

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	蛋白質結晶の分子設計による超分子構造体の創製
Title(English)	
著者(和文)	根岸走
Author(English)	Hashiru Negishi
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10917号, 授与年月日:2018年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:上野 隆史,櫻井 実,丸山 厚,小島 英理,金原 数
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10917号, Conferred date:2018/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

蛋白質結晶の分子設計による超分子
構造体の創製

東京工業大学大学院 生命理工学研究科

生体分子機能工学 上野研究室

根岸 走

目次

第一章 緒言	1
第二章 リン酸化酵素内包多角体結晶の細胞内合成	25
第三章 多角体結晶を利用した超分子かご型構造体の構築	49
第四章 TbCatB 結晶を利用したフィラメント構造体の構築	77
第五章 総括	97
謝辞	99
発表論文	101

第一章

緒言

1-1. 天然の蛋白質集合体

天然に存在する蛋白質は、単量体同士が自己集合することにより超分子構造体を形成し、生体内で重要な役割を担っている（図 1-1）¹⁻³。これまで報告されてきた蛋白質のうち、単量体が自己集合し、多量体を形成する蛋白質は 50 - 70 % あり⁴、多量体により形成される特異な超分子構造は、単量体とは異なる特性を有し、機能発現において有用である。特に、(1)多種多様な構造が構築可能、(2)協奏的反応が可能、(3)高い安定性の 3 つの点に優れていることが知られている。

多量体形成により様々な超分子構造体が構築可能となり、リング、かご型、フィラメント構造などを創製できる^{5,6}。これらの特異な構造は、それぞれの構造に適した機能を有する。DNA クランプ (PDB: 2POL) はリング構造を形成し、リングの中心に DNA が貫き、DNA 上をスライディングする機能を有する（図 1-1a）。クラスリンはかご型構造を形成し、分子内包とエンドサイトーシスにより細胞内への分子輸送を担う（図 1-1b）⁵。マイクロチューブでは、剛直な 1 次元チューブ構造を形成し、強固な細胞骨格としての役割を有する（図 1-1c）⁶。

超分子構造体は、構造由来の機能を発現する際に有利であるのみならず、単量体同士が協奏的に反応を進行させることができる。例えば、ヘモグロ빈は四量体を形成し、1 つの単量体に酸素が結合すると、全体構造が変化し、他の単量体への酸素結合能が向上する（図 1-1d）⁷。また、多価抗体では 1 分子あたりの抗原結合部位が増加することで抗原に対する親和性が向上する（図 1-1e）⁸。このように多量体形成により初めて付与される機能は多数存在することが報告されてきた。

さらに、多量体形成により蛋白質の安定性も向上することが知られている。多量体は、単量体同士が水素結合、静電引力、疎水性相互作用、ファンデルワールス力などの非共有相互作用により形成され、単量体が単独で存在するより、エンタルピー的に有利な構造である⁴。また、多量体形成により、露出する表面積が小さくなり、水分子による加水分解や化学物質による変性などが起こりにくくなる⁴。

以上より、生体内で様々な機能を発現するためには、蛋白質分子は自己集合し、特異な構造を有する超分子構造体を形成することが重要である。天然の蛋白質超分子構造体の機能に着目し、新たなバイオ材料として利用するために、人工的に蛋白質超分子構造体を構築する研究が進められている。

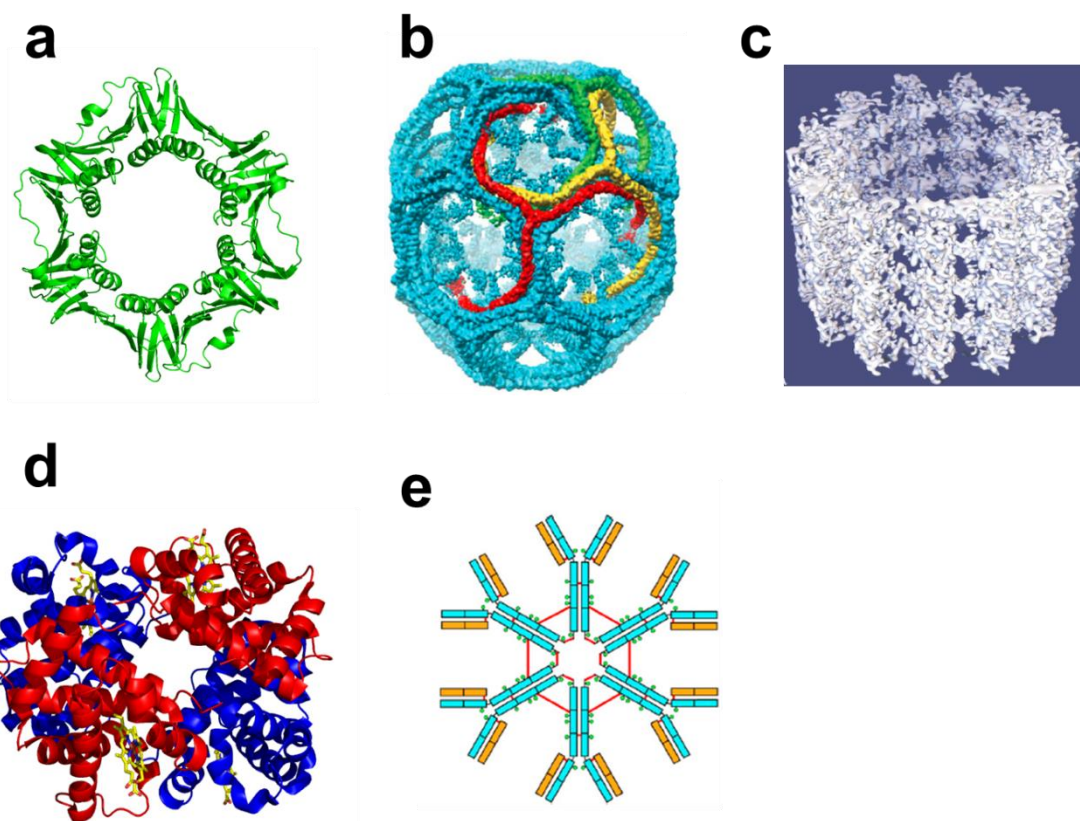


図 1-1. 天然に存在する蛋白質集合体. (a) DNA クランプ. (b) クラスリン蛋白質. (c) マイクロチューブ. (d) ヘモグロビン. (e) 多価抗体.

1-2. 蛋白質集合体の設計

天然の蛋白質集合体に着目し、人工的に新たな蛋白質集合体を構築する研究が盛んに行われてきた。しかし、蛋白質分子は構造の柔軟性や表面構造の複雑さから、分子同士がランダムに会合する凝集体が形成しやすく、分子間の相互作用を設計し、均一かつ特異な超分子構造体を形成することは困難であった¹。そこで、近年、様々な相互作用を利用し、人工蛋白質集合体の構築が報告されてきた。ここでは、天然に存在する相互作用として、(1) 蛋白質-リガンド相互作用、(2) 蛋白質-蛋白質相互作用を利用した蛋白質集合体、および、(3) 人工的に新たな蛋白質-蛋白質相互作用を創出し、構築された蛋白質集合体について示す。

(1) 天然の蛋白質-リガンド相互作用の利用

1999 年、Freeman らは人工的に蛋白質集合体を初めて構築した⁹。この研究は、天然に存在する lectin と糖の特異な非共有結合を利用し、凝集体形成を防ぎながら、三次元結晶の構築を達成した (図 1-2a)⁹。近年では、lectin と糖の相互作用を利用し、チューブ構造や結晶系を制御可能な三次元集積構造の構築も達成されている (図 1-2b, 2c)^{10,11}。Lectin-糖相互作用以外に、天然に存在する蛋白質-リガンド相互作用を利用し、様々な集合体が構築されている。例えば、特異かつ強固なアビジン-ビオチン相互作用を利用し、アルドラーゼを連結させ、蛋白質集合体の構築を達成した (図 1-2d)¹²。アポ体のヘム蛋白質にヘムが結合する相互作用を利用し、ワイヤー状に集合する構造や枝分かれした構造を構築することができる (図 1-2e)¹³⁻¹⁵。

(2) 天然の蛋白質-蛋白質相互作用の利用

T. O. Yeates らは、天然に存在する多量体を形成するサブユニット同士の相互作用を利用し、新たな構造体を構築した。具体的には、天然の二量体、三量体のサブユニット同士の相互作用を利用するために、サブユニット同士を遺伝子融合し、かご型構造に自己集合する蛋白質集合体の構築を達成した (図 1-3a)^{16,17}。この手法を応用し、四量体や二量体のサブユニット同士を遺伝子融合し、1 次元、2 次元、3 次元集合体の構築を達成した (図 1-3b)¹⁸。また、ドメインスワッピングによる単量体間の相互作用形成により構造体の構築も可能である。ミオグロビン二量体をドメインスワッピングにより形成させることで、酸化数の異なる 2 種類のヘムを結合したミオグロビン集合体が形成された (図 1-3c)¹⁹。

(3) 人工的な蛋白質-蛋白質相互作用の利用

特異な蛋白質-蛋白質相互作用を設計するために、蛋白質界面へ疎水性相互作用、金属配位結合、ジスルフィド結合などを導入し、蛋白質集合体を構築している。アミノ酸置換による疎水性相互作用とジスルフィド結合の導入により、Cryptand と類似した蛋白

質構造体の構築を達成し、金属結合能を付与することに成功した（図 1-4a）²⁰。金属配位結合を蛋白質分子表面へ導入することで、リング構造やらせんチューブ構造を構築できる（図 1-4b, 4c）^{21,22}。金属配位結合は、外部環境に応じて相互作用点が変化し、チューブ構造、二次元結晶、三次元結晶が構築可能となる（図 4d）²³。ジスルフィド結合により蛋白質分子同士を特異に連結させることで、チューブ構造やシート構造が形成されてきた（図 1-4e, 4f）^{24,25}。近年、蛋白質-蛋白質相互作用をコンピュータシミュレーションにより設計し、より複雑な構造体を構築できるようになった。シミュレーション結果から、蛋白質分子界面を安定化するための変異体を設計することにより、かご型構造、シート構造、三次元結晶の構築を達成した（図 1-4g, 4h, 4i）²⁶⁻²⁹。同様にコンピュータシミュレーションを利用することで、蛋白質-DNA 分子界面の安定化も達成し、DNA と蛋白質が自己集合したナノワイヤー構造が構築できる（図 1-4j）³⁰。

以上のように、蛋白質間相互作用を設計し、超分子構造体を構築することで、単量体単独では不可能な機能を有する材料としての応用が期待される。新たな蛋白質構造体を構築するためには、蛋白質分子界面の設計指針が重要となる。

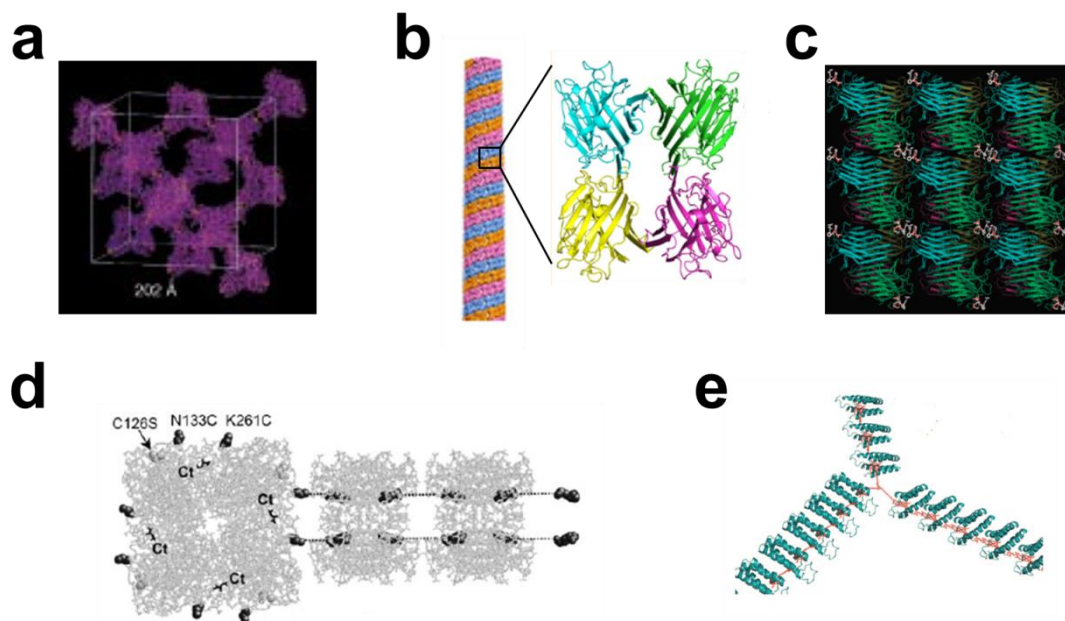


図 1-2. 天然の蛋白質-リガンド相互作用を利用した蛋白質集合体. (a) Lectin-糖相互作用を利用した三次元結晶. (b) Lectin-糖相互作用を利用したチューブ構造. (c) lectin-糖相互作用により構築された結晶系が制御可能な三次元構造体. (d) アビジン-ビオチン相互作用を利用した蛋白質集合体. (e) アポ体のヘム蛋白質とヘムの相互作用を利用した枝分かれた蛋白質集合体.

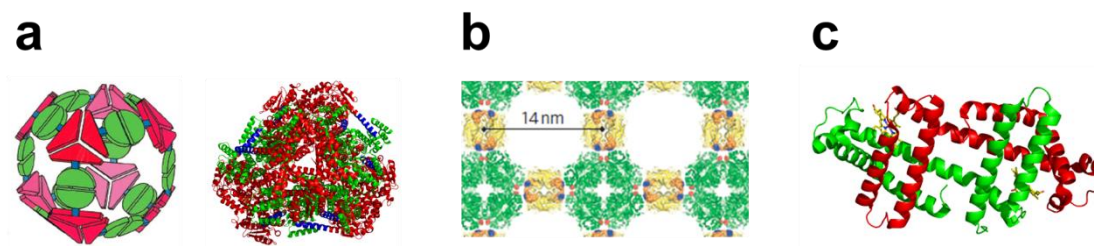


図 1-3. 天然の蛋白質-蛋白質相互作用を利用した蛋白質集合体. (a) 多量体を形成するサブユニット同士の相互作用を利用した蛋白質かご型構造体. (b) 多量体を形成するサブユニット同士の相互作用を利用した 1, 2, 3 次元構造体. (c) ドメインスワッピングによるミオグロビン二量体.

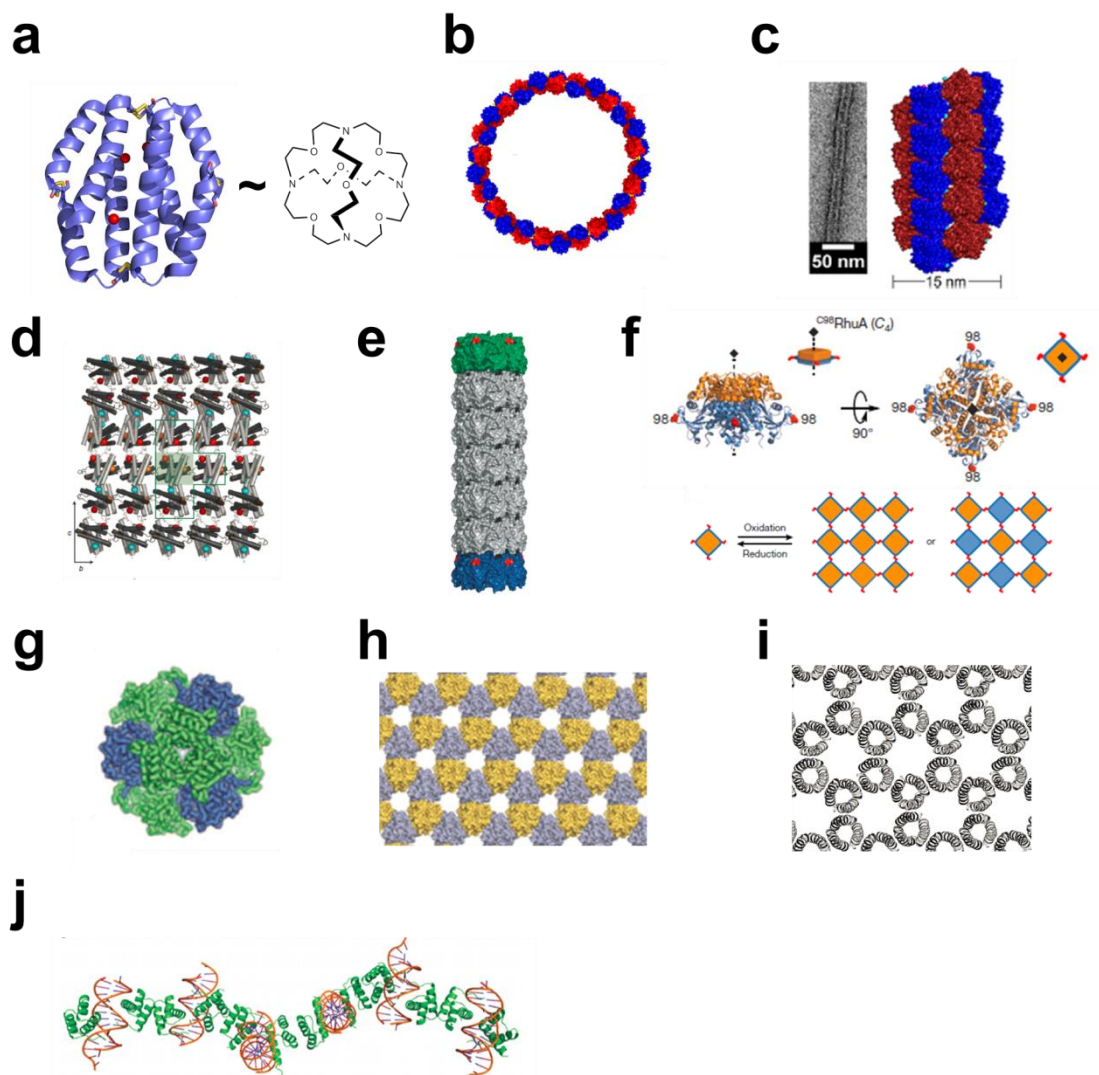


図 1-4. 人工的な蛋白質-蛋白質相互作用を利用した蛋白質集合体. (a) ジスルフィド結合による蛋白質かご型構造体. (b) 金属配位結合を利用した蛋白質リング構造. (c) 金属配位結合を利用したらせんチューブ構造. (d) 金属配位結合の設計により制御可能な 1, 2, 3 次元蛋白質集合体. (e, f) ジスルフィド結合を利用した (e) チューブ構造と (f) 二次元シート構造. (g-j) コンピュータシミュレーションにより創出された蛋白質-蛋白質相互作用による (g) かご型構造体, (h) 二次元シート構造, (i) 三次元結晶構造. (j) コンピュータシミュレーションによる蛋白質-DNA 相互作用を利用した一次元ナノワイヤー構造.

1-3. 蛋白質-蛋白質分子界面

目的の蛋白質集合体を形成するうえで、蛋白質-蛋白質分子界面を設計し、蛋白質間相互作用を創出することが重要である。蛋白質間相互作用により形成される分子界面は、(1) permanent な分子界面、(2) transient な分子界面、(3) 結晶を形成する分子界面の 3 種類に分類できる (図 1-5)^{31,32}。Permanent な分子界面は、多くの疎水性アミノ酸残基により形成される。また、分子同士の接触面積が大きく、最も安定な分子界面である³¹。二量体を形成するシトクロム c や四量体を形成するヘモグロビンなどの分子界面は permanent な分子界面であり、多量体構造を維持する役割を担い、単量体として解離することを防ぐ。Transient な分子界面は、permanent な分子界面に比べ、界面を形成する疎水性アミノ酸残基が少なく、分子同士の接触面積も小さい³¹。Transient な分子界面により、酵素-阻害剤複合体や抗体-抗原複合体などのヘテロ多量体が形成され、外部環境によって蛋白質分子の会合および解離を制御する役割を担う。結晶を形成する分子界面は、最も分子同士の接触面積が小さく、疎水性アミノ酸残基が少ないため、分子同士が解離しやすい³²。この分子界面は、蛋白質の結晶化により初めて形成され、結晶構造を保持する役割を担い、結晶が溶解することで消失する。このように、それぞれの分子界面が担う役割は異なり、蛋白質集合体の特性や機能に大きな影響を与えている³¹⁻³³。

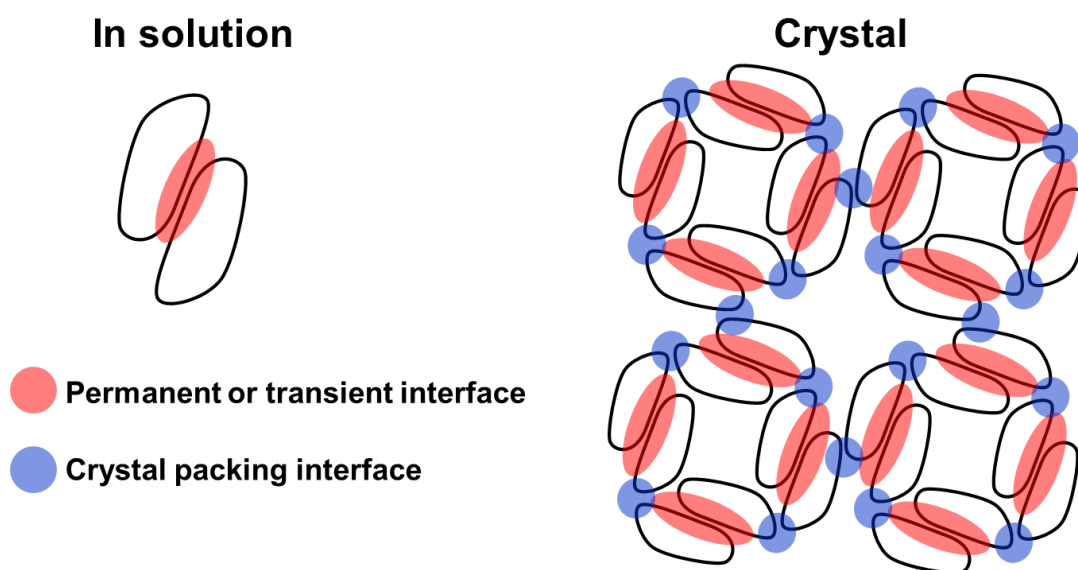


図 1-5. 3 種類の蛋白質-蛋白質分子界面。Permanent な分子界面や transient な分子界面は溶液中に存在する。一方、結晶内のみが存在する分子界面は、結晶化条件によって初めて形成され、蛋白質結晶内のみが存在する。

1-4. 蛋白質結晶の利用

蛋白質結晶内のみが存在する分子界面は、結晶構造の保持に必要不可欠である一方、この分子界面により結晶内には特異な超分子構造体が形成されている^{32,34,35}。しかし、特定の機能を持たないと考えられ、長い間、利用されてこなかった。蛋白質の結晶化現象が発見された当初は、結晶化は蛋白質分子の精製を目的として行われていた(図 1-6a)³⁶。1958 年にミオグロビン結晶へ X 線を照射し、得られた回折格子から立体構造が解明され、構造解明のために結晶化が行われるようになった(図 1-6b)。近年、蛋白質結晶内特有の分子界面により形成される超分子構造が溶液中の蛋白質超分子構造体では見られない機能を有し、新たな固体材料として注目を集めてきた(図 1-6c)。具体的には、lysozyme 結晶内の 1 次元細孔空間で金属微粒子を合成することにより、磁性を制御することを達成した(図 1-7a)^{37,38}。また、ルテニウム錯体が配位した lysozyme 結晶の特異なナノ空間を利用することで、不斉触媒反応が達成される(図 1-7b)³⁹。Thermolysin 結晶やグルコースイソメラーゼ結晶内の特異な環境を利用することにより、結晶を固定相として光学異性体やアミノ酸の分離を達成した(図 1-7c)⁴⁰⁻⁴²。さらに、亜鉛ポルフィリンで再構成したミオグロビンを結晶化し、結晶内に Ru 錯体を精密に配置させることにより高効率な電子伝達反応を達成した⁴³。このように結晶内の分子界面により形成される特異構造を利用することにより、蛋白質結晶を新たな固体材料として応用できる。

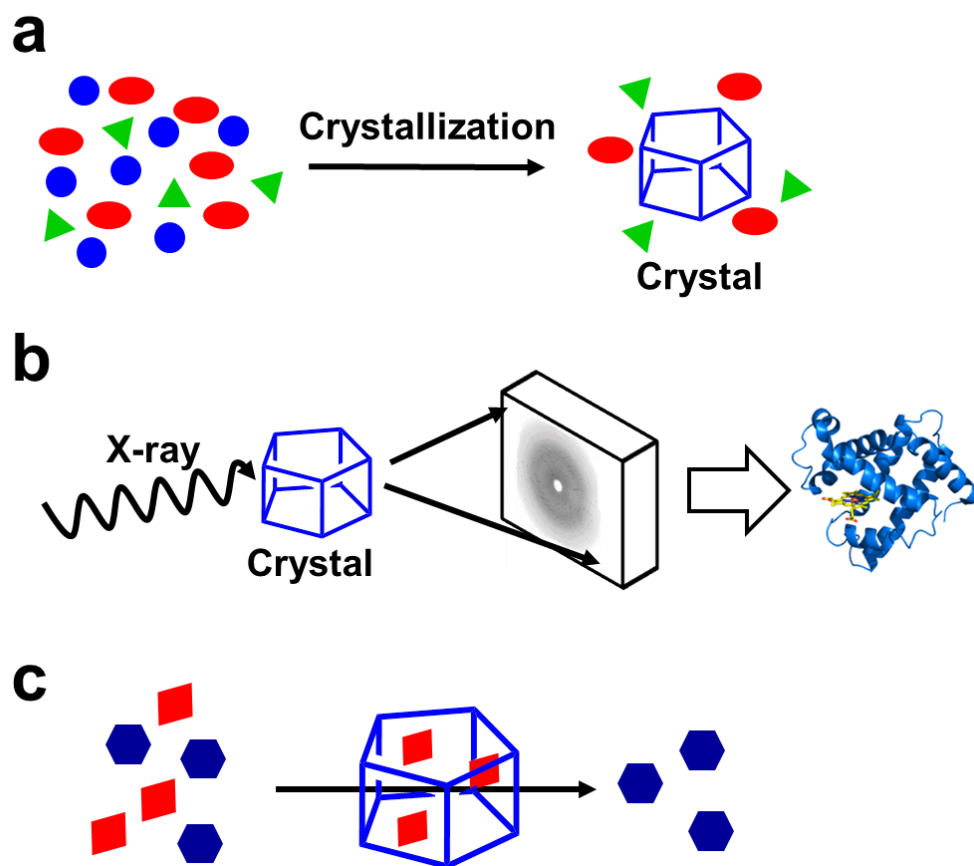


図 1-6. (a) 蛋白質分子の精製のための蛋白質結晶化. (b) 蛋白質結晶を用いた X 線結晶構造解析によるミオグロビン立体構造の解明. (c) 固体材料としての蛋白質結晶の利用. 具体的には, 蛋白質結晶内の特異な環境を利用し, 小分子を分離することができる.

1-5. 蛋白質結晶の高い安定性と溶解現象の利用

蛋白質結晶は固体材料としてのみならず、結晶の高い安定性と溶解現象を利用し、新たな材料として利用されている⁴⁴⁻⁴⁶。蛋白質結晶は分子が規則正しく密に配列することにより、蛋白質分子の変性や分解を防ぎ、長期にわたり安定に保存できる。グルコースオキシダーゼを結晶状態、アモルファス状態でそれぞれ 50°C, 2 日間保存し、その後、結晶およびアモルファス状態のサンプルをそれぞれ溶解させ、酵素活性を評価した。その結果、結晶状態では保存前に対し、活性が 72 %維持されるが、アモルファス状態では 15 %しか維持されない⁴⁴。これより、結晶は酵素の活性を安定保存するのに適していることが示された。また、蛋白質結晶が溶解する環境や溶解速度などを制御し、新たな材料として応用する研究も進められてきた。インスリンと可溶性が低くなるように設計されたインスリン類似体の共結晶は、結晶の溶解性が低下し、インスリンを徐放する材料として利用できる(図 1-8a)⁴⁵。*Candida rugosa* lipase の結晶を利用し、還元剤で切断される架橋剤を結晶に架橋することで還元環境に応答して結晶が溶解し、lipase が活性化する材料を構築できる(図 1-8b)⁴⁶。このように蛋白質結晶は様々な材料として利用されてきたが、これらの材料を構築するためには、蛋白質の精製や結晶化、架橋化など複数の過程を経る必要がある。安定な蛋白質結晶を簡便に得ることができれば、蛋白質結晶が機能性材料として、より利用されやすくなると考えられる。そこで、細胞内で蛋白質が発現すると自発的に集積し、結晶を形成する細胞内蛋白質結晶に着目した。天然には、様々な細胞内蛋白質結晶が存在し、結晶内分子界面の相互作用を緻密に設計し、結晶の溶解性を制御することで生体内で適した機能を発現している⁴⁷⁻⁵⁰。例えば、spindle と呼ばれる蛋白質結晶は、昆虫細胞内で fusolin 蛋白質が自己集合することにより形成され、単量体同士がジスルフィド結合により強固に連結し、結晶性を維持している(図 1-9)⁴⁹。Fusolin 蛋白質は、spindle 結晶内では活性サイトが自己集合により覆われることで不活性しているが、塩基性環境および蛋白質分解により spindle 結晶が溶解すると、結晶から放出された fusolin 蛋白質は活性化する。また、妊娠したゴキブリの細胞内においても脂肪酸が結合した蛋白質が結晶化し、エネルギーを貯蔵する役割を担っている⁵⁰。この結晶は、栄養不足の際に溶解し、脂肪酸を結合した蛋白質が放出され、栄養として利用される。以上より、細胞内蛋白質結晶化により様々な機能を有する蛋白質結晶が細胞内合成でき、さらに、結晶を溶解することで蛋白質の機能が発現される。

そこで、本研究では、細胞内蛋白質結晶化現象により特異に生じる分子内包や集積構造の形成を利用し、機能的な蛋白質結晶の細胞内合成を試みた(図 1-10a)。また、結晶内の特有な分子界面を設計し、(1) 結晶の溶解性、および (2) 溶解後の蛋白質超分子構造体をそれぞれ制御し、新たな機能を付与することにより、新規材料の構築を目指した(図 1-10b)。そのために、以下の 2 つの戦略により結晶の分子設計を行った。(1) 蛋白質結晶内特有の分子界面を不安定化させることで、溶解性の高い蛋白質結晶を作製し、蛋白質の溶解量の増加に伴う活性向上を目指した。(2) 蛋白質結晶内特有の分子界面を

安定化させ、結晶溶解後も溶液中で界面を保持させることで、結晶内にしか存在しえなかった特異な構造体を溶液中へ放出させ、新たな材料として利用することを目指した。具体的な方法として、(1)では分子界面を形成する水素結合などの蛋白質間相互作用を減少させ、不安定化を試みる。また、(2)では蛋白質結晶の部位特異的な架橋化手法を利用し、分子界面ヘジスルフィド結合を導入し、単量体同士を共有結合で連結させることで安定化を試みる（図 1-11）⁵¹。

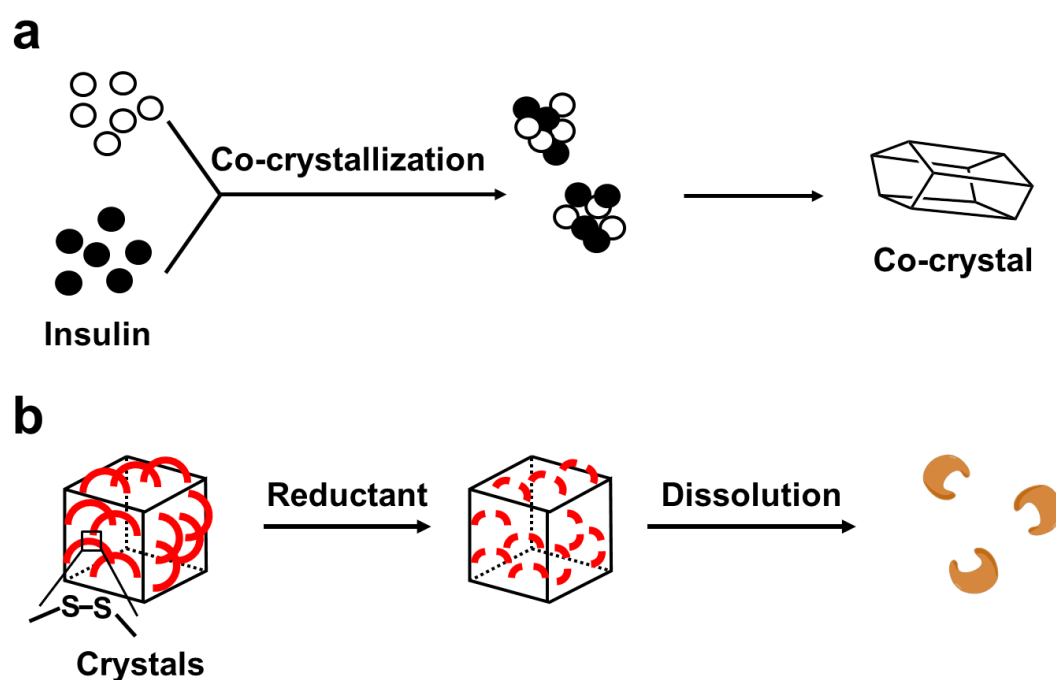


図 1-8. 蛋白質結晶の溶解を利用した材料の構築. (a) 2 種類のインスリンを共結晶化することで徐放性を有する結晶の構築. (b) 還元剤によって切断される架橋剤による lipase 結晶の架橋化と、結晶溶解による lipase の活性化を達成.

