

平成 28 年度

博士論文

タンパク質の多量体形成を利用した
ナノ構造体構築に関する研究

宮本 昂明

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科
超分子集合体科学研究室

目次

第 1 章

序論

1-1. 自然界に存在するタンパク質ナノ構造体のトポロジーと機能	1
1-2. タンパク質ナノ構造体の応用研究	4
1-3. 人工タンパク質ナノ構造体の構築	5
1-3-1. コンピューターデザイン	
1-3-2. 対称性に基づく融合タンパク質の多量体形成	
1-3-3. 金属配位	
1-3-4. ドメインスワッピング	
1-3-5. その他の手法によるタンパク質ナノ構造体の構築	
1-4. 本研究の目的	14
1-5. 本論文の構成	14
参考文献	15

第 2 章

ドメインスワップしたシトクロム cb_{562} 2 量体によるタンパク質ナノケージ構築

2-1. 導入	18
2-2. 実験方法	19
2-3. 実験結果	23
2-3-1. cyt b_{562} 量体および cyt cb_{562} 量体の形成と安定性	
2-3-2. cyt cb_{562} 量体の吸収および CD スペクトル	
2-3-3. cyt cb_{562} 量体の酸化還元電位	
2-3-4. cyt cb_{562} 量体の熱力学的特性	
2-3-5. cyt cb_{562} 量体の結晶構造	
2-3-5. cyt cb_{562} 量体と Zn^{2+} の溶液中での相互作用	
2-4. 考察	35
2-5. 本章の結論	41
参考文献	42

第3章

3 ヘリックスバンドルタンパク質で 2 種類の多量体形成タンパク質を連結した融合タンパク質によるナノ構造体構築

3-1. 導入	45
3-2. 実験方法	46
3-3. 実験結果	48
3-3-1. 3MLI-1BR0-1WRS の設計戦略	
3-3-2. リフォールディングにより得られた 3MLI-1BR0-1WRS の多量体形成	
3-3-3. 3MLI-1BR0-1WRS の 4 量体溶液構造	
3-3-4. 3MLI-1BR0-1WRS 4 量体の高速原子間力顕微鏡 (AFM) 観察	
3-4. 考察	55
3-5. 本章の結論	57
参考文献	58

第4章

結論

4-1. 結論	59
4-2. 今後の展望	60
謝辞	61
目録	62

第 1 章 序論

1-1. 自然界に存在するタンパク質ナノ構造体のトポロジーと機能

タンパク質は生命活動の根幹を担う生体高分子であり、多様な構造と機能を有している。タンパク質には1個のポリペプチド鎖からなる単量体として機能を発揮するものもあるが、多くのタンパク質は複数のポリペプチド鎖の会合により複合体を形成する。タンパク質が複合体を形成する利点として、アロステリック制御、安定性の向上、翻訳エラーの低減などが挙げられる¹。しかし、複合体形成の最も重要な利点の1つは、タンパク質が複雑なトポロジーを形成することにより構造と連動した高度な機能を発揮できることである。事実、自然界に存在するタンパク質は、ナノスケールで制御されたリニアー、リング、チューブ、ケージなどの多様な構造体を形成することにより、生命活動に欠かせない重要な役割を担っている²。

リニアー型のタンパク質構造体の例として、コラーゲンやアクチンが挙げられる。コラーゲンは哺乳類に最も多く存在するタンパク質であり、3つのポリペプチド鎖からなる特徴的な3重らせん構造を取る (**Figure 1-1, A**)³。コラーゲンの3重らせんを構成するポリペプチド鎖は、3残基ごとに Gly が配置される繰り返し配列 (Gly-Xaa-Yaa, Xaa と Yaa は任意のアミノ酸) を有する。コラーゲンは様々なタイプに分類されるが、その多くはさらなる自己集合によりコラーゲン繊維を形成する。コラーゲン繊維は構造タンパク質として動物の結合組織に広く分布し、組織形態の維持や機械的強度の付与に重要な役割を果たしている。一方、アクチンは真核細胞に最も多く存在するタンパク質の1つであり、複数のアクチン分子が集合することで繊維状のアクチンフィラメント (F-アクチン) を形成する (**Figure 1-1, B**)⁴。アクチンは細胞骨格を構成するほか、細胞分裂や筋収縮にも関与する。

リング型のタンパク質構造体は、DNA と相互作用して機能を発揮するものが多い。DNA クランプは DNA 複製に不可欠なリング状のタンパク質であり、リング中央の穴に2本鎖 DNA を通す様式で結合して DNA 上をすべるように移動する。DNA クランプは DNA ポリメラーゼとも強く結合し、ポリメラーゼを鋳型 DNA 鎖上につなぎとめることで、複製の速度および持続時間を向上させる⁵。DNA クランプの機能はリング構造と密接に関わっており、多くの生物種でクランプのリング構造が保存されている。また、大腸菌由来 β クランプでは、リングの内側に正電荷が集中しており、水分子を介して DNA 鎖と相互作用していることが分かっている (**Figure 1-1, C**)⁶。リング構造を持つ DNA 結合タンパク質のもうひとつの例としてヘリカーゼが挙げられる (**Figure 1-1, D**)。ヘリカーゼは、1本鎖 DNA を取り囲み2本鎖 DNA を1本鎖にほどこきながら DNA 上をスライドする。ヘリカーゼは様々な生物種に広く保存されており、DNA 複製や組換えなどの場面で働く⁷。

チューブ形状を持つタンパク質構造体は、細胞膜を貫通するチャネルとして細胞内外への物質輸送に働くものが知られている。炭疽菌防御抗原は、炭疽菌が産生する3種の外毒素のうちの一つであり、残り2つの外毒素である浮腫因子および致死因子を標的細胞内へ送り込む役割を担っている⁸。防御抗原は標的の細胞膜上で7量体を形成し、浮腫因子と致死因子とともにエンドサイトーシスを介して小胞として細胞内へ取り込まれる。小胞内のpH低下がトリガーとなり、防御抗原7量体は小胞膜を貫通するチューブ状のポアへと構造が変換される (**Figure 1-1, E**)。このポアがチャネルとして働き、小胞内の浮腫因子と致死因子を効率よく細胞質へと輸送する。チューブ状タンパク質構造体には、ウィルスの宿主への感染に関与するものもある。バクテリオファージφX174が持つHタンパク質はコイルドコイル構造の10量体として存在し、長さ170 Å、幅48 Åのチューブを形成する (**Figure 1-1, F**)⁹。Hタンパク質が形成するチューブも炭疽菌防御抗原と同様にチャネルとして働き、ファージのDNAを宿主細菌に注入するために利用される。Hタンパク質チューブの内部は負に帯電しているが、Gln, Asn, Arg 残基も点在しており、これらの残基がDNAの輸送を促進していると考えられている。

