

共同利用研究ハイライト

二量体形成新規人工タンパク質を用いた タンパク質ナノブロック開発による自己組織化 ナノ構造複合体の創製

小林 直也 信州大学大学院総合工学系研究科 博士課程 新井 亮一 信州大学繊維学部 助教

1. はじめに

生命活動は、タンパク質や核酸、糖、脂質といった様々な自己組織化能力をもつ生体分子の複合体によって営まれている。なかでもタンパク質は、複雑で洗練されたナノスケールの複合体構造を形成することで高度な機能を発揮する最も重要な生体分子である。これらのタンパク質複合体を自在にデザインし、望みの機能を実現することができるになれば、医薬品開発やナノテクノロジー、合成生物学研究分野の発展に大きく貢献できると考えられる。しかしながら、人工タンパク質複合体のデザインは、立体構造形成に多くの相互作用が関係するために非常に複雑で、現在においても大変困難な課題である。近年、我々は、タンパク質構造構築や機能発現の原理的な理解を目指して、新規な人工タンパク質の創製・解析研究に取り組んできた。特に、プリンストン大学のMichael Hecht 教授との共同研究により、バイナリーパターン法^[1]を用いて創製した新規人工タン

パク質 WA20 のX線結晶構造解析に成功した^[2]。WA20は、2本の長い α ヘリックス構造が2分子それぞれお互いに挟みこむようにして組み合わさることで、非常に特徴的な分子間フォールディング（ドメインスワップ）型4本ヘリックスバンドル2量体構造を形成することを解明した。

そこで、本研究では、このWA20の特徴的な構造とタンパク質の自己組織化能力を活かして、人工タンパク質を骨格構造としたナノ構造複合体構築に応用することを着想し、「タンパク質ナノブロック (Protein Nano-building Block: PN-Block)」を開発した^[3]。その基本戦略は、少数のシンプルな基本ブロックを開発し、おもちゃのブロック遊びのように組み合わせることで、多様なナノ構造複合体を創出するところにある。

2. 人工タンパク質ナノブロック(PN-Block)のデザイン

PN-Blockとして、WA20とT4ファア

ジ由来fibrin タンパク質ドメインのfoldonを遺伝子工学的に融合したWA20-foldonを設計・構築した(図1)。WA20-foldon タンパク質の構造構成要素であるWA20とfoldonは、それぞれ2量体と3量体を形成するタンパク質ドメインであり、結合する相手同士が過不足なく組み合わせるためには、幾何学的対称性の制約により、2と3の公倍数である6の倍数量体(6量体, 12量体, 18量体, 24量体, …)の形成が予測される。

3. WA20-foldonタンパク質の自己組織化ナノ構造複合体の創製及び会合数と形状解析

大腸菌によりWA20-foldon タンパク質を発現させたところ可溶性に発現し、His₆-tag精製後にSDS-PAGEとNative PAGEを行った結果、自己組織的に複数の複合体(多量体)を形成することが示唆された(図2)。さらにそれぞれ精製分画し、サイズ排除クロマトグラフィーや多角度光散乱(size exclusion chromatography-multi angle

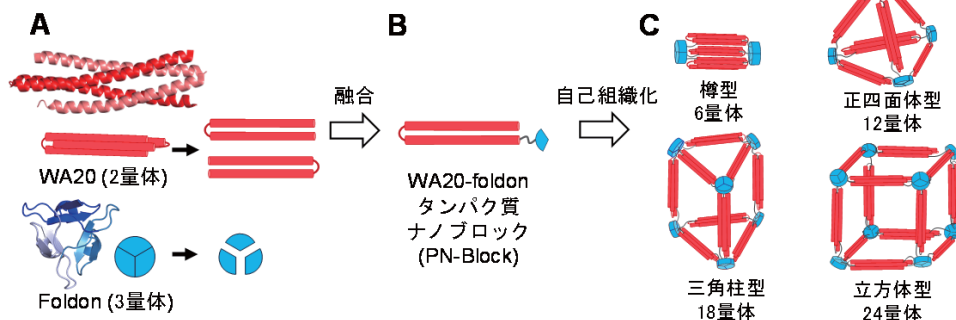


図1 タンパク質ナノブロック(PN-Block)の設計開発戦略と自己組織化ナノ構造モデル。(A)WA20の結晶構造(PDB: 3VJF)とfoldonドメインNMR構造(PDB: 1RFO)及びそれらの模式図。(B)タンパク質ナノブロックWA20-foldon融合タンパク質の構築。(C)幾何学的に予想されるPN-Block(WA20-foldon)自己組織化ナノ構造モデル。