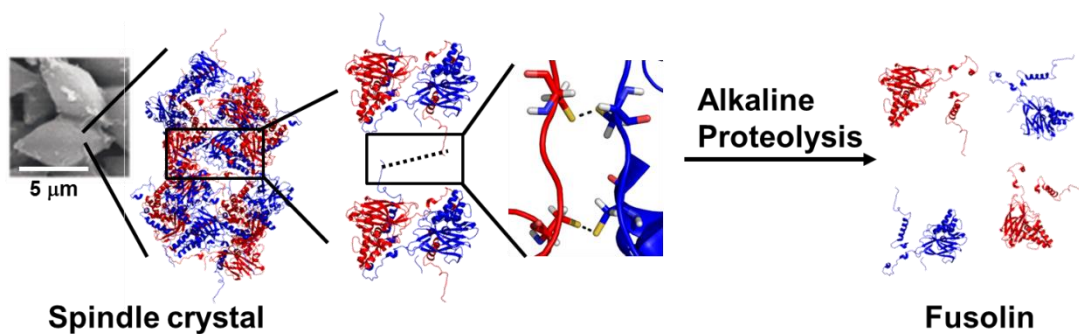


図 1-9. Spindle 結晶内の蛋白質分子同士のジスルフィド結合および結晶溶解による fusolin 蛋白質の活性化 .

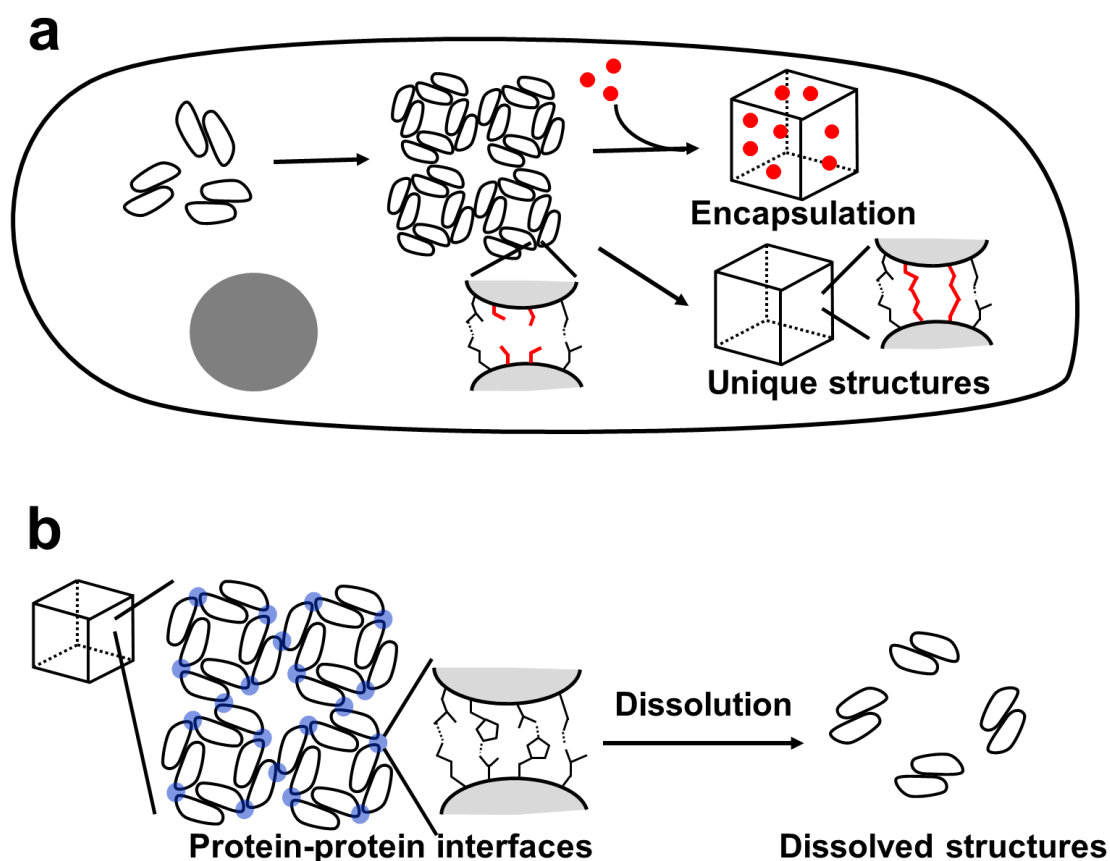


図 1-10. 細胞内蛋白質結晶を利用した機能性材料の構築. (a) 細胞内蛋白質結晶化現象により特異に生じる分子内包や集積構造の形成を利用した機能性蛋白質結晶の細胞内合成. (b) 蛋白質結晶内特有の分子界面の設計により結晶の溶解性, および溶解後の蛋白質構造体の制御と新たな機能の発現.

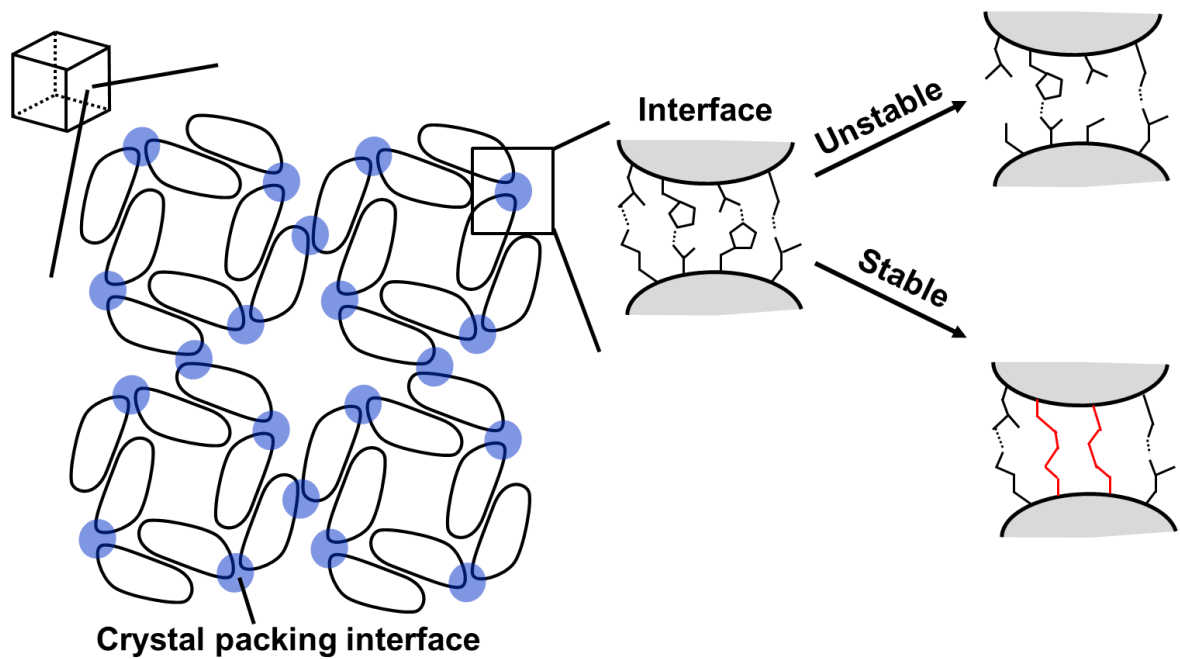


図 1-11. 蛋白質結晶内の分子界面の設計による新規材料の構築. 具体的には, 分子界面のアミノ酸を置換し, 水素結合を減少させることによる界面の不安定化と共有結合による界面の安定化を行う.

1-6. 多角体結晶

蛋白質結晶の溶解挙動を制御することで新たな材料を構築するために、私は多角体と呼ばれる細胞内蛋白質結晶に着目した。多角体結晶は、細胞質多角体病ウイルスが昆虫細胞に感染することで、細胞内で形成される（図 1-12）。多角体結晶は細胞内で結晶化する過程で、直径 70 nm のウイルス粒子を内包する特徴を有する。乾燥、凍結、酸（pH 2）などの環境下においても多角体結晶は結晶性を維持する高い安定性を有するため、外部の過酷な環境からウイルス粒子を保護し、感染力を維持したまま長期保存が達成される⁵²。一方、pH 10 以上の塩基性溶液中で多角体結晶は溶解し、ウイルス粒子は放出され、新たな昆虫細胞へと感染する。天然では、宿主となるカイコの幼虫などが多角体結晶を摂食し、pH 9 - 11 の塩基性環境の中腸に到達することで、多角体結晶が溶解し、内包ウイルス粒子が放出され、新しい細胞へと感染する。このような多角体結晶の高安定性と溶解現象を利用するために、近年、ウイルス粒子の代わりに様々な外来蛋白質を結晶へ内包させる研究が進められてきた⁵³。外来蛋白質を多角体結晶へ内包するには、外来蛋白質ヘタグペプチドを融合し、昆虫細胞内でタグペプチド融合外来蛋白質と多角体蛋白質を共発現させる必要がある。これまで外来蛋白質を多角体結晶へ内包させるのに必要なタグペプチドは 2 種類存在することが分かった⁵⁴。1 つ目は内包ウイルス粒子の外殻カプシド蛋白質の C 末端の VP3 と呼ばれる領域、2 つ目は多角体蛋白質の N 末端の H1 ヘリックスと呼ばれる領域である。外来蛋白質として enhanced green fluorescent protein (EGFP) を利用し、VP3 および H1 ヘリックスを EGFP の N 末端、C 末端へ融合した VP3-EGFP, EGFP-VP3, H1-EGFP, EGFP-H1 をそれぞれ昆虫細胞内で多角体蛋白質と共発現させた結果、4 種類とも結晶への内包が確認できた。また、最も効率的に内包したのは、H1-EGFP であった⁵⁴。これより、様々な蛋白質の N 末端へ H1 ヘリックスを融合させ、昆虫細胞内で多角体結晶へ内包させることで、多角体結晶の特徴を活かした内包蛋白質の安定保存と結晶溶解による機能発現を達成する材料の構築が期待できる。

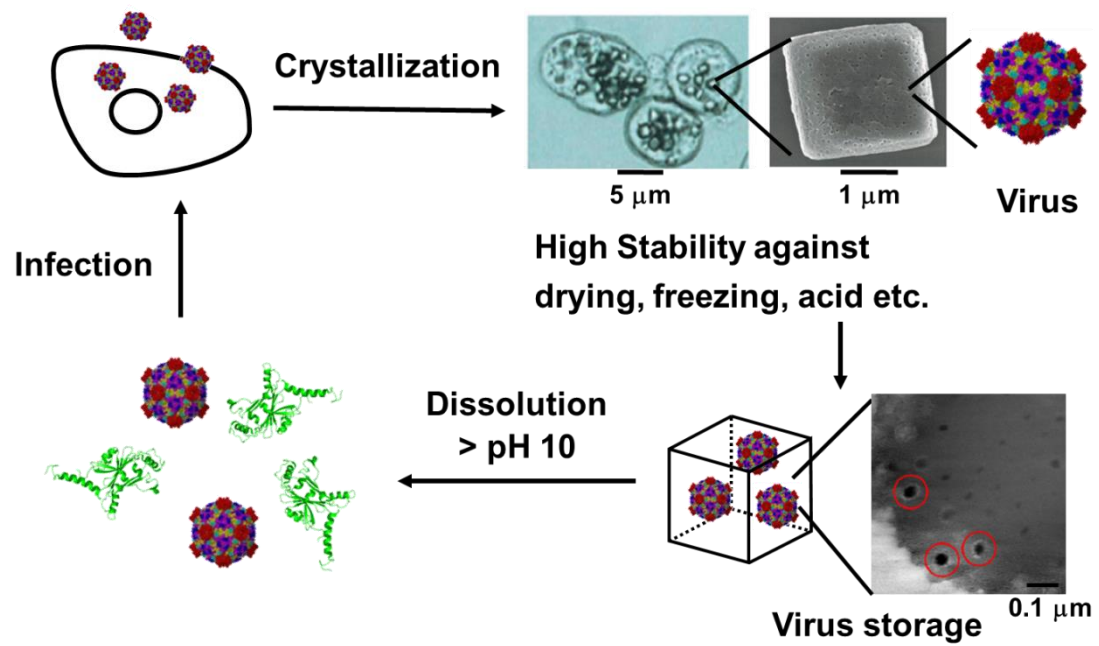


図 1-12. 多角体結晶の高安定性を利用したウイルス粒子の内包と，結晶溶解を利用したウイルス粒子の放出．

1-7. 細胞内蛋白質結晶の溶解現象を利用した新材料の構築

本論文では、細胞内蛋白質結晶化現象と結晶の溶解現象を利用し、新たな機能性材料を構築した。具体的には、(1) 酵素内包蛋白質結晶の細胞内合成と、結晶の溶解性制御による酵素活性を維持したまま結晶からの放出、(2) 細胞内蛋白質結晶に存在する特異な超分子構造体の溶液中への切り出しを達成した。

第二章では、蛋白質結晶内の特異な分子界面を不安定化し、結晶の溶解性を制御することにより新たな材料の構築を行う。具体的には、細胞内結晶化現象を利用し、細胞内で多角体結晶へ酵素を内包することと、内包酵素の活性を維持したまま結晶から放出することが可能な酵素保存材料の構築を試みた。結晶構造データを基にアミノ酸置換を行い、R13A, R13K 結晶の2種類の変異体を作製した。R13A, R13K 結晶はWT 結晶では溶解しない pH 8.5 で溶解できる。そこで、昆虫細胞内で R13A, R13K 結晶ヘリン酸化酵素 (PKC) を内包し、活性を維持したまま PKC を放出することを達成した。また、1 週間の乾燥保存に対し、単独の PKC では 2% 以下の活性しか示さなかったが、多角体結晶に内包することで、WT では 95%, R13A では 53%, R13K では 23% 活性を保持できた。これらの結果から R13A, R13K 結晶を利用することで内包 PKC の酵素活性を保持したまま結晶から放出でき、酵素保存材料としての有用性を示した (図 1-11a)。

第三章では、蛋白質結晶内の特異な分子界面を架橋化することで安定化し、結晶溶解後も結晶内特異構造を保持することを試みた。具体的には、多角体結晶を利用し、結晶内特有の分子界面ヘジスルフィド結合を導入し、特異なかご型構造体を結晶から溶液中へ切り出すことを達成した (図 1-11b)。多角体結晶内の分子界面でのジスルフィド結合が形成可能な部位として E73/Y83 および S193/A194 の2か所があり、これらヘシステインを導入し、結晶内ジスルフィド結合の形成を試みた。X 線結晶構造解析より C73/C83/C193/C194 変異体結晶は、過酸化水素で酸化することで、結晶内でジスルフィド結合を形成することが示された。酸化後の結晶を pH 10 の塩基性溶液で溶解することにより、結晶からかご型構造の切り出しを達成した。一方、C73/C83/C193/C194 の単量体を溶液中で酸化しても、かご型構造体は構築されず、凝集体が形成された。また、多角体結晶の乾燥に対する高い安定性を利用し、4 日間結晶を乾燥させた後も結晶からかご型構造が形成されていることが示された。

第四章では、第三章で確立した蛋白質結晶から超分子構造体を切り出す手法を他の蛋白質結晶へ適用し、1 次元構造体の構築を目指した。具体的には、*Trypanosoma brucei* cystein protease cathepsin B (TbCatB) と呼ばれる昆虫細胞内で結晶化する TbCatB 結晶を利用し、細胞内結晶に存在する特異な一次元フィラメント構造体の構築を試みた (図 1-11c)。本章では、結晶からフィラメント構造を構築するために、2 種類の変異体を設計した。TbCatB 結晶構造データを基にジスルフィド結合の形成が期待できる分子界面、R91/T223 および K214/Q277 ヘシステインを導入し、ジスルフィド結合で単量体間を架橋化した。C91/C223 変異体結晶は結晶構造解析の結果、酸化処理をしなくても

結晶内ジスルフィド結合の形成を確認し、細胞内で単量体同士の自発的に架橋化すると考えられる。よって、C91/C223 結晶は溶解するだけでフィラメント構造体が構築できた。一方、C214/C277 結晶では、結晶内ジスルフィド結合は形成されず、単量体同士を共有結合させるためには、架橋剤が必要であることが分かった。架橋化後の C214/C217 結晶を溶解するとフィラメント構造体を溶液中へ切り出すことができた。以上より、第三章、第四章から、様々な蛋白質結晶を利用し、結晶内分子界面を設計することにより、多種多様な超分子構造体が構築できることが示唆された。

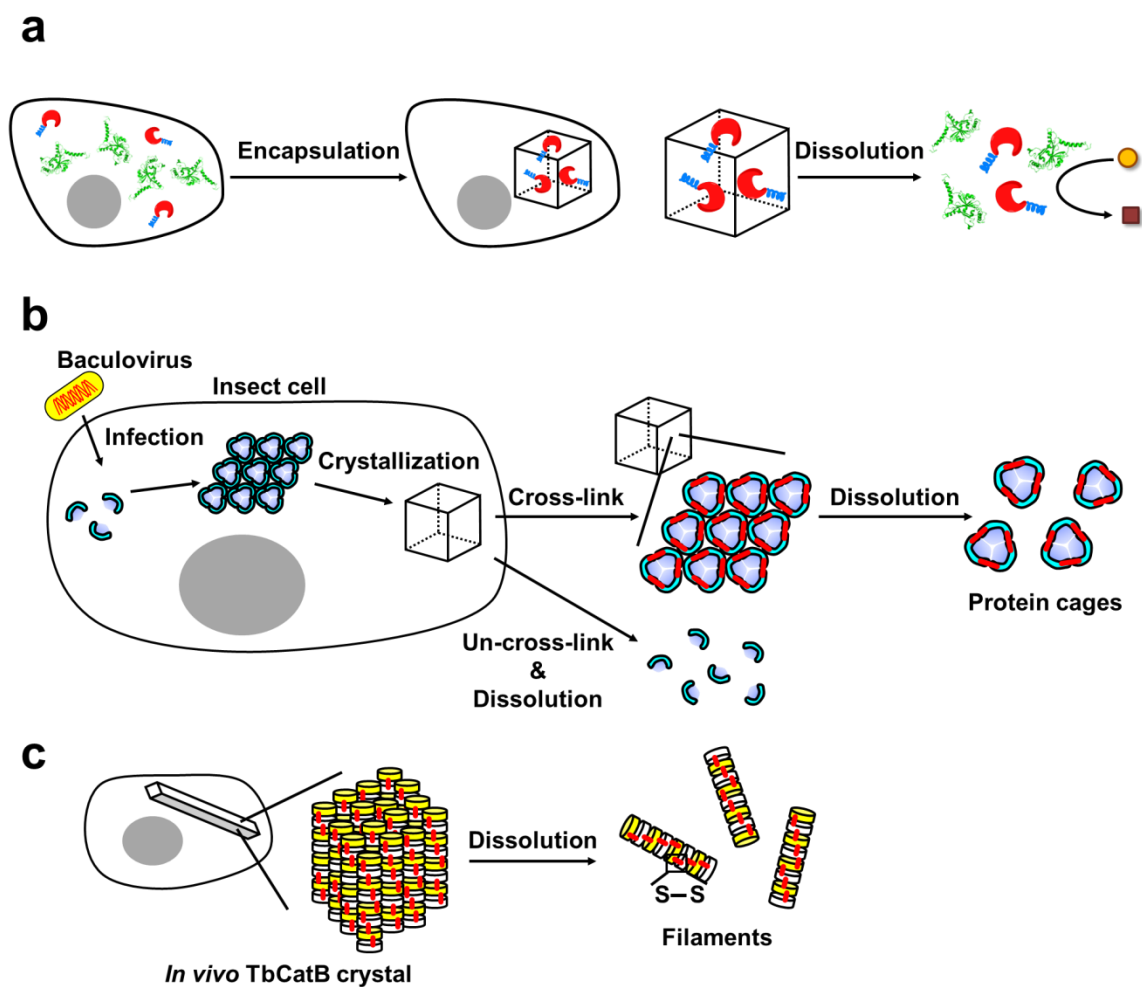


図 1-11. (a) 細胞内における多角体結晶の酵素内包と結晶の溶解性制御による活性を維持したまま酵素の放出が可能な酵素保存材料の構築. (b) 多角体結晶を利用し、ジスルフィド結合による単量体同士の架橋と結晶溶解による超分子かご型構造体の構築. (c) TbCatB 結晶を利用し、細胞内での単量体同士の架橋反応の進行と結晶溶解によるフィラメント構造体の構築.

1-8. 参考文献

1. Luo, Q., Hou, C., Bai, Y., Wang, R. & Liu, J. Protein Assembly: Versatile Approaches to Construct Highly Ordered Nanostructures. *Chem. Rev.* **116**, 13571-13632 (2016).
2. Hong, F., Zhang, F., Liu, Y. & Yan, H. DNA Origami: Scaffolds for Creating Higher Order Structures. *Chem. Rev.* **117**, 12584-12640 (2017).
3. Gradiar, H. & Jerala, R. Self-assembled bionanostructures: proteins following the lead of DNA nanostructures. *J. Nanobiotech.* **12** (2014).
4. Goodsell, D. S. & Olson, A. J. Structural symmetry and protein function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 105-153 (2000).
5. Fotin, A., Cheng, Y. F., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S. C., Kirchhausen, T. & Walz, T. Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* **432**, 573-579 (2004).
6. Li, H. L., DeRosier, D. J., Nicholson, W. V., Nogales, E. & Downing, K. H. Microtubule structure at 8 angstrom Resolution. *Structure* **10**, 1317-1328 (2002).
7. Ackers, G. K. & Holt, J. M. Asymmetric cooperativity in a symmetric tetramer: Human hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **281**, 11441-11443 (2006).
8. Cuesta, A. M., Sainz-Pastor, N., Bonet, J., Oliva, B. & Alvarez-Vallina, L. Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends Biotechnol.* **28**, 355-362 (2010).
9. Dotan, N., Arad, D., Frolov, F. & Freeman, A. Self-assembly of a tetrahedral lectin into predesigned diamondlike protein crystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 2363-2366 (1999).
10. Yang, G., Zhang, X., Kochovski, Z., Zhang, Y., Dai, B., Sakai, F., Jiang, L., Lu, Y., Ballauff, M., Li, X., Liu, C., Chen, G. & Jiang, M. Precise and Reversible Protein-Microtubule-Like Structure with Helicity Driven by Dual Supramolecular Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 1932-1937 (2016).
11. Sakai, F., Yang, G., Weiss, M. S., Liu, Y., Chen, G. & Jiang, M. Protein crystalline frameworks with controllable interpenetration directed by dual supramolecular interactions. *Nat. Commun.* **5**, 4634 (2014).
12. Ringler, P. & Schulz, G. E. Self-assembly of proteins into designed networks. *Science* **302**, 106-109 (2003).
13. Oohora, K., Onoda, A. & Hayashi, T. Supramolecular assembling systems formed by heme-heme pocket interactions in hemoproteins. *Chem. Commun.* **48**, 11714-11726 (2012).
14. Kitagishi, H., Oohora, K., Yamaguchi, H., Sato, H., Matsuo, T., Harada, A. & Hayashi, T. Supramolecular hemoprotein linear assembly by successive interprotein heme-heme pocket interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10326-10327 (2007).
15. Kitagishi, H., Kakikura, Y., Yamaguchi, H., Oohora, K., Harada, A. & Hayashi, T. Self-Assembly of One- and Two-Dimensional Hemoprotein Systems by Polymerization

- through Heme-Heme Pocket Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 1271-1274 (2009).
16. Padilla, J. E., Colovos, C. & Yeates, T. O. Nanohedra: using symmetry to design self assembling protein cages, layers, crystals, and filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2217-2221 (2001).
 17. Lai, Y. T., Tsai, K. L., Sawaya, M. R., Asturias, F. J. & Yeates, T. O. Structure and flexibility of nanoscale protein cages designed by symmetric self-assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 7738-7743 (2013).
 18. Sinclair, J. C., Davies, K. M., Venien-Bryan, C. & Noble, M. E. Generation of protein lattices by fusing proteins with matching rotational symmetry. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 558-562 (2011).
 19. Lin, Y. W., Nagao, S., Zhang, M., Shomura, Y., Higuchi, Y. & Hirota, S. Rational Design of Heterodimeric Protein using Domain Swapping for Myoglobin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 511-515 (2015).
 20. Medina-Morales, A., Perez, A., Brodin, J. D. & Tezcan, F. A. In vitro and cellular self-assembly of a Zn-binding protein cryptand via templated disulfide bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 12013-12022 (2013).
 21. Bai, Y., Luo, Q., Zhang, W., Miao, L., Xu, J., Li, H. & Liu, J. Highly ordered protein nanorings designed by accurate control of glutathione S-transferase self-assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 10966-10969 (2013).
 22. Brodin, J. D., Smith, S. J., Carr, J. R. & Tezcan, F. A. Designed, Helical Protein Nanotubes with Variable Diameters from a Single Building Block. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 10468-10471 (2015).
 23. Brodin, J. D., Ambroggio, X. I., Tang, C., Parent, K. N., Baker, T. S. & Tezcan, F. A. Metal-directed, chemically tunable assembly of one-, two- and three-dimensional crystalline protein arrays. *Nat. Chem.* **4**, 375-382 (2012).
 24. Ballister, E. R., Lai, A. H., Zuckermann, R. N., Cheng, Y. & Mougous, J. D. In vitro self-assembly of tailorable nanotubes from a simple protein building block. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3733-3738 (2008).
 25. Suzuki, Y., Cardone, G., Restrepo, D., Zavattieri, P. D., Baker, T. S. & Tezcan, F. A. Self-assembly of coherently dynamic, auxetic, two-dimensional protein crystals. *Nature* **533**, 369-373 (2016).
 26. King, N. P., Sheffler, W., Sawaya, M. R., Vollmar, B. S., Sumida, J. P., Andre, I., Gonen, T., Yeates, T. O. & Baker, D. Computational design of self-assembling protein nanomaterials with atomic level accuracy. *Science* **336**, 1171-1174 (2012).
 27. King, N. P., Bale, J. B., Sheffler, W., McNamara, D. E., Gonen, S., Gonen, T., Yeates, T. O. & Baker, D. Accurate design of co-assembling multi-component protein nanomaterials.

- Nature* **510**, 103-108 (2014).
28. Gonen, S., DiMaio, F., Gonen, T. & Baker, D. Design of ordered two-dimensional arrays mediated by noncovalent protein-protein interfaces. *Science* **348**, 1365-1368 (2015).
 29. Lanci, C. J., MacDermaid, C. M., Kang, S. G., Acharya, R., North, B., Yang, X., Qiu, X. J., DeGrado, W. F. & Saven, J. G. Computational design of a protein crystal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 7304-7309 (2012).
 30. Mou, Y., Yu, J. Y., Wannier, T. M., Guo, C. L. & Mayo, S. L. Computational design of co-assembling protein-DNA nanowires. *Nature* **525**, 230-233 (2015).
 31. Jones, S. & Thornton, J. M. Principles of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13-20 (1996).
 32. Janin, J., Rodier, F., Chakrabarti, P. & Bahadur, R. P. Macromolecular recognition in the Protein Data Bank. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **63**, 1-8 (2007).
 33. Nooren, I. M. A. & Thornton, J. M. Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J.* **22**, 3486-3492 (2003).
 34. Krissinel, E. & Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774-797 (2007).
 35. Krissinel, E. Macromolecular complexes in crystals and solutions. *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.* **67**, 376-385 (2011).
 36. Giege, R. A historical perspective on protein crystallization from 1840 to the present day. *FEBS J.* **280**, 6456-6497 (2013).
 37. Guli, M., Lambert, E. M., Li, M. & Mann, S. Template-directed synthesis of nanoplasmonic arrays by intracrystalline metalization of cross-linked lysozyme crystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 520-523 (2010).
 38. Abe, S., Tsujimoto, M., Yoneda, K., Ohba, M., Hikage, T., Takano, M., Kitagawa, S. & Ueno, T. Porous protein crystals as reaction vessels for controlling magnetic properties of nanoparticles. *Small* **8**, 1314-1319 (2012).
 39. Tabe, H., Abe, S., Hikage, T., Kitagawa, S. & Ueno, T. Porous protein crystals as catalytic vessels for organometallic complexes. *Chem. Asian J.* **9**, 1373-1378 (2014).
 40. Hu, Z. Q. & Jiang, J. W. Chiral Separation of Racemic Phenylglycines in Thermolysin Crystal: A Molecular Simulation Study. *J. Phys. Chem. B* **113**, 15851-15857 (2009).
 41. Pastinen, O., Visuri, K. & Leisola, M. Xylitol purification by cross-linked glucose isomerase crystals. *Biotechnol. Tech.* **12**, 557-560 (1998).
 42. Hu, Z. & Jiang, J. Separation of amino acids in glucose isomerase crystal: insight from molecular dynamics simulations. *J. Chromatogr. A* **1216**, 5122-5129 (2009).
 43. Koshiyama, T., Shirai, M., Hikage, T., Tabe, H., Tanaka, K., Kitagawa, S. & Ueno, T. Post-crystal engineering of zinc-substituted myoglobin to construct a long-lived

- photoinduced charge-separation system. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 4849-4852 (2011).
44. Shenoy, B., Wang, Y., Shan, W. Z. & Margolin, A. L. Stability of crystalline proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **73**, 358-369 (2001).
 45. Brader, M. L., Sukumar, M., Pekar, A. H., McClellan, D. S., Chance, R. E., Flora, D. B., Cox, A. L., Irwin, L. & Myers, S. R. Hybrid insulin cocrystals for controlled release delivery. *Nat. Biotechnol.* **20**, 800-804 (2002).
 46. Margolin, A. L. & Navia, M. A. Protein crystals as novel catalytic materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 2204-2222 (2001).
 47. Mori, H., Ito, R., Nakazawa, H., Sumida, M., Matsubara, F. & Minobe, Y. EXPRESSION OF BOMBYX-MORI CYTOPLASMIC POLYHEDROSIS-VIRUS POLYHEDRIN IN INSECT CELLS BY USING A BACULOVIRUS EXPRESSION VECTOR, AND ITS ASSEMBLY INTO POLYHEDRA. *J. Gen. Virol.* **74**, 99-102 (1993).
 48. Coulibaly, F., Chiu, E., Gutmann, S., Rajendran, C., Haebel, P. W., Ikeda, K., Mori, H., Ward, V. K., Schulze-Briese, C. & Metcalf, P. The atomic structure of baculovirus polyhedra reveals the independent emergence of infectious crystals in DNA and RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 22205-22210 (2009).
 49. Chiu, E., Hijnen, M., Bunker, R. D., Boudes, M., Rajendran, C., Aizel, K., Olieric, V., Schulze-Briese, C., Mitsuhashi, W., Young, V., Ward, V. K., Bergoin, M., Metcalf, P. & Coulibaly, F. Structural basis for the enhancement of virulence by viral spindles and their in vivo crystallization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 3973-3978 (2015).
 50. Banerjee, S., Coussens, N. P., Gallat, F. X., Sathyanarayanan, N., Srikanth, J., Yagi, K. J., Gray, J. S. S., Tobe, S. S., Stay, B., Chavas, L. M. G. & Ramaswamy, S. Structure of a heterogeneous, glycosylated, lipid-bound, in vivo-grown protein crystal at atomic resolution from the viviparous cockroach *Diploptera punctata*. *IUCrJ* **3**, 282-293 (2016).
 51. Buch, M., Wine, Y., Dror, Y., Rosenheck, S., Lebendiker, M., Giordano, R., Leal, R. M., Popov, A. N., Freeman, A. & Frolow, F. Protein products obtained by site-preferred partial crosslinking in protein crystals and "liberated" by redissolution. *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 1296-1303 (2014).
 52. Chen, J., Sun, J., Atanasov, I., Ryazantsev, S. & Zhou, Z. H. Electron tomography reveals polyhedrin binding and existence of both empty and full cytoplasmic polyhedrosis virus particles inside infectious polyhedra. *J. Virol.* **85**, 6077-6081 (2011).
 53. Ikeda, K., Nakazawa, H., Shimo-Oka, A., Ishio, K., Miyata, S., Hosokawa, Y., Matsumura, S., Masuhara, H., Belloncik, S., Alain, R., Goshima, N., Nomura, N., Morigaki, K., Kawai, A., Kuroita, T., Kawakami, B., Endo, Y. & Mori, H. Immobilization of diverse foreign proteins in viral polyhedra and potential application for protein microarrays. *Proteomics* **6**, 54-66 (2006).