タンパク質で構成されるケージの多くは、中空構造を活かして毒性の高い物質を内部空間に取り込み外部環境から隔離する、あるいは不安定な物質を内包して保護する役割を担う。天然タンパク質ケージには、フェリチンやウィルスキャプシドがある。フェリチンは多くの生物種に普遍的に存在し、細胞内での鉄元素の無毒化と貯蔵に寄与している。具体的なフェリチンの役割は、細胞毒性の高いFe²⁺を内部空間へと取り込み、酸化反応によりFe²⁺をFe³⁺に変換した後、毒性の低いフェリハイドライト(5Fe₂O₃•9H₂O)結晶の形で鉄原子を貯蔵することである¹⁰。フェリチンには、24のサブユニットが集合してケージを形成するマキシフェリチンの他に (**Figure 1-1, G**)、12のサブユニットでケージが構成されるミニフェリチン(Dps)も知られている¹¹。ウィルスキャプシドの約半数は球状のケージ構造を持ち、そのほとんどが正二十面体対称を有している。キャプシドの機能は、ウィルスゲノムを内包することで外部環境から保護し、宿主細胞へと運搬することである。いくつかのキャプシドは、自己集合により正しくケージを形成するために、足場となる核酸や別のタンパク質を必要とする。これに対して、ササゲクロロティックモットルウイルス(CCMV)はキャプシド形成に核酸や足場タンパク質が不要で、正二十面体構造のウィルスとして初めて *in vitro* でのキャプシド形成が報告された (**Figure 1-1, H**)¹²。CCMVキャプシドの自己集合は、5つの2量体からなる多量体の形成から始まり、この核となる多量体に2量体が次々と会合していくことで180のサブユニットからなるキャプシドが組み立てられる¹³。このキャプシド形成は、多数の可逆的なプロセスの集積から成り、1つ1つのサブユニット間の相互作用は弱いことが分かっている。これらの特徴は、速度論的にトラップされたキャプシド中間体を減少させ、正確なキャプシドの構築に有利に働くと考えられている。

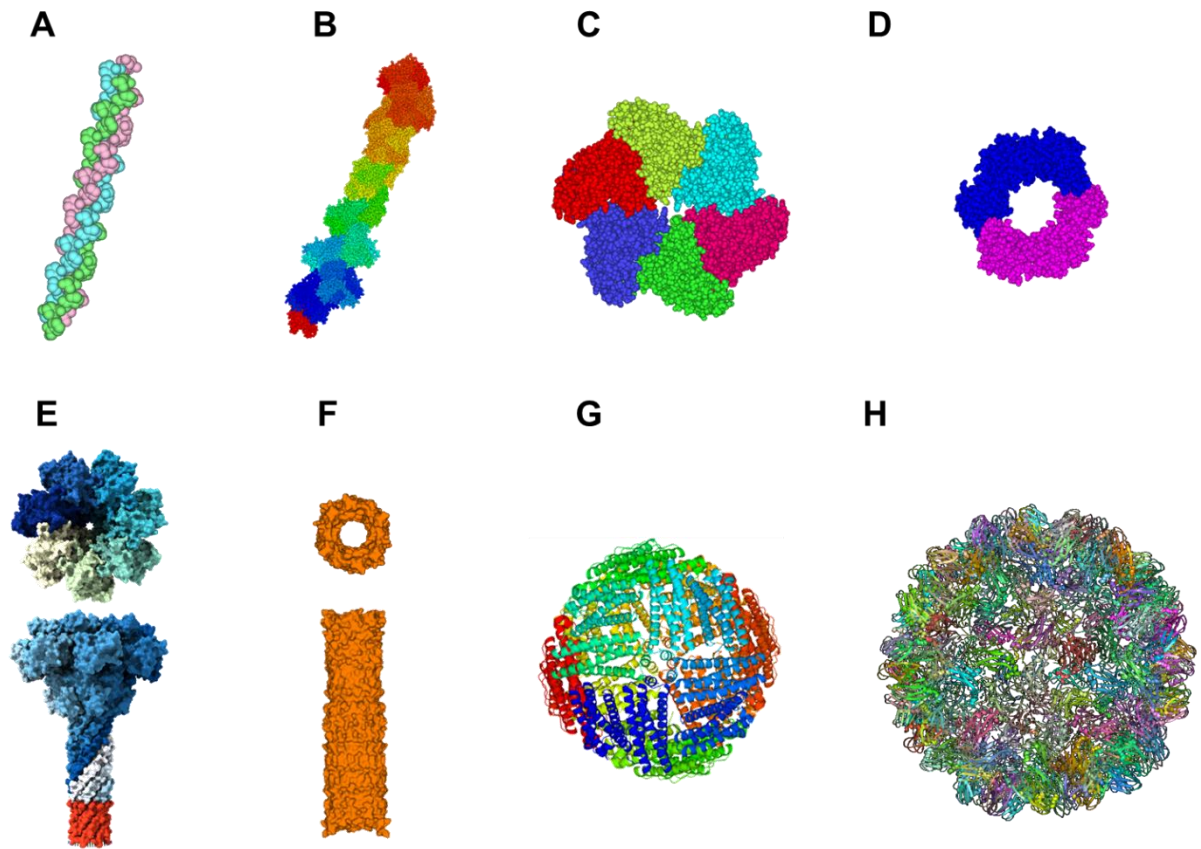


Figure 1-1. 自然界に存在するタンパク質ナノ構造体。(A) コラーゲン (PDB:3B0S)。(B) F-アクチン (PDB:3MFP)。(C) 大腸菌由来 β クランプ (PDB:2POL)。(D) バクテリオファージ T7 gp4 ヘリカーゼ (PDB:1E0K)。(E) 炭疽菌防御抗原 (PDB:3J9C)。(F) バクテリオファージ ϕ X174 由来 H タンパク質 (PDB:4JPP)。(G) マキシフェリチン (PDB:1BFR)。(H) CCMV キャプシド (PDB:1CWP)。

