

## 論文の内容の要旨

論文題目 重合性蛋白質の設計に基づく機能性蛋白質高次構造体の創製

氏名 松長 遼

### 1. 序論

蛋白質は生命活動の基礎となる多機能分子である。蛋白質の担う多様な役割のなかで、生物材料における蛋白質に着目した。例えば、ヒトの毛髪はケラチン繊維が他の構成蛋白質群と架橋して形成され、甲殻類の外骨格ではキチン繊維に結合した蛋白質が炭酸カルシウムの結晶成長を制御し強靱な複合材料が形成される。しかしながら、このような構造蛋白質を工学的観点で研究した例は多くない。生物を模倣し、蛋白質を材料として利用することができれば、酵素などの機能性蛋白質を含有させたり、環境に応じて構造を変化させたり、異質な材料と特異的に接着したりするといった無機物質や合成有機高分子では実現できないような特異な性質を付与し、医用材料等の高機能なソフトマテリアルとしての応用が期待できる。そこで、ボトムアップアプローチによる機能性蛋白質高次構造体の構築を目標とした。

蛋白質を重合することができれば、機能性蛋白質を融合することで新奇な機能性ポリマーを創製することが可能になると予想される。これまでも、アミロイドやコラーゲンなど多量化して線維を形成するような蛋白質（ペプチド）は知られているが、複雑な積層構造を有するために均一な径や表面構造を有した線維を形成する蛋白質を人工的に予測して設計することは困難である。したがって、本研究では単純に直列に相互作用して重合するような蛋白質を設計することにした。

鋳型とするモノマー蛋白質として、レンサ球菌の線毛に着目した。線毛は蛋白質サブユニットが酵素を触媒として重合することで形成される。直径は2-5 nmと非常に細い一方で、長さは最大で4  $\mu\text{m}$ に達する。線毛は凝集せずに伸長した構造をとることから、線毛構成蛋白質はモノマー骨格として最適であると判断した。

化膿レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* の線毛構成蛋白質である Spy0128 は現在までに構造や物性について詳細な解析がなされている。この分子内にはイソペプチド結合とよばれるアミノ酸側鎖どうしの共有結合が存在する。この結合はフォールディングの

過程で自発的に形成され、構造の安定化に大きく寄与する。結合はLys-Asn間で形成され、結合形成には触媒残基であるGluと疎水的環境が必須である。近年の報告で、イソペプチド結合を形成する、Asnを含むC末端の $\beta$ ストランド (Isopeptag) とLysを含む残りの部分でSpy0128を2つに分割し、それぞれを別々に発現・精製して試験管内で混合すると、野生型の構造を再生するようにして自発的に2分子間で共有結合を形成することが明らかにされている。本研究では、この相補的反応対からなる「Isopeptagシステム」を利用して自発的に重合するような蛋白質を設計することにした。

## 2. 実験結果と考察

両端にIsopeptagシステムの相補的反応対を有するような改変蛋白質を設計することができれば、重合能を人工的に創出できると予想される。しかしながら、Isopeptagシステムの反応対は自発的に反応することから、重合反応をいかに制御するかが課題となる。環境変化により開閉を制御できるペプチドの「蓋」で結合ポケットを覆うことができれば、溶媒環境による反応性の制御が可能になるという仮説を立てた。そこで、Spy0128のC末端のペプチド配列 (Isopeptag) をN末端に移動し、代わりにそれにより生じたC末端の空洞 (Isopeptag結合ポケット) を覆うような蓋を導入した蛋白質を設計することにした。酸化還元環境によって蓋の開閉を制御するため、蓋とその隣のストランドにCysを導入し、ジスルフィド結合を形成するような分子種を設計した。酸化環境ではジスルフィド結合により蓋が固定され活性部位が被覆されるために重合反応が起きず、還元環境では結合が開裂して重合反応が開始されることが予想される。このように設計した蛋白質を、互いを強固にリンクすることができるという性質に着目して、Protein shackleと名付けた。