54. Ijiri, H., Coulibaly, F., Nishimura, G., Nakai, D., Chiu, E., Takenaka, C., Ikeda, K., Nakazawa, H., Hamada, N., Kotani, E., Metcalf, P., Kawamata, S. & Mori, H. Structure-based targeting of bioactive proteins into cypovirus polyhedra and application to immobilized cytokines for mammalian cell culture. *Biomaterials* **30**, 4297-4308 (2009).

第二章

リン酸化酵素内包多角体結晶の細胞内合成

要旨

近年、蛋白質集合体を利用し、酵素の内包や放出を達成した研究が進めれてきた。しかし、酵素を安定に内包することや活性を維持したまま酵素を放出することは依然として困難である。本研究では、蛋白質結晶を利用し、酵素の安定保存および酵素活性を維持したまま放出することを達成した。具体的には、昆虫細胞内で結晶化する多角体結晶と呼ばれる蛋白質結晶を利用し、リン酸化酵素 (Protein Kinase C: PKC) を内包する多角体結晶を細胞内で合成した。多角体結晶の変異体を作製することにより、PKC の安定保存と活性を維持したままの放出を達成し、酵素保存材料としての応用が期待される。

2-1. 緒言

近年, 酵素の内包や放出を目的とした材料の構築が盛んに行われている¹⁻³. これまで, 蛋白質集合体やポリマー, シリカ粒子などが酵素の反応性を制御するための担体として利用されてきた⁴⁻⁸. 中でも, 蛋白質集合体を利用した酵素内包は, 天然に存在するマイクロコンパートメント等利用されているため, その有用性が期待されている⁹. 人工的に蛋白質集合体へ酵素の内包や固定化を達成するために, *in vitro* での蛋白質分子の自己集合や, 遺伝子融合を利用した手法が確立されてきた¹⁰⁻¹⁵. しかし, 依然として酵素活性を保持し, 担体から酵素を放出する材料の構築は困難である¹⁶. そこで, 蛋白質結晶に着目した. 蛋白質結晶は, 蛋白質分子が規則正しく配列することにより形成され, 結晶特有の安定性を利用した酵素保存や結晶溶解を利用した酵素放出が可能となり, 新たな酵素保存固体材料として有用であると考えられる¹⁷⁻²⁰.

近年, 構造生物学やナノテクノロジー分野において, 蛋白質の細胞内結晶化現象が注目されている²¹⁻²³. 本研究では, 昆虫細胞内で結晶化する多角体結晶 (Polyhedra crystal: PhC) を利用した. 多角体結晶は, 細胞質多角体病ウイルス (Cytoplasmic polyhedrosis virus, CPV) が昆虫細胞に感染することにより, 多角体単量体 (Polyhedrin monomer: PhM) が細胞内で結晶化し, 形成される. その過程で直径 75 nm の CPV は多角体結晶へ内包される²⁴. 多角体結晶は尿素, 酸, 界面活性剤などに対して結晶構造を維持する高い安定性を有するため, 結晶に内包された CPV は乾燥, 凍結, 酵素による分解などの過酷な周囲環境から保護され, 活性を維持したまま長期間保存が可能となる²⁵. 外来蛋白質と多角体単量体を昆虫細胞内で共発現させることにより, 多角体結晶へ CPV の代わりに外来蛋白質を内包することが可能である²⁶. しかし, 野生型の多角体結晶 (Wild type PhC: WTPhC) は pH 10 以上の塩基性溶液にしか溶解しないため, 結晶へ内包した酵素が放出する際, ほとんどが失活してしまい, 酵素活性を維持したまま結晶から放出することは困難である²⁷. この問題を解決するために, pH 10 以下で溶解する多角体結晶を作製し, 内包酵素の至適な pH で結晶から放出させる必要がある. そこで, 多角体結晶の溶解メカニズムを解明し, pH 10 以下で溶解する多角体結晶の設計指針を決めた.

本研究では, リン酸化酵素 (Protein kinase C: PKC) と多角体単量体を昆虫細胞内で共発現させ, PKC 内包多角体結晶の細胞内合成を行った. 多角体蛋白質の変異体設計により, 酵素活性を維持したまま PKC を放出できる変異体結晶を作製した (図 2-1). また, 変異体結晶は PKC のみでは失活してしまう過酷な環境下においても高い安定性を示し, 内包した PKC を失活させずに安定保存できることが示された. 多角体変異体結晶を利用することにより, 様々な外来蛋白質を内包し, 安定に保存したり, 活性を維持したまま結晶から放出することが達成でき, 蛋白質保存材料としての応用が期待できる.

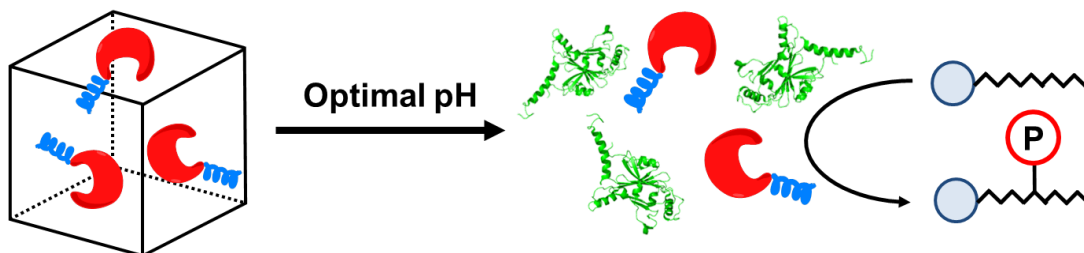


図 2-1. PKC 内包多角体結晶の溶解による酵素活性を維持したまま結晶からの放出.

2-2. 結果と考察

溶解メカニズム

pH 10 以下の溶液中で溶解する多角体結晶の変異体設計のために, WTPhC の溶解メカニズムの理解は重要である. 初めに BCA アッセイにより, WTPhC の pH に対する溶解量を定量した (図 2-2a). WTPhC は pH 9.5 で溶解し始めることが示された. 多角体結晶を 0.1M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH 9.5) 緩衝液に 37°C で浸漬すると, 10 分後, 吸収スペクトルのピークは 261 nm であった. その後, 吸収波長のピークは 30 分後に 269 nm, 60 分後に 271 nm へと変化した (図 2-2b). イオン交換カラムクロマトグラフィーにより, WTPhC の内部に存在する ATP, CTP, GTP が結晶から溶液中へ溶出していることが確認された (図 2-2c). また, WTPhC を pH 8.5 や pH 9.0 で 1 時間浸漬すると, 吸収スペクトルのピークは 260 nm であった (図 2-3). ATP, CTP, GTP の吸収スペクトルのピーク波長は, それぞれ 260, 272, 253nm であることから, ATP が結晶から溶出され, 結晶が溶解し始めることが示された.

溶解プロセスにおいて WTPhC の形状変化を確認するために, 0.1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH 9.5) に 1 時間, 結晶を浸漬し, 走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) により観察した (図 2-4). 結晶の表面には多数の穴が観察されたことから, ATP が溶出した後, 結晶表面に穴が形成するように, 多角体蛋白質が溶液中へ溶出されることが考えられる.

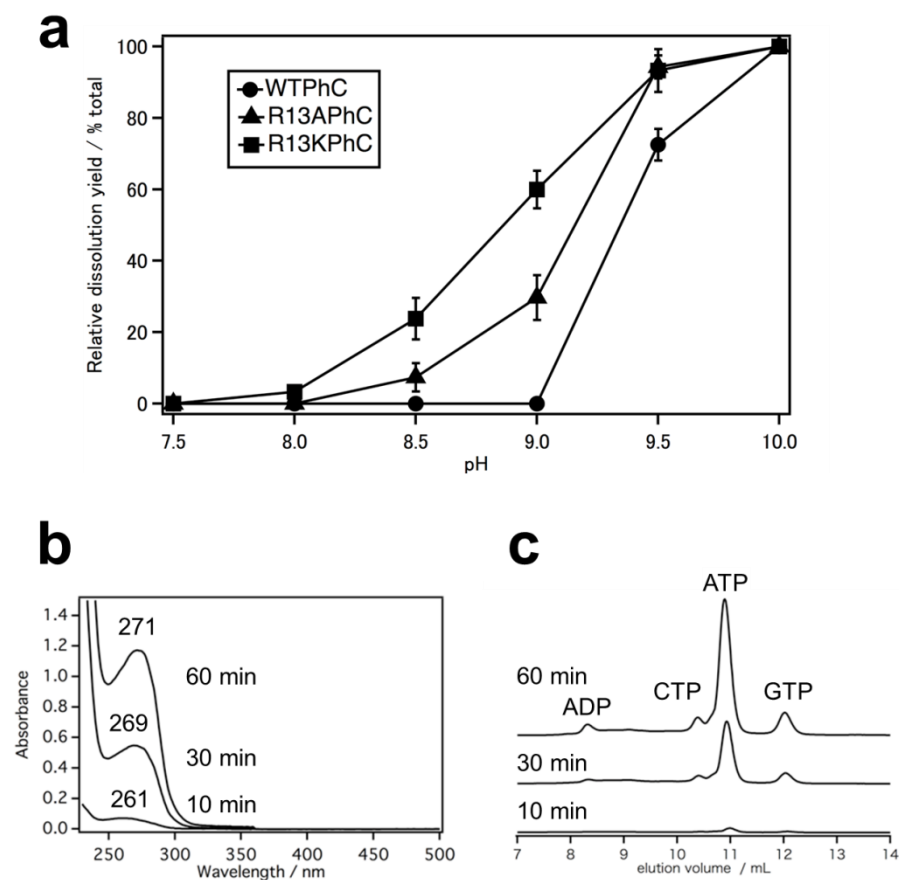


図 2-2. (a) pH に対する多角体結晶の溶解性. 蛋白質の溶解量は, 6×10^6 個の結晶を 100 mM tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) および 100 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 緩衝液 (pH 9.5, 10.0) に 1 時間, 37 °C 浸漬した後に BCA アッセイにより測定した. (b) WTPhC を 100 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 緩衝液 (pH 9.5) へ 10 分, 30 分, 60 分浸漬した後の上澄み溶液の UV スペクトル. (c) WTPhC を 100 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 緩衝液 (pH 9.5) へ 10 分, 30 分, 60 分浸漬した後の上澄み溶液のイオン交換カラムクロマトグラフィー. 260 nm の吸収を追跡している.

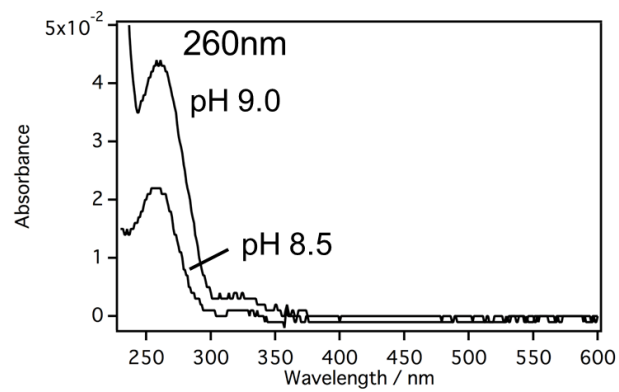


図 2-3. WTPhC を 100 mM tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5, 9.0) に 1 時間浸漬した後の上澄み液の UV スペクトル

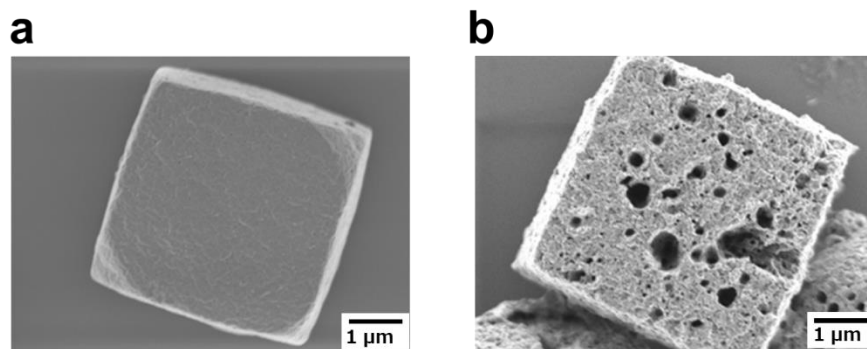


図 2-4. FE-SEM による WTPhC の観察. 0.1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH 9.5) に 1 時間, (a) 浸漬する前の WTPhC と (b) 浸漬後の WTPhC.

変異体設計

WTPhC の結晶構造データ (PDB ID: 2OH6) から、2つの H1 ヘリックスの界面により形成された隙間に ATP と GTP がスタックするように存在している (図 2-5a, 5b). また、ATP, GTP は多角体単量体の N 末端近傍に存在している (図 2-5b). H1 ヘリックスは隣接した単量体分子と強固に相互作用し、多角体結晶の高い安定性に寄与していると考えられる (図 2-5c). すなわち、アミノ酸置換により H1 ヘリックス近傍の蛋白質-蛋白質相互作用が不安定化されると結晶からの ATP 溶出がスムーズになり、WTPhC に比べ、低い pH で溶解可能な変異体結晶が作製できると考えられる. バキュロウイルスが感染した昆虫細胞内の pH は 7 付近で一定であるため、WTPhC は pH 7 付近で結晶化すると考えられる²⁸. 結晶内において隣接した単量体同士は H1 ヘリックスの先端にある Arg13 (R13)を介して、Tyr165 (Y165), Leu233 (L233), 水分子と 4 つの水素結合を形成している (図 2-5c). R13 を Ala (R13A)および Lys (R13K)に置換し、隣接している単量体との水素結合の数を減少させることにより、結晶の安定性を低下させ、WTPhC より低い pH で溶解可能な変異体結晶が作製できると考えられる. 作製した R13A および R13K は昆虫細胞内で結晶化した (R13A の変異体結晶: R13APhC, R13K の変異体結晶: R13KPhC). R13APhC, R13KPhC は pH 8.5, pH 8.0 で溶解し始めることが示された (図 2-2a). R13KPhC は、R13APhC および WTPhC に比べ、ATP の溶出が早いため、低い pH での溶解性が高いと考えられる (図 2-6).

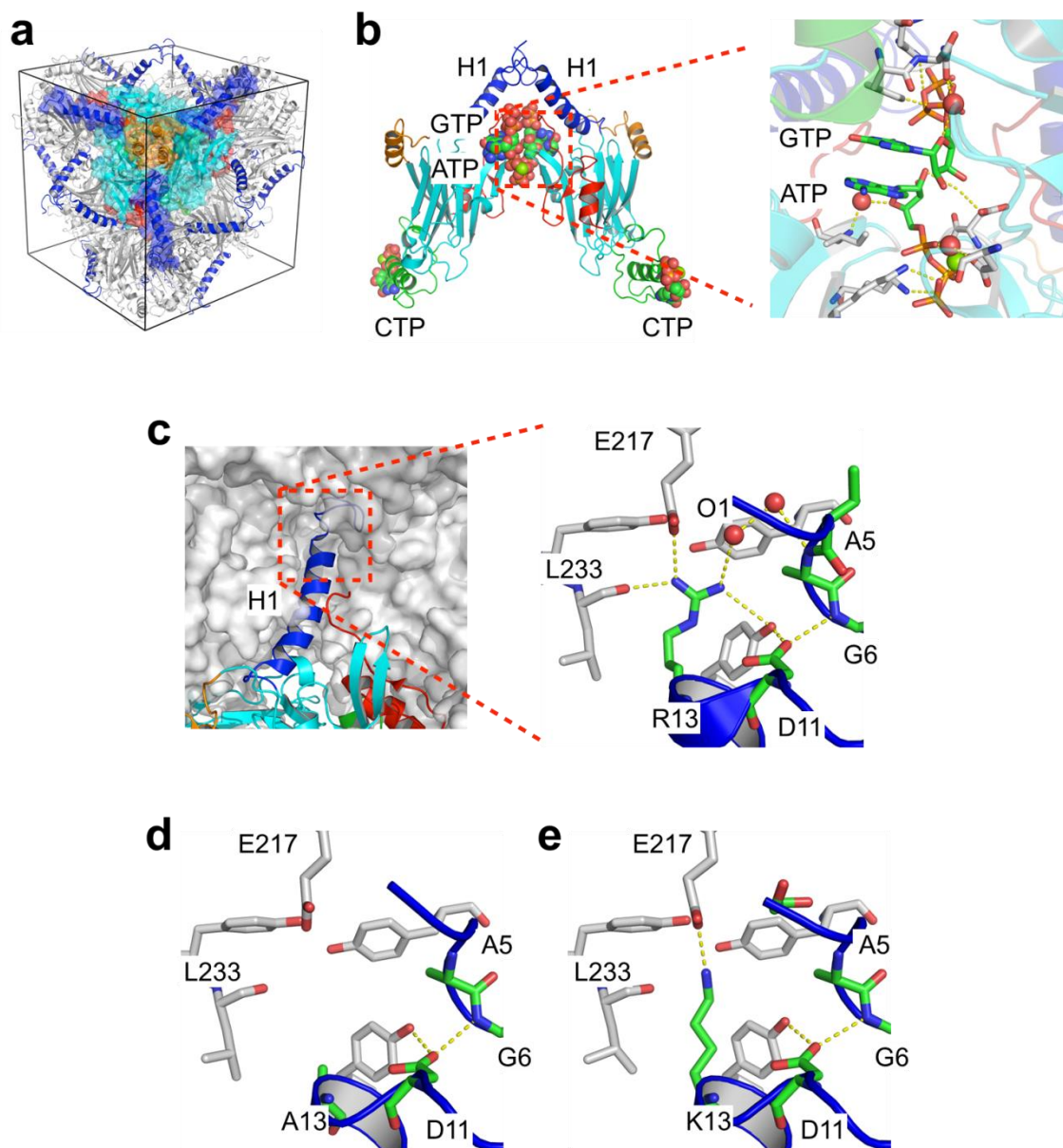


図2-5. WTPhC, R13APhC, R13KPhCの結晶構造. (a) ユニットセル内の三量体の集積パターン (PDB ID: 2OH6). 三量体構造はsphereにより示し, H1ヘリックスは青で示した. (b) WTPhCにおけるATP, GTP, CTPの結合部位 (左) とATP近傍の結合部位の拡大図 (右). (c) 隣接した単量体とH1ヘリックスの相互作用. 水素結合は黄色の点線で示した. (d) R13APhCのA13周辺の構造. (e) R13KPhCのK13周辺の構造. 水素結合は黄色の点線で示した.

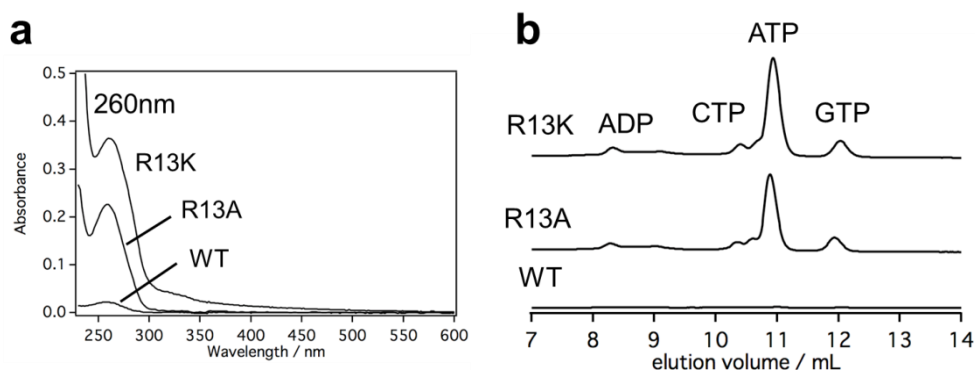


図 2-6. (a) 野生型, R13A, R13K の多角体結晶を 100 mM tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) に 1 時間浸漬した後の上澄み溶液の UV スペクトル. (b) WT, R13A, R13K の多角体結晶を 100 mM tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) に 1 時間浸漬した後の上澄み溶液のイオン交換カラムクロマトグラフィー. 260 nm の吸収を追跡している.

結晶構造解析

変異体結晶 R13A_{PhC}, R13K_{PhC} の変異導入部位の水素結合ネットワークの変化を確認するために, X 線結晶構造解析を行った. R13A_{PhC} は, 1.60 Å, R13K_{PhC} は 2.04 Å の分解能で構造決定ができた (表 2-1, 2-2). R13A_{PhC}, R13K_{PhC} と WT の C α 原子の root-mean-square deviations (RMSD) は 0.1 Å であり, 変異導入による全体構造への影響はほとんどないことが示された. また, R13 を介した水素結合は, R13A_{PhC} ではすべて消失し, R13K_{PhC} では E217 との 1 つ存在していることが示された (図 2-5d, e). R13K_{PhC} では, ATP の存在を確認できる電子密度は観測されなかったことから, H1 ヘリックスの不安定化により, ATP が早く溶出されられると考えられる.

表 2-1. 結晶構造データ

Data collection	R13APhC	R13KPhC
Space group	<i>I</i> 23	<i>I</i> 23
Crystal cell (Å)		
$a = b = c$	103.229	103.381
Resolution range (Å)	40.0–1.60 (1.63–1.60)	40.0–2.04 (2.08–2.04)
Observations	121479	55378
Unique reflections	24339	11308
Completeness (%)	100 (100)	93.3 (97.3)
I/σ	14.2 (2.5)	6.2 (2.2)
R_{meas}	13.2 (60.0)	17.9 (48.0)
Redundancy	5.0 (4.9)	2.8 (2.7)

表 2-2. 結晶構造解析パラメータ

	R13APhC	R13KPhC
Resolution range (Å)	32.6-1.6	36.5-2.04
Reflection used	23019	10749
<i>R</i> -factor (%)	16.0	14.9
Free <i>R</i> -factor (%)	18.9	20.6
R.m.s. deviations from ideal		
Bond length (Å)	0.0083	0.0141
Angle (°)	1.3557	1.6529
Ramachandran plot (%)		
most favored	97.1	97.1
allowed	2.9	2.9

変異体結晶への EGFP の内包

R13APhC, R13KPhC を利用し, 外来蛋白質の内包と pH に対する内包蛋白質の放出量を評価するために, enhanced green fluorescent protein (EGFP) を内包した多角体結晶を作製した. EGFP の N 末端へ多角体単量体に含まれる H1 ヘリックス部位を融合した H1-EGFP を作製し, H1-EGFP と多角体蛋白質を昆虫細胞内で共発現させることにより, 多角体結晶への EGFP の内包を行った (図 2-7a)²⁶. H1 ヘリックスは, WTPPhC の構造データから隣接単量体と強固に相互作用していることから, 結晶へ EGFP を内包するために多角体単量体を認識する部位として機能すると考えられる²⁷. それぞれの結晶への EGFP 内包を確認するために, 得られた結晶を共焦点顕微鏡により観察した. WTPPhC, R13APhC, R13KPhC いずれの結晶にも EGFP が内包されていることを確認した (図 2-7b, c, d). また, H1-EGFP/R13APhC の高さ方向への断面図を共焦点顕微鏡により観察した結果, 結晶内部より結晶表面により EGFP が分布していることが確認できた (図 2-7e).

それぞれの多角体結晶への EGFP の内包量を求めるために, pH 10 での多角体結晶から放出された EGFP による蛍光値を測定した. H1-EGFP/WTPPhC では, $6.7 \pm 0.3 \times 10^6/\text{crystal}$, H1-EGFP/R13APhC では, $6.7 \pm 0.4 \times 10^6/\text{crystal}$, H1-EGFP/R13KPhC では $5.6 \pm 0.3 \times 10^6/\text{crystal}$ 内包されていることが示された. H1-EGFP の内包量は WTPPhC, R13APhC, R13KPhC いずれの結晶においてもほとんど同じであった. 続いて, H1-EGFP 内包多角体結晶の pH に対する EGFP 放出量を蛍光値を測定することにより求めた. 各 H1-EGFP 内包多角体結晶を 37°C, 1 時間, pH 7.5 から pH 10 までの緩衝液に浸漬し, 上澄み溶液の蛍光値を測定し, 結晶からの EGFP 放出量を算出した (図 2-8). H1-EGFP/R13KPhC では, EGFP が pH 8.0 で放出し始め, pH 8.5 ではほとんどすべての内包 EGFP が放出された. H1-EGFP/R13APhC では, pH 8.5 付近から EGFP が放出し始め, H1-EGFP/R13KPhC と同様の放出傾向を示した. EGFP を内包していない単独の R13APhC, R13KPhC の溶解 pH に比べ, 低い pH で EGFP が放出し始めるのは, 結晶へ EGFP が内包することにより結晶構造の一部に欠陥が生じ, 安定性が低下したためであると考えられる. 一方, WTPPhC では, pH 8.5 まで EGFP はほとんど放出されず, pH 9.5 で放出し始める. 以上より, R13APhC および R13KPhC に内包された EGFP は WTPPhC に内包された EGFP では放出できない pH 8.5 でほとんど放出されることが示された.

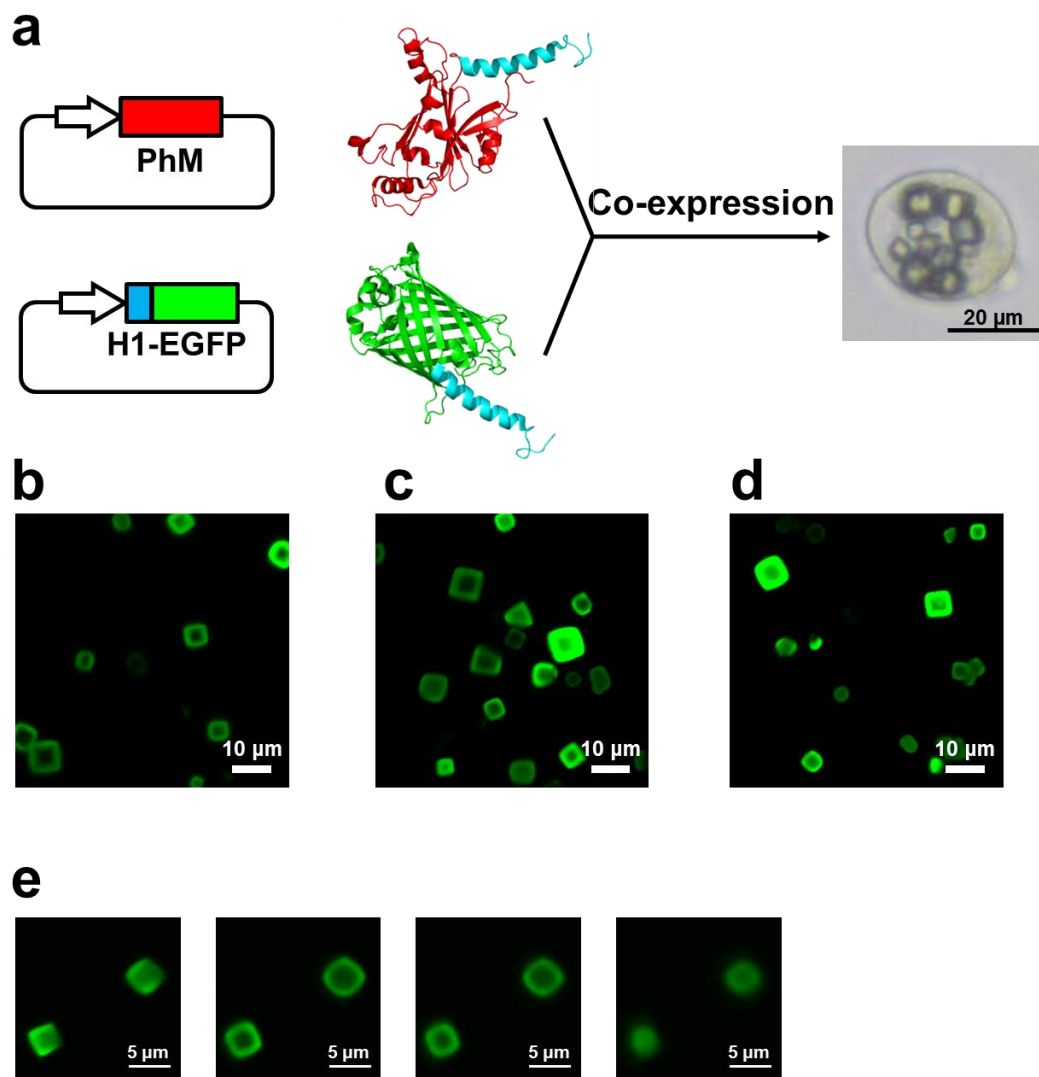


図 2-7. (a) 昆虫細胞による EGFP 内包多角体結晶の作製. (b-e) 共焦点顕微鏡による EGFP 内包多角体結晶の観察図. (b) H1-EGFP/WTPhC (c) H1-EGFP/R13APhC (d) H1-EGFP/R13KPhC (e) H1-EGFP/R13APhC の高さ方向へ $1\ \mu\text{m}$ ごとに観察した図.

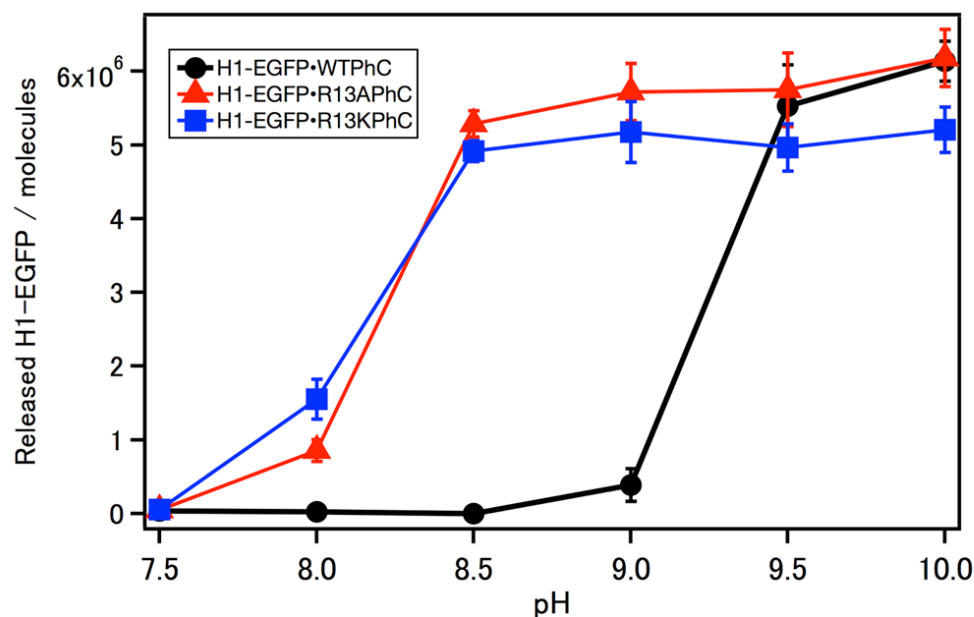


図2-8. pHに対する多角体結晶からのEGFP放出量. 10×10^5 個のEGFP内包多角体結晶を100 mM tris-HCl (pH 7.5, 8.0, 8.5, 9.0), または100 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH 9.5, 10.0) に37°C, 1 時間浸漬した後, 上澄み溶液の蛍光値を測定することにより, EGFP放出量を測定した.

