

## ◆ 若手研究者からのメッセージ ◆

信州大学 繊維学部・  
バイオメディカル研究所  
准教授 新井 亮一

### はじめに

時の流れは速いもので、既に私も若手研究者とはお世辞にも言えないような歳になってしまいました。しかし、気持ちと立場は未だに若手並みということもあり、せっかくお声掛け頂きましたので、ここ数年の筆者らの研究のご紹介から、最近、米国シアトルへの長期出張中に思うことまでいろいろと書き連ねてみたいと思います。

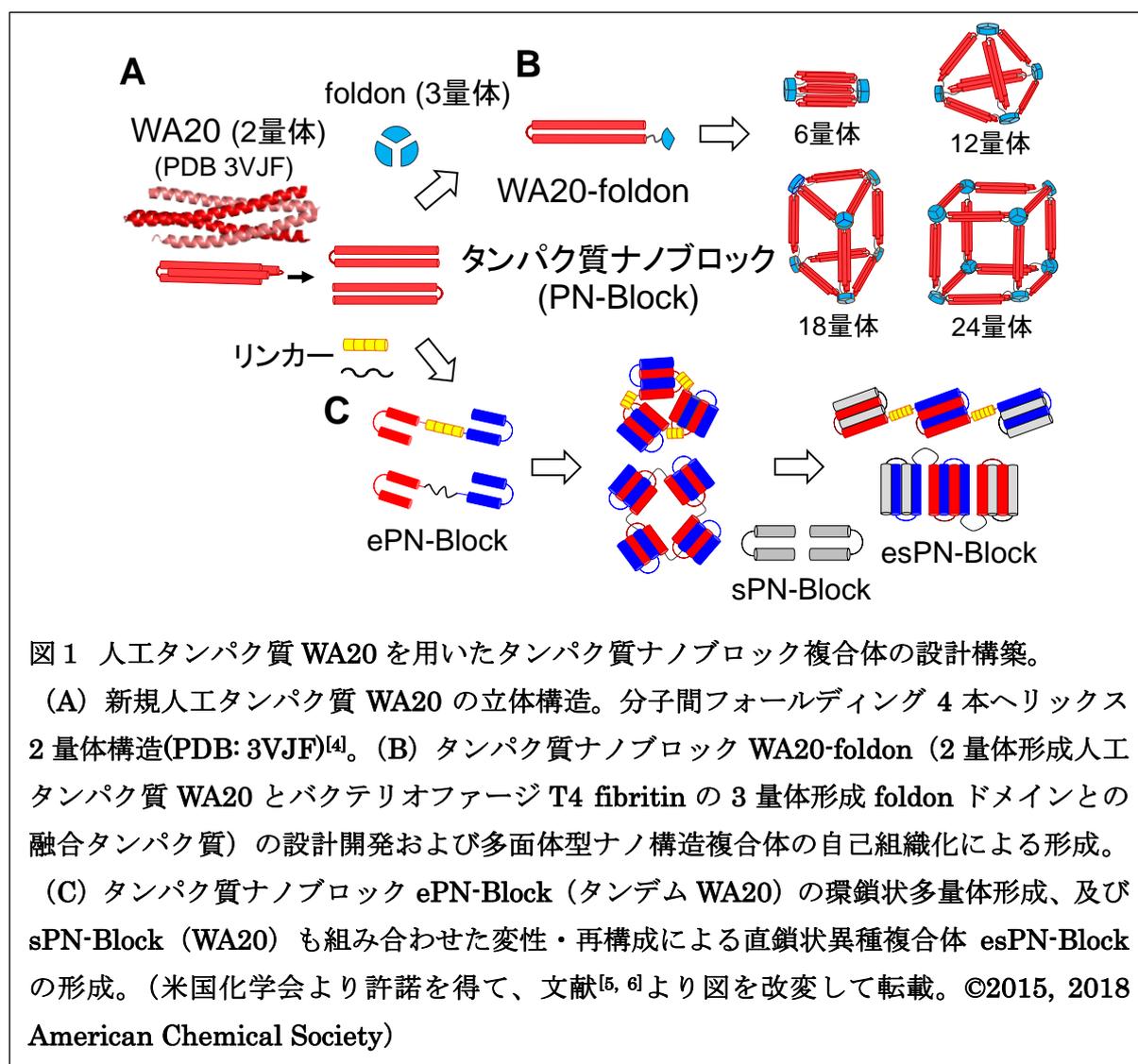
### 人工タンパク質ナノブロックによる多様な複合体構造の設計構築

生命活動は、タンパク質や核酸、糖、脂質などのさまざまな自己組織化能力を持つ生体分子によって営まれている。タンパク質は生体分子の中で最も高度な機能を有するものであるが、それらがナノスケールの超分子複合体を形成することで、単量体よりさらに複雑で多彩な機能を発揮することができるようになる。このようなタンパク質複合体を人工的にデザインし、望みの構造や機能を創出することができるようになれば、バイオテクノロジーや合成生物学分野の研究の発展および医薬品やナノテクノロジーの開発等に大きく貢献できると考えられる。しかし、人工タンパク質複合体のデザインは、複合体構造形成に多くの相互作用が関与するために非常に複雑で、現在においても困難な課題である。人工的にタンパク質複合体を設計開発する研究は 2000 年ごろから行われてきたが、近年飛躍的に研究が進展してきており、世界的にも非常にホットな研究領域である<sup>[1,2]</sup>。そこで、対称性を利用した自己組織化人工タンパク質であるタンパク質ナノブロックの設計開発及び多様な複合体構造構築などについて、筆者らの研究を中心に紹介させていただきたい。

### 多面体型複合体構造の辺と頂点をつくるタンパク質ナノブロック

近年、筆者らの研究グループでは、バイナリーパターン法 (Princeton University の Michael Hecht 研究室で開発された親水性と疎水性の 2 種類のアミノ酸残基の繰り返し配列パターンのデザインにより人工タンパク質を設計する方法<sup>[3]</sup>) により創出された新規人工タンパク質 (*de novo protein*) WA20 が、分子間フォールディング (ドメインスワップ) 4 本ヘリックス 2 量体構造 (PDB: 3VJF) を形成することを解明し (図 1 A)<sup>[4]</sup>、この特徴的構造を活かしたタンパク質ナノブロック (Protein Nanobuilding Block: PN-Block) を設計開発してきた。研究のコンセプトとして、おもちゃのブロック遊びのように、単純かつ少種類の基本ブロックを開発し、それらを組み合わせることで、多様なナノ構造複合体を創出することを基本戦略としている。

まず、人工タンパク質 WA20 を利用したタンパク質ナノブロック (PN-Block) として、WA20 を辺のパーツ、T4 ファージ fibritin の 3 量体形成ドメイン foldon を頂点のパーツとして用いて、両者を遺伝子工学的につなげた融合タンパク質 WA20-foldon を設計開発した (図 1B) [5]。タンパク質ナノブロック WA20-foldon を大腸菌で発現、精製し、Native PAGE 等により分析したところ、自己組織化により主に 4 種類の複合体構造を形成していた。これらを分離精製し、サイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱 (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して会合数を求めたところ、各複合体は、それぞれ 6 量体、12 量体、18 量体、24 量体であり、WA20-foldon がデザインどおりに、2 量体の辺 (WA20) と 3 量体の頂点 (foldon) が互いに過不足なく幾何学的に組み合わせることで、2 と 3 の公倍数である 6 の倍数量体の複合体を安定的に形成することが示された (図 1B)。また、SAXS によるモデリング解析により、6 量体と 12 量体のナノ構造複合体の概形構造は、それぞれ樽型 (ラグビーボール型) 構造、正四面体型 (テトラポッド型) 構造であることが示唆された。



