芳香族アミノ酸（Trp, Tyr, Phe）の配置を工夫する。蛍光物質は検出が容易であり、また薬剤と構造が比較的近いものも多いため、ドラッグデリバリーなどへの適用化を確認することが可能となる。さらに、小型のタンパク質を取り込めるように、内径と形状を制御する。さらに、ヘリックス集合体内に酵素の活性部位を天然酵素と同様の立体配置で配することで、ミニチュア酵素の創製を目指した。

相互作用の検出は、等温滴定型熱量計（ITC:現有設備）あるいは分光学的測定を用いた滴定によって、結合定数やエンタルピー、エントロピーなどの熱力学的パラメータを高精度で求め、詳細に解析することで行う。また、結合によって変化する構造も、原子レベルの分解能でNMRを用いて追跡する。これらの構造体の構造安定化機構を明らか

にすることで、新たな基質結合の有無、あるいは pH の変化で構造形成を起こし、ヘリックス ランダム構造間を構造転移するスイッチング型機能を発現させる。

1つの分子ではなく集合体とすることで、構造安定性、協同性、および多種多様な相互作用を導入することが可能である。集合体としては、今回は分子間の空間配置を設計するのが容易なヘリックス型を用いて多機能化を目指す。ヘリックス型の場合、基本相互作用はヘリックスバンドル型であるので、中央の空隙に上記金属結合性のアミノ酸を導入すべく、近隣のアミノ酸の大きさや疎水性を考慮して設計する。また、ヘリックスは構造形成のフォールディング速度がシートに比べて格段に速いため、高速高感度の構造スイッチングが可能となる。このようにして得られた機能性タンパク質集合体は、組み合わせによる多機能化が可能である。例えば、1) 集合体を形成するタンパク質分子に異なる結合能を持ったものをある比率で混合する、2) タンパク質集合体ファイバーに、別のタンパク質分子を化学的に結合させる(この技術は既に開発済み)などのアイデアを用いる。これを利用すると、例えば結合している物質を、新たに加えた物質が結合することで放出させるような、生体内で行われている情報伝達に類似した複雑な機能を人工システムで実現し、その機構を詳しく探ることが可能となる。形態の観測は、AFM および電子顕微鏡で行う。

4. 研究成果

23年度は、ペプチド分子集合体の人工デザイン研究を、1) 構造面および2) 機能面の両面から展開した。これは、フラレン様のナノ構造の骨格となる分子設計を行うとともに、この構造体を機能化し有用な機能性ペプチド集合体とするためである。1) について、まずオリジナル技術であるペプチドナノチューブを環状ペプチドの集合によって形成させたものについて、詳細な原子レベルでの立体構造を超高分解能の原子間力顕微鏡測定によって明らかにした。この結果、直径2ナノメートルの環状ペプチドが積層し、さらにこのチューブが何本かバンドル化していること、その際に外側のアミノ酸側鎖が規則的に配していることを明らかにした。この観測結果を元に、さらに二次元平面的、および三次元立体的な構造を形成させるために必要な分子間相互作用が明示されるに至った。そこで、ヘリックス間の相互作用を最適化するため、基本構造単位を三角形として組合せ、分子間に必要な疎水および静電相互作用を導入することとした。これについて、CDやNMR法による物理化学的分光測定、およびナノ構造形態を原子間力顕微鏡によって観測することで、分子同士が集合していることまで確認したが、目的構造とするには

さらに工夫が必要なことが示唆された。

一方、機能化としては、レアメタル等の希少金属イオンに対する結合機能の獲得を目指した。基本構造はヘリックス構造であるが、結合能をより高くするために、分子を数分子集合させることとし、分子の間に結合部位を配することとした。この結果、銅およびパラジウムイオンの双方、あるいはパラジウムのみに選択的に結合するペプチドを得ることに成功した。この成果を産業界での利用可能性を探るため、紙に吸着させ機能紙として利用できるかどうかの実験を行った。この結果、パラジウムを高効率で吸着する機能紙となったことが明らかになり、特許出願に至った(特願2012-47585)。