変異体結晶へ内包した PKC の活性評価

多角体結晶へ酵素を内包し, その活性を評価するために, 内包酵素としてリン酸化酵素である PKC βII を利用し, その N 末端へ多角体単量体に含まれる H1 ヘリックス部位を融合した H1-PKC を作製した. H1-PKC と多角体蛋白質を昆虫細胞内で共発現させることにより, 多角体結晶へ PKC を内包させた²⁶. 多角体結晶へ PKC が内包していることを確認するために, SDS-PAGE および Western blotting を行った(図 2-8). また, FE-SEM および X 線結晶構造解析より, H1-PKC/R13APhC は結晶性を維持していることが示され, PKC を内包しても, 結晶の形状や格子定数は変化しないことが確認できた(図 2-9, 表 2-3).

各結晶に対する PKC の内包量を多角体結晶が完全に溶解する pH 11 における H1-PKC の放出量とし, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により求めた.

H1-PKC/WTPhC では、 $0.50 \pm 0.03 \times 10^6/\text{crystal}$, H1-PKC/R13APhC では $2.7 \pm 0.4 \times 10^6/\text{crystal}$, H1-PKC/R13KPhC では、 $1.1 \pm 0.1 \times 10^6/\text{crystal}$ であることが示された。R13APhC では約 5 倍, R13KPhC では約 2 倍, WTPhC より PKC 内包量が多いことを確認した。また, pH 7.5 および pH 8.5 における内包 PKC の放出量を測定するために, PKC を内包した各結晶を 20 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.5, 8.5) に 30°C, 30 分間浸漬し, 上澄み溶液に対し, ELISA を行った (図 2-11a)。pH 7.5 における PKC 放出量は, H1-PKC/WTPhC では $1.7 \pm 0.6 \times 10^3/\text{crystal}$, H1-PKC/R13APhC では $4.0 \pm 1.1 \times 10^3/\text{crystal}$, H1-PKC/R13KPhC では $4.5 \pm 0.3 \times 10^3/\text{crystal}$ であり, 内包量に対しそれぞれ 0.3 %, 0.1 %, 0.4 %であることが示された。以上より, pH 7.5 ではいずれの結晶も低い溶解性であり, PKC がほとんど放出されないことが示された (図 2-2a)。pH 8.5 における PKC 放出量は, H1-PKC/R13APhC では $4.5 \pm 0.4 \times 10^5/\text{crystal}$, H1-PKC/R13KPhC では $4.3 \pm 0.6 \times 10^3/\text{crystal}$ であり, 各結晶の内包量に比べ, それぞれ 17 %, 40 %であることが示された。一方, H1-PKC/WTPhC では pH 8.5 において $4.6 \pm 0.1 \times 10^3/\text{crystal}$ の PKC 放出量であり, pH 8.5 に対する WT の低い溶解性からほとんど内包 PKC は放出されないことが示された (図 2-2a)。以上より, R13APhC, R13KPhC を利用することで pH 8.5 における内包 PKC の放出量が増加し, pH に対する GFP の放出量と同様の放出傾向を示すことが確認できた。

続いて, pH 7.5 および pH 8.5 における PKC の活性評価を行った (図 2-11b)。**H1-PKC/R13A** から放出された H1-PKC の酵素活性は, 単独の PKC に比べ, 0.7 倍であった。これは, N 末端に H1 ヘリックスが融合しているためであると考えられる。pH 7.5 では内包 PKC がほとんど放出されないが, PKC の活性が示された。これより, pH 7.5 における PKC の活性はほとんどが多角体結晶の表面に固定化された PKC に由来する活性であると考えられる。また, pH 8.5 では WTPhC の PKC の活性が pH 7.5 に比べ, 55 %低下していることが示された。これは, pH 8.5 における PKC の活性が, pH 7.5 に比べ, 40 %低下するのと同様に, WTPhC 表面に固定化されている PKC の活性が低下したことが原因であると考えられる。一方, pH 8.5 における H1-PKC/R13APhC および H1-PKC/R13KPhC は, pH 7.5 に比べ, それぞれ 85 %, 96 %活性が維持されることが示された。これは, pH 8.5 における R13APhC および R13KPhC の内包 PKC 放出量が増加することにより, pH 8.5 での PKC 自体の活性低下を相殺したためであると考えられる。最後に, 内包 PKC の乾燥に対する安定性を評価するために, それぞれの H1-PKC 内包多角体結晶を 1 週間, 25°C で乾燥させ, pH 8.5 における PKC の活性評価を行った (図 2-11c)。その結果, WTPhC, R13APhC, R13KPhC では, 乾燥前の活性に比べそれぞれ, 95 %, 53 %, 23 %であることが示された。一方, PKC のみを 1 週間, 25°C で乾燥させた後, pH 8.5 で活性を評価すると, 乾燥保存前に比べ, 2 %以下の活性しか示さなかった。これより, 多角体結晶へ PKC を内包させることで, 乾燥などの過酷な環境に対し活性を維持したまま安定保存できることが示された。

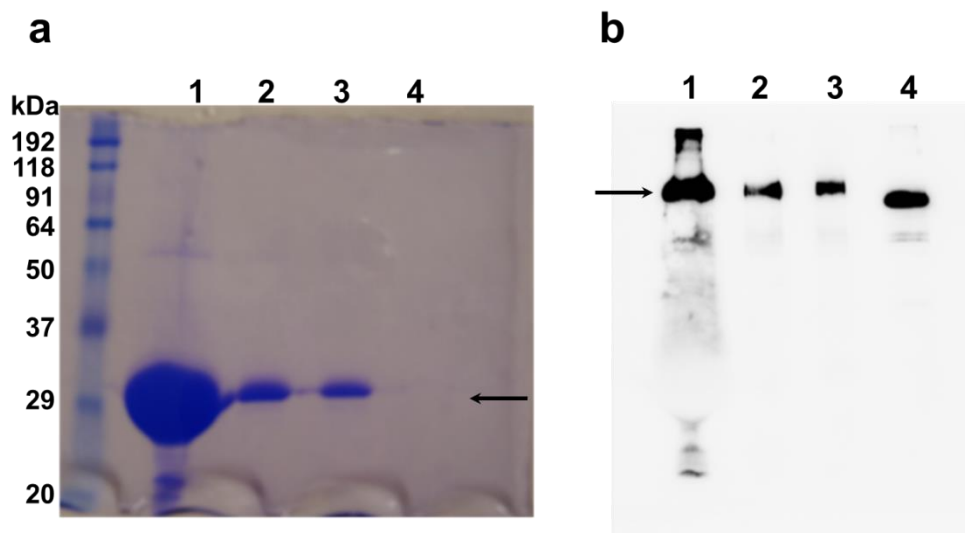


図 2-9. (a) H1-PKC 内包多角体結晶の SDS-PAGE. レーン 1 : H1-PKC/WTPPhC (結晶数 5×10^6 個), レーン 2: H1-PKC/R13APhC (結晶数 5×10^5 個), レーン 3 : H1-PKC/R13KPhC (結晶数 5×10^5 個) 矢印は, 多角体単量体を示している. (b) H1-PKC 内包多角体結晶の Western blotting. レーン 1 : H1-PKC/WTPPhC (結晶数 5×10^6 個), レーン 2: H1-PKC/R13APhC (結晶数 5×10^5 個), レーン 3 : H1-PKC/R13KPhC (結晶数 5×10^5 個) 矢印は H1-PKC を示している.

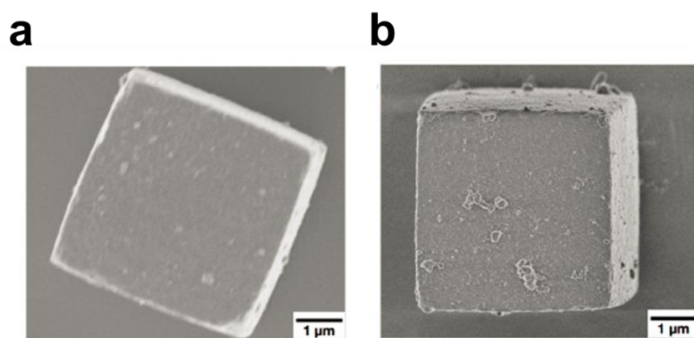


図 2-10. FE-SEM による(a) R13APhC および(b) H1-PKC/R13APhC の観察図.

表 2-3. 結晶構造データ

Data collection	H1-PKC/R13APhC
Space group	<i>I</i> 23
Crystal cell (Å)	
$a = b = c$	103.465
Resolution range (Å)	25.0–1.90 (1.93–1.90)
Observations	65331
Unique reflections	14546
Completeness (%)	99.3 (98.4)
I/σ	8.4 (2.2)
R_{meas}	17.5 (50.8)
Redundancy	4.5 (4.3)

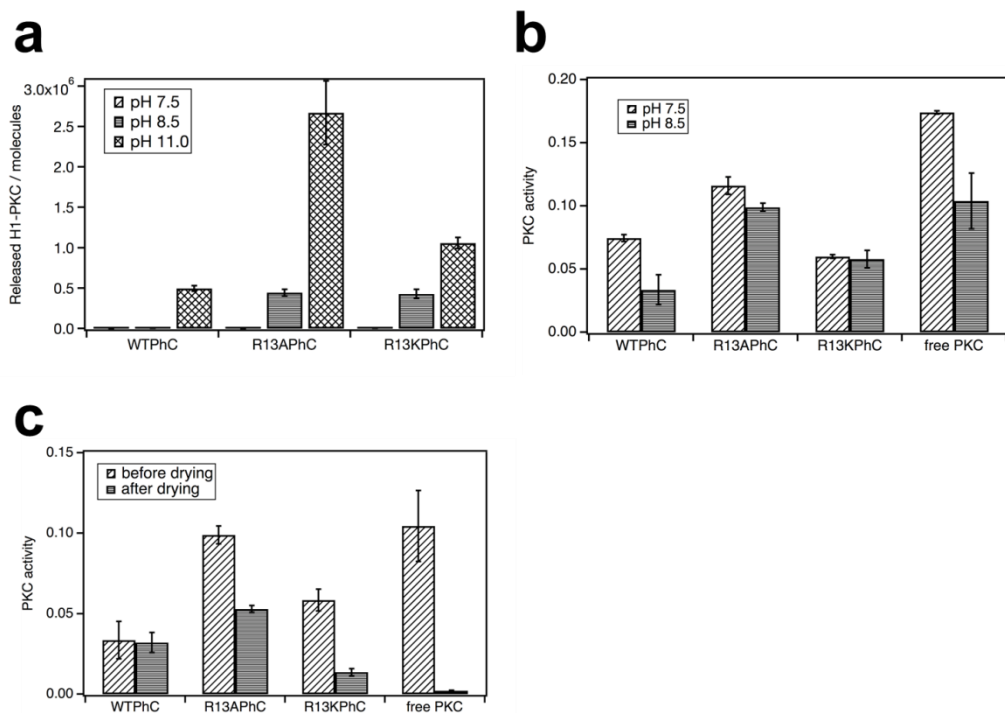


図2-11. (a) ELISAによるpHに対するH1-PKC放出量. 放出したH1-PKC量は, 2.5×10^5 個のH1-PKC内包多角体結晶を20 mM HEPES (pH 7.5, 8.5)緩衝液, または100 mM $\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$ (pH 11.0)に30°C, 30分間浸漬し, 上澄みをELISAにより決定した. (b) H1-PKC/PhCおよびPKCのみの酵素活性. 2.0×10^5 個のH1-PKC内包多角体結晶または32 ngのPKC β IIをPepTag Protein Kinaseアッセイキットを利用し, PKC活性を評価した. 酵素反応は, 20 mM HEPES緩衝液 (pH 7.5, 8.5)中で30°C, 30分間行った. (c) 2.0×10^5 個のH1-PKC内包多角体結晶または32 ngのPKC β IIを1週間, 25°Cで乾燥保存し, 各結晶またはPKC β IIを20 mM HEPES緩衝液 (pH 8.5)中で30°C, 30分間酵素反応を進行させた.

2-3. 結論

結晶構造データを基に適切な部位にアミノ酸置換を行うことで、酵素活性を維持したまま内包酵素を放出できる多角体結晶の細胞内合成を達成した。R13A_{PhC}, R13A_{PhC} は、WTP_{PhC} に比べ低い pH で溶解し、内包 PKC は結晶から放出した後も活性を維持することが示された。また、多角体結晶に内包した PKC は乾燥に対して高い安定性を有し、酵素活性を維持したまま保存できることが示された。本研究を応用し、様々な酵素の安定保存と活性を維持したままの酵素放出を達成できる新たな固体材料の開発が期待できる。

2-4. 実験項

材料

BaculoGold™-linearized baculovirus DNAおよびfetal bovine serum は、BD Biosciences Pharmingen, Life Technologiesからそれぞれ購入した。 *Spodoptera frugiperda* cell line IPLB-Sf21-AE (Sf21) は、10% fetal bovine serum (Gibco), 2.6 mg/mL tryptose broth, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycinを含むGrace培地 (Gibco)を使用し、27°Cで培養した。組換えEGFPおよびPKCは、Biovision, Life Technologiesからそれぞれ購入した。PKCの活性評価のためのPepTag®アッセイキットは、Promegaから購入した。

WTPhC および変異体 PhC の作製

組換え野生型多角体結晶 (*Bombyx mori* CPV polyhedra, WTPhC) のSf21細胞内での発現と精製は、先行研究の手法に従って行った²⁹。 **R13APhC**, **R13KPhC**のプラスミドは、Quick change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)により作製した。また、Sf21細胞内での**R13APhC**, **R13KPhC**の発現と精製は、WTPhCと同様の手法で行った²⁹。

多角体結晶の溶解性評価

pHに対する多角体結晶の相対的な溶解量は、pH 10の緩衝液における溶解した蛋白質量を基に算出した。 0.6×10^6 個の各PhCをそれぞれの緩衝液 (pH 7.5, 8.0, 8.5, 9.0は100 mM Tris/HCl緩衝液, pH 9.5, pH 10は100 mM NaHCO₃/Na₂CO₃緩衝液を使用) に37°C, 1時間浸漬し、上澄み液に含まれる溶解蛋白質量をBCAアッセイにより求めた (検量線はウシ血清由来アルブミンにより作成した。)。

電界放出形走査電子顕微鏡 (Field-Emission Scanning Electron Microscopy: FE-SEM)

WTPhCおよびpH 9.5の100 mM Na₂CO₃/NaHCO₃緩衝液に1時間浸漬したWTPhCをそれぞれH₂Oで洗浄し、ガラス板上で乾燥させた。 WTPhCおよび**R13APhC**はオスミウムプラズマコーター (Filgen, OPC60A), **H1-PKC/R13APhC**はプラチナコーター (Hitachi, MC1000) でそれぞれ処理し、JEOL JSM 75FCT FE-SEMで観察した。

結晶構造解析

測定を行う前に、**R13APhC**, **R13KPhC**を50 % (w/w)エチレングリコール含有緩衝液に浸漬し、MicroMesh上へ結晶を分散させた。続いて、サンプルを液体窒素により凍結した。各結晶のX線回折データは、1.00 Åの波長でSPring-8のBL32XUにて100 Kで集められた。また、データ処理はHKL2000で行った。結晶格子定数やX線回折データ収集の統計値は表2-1に示した。初めに、多角体結晶構造 (PDB ID: 2OH6) を基にMOLREPにより分子置換した。続いて、CCP4のREFMAC5³⁰により**R13APhC**は分解能1.60 Å,

R13KPhCは分解能2.04 Åでそれぞれ構造を精密化した。COOT³¹を基に(2*Fo*-*Fc*)および(*Fo*-*Fc*)電子密度マップを作成した。各構造モデルは、構造解析を行うそれぞれの段階でオミットマップおよびRAMPAGE³²により妥当であることを確認している。結晶構造解析の統計値は表2-2に示した。

Accession Codes : R13APhC, R13KPhCの結晶構造は、Protein Data Bankに登録され、IDは、それぞれ5AXU, 5AXVである。

H1-EGFP/PhC および H1-PKC/PhC の作製

H1-EGFP/PhCは先行研究と同様の方法で作製した²⁶。H1タグを融合したH1-PKCがコードされたトランスファーベクターは、GATEWAYクローニング技術により作製した(H1-EGFPと同様の手法²⁶)。初めに、Human PKC β IIのcDNA配列をattL1とattL2配列の間に挿入したエントリーベクターを作製した(pENT-H1-PKC)。pENT-H1-PKCの開始コドンは削除した。H1-PKCのトランスファーベクター(pTrans-H1-PKC)を作製するために、エントリーベクターのPKC配列を酵素を利用したLRクロナーゼ反応によりデステイナーベクター(pDEST-N-H1)へ導入した。作製したトランスファーベクターは、baculogold baculovirus DNAとSf21細胞へ共感染させた。27°Cで培養後、Sf21細胞内で産生されたH1-PKC組換えバキュロウイルスを含んだ上澄み液を回収し、多角体蛋白質(WTPhM, **R13APhM**, **R13KPhM**)を発現するバキュロウイルスとSf21細胞へ共感染させ、27°C, 7日間培養した。**H1-PKC/PhC**はPhCと同様の方法で精製した²⁶。結晶1個あたりの内包H1-EGFPは、**H1-EGFP/PhC**をpH 10の緩衝液に37°C, 1時間浸漬し、結晶溶解後の上澄み液の蛍光値より算出した。また、結晶1個あたりの内包H1-PKCは、**H1-PKC/PhC**をpH 11の緩衝液に30分浸漬し、結晶溶解後の上澄み液のELISAにより算出した。

多角体結晶からのH1-EGFPの放出量

H1-EGFP/PhCからのH1-EGFP放出量は、 1.0×10^6 個の各結晶を100 mM Tris/HCl緩衝液(pH 7.5, 8.0, 8.5, 9.0), または、100 mM NaHCO₃/Na₂CO₃緩衝液(pH 9.5, pH 10.0)に37°C, 1時間浸漬し、上澄み液の蛍光値より算出した。蛍光測定は、96ウェルプレートを利用し、励起波長490 nm, 測定波長570 nmに設定し、GloMax-Multi+ Microplate Multimode Reader (Promega)により行った。

多角体結晶からのH1-PKCの放出量

H1-PKC/PhCからのH1-PKC放出量は、 2.5×10^5 個の各結晶を20 mM HEPES緩衝液(pH 7.5, 8.5)に30°C, 30分浸漬し、上澄み液のELISAにより算出した。

H1-PKC/PhCの酵素活性評価

H1-PKC/PhCのPKC活性はPepTag®アッセイキットを利用し、評価した。基質の

PepTag C1蛍光ペプチドを反応溶液中（20 mM HEPES緩衝液，pH 7.5またはpH 8.5，1.3 mM CaCl_2 ，1 mM DTT，10 mM MgCl_2 ，1 mM ATP）で，200 $\mu\text{g/mL}$ ホスフォチジルセリンと混合し，そこへ**H1-PKC/PhC**を加え，30°C，30分間酵素反応を進行させた．反応を終了させるために，サンプルを100°Cで10分間熱処理した．その後，50 mM Tris/HCl緩衝液（pH 8.0）で作製した0.8 %アガロースゲルを用いて，C1蛍光ペプチドを100 V，20分間電気泳動した．リン酸化ペプチドはアノード側 (+)に，リン酸化されていないペプチドはカソード側 (-)にそれぞれ移動した．リン酸化されたペプチドのバンドをUVで確認しながら，ゲルから切り出し，95°Cで切り出したゲルを溶解した．過熱により溶解したゲルへPepTag®アッセイキットのgel soluble solution，酢酸， H_2O を加え，溶液状態のままC1ペプチドの蛍光値を測定した．蛍光測定は，励起波長525 nm，測定波長580 nmおよび640 nmに設定し，GloMax-Multi + Microplate Multimode Reader (Promega)により行った．

H1-PKC と組換え PKC の活性の比較

5.0×10^5 個の**H1-PKC/R13APhC**を20 mM HEPES緩衝液（pH 8.5）に30 °C，30分間浸漬し，H1-PKCを結晶から放出させた．放出されたH1-PKCは遠心により結晶から分離し，ELISAによりH1-PKC量を算出した．その後，放出されたH1-PKC（3.6 ng）と組換えPKC（5 ngおよび10 ng）の酵素活性評価をし，1 ngあたりの活性を比較した．

2-5. 参考文献

1. Sheldon, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1289-1307 (2007).
2. Cardinale, D., Carette, N. & Michon, T. Virus scaffolds as enzyme nano-carriers. *Trends Biotechnol.* **30**, 369-376 (2012).
3. Tran, D. N. & Balkus, K. J. Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. *ACS Catal.* **1**, 956-968 (2011).
4. Luckarift, H. R., Spain, J. C., Naik, R. R. & Stone, M. O. Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nat. Biotechnol.* **22**, 211-213 (2004).
5. Hudson, S., Cooney, J. & Magner, E. Proteins in mesoporous silicates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 8582-8594 (2008).
6. Moll, D., Huber, C., Schlegel, B., Pum, D., Sleytr, U. B. & Sara, M. S-layer-streptavidin fusion proteins as template for nanopatterned molecular arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 14646-14651 (2002).
7. Roessler, U., Nahalka, J. & Nidetzky, B. Carrier-free immobilized enzymes for biocatalysis. *Biotechnol. Lett.* **32**, 341-350 (2010).
8. Caruso, F., Trau, D., Mohwald, H. & Renneberg, R. Enzyme encapsulation in layer-by-layer engineered polymer multilayer capsules. *Langmuir* **16**, 1485-1488 (2000).
9. Tanaka, S., Sawaya, M. R. & Yeates, T. O. Structure and mechanisms of a protein-based organelle in Escherichia coli. *Science* **327**, 81-84 (2010).
10. Comellas-Aragones, M., Engelkamp, H., Claessen, V. I., Sommerdijk, N., Rowan, A. E., Christianen, P. C. M., Maan, J. C., Verduin, B. J. M., Cornelissen, J. & Nolte, R. J. M. A virus-based single-enzyme nanoreactor. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 635-639 (2007).
11. Carette, N., Engelkamp, H., Akpa, E., Pierre, S. J., Cameron, N. R., Christianen, P. C. M., Maan, J. C., Thies, J. C., Weberskirch, R., Rowan, A. E., Nolte, R. J. M., Michon, T. & Van Hest, J. C. M. A virus-based biocatalyst. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 226-229 (2007).
12. Fiedler, J. D., Brown, S. D., Lau, J. L. & Finn, M. G. RNA-Directed Packaging of Enzymes within Virus-like Particles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 9648-9651 (2010).
13. Worsdorfer, B., Woycechowsky, K. J. & Hilvert, D. Directed evolution of a protein container. *Science* **331**, 589-592 (2011).
14. Glasgow, J. E., Capehart, S. L., Francis, M. B. & Tullman-Ercek, D. Osmolyte-Mediated Encapsulation of Proteins inside MS2 Viral Capsids. *ACS Nano*. **6**, 8658-8664 (2012).
15. Minten, I. J., Claessen, V. I., Blank, K., Rowan, A. E., Nolte, R. J. M. & Cornelissen, J. J. L. M. Catalytic capsids: the art of confinement. *Chem. Sci.* **2**, 358-362 (2011).
16. O'Neil, A., Reichhardt, C., Johnson, B., Prevelige, P. E. & Douglas, T. Genetically programmed in vivo packaging of protein cargo and its controlled release from

- bacteriophage P22. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 7425-7428 (2011).
17. Brodin, J. D., Ambroggio, X. I., Tang, C., Parent, K. N., Baker, T. S. & Tezcan, F. A. Metal-directed, chemically tunable assembly of one-, two- and three-dimensional crystalline protein arrays. *Nat. Chem.* **4**, 375-382 (2012).
 18. Sinclair, J. C., Davies, K. M., Venien-Bryan, C. & Noble, M. E. Generation of protein lattices by fusing proteins with matching rotational symmetry. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 558-562 (2011).
 19. Wei, H., Wang, Z. D., Zhang, J., House, S., Gao, Y. G., Yang, L. M., Robinson, H., Tan, L. H., Xing, H., Hou, C. J., Robertson, I. M., Zuo, J. M. & Lu, Y. Time-dependent, protein-directed growth of gold nanoparticles within a single crystal of lysozyme. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 93-97 (2011).
 20. Ueno, T. Porous Protein Crystals as Reaction Vessels. *Chem. Eur. J.* **19**, 9096-9102 (2013).
 21. Doye, J. P. K. & Poon, W. C. K. Protein crystallization in vivo. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **11**, 40-46 (2006).
 22. Redecke, L., Nass, K., DePonte, D. P., White, T. A., Rehders, D., Barty, A., Stellato, F., Liang, M. N., Barends, T. R. M., Boutet, S., Williams, G. J., Messerschmidt, M., Seibert, M. M., Aquila, A., Arnlund, D., Bajt, S., Barth, T., Bogan, M. J., Caleman, C., Chao, T. C., Doak, R. B., Fleckenstein, H., Frank, M., Fromme, R., Galli, L., Grotjohann, I., Hunter, M. S., Johansson, L. C., Kassemeyer, S., Katona, G., Kirian, R. A., Koopmann, R., Kupitz, C., Lomb, L., Martin, A. V., Mogk, S., Neutze, R., Shoeman, R. L., Steinbrener, J., Timneanu, N., Wang, D. J., Weierstall, U., Zatsepin, N. A., Spence, J. C. H., Fromme, P., Schlichting, I., Duszynko, M., Betzel, C. & Chapman, H. N. Natively Inhibited Trypanosoma brucei Cathepsin B Structure Determined by Using an X-ray Laser. *Science* **339**, 227-230 (2013).
 23. Matsumoto, G., Ueda, T., Shimoyama, J., Ijiri, H., Omi, Y., Yube, H., Sugita, Y., Kubo, K., Maeda, H., Kinoshita, Y., Arias, D. G., Shimabukuro, J., Kotani, E., Kawamata, S. & Mori, H. Bone regeneration by polyhedral microcrystals from silkworm virus. *Sci. Rep.* **2** (2012).
 24. Chen, J., Sun, J., Atanasov, I., Ryazantsev, S. & Zhou, Z. H. Electron tomography reveals polyhedrin binding and existence of both empty and full cytoplasmic polyhedrosis virus particles inside infectious polyhedra. *J. Virol.* **85**, 6077-6081 (2011).
 25. Rohrmann, G. F. POLYHEDRIN STRUCTURE. *J. Gen. Virol.* **67**, 1499-1513 (1986).
 26. Ijiri, H., Coulibaly, F., Nishimura, G., Nakai, D., Chiu, E., Takenaka, C., Ikeda, K., Nakazawa, H., Hamada, N., Kotani, E., Metcalf, P., Kawamata, S. & Mori, H. Structure-based targeting of bioactive proteins into cypovirus polyhedra and application to immobilized cytokines for mammalian cell culture. *Biomaterials* **30**, 4297-4308 (2009).
 27. Coulibaly, F., Chiu, E., Ikeda, K., Gutmann, S., Haebel, P. W., Schulze-Briesse, C., Mori, H. & Metcalf, P. The molecular organization of cypovirus polyhedra. *Nature* **446**, 97-101

(2007).

28. Medina, M., Lopezrivas, A., Zuidema, D., Belsham, G. J., Domingo, E. & Vlak, J. M. STRONG BUFFERING CAPACITY OF INSECT CELLS - IMPLICATIONS FOR THE BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM. *Cytotechnology* **17**, 21-26 (1995).
29. Mori, H., Ito, R., Nakazawa, H., Sumida, M., Matsubara, F. & Minobe, Y. EXPRESSION OF BOMBYX-MORI CYTOPLASMIC POLYHEDROSIS-VIRUS POLYHEDRIN IN INSECT CELLS BY USING A BACULOVIRUS EXPRESSION VECTOR, AND ITS ASSEMBLY INTO POLYHEDRA. *J. Gen. Virol.* **74**, 99-102 (1993).
30. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240-255 (1997).
31. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126-2132 (2004).
32. Lovell, S. C., Davis, I. W., Adrendall, W. B., de Bakker, P. I. W., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and C beta deviation. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **50**, 437-450 (2003).

第三章

多角体結晶を利用した超分子かご型構造体の構築

要旨

蛋白質結晶は蛋白質分子が規則正しく配列することにより形成され、結晶内には特異な超分子構造体が存在する。本研究では、結晶内の特異な超分子構造に着目し、多角体結晶を利用し、結晶内かご型構造の構築を試みた。多角体結晶内の超分子かご型構造体は、架橋化により安定化され、結晶溶解により溶液中へ切り出される。また、多角体結晶の安定性を利用し、乾燥後の結晶からも特異なかご型構造体の構築が可能であることが示された。

3-1. 緒言

近年, 蛋白質超分子構造体はバイオナノテクノロジーや材料科学などの分野において, 注目されている^{1,2}. かご型構造, リング構造, チューブ構造, テトラヘドラル構造, 二次元結晶構造などに代表される蛋白質超分子構造体は, 蛋白質分子界面の設計により構築可能となった³⁻¹⁴. 例えば, 金属配位結合やジスルフィド結合を分子界面に導入することにより人工的に蛋白質構造体の構築が報告されている^{6-11,13}. これら新たな蛋白質超分子構造体は, 生体触媒, ドラッグデリバリーシステム, イメージング材料などへの応用が期待されている¹⁵⁻¹⁷. しかし, 蛋白質超分子構造体を構築するにあたり, 蛋白質分子の柔軟さや分子表面の複雑さが原因で分子同士がランダムに会合した凝集体が形成されやすく, 目的の超分子構造体を均一かつ効率的に構築することは依然として困難である¹. 一方, 蛋白質結晶は蛋白質分子が規則正しく配列した集積構造体であり, その内部には特有な超分子構造体を有する. これらの構造体は結晶内で安定に存在するものの, 結晶化条件以外の環境下では崩壊してしまう¹⁸. 本研究では, 結晶内の超分子構造体を結晶内の蛋白質分子界面を設計することにより, 結晶溶解後も保持させ, 蛋白質集合体の新たな構築手法を確立する.

近年, 分子設計による新たな蛋白質結晶が創製され, 機能性バイオ材料としての応用が期待されている¹⁹⁻²⁴. 蛋白質結晶内には, アミノ酸残基の繰り返し配列により化学的および物理的に特有なナノ空間が存在し, 金属微粒子の合成, 不斉触媒反応, 電子伝達反応などに利用されてきた²⁵⁻²⁸. それらの特有な構造体は, 結晶化条件により形成され, 結晶内で安定に保持されているため, 通常, 溶液中では構築されない²⁹. 我々は, 結晶内特有な超分子構造体を溶液中で保持し, 新たな蛋白質集合体として利用するために, 多角体と呼ばれる蛋白質結晶に着目した. 多角体結晶 (Polyhedra crystal: PhC) は細胞内で結晶化する *in vivo* 蛋白質結晶の一つであり, 様々な環境下において結晶構造を維持する高い安定性を有することが知られている³⁰. 本研究では, 蛋白質超分子構造の新たな構築手法の確立を目指し, 結晶内の単量体同士を架橋後, 結晶を溶解し, 多角体結晶内の超分子かご型構造体を溶液中へ切り出すことを試みた (図 3-1a).