## 鎖状複合体構造をつくるタンデム型タンパク質ナノブロック

最近、新たなタンパク質ナノブロックとして、2個の新規人工タンパク質 WA20 をペプチドリンカーで直列につないだタンデム WA20 (extender PN-Block: ePN-Block) を開発し、鎖状伸長多量体構造を構築した (図 1 C) [6]。ePN-Block を大腸菌により発現、精製し、SAXS や SEC-MALS、電子顕微鏡観察等、さまざまな実験解析を行ったところ、ePN-Block が自己組織的に高次構造を作り、環鎖状とみられる多量体 (2~5 量体等) を形成していた。次に、WA20 単体 (stopper PN-Block: sPN-Block) と混合して、変性・リフォールディングすることにより、2種類のタンパク質ナノブロック ePN-Block と sPN-Block を組み合わせる再構成を行った。その結果、異種複合体 (esPN-Block) の構築に成功し、環鎖状から直鎖状フォームへと複合体構造が大きく変化することが示唆された (図 1 C)。さらに、この直鎖状複合体 (esPN-Block) に金属イオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) を添加したところ、自己組織的に集合した超分子複合体のナノスケール構造を原子間力顕微鏡で観察することにも成功した [6]。

## 超安定化人工タンパク質 Super WA20 (SUWA) の設計開発

タンパク質は、一般に、熱や酸・アルカリなどに弱く変性しやすい性質を持つが、将来ナノマテリアルなどとして幅広く応用展開していくためには、タンパク質ナノブロック (PN-Block) を構成する人工タンパク質の安定化が必要であると考えられる。そこで、さらなる構造安定化を目指して、PN-Block を構成する新規人工タンパク質 WA20 の立体構造を基にして、 $\alpha$ ヘリックスや疎水性コアの増強を合理的にデザインした改変人工タンパク質 Super WA20 (SUWA) を開発した (図 2)。CD 測定による熱変性実験より、WA20 の変性温度  $T_m$  は  $75^\circ\text{C}$  であったのに対し、改変体 SUWA の  $T_m$  は水の沸点をも遥かに超える  $122^\circ\text{C}$  にまで向上したことが確かめられ、大幅な安定化を達成した (論文投稿準備中)。いわば、ゆで卵の例のようにタンパク質は茹でれば変性するという一般的常識を覆すような、超安定化人工タンパク質の開発に成功した。近年、非常に高い安定性の人工設計タンパク質の報告が相次いでおり [7, 8]、理想的に構造設計された人工タンパク質の特徴として高い安定性を有するということが示唆される [9]。私見になるが、タンパク質 (ポリペプチド) という物質自体は、人工

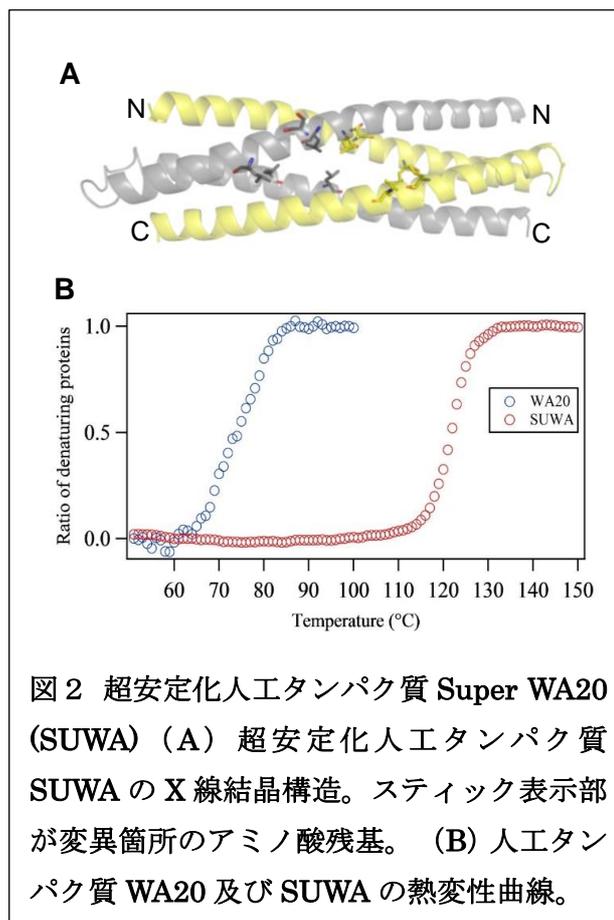


図 2 超安定化人工タンパク質 Super WA20 (SUWA) (A) 超安定化人工タンパク質 SUWA の X 線結晶構造。スティック表示部が変異箇所のアミノ酸残基。(B) 人工タンパク質 WA20 及び SUWA の熱変性曲線。