1-2. タンパク質ナノ構造体の応用研究

1-1 節で述べたように、自然界に存在するある種のタンパク質は、複合体を形成してナノサイズの秩序だった構造を作り出すことにより、単独の分子では達成できない高度な機能を発揮している。タンパク質ナノ構造体は、水溶性、生体適合性、生分解性に優れるほか、遺伝子工学や化学修飾など機能改変のための手段が豊富に存在する。また、有限のタンパク質ナノ構造体では、構造体を構成するサブユニットが精密に配置されることで、会合数（サブユニットの数）、サイズ、形状が一義的に決まった構造体が形成される。これらの魅力的な特性を活かして、タンパク質ナノ構造体を次世代のナノ材料として様々な分野に応用する試みがなされている。

シルクタンパク質のフィブロインは機械的強度に優れる繊維を形成し、なおかつ生体適合性や生分解性を有する。これらの特性は組織培養のための足場材として重要であるため、フィブロイン繊維は再生医療分野でよく研究されている¹⁴。タバコモザイクウイルス (TMV) のキャプシドはらせん状のチューブ様構造や2層からなるディスク構造を取るが、この構造変化は溶液中の pH やイオン強度によりコントロールできる¹⁵。すなわち、TMV キャプシドは特定の条件下では決まったサイズ・形状の構造を形成する。TMV キャプシドは、新規なナノデバイスを開発する目的で、金属粒子をナノスケールで規則正しく配列するためのテンプレートとして利用されている¹⁶⁻¹⁸。また、タンパク質ケージは薬物送達キャリアとしての応用が期待されることから、医療分野で広く注目を集めている¹⁹。天然のタンパク質ケージの多くは受容体を介したエンドサイトーシスに最適な 10–100 nm の大きさを持ち、薬物を内包して外部環境から隔離・保護するための内部空間を有する。また、タンパク質ケージを遺伝子工学あるいは化学修飾により改変することで、薬物の担持・放出の調節および標的指向性の付与などの機能化が容易に行えることも利点の1つである。単分散の粒子として得られるタンパク質ケージは、ロットごとのばらつきも少なく、優れた薬物送達キャリアに成り得る。

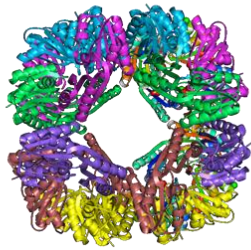
上述のように、タンパク質ナノ構造体の応用研究では、天然のタンパク質を目的に合わせて改変することが多い。しかし、利用できる天然のタンパク質ナノ構造体には限りがあり、望みの特性を持つ構造体が自然界に存在しないこともあり得る。新しい構造体を供給するために、タンパク質に基づくナノ構造体を人工的に構築する手法が求められている。

1-3. 人工タンパク質ナノ構造体の構築

1-3-1. コンピューターデザイン

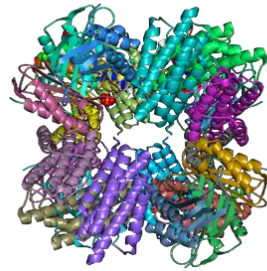
サブユニットとなるタンパク質に適切な相互作用界面を設計することができれば、自己集合による任意の構造体の構築が可能となる。David Baker らのグループは、計算機を利用したタンパク質デザインにより種々の多面体型ケージを人工構築することに成功している (**Figure 1-2**)²⁰⁻²³。その手法はタンパク質デザインに特化したソフトウェア Rosetta を用いたものであり、以下に要約される。(1) ビルディングブロックとして用いる多量体 (2, 3, あるいは 5 量体) 形成タンパク質を Protein Data Bank に結晶構造が登録されているものの中から選定する。回転対称性の有無, 結晶構造の分解能の高さ, アミノ酸残基数, 大腸菌発現系を利用可能かなどの観点から候補タンパク質が選定される。(2) ターゲットの多面体構造が持つ C_2 , C_3 , あるいは C_5 対称軸上にビルディングブロックの 2, 3, あるいは 5 量体タンパク質をそれぞれ配置して, ビルディングブロックの空間配置が最適化されるようにドッキングシミュレーションを行う。ドッキングでは, 対称軸上に置かれたビルディングブロックの自由度を軸周りの「回転」と軸に沿った「並進」の 2 つに制限して計算が行われる。これにより, 異種のビルディングブロック間でコンタクトし, なおかつタンパク質の固定された領域上にあるアミノ酸残基数が最大になる空間配置が計算される。(3) ドッキングにより得られたビルディングブロック間の相互作用界面について, ターゲットの多面体構造が最安定化されるようにアミノ酸配列を設計する。このプロセスではまず, 変異を導入する位置が選ばれ, Rosetta に実装されたスコア関数により最適なアミノ酸残基が導入される。ここでは, 変異させるアミノ酸残基数が多くなりすぎないようにフィルターが設定され, 最終的には目視による確認も行われる。エネルギー評価に用いられるスコア関数は, i) 界面の相互作用で得られる結合エネルギー, ii) 界面の形状相補性, iii) 界面において内部に埋まっている水素結合を形成していない極性残基の数, iv) 界面のサイズなどに基づく。上述のプロセスを経て選ばれたスコア上位のデザインタンパク質のうち, 数個が狙い通りの多面体型ケージを形成していることが確認された。この設計法の特筆すべき点は, 計算機上でデザインされた構造が X 線結晶構造解析で解かれた構造とほとんど一致していたことであり, 計算機を利用することで原子レベルの正確さで人工タンパク質ケージが構築できることを示している。一方で, この設計法の欠点は, 大規模計算に耐える計算資源が必要なため汎用性に欠けることである。また, 新たな相互作用界面を作り出すために疎水性のアミノ酸残基が多く導入されるため, デザインしたタンパク質の多くが発現の際に大腸菌内で封入体を形成することも問題となっている。コンピューターデザインでは, 1 つのターゲット構造につき数万から数十万の候補構造を生成するが, スコア上位の数十個の候補を選択しても狙いの構造体の構築に成功する確率は 10% にも満たない。