多角体結晶は, 細胞質多角体病ウイルス (cytoplasmic polyhedrosis virus, CPV) が昆虫細胞へ感染することにより, 多角体単量体 (Polyhedrin monomer: PhM) が細胞内で結晶化し, 形成される³¹. 多角体結晶は, 尿素, 酸, 変性剤などの過酷な環境下においても結晶構造を維持する高い安定性を有するものの, pH 10 の塩基性条件で結晶は容易に溶解する^{30,32}. これらの多角体結晶の高い安定性を利用し, 活性を維持したまま酵素の長期保存が達成された (第二章)³³. 結晶構造データから, 多角体結晶は, 三量体がビルディングブロックとし, 規則正しく集積することにより形成されている (図 3-1b). 三量体構造の中心には, 直径 1.5 nm の空間が存在し, かご型構造を形成している (図 3-1c)

³⁰. 三量体構造は, 多角体結晶が溶解すると単量体同士の相互作用が消失し, 単量体へと解離する. そこで, 結晶内特異な三量体構造を溶液中でも安定に保持するために, 単

量体同士をジスルフィド結合により架橋化することを試みた。ジスルフィド結合は、結晶内の分子界面を安定化するために天然の蛋白質結晶で利用されており、ジスルフィド結合を多角体結晶内の分子界面へ導入することにより三量体構造の安定化が期待できる^{34,35}。そこで、多角体結晶から超分子かご型構造体を構築するために、(1) 単量体同士をジスルフィド結合で架橋化する Cys を分子界面へ導入し、(2) 結晶を酸化することによる結晶内ジスルフィド結合の形成、(3) 結晶溶解により、三量体からなる超分子かご型構造体を溶液中へ切り出すことを試みた (図 3-1a)。結晶内特異なかご型構造は、結晶を酸化後、溶解したときのみ形成され、溶液中の多角体単量体を酸化しても形成されないことが示された。また、多角体結晶の乾燥に対する高い安定性を利用し、4 日間乾燥させた結晶から超分子かご型構造体の切り出しを達成した。本手法により、蛋白質結晶内の様々な超分子構造体の構築が可能となり、結晶を利用したリング構造、チューブ構造、2 次元シート構造などの構築へ応用されることが期待できる。

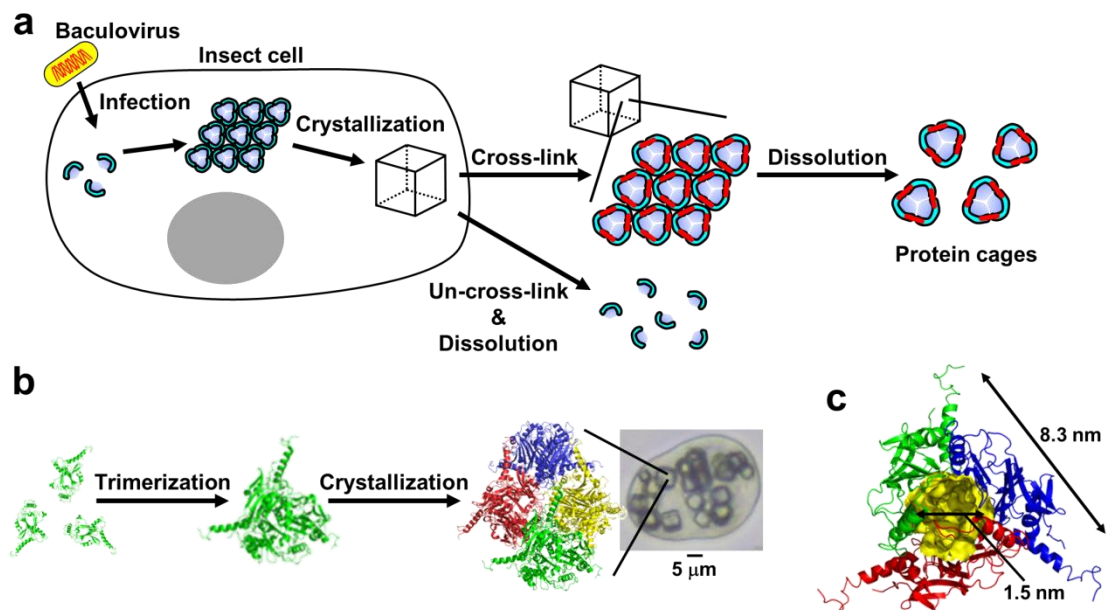


図 3-1. (a) 昆虫細胞内による多角体結晶の形成と結晶の架橋化および溶解による超分子かご型構造体の構築. (b) 細胞内における単量体の結晶化. 三量体が 8 つ集まった 24 量体をユニットセルとし, 結晶化が進行する. (c) 中央に 1.5 nm の細孔を有する蛋白質かご型構造体.

3-2. 結果と考察

変異体設計

野生型の多角体結晶内には特異な三量体構造があり、直径 1.5 nm の空間を有するかご型構造を形成している (図 3-1c). Arg13 を Ala に置換した R13A 変異体結晶は、結晶の安定性に重要な役割を担う R13 と隣接単量体との水素結合を切断することにより、野生型多角体結晶に比べ、低い pH で溶解する³³. そこで、R13A をテンプレートとし、結晶内の分子界面へ Cys を導入した変異体結晶を作製した. 結晶内の三量体構造を形成する単量体同士を共有結合で安定化することにより、結晶溶解後に溶液中で三量体構造が保持できると考えられる. 本研究では、分子界面に導入した Cys によるジスルフィド結合で単量体間を架橋化する変異体を作製した. ジスルフィド結合が形成可能な Cα-Cα間 (2.5 Å-7.5 Å) を結晶構造から探索すると、E73_a-Y83_b (Cα-Cα間距離: 6.4 Å) および S193_a-A194_b (Cα-Cα間距離: 5.1 Å) の 2 か所が存在することが分かった (図 3-4a)³⁶. そこで、3 つの変異体 R13A/E73C/Y83C/S193C/A194C (**1-PhM**), R13A/E73C/Y83C (**2-PhM**), R13A/S193C/A194C (**3-PhM**) を作製し、すべての変異体が結晶化することを確認した (図 3-2). また、MALDI-TOF MS により 3 種類の結晶はそれぞれ **1-**, **2-**, **3-PhM** の分子量と良い一致を示すピークが得られた (図 3-3a~3c).

結晶構造解析

変異体結晶内におけるジスルフィド結合の形成を確認するために、X 線結晶構造解析を行い、**1-**, **2-**, **3-PhC** の結晶構造を 1.72, 1.70, 1.79 Å の分解能で決定した (図 3-4, 表 3-1, 3-2). これらの構造は野生型多角体と同じ *I23* の空間群を有する. また、**1-**, **2-**, **3-PhM** と R13A 変異体の Cα原子の root-mean-square deviations (RMSD) は、0.11, 0.13, 0.11 Å であり、分子界面への Cys 導入による全体構造へ影響はほとんどないことが示された. **1-PhC** および **2-PhC** の C73_a-C83_b の Cα間は 6.5 Å である (図 3-4b, 3-4f). また、**1-PhC** および **3-PhC** の C193_a-C194_b の Cα間はそれぞれ 5.5 Å, 5.3 Å であり (図 3-4d, 3-4h), ジスルフィド結合形成可能な距離である³⁶. **1-PhC** および **2-PhC** の C83 はダブルコンフォメーションを形成し、一部は C73 とジスルフィド結合形成が確認された (図 3-4b, 3-4f). また、C73 周辺のループ構造は *B-factor* が高く、柔軟性の高い構造であるため、結晶構造が決定できるほどの電子密度が確認できなかった (図 3-5).

次に、多角体結晶を酸化し、結晶内ジスルフィド結合を形成するために、それぞれの結晶 (6 × 10⁷ 個) を 100 mM H₂O₂ 溶液 (milliQ により希釈, pH 6.8) に 12 時間、37 °C 浸漬した. 酸化後の **1-**, **2-**, **3-PhC** (以降、**ox1-**, **ox2-**, **ox3-PhC** と表記) の結晶構造は、1.65, 1.67, 1.85 Å の分解能で決定された (図 3-4, 表 3-1, 3-2). 酸化後の結晶は野生型結晶および酸化前の変異体結晶と同じ空間群を示し、**ox1-**, **ox2-**, **ox3-PhM** と **1-**, **2-**, **3-PhM** の Cα原子の RMSD はそれぞれ 0.07, 0.06, 0.08 Å であった. これより、結

晶の酸化過程は、全体の結晶構造にほとんど影響を与えないことが示された。酸化による C73 および C83 への構造変化はほとんど見られず、C73_a-C83_b の一部はジスルフィド結合を形成していることが示された (図 3-4c, 3-4g)。ox1-PhC での C193_a と C194_b はジスルフィド結合を形成し、S 原子間の距離は 2.0 Å であった (図 3-4e)。これより、酸化により C193_a と C194_b の構造は大きく変化し、ジスルフィド結合が形成されることが確認できた。Ox3-PhC においても、ox1-PhC と同様に酸化前に比べ、C193_a と C194_b の構造が大きく変化し、S 原子間距離 1.9 Å でジスルフィド結合が形成していることが示された (図 3-4i)。

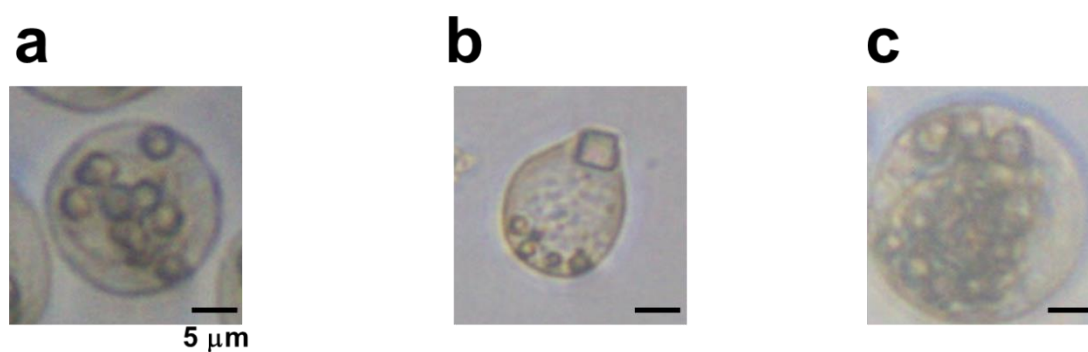


図 3-2. Sf21 細胞へウイルスを感染し、27°C、7 日間培養後の (a) 1-PhC, (b) 2-PhC, (c) 3-PhC の顕微鏡による観察。

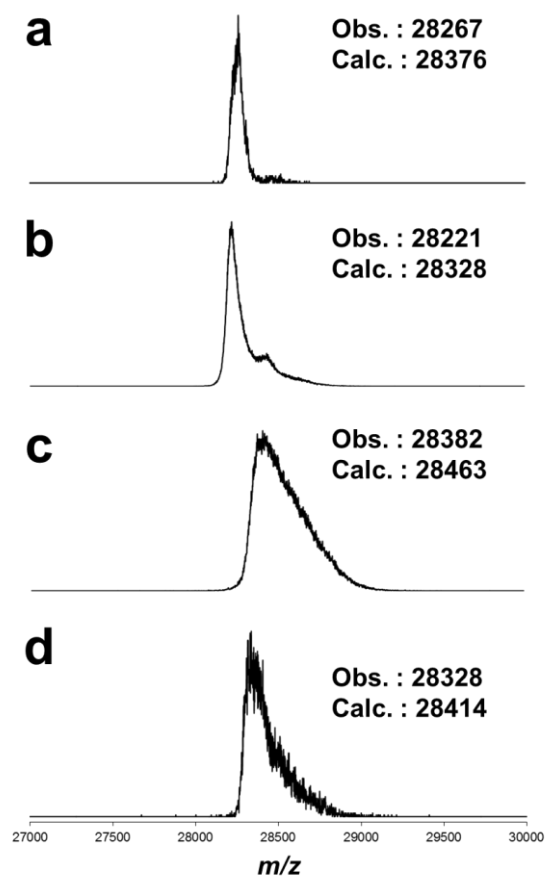


図 3-3. (a) 1-PhC, (b) 2-PhC, (c) 3-PhC および(d) R13APhC の MALDI-TOF MS. 各結晶と飽和シナピン酸溶液 (TA 溶液 : water : acetonitrile = 1 : 1, 0.1 wt% トリフルオロ酢酸含有を利用) を 1 : 6 で混合し, 測定した.

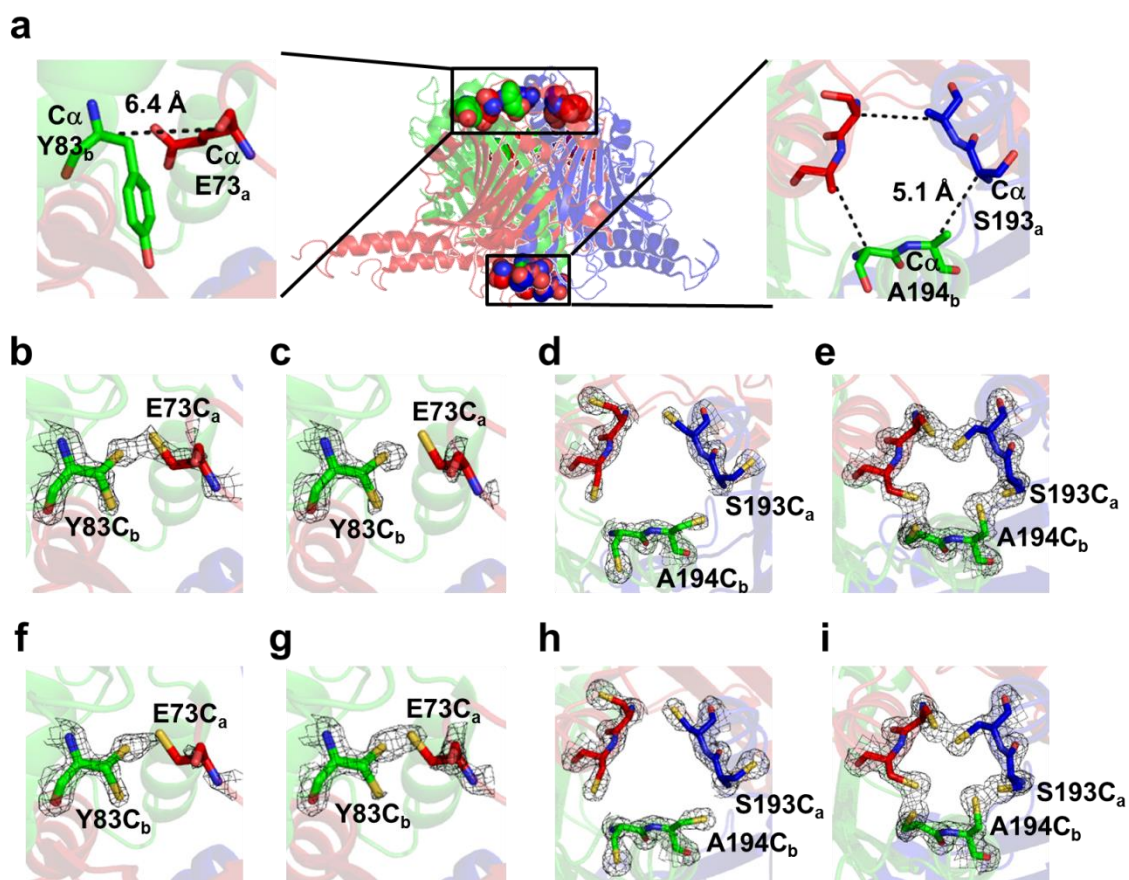


図 3-4. 変異体の結晶構造. (a) R13A 結晶構造内の Cys 導入部位 (E73/Y83, S193/A194) と E73/Y83 (左) および S193/A194 (右) の周辺部位. Sphere はかご型構造内の Cys 導入部位を示している (真ん中). (b, d) 1-PhC 内および (c, e) ox1-PhC 内の E73C-Y83C および S193C-A194C の周辺構造. (f) 2-PhC 内 および (g) ox2-PhC 内の E73C-Y83C の周辺構造. (h) 3-PhC 内および (i) ox3-PhC 内の S193C-A194C の周辺構造. 1.0σ における $2|F_o| - |F_c|$ 電子密度はグレーで表示している.

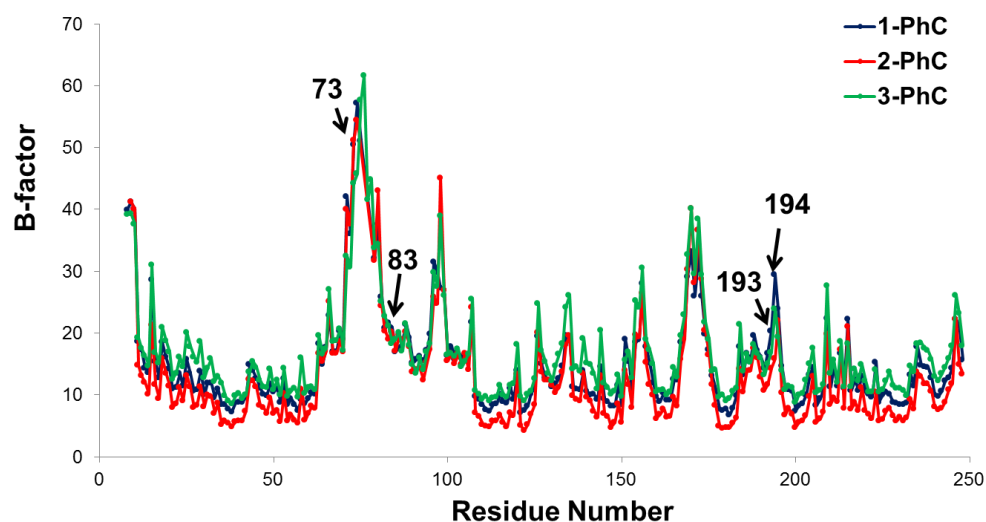


図 3-5. 1-PhC, 2-PhC, 3-PhC 主鎖の B-factor

表 3-1. 結晶構造データ

Data collection	1-PhC	2-PhC	3-PhC	ox1-PhC	ox2-PhC	ox3-PhC
No. collected datasets	32	127	49	78	323	29
No. of merged datasets	9	51	30	13	119	17
Space group	<i>I</i> 23	<i>I</i> 23	<i>I</i> 23	<i>I</i> 23	<i>I</i> 23	<i>I</i> 23
Crystal cell (Å)						
$a = b = c$	103.6	103.7	103.7	103.7	103.7	103.6
Resolution range (Å)	50.0–1.72 (1.82–1.72)	50.0–1.70 (1.80–1.70)	50.0–1.79 (1.90–1.79)	50.0–1.65 (1.75–1.65)	50.0–1.67 (1.77–1.67)	50.0–1.85 (1.96–1.85)
Completeness (%)	98.5 (99.2)	100.0 (100)	100.0 (100)	99.7 (99.8)	100.0 (100)	99.9 (99.8)
Multiplicity	4.9 (4.9)	27.3 (18.8)	21.1 (20.4)	7.0 (7.1)	60.5 (36.5)	9.0 (8.5)
Unique reflections	19520 (3161)	20579 (3282)	17636 (2836)	22401 (3581)	21659 (3432)	15953 (2542)
R_{meas}	0.244 (1.132)	0.599 (6.046)	0.579 (3.072)	0.204 (1.431)	0.631 (6.329)	0.402 (1.845)
I/σ	5.57 (1.34)	8.49 (1.10)	6.51 (1.00)	7.37 (1.34)	11.24 (1.21)	5.52 (1.21)
CC1/2	0.984 (0.521)	0.990 (0.507)	0.988 (0.539)	0.992 (0.498)	0.994 (0.563)	0.980 (0.499)

表 3-2. 結晶構造解析パラメータ

	1-PhC	2-PhC	3-PhC	ox1-PhC	ox2-PhC	ox3-PhC
Resolution range (Å)	32.76-1.72	36.68-1.70	42.34-1.79	36.67-1.65	36.66-1.67	42.30-1.85
Reflection used	17570	18547	15866	20176	19524	14365
<i>R</i> -factor (%)	15.61	15.79	15.84	15.65	14.27	16.20
Free <i>R</i> -factor (%)	20.85	20.47	21.78	20.15	18.57	22.18
R.m.s. deviations from ideal						
Bond length (Å)	0.0173	0.0195	0.0176	0.0193	0.0195	0.0156
Angle (°)	1.7803	1.8630	1.7536	1.9107	1.9011	1.6847
Ramachandran plot (%)						
most favored	96.09	96.43	96.62	96.93	97.05	96.64
allowed	3.91	3.57	2.95	2.63	2.95	2.52

結晶からのかご型構造体の切り出し

Ox1-PhC から超分子かご型構造体を溶液中へ切り出すために, **ox1-PhC** を 100 mM グリシン緩衝液 (pH 10) に 6 時間, 25°C 浸漬し, 結晶を溶解した. **Ox1-PhC** の溶解には, 結晶の溶解性が十分である pH 10 の緩衝液を利用した. 結晶溶解後, 上澄み溶液を 20 mM トリス緩衝液 (pH 9) により 12 時間, 4°C 透析した. 続いて, 溶解した蛋白質をサイズ排除クロマトグラフィー (Size exclusion chromatography: SEC) により分析した. その結果, 11.6 mL および 12.7 mL にピークが得られた (図 3-7a). Native-PAGE により 11.6 mL および 12.7 mL のピークの分子量を確認した結果, 分子量マーカーの 480 kDa および 146 kDa 付近にそれぞれバンドが見られた (図 3-6). より詳細な分子量を MALDI-TOF MS により測定した結果, 12.7 mL に溶出した蛋白質は, 85110 Da の分子量を有し, 三量体の分子量 (85129 Da) と良い一致を示した (図 3-7b). この 12.7 mL に溶出した蛋白質集合体の構造を同定するために, 電子顕微鏡 (TEM), 原子間力顕微鏡 (AFM), 円偏光二色性スペクトル (CD) 測定を行った. 12.7 mL に溶出した蛋白質集合体は, TEM 像より均一な粒子であり, 直径 8.2 ± 0.3 nm であることが示され, 結晶構造内の三量体構造のサイズ (8.3 nm) と良い一致を示した (図 3-1c, 3-7c, 3-7d). TEM 像の粒子を拡大すると, 三角形構造や結晶内の三量体構造を基にした二次元投影像が観察された (図 3-7c). AFM 測定では, 粒子径が 16.1 ± 0.6 nm であることが示された (図 3-8a, 8c). AFM チップにより粒子幅は大きく測定されるため, 粒子径は結晶構造の三量体構造に比べ, 大きいサイズで観察された³⁷. また, 粒子の高さが 2.0 ± 0.1 nm であり, 結晶構造の三量体の高さ (5.2 nm) に比べ, 小さかった (図 3-8a, 8d). これは, かご型構造がマイカ表面や AFM チップとの相互作用により押しつぶされたためであると考えられる³⁷. また, 溶出した蛋白質集合体の二次構造を同定するために, CD 測定および BeStSel による解析を行った (図 3-9)³⁸. CD 測定より, かご型構造は 20 % のヘリックス構造, 33 % の β シート構造を有することが示され, **ox1-PhC** の結晶構造の二次構造 (23 % のヘリックス構造, 30 % の β シート構造) と良い一致を示した. また, R13A PhM は, 19 % ヘリックス構造と 31 % の β シート構造を有することが示された (図 3-9). これより **ox1-PhC** から切り出されたかご型構造は R13A PhM に比べ, β シート構造の割合が多いことが確認できた. 一方, 11.6 mL で溶出した蛋白質集合体は MALDI-TOF MS ではピークが見られず, Native-PAGE, TEM, AFM の結果から凝集体であることが推定される (図 3-6, 3-8, 3-10). 酸化していない **1-PhC** は, 三量体を示すピークは得られず, 11.9 mL および 13.7 mL にピークが得られた (図 3-11a). MALDI-TOF MS より 13.7 mL は単量体および二量体の混合物であることが示された (図 3-11d). 二量体構造は, C73_a-C83_b の一部がジスルフィド結合を形成するために構築されたと考えられる. また, 結晶溶解後, 溶液中で空気酸化されることでも二量体構造が構築される可能性がある. R13A 結晶では, 単量体間を架橋するジスルフィド結合が存在しないため, 三量体を示すピークは得られなかった (図 3-11b, 11e). 以上より, 三量体構造は **ox1-PhC** を溶解すること

により特異的に形成される構造体であることが示された。三量体からなる超分子かご型構造が結晶から特異的に切り出されることを証明するために、溶液中の **1-PhM** を酸化し、三量体が形成されるかを確認した。まず、**1-PhC** 内のジスルフィド結合を還元するため、100 mM DTT (milliQ により希釈, pH 5.0) に 12 時間, 37°C 浸漬した。続いて、還元した結晶を 100 mM グリシン緩衝液 (pH 10) に 6 時間, 25°C 浸漬し、溶解させた。最後に、**1-PhM** を 20 mM トリス緩衝液 (pH 9) に 12 時間, 4°C 透析した。透析後、溶液中の **1-PhM** を酸化するために H_2O_2 を加え (終濃度: $[\text{PhM}] = 28 \mu\text{M}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ mM}$)、12 時間, 37°C 反応させた。サイズ排除クロマトグラフィーにより、三量体に対応するピークが観測されず、11.0 mL にピークのみ得られ、単量体による凝集体が形成されることが示された (図 3-12)。凝集体は、単量体同士がジスルフィド結合によりランダムに架橋したことで形成されたと考えられる。以上より、三量体構造を構築するためには、**1-PhC** を酸化し、結晶内でジスルフィド結合を形成させることが重要であることが示された。

Ox2-PhC および **ox3-PhC** に関して、それぞれの結晶を 100 mM グリシン緩衝液 (pH 10) に 6 時間, 25°C 浸漬し、透析後 (**ox1-PhC** と同条件) にサイズ排除カラムクロマトグラフィーで分析した。その結果、**ox2-PhC** では 11.7 mL, 12.8 mL, 14.8 mL, **ox3-PhC** では 11.5 mL, 13.1 mL, 14.8 mL にそれぞれ溶出ピークが得られた (図 3-13a, 13b)。MALDI-TOF MS より **ox2-PhC** における 12.8 mL では、84856 Da の分子量を示し、三量体の分子量 (84985 Da) と良い一致を示した (図 3-13c)。これより、三量体構造は $\text{C73}_a\text{-C83}_b$ によるジスルフィド結合により構築されたと考えられる。**Ox3-PhC** において、13.1 mL に溶出した蛋白質が三量体構造であると推定できるが、MALDI-TOF MS ではピークが得られず、分子量の同定を行うことができなかった。全溶解蛋白質量に対する超分子かご型構造を形成する蛋白質量の割合をサイズ排除クロマトグラフィーの結果から算出すると、**ox1-PhC** は 52 %, **ox2-PhC** は 44 %, **ox3-PhC** は 24 % であった。これより、**ox1-PhC** のようにかご型構造体の上部および下部へ 2 種類のジスルフィド結合を導入する方が、**ox2-PhC** や **ox3-PhC** のようにジスルフィド結合を 1 種類のみ導入するより、効率的に超分子かご型構造体を構築できることが示された。

過酷な条件下における **1-PhC** 内の超分子かご型構造体の安定性を評価するために、37°C で 4 日間乾燥保存された **1-PhC** から超分子かご型構造体を切り出すことを試みた。乾燥した **1-PhC** を前出の条件で酸化、溶解し、サイズ排除カラムクロマトグラフィーにより分析した。その結果、11.4 mL, 12.6 mL, 14.7 mL の 3 つのピークが観測された (図 3-11c)。MALDI-TOF MS により 12.6 mL の溶出蛋白質は、85112 Da を示し、三量体の分子量 (84129 Da) と良い一致を示した (図 3-11f)。全溶解蛋白質量に対する超分子かご型構造を形成する蛋白質量の割合は、48 % であり、乾燥前の **ox1-PhC** に比べて 4 % のみの減少にとどまった (図 3-7a, 3-11c)。以上より、多角体結晶の乾燥に対する高い安定性により、乾燥保存した **1-PhC** においても効率的に超分子かご型構造体の構築が

可能であることが示された.

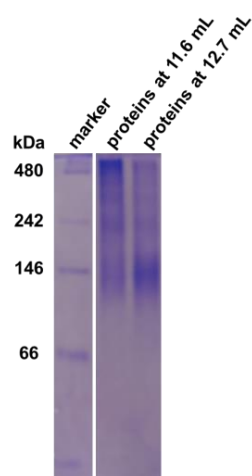


図 3-6. Ox1-PhC における 11.6 mL および 12.7 mL に溶出した蛋白質集合体の Native-PAGE (アクリルアミドゲル, 7.5 %, 泳動時間 90 分).

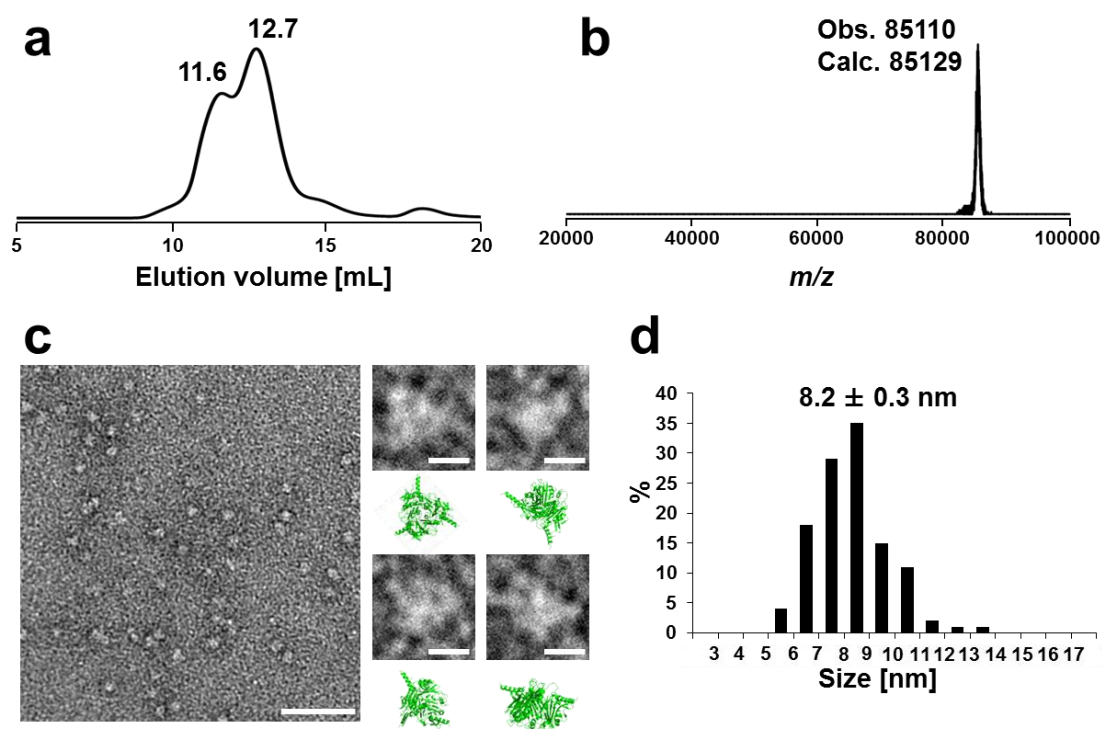


図 3-7. Ox1-PhC から切り出された蛋白質集合体の同定. (a) ox1-PhC の SEC プロファイル, (b) ox1-PhC から切り出された蛋白質 (12.7 mL 溶出) の MALDI-TOF MS, (c) TEM 像と拡大図と結晶構造による対応図 (左のスケールバーは 50 nm, 右のスケールバーは 5 nm) (d) TEM 像のサイズ分布 (N=116)

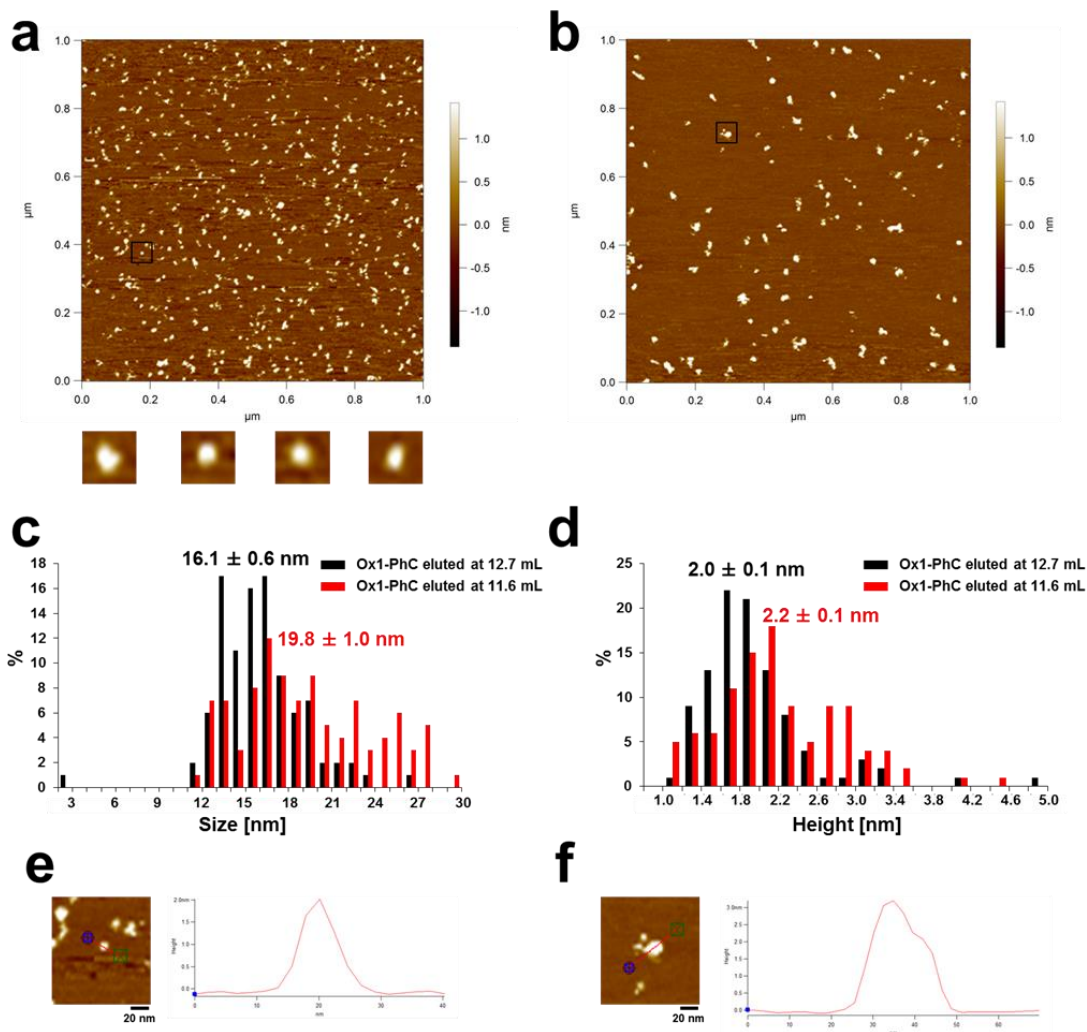


図 3-8. (a) Ox1-PhC における 12.7 mL に溶出したかご型構造体の AFM 像. (b) Ox1-PhC における 11.6 mL に溶出した凝集体構造の AFM 像. (c) Ox1-PhC から切り出されたかご型構造体および凝集体のサイズ分布 ($N_{\text{cage}} = 100$, $N_{\text{agg}} = 105$). (d) Ox1-PhC から切り出されたかご型構造体および凝集体の高さ分布 ($N_{\text{cage}} = 100$, $N_{\text{agg}} = 105$). (e) (a)の四角で囲まれた粒子の高さプロファイル. (f) (b)の四角で囲まれた粒子の高さプロファイル.