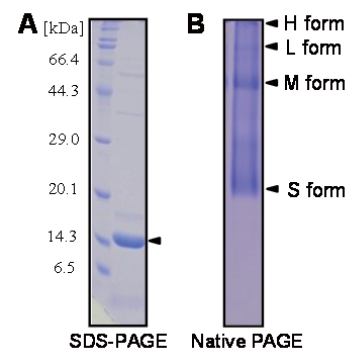


図2 WA20-foldonタンパク質の発現・精製。(A) SDS-PAGE、(B) Native PAGE。(WA20-foldonタンパク質単量体の分子量17 kDa)

light scattering, SEC-MALS)、超遠心分析 (AUC)、小角X線散乱 (SAXS) 等により分子量を測定することで会合数を求めたところ、S form、M form、L formの各複合体は、それぞれ6量体、12量体、18量体であった (表1)。このことは、WA20-foldonがデザインした通りに、過不足なくお互いに組み合わせることで、6の倍数量体の複合体を安定的に形成することを示している。

さらに、複合体の溶液中での形状を評価するために、WA20及びfoldonの各立体構造とSAXS実験データに基づいて剛体モデリング解析を行ったところ、S form (6量体) とM form (12量体) は、幾何学的対称性により予測されたナノ構造複合体である樽型 (ラグビー

ボール型) 構造と正四面体型 (テトラポッド型) 構造をそれぞれ形成していることが強く示唆された (図3)。

本研究で開発した「タンパク質ナノブロック (PN-Block)」の戦略は、さらに新たなPN-Blockを開発して自在に組み合わせていくことで、天然タンパク質では実現できないような多様な構造や機能を持つ人工タンパク質ナノ構造複合体の創出につながると考えられる。今後、タンパク質工学分野をはじめ、超分子化学やナノテクノロジー、合成生物学分野の発展にPN-Block戦略を活かしていきたい。

4. おわりに

本研究において、SEC-MALSを用い

た実験は、分子科学研究所・協力研究として、古賀信康准教授、古賀理恵博士の御協力のもとに行われました。また、SAXSを用いた実験は信州大学の佐藤高彰准教授及び柳瀬慶一氏、AUCの実験は横浜市立大学の雲財悟助教の御協力のもとに行われました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。なお、本研究成果^[3]は、特に注目の論文としてJACS Spotlightsに選出されるとともに、表紙を飾りました。このような成果を得ることができたのも、分子研で先端測定機器を共同利用することができたおかげであり、今後も大学共同利用機関としての継続的発展を期待致します。

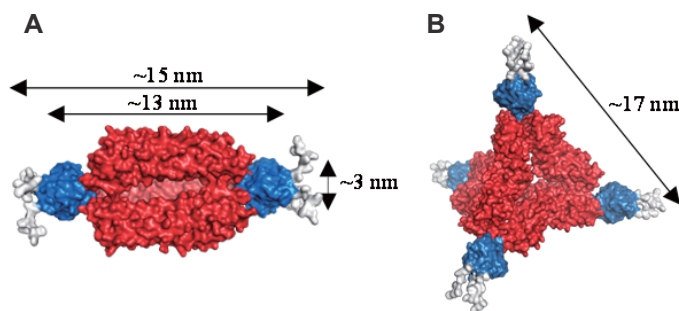


図3 (A) S form 剛体モデリング構造、(B) M form 剛体モデリング構造。

form	SEC [kDa]	MALS [kDa]	AUC [kDa]	MS [kDa]	SAXS [kDa]	会合数 [mer]
S form	84	101	96	111	97	6
M form	195	199	180	-	224	12
L form	284	299	-	-	331	18
H form	415	392, 543	-	-	641	24, 30, 36?

表1 WA20-foldon複合体の分子量と会合数のまとめ。

参考文献

- [1] Hecht, M. H. *et al.*, *Protein Sci.* **13**, 1711-1723 (2004)
 [2] Arai, R. *et al.*, *J. Phys. Chem. B.* **116**, 6789-6797 (2012)
 [3] Kobayashi, N. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 11285-11293 (2015)



こばやし・なおや

2011年信州大学繊維学部応用生物科学科卒業。信州大学大学院総合工学系研究科博士課程在学中。専門はタンパク質工学及び合成生物学、特にタンパク質ナノブロック開発による自己組織化ナノ構造複合体の創製を研究。



あらい・りょういち

2001年東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻博士課程修了、博士 (工学) 取得。理化学研究所ゲノム科学総合研究センター研究員、学振海外特別研究員 (Princeton Univ.) 等を経て、2007年信州大学ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点助教、2012年より現職。専門はタンパク質工学及び構造生物学、特に人工タンパク質の創製や立体構造解析等を研究。