Tetrahedron



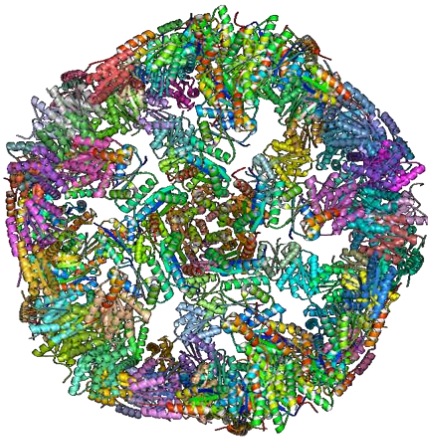
PDB: 4DDF

Octahedron

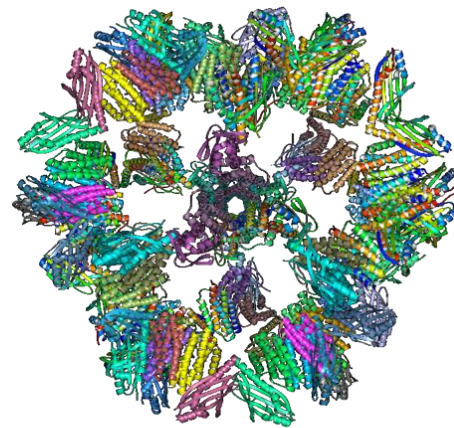


PDB: 4NWQ

Icosahedron



PDB: 5IM4



PDB: 5IM6

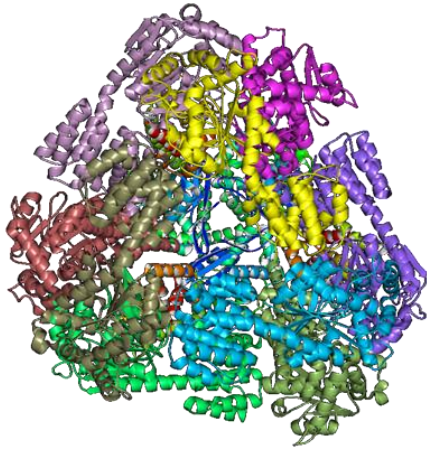
Figure 1-2. コンピューターデザインにより構築された多面体型タンパク質ケージ。

1-3-2. 対称性に基づく融合タンパク質の多量体形成

2001年に Todd O. Yeates らのグループは、2量体タンパク質と3量体タンパク質を α ヘリックスリンカーで連結した融合タンパク質を設計することにより、リニアなフィラメント構造体と四面体のケージ構造体が構築できることを報告した²⁴。この報告では、所望の構造体だけではなく様々な構造体が不均一に形成されることが課題であった。しかし、2012年には α ヘリックスリンカーの安定性に関与するアミノ酸残基を変異させることで、12のサブユニットから成る四面体ケージを選択的に構築し、X線結晶構造解析により原子レベルで構造を立証した (**Figure 1-3, 左**)²⁵。その後、Yeates らは同様の設計戦略により、24のサブユニットから成る多孔性の立方体型ケージを構築することにも成功している (**Figure 1-3, 右**)²⁶。この設計法の要諦は、剛直な α ヘリックスリンカーにより2量体タンパク質と3量体タンパク質の相対的な配置を固定することにある。これにより、2量体タンパク質部位の C_2 対称軸と3量体タンパク質部位の C_3 対称軸が一定の角度で交差することになり、望みの対称性を持つケージ構造が形成される。1-3-1項で述べたコンピューターデザインによる構築法と比較して、Yeates らの手法はビルディングブロックのタンパク質に新たな相互作用界面を設計する必要がない点で優れている。一方で、この手法では、融合タンパク質の α ヘリックスリンカー部位の不安定性により、意図しない構造体が形成されることがある²⁷。実際に、24量体の立方体型ケージを構築した報告では、意図しない18および12量体が50%を超える割合で溶液中に存在することが明らかになっている²⁶。また設計の都合上、融合タンパク質の構成要素として利用できる多量体形成タンパク質は、末端に α ヘリックス構造を持つものに制限され、構築できる構造体も限定的である。

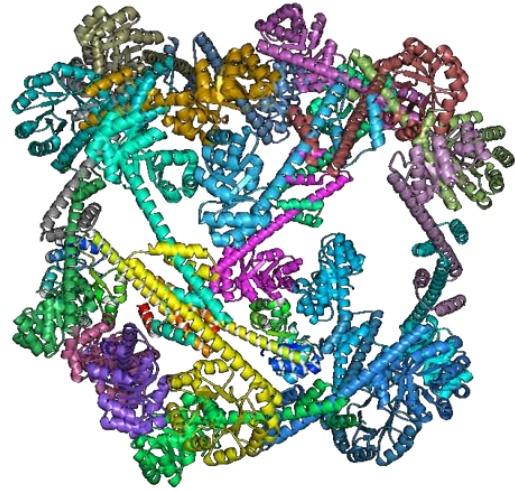
2種類の多量体形成タンパク質をフレキシブルなリンカーで連結した融合タンパク質による構造体の構築も報告されている。Kobayashi らは、5残基からなる短いリンカーにより人工の2量体タンパク質 WA20 に天然の3量体タンパク質 foldon を連結した融合タンパク質 (WA20-foldon) をビルディングブロックとして利用した²⁸。WA20-foldon では両末端の多量体形成ドメインの相対配置は固定されていないため、6量体と12量体およびそれ以上の高次多量体が形成された。SAXS法による構造解析の結果、6量体はバレル構造、12量体は四面体のケージ構造を取り、ビルディングブロックの構造自由度が高い状態においても対称性の高い構造体が形成されると示唆された。一方、Sciore らはこれまでの2量体と3量体の組み合わせとは異なり、4量体を形成するコイルドコイルペプチドを3量体タンパク質に連結した融合タンパク質を設計した²⁹。コイルドコイルペプチドと3量体タンパク質は2~4残基のフレキシブルなリンカーでつながっており、リンカーの残基数が4のときは望みのケージ構造体を選択的に形成されたが、リンカー残基数が2や3のときは意図しない多量体が形成された。このことから、多量体形成タンパク質を連結するリンカーの長さがケージ構築に重要であることが示された。フレキシブルなリンカーを持つ融合タンパク質を利用する設計法は、Yeates らの設計法と比較して、広い種類の多量体タンパク質を融合タンパク質の構成要素として利用できるが構造制御が難しい。