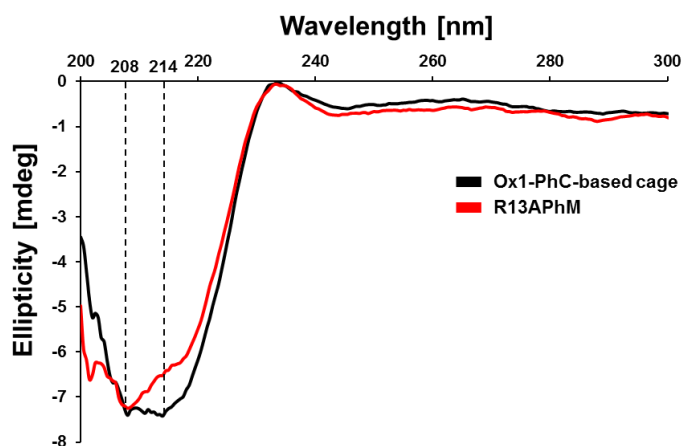


図 3-9. ox1-PhC による蛋白質かご型構造体の CD スペクトル. それぞれのサンプルは, 20°C で測定した. サンプル濃度は, [ox1-PhT] = 1.7 μ M, [R13APhM] = 5 μ M, 20 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 9) を使用した.

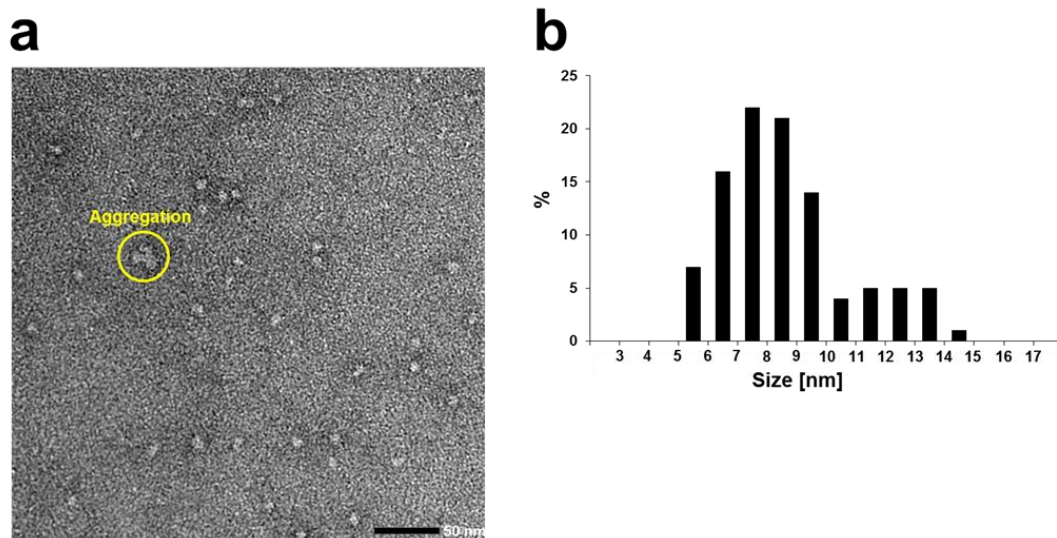


図 3-10. (a) 11.6 mL に溶出した蛋白質集合体の TEM 像. (b) (a)の粒子のサイズ分布 (N=101). 1 μ M のサンプルを使用し, 50 % メチルアミンタングステン酸によりネガティブ染色を行った.

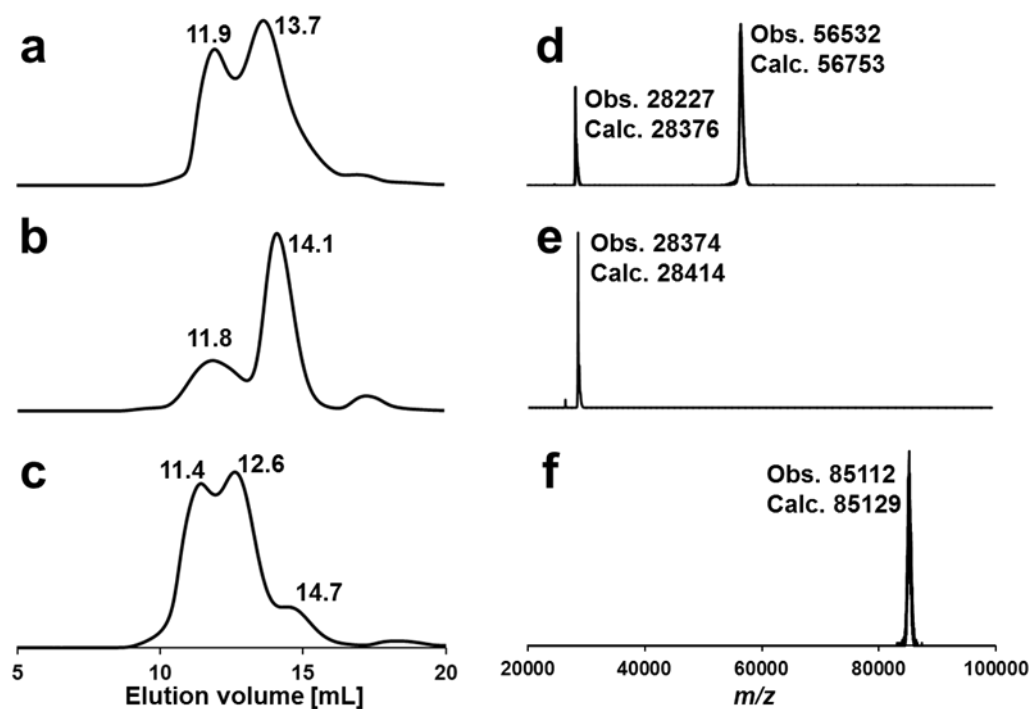


図 3-11. (a-c) (a) 1-PhC, (b) oxR13APhC (c) 乾燥後の ox1-PhC から切り出された蛋白質集合体の SEC プロファイル. (d-f) (d) 1-PhC より 13.7 mL に溶出した蛋白質集合体の MALDI-TOF MS. (e) oxR13APhC より 14.1 mL に溶出した蛋白質集合体の MALDI-TOF MS. (f) 乾燥後の ox1-PhC より 12.6 mL に溶出した蛋白質集合体の MALDI-TOF MS.

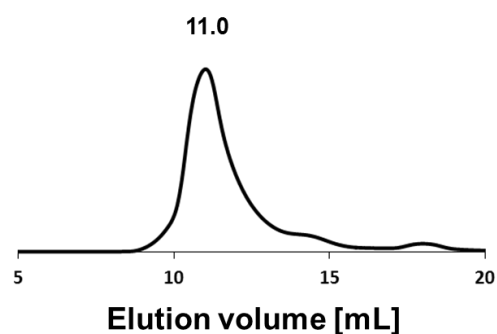


図 3-12. 溶液中で 1-PhM を酸化したサンプルの SEC プロファイル

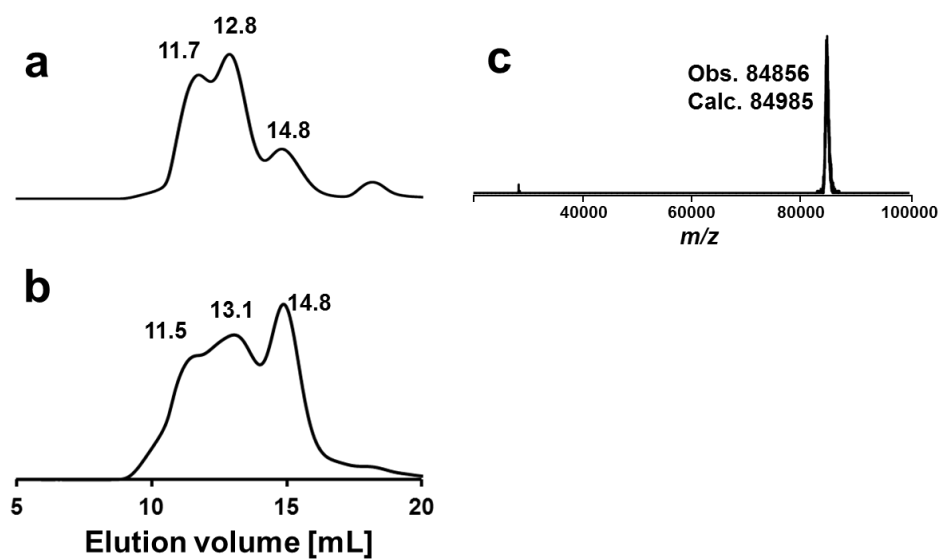


図 3-13. 多角体結晶から切り出された蛋白質集合体の SEC および MALDI-TOF MS による同定. (a) ox2-PhC, (b) ox3-PhC の SEC による溶出プロファイル. (c) ox2-PhC における 12.8 mL に溶出した蛋白質集合体の MALDI-TOF MS.

かご型構造体による小分子の捕捉

Ox1-PhC から切り出されたかご型構造体の機能を調べるために、かご型構造体と小分子の結合挙動を評価した。pH 9 の溶液中では、かご型構造体は細孔内部が正電荷を帯びているため、負電荷分子を細孔内部で捕捉することが期待できる (図 3-14a)。そこで、アニオン性色素分子のアシッドレッド 94 (Acid red 94: AR, 図 3-14b) とカチオン性色素分子のローダミン 6G (Rhodamine 6G: Rho, 図 3-14c) を使用し、かご型構造体とそれぞれの色素分子を混合し、高速液体クロマトグラフィーにより構造体を溶出させた (図 3-15)。その結果、かご型構造体の溶出時間と同じ時間に AR の蛍光は観測された (図 3-15a, 15b)。一方、Rho の蛍光はかご型構造体の溶出時間より早い時間に観察され、Rho を介し、かご型構造体が凝集体を形成したと考えられる (図 3-15a, 15c)。また、単量体の R13APhM と AR, Rho それぞれを混合させ、高速液体クロマトグラフィーにより溶出させた結果、AR, Rho の蛍光はいずれも単量体の溶出時間より早い時間に観測され、それぞれの色素分子を介して凝集体が形成されたと考えられる (図 3-15d, 15e, 15f)。以上より、かご型構造体は、凝集体を形成することなく負電荷の小分子と選択的に結合する機能を有することが示された。かご型構造体の細孔内の正電荷と AR の負電荷が静電相互作用により結合したと推測される。

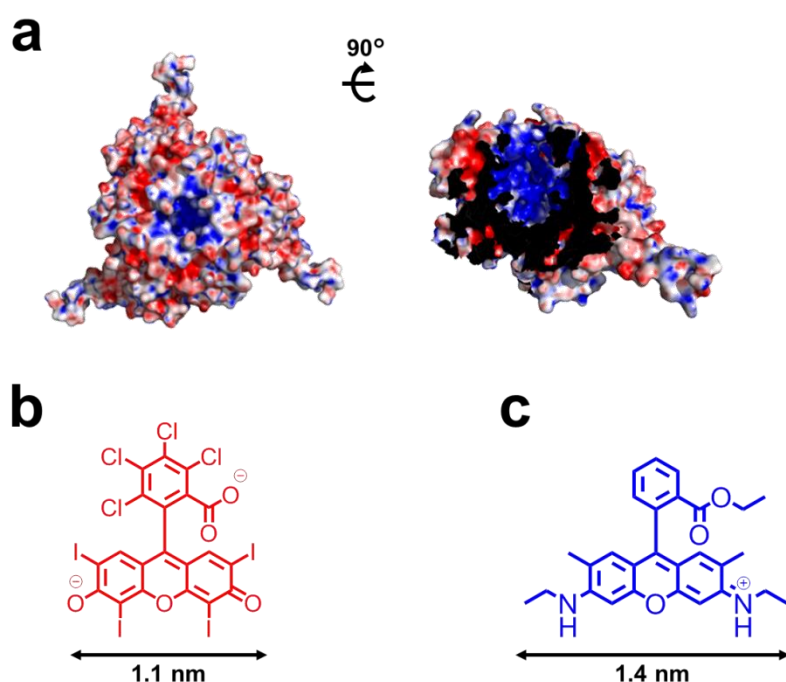


図 3-14. (a) pH 9 におけるかご型構造体の表面電荷。右図は、かご型構造体の細孔の断面図である。表面電荷は、PDB2PQR サーバーより求めた。(b) アシッドレッド 94 の構造。(c) ローダミン 6G の構造。AR, Rho いずれもかご型構造体の細孔 (直径 1.5 nm) 内へ入ることができるサイズである。

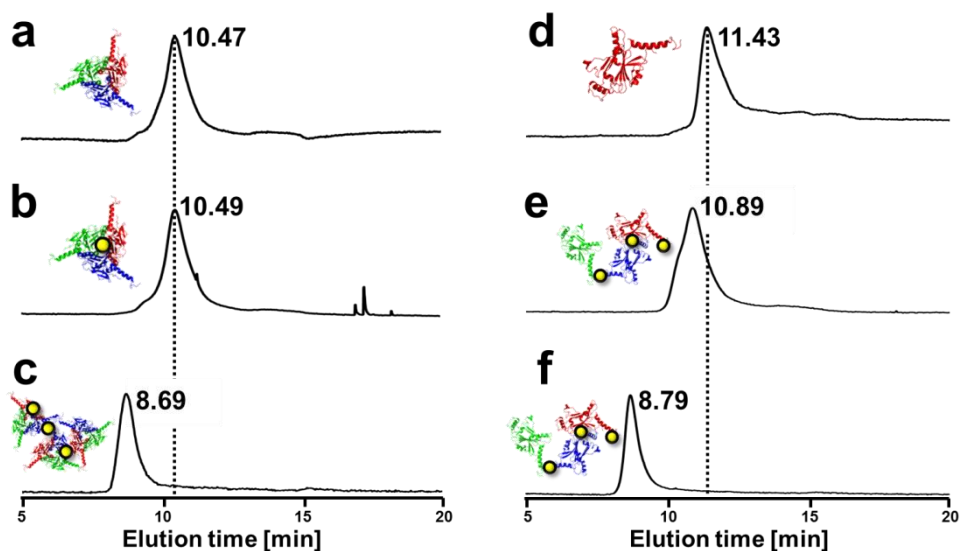


図 3-15. 高速液体クロマトグラフィーによる (a-c) かご型構造体と色素分子を混合したサンプルおよび (d-f) R13A_{PhM} と色素分子を混合したサンプルの溶出プロファイル. (a) ox1-PhC から切り出されたかご型構造体を 280 nm の吸収で追跡した溶出プロファイル. (b) かご型構造体と AR を混合したサンプルを蛍光で追跡した溶出プロファイル. (c) かご型構造体と Rho を混合したサンプルを蛍光で追跡した溶出プロファイル. (d) R13A_{PhM} を 280 nm の吸収で追跡した溶出プロファイル. (e) R13A_{PhM} と AR を混合したサンプルを蛍光で追跡した溶出プロファイル. (f) R13A_{PhM} と Rho を混合したサンプルを蛍光で追跡した溶出プロファイル. AR と混合したサンプルの蛍光は励起波長 560 nm, 測定波長 570 nm で追跡している. また, Rho と混合したサンプルの蛍光は励起波長 525 nm, 測定波長 555 nm で追跡している.

3-3. 結論

蛋白質結晶の酸化および溶解により蛋白質結晶内の特異な超分子構造体の構築を達成した。Cys を結晶内分子界面へ適切に導入することにより、単量体同士をジスルフィド結合で架橋し、多角体結晶内特有の超分子かご型構造体を溶液中へ切り出すことができた。一方、溶液中で単量体同士を架橋すると、ランダムな架橋による凝集体が形成された。これらの結果から、結晶内で単量体同士がジスルフィド結合により架橋されることが超分子構造体形成において重要であることが示された。また、多角体結晶の乾燥に対する高い安定性により、結晶内の超分子かご型構造体は変性することなく、乾燥後の多角体結晶から切り出すことを達成した。さらに、切り出されたかご型構造体は細孔が正電荷を帯びているため、負電荷の小分子を選択的に捕捉する機能を有することが示された。本研究の手法を様々な蛋白質結晶へ適用することにより、リング、チューブ、2次元シート構造などの構築が可能となり、新たなバイオ材料への応用が期待される。

3-4. 実験項

材料

BaculoGold™-linearized baculovirus DNA および fetal bovine serum は、BD Biosciences Pharmingen, Life Technologies からそれぞれ購入した。 *Spodoptera frugiperda* cell line IPLB-Sf21-AE (Sf21) は、10% fetal bovine serum (MP Biomedicals. Inc.), 2.6 mg/mL tryptose broth, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin を含む Grace 培地 (Gibco-BRL) を使用し、27°C で培養した。 Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix, Lipofectin® Transfer Reagent, Top 10 Competent Cells は、Life Technologies から購入した。 その他の試薬は、TCI, 和光, ナカライテスク, Sigma-Aldrich, Life Technologies から購入した。

変異体 PhC 作製

1-PhM, 2-PhM, 3-PhM のプラスミドは、下記プライマーを使用し、R13APhM をテンプレートとし、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)により作製した。

E73C	F: 5'-GGCACTTAAGGAATATCGCTGCGGACAACACAACGACTC-3'
	R: 5'-GAGTCGTTGTGTTGTCCGCAGCGATATTCCTTAAGTGCC-3'
Y83C	F: 5'-CGACTCTTACGATGAGTGCGAAGTGAATCAGAGCATC-3'
	R: 5'-GATGCTCTGATTCACTTCGCACTCATCGTAAGAGTCG-3'
S193C	F: 5'-CATCATACAATGTCGGATGCGCACATAACGTAATGGACG-3'
	R: 5'-CGTCCATTACGTTATGTGCGCATCCGACATTGTATGATG-3'
A194C	F: 5'-CATCATACAATGTCGGATGCTGCCATAACGTAATGGACGTCTTC-3'
	R: 5'-GAAGACGTCCATTACGTTATGGCAGCATCCGACATTGTATGATG-3'

各プラスミドを Top 10 Competent Cell へ導入した後、QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen)で精製した。精製後の変異体プラスミドを LR クロナーゼ反応によりデスティネーションベクター (pDEST)へ導入した後、QIAprep Spin Miniprep kit により精製した。精製後のバキュロウイルスプロモーターを有する変異体プラスミドと baculogold linearized baculovirus DNA を lipofectin 試薬を利用し、Sf21 細胞へ導入し、Grace 培地で 27°C, 24 時間培養した。24 時間後、Grace 培地を 10 % fetal bovine serum 含有 Grace 培地に交換し、27°C, 4 日間培養した。培養後、変異体のバキュロウイルスを含む上澄み液を回収した。Sf21 細胞内での **1-, 2-, 3-PhC** の発現と精製は WTPhC と同様の方法で行った^{39,40}。

結晶構造解析

測定を行う前に、**1-PhC**, **2-PhC**, **3-PhC**, **ox1-PhC**, **ox2-PhC**, **ox3-PhC**を50 % (w/w) エチレングリコール含有緩衝液に浸漬し、MicroMesh上へ結晶を分散させた。続いて、サンプルを液体窒素により凍結した。各結晶のX線回折データは、1.00 Åの波長でSPring-8のBL32XU, BL41XUにて100 Kで集められた。1つの結晶から複数の小角範囲 (5° または10°) のデータを収集し、マージすることで高分解能の結晶構造を決定できた。まず、クライオループ状の結晶の位置は低線量スキャンにより決定した。BL32XUでは、すべてのデータはZOOシステムにより自動的に収集され、それらのデータはKAMOシステムにより自動的に処理、マージされた⁴¹。また、XDSによりそれぞれのデータを分類し、積算した⁴²。多角体結晶の格子定数 ($a \sim 103$ Å, $I23$)と良い一致を示すデータを選択し、2つのとりうるパラメータ (hkl および $h\bar{l}k$) を検証し、多角体結晶 (PDB ID: 2OH6) とより一致する構造をとるように処理した。それぞれのデータは、強度の相関関数によって階層的なクラスターに分類され、KAMOによる各クラスターごとのはずれ値の排除と、XSCALEによるマージを行った⁴²。各クラスターの中でCC₁₂が最も高いクラスターを選択し、さらなる結晶構造解析を進めた。初めに、phenix.refineによるrigid body refinementを行い、PDBの2OH6構造を基に構造精密化を行った⁴³。CCP4のREFMAC5⁴⁴を利用し、**1-PhC**, **2-PhC**, **3-PhC**, **ox1-PhC**, **ox2-PhC**, **ox3-PhC**の構造を1.72, 1.70, 1.79, 1.65, 1.67, 1.85 Åの分解能でそれぞれ決定した。COOT⁴⁵を基に(2*Fo*-*Fc*)および(*Fo*-*Fc*)電子密度マップを作成した。**1-PhC**ではN末端領域 (ACE1-Thr7)およびループ領域 (His76-Asp78), **2-PhC**ではN末端領域 (ACE1-Ser8)およびループ領域 (Gln75-Asp78), **3-PhC**ではN末端領域 (ACE1-Thr7), **ox1-PhC**ではN末端領域 (ACE1-Asn9)およびループ領域 (His76-Asp78), **ox2-PhC**ではN末端領域 (ACE1-Val4), **ox3-PhC**ではN末端領域 (ACE1-Thr7)が電子密度が得られず、構造決定できなかった。また、電子密度が小さいため**1-PhC**および**ox1-PhC**のGlu75はAlaに置換している。各構造モデルは、構造解析を行うそれぞれの段階でオミットマップおよびRAMPAGE⁴⁶により妥当であることを確認している。X線回折データ収集、結晶構造の精密化に関する統計値はそれぞれ表3-1, 3-2に示した。

Accession Codes : **1-PhC**, **2-PhC**, **3-PhC**, **ox1-PhC**, **ox2-PhC**, **ox3-PhC**の結晶構造はProtein Data Bankに登録され、IDは、それぞれ5YR1, 5YR9, 5YRA, 5YRB, 5YRC, 5YRDである。

多角体結晶からかご型構造体の構築

6×10^7 個の多角体結晶を 200 μL の 100 mM H_2O_2 含有 milliQ に 37°C, 12 時間浸漬し, 結晶内ジスルフィド結合を形成させた. 酸化後の結晶を 3 回, 200 μL の milliQ で洗浄し, 100 mM Glycine-NaOH 緩衝液 (pH 10, 1 mL) に 25°C, 6 時間浸漬し, 結晶を溶解させた. 溶解後のサンプルを遠心し, 上澄み液を 20 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 9) で 12 h, 4°C で透析した. 透析後, サンプルを遠心し, 上澄み溶液を利用し, 構造の同定を進めた.

サイズ排除クロマトグラフィー: 各サンプルをサイズ排除カラム (Superdex200, AKTA) にロードし, 溶出させた. 溶出に用いた緩衝液は, 20 mM Tris/HCl (pH 9) である. 蛋白質の溶出は 280 nm の吸光度を追跡することで確認した.

MALDI-TOF MS 測定: 各サンプルをシナピン酸飽和の TA 溶液 (milliQ : アセトニトリル = 1:1, 0.1 wt% トリフルオロ酢酸含有) と混合し, UltrafleXtreme (Bruker) で測定した.

電気泳動: 各サンプルをブロモフェノールブルー溶液に 1:1 で混合し, 7.5 % アクリルアミドゲルを使用し, 90 分, 20 mA で泳動した. 泳動後, アクリルアミドを 1 時間, CBB 染色 (CBB Staine One, ナカライテスク) し, milliQ により脱色後, 蛋白質のバンドを確認した.

透過型電子顕微鏡 (TEM): TEM 観察は JEOL JEM-1400Plus で行った. 1 μM のサンプルを 50 % メチルアミンタングステン酸によりネガティブ染色し, 観察を行った.

原子間力顕微鏡 (AFM): AFM 測定は, Oxford Instruments Asylum Research の MFP 3D で行った. カンチレバーは, BL-AC40TS-C2 (Olympus) を使用した. 70 nM のサンプルを mica 上に添加し, 5 h 静置した後, 20 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 9.0) で 3 回洗浄し, 20 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 9.0) 中のサンプルを観察した.

円二色性スペクトル (CD): 20 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 9.0) 中の **ox1-PhC** から構築されたかご型構造体および R13A PhM の CD スペクトルは, J-820 (JASCO) により, 20°C で測定した. サンプルは, **ox1-PhC** から構築されたかご型構造体は 1.7 μM , R13A PhM は 5 μM に調整した. CD スペクトルデータを BeStSel サーバーにより分析し, 溶液中のサンプルの二次構造を決定した³⁸. また, **ox1-PhC** の結晶構造内のヘリックスおよび β -sheet の割合は DSSP プログラムにより決定した⁴⁷.

かご型構造体と色素分子の複合化

それぞれの終濃度が，**ox1-PhC** から構築されたかご型構造体は 3.3 μM ，R13A PhM は 10 μM ，AR は 2 μM ，Rho は 2 μM になるように調整し，それぞれ 25°C で 5 時間混合させ，複合体を形成された．各サンプルを 0.45 μm フィルター (Millex)に通し，高速液体クロマトグラフィーにより複合体の溶出を確認した．

高速液体クロマトグラフィー：High performance liquid chromatography (HPLC)システム (L-2000, HITACHI)により，各サンプルをサイズ排除カラム (GF 510-HQ, Shodex)へロードし，20 mM Tris/HCl 緩衝液で溶出した．280 nm の吸収を追跡し，蛋白質の溶出を確認した．また，AR の蛍光は励起波長 560 nm，測定波長 570 nm，Rho の蛍光は励起波長 525 nm，測定波長 555 nm で検出し，蛋白質と色素分子の複合体を追跡した．

3-5. 参考文献

1. Luo, Q., Hou, C., Bai, Y., Wang, R. & Liu, J. Protein Assembly: Versatile Approaches to Construct Highly Ordered Nanostructures. *Chem. Rev.* **116**, 13571-13632 (2016).
2. Yang, G., Wu, L., Chen, G. & Jiang, M. Precise protein assembly of array structures. *Chem. Commun.* **52**, 10595-10605 (2016).
3. King, N. P., Bale, J. B., Sheffler, W., McNamara, D. E., Gonen, S., Gonen, T., Yeates, T. O. & Baker, D. Accurate design of co-assembling multi-component protein nanomaterials. *Nature* **510**, 103-108 (2014).
4. Lai, Y. T., Reading, E., Hura, G. L., Tsai, K. L., Laganowsky, A., Asturias, F. J., Tainer, J. A., Robinson, C. V. & Yeates, T. O. Structure of a designed protein cage that self-assembles into a highly porous cube. *Nat. Chem.* **6**, 1065-1071 (2014).
5. Padilla, J. E., Colovos, C. & Yeates, T. O. Nanohedra: using symmetry to design self assembling protein cages, layers, crystals, and filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2217-2221 (2001).
6. Li, Q., So, C. R., Fegan, A., Cody, V., Sarikaya, M., Vallera, D. A. & Wagner, C. R. Chemically Self-Assembled Antibody Nanorings (CSANs): Design and Characterization of an Anti-CD3 IgM Biomimetic. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 17247-17257 (2010).
7. Bai, Y., Luo, Q., Zhang, W., Miao, L., Xu, J., Li, H. & Liu, J. Highly ordered protein nanorings designed by accurate control of glutathione S-transferase self-assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 10966-10969 (2013).
8. Ballister, E. R., Lai, A. H., Zuckermann, R. N., Cheng, Y. & Mougous, J. D. In vitro self-assembly of tailorable nanotubes from a simple protein building block. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3733-3738 (2008).
9. Yang, G., Zhang, X., Kochovski, Z., Zhang, Y., Dai, B., Sakai, F., Jiang, L., Lu, Y., Ballauff, M., Li, X., Liu, C., Chen, G. & Jiang, M. Precise and Reversible Protein-Microtubule-Like Structure with Helicity Driven by Dual Supramolecular Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 1932-1937 (2016).
10. Gradisar, H., Bozic, S., Doles, T., Vengust, D., Hafner-Bratkovic, I., Mertelj, A., Webb, B., Sali, A., Klavzar, S. & Jerala, R. Design of a single-chain polypeptide tetrahedron assembled from coiled-coil segments. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 362-366 (2013).
11. Brodin, J. D., Ambroggio, X. I., Tang, C., Parent, K. N., Baker, T. S. & Tezcan, F. A. Metal-directed, chemically tunable assembly of one-, two- and three-dimensional crystalline protein arrays. *Nat. Chem.* **4**, 375-382 (2012).
12. Gonen, S., DiMaio, F., Gonen, T. & Baker, D. Design of ordered two-dimensional arrays mediated by noncovalent protein-protein interfaces. *Science* **348**, 1365-1368 (2015).
13. Suzuki, Y., Cardone, G., Restrepo, D., Zavattieri, P. D., Baker, T. S. & Tezcan, F. A.