24年度は、まずウイルスキャプシド等の構造を参考にして、規則的な構造を有するナノ構造体を型三叉路とヘリックス型バンドル化を工夫したペプチドの自己集合により構築することを目標とした。三叉路構造として β -annulus 構造即ち3本のペプチド鎖が β -ストランドに類似した水素結合により形成される三叉型3量体構造を用いた。この末端に相補的ヘリックス会合形成配列を追加した新たな2種類のペプチドF-K3/F-E3を合成した。そしてこれらペプチドの自発的会合により、フラレン様のケージ構造の構築を試みた。

実験ではCD測定、DLS測定、AFM観察を行い、2種ペプチドの混合前後における二次構造変化、粒子径変化、形状変化から会合体の形成について検証した。次に、形成された会合体の構造形態をゲルろ過クロマトグラフィーで探り、正確な分子量を分析超遠心測定によって明らかにした。最後に会合体が有する機能について、ゲスト分子との相互作用の観点から測定を行い検討した。

これらの結果から相補的ヘリックス配列の性質により会合していること、また2種会合条件においても β -annulus 型3量体が健在であることが明らかとなった。さらに形成された巨大球状粒子の表面や内部構造について調べるために、ゲスト分子として種々のタンパク質を用いて測定を行ったところ、Myoglobin が取り込まれていることが確認できた。これはペプチドの会合による巨大粒子形成に伴い、その内部にタンパク質分子が取り込まれたことを示す結果であり、球状粒子内部にそのようなゲスト分子を内包できる空間が存在することを示すものでもある。以上の結果から、このようにデザインしたペプチドは、自己会合によって規則的な構造と機能を有した球状ナノ粒子を形成していることが示された。

25年度はさらに新たな機能を付与すべく機能化を進展させた。この結果、ヘリックスを4分子程度集合させ、内部にタンパク質分解酵素が有する触媒部位を最適空間

配置で配することでの加水分解能の獲得することに成功した。これと合わせた機能化として、以下の6点の獲得を行った。即ち1) 脂肪中のエステル結合の加水分解能、2) アミロイド線維の加水分解能、3) 菌体および細胞を凝集させる機能、4) 生体膜中での自己会合能とシグナル伝達の可能性開発、5) 光による分子集合状態の on/off 制御、6) 新たな金属(レアメタル、レアアース)結合能、の6点である。

これらの成果は、我国が高齢化社会を迎えるにあたって、1) は肥満という生活習慣病の克服、2) はアルツハイマー病などの根源的治療法につながるものとなる。また、6) については、平成 23 年度から継続して金、白金、パラジウムなどの貴重なレアメタルだけでなく、ネオジムやディスプロシウムなどのハイテク機器に不可欠なレアアースに至るまで、新しいリサイクル技術につながるものであり、現代の資源問題の克服にもつながる。このように、現代社会の問題点解決につながる新規技術として期待される。

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)

Naoki Yamamoto & Atsuo Tamura (2014) Designing Cell-Aggregating Peptides without Cytotoxicity. *Biomacromolecules* **15**, 512-523. 査読有

Tomoki Sugihara, Itsuho Hayashi, Hiroshi Ohnishi, Kenjiro Kimura, & Atsuo Tamura (2013) Sub-nanometer-resolution imaging of peptide nanotubes in water using frequency modulation atomic force microscopy *Chemical Physics*, **419**, 74-77. 査読有

[学会発表](計 2 1件)

枝川朝子、藤本隼平、田村厚夫、ナノ会合体の形成に及ぼす helix 間相互作用部位の影響、若手フロンティア研究会 2013 (神戸) 2013/12/25

Takato Hiramatsu & Atsuo Tamura Design of transmembrane peptide for constructing a signaling model 第 51 回日本生物物理学会年会 (京都) 2013 年 10 月 30 日

Yoshihiro Iida & Atsuo Tamura Hydrolysis of lipid droplets and amyloid fibrils by the designed peptide 第 51 回日本生物物理学会年会 (京都) 2013 年 10 月 30 日

Shinji Kawabata, Yasuhiro Ebisu, Yuta Saeki, Masahiko Hayashi & Atsuo Tamura Design of Photo-controllable Cyclic Peptides 第 51 回日本生物物理学会年会 (京都) 2013 年 10 月 30 日

田村厚夫 ペプチドナノチューブの人工デザイン - 新機能バイオ材料の創製を目指して - 新化学技術推進協会講演会 (招待講演) (東京) 2013 年 4 月 10 日