的に理想的な構造を設計できれば十分に高い安定性を獲得しうる潜在的能力を持つが、天然のタンパク質は、逆に、構造安定性ではなく、高い機能性を求めて進化してきたが故に、一般に安定性が低く、変性しやすいということなのではないかと思う。また、あらゆるタンパク質配列全体、即ち 20 種類のアミノ酸の配列組合せの数（例えば比較的小さな 100 残基のタンパク質でも  $20^{100} \sim 1.3 \times 10^{130}$ ）からみれば、天然タンパク質はごくごく一部の配列群に過ぎないということもあり、今後も、天然タンパク質の常識の枠にとらわれずに、新規に人工タンパク質を設計創出する努力を続けることにより、未知のタンパク質の秘める新たな潜在能力を開花できる可能性を示唆していると考えられるのではないだろうか。

さらに、タンパク質ナノブロック(PN-Block)として、この超安定化人工タンパク質 SUWA を導入した SUWA-foldon を作製したところ、自己組織化による超分子複合体の構築にも成功し、熱変性実験により高い安定性も示された。今後、PN-Block によるナノマテリアル開発や応用展開の可能性が広がることが期待される。

### サッカーボール型タンパク質複合体ナノ粒子 TIP60 の設計開発

また最近、慶應大学の川上史専任講師らを中心とする共同研究によって、海洋メタゲノム由来の LSm 類似 5 量体タンパク質 (PDB: 3BY7) と、ヒト由来 myosin X の逆平行コイルドコイル 2 量体化ドメイン MyoX-coil (PDB: 2LW9) とを連結した人工融合タンパク質から自己組織化される切頂二十面体型 (サッカーボール型) のタンパク質複合体ナノ粒子 TIP60 (truncated icosahedral protein composed of 60-mer fusion proteins) が設計開発された<sup>[10]</sup>。

SAXS や SEC-MALS、電子顕微鏡観察等、様々な実験解析を行い、TIP60 は設計通りに 60 量体で、均一性の高い中空球状タンパク質複合体ナノ粒子を形成していることを明らかにした (図 3)。さらに最近、クライオ電子顕微鏡による原子分解能での単