大腸菌で発現させ、精製したProtein shackleを酸化環境と還元環境に置いた。その結果、酸化環境でもわずかに反応が観察されるものの、還元環境で著しく重合反応が進行することが確認された。重合は経時的に進行し、酸化還元環境を切り替えることで、反応のON/OFFを制御することが可能であることもSDS-PAGEから確認された。多角度光散乱検出器 (MALS) を用いたAsymmetric Flow Field Flow Fractionation (AF4) 測定により分子量分布を測定したところ、高分子量側に裾の長い縮合重合様のなだらかな形状の分布を得た (モノマー35 kDaに対して24 h反応サンプルで100-2000 kDa程度)。また、示差走査熱量測定 (DSC) により、重合によって変性中点温度71 °Cの熱安定な構造を形成することが示された。

原子間力顕微鏡 (AFM) によりポリマーの形態観察を行った。マイカ基板に吸着させ乾燥状態で測定をしたところ、高さ1 nm、長さ数百nmの柔軟な形状の線維状構造体 (Nanochain) が多数確認された。さらに拡大して観察したところ節目のようなくびれが構造体中に見られ、実際にモノマー粒子が連なってNanochainが構成されていることが確認できた。

続いて、Protein shackleの重合反応機構の解析を行った。サブユニット間の特異的な非共有結合性相互作用が反応速度を向上させているという仮説を証明するため、相互作用界面内の2箇所の残基にそれぞれ変異を加えた単変異体、P108EとW141Aを作製した。SDS-PAGEによる反応速度解析の結果、変異によりIsopeptag自体との反応性は損なわれないものの、重合速度が大きく減少することが明らかになった。また、AF4-MALS測定により、非還元環境における非共有結合性会合体の形成が強く示唆された。これらの実験結果より、非共有結合性会合体が重合反応を促進する反応モデルが推定された。また、これらの変異体ポリマーはAFM測定において線維状構造体が観察されなかったことから、形態安定性の観点からもサブユニット間界面の相互作用が必須であることが示された。

Protein shackleの基本設計が確立されたので、機能性蛋白質の融合による機能性高次構造体の創製に着手した。はじめに、Protein shackleのN末端に緑色蛍光蛋白質GFPを融合した蛋白質を合成したところ、GFP由来の蛍光能を維持したまま重合反応が進行することが明らかになった。この結果より、Protein shackleが、立体構造を維持したまま機能性蛋白質を配置することのできる足場として有用であることが示された。

そこで、分子認識能を有するペプチドとしてコイルドコイルヘテロダイマーを形成するペプチド対の片方をProtein shackleのN末端に融合し、もう片方のペプチドへの結合能を重合度を変化させて比較した。表面プラズモン共鳴法 (SPR) による分子間相互作用解析の結果、重合により結合能が上昇することが確認された。したがって、検出試薬として利用される分子認識ペプチド・蛋白質の結合能を向上させる足場蛋白質としての応用が可能であることが示された。

また、Protein shackleを固定化したヒドロゲルの創製を試みた。担体となる高分子材料と機能性蛋白質を繋ぐ足場としてProtein shackleを利用することで、蛋白質の有する多様な機能を付与したマクロ材料を簡便に創製することが可能になる。具体的には、合成有機高分子からなるヒドロゲルを構成するポリマー鎖からProtein shackleポリマーを生長させる方法を開発した。Isopeptag結合ポケットを有する蛋白質のN末端にCysを導入し、そのチオール基と*N,N'*methylenebisacrylamideを反応させることで、アクリルアミド基を有したIsopeptag結合性蛋白質を用意した。これをポリアクリルアミドゲルを作製するための反応液に混合して共重合させることで、Protein shackleを通じて機能性蛋白質を固定化可能なヒドロゲルを作製した。このゲルをGFP融合Protein shackleを含む反応液に含浸したところ、GFP由来の蛍光によりProtein shackleが修飾されたことを確認した。

### 3. 結論

本研究では、ジスルフィド結合でロックされる蓋により結合ポケットが覆われた直列に相互作用し重合する蛋白質Protein shackleを開発した。この蛋白質により構成され

るポリマーは、高い熱安定性と溶解性を有し、遺伝子融合による機能性蛋白質の修飾が可能である。したがって、これらの性質を利用した材料創製が期待される。本研究においては、分子認識ペプチドの機能を増強する足場材料としての応用やヒドロゲルへの融合について検討した。今後、酵素や抗体、無機材料結合性ペプチドや細胞接着性ペプチド等の機能性ペプチド・蛋白質を融合することで、任意の機能を有した高機能材料を創製する研究へと展開していくことが期待される。