

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620130

研究課題名(和文)蛋白質結晶エッチング法による新規超分子構造体の創成

研究課題名(英文)Construction of Protein Supramolecular Architectures by Etching of Protein Crystals

研究代表者

安部 聡 (ABE, Satoshi)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：40508595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質集合体は、高い対称性をもつケージやチューブなど、特異な構造体を形成するため、新しいナノ材料として高い注目を集めている。本研究では、タンパク質結晶内に形成される高次構造体をそのまま溶液中に切り出す、タンパク質超分子構造体の新規構築手法の開発を目指した。細胞内で結晶化する多角体結晶のナノカップ構造に着目し、単量体間に導入したシステイン残基の酸化反応によるジスルフィド結合形成により結晶内でのナノカップ構造体を構築した。結晶構造解析、MALDI TOF-MS、SDS-PAGEにより、ナノカップ構造体の同定を行い、多角体結晶からナノカップ構造体を構築することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Protein supramolecular architectures, such as cages, rings, tubes and two-dimensional arrays, have attracted a great deal of interest in bio-nanotechnology and material sciences. In this research, we demonstrated novel method to construct protein supramolecular architectures using protein crystals, which have highly ordered 3D arrangements of protein molecules. We used polyhedra crystals, in vivo protein crystals to construct nanocup structures. We designed polyhedra mutants, in which cysteine residues were introduced on the interfaces of monomer to form disulfide bonds within the crystals, for construction of nanocup structures. We succeeded in construction of the nanocup structures by oxidation and dissolution of the crystals. The nanocup structures were characterized by X-ray structure analysis, MALDI TOF-MS and SDS-PAGE. This method can be applied to various protein crystals to construct protein architectures.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：タンパク質結晶 多角体 超分子構造体 ジスルフィド結合

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の自己集積体は、合成高分子を使った超分子集積体にくらべ、特異な分子環境や構造を 10-100nm のサイズ領域で構築することが可能であり、新しい材料化学を切り開く手法として近年盛んに研究されている。タンパク質をビルディングブロックとしてボトムアップ的に構築されたケージやチューブ構造が多数報告されているものの、機能が達成された例はわずかである。その理由は、計算化学等で分子界面における設計が行われているものの、溶液中でのタンパク質会合の平衡を考慮することが難しく、実際に組み上がる構造を予想することが困難なためである。従って、溶液中での集積化法では、集積体の内部や外部を機能化することが困難なため、材料科学やナノバイオ分野への応用には至っておらず、これらの問題点を克服する新しいタンパク質集積体構築法の開発が求められている。本研究では、タンパク質の固体の集合体であるタンパク質結晶内に形成される高次構造体をそのまま溶液中に切り出すことができれば、精密な分子集合体の機能化技術になりうると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、結晶内に存在するタンパク質集合体を架橋化することにより、溶液中にその構造体を切り出す、新しいタンパク質超分子構造体の構築手法を開発する。本手法を実現するために、本研究では、細胞内で結晶化する「多角体」結晶に着目した。多角体は、昆虫ウイルスによって感染した昆虫細胞内で形成されるタンパク質結晶である。2007年にその構造が報告されており (F. Coulibaly, *et al.*, *Nature* **2007**, 446, 97-101)、分子量 2 万 8 千の単量体 (ポリヘドリン) が集積した結晶である。結晶内では、ポリヘドリン 3 量体がビルディングブロックとしてパッキングすることにより、結晶を形成している (図 1)。多角体は、高い安定性を有しているものの、pH10 以上のアルカリ溶液で溶解する。

本研究では、多角体の結晶内特有のナノカップ構造 (3 量体構造) に着目し、溶液中でもナノカップ構造を維持させるために、結晶

内でモノマー間を架橋化し、ナノカップ構造の形成と結晶溶解による溶液中への切り出しを行った (図 2)。

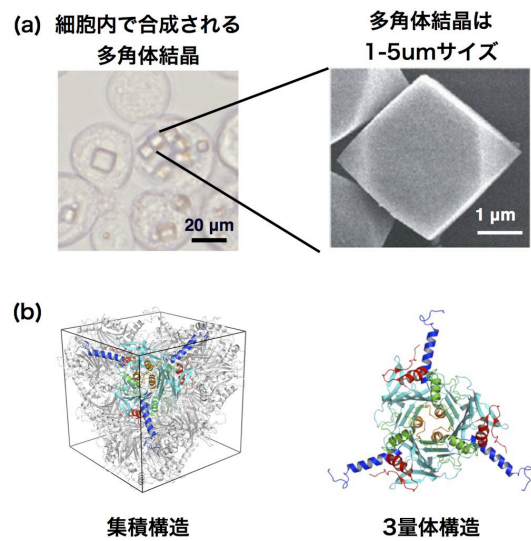


図 1. (a)細胞内での多角体結晶と SEM イメージ、(b)結晶構造 (PDB ID : 2OH6)