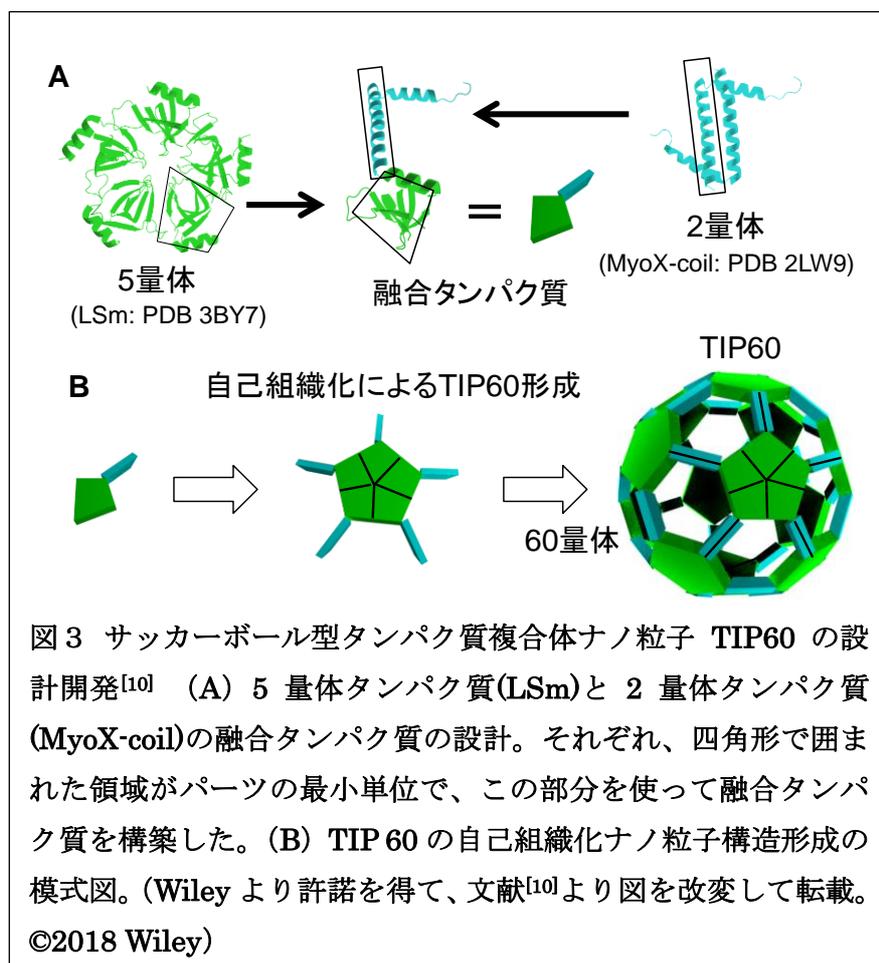


図 3 サッカーボール型タンパク質複合体ナノ粒子 TIP60 の設計開発<sup>[10]</sup> (A) 5 量体タンパク質(LSm)と 2 量体タンパク質(Myox-coil)の融合タンパク質の設計。それぞれ、四角形で囲まれた領域がパーツの最小単位で、この部分を使って融合タンパク質を構築した。(B) TIP 60 の自己組織化ナノ粒子構造形成の模式図。(Wiley より許諾を得て、文献<sup>[10]</sup>より図を改変して転載。©2018 Wiley)

粒子構造解析にも成功し、実際にデザイン通りのサッカーボール型（切頂二十面体型）の超分子複合体構造であることを解明した（論文準備中）。また、Cys 残基を導入した変異体を利用して、ナノ粒子の内部または外部表面を蛍光色素などの低分子化合物で特異的に修飾することも可能であり、将来的に、新たなナノ分子材料やドラッグデリバリーシステムなど様々な応用開発が期待される。

## おわりに

以上、筆者らの研究を中心に紹介してきたが、世界に目を向けると、人工タンパク質の設計開発研究は、近年、計算機を用いたデザインの発展が非常に顕著である<sup>[2, 11]</sup>。この分野の世界の最先端を行くのが、University of Washington (UW), Institute for Protein Design (IPD) の David Baker 研究室であろう。ここ 5 年間だけでも Nature や Science に 20 報以上の先端的な論文を驚異的なペースで発表し続けている。そこで、今後の研究展開において、計算機を用いたタンパク質デザイン研究の必要性が増してきていることもあり（またなぜ Baker 研究室ではこのように超トップレベルの論文を量産できるのかを知りたいとも思い）、科研費の国際共同研究加速基金を利用して、実は、2019 年 4 月～9 月まで半年間 Baker 研究室に Visiting Scholar として滞在して研究しているところである。これまで論文を読むだけでは分からなかったことばかりで、日々得られる情報等に大変刺激を受けており、このように半年間海外で研究に集中できる貴重な機会が得られて本当に有難く思う。せっかくなので、Baker 研究室(<https://www.bakerlab.org/>)の様子も少し紹介させて頂きたい。まず、Baker 研は、現在、UW の大学院生 33 人、多様なバックグラウンドを持つポストドク・研究員が約 50 人、様々な専門分野の支援スタッフが 20 人以上、さらに私のような Visitor や Intern が入れ代わり立ち代わり 10 人程度、さらに時期によって学部生やローテーションの学生等も数多く出入りし、優に 100 人を超える規模の非常に大所帯である。IPD 等のために数年前に建設された研究棟の 4 階の広大なスペースをほぼ占有しているが、それでも実験スペースはベンチを二人で共用する等やや手狭になってきている。また、計算環境も抜群で、専用のクラスターコンピューター(約 6000 CPU core)を所有し、Mac か Linux の端末も基本的に 1 人 1 台ずつ割り当てられ、これらを利用してタンパク質デザインや機械学習等のドライ（計算）研究を行うことができる。ただ、近年は応用志向の研究も増えてきて、ドライ研究よりもウェット研究に力を入れているようで、8 割～9 割くらいの研究者は、ウェット中心かドライとウェットの両方を行っている（ちなみに最近私も数年ぶりに自らウェット実験にも取り組んでいるところである。）また、もちろん、ウェットの研究環境も抜群で、様々な実験機器や測定機器等は十分に揃えられている。では、この大所帯の研究室をどのような体制で運営しているのだろうか？ いわゆる先生は PI の David Baker 教授だけで、日本のように准教授や助教に相当する先生はいないが、様々な専門的支援スタッフが IPD に 20 人以上そろっており、チームとして適切に役割分担して運営する体制が整っている。事務系スタッフはもちろん、戦略的運営統括チーフ(PhD & MBA)、ラボマネージャー、各種実験支援スタッフ、計算機管理

