

## 高温環境下(100℃)でも変性しない超安定化人工タンパク質 SUWA を開発 ～ナノテクノロジー・合成生物学研究等に役立つ“ナノ御柱”としての応用が期待～

信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所生体分子イノベーション部門・繊維学部応用生物科学科の新井亮一准教授、木村尚弥修士（信州大学繊維学部応用生物科学科・大学院理工学系研究科卒業生）らの共同研究グループは、独自の柱状人工タンパク質の安定性を顕著に向上させ、高温環境下(100℃)でも変性しない、いわば“ゆでてもゆであがらない”超安定化人工タンパク質 SUWA の開発に成功しました。これは、“タンパク質はゆでると変性する（例：卵をゆでるとゆで卵になって固まる）”という一般的な常識を超えるような成果であり、今後、信州発のナノスケールの柱状ブロックパーツ“ナノ御柱”として、新たなタンパク質ナノブロック開発に利用するなど、ナノテクノロジーや合成生物学研究等への応用が期待されます。

### <本研究成果のポイント>

- ・ 新規人工タンパク質 WA20 の安定性を顕著に向上させた変異体 SUWA (Super WA20)を開発
- ・ SUWA タンパク質の変性温度は 122℃であることがわかり、ゆでてもゆであがらない(100℃でも変性しない)超安定化人工タンパク質の開発に成功
- ・ X線結晶構造解析等により、SUWA の柱状二量体の特徴的な立体構造を解明
- ・ 分子動力学シミュレーションにより、主に中央部の  $\alpha$  ヘリックスらせん構造の安定化が耐熱性向上に寄与していることを解明
- ・ 今後、超安定化人工タンパク質 SUWA を柱状ブロックパーツ“ナノ御柱”として利用したタンパク質ナノブロック開発により、ナノテクノロジーや合成生物学研究等への応用が期待

本研究成果は、米国化学会発行の学術雑誌 ACS Synthetic Biology の 2 月号（2 月 21 日発行）に掲載される予定であり、先行して同誌 Web サイトでオンライン公開されました。

### <研究の内容>

タンパク質は、生体内において自己組織的にさまざまな複合体を形成し、複雑な生命現象を担っています。今後、タンパク質や複合体を人工的にデザインし、望みの機能を実現することができるようになれば、バイオ医薬品開発や、環境負荷の少ない化学反応、さらにはナノバイオテクノロジー<sup>\*1</sup>等への応用が期待され、人類の豊かな生活のために貢献できると考えられています。

そこで、これまでに独自のタンパク質ナノブロック<sup>\*2</sup>戦略による人工タンパク質のデザイン開発に取り組み、目に見えないナノメートル（1 ミリメートルの 100 万分の 1）スケールの極めて微小な世界で、いわば、おもちゃのブロック遊びのように、人工タンパク質を組み合わせ、多様なタンパク質複合体の創出に挑戦してきました。これまでに、天然にない新規人工タンパク質 WA20<sup>\*3</sup>の柱状二量体の特徴的

構造[参考情報: [WA20 立体構造解明プレスリリース](#)]を活かしたタンパク質ナノブロックの設計開発を行い、多様な超分子ナノ構造複合体<sup>\*4</sup>を創出してきました(Kobayashi *et al.*, 2015, *J. Am. Chem. Soc.* 137, 11285–11293) [参考情報: [人工タンパク質ナノブロックプレスリリース](#)]; (Kobayashi *et al.*, 2018, *ACS Synth. Biol.*, 7, 1381–1394) [参考情報: [鎖状連結タンパク質ナノブロックプレスリリース](#)]

しかしながら、一般にタンパク質は、高温などに弱い性質があり、例えば、卵をゆでるとゆで卵になって固まるように、タンパク質は熱等により変性<sup>\*5</sup>することが知られています。今後、ナノテクノロジーやナノマテリアル<sup>\*1</sup>などの分野へ、タンパク質の工学的応用をさらに広げていくためには、タンパク質の安定性の向上が必要不可欠と考えられます。