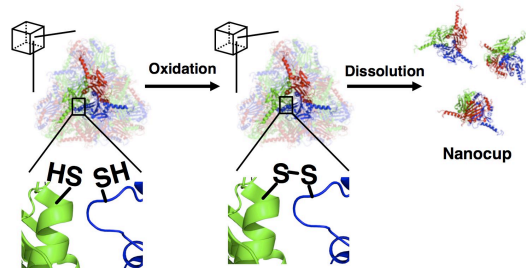


図 2. 多角体結晶を利用したナノカップ構造体の構築

## 3. 研究の方法

### 1. ジスルフィド結合形成のためのシステイン残基の導入

ナノカップ構造体を結晶内で構築するため、モノマー間をジスルフィド結合により架橋化するシステイン残基の設計を行った。ジスルフィド結合の距離 (C $\alpha$ -C $\alpha$ 間の距離で 4.7 - 6.5 Å) に近い 2 つのアミノ酸側鎖を選択した。具体的には、カップ構造の上部に位置する E73/Y83 にシステインを導入した E73C/Y83C 変異体、下部に位置する S193/A194 にシステインを導入した S193C/A194C 変異体、両方に導入した E73C/Y83C/S193C/A194C 変異体を作成した (図 3)。

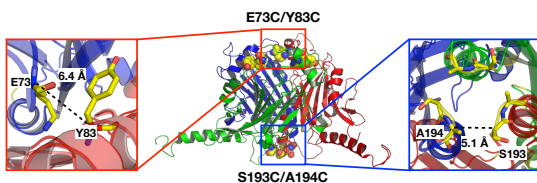


図 3. 変異体設計

## 2. 多角体変異体の酸化反応

結晶内でナノカップ構造を構築するために、 $6 \times 10^7$  個の結晶を 100mM 酸化水素水に 37 °C、12 時間浸漬し、変異導入したシステインの酸化によるジスルフィド結合形成を行った。

## 3. 結晶構造解析

次に、酸化反応後結晶内ナノカップ構造の確認と酸化反応前後での構造変化を明らかにするために、SPRING-8 BL32XU、BL41XU にて、X 線結晶構造解析を行った。

## 4. 多角体結晶溶解によるナノカップ構造体の溶出

酸化した結晶を 100 mM Glycine-NaOH buffer (pH 10.0) 溶液に 25 °C、6 時間浸漬させ、結晶を溶解した後、各種測定により、ナノカップ構造のキャラクタリゼーションを行った。

## 4. 研究成果

設計した 3 つの変異体とも昆虫細胞内で結晶を形成したことを確認した。続いて結晶構造解析を行った。多角体にシステインを導入、酸化反応によるジスルフィド結合形成を行っても結晶系や全体構造にほとんど変化はなかったことから、システインの導入や酸化反応による全体構造への影響がないことがわかる。酸化した前後の変異体の構造変化を解析したところ、酸化後、変異導入したシステインによる結晶内ジスルフィド結合の形成を確認した。また、酸化反応によりシステイン残基の側鎖が構造変化し、ジスルフィド結合が形成されていることを明らかとした (図 4)。

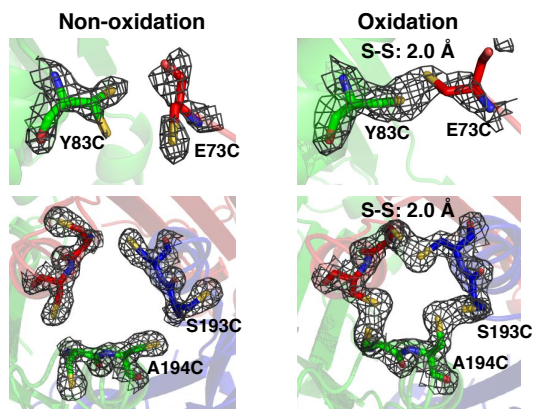


図 4. X 線結晶構造解析 (E73C/Y83C および S193C/A194C の構造変化)