スタッフ、広報スタッフ（科学コミュニケーター）など、様々な専門性を持つ多くの優れた人材がチームとして協力分担して運営する体制になっているのが特色であろう。これにより、**Baker** 教授自身は、基本的に研究に集中できる環境となり、多くの時間を学生や研究者とのディスカッションに費やすという理想的な研究体制を構築している。（残念ながら、日本の教授陣は様々な雑用があつて、なかなか研究に集中できないことが多いのではないだろうか…。やはり、良い研究成果を生み出すためには、目先の研究費も大事だが、何よりも研究時間をより多く確保することが大切であり、日本でももっと恒常的な人件費を投入して大学の教職員や支援スタッフを増員充実させることが本来必要ではないだろうか。）さらに、**Baker** 教授の特筆すべき点は、これだけの大所帯の各研究の基本的な方針の決定や指導・指示等をほとんど全て自分自身で行っていることである。物理・化学・生物・計算など全分野のドライからウェット研究まであらゆることに精通し、100 人近くのほとんど全員のプロジェクトを常に把握して、研究室内を常に駆け廻りながら、適宜必要な指導・指示やディスカッションを行い、研究室内のチーム編成や外部の有力研究室とのコラボレーションも効率的にアレンジして統括することができるのは、まさに天賦の才であろう。また、非常に有名な先生にも関わらず、比較的出張が少ないことも、出張や講演より日常の研究室内での議論や指導を大切にしているからと思われる。研究テーマとしては、ほとんどが **Nature** や **Science** を狙えるレベルで、世界よりも5年以上先を行っているような取り組みが多く、また実際に博士学位論文でも **Nature** や **Science** に出版した論文が基になるものが多いのも驚異的である。きっと **Baker** 教授は10年以上先の未来の世界を思い描いて研究を展開しているのであろう。最近の **Audacious Project** 採択の際の **TED Talks** で **Protein Design Revolution** について熱く語る **Baker** 教授の貴重な講演動画はその一端を垣間見ることができる、とても夢のある話なので、ぜひ一度ご覧頂きたい(<https://www.ipd.uw.edu/audacious/>)。さらに、ここ数年で、人工タンパク質デザイン技術を応用して、ワクチンデザインやがん治療、ドラッグデリバリーなどのベンチャー企業を5つも次々とスピナウトしていることも特に注目すべき点である<sup>9)</sup>。