そこで、今回、独自の柱状二量体人工タンパク質 WA20 の安定化を目的として研究を行いました。WA20 の立体構造を基にして安定性向上を目指した変異体を設計して実験を行いました。その結果、従来の WA20 タンパク質の変性中点温度は 75°C であるのに対して、新たに 5 箇所のアミノ酸に変異を加えた人工タンパク質の変性中点温度は 122°C であり、常圧での水の沸点をも超えるほどに大幅に安定性が向上しました (図 1)。いわば、ゆでてもゆであがらない (100°C でも変性しない) 超安定化人工タンパク質の開発に成功し、**Super WA20 (SUWA)**<sup>\*6</sup> と名付けました。

さらに、この SUWA タンパク質の立体構造を X 線結晶構造解析<sup>\*7</sup> や小角 X 線散乱解析<sup>\*8</sup> により解明し、長い  $\alpha$  ヘリックス 2 本が挟み込むように交差した特徴的な 4 本ヘリックスバンドルの柱状二量体構造 (長さ約 10 nm, 幅約 3 nm) を明らかにしました (図 2)。また、分子動力学(Molecular Dynamics: MD)シミュレーションにより、主に柱の中央部の  $\alpha$  ヘリックスらせん構造の安定化が耐熱性向上に寄与していることも明らかにしました。

今後、超安定化人工タンパク質 SUWA を ナノスケールの柱状ブロックパーツの“ナノ御柱<sup>\*6</sup>”として利用し、新たなタンパク質ナノブロックの開発 (図 3) を進めていくことにより、ナノテクノロジー<sup>\*1</sup> や合成生物学<sup>\*9</sup> 研究等への応用につながることを期待されます。将来的には、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タンパク質ナノ構造複合体の創製につながる可能性があり、タンパク質ナノブロックの自己組織化<sup>\*10</sup> 技術を活かしたナノバイオプロセス<sup>\*11</sup> やナノバイオマテリアル<sup>\*1</sup> 開発等への応用も期待されます。

本研究は、信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所生体分子イノベーション部門・信州大学繊維学部応用生物科学科の新井亮一准教授、木村尚弥修士 (信州大学繊維学部応用生物科学科・大学院理工学系研究科卒業生、アピ株式会社) を中心として、信州大学繊維学部化学・材料学科・信州大学先鋭領域融合研究群国際ファイバー工学研究拠点の望月建爾助教、信州大学バイオメディカル研究所生体分子イノベーション部門・信州大学大学院総合理工学研究科生命医工学専攻生命工学分野の梅澤公二助教、米国プリンストン大学化学科の Michael H. Hecht 教授らとの国際共同研究として行われました。

本研究成果は、米国化学会発行の合成生物学分野の代表的な国際学術雑誌 ACS Synthetic Biology の 2 月号に掲載されるのに先立ち、同誌 Web サイトにてオンライン公開されました。

## <発表論文情報>

【著者】 Naoya Kimura, Kenji Mochizuki, Koji Umezawa, Michael H. Hecht, and Ryoichi Arai\*

(\*Corresponding Author 責任著者)

【論文タイトル】 Hyperstable *DeNovo* Protein with a Dimeric Bisecting Topology

(二量体交差型トポロジーを持つ超安定化新規人工タンパク質)

【掲載誌情報】 *ACS Synthetic Biology*, 9, in press (2020). DOI: 10.1021/acssynbio.9b00501

掲載論文 Web サイト: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssynbio.9b00501>