- Self-assembly of coherently dynamic, auxetic, two-dimensional protein crystals. *Nature* **533**, 369-373 (2016).
14. Sinclair, J. C., Davies, K. M., Venien-Bryan, C. & Noble, M. E. Generation of protein lattices by fusing proteins with matching rotational symmetry. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 558-562 (2011).
 15. Uchida, M., Klem, M. T., Allen, M., Suci, P., Flenniken, M., Gillitzer, E., Varpness, Z., Liepold, L. O., Young, M. & Douglas, T. Biological Containers: Protein Cages as Multifunctional Nanoplatfroms. *Adv. Mater.* **19**, 1025-1042 (2007).
 16. Abe, S., Maity, B. & Ueno, T. Design of a confined environment using protein cages and crystals for the development of biohybrid materials. *Chem. Commun.* **52**, 6496-6512 (2016).
 17. Margolin, A. L. & Navia, M. A. Protein crystals as novel catalytic materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 2204-2222 (2001).
 18. Shenoy, B., Wang, Y., Shan, W. Z. & Margolin, A. L. Stability of crystalline proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **73**, 358-369 (2001).
 19. Dotan, N., Arad, D., Frolow, F. & Freeman, A. Self-assembly of a tetrahedral lectin into predesigned diamondlike protein crystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 2363-2366 (1999).
 20. Banatao, D. R., Cascio, D., Crowley, C. S., Fleissner, M. R., Tienson, H. L. & Yeates, T. O. An approach to crystallizing proteins by synthetic symmetrization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16230-16235 (2006).
 21. Kostiainen, M. A., Hiekkataipale, P., Laiho, A., Lemieux, V., Seitsonen, J., Ruokolainen, J. & Ceci, P. Electrostatic assembly of binary nanoparticle superlattices using protein cages. *Nat. Nanotechnol.* **8**, 52-56 (2013).
 22. Liljestrom, V., Mikkila, J. & Kostiainen, M. A. Self-assembly and modular functionalization of three-dimensional crystals from oppositely charged proteins. *Nat. Commun.* **5**, 4445 (2014).
 23. Sontz, P. A., Bailey, J. B., Ahn, S. & Tezcan, F. A. A Metal Organic Framework with Spherical Protein Nodes: Rational Chemical Design of 3D Protein Crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 11598-11601 (2015).
 24. Abe, S. & Ueno, T. Design of protein crystals in the development of solid biomaterials. *RSC Adv.* **5**, 21366-21375 (2015).
 25. Guli, M., Lambert, E. M., Li, M. & Mann, S. Template-directed synthesis of nanoplasmonic arrays by intracrystalline metalization of cross-linked lysozyme crystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 520-523 (2010).
 26. Abe, S., Tsujimoto, M., Yoneda, K., Ohba, M., Hikage, T., Takano, M., Kitagawa, S. & Ueno, T. Porous protein crystals as reaction vessels for controlling magnetic properties of

- nanoparticles. *Small* **8**, 1314-1319 (2012).
27. Tabe, H., Abe, S., Hikage, T., Kitagawa, S. & Ueno, T. Porous protein crystals as catalytic vessels for organometallic complexes. *Chem. Asian J.* **9**, 1373-1378 (2014).
 28. Koshiyama, T., Shirai, M., Hikage, T., Tabe, H., Tanaka, K., Kitagawa, S. & Ueno, T. Post-crystal engineering of zinc-substituted myoglobin to construct a long-lived photoinduced charge-separation system. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 4849-4852 (2011).
 29. Buch, M., Wine, Y., Dror, Y., Rosenheck, S., Lebendiker, M., Giordano, R., Leal, R. M., Popov, A. N., Freeman, A. & Frolow, F. Protein products obtained by site-preferred partial crosslinking in protein crystals and "liberated" by redissolution. *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 1296-1303 (2014).
 30. Coulibaly, F., Chiu, E., Ikeda, K., Gutmann, S., Haebel, P. W., Schulze-Briese, C., Mori, H. & Metcalf, P. The molecular organization of cypovirus polyhedra. *Nature* **446**, 97-101 (2007).
 31. Belloncik, S. & Mori, H. Cypoviruses. *Insect Viruses*, 337-369 (1998).
 32. Rohrmann, G. F. POLYHEDRIN STRUCTURE. *J. Gen. Virol.* **67**, 1499-1513 (1986).
 33. Abe, S., Ijiri, H., Negishi, H., Yamanaka, H., Sasaki, K., Hirata, K., Mori, H. & Ueno, T. Design of Enzyme-Encapsulated Protein Containers by In Vivo Crystal Engineering. *Adv. Mater.* **27**, 7951-7956 (2015).
 34. Coulibaly, F., Chiu, E., Gutmann, S., Rajendran, C., Haebel, P. W., Ikeda, K., Mori, H., Ward, V. K., Schulze-Briese, C. & Metcalf, P. The atomic structure of baculovirus polyhedra reveals the independent emergence of infectious crystals in DNA and RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 22205-22210 (2009).
 35. Chiu, E., Hijnen, M., Bunker, R. D., Boudes, M., Rajendran, C., Aizel, K., Olieric, V., Schulze-Briese, C., Mitsuhashi, W., Young, V., Ward, V. K., Bergoin, M., Metcalf, P. & Coulibaly, F. Structural basis for the enhancement of virulence by viral spindles and their in vivo crystallization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 3973-3978 (2015).
 36. Waschutza, G., Li, V., Schafer, T., Schomburg, D., Villmann, C., Zakaria, H. & Otto, B. Engineered disulfide bonds in recombinant human interferon-gamma: The impact of the N-terminal helix A and the AB-loop on protein stability. *Protein Eng.* **9**, 905-912 (1996).
 37. Stephanopoulos, N., Liu, M. H., Tong, G. J., Li, Z., Liu, Y., Yan, H. & Francis, M. B. Immobilization and One-Dimensional Arrangement of Virus Capsids with Nanoscale Precision Using DNA Origami. *Nano Letters* **10**, 2714-2720 (2010).
 38. Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y. H., Goto, Y., Refregiers, M. & Kardos, J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E3095-E3103 (2015).
 39. Mori, H., Ito, R., Nakazawa, H., Sumida, M., Matsubara, F. & Minobe, Y. EXPRESSION

OF BOMBYX-MORI CYTOPLASMIC POLYHEDROSIS-VIRUS POLYHEDRIN IN INSECT CELLS BY USING A BACULOVIRUS EXPRESSION VECTOR, AND ITS ASSEMBLY INTO POLYHEDRA. *J. Gen. Virol.* **74**, 99-102 (1993).

40. Abe, S., Tabe, H., Ijiri, H., Yamashita, K., Hirata, K., Atsumi, K., Shimoi, T., Akai, M., Mori, H., Kitagawa, S. & Ueno, T. Crystal Engineering of Self-Assembled Porous Protein Materials in Living Cells. *ACS Nano* **11**, 2410-2419 (2017).
41. <https://github.com/keitaroyam/yamtbx/blob/master/doc/kamo-en.md>.
42. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. Sec. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 125-132 (2010).
43. Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A., Zwart, P. H. & Adams, P. D. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.* **68**, 352-367 (2012).
44. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240-255 (1997).
45. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126-2132 (2004).
46. Lovell, S. C., Davis, I. W., Adrendall, W. B., de Bakker, P. I. W., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and C beta deviation. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **50**, 437-450 (2003).
47. Kabsch, W. & Sander, C. DICTIONARY OF PROTEIN SECONDARY STRUCTURE - PATTERN-RECOGNITION OF HYDROGEN-BONDED AND GEOMETRICAL FEATURES. *Biopolymers* **22**, 2577-2637 (1983).

第四章

TbCatB 結晶を利用したフィラメント構造体の構築

要旨

近年，蛋白質超分子構造体の機能が注目され，新たな材料として応用が期待される．我々は，蛋白質結晶内の超分子構造に着目し，架橋化および結晶溶解により特異な超分子構造体を溶液中へ切り出す手法を確立した．本研究では，*Trypanosoma brucei* *cysteine protease cathepsin B* (TbCatB) の細胞内蛋白質結晶を利用し，結晶内特有の一次元フィラメント構造体を溶液中へ切り出すことを試みた．TbCatB 変異体を作製することにより細胞内で変異体結晶内の単量体同士が架橋し，結晶を酸化処理せず，溶解するだけでフィラメント構造体を切り出すことを達成した．この手法を様々な蛋白質結晶へ適用することで多種多様な超分子構造体の構築が可能になることが示唆された．

4-1. 緒言

蛋白質超分子構造体は様々な構造を形成し、生体内で重要な役割を担っている。それらの構造体は4つの階層、すなわち、かご型構造やリング構造などの0次元構造体、チューブ構造やフィラメント構造などの一次元構造体、シート構造などの二次元構造体、結晶の三次元構造体に分類でき、それぞれの構造に適した機能を有する¹⁴。蛋白質を利用した様々な機能性材料を構築するためには、0-3次元構造体すべてを構築できる手法の確立が必要である。我々は、第三章で多角体結晶から超分子かご型構造体を構築し、結晶から特異な0次元構造体を構築することを達成した。そこで、第三章で確立した手法を拡張するために、蛋白質結晶から一次元構造体の構築を目指した(図4-1a)。

これまで蛋白質を利用した一次元構造体の構築は、様々な手法により達成されてきた⁵⁻¹⁸。例えば、天然の多量体蛋白質のサブユニット同士の相互作用、アポミオグロビンがヘムと結合する相互利用、coiled-coil 相互作用、イソペプチド結合などを利用することで、一次元フィラメント構造体を構築することができる⁵⁻¹¹。また、金属配位結合、ジスルフィド結合、静電相互作用糖-lectin 相互作用などを利用し、チューブ構造体を構築した研究も報告されている¹²⁻¹⁸。近年、これらの一次元蛋白質超分子構造体の特異な機能が注目され、新たなバイオ材料としての応用が進められてきた。シャペロニン蛋白質により形成されるチューブ構造体は、分子を内包し、細胞内へ輸送する機能を有する。このチューブ構造体は細胞内のATPにより崩壊し、内包分子を放出できるため、分子輸送材料としての利用が期待できる¹²。また、糖-lectin 相互作用により形成されるらせんチューブ構造は、マクロファージの免疫応答を活性化し、効率的にサイトカインの放出を誘導する機能を有する¹⁶。このように、一次元構造体の有用性に注目が集まり、その構築手法を開発することは新たな蛋白質材料を構築するうえで重要である。

我々は蛋白質結晶を利用し、一次元構造体の構築する手法を確立するために、昆虫細胞内で結晶化する *Trypanosoma brucei* cystein protease cathepsin B (TbCatB) と呼ばれる蛋白質を利用した^{19,20}。TbCatB は昆虫細胞内で発現すると自発的に集積し、結晶化する(図4-1b)。細胞内 TbCatB 結晶は in vitro で結晶化した TbCatB と異なる集積構造を形成している(図4-1c)¹⁹。この細胞内 TbCatB 結晶には特有な一次元フィラメント構造が形成されているが、酸性条件下において構造体は崩壊し、単量体へ解離する¹⁹。そこで、第三章の手法を利用し、TbCatB 結晶から結晶内チューブ構造体を形成する一次元フィラメント構造体を溶液中へ切り出すことを目的とし、結晶内の分子界面へCysを導入し、結晶内ジスルフィド結合形成による架橋化および結晶溶解を行った(図4-1a)。

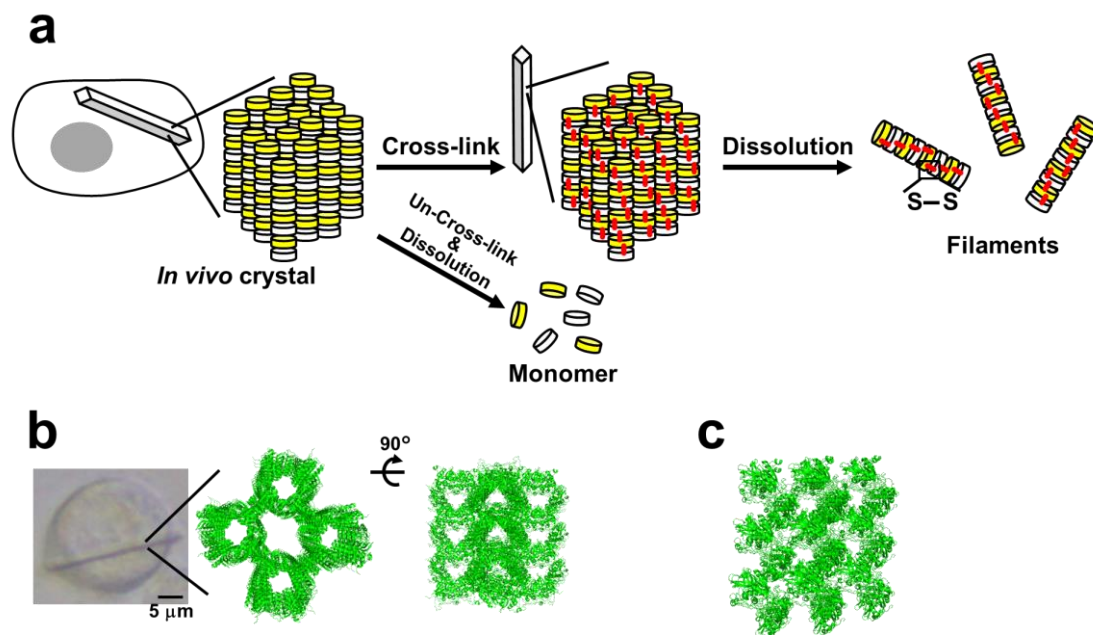


図 4-1. (a) TbCatB 結晶を利用し，結晶内で単量体同士の架橋化および結晶溶解を利用した一次元構造体の構築. (b) 昆虫細胞内で結晶化した野生型の TbCatB 結晶とその結晶構造 (PDB ID: 4HWY). (c) *In vitro* での TbCatB 結晶構造 (PDB ID: 3MOR).

4-2. 結果と考察

変異体設計

細胞内 TbCatB 結晶には2つの特有なフィラメント構造体が存在する (図 4-2). フィラメント構造体 1 を結晶から構築するために, 単量体間でジスルフィド結合を形成可能な C α -C α の距離 (2.5 Å - 7.5 Å)に存在するアミノ酸残基を探索し, R91-T223 (C α -C α 距離: 5.9 Å) が存在することが分かった (図 4-2b) ²¹. 一方, フィラメント構造体 2 では, Cys 導入部位はジスルフィド結合が形成可能な C α -C α の距離 (2.5 Å - 7.5 Å)より長い C α -C α の距離である K214-Q277 (C α -C α 距離: 9.3 Å) を候補にした (図 4-2c). それぞれの変異体, R91C/T223C (**1-TbCatB**), K214C/Q277C (**2-TbCatB**)を作製し, 昆虫細胞 (Sf9)で結晶化を試みた. いずれの変異体も結晶が観察され, **1-TbCatB** では正方形, **2-TbCatB** では針状の結晶が形成されていることが示された (図 4-3). 続いて, 変異体結晶を細胞から取り出すために, 細胞を RIPA 溶液 (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5 w/v% sodium deoxycholate, 0.1 w/v% sodium dodecyl sulfate, 1.0 w/v% NP-40 substitute) に 20°C, 24 時間浸漬し, Sf9 細胞を溶解した. **1-TbCatB**, **2-TbCatB** いずれの結晶も細胞から取り出すことができた.

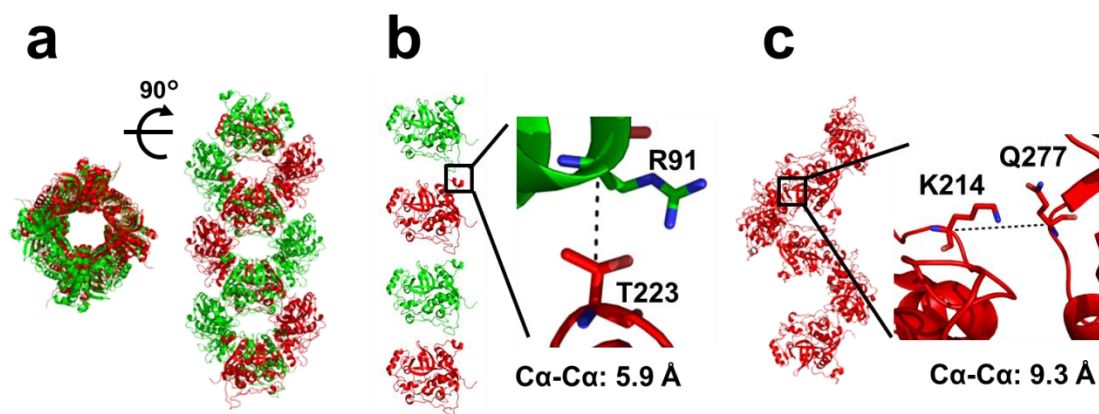


図 4-2. (a) TbCatB 結晶内の特異な集積構造 (PDB ID: 4HWY). (b) フィラメント構造体 1 と Cys 導入部位 (R91C/T223C). (c) フィラメント構造体 2 と Cys 導入部位 (K214C/Q277C).

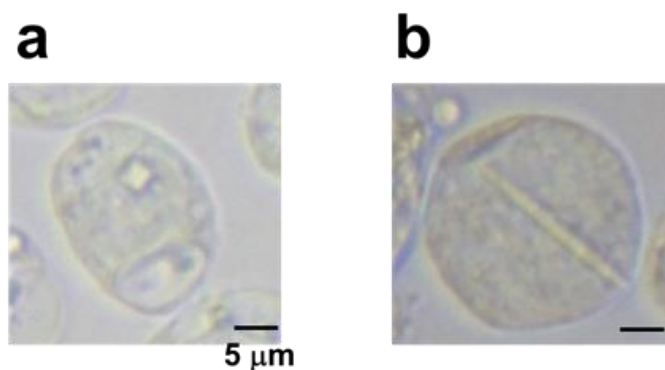


図 4-3. それぞれの変異体を発現するウイルスを Sf9 細胞へ感染させ、27°C、7 日間培養した後の細胞観察図. (a) 1-TbCatB, (b) 2-TbCatB の光学顕微鏡による観察図.

X 線結晶構造解析

X 線結晶構造解析により、**1-TbCatB**, **2-TbCatB** 結晶の構造解析を行った. その結果、構造解析が十分できる回折を得られたのは、**1-TbCatB** 結晶のみであった. **1-TbCatB** 結晶は野生型 TbCatB 結晶 (WT-TbCatB) と同じ空間群 ($P4_22_12$) を有する (図 4-4a, 表 4-1, 4-2). **1-TbCatB** と野生型 TbCatB の C α 原子の root-mean-square deviations (RMSD) は、0.167 Å であることから、分子界面への Cys 導入による全体構造へ影響はほとんどないことが示された (図 4-4b). また、C91-C223 部位を拡大すると、ジスルフィド結合を形成する電子密度が観測された (図 4-4c). これは、近接した Cys 同士が細胞内で自発的にジスルフィド結合を形成した、もしくは、結晶の精製過程で空気酸化し、ジスルフィド結合を形成したと推測される. 続いて、**1-TbCatB** 結晶を 1 mM H₂O₂ 含有 milliQ へ 37°C、3 時間浸漬し、酸化した **1-TbCatB (ox1-TbCatB)** 結晶を作製した. X 線結晶構造解析より、**ox1-TbCatB** 結晶は、**1-TbCatB** 結晶および野生型の TbCatB 結晶と同じ空間群 ($P4_22_12$) を有し、野生型 TbCatB の C α 原子に対する RMSD は 0.169 Å であった (図 4-4a, 4b). これより **1-TbCatB** 結晶の酸化処理では、全体構造へほとんど影響を与えないことが示された. また、C91-C223 部位を拡大すると、C91-C223 によるジスルフィド結合の形成を示す電子密度が得られた. **1-TbCatB** 結晶は酸化処理の有無によらず、結晶内で C91-C223 によるジスルフィド結合を形成することが示された.

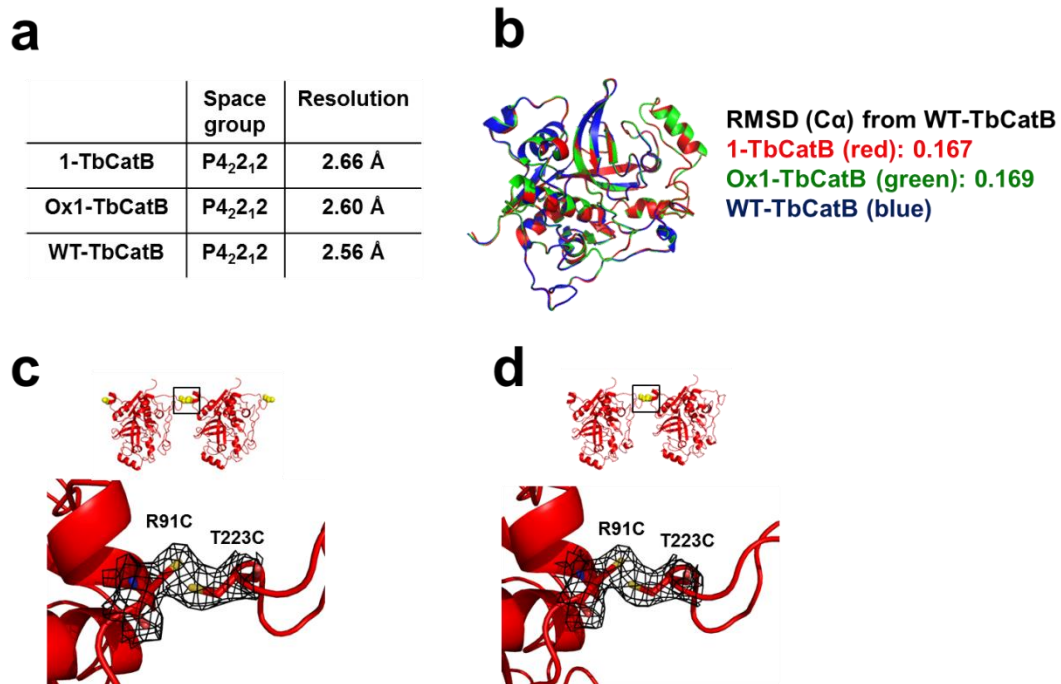


図 4-4. (a) X 線結晶構造解析の 1-TbCatB および ox1-TbCatB の空間群と分解能. (b) 1-TbCatB, ox1-TbCatB と WT-TbCatB の C α 原子の RMSD. (c, d) 1-TbCatB 結晶および ox1-TbCatB 結晶の X 線結晶構造解析. (c) 1-TbCatB 結晶内および (d) ox1-TbCatB 結晶内の R91C-T223 の周辺構造. 1.0σ における $2|F_o| - |F_c|$ 電子密度は黒で表示している.

表 4-1. 結晶構造データ

Data collection	1-TbCatB	Ox1-TbCatB
Space group	<i>P4₂2₁2</i>	<i>P4₂2₁2</i>
Crystal cell (Å)		
<i>a</i> = <i>b</i>	123.84	123.98
<i>c</i>	54.30	54.35
Resolution range (Å)	50.0–2.66	50.0–2.60
Completeness (%)	100	100
Multiplicity	6.4	6.8
Unique reflections	12644	13551
R _{meas}	0.33	0.36
I/σ	6.55	5.51
CC1/2	0.95	0.95

表 4-2. 結晶構造解析パラメータ

	1-TbCatB	Ox1-TbCatB
Resolution range (Å)	50.0–2.66	50.0–2.60
Reflection used	12067	12934
<i>R</i> -factor (%)	21.4	20.8
Free <i>R</i> -factor (%)	27.6	24.4
R.m.s. deviations from ideal		
Bond length (Å)	0.0117	0.0134
Angle (°)	1.7031	1.7906
Ramachandran plot (%)		
most favored	91.15	94.31
allowed	7.21	4.01

細胞内 TbCatB 結晶からのフィラメント構造体の切り出し

1-TbCatB, **ox1-TbCatB** 結晶を 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.5) に 37°C, 6 時間浸漬し, 溶解した蛋白質の構造を, 電子顕微鏡 (TEM) により観察した (図 4-5a, 5b). いずれのサンプルからもフィラメント構造体が観察された. フィラメント構造体の長さを測定した結果, **1-TbCatB** は 109 ± 18 nm, **ox1-TbCatB** は 174 ± 17 nm であった (図 4-5d). これより, 過酸化水素で結晶を酸化することで, 効率的に単量体間でジスルフィド結合が形成され, 均一かつ長いフィラメント構造体が形成されることが示された. フィラメント構造体を形成する単量体のサイズは 5 nm であるため, **1-TbCatB** は約 22 分子, **ox1-TbCatB** は約 35 分子の単量体が連結したフィラメント構造体を形成していることが示された (図 4-5e). また, 原子間力顕微鏡 (AFM) により **ox1-TbCatB** 結晶から切り出された構造体を観察した結果, 長さ 163 ± 21 nm, 高さ 3.0 nm のフィラメント構造体が観察された (図 4-6). 結晶構造よりフィラメント構造体の高さ 2.7 nm と良い一致を示し, **ox1-TbCatB** 結晶から目的のフィラメント構造体を切り出すことを達成した. また, **ox1-TbCatB** から切り出されたフィラメント構造体の TEM 像および AFM 像を詳細に観察すると, 2 つのフィラメント構造体が束になり集積したバンドル構造体 (幅が約 10 nm) を形成していることが分かる (図 4-7a, 7b). バンドル構造は, **1-TbCatB** 結晶を溶解し, 構造体を切り出す際にジスルフィド結合で単量体同士を連結させた界面 (図 4-7c, 右) を保持するのみならず, 結晶内特有の界面の一部 (図 4-7c, 左) が消失せずに保持されたと考えられる. 結晶溶解後も保持された一部の界面には水素結合や疎水性相互作用などの蛋白質間相互作用が消失することなく存在し, バンドル構造が形成されたと推測される.

続いて, 溶液中の単量体を酸化することによりフィラメント構造体が形成されるか確認するために, **1-TbCatB** 結晶を 1 mM DTT 溶液に 37°C, 3 時間浸漬し, 結晶内のジスルフィド結合を切断した後, 結晶を 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.5) に 37°C, 6 時間浸漬し, 単量体として溶解させた. 続いて, 溶液中の **1-TbCatB** 単量体を終濃度 1 mM H_2O_2 (100 mM 酢酸緩衝液, pH 3.5) 溶液中で 37°C, 3 時間酸化し, TEM により構造体を観察した. その結果, フィラメント構造体が観察され, その長さは, 100 ± 14 nm であった (図 4-5c, 5d). 溶液中においても C91 と C217 によるジスルフィド結合が形成され, フィラメント構造が構築されるが, **1-TbCatB**, **ox1-TbCatB** から形成されるフィラメント構造に比べ, 長さは短く, ばらつきも大きいことが示された. 以上より, C91-C217 を結晶内で架橋化することにより均一かつ長いフィラメント構造体が構築できることが示された.

同様に, **2-TbCatB** 結晶を 1 mM H_2O_2 含有 milliQ へ 37°C, 3 時間浸漬し, 結晶を酸化させた後, 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.5) に 37°C, 6 時間浸漬し, 結晶を溶解し, 切り出された構造体を TEM で観察した. その結果, フィラメント構造は観察されなかった (図 4-8b). WT-TbCatB 結晶構造データ (PDB ID: 4HWY) から K214-Q277 では, C α -C α 距離は 9.3 Å であり, ジスルフィド結合を形成するには C α -C α 距離が長すぎると考えられる

(図 4-2c). そこで, 1,2-ethylene dithiol (ED)を架橋剤として利用し, 結晶内で C214-C277 の架橋化を試みた (図 4-8a). ED の長さは 4.4 Å であり, C214-C277 (C α -C α 距離が 1.8 Å 長い), を架橋化するには十分な長さを有している. 初めに, それぞれの変異体結晶を 50 mM ED に 37°C, 1 時間浸漬し, その後, 終濃度が 1 mM になるように H₂O₂ を加え, 37°C で 3 時間浸漬した. 架橋化反応後の **2-TbCatB** 結晶を 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.5) に 37°C, 6 時間浸漬し, 結晶を溶解させた. 得られた構造体を TEM により観察した結果, 30 $\pm$ 1 nm のフィラメント構造体が観察された (図 4-8c, 8e). また, **2-TbCatB** 結晶を DTT で還元した後, 酸性溶液で溶解し (**1-TbCatB** と同様の条件), **2-TbCatB** 単量体を 50 mM ED, 1 mM H₂O₂ で溶液中で架橋し, TEM により観察した. その結果, 17.1 $\pm$ 1 nm のフィラメント構造体が観察された (図 4-8d, 8e). 以上より, **2-TbCatB** 結晶内で架橋化した方が溶液中で架橋化するより, 効率的に単量体同士が架橋され, より長いフィラメント構造体が構築されたと考えられる.

2-TbCatB 結晶に比べ, **1-TbCatB** 結晶の方がより長いフィラメント構造体を構築できた理由は, 2 つ考えられる. 1 つ目は, **1-TbCatB** の高い結晶性を有するからである. **1-TbCatB** は X 線照射により結晶構造が決定できる程の十分な回折が得られた. 一方, **2-TbCatB** では結晶構造が決定できる程の回折は得られなかった. 結晶内の単量体の配列がより規則正しい **1-TbCatB** 結晶の方が効率的に結晶内架橋反応が進行し, より長いフィラメント構造体が溶液中へ切り出せたと考えられる. 2 つ目は, **1-TbCatB** 結晶内での単量体同士の架橋化には, 架橋剤を利用せずにジスルフィド結合で架橋ができたからである. **2-TbCatB** 結晶のように架橋剤を利用すると, 効率的な架橋反応のためには結晶内に架橋剤が均一に分散する必要がある. 架橋剤を用いない **1-TbCatB** 結晶を利用した方が結晶内でより効率的に単量体同士が架橋され, 長いフィラメント構造体が切り出されたと考えられる.

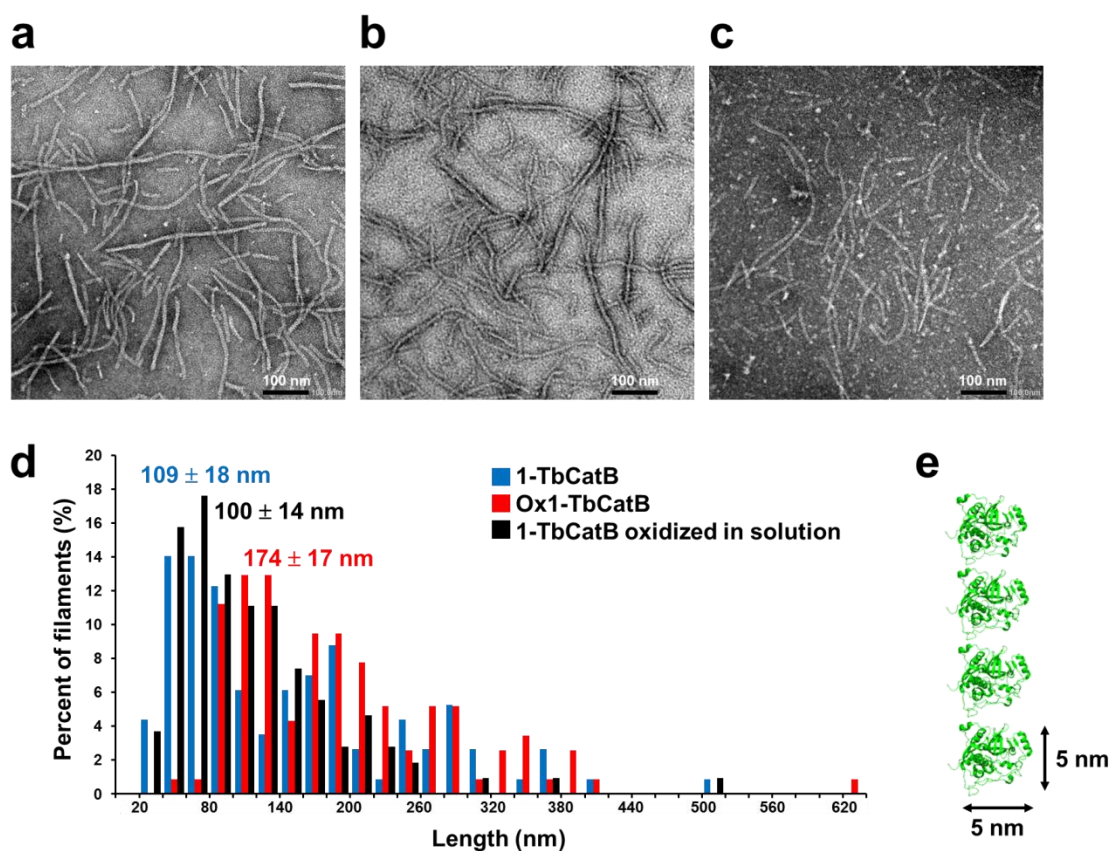


図 4-5. (a-b) TEM による各結晶から切り出された構造体の観察. サンプルは, 単量体あたり $1 \mu\text{M}$ で染色剤は 50%メチルアミンタングステン酸を使用した. (a) 1-TbCatB 結晶, (b) ox1-TbCatB 結晶から切り出されたフィラメント構造体. (c) 1-TbCatB 単量体を溶液中で酸化し, 構築したフィラメント構造体. (d) (a)-(c)で観察されたフィラメント構造体の長さの分布. (a) $N = 114$, (b) $N = 116$, (c) $N = 108$. (e) フィラメント構造体の結晶構造.