Tetrahedron



PDB: 3VDX

Cube



PDB: 4QCC

Figure 1-3. 融合タンパク質の多量体形成により構築されたタンパク質ケージ。

1-3-3. 金属配位

金属配位では金属と配位子が決まった方向に結合を作る。この特性により、金属配位は有機化合物から成るナノ構造体の構築によく利用されている。なかでも金属有機構造体（あるいは多孔性配位高分子）は、気体分子の貯蔵や結晶スポンジ法への応用が期待されることから、盛んに研究がなされている。一方、タンパク質構造体の構築においても金属配位が利用されている。F. Akif Tezcan らのグループは、4ヘリックスバンドル構造を持つヘム（鉄-プロトポルフィリン IX 錯体）タンパク質のシトクロム *cb562* (cyt *cb562*) を用い、金属配位による種々の構造体構築を報告している (Figure 1-4)。Tezcan らはまず、cyt *cb562* の結晶パッキング部位である N 末端から 3 番目のヘリックス (helix 3) 上に 4 つの His から成る金属結合サイトを導入した変異体を作製し、 Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} を配位させることにより D_2 対称の 4 量体, C_2 対称の 2 量体, C_3 対称の 3 量体をそれぞれ構築した³⁰⁻³²。また、金属結合サイトを導入した cyt *cb562* の表面にヨード酢酸を共有結合させた別の変異体では、四面体型のケージ構造を持つ 12 量体が結晶中で形成された³³。これらに加え、親和性の異なる 2 つの Zn 結合サイトを表面に導入した cyt *cb562* 変異体を利用し、1次元のらせん状ナノチューブおよび 2, 3次元の結晶性アレイを構築した報告もある³⁴。

金属配位を利用した別の例として、Bai らによるナノリングの構築と Biswas らによるナノチューブの構築が報告されている³⁵⁻³⁶。ナノリングは、表面に bis-His 金属結合サイトを導入したグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 変異体の Ni^{2+} との配位結合を利用することで構築された。この GST のリング構造は、 Ni^{2+} 配位により新しく生成したサブユニット間における非共有性相互作用（水素結合と静電相互作用）により安定化される。一方、ナノチューブの構築では、シャペロニン GroEL の表面にフォトクロミック化合物のメロシアニン (MC) を共有結合させた誘導体 (GroEL_{MC}) が用いられた。GroEL_{MC} はリング構造を持っているが、 Mg^{2+} との配位結合によりリングが積み重なったチューブ構造を示した。GroEL_{MC} によるナノチューブは ATP の加水分解によりチューブ構造が壊れ、この構造変換に伴ってゲスト分子を放出することも報告されており³⁷、薬物の輸送担体としての応用が期待されている。金属配位による構造体構築では、金属イオンの有無によりビルディングブロックの集合と解離を容易に制御できることが利点である。しかし、金属配位を利用するとビルディングブロックが平衡により様々な状態を取ることが多く、望みの構造体のみを選択的に得ることは難しい。このため、金属配位による構築法では、タンパク質の構造制御だけではなく配位で生じる平衡を制御することも求められる。

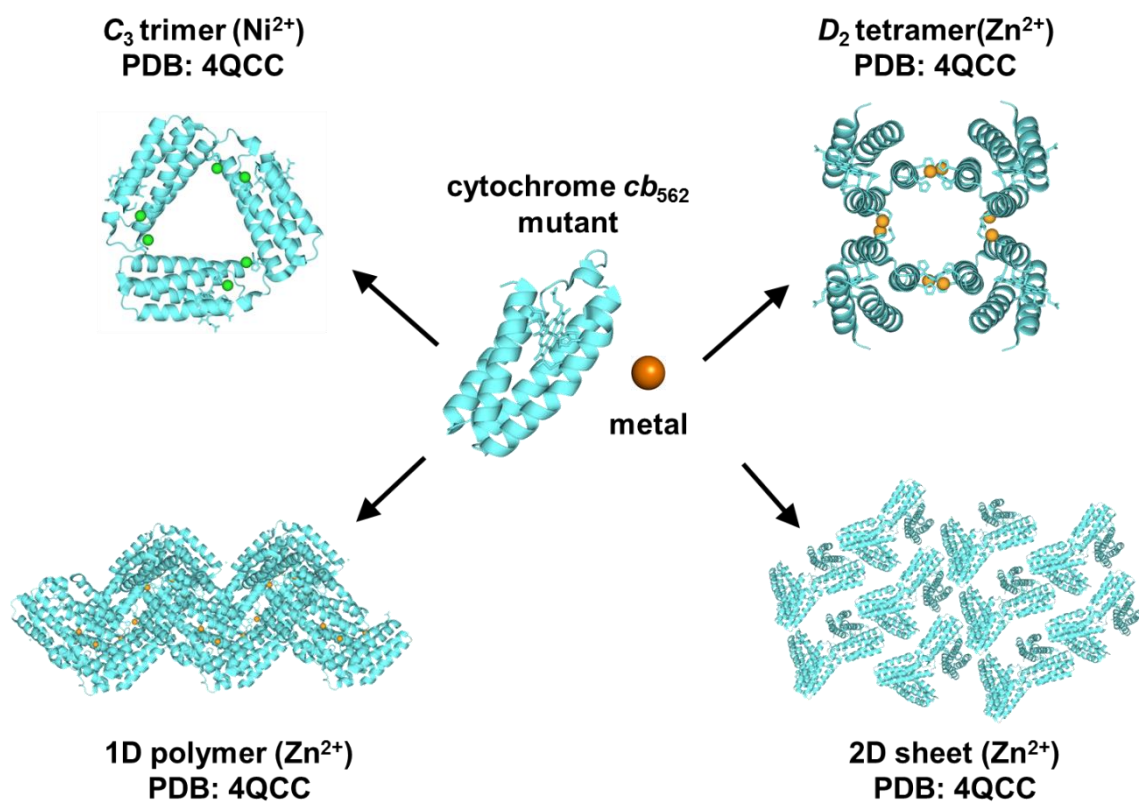


Figure 1-4. cyt *cb*₅₆₂ の金属配位により構築された種々のタンパク質構造体。

1-3-4. ドメインスワッピング

天然のタンパク質が持つ多量体形成機構の 1 つとしてドメインスワッピングが知られている。ドメインスワッピングでは、タンパク質が構造の一部を分子間で交換することにより多量体を形成する。交換される構造領域と残りのタンパク質部分をつなぐループはヒンジループと呼ばれる。ヒンジループの構造は、単量体とドメインスワップ多量体の間で大きく異なる。ドメインスワッピングは 1994 年にジフテリア毒素の 2 量体形成機構として初めて報告され (Figure 1-5)³⁸, David Eisenberg により定義された³⁹⁻⁴¹。多くのタンパク質についてドメインスワッピングによる多量体形成が報告されてきたが⁴²⁻⁵¹, その多くの研究で注目されていたのは、ドメインスワッピングとフォールディング病の関連である⁵²⁻⁵⁵。セルピン (serpin: serine protease inhibitors) の一種である α_1 -アンチトリプシン変異体は、ポリマー化により本来の機能が喪失することで肺気腫や肝硬変を引き起こす⁵⁶。 α_1 -アンチトリプシン変異体のポリマー化機構は長らく未解明であったが、2008 年に Yamasaki らにより、 α_1 -アンチトリプシン変異体がドメインスワッピングによりポリマー化することが明らかにされた⁵⁷。