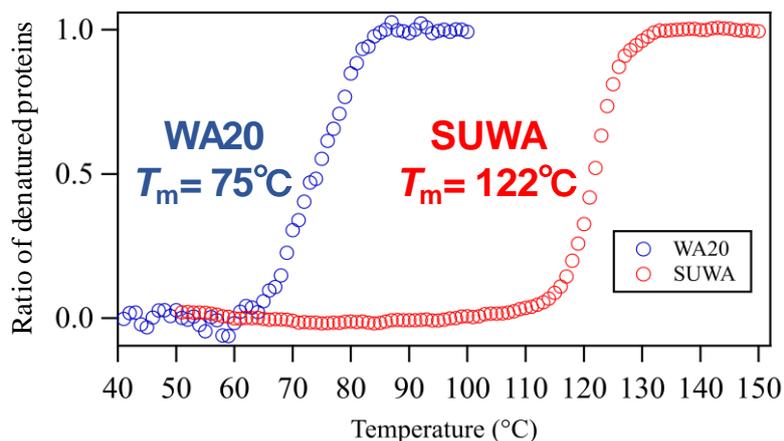


図1 人工タンパク質 SUWA と WA20 の熱変性曲線 ( $T_m$ : 変性中点温度)

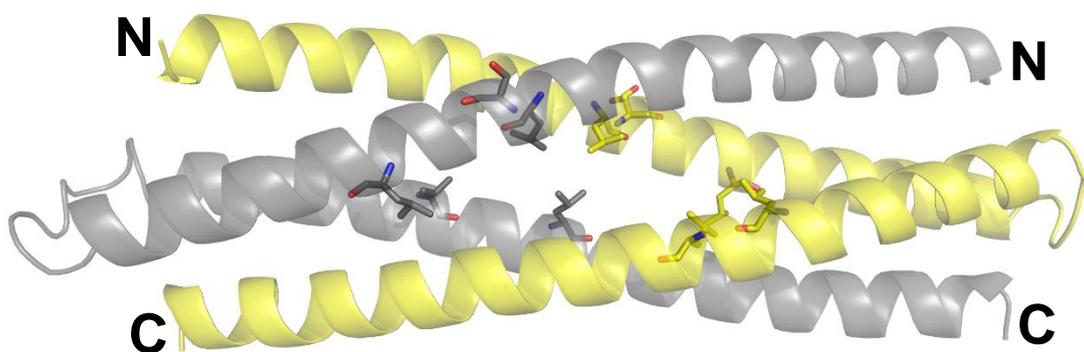


図2 人工タンパク質 SUWA の立体構造 (4 本ヘリックスバンドル柱状二量体構造)

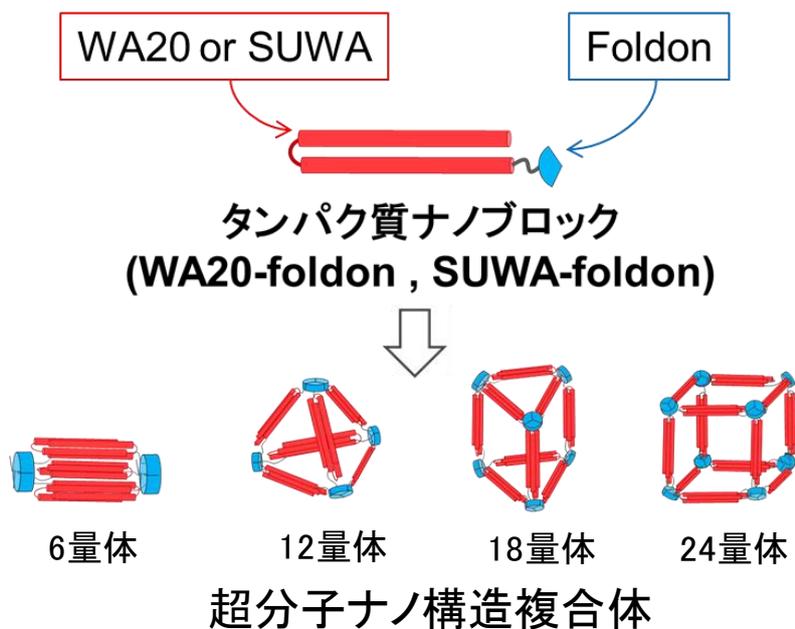


図3 SUWA を利用したタンパク質ナノブロックの開発および超分子ナノ構造複合体構築のイメージ図

(米国化学会より許諾を得て、上述の発表論文等より図を改変して転載© 2020 American Chemical Society)