最後になりましたが、これまで一緒に研究してきた信州大の学生の皆さん、特に、OBの小林直也博士、木村尚弥修士、笹原健嗣修士、また、**Princeton University** の **Michael H. Hecht** 教授、信州大学の佐藤高彰准教授、分子科学研究所の古賀信康准教授、法政大学の雲財悟准教授、金沢大学の福間剛士教授、生理学研究所の村田和義准教授、慶應義塾大学の川上了史専任講師、宮本憲二教授らをはじめ、様々な先生方や学生の皆さんなど、多くの方々との共同研究や御協力のもとに行われたものであり、心より御礼申し上げます。放射光 X 線実験は共同利用実験として **KEK Photon Factory** で行われました。本研究は **JSPS** 科研費 (**JP16H00761**, **JP16K05841**, **JP16H06837**, **JP14J10185**, **JP17KK0104**) や分子研協力研究等の助成や御支援を受けたものです。また、**Visiting Scholar** として貴重な半年間の滞在を受け入れて頂いた **University of Washington** の **David Baker** 教授にも心より感謝致します。さらに最後にちょっと長くなってしまい申し訳ありませんでしたが、このような執筆の機会を頂きました九州大学の神谷典徳教授をはじめ、部会の先生方に心より御礼申し上げます。

## 参考文献

- [1] Kobayashi, N. and Arai, R., *Curr. Opin. Biotech.*, 2017, **46**, 57-65.
- [2] Arai, R., *Biophys. Rev.*, 2018, **10**, 391-410.
- [3] Hecht, M. H., Das, A., Go, A., Bradley, L. H. and Wei, Y., *Protein Sci.*, 2004, **13**, 1711-1723.
- [4] Arai, R., Kobayashi, N., Kimura, A., Sato, T., Matsuo, K., Wang, A. F., Platt, J. M., Bradley, L. H. and Hecht, M. H., *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 6789-6797.
- [5] Kobayashi, N., Yanase, K., Sato, T., Unzai, S., Hecht, M. H. and Arai, R., *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 11285-11293.
- [6] Kobayashi, N., Inano, K., Sasahara, K., Sato, T., Miyazawa, K., Fukuma, T., Hecht, M. H., Song, C., Murata, K. and Arai, R., *ACS Synth. Biol.*, 2018, **7**, 1381-1394.
- [7] Huang, P. S., Oberdorfer, G., Xu, C., Pei, X. Y., Nannenga, B. L., Rogers, J. M., DiMaio, F., Gonen, T., Luisi, B. and Baker, D., *Science*, 2014, **346**, 481-485.
- [8] Hsia, Y., Bale, J. B., Gonen, S., Shi, D., Sheffler, W., Fong, K. K., Nattermann, U., Xu, C., Huang, P. S., Ravichandran, R., Yi, S., Davis, T. N., Gonen, T., King, N. P. and Baker, D., *Nature*, 2016, **535**, 136-139.
- [9] Baker, D., *Protein Sci.*, 2019, **28**, 678-683.
- [10] Kawakami, N., Kondo, H., Matsuzawa, Y., Hayasaka, K., Nasu, E., Sasahara, K., Arai, R. and Miyamoto, K., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2018, **57**, 12400-12404.
- [11] Huang, P. S., Boyken, S. E. and Baker, D., *Nature*, 2016, **537**, 320-327.
- [12] [https://www.ipd.uw.edu/wp-content/uploads/2019/04/IPD\\_AudaciousProject\\_MediaBrief-3.pdf](https://www.ipd.uw.edu/wp-content/uploads/2019/04/IPD_AudaciousProject_MediaBrief-3.pdf)

新井 亮一 (あらい りょういち)

信州大学 繊維学部・バイオメディカル研究所 准教授

2001年3月 東京大学大学院 工学系研究科

博士課程修了 博士(工学)

2001年4月 理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター

リサーチアソシエイト・研究員

2006年2月 日本学術振興会 海外特別研究員(Princeton University)

2007年12月 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4月 信州大学 繊維学部 助教

2016年6月 現職

2016年10月 信州大学 菌類・微生物ダイナミズム創発研究センター 部門長 (兼任)

2019年4月 信州大学 バイオメディカル研究所 (専任)

2019年4月～9月 University of Washington, Institute for Protein Design, Visiting Scholar