平松貴人、田村厚夫 人工設計膜貫通ペプチドを用いたシグナル伝達モデル系の構築 若手フロンティア研究会 2012 (神戸) 2012 年 12 月 25 日

川端真司、蛭子靖弘、佐伯優太、林昌彦、田村厚夫 光応答性ペプチドナノチューブの創製 若手フロンティア研究会 2012 (神戸) 2012 年 12 月 25 日

平松貴人、田村厚夫 人工設計膜貫通ペプチドを用いたシグナル伝達モデル系の構築 若手フロンティア研究会 2012 (神戸) 2012 年 12 月 25 日

中尾みのり、田村厚夫 芳香族化合物と相互作用するペプチドナノチューブの分子設計 第 85 回日本生化学会大会 (福岡) 2012 年 12 月 16 日

藤本隼平、田村厚夫 -sheet 様三叉構造を骨格とするケージ状ペプチド会合体の人工設計 第 85 回日本生化学会大会 (福岡) 2012 年 12 月 16 日

Yoshihiro Iida, Atsuo Tamura Design of functional miniature peptides acting like the lipase 第 50 回 日本生物物理学会年会 (名古屋) 2012 年 9 月 22 - 24 日

藤本隼平、田村厚夫 ヘリックス間相互作用によって誘起されるペプチドナノ構造体の設計 若手フロンティア研究会 2011 (神戸) 2012 年 12 月 22 日

川端真司、田村厚夫、複孔性ペプチドナノチューブの分子設計 先端融合科学シンポジウム「タンパク質アセンブリ - 会合、超分子化、凝集 - 」(神戸) 2012 年 1 月 31 - 2 月 1 日

藤本隼平、田村厚夫 ヘリックス間相互作用によって誘起されるペプチドナノ構造体の設計 先端融合科学シンポジウム「タンパク質アセンブリ - 会合、超分子化、凝集 - 」(神戸) 2012 年 1 月 31 - 2 月 1 日

中尾みのり、田村厚夫、芳香族化合物と相互作用するペプチドナノチューブの分子設計先端融合科学シンポジウム「タンパク質アセンブリ - 会合、超分子化、凝集 - 」(神戸) 2012年1月31 - 2月1日

田村厚夫、機能性ペプチドナノチューブの人工設計先端融合科学シンポジウム「タンパク質アセンブリ - 会合、超分子化、凝集 - 」(招待講演)(神戸) 2012年1月31 - 2月1日

林逸歩・木戸脇 彩, 河村 芽生, 田村厚夫 機能性ペプチドナノチューブの設計第33回日本バイオマテリアル学会(京都) 2011年11月21 - 22日

林逸歩、河村芽生、田村厚夫、膜結合能を有するペプチドナノチューブの分子設計第84回日本生化学会大会(京都) 2011年9月21 - 24日

厚夫、大西洋 グラファイト-液体界面に集積したペプチドナノチューブの構造 分子科学討論会 2011(札幌) 2011年9月20 - 23日

田村厚夫、人工設計ペプチドが織り成す構造体の世界 分子からナノチューブまで第2回メディシヨナルナノテク研究会(招待講演)(大阪) 2011年7月28日

21)岡本裕美、山本直樹、田村厚夫、シグナル伝達モデル系の構築を目指した水溶性膜貫通ペプチドの設計 第11回 日本蛋白質科学会年会(大阪) 2011年6月7 - 9日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 3件)

名称：アミロイド分解能を有する人工ペプチドおよびその利用
発明者：田村厚夫、飯田禎弘
権利者：国立大学法人神戸大学
種類：特許
番号：特願 2013-222702
出願年月日：2013/10/25
国内外の別：国内

名称：レアメタル結合能を有する人工ペプチドおよびその利用
発明者：田村厚夫、飯田禎弘
権利者：国立大学法人神戸大学
種類：特許
番号：特願 2013-182954
出願年月日：2013/9/4
国内外の別：国内

名称：レアメタル結合能を有する人工ペプチドおよびその利用
発明者：田村厚夫、飯田禎弘
権利者：国立大学法人神戸大学
種類：特許
番号：特願 2012-47585
出願年月日：2012/3/5
国内外の別：国内

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
田村 厚夫 (TAMURA Atsuo)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：90273797

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：