## <謝辞>

本研究における円偏光二色性測定（熱変性実験）は、東京薬科大学において、山岸明彦教授、八木創太博士、笹本峻弘修士、早稲田大学の赤沼哲史准教授の御協力のもとに行われました。また、多角度光散乱及び円偏光二色性測定は、分子科学研究所において、古賀信康准教授、小杉貴洋助教、古賀理恵博士の御協力のもとに行われました。本研究の X 線結晶回折実験や小角 X 線散乱実験は高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設(Photon Factory)の共同利用実験(No. 2014G111, 2014G673, 2016G153, 2016G606, 2016G617, 2018G634, 2018G636; PF ビームライン BL-5A, BL-6A 等)として、多くの先生方やスタッフの皆様の御協力のもとに行われました。X 線結晶構造解析ソフト(MR-Rosetta)のセットアップには、信州大学の小柳祐輔修士、東京大学の山下恵太郎助教に御協力御助言頂きました。小角 X 線散乱解析は、信州大学繊維学部の佐藤高彰教授、稲野紘一修士、柳瀬慶一博士、小林直也博士らに御協力頂きました。心より御礼申し上げます。

本研究は、JSPS 科研費 (JP16K05841, JP16H00761, JP24780097, JP17KK0104, JP19H02522) や分子科学研究所協力研究等の助成や支援を受けて行われました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

## <問い合わせ先>

### 【責任著者】

信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所生体分子イノベーション部門

信州大学繊維学部応用生物科学科 准教授

新井 亮一

〒386-8567 長野県上田市常田 3-15-1

TEL&FAX: 0268-21-5881

E-mail: rarai@shinshu-u.ac.jp

研究室 HP: <http://fiber.shinshu-u.ac.jp/arai/index.html>

## <用語解説>

※1 ナノテクノロジー、ナノマテリアル、ナノバイオテクノロジー、ナノバイオマテリアル

ナノテクノロジーとは、ナノメートル（1 nm は 1 mm の 100 万分の 1）の領域、すなわち原子や分子のスケールにおいて、物質を自在に制御する技術のことである。そのようなナノスケールでの新素材開発や、ナノスケールのデバイスを開発するための技術等がすべて含まれる。ナノマテリアルとは、ナノスケール（およそ 1 nm~100 nm）の大きさの粒子等から構成される材料・素材のことである。また、タンパク質や核酸等も、ナノスケールの機能性生体分子であり、ナノバイオテクノロジーとは、ナノテクノロジーとバイオテクノロジーが融合した学際領域である。幅約 2 nm の DNA・RNA 分子や、大きさがおよそ数 nm~数十 nm 程度のタンパク質分子などの生体分子（バイオ分子）は、生命現象を担うナノスケールの分子機械（ナノマシン）、ナノスケールの生体分子材料（ナノバイオマテリアル）と考えられる。ナノバイオ分子は精巧な認識能力、均質性、自己組織化などの特徴を示し、このようなナノマシン・ナノマテリアルは、現在の工学的技術では製造不可能であり、ナノバイオテクノロジーは新しい技術分野となりうる。病気の診断や治療などの医薬分野、環境汚染モニタリングなどの環境分野、化学・材料分野などで盛んに研究が進められている。

※2 タンパク質ナノブロック

タンパク質ナノブロックとは、本研究で開発した人工タンパク質(protein)によるナノ(nano)スケールのブロック(building block)のことで、英語(Protein Nanobuilding Block)の頭文字を取って、PN-Block の略称でも呼ばれる。タンパク質ナノブロック戦略とは、おもちゃのブロック遊びのように、少ない種類のシンプルで基