ドメインスワッピングは生化学の分野で注目されていたが、タンパク質構造体の構築に応用された例もある。Ogihara らは、3 ヘリックスバンドルタンパク質を改変することで人工のタンパク質繊維を構築した⁵⁸。具体的には、3 ヘリックスバンドルタンパク質のループを切断して N 末端から 2, 3 番目のヘリックスを直接連結し、連続的なドメインスワッピングが起こるように人工タンパク質を設計することで繊維状のオリゴマーを得た。Ren らは、好熱性水素細菌 (*Hydrogenobacter thermophilus*) 由来 cyt *c*₅₅₂ (HT cyt *c*₅₅₂) の変異体を作製し、ドメインスワッピングによるリング構造構築を報告した⁵⁹。この HT cyt *c*₅₅₂ 変異体は、ドメインスワップによる高次多量体形成時の立体障害を低減させる目的で、ヒンジループの位置に 3 残基の Gly 残基が挿入されている。ドメインスワッピングを利用した構造体構築法には、新たな相互作用界面の設計が不要、形成される多量体 (構造体) の 2 次構造が単量体と類似するため単量体で発揮される機能が保持されやすいなどの利点がある。しかし、ドメインスワッピングによる構造体構築は報告数が少なく、精密な構造制御のためにはさらなる知見が必要である

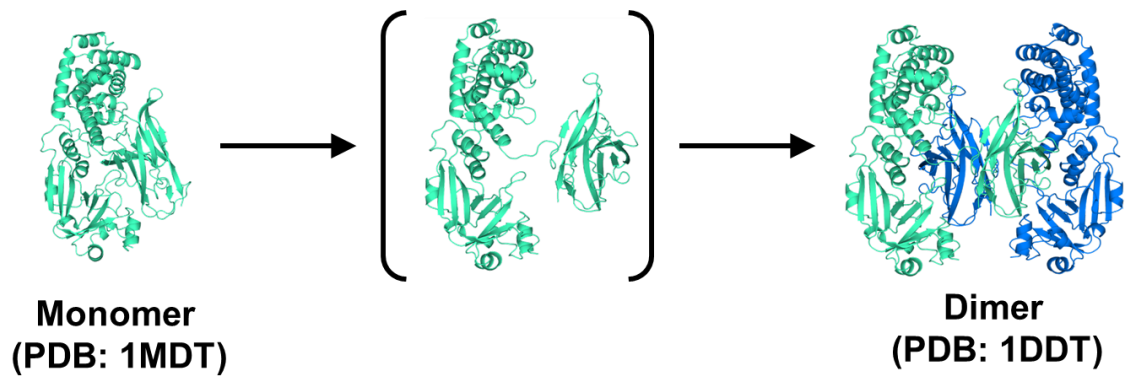


Figure 1-5. ジフテリア毒素のドメインスワッピングによる 2 量体形成。

1-3-5. その他の手法によるタンパク質ナノ構造体の構築

人工タンパク質ナノ構造体は、1-3-1~1-3-4 項で述べてきたコンピューターデザイン、融合タンパク質の多量体形成、金属配位、ドメインスワッピングとは異なる手法でも構築されている。例えば、Kitagishi らは大腸菌由来の電子伝達タンパク質 *cyt b₅₆₂* とその補因子であるヘムとの相互作用を利用してナノワイヤーを構築した⁶⁰。具体的には、*cyt b₅₆₂* のタンパク質表面にヘムを共有結合させた誘導体を作製し、この誘導体もともと内部ポケットに持っていたヘムを酸処理により除去することで、タンパク質表面に修飾したヘムと空になった内部ポケットが相互作用し、誘導体が一線なワイヤーを形成した。また、Chou らは2つのジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) をフレキシブルなペプチドリンカーでつないだ人工の DHFR2 量体と、DHFR に対する結合箇所を2つ持つ化合物 (bis-MTX-C₉) を混合することで酵素ナノリングを構築した⁶¹。このナノリングは、DHFR をつなぐリンカーの長さによりサイズを制御することが可能であり、サイズに依存した酵素活性を示すことが報告されている⁶²。Ballister らはリング状の6量体タンパク質 Hcp1 に Cys を導入した変異体を作製し、ジスルフィド結合によりリングが積み重なったチューブ構造体を構築した⁶³。Hcp1 変異体の特徴は、チューブ構造への集合とリング構造への解離を酸化還元により制御できることである。Gradišar らは、ホモ2量体を形成するコイルドコイルペプチド4種とヘテロ2量体を形成するコイルドコイルモチーフ2種のアミノ酸配列を3残基のリンカーで1本のポリペプチド鎖として連結することにより、四面体型のケージ構造にフォールドする人工タンパク質を設計した⁶⁴。この設計法では、コイルドコイルを形成する部位のタンパク質中での位置関係が重要となる。このため、各コイルドコイルペプチドのアミノ酸配列を連結する順序がデザインの成否を分けるが、その順序はグラフ理論に基づく数学的なアプローチにより決定された。

1-4. 本研究の目的

タンパク質が形成するナノ構造体は特異な機能と構造を持つため、次世代のナノ材料として広く注目を集めている。現状では、自然界に存在するタンパク質ナノ構造体を利用した応用研究が主流であるが、ナノ構造体を人の手により自在に設計・構築することができれば、医療・工業などの様々な分野に貢献できる。様々な手法により人工タンパク質ナノ構造体を構築する研究が進められているが、成功例は限られており、現状では構造体に機能を付与することはおろか、構造を精密に制御することも難しい。このような現状を打破するために新たなナノ構造体構築法が求められているが、これには以下の2つのアプローチが考えられる。(1) 既存の構築法とは異なる新しい概念でナノ構造体構築法を開発する。(2) 既存の構築法を改良することでより良い構築法を開発する。本研究では、上記2つのアプローチにより新しいナノ構造体構築法の開発に挑戦した。1つ目のアプローチでは、ドメインスワッピングに着目し、ヘムタンパク質のドメインスワッピングを利用したナノ構造体構築を試みた。2つ目のアプローチでは、既存のものを改良した新たな融合タンパク質の設計戦略を考案し、新しく設計した融合タンパク質を利用することでナノ構造体構築を構築した。