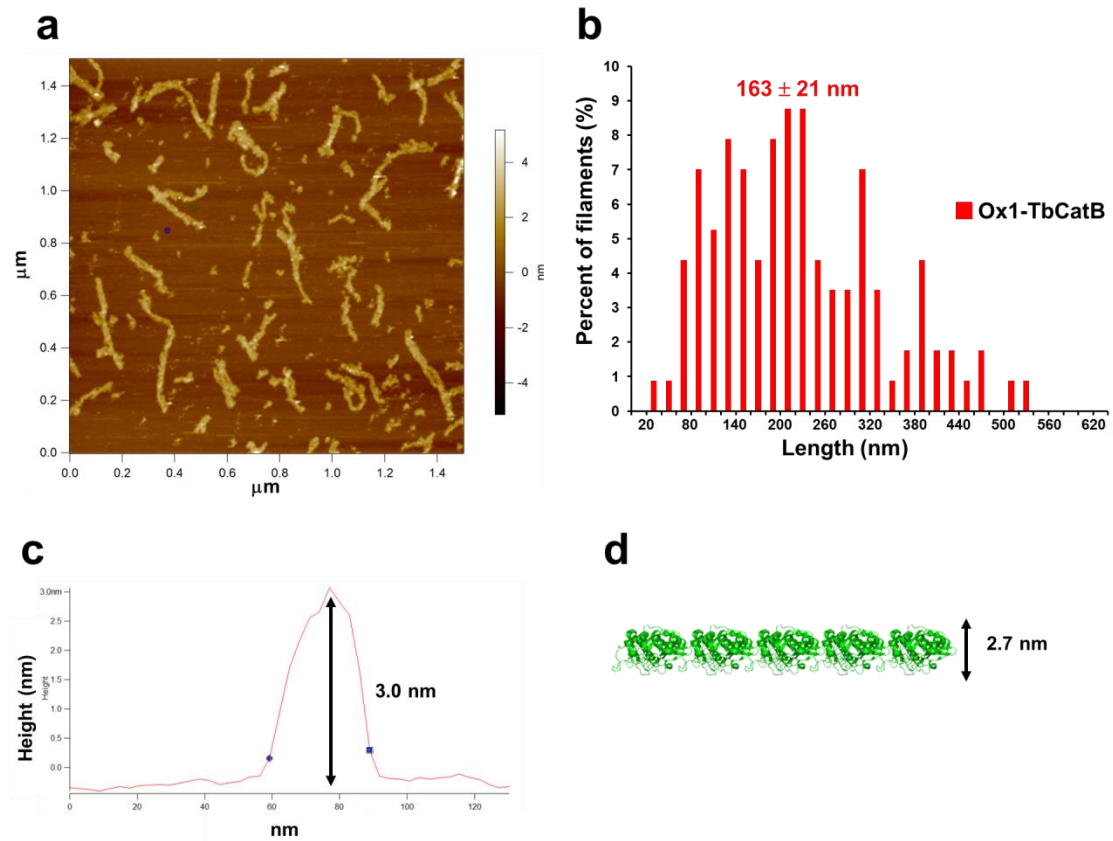


図 4-6. (a) ox1-TbCatB 結晶から切り出されたフィラメント構造体の AFM による観察図. サンプル濃度は 50 nM である. (b) (a)のフィラメント構造体の長さの分布. $N = 114$. (c) フィラメント構造体の高さプロファイル. 高さは 3.0 nm である. (c) TbCatB 結晶構造データ (PDB ID: 4HWY) を基にしたフィラメント構造体. 高さは約 2.7 nm である.

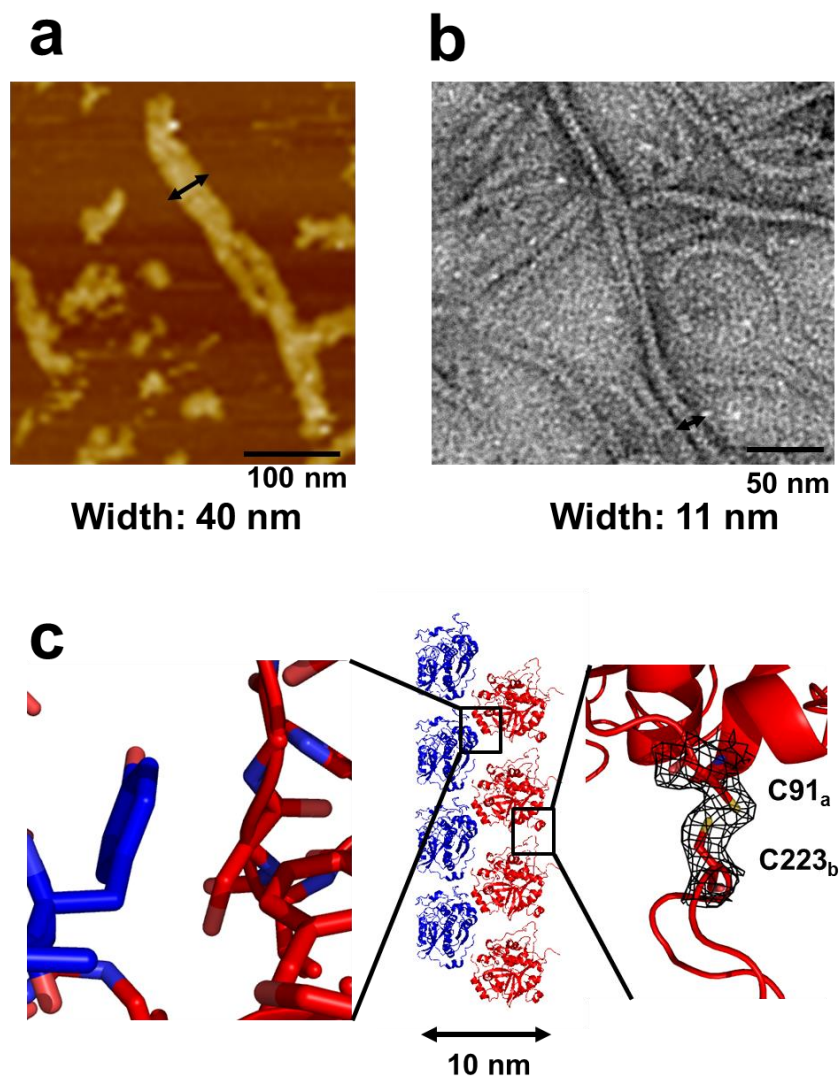


図4-7. 2つのフィラメント構造が束になり集積したバンドル構造の(a) AFM像および、(b) TEM 像. AFM 像のバンドル構造体の幅は、40 nm であり、カンチレバーの曲率半径の影響で予想されるバンドル構造体の幅 (10 nm)より大きくなったと考えられる. (c) TbCatB 結晶構造内に存在するバンドル構造体.

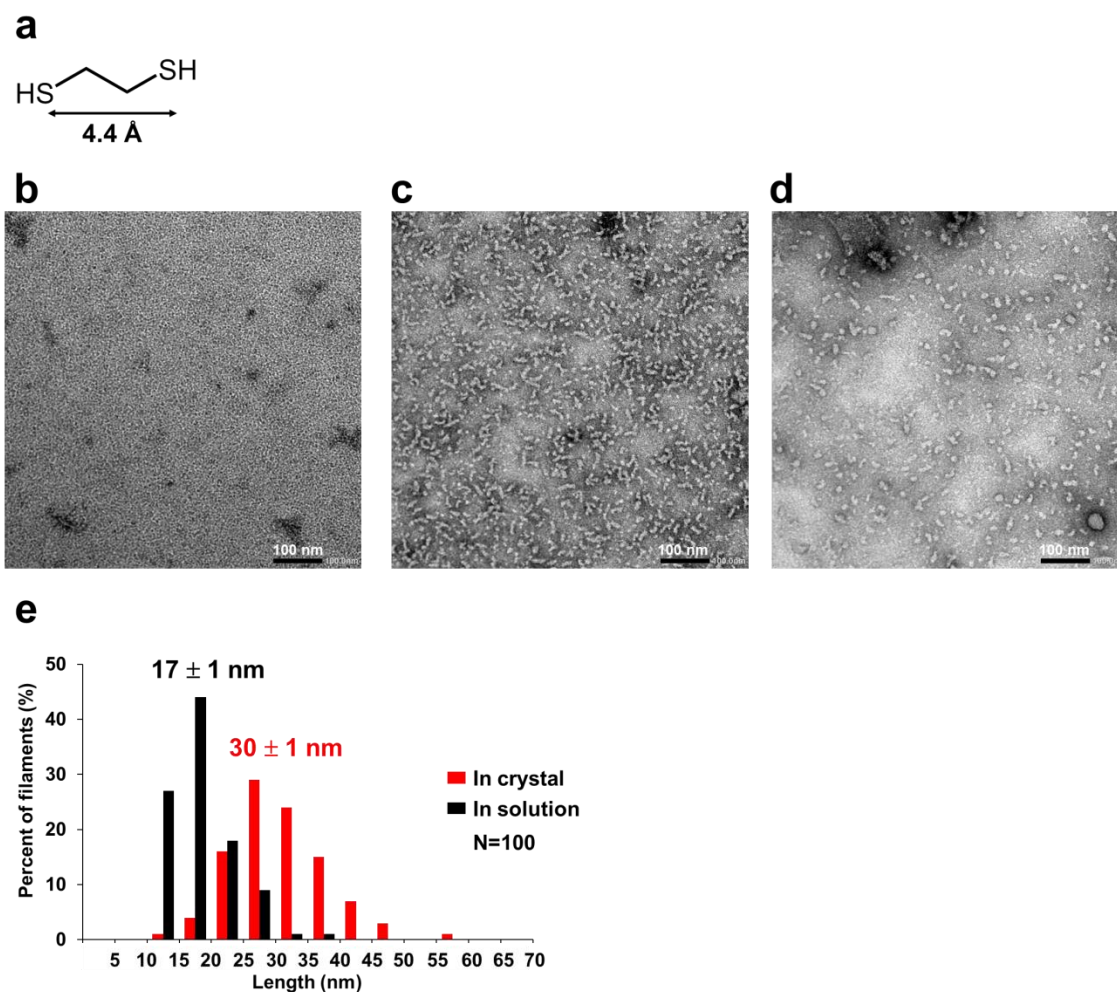


図 4-8. (a) 架橋剤 1,2-ethylene dithiol (ED)の構造と長さ. (b-d) TEM による各結晶から切り出されたフィラメント構造体の観察. サンプルは, 単量体あたり $1\ \mu\text{M}$ で染色剤は 50%メチルアミンタングステン酸を使用した. (b) ox2-TbCatB 結晶, (b) 2-TbCatB 結晶を 50 mM ED と 1 mM H_2O_2 により架橋した結晶からそれぞれ切り出されたフィラメント構造体. (c) 2-TbCatB 単量体を溶液中において架橋剤 ED で架橋し, 構築したフィラメント構造体. (d) (b), (c)で観察されたフィラメント構造の長さの分布. いずれのサンプルも $N = 100$.

4-3. 結論

TbCatB の細胞内結晶に存在する特異なフィラメント構造体を構築するため、単量体界面に Cys を導入した変異体 R91C/T223C, K214C/Q277C を設計し、昆虫細胞内での結晶化を達成した。C91/C223 結晶では、酸化処理をしなくても結晶内で単量体同士がジスルフィド結合により架橋化され、結晶を溶解するだけでフィラメント構造体が溶液中へ切り出された。一方、C214/C277 結晶では、1,2-ethylene dithiol を架橋剤として利用することにより、結晶内で単量体同士の架橋化が進行し、フィラメント構造体が切り出された。これより、細胞内蛋白質結晶を利用し、結晶内の分子界面を設計することで、結晶を溶解するだけで一次元超分子構造体が構築できることが示された。

4-4. 実験項

材料

Spodoptera frugiperda 由来の Sf9 細胞は, 10% fetal bovine serum (MP Biomedicals, Inc.), 2.6 mg/mL tryptose broth, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin を含む Grace 培地 (Gibco-BRL) を使用し, 27°C で培養した. Sf9 cells in Sf-900™ III SFM, DH10Bac™ 細胞は, Thermo Fisher Scientific から購入した. その他の試薬は, TCI, 和光, ナカライテスク, Sigma-Aldrich, Life Technologies から購入した.

TbCatB変異体の作製

野生型TbCatBの配列をpFastBac™ベクターへ導入した. pFastBac™ベクターに導入されたTbCatB変異体プラスミドは下記プライマーを利用し, 野生型TbCatBをテンプレートとし, Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) で作製した.

R91C	F: 5'-GATTCACCGAGGAAGAGGCATGCGCCCCGCTTCC-3'
	R: 5'-GGAAGCGGGGCGCATGCCTCTTCCTCGGTGAATC-3'
T223C	F: 5'-GCGATGACCCGTGCATCCCCGTTGTCAACTAC-3'
	R: 5'-GTAGTTGACAACGGGGATGCACGGGTCATCGC-3'
K214C	F: 5'-CTTTGACACGCCCTGCTGCAATTACACGTGCGATGAC-3'
	R: 5'-GTCATCGCACGTGTAATTGCAGCAGGGCGTGTCAAAG-3'
Q277C	F: 5'-CACCACGTTTCAGGATGCTATCTCGGAGGACATGCCGG-3'
	R: 5'-CCGCATGTCCTCCGAGATAGCATCCTGAAACGTGGTG-3'

各プラスミドをバキュロウイルスシャトルベクター (bacmid) を有する DH10Bac™ 細胞へ導入し, アンピシリン, カナマイシン, ゲンタマイシン含有 LB 培地で 27°C で培養し, pFastBac™ プラスミドの T7 エレメントを bacmid の mini-attTn7 部位へトランスポゾンにより移動させ, 変異体の組換え bacmid を作製した. 培養後, TbCatB 変異体の組換え bacmid を QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) で精製した. その後, 変異体の組換え bacmid DNA は Cellfectin® II 試薬により昆虫細胞 (Sf21) へ導入され, Grace 培地で 27°C で 6 時間培養した. さらに, Grace 培地を 10% fetal bovine serum 含有 Grace 培地に交換し, 27°C, 4 日間培養した. 培養後, 変異体のバキュロウイルスを含む上澄み液を回収した. Sf9 細胞内での変異体の蛋白質発現と変異体結晶の精製は, 先行研究と同様の方法で行った¹⁹.

結晶構造解析

測定を行う前に、**1-TbCatB**, **ox1-TbCatB** を 50% (w/w) エチレングリコール含有緩衝液に浸漬し、MicroMesh 上へ結晶を分散させた。続いて、サンプルを液体窒素により凍結した。各結晶の X 線回折データは、1.00 Å の波長で SPring-8 の BL32XU にて 100 K で集められた。1 つの結晶から複数の小角範囲 (5° または 10°) のデータを収集し、マージすることで高分解能で結晶構造を決定できた。まず、クライオランプ状の結晶の位置は低線量スキャンにより決定した。すべてのデータは ZOO システムにより自動的に収集され、それらのデータは KAMO システムにより自動的に処理、マージされた²²。また、XDS によりそれぞれのデータを分類し、積算した²³。野生型 TbCatB 結晶の格子定数 ($a, b \sim 124$ Å, $c \sim 54$ Å, $P4_22_12$) と良い一致を示すデータを選択し、2 つのとりうるパラメーター (hkl および hik) を検証し、TbCatB 結晶 (PDB ID: 4N4Z) とより一致する構造をとるように処理した。それぞれのデータは、強度の相関関数によって階層的なクラスターに分けられ、KAMO による各クラスターごとのはずれ値の排除と、XSCALE によるマージを行った²³。各クラスターの中で $CC_{1/2}$ が最も高いクラスターを選択し、さらなる結晶構造解析を進めた。初めに、phenix.refine による rigid body refinement を行い、PDB の 4N4Z 構造を基に構造精密化を進めた²⁴。CCP4 の REFMAC5²⁵ を利用し、**1-TbCatB**, **ox1-TbCatB** の構造を 2.66, 2.60 Å の分解能でそれぞれ決定した。COOT²⁶ を基に (2Fo-Fc) および (Fo-Fc) 電子密度マップを作成した。**1-TbCatB** および **ox1-TbCatB** は、N 末端領域 (Met1-Ala26)、ループ領域 (Lys73-Ala77) において電子密度が得られず、構造決定できなかった。各構造モデルは、構造解析を行うそれぞれの段階でオミットマップおよび RAMPAGE²⁷ により妥当であることを確認している。X 線回折データ収集、結晶構造の精密化に関する統計値はそれぞれ表 4-1, 4-2 に示した。現段階では PDB へ登録していない。

TbCatB 結晶からフィラメント構造体の構築

6×10^6 個の **1-TbCatB** 結晶を 100 μ L の 1 mM H_2O_2 含有 milliQ に 37°C, 3 時間浸漬し、結晶内ジスルフィド結合の形成を促進させた。また、 1×10^6 個の **2-TbCatB** 結晶を 100 μ L の 50 mM 1,2-ethylenedithiol 含有 milliQ に 37°C, 1 時間浸漬し、その後、終濃度が 1 mM になるように H_2O_2 を添加し、37°C, 3 時間酸化させ、結晶内で単量体同士の架橋反応を進行させた。酸化後の **1-TbCatB**, **2-TbCatB** 結晶を 2 回、100 μ L の milliQ で洗浄し、100 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.5, 100 μ L) に 37°C, 6 時間浸漬し、それぞれの結晶を溶解させた。溶解後のサンプルを遠心し、上澄み液を利用し、構造の同定を進めた。

透過型電子顕微鏡 (TEM) : TEM 観察は JEOL JEM-1400Plus で行った。1 μ M のサンプル (単量体あたり) を 50 %メチルアミンタングステン酸によりネガティブ染色し、観察を行った。

原子間力顕微鏡 (AFM)： AFM測定は、Oxford Instruments Asylum ResearchのMFP 3Dで行った。カンチレバーは、BL-AC40TS-C2 (Olympus)を使用した。50 nMのサンプルをmica上に添加し、5 h静置した後、100 mM酢酸緩衝液 (pH 3.5)で3回洗浄し、100 mM酢酸緩衝液 (pH 3.5)中のサンプルを観察した。

4-5. 参考文献

1. Luo, Q., Hou, C., Bai, Y., Wang, R. & Liu, J. Protein Assembly: Versatile Approaches to Construct Highly Ordered Nanostructures. *Chem. Rev.* **116**, 13571-13632 (2016).
2. Yang, G., Wu, L., Chen, G. & Jiang, M. Precise protein assembly of array structures. *Chem. Commun.* **52**, 10595-10605 (2016).
3. Abe, S., Maity, B. & Ueno, T. Design of a confined environment using protein cages and crystals for the development of biohybrid materials. *Chem. Commun.* **52**, 6496-6512 (2016).
4. Uchida, M., Klem, M. T., Allen, M., Suci, P., Flenniken, M., Gillitzer, E., Varpness, Z., Liepold, L. O., Young, M. & Douglas, T. Biological Containers: Protein Cages as Multifunctional Nanoplatfoms. *Adv. Mater.* **19**, 1025-1042 (2007).
5. Sinclair, J. C., Davies, K. M., Venien-Bryan, C. & Noble, M. E. Generation of protein lattices by fusing proteins with matching rotational symmetry. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 558-562 (2011).
6. Padilla, J. E., Colovos, C. & Yeates, T. O. Nanohedra: using symmetry to design self assembling protein cages, layers, crystals, and filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2217-2221 (2001).
7. Kitagishi, H., Oohora, K., Yamaguchi, H., Sato, H., Matsuo, T., Harada, A. & Hayashi, T. Supramolecular hemoprotein linear assembly by successive interprotein heme-heme pocket interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10326-10327 (2007).
8. Boyle, A. L., Bromley, E. H., Bartlett, G. J., Sessions, R. B., Sharp, T. H., Williams, C. L., Curmi, P. M., Forde, N. R., Linke, H. & Woolfson, D. N. Squaring the circle in peptide assembly: from fibers to discrete nanostructures by de novo design. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 15457-15467 (2012).
9. Matsunaga, R., Yanaka, S., Nagatoishi, S. & Tsumoto, K. Hyperthin nanochains composed of self-polymerizing protein shackles. *Nat. Commun.* **4**, 2211 (2013).
10. Mou, Y., Yu, J. Y., Wannier, T. M., Guo, C. L. & Mayo, S. L. Computational design of co-assembling protein-DNA nanowires. *Nature* **525**, 230-233 (2015).
11. Si, C. Y., Li, J. X., Luo, Q., Hou, C. X., Pan, T. Z., Li, H. B. & Liu, J. Q. An ion signal responsive dynamic protein nano-spring constructed by high ordered host-guest recognition. *Chem. Commun.* **52**, 2924-2927 (2016).
12. Biswas, S., Kinbara, K., Niwa, T., Taguchi, H., Ishii, N., Watanabe, S., Miyata, K., Kataoka, K. & Aida, T. Biomolecular robotics for chemomechanically driven guest delivery fuelled by intracellular ATP. *Nat. Chem.* **5**, 613-620 (2013).
13. Brodin, J. D., Ambroggio, X. I., Tang, C., Parent, K. N., Baker, T. S. & Tezcan, F. A. Metal-directed, chemically tunable assembly of one-, two- and three-dimensional

- crystalline protein arrays. *Nat. Chem.* **4**, 375-382 (2012).
14. Brodin, J. D., Smith, S. J., Carr, J. R. & Tezcan, F. A. Designed, Helical Protein Nanotubes with Variable Diameters from a Single Building Block. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 10468-10471 (2015).
 15. Ballister, E. R., Lai, A. H., Zuckermann, R. N., Cheng, Y. & Mougous, J. D. In vitro self-assembly of tailorable nanotubes from a simple protein building block. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3733-3738 (2008).
 16. Yang, G., Zhang, X., Kochovski, Z., Zhang, Y., Dai, B., Sakai, F., Jiang, L., Lu, Y., Ballauff, M., Li, X., Liu, C., Chen, G. & Jiang, M. Precise and Reversible Protein-Microtubule-Like Structure with Helicity Driven by Dual Supramolecular Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 1932-1937 (2016).
 17. Miao, L., Fan, Q., Zhao, L., Qiao, Q., Zhang, X., Hou, C., Xu, J., Luo, Q. & Liu, J. The construction of functional protein nanotubes by small molecule-induced self-assembly of cricoid proteins. *Chem. Commun.* **52**, 4092-4095 (2016).
 18. Sun, H., Zhang, X., Miao, L., Zhao, L., Luo, Q., Xu, J. & Liu, J. Micelle-Induced Self-Assembling Protein Nanowires: Versatile Supramolecular Scaffolds for Designing the Light-Harvesting System. *ACS Nano* **10**, 421-428 (2016).
 19. Koopmann, R., Cupelli, K., Redecke, L., Nass, K., Deponte, D. P., White, T. A., Stellato, F., Rehders, D., Liang, M., Andreasson, J., Aquila, A., Bajt, S., Barthelmess, M., Barty, A., Bogan, M. J., Bostedt, C., Boutet, S., Bozek, J. D., Coleman, C., Coppola, N., Davidsson, J., Doak, R. B., Ekeberg, T., Epp, S. W., Erk, B., Fleckenstein, H., Foucar, L., Graafsma, H., Gumprecht, L., Hajdu, J., Hampton, C. Y., Hartmann, A., Hartmann, R., Hauser, G., Hirsemann, H., Holl, P., Hunter, M. S., Kassemeyer, S., Kirian, R. A., Lomb, L., Maia, F. R., Kimmel, N., Martin, A. V., Messerschmidt, M., Reich, C., Rolles, D., Rudek, B., Rudenko, A., Schlichting, I., Schulz, J., Seibert, M. M., Shoeman, R. L., Sierra, R. G., Soltau, H., Stern, S., Struder, L., Timneanu, N., Ullrich, J., Wang, X., Weidenspointner, G., Weierstall, U., Williams, G. J., Wunderer, C. B., Fromme, P., Spence, J. C., Stehle, T., Chapman, H. N., Betzel, C. & Duszynski, M. In vivo protein crystallization opens new routes in structural biology. *Nat. Methods* **9**, 259-262 (2012).
 20. Redecke, L., Nass, K., DePonte, D. P., White, T. A., Rehders, D., Barty, A., Stellato, F., Liang, M. N., Barends, T. R. M., Boutet, S., Williams, G. J., Messerschmidt, M., Seibert, M. M., Aquila, A., Arnlund, D., Bajt, S., Barth, T., Bogan, M. J., Coleman, C., Chao, T. C., Doak, R. B., Fleckenstein, H., Frank, M., Fromme, R., Galli, L., Grotjohann, I., Hunter, M. S., Johansson, L. C., Kassemeyer, S., Katona, G., Kirian, R. A., Koopmann, R., Kupitz, C., Lomb, L., Martin, A. V., Mogk, S., Neutze, R., Shoeman, R. L., Steinbrener, J., Timneanu, N., Wang, D. J., Weierstall, U., Zatsepin, N. A., Spence, J. C. H., Fromme, P., Schlichting,

- I., Duszenko, M., Betzel, C. & Chapman, H. N. Natively Inhibited Trypanosoma brucei Cathepsin B Structure Determined by Using an X-ray Laser. *Science* **339**, 227-230 (2013).
21. Waschutza, G., Li, V., Schafer, T., Schomburg, D., Villmann, C., Zakaria, H. & Otto, B. Engineered disulfide bonds in recombinant human interferon-gamma: The impact of the N-terminal helix A and the AB-loop on protein stability. *Protein Eng.* **9**, 905-912 (1996).
 22. <https://github.com/keitaroyam/yamtbx/blob/master/doc/kamo-en.md>.
 23. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125-132 (2010).
 24. Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A., Zwart, P. H. & Adams, P. D. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.* **68**, 352-367 (2012).
 25. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240-255 (1997).
 26. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126-2132 (2004).
 27. Lovell, S. C., Davis, I. W., Adrendall, W. B., de Bakker, P. I. W., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and C beta deviation. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **50**, 437-450 (2003).

第五章

総括

本博士論文では、細胞内結晶化現象を利用し、機能性蛋白質結晶の細胞内合成と蛋白質結晶内の分子界面へアミノ酸置換による変異を導入することにより、蛋白質結晶の溶解性および溶解後の蛋白質構造体の制御を達成し、新たなバイオ材料を構築した。これらの成果を基に、将来的にはバイオ医薬品や細胞機能制御材料などの開発に蛋白質結晶が利用されることが期待できる。

第二章では、細胞内蛋白質結晶化現象を利用し、細胞内で多角体結晶へ酵素を内包することと、結晶の分子設計による溶解性制御を行った。多角体結晶構造データから結晶内分子界面の水素結合数を減少させる設計をし、野生型多角体結晶より低いpHで溶解できる変異体結晶を作製した。設計した変異体結晶はpH 8.5で溶解し、内包された酵素は活性を維持したまま溶液中へ放出することが可能となった。これより、多角体結晶の分子界面を設計し、変異体結晶を作製することで酵素の安定保存と活性を維持したまま結晶からの放出を達成し、酵素保存材料として有益であることが示された。

第三章では、多角体結晶内の分子界面をジスルフィド結合で架橋化することで、結晶内特有のかご型構造体を溶液中へ切り出すことを達成した。また、溶液中で単量体同士を架橋化するとランダムな架橋化により凝集体が形成され、かご型構造体が構築されなかった。さらに、多角体結晶の高い安定性を利用することで、乾燥に対して結晶内のかご型構造体を保持でき、乾燥後の結晶からもかご型構造体を切り出すことができた。本章の成果により、蛋白質結晶の分子設計と溶解現象を利用し、蛋白質超分子構造体の新たな構築手法を確立した。

第四章では、第三章で確立した手法をTbCatB結晶へ適用し、一次元フィラメント構造体の構築を達成した。TbCatB結晶内の分子界面をジスルフィド結合で架橋化し、結晶を溶解することで2種類のフィラメント構造体を構築した。また、Cysの導入部位によって、酸化処理をせずに自発的に結晶内ジスルフィド結合が形成され、結晶を溶解するだけでフィラメント構造体の構築を達成した。

以上より、細胞内蛋白質結晶化現象により特異に生じる分子内包や集積構造の形成を利用することで、機能性蛋白質結晶の細胞内合成を達成した。また、細胞内蛋白質結晶の分子界面に着目し、その界面に存在する蛋白質間相互作用を設計することで、結晶溶解性や溶解後の蛋白質構造体を制御でき、新たな機能を付与することができた。本研究の手法を数万種類におよぶ既存の蛋白質結晶に適用することで、目的の機能を有する蛋白質結晶が、特定の外部刺激に応答して溶解し、溶液中で特異な超分子構造体を形成することで機能を発現でき、機能性材料としての応用が期待される。

謝辞

本博士論文は、2012 年 4 月から 2018 年 3 月まで上野隆史教授のご指導の下、蛋白質結晶の分子設計による超分子構造体の創製に関する研究を基に作成した。本研究は、東京工業大学大学院 生命理工学研究科 生体分子機能工学専攻において行い、得られた成果である。本専攻には、様々な研究施設をご提供して頂き、研究活動を進めることができた。この場を借りて御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、研究に関する多大なご指導やご助言、論文執筆、学会発表などに関する貴重なご助言をして頂いた東京工業大学の上野隆史教授に深く感謝申し上げます。また、研究に関する多大なご指導やご助言、論文執筆、学会発表、実験などに関してご指導、ご助言をして頂いた東京工業大学の安部聡助教に深く感謝申し上げます。

多角体結晶の実験を進めるにあたり多くのご助言をして頂いた京都工芸繊維大学の森肇教授に深く感謝申し上げます。X 線結晶構造解析に関するご指導、ご助言をして頂いた理化学研究所, SPring-8 の平田邦生博士, 山下恵太郎博士に深く感謝申し上げます。また、X 線結晶構造解析や論文に関するご助言をして頂いた Monash 大学の Fasséli Coulibaly 博士, Marion Boudes 博士に深く感謝申し上げます。

透過型電子顕微鏡による測定に関してご指導、ご助言して頂いた東京工業大学技術部 バイオ部門の池田桂子様に感謝申し上げます。また、MALDI-TOF MS 測定においてご助言して頂いた小泉公人様に感謝申し上げます。変異体の DNA シーケンスチェックでお世話になったすずかけ台分析部門の方々に感謝申し上げます。

学部 4 年から博士 3 年までの 6 年間、事務手続きなどで大変お世話になった東京工業大学、上野研究室秘書の田中敬子様、研究、実験などを行ううえで大変お世話になった上野研究室メンバーの方々に深く感謝申し上げます。

2015 年 4 月から 2018 年 3 月まで研究活動や生活に関して金銭的に多大な援助をして頂いた日本学術振興会に深く感謝申し上げます。

最後に、博士課程進学に対し、ご理解して頂き、3 年間研究活動に専念できる環境をご提供して頂いた両親の根岸努様、根岸しげ子様に深く感謝申し上げます。

2018 年 3 月

根岸 走

発表論文

- 1) Satoshi Abe, Hiroshi Ijiri, **Hashiru Negishi**, Hiroyuki Yamanaka, Katsuhito Sasaki, Kunio Hirata, Hajime Mori, Takafumi Ueno Design of Enzyme-Encapsulated Protein Containers by In Vivo Crystal Engineering. *Adv. Mater.*, 2015, 27, 7951-7956. DOI: 10.1002/adma.201503827 (第二章)

- 2) **Hashiru Negishi**, Satoshi Abe, Keitaro Yamashita, Kunio Hirata, Kento Niwase, Marion Boudes, Fasséli Coulibaly, Hajime Mori, Takafumi Ueno Supramolecular protein cages constructed from a crystalline protein matrix *Chem. Commun.*, 2018, 54, 1988-1991. DOI: 10.1039/c7cc08689j (第三章)