本的なブロック(PN-Block)を開発して自己組織的に組み合わせることにより、多種多様な自己組織化ナノ構造を創り上げる革新的なナノテクノロジー分子技術戦略である。タンパク質ナノブロック(PN-Block)では、WA20のような安定でシンプルな柱状概形の分子間フォールディング(ドメインスワップ)型二量体構造を構成要素としていることにより、ナノ構造のデザインや構築が比較的容易であること、さらに、バイナリーパターン法を用いて、さらなる再設計・改良が比較的容易であることなどが特徴として挙げられる。

(参考情報：人工タンパク質ナノブロックプレスリリース <https://www.shinshu-u.ac.jp/institution/iccer/topics/iccer/post-21.html>)

(参考情報：鎖状連結タンパク質ナノブロックプレスリリース <http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/textiles/news/2018/05/115879.html>)

### ※3 新規人工タンパク質 WA20

新規人工タンパク質 WA20 とは、天然タンパク質のアミノ酸配列をもとにしないで、新規にアミノ酸配列をデザインした人工タンパク質の一つである。タンパク質の目的構造に忠じて、親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸の2種類の繰り返し配列パターンを半合理的にデザインするバイナリーパターン法により、米国プリンストン大学 Hecht 研究室において設計開発された新規人工タンパク質(*de novo protein*)である。2012年に、新井研究室を中心とした立体構造解析により、“クロスヌンチャク型”二量体構造(図1)とも呼ばれる新奇な分子間フォールディング 4本ヘリックスバンドル柱状二量体構造<sup>#補足1</sup>を形成することを解明した(Arai, R., et al., *J. Phys. Chem. B*, 116, 6789–6797, 2012)。このユニークな柱状二量体の構造的特徴は、タンパク質ナノブロックを構成するパーツとして好適である

(参考情報：WA20 立体構造解明プレスリリース <http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/textiles/news/2012/03/46854.html>)

#### #補足1 4本ヘリックスバンドル柱状二量体構造

4本ヘリックスバンドル二量体構造とは、図2のSUWAの立体構造のように、2本の長い $\alpha$ ヘリックス<sup>#補足2</sup>が連結したヌンチャク型のWA20分子2つが、お互いに挟みこむように交差しながら組み合わさることで、全体として4本の $\alpha$ ヘリックスを束ねた(バンドル)形状の柱状二量体(2つの分子が組み合わさって形成される複合体)の立体構造をしている。

#### #補足2 $\alpha$ ヘリックス

$\alpha$ ヘリックス構造は、タンパク質の立体構造を構成する基本的な共通骨格構造である2次構造の1つで、バネに似たような右巻らせん形状をしている。骨格となるアミノ酸のアミノ基は4残基離れたアミノ酸のカルボニル基と水素結合を形成し、構造を安定化している。

### ※4 超分子ナノ構造複合体

超分子とは、複数の分子が共有結合以外の結合(配位結合、水素結合など)や比較的弱い相互作用により秩序だって集合した化合物・単体のことである。クラウンエーテル、シクロデキストリンなど、分子間相互作用によって分子やイオンを内包するホストゲスト化合物や、近年では、複数ユニットから構成されるタンパク質複合体や自己組織化膜、液晶なども超分子に含まれる。

超分子ナノ構造複合体とは、上記のような超分子により作製したナノスケールの構造をもつ複合体である。たとえば、タンパク質サブユニットを組み合わせ会合させて作製したナノスケールのタンパク質複合体も超分子の一種であり、超分子ナノ構造複合体の代表的な例の一つと考えられる。