1-5. 本論文の構成

本論文は4つの章で構成される。第1章では、自然界に存在するタンパク質ナノ構造体の機能や応用例、人工タンパク質ナノ構造体の構築に関する先行研究について概説した。第2章では、ヘムタンパク質 *cyt cb₅₆₂* のドメインスワッピングによる多量体形成について調べ、*cyt cb₅₆₂* がドメインスワップにより2量体を形成することを明らかにした。さらに3分子の *cyt cb₅₆₂* 2量体により Zn-SO₄ クラスタを内包するケージ構造が結晶中で形成されることも明らかにした。第3章では、2種類の2量体形成タンパク質を3ヘリックスバンドルタンパク質で連結した融合タンパク質を設計し、融合タンパク質の多量体形成を利用することにより、四角形のタンパク質構造体を溶液中で構築した。第4章では本論文を総括し、今後の展望について述べた。

参考文献

1. D. S. Goodsell and A. J. Olson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2000, **29**, 105.
2. B. J. G. E. Pieters, M. B. van Eldijk, R. J. M. Nolte and J. Mecnovic, *Chem. Soc. Rev.*, 2016, **45**, 24.
3. M. D. Shoulders and R. T. Raines, *Annu. Rev. Biochem.*, 2009, **78**, 929.
4. R. Dominguez and K. C. Holmes, *Annu. Rev. Biophys.*, 2011, **40**, 169.
5. T. Tsurimoto and B. Stillman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1990, **87**, 1023.
6. X. P. Kong, R. Onrust, M. O'Donnell and J. Kuriyan, *Cell*, 1992, **69**, 425.
7. M. M. Hingorani and M. O'Donnell, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2000, **1**, 22.
8. J. Jiang, B. L. Pentelute, R. J. Collier and Z. H. Zhou, *Nature*, 2015, **521**, 545.
9. L. Sun, L. N. Young, X. Zhang, S. P. Boudko, A. Fokine, E. Zbornik, A. P. Roznowski, I. J. Molineux, M. G. Rossmann and B. A. Fane, *Nature*, 2014, **505**, 432.
10. X. Liu and E. C. Theil, *Acc. Chem. Res.*, 2005, **38**, 167.
11. R. A. Grant, D. J. Filman, S. E. Finkel, R. Kolter and J. M. Hogle, *Nat. Struct. Biol.*, 1998, **5**, 294.
12. X. Zhao, J. M. Fox, N. H. Olson, T. S. Baker and M. J. Young, *Virology*, 1995, **207**, 486.
13. A. Zlotnick, R. Aldrich, J. M. Johnson, P. Ceres and M. J. Young, *Virology*, 2000, **277**, 450.
14. B. B. Mandal, A. Grinberg, E. S. Gil, B. Panilaitis and D. L. Kaplan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, **109**, 7699.
15. A. Klug, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 1999, **354**, 531.
16. E. Dujardin, C. Peet, G. Stubbs, J. N. Culver and S. Mann, *Nano Lett.*, 2003, **3**, 413.
17. K. M. Bromley, A. J. Patil, A. W. Perriman, G. Stubbs and S. Mann, *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 4796.
18. O. K. Zahr and A. S. Blum, *Nano Lett.*, 2012, **12**, 629.
19. N. M. Molino and S. W. Wang, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2014, **28**, 75.
20. N. P. King, W. Sheffler, M. R. Sawaya, B. S. Vollmar, J. P. Sumida, I. André, T. Gonen, T. O. Yeates and D. Baker, *Science*, 2012, **336**, 1171.
21. N. P. King, J. B. Bale, W. Sheffler, D. E. McNamara, S. Gonen, T. Gonen, T. O. Yeates and D. Baker, *Nature*, 2014, **510**, 103.
22. J. B. Bale, S. Gonen, Y. Liu, W. Sheffler, D. Ellis, C. Thomas, D. Cascio, T. O. Yeates, T. Gonen, N. P. King and D. Baker, *Science*, 2016, **353**, 389.
23. Y. Hsia, J. B. Bale, S. Gonen, D. Shi, W. Sheffler, K. K. Fong, U. Nattermann, C. Xu, P. S. Huang, R. Ravichandran, S. Yi, T. N. Davis, T. Gonen, N. P. King and D. Baker, *Nature*, 2016, **535**, 136.
24. J. E. Padilla, C. Colovos and T. O. Yeates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**, 2217.
25. Y. T. Lai, D. Cascio and T. O. Yeates, *Science*, 2012, **336**, 1129.
26. Y. L. Lai, E. Reading, G. L. Hura, K. L. Tsai, A. Laganowsky, F. J. Asturias, J. A. Tainer, C. V. Robinson and T. O. Yeates, *Nat. Chem.*, 2014, **6**, 1065.