結晶内に形成したナノカップ構造体を溶液中に切り出すために、結晶を塩基性溶液により溶解した。透析後、切り出した構造体の分子量を MALDI TOF-MS および SDS-PAGE により同定した結果、ナノカップ構造体の分子量と良い一致を示した。3 つの変異体の比較からナノカップ構造の上下に 2 種類のジスルフィド結合を導入した E73C/Y83C/S193C/A194C 変異体がもっとも効率よくナノカップ構造を切り出すことがわかった。また、先に結晶を溶解したのちに、酸化したサンプルでは、カップ構造は検出されず、凝集体が観測されたため、特異な集積構造体を切り出すためには、結晶状態で酸化し架橋化することが必要であることがわかった。結晶内でジスルフィド結合の形成部位を設計することにより、多角体結晶からナノカップ構造体を切り出すことに成功した。

現在、本手法を拡張するために、様々なタンパク質結晶から構造体を切り出す変異体の設計を試みている。

## 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 6 件)

- ① S. Abe, B. Maity, and T. Ueno, "Design of Confined Environment using a Protein Cage and Crystals in Development of Bio-hybrid Materials" *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 6496-6512. 査読有, DOI : 10.1039/C6CC01355D
- ② H. Tabe, T. Shimoi, M. Boudes, S. Abe, F. Coulibaly, S. Kitagawa, H. Mori, and T.

Ueno, "Photoactivatable CO Release from Engineered Protein Crystals to Modulate NF-kB Activation" *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 4545-4548. 査読有, DOI : 10.1039/C5CC10440H

- ③ **S. Abe**, H. Ijiri, H. Negishi, H. Yamanaka, K. Sasaki, K. Hirata, H. Mori, and T. Ueno, "Design of Enzyme-Encapsulated Protein Containers by in Vivo Crystal Engineering" *Adv. Mater.*, **2015**, 27, 7951-7956. 査読有, DOI : 10.1002/adma.201503827
- ④ **S. Abe**, Y. Tokura, Y. Tokura, R. Pal, N. Komura, A. Imamura, K. Matsumoto, H. Ijiri, N. J. M. Sanghamitra, H. Tabe, H. Ando, M. Kiso, H. Mori, S. Kitagawa, and T. Ueno, "Surface functionalization of protein crystals with carbohydrate using site-selective bioconjugation" *Chem. Lett.*, **2015**, 44, 29-31. 査読有, DOI : 10.1246/cl.140865
- ⑤ **S. Abe** and T. Ueno, "Design of Protein Crystals in the Development of Solid Biomaterials" *RSC Adv.*, **2015**, 21366-21375. 査読有, DOI : 10.1039/C4RA16748A
- ⑥ H. Tabe, K. Fujita, **S. Abe**, M. Tsujimoto, T. Kuchimaru, S. Kizaka-Kondoh, M. Takano, S. Kitagawa and T. Ueno, "Preparation of a Cross-linked Porous Protein Crystal containing Ru carbonyl complexes as a CO-releasing Extracellular Scaffold" *Inorg. Chem.*, **2015**, 54, 215-220. 査読有, DOI : 10.1021/ic502159x

[学会発表] (計 5 件)

- ① **安部 聡**、森 肇、上野隆史「In vivo Crystal Engineering for Protein Porous Materials」日本化学会第 96 春季年会 (2016) 京都、2016 年 3 月 27 日
- ② **安部 聡**、森 肇、上野隆史「細胞内結晶工学によるタンパク質結晶のナノ空間設計」第 9 回バイオ関連化学シンポジウム、熊本、2015 年 9 月 11 日
- ③ **安部 聡**、田部博康、赤井祐貴、森 肇、北川 進、上野隆史「蛋白質結晶細孔設計による機能性分子の集積制御」日本化学会第 95 春季年会 (2015) 船橋、2015 年 3 月 29 日
- ④ **安部 聡**、根岸 走、上野隆史「蛋白質結晶内分子設計による超分子構造体の構築」第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、岡山、2014 年 9 月 11 日
- ⑤ **安部 聡**、徳増沙耶、森 肇、上野隆史「細

胞内タンパク質結晶の形成機構の解明」  
第 63 回高分子学会年次大会、名古屋、  
2014 年 5 月 30 日

[図書] (計 1 件)

- ① **安部 聡**、上野隆史「タンパク質結晶の分子設計によるバイオ固体材料の開発」  
化学工業, 2015, 66, 264-272.

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 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

**安部 聡 (ABE SATOSHI)**

東京工業大学大学院生命理工学研究科・助教  
研究者番号 : 40508595