### ※5 タンパク質の変性、変性(中点)温度( $T_m$ )

加熱やpHの変化、化学物質等の存在により、タンパク質の高次構造が崩れて、活性を失ったり、凝集して固まったりする現象のことである。例えば、タンパク質は高温になると変性するが、これは特に熱変性と呼ばれる。加熱によって、タンパク質の一次構造が変化することはほとんど無いが、二次以上の高次構造は崩れやすい。一般的には約60°C以上になると、周囲に軽く結びつき水和状態をつくる水分子が振動し高次結合部分が解け、細長いひものような状態になる。さらに内部に封じられた疎水部分が露出し、他のポリペプチドの露出部分と引き合い、全体的に凝集したような状態になる。通常は透明で液状の卵白が、加熱されると白い固形に変化するはこのタンパク質の変性が起こるからである。また、加熱により、タンパク質が変性する過程を調べる実験において、ちょうど半分のタンパク質が変性する温度のことを変性中点温度( $T_m$ )または変性温度と

呼び、タンパク質の安定性を評価する際の指標となる。

#### ※6 超安定化人工タンパク質 SUWA、ナノ御柱

この超安定化した人工タンパク質 WA20 変異体の名前は、**Super WA20** の頭二文字ずつをとって“SUWA”と名付けられたが、実は、これにはもう一つの意味が込められており、信州が誇る有名な祭りの諏訪大社の御柱祭にもちなんである。今後、信州で開発された独自の超安定化人工タンパク質 SUWA は、その柱状構造を活かして、ナノスケールの柱としてタンパク質ブロック等に利用すること、いわば“ナノ御柱”としての応用を目指している。

#### ※7 X線結晶構造解析

X線結晶構造解析は、タンパク質や核酸それらの複合体など、生体高分子の立体構造を決定する最も一般的な手法の一つである。X線を物質に照射すると、その一部は原子核の周囲にある電子によって散乱されるが、特に、原子や分子が3次的に並んだ結晶に照射すると、特定の方向のみに散乱されたX線が干渉し強めあう回折と呼ばれる現象が起きる。この回折の起きる方向とその強さには、結晶中の電子の分布についての情報が含まれており、回折X線を測定しコンピューターで解析することで、結晶中の電子の分布、さらには分子の原子配置を決定することができる。

#### ※8 小角X線散乱解析

X線を溶液状態の物質に照射して散乱されるX線のうち、散乱角が小さいもの(約  $10^\circ$  以下)を測定することにより 1~100 nm スケールの微細構造に関する情報を得る解析手法である。溶液中のタンパク質の概形構造や分子量を解析する目的等に利用される。

#### ※9 合成生物学

合成生物学とは、新しい遺伝子やタンパク質等の生体分子、細胞・代謝系等の生体機能システムなどを人工的に創ることに挑戦することで生命機能の理解を深めるアプローチを主流とする比較的新しい研究分野である。生物学のみならず化学や工学分野からの複合的な領域横断的なアプローチで、近年、先端的研究が展開されている。多くの生命機能を担う生体分子であるタンパク質を人工的にデザイン・創製する研究を含むタンパク質工学分野も合成生物学研究の一端を担っている。

#### ※10 自己組織化

自己組織化とは、自律的・自発的に秩序を持つ構造を作り出す現象のことである。タンパク質複合体における自律的・自発的な集合・構造形成も自己組織化の一種である。

#### ※11 バイオナノプロセス

バイオナノプロセスとは、タンパク質をはじめとするバイオ分子によってナノ構造を作製するプロセスのことである。従来の半導体加工技術のトップダウン的技術では、ナノスケール微細加工の限界が近く、装置が高価等の問題もある。そこで、ボトムアップ的技術の開発が求められており、特に、タンパク質による自己組織化ナノ構造をテンプレートとして、バイオミネラリゼーションを組み合わせることにより、水溶液中で有機無機ハイブリッドナノ材料等を比較的簡単に作製するバイオナノプロセスの研究開発が進められている。この手法では、極めて小さなナノ構造ができるだけでなく、これまでに無い量子効果などの可能性もあり、次世代半導体デバイス開発技術として期待されている。(参考書籍:「バイオナノプロセス」溶液中でナノ構造を作るウェット・ナノテクノロジーの薦め(山下一郎、芝清隆監修、シーエムシー出版))