27. Y. T. Lai, K. L. Tsai, M. R. Sawaya, F. J. Asturias and T. O. Yeates, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 7738.
28. N. Kobayashi, K. Yanase, T. Sato, S. Unzai, M. H. Hecht and R. Arai, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 11285.
29. A. Sciore, M. Su, P. Koldewey, J. D. Eschweiler, K. A. Duffley, B. M. Linhares, B. T. Ruotolo, J. C. Bardwell, G. Skinotis and E. N. Marsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2016, **113**, 8681.
30. E. N. Salgado, J. Faraone-Mennella and F. A. Tezcan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 13374.
31. E. N. Salgado, R. A. Lewis, J. Faraone-Mennella and F. A. Tezcan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 6082.
32. E. N. Salgado, R. A. Lewis, S. Mossin, A. L. Rheingold and F. A. Tezcan, *Inorg. Chem.*, 2009, **48**, 2726.
33. T. W. Ni and F. A. Tezcan, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 7014.
34. J. D. Brodin, X. I. Ambroggio, C. Tang, K. N. Parent, T. S. Baker and F. A. Tezcan, *Nat. Chem.*, 2012, **4**, 375.
35. S. Biswas, K. Kinbara, N. Oya, N. Ishii, H. Taguchi and T. Aida, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 7556.
36. Y. Bai, Q. Luo, W. Zhang, L. Miao, J. Xu, H. Li and J. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 10966.
37. S. Biswas, K. Kinbara, T. Niwa, H. Taguchi, N. Ishii, S. Watanabe, K. Miyata, K. Kataoka and T. Aida, *Nat. Chem.*, 2013, **5**, 613.
38. M. J. Bennett, S. Choe and D. Eisenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1994, **91**, 3127.
39. M. J. Bennett, M. P. Schlunegger and D. Eisenberg, *Protein Sci.*, 1995, **4**, 2455.
40. M. P. Schlunegger, M. J. Bennett and D. Eisenberg, *Adv. Protein Chem.*, 1997, **50**, 61.
41. Y. Liu and D. Eisenberg, *Protein Sci.*, 2002, **11**, 1285.
42. D. Nurizzo, M. C. Silvestrini, M. Mathieu, F. Cutruzzolà, D. Bourgeois, V. Fülöp, J. Hajdu, M. Brunori, M. Tegoni and C. Cambillau, *Structure*, 1997, **5**, 1157.
43. B. R. Crane, R. J. Rosenfeld, A. S. Arvai, D. K. Ghosh, S. Ghosh, J. A. Tainer, D. J. Stuehr and E. D. Getzoff, *EMBO J.*, 1999, **18**, 6271.
44. R. Jerala and E. Žerovnik, *J. Mol. Biol.*, 1999, **291**, 1079.
45. F. Rousseau, J. W. Schymkowitz, H. R. Wilkinson and L. S. Itzhaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**, 5596.
46. E. Bucci, L. Vitagliano, R. Barone, S. Sorrentino, G. D'Alessio and G. Graziano, *Biophysical chemistry*, 2005, **116**, 89.
47. M. Czjzek, S. Létoffé, C. Wandersman, M. Delepierre, A. Lecroisey and N. Izadi-Pruneyre, *J. Mol. Biol.*, 2007, **365**, 1176.
48. C. Liu, M. R. Sawaya and D. Eisenberg, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2011, **18**, 49.
49. X. Kang, N. Zhong, P. Zou, S. Zhang, C. Jin and B. Xia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, **109**, 14900.

50. L. Liu, I. J. Byeon, I. Bahar and A. M. Gronenborn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 4229.
51. M. A. Silva, T. G. Lucas, C. A. Salgueiro and C. M. Gomes, *PLoS One*, 2012, **7**, e46328.
52. S. Sambashivan, Y. Liu, M. R. Sawaya, M. Gingery and D. Eisenberg, *Nature*, 2005, **437**, 266.
53. M. J. Bennett, M. R. Sawaya and D. Eisenberg, *Structure*, 2006, **14**, 811.
54. Z. Guo and D. Eisenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**, 8042.
55. R. Nelson and D. Eisenberg, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2006, **16**, 260.
56. D. A. Lomas, D. Belorgey, M. Mallya, E. Miranda, K. J. Kinghorn, L. K. Sharp, R. L. Phillips, R. Page, A. S. Robertson and D. C. Crowther, *Biochem. Soc. Trans.*, 2005, **33**, 321.
57. M. Yamasaki, W. Li, D. J. Johnson and J. A. Huntington, *Nature*, 2008, **455**, 1255.
58. N. L. Ogihara, G. Ghirlanda, J. W. Bryson, M. Gingery, W. F. DeGrado and D. Eisenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**, 1404.
59. C. Ren, S. Nagao, M. Yamanaka, H. Komori, Y. Shomura, Y. Higuchi and S. Hirota, *Mol. Biosyst.*, 2015, **11**, 3218.
60. H. Kitagishi, K. Oohora, H. Yamaguchi, H. Sato, T. Matsuo, A. Harada and T. Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 10326.
61. J. C. Carlson, S. S. Jena, M. Flenniken, T. F. Chou, R. A. Siegel and C. R. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 7630.
62. T. F. Chou, C. So, B. R. White, J. C. Carlson, M. Sarikaya and C. R. Wagner, *ACS nano*, 2008, **2**, 2519.
63. E. R. Ballister, A. H. Lai, R. N. Zuckermann, Y. Cheng and J. D. Mougous, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 3733.
64. H. Gradišar, S. Božič, T. Doles, D. Vengust, I. Hafner-Bratkovič, A. Mertelj, B. Webb, A. Šali, S. Klavžar and R. Jerala, *Nat. Chem. Biol.*, 2013, **9**, 362.

第2章

ドメインスワップしたシトクロム *cb*₅₆₂ 2 量体によるタンパク質ナノケージ構築

2-1. 導入

1-3 節で述べたように、昨今、人工のタンパク質ナノ構造体が様々な手法により構築されつつある。しかし、多様なタンパク質ナノ構造体を自在に構築するためには、これまでに報告されたものとは異なる新たな構築法が必要である。本章では、ナノ構造体の構築法としてタンパク質多量化機構の 1 つであるドメインスワッピングに着目した (1-3-4 項)。これまでに我々は、種々のシトクロム *c* (cyt *c*) やミオグロビン (Mb) などのヘムタンパク質がドメインスワップにより多量化することを明らかにしてきた。例えば、ウマ cyt *c* は C 末端 α ヘリックスを分子間で交換することで 2 および 3 量体を形成する¹。緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来 cyt *c*₅₅₁ (PA cyt *c*₅₅₁) および好熱性水素細菌 (*Hydrogenobacter thermophilus*) 由来 cyt *c*₅₅₂ (HT cyt *c*₅₅₂) は N 末端 α ヘリックスとヘムを含む領域をプロトマー間で交換して 2 量体を形成する²⁻³。一方、ウマ Mb は単量体で活性部位を構成している E および F ヘリックスと EF ループが 1 本の長い α ヘリックスに変化した 2 量体を形成する⁴。

大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来 cyt *b*₅₆₂ は 106 残基のアミノ酸からなる比較的小型 (分子量: 約 12,000) のヘムタンパク質である⁵。X 線結晶構造解析および溶液 NMR により、cyt *b*₅₆₂ は 4 本の α ヘリックスが逆平行に並んだ 4 ヘリックスバンドル構造を取ることが明らかにされている⁶⁻⁷。cyt *b*₅₆₂ はその単純な構造ゆえに、タンパク質の安定性やフォールディングの研究にモデルタンパク質としてよく用いられる⁸⁻¹²。また、cyt *b*₅₆₂ はタンパク質部位と共有結合していない *b* 型ヘムを捕因子として有し、ヘム鉄には N 末端 α ヘリックス上の Met7 と C 末端 α ヘリックス上の His102 が軸配位している。Barker らは、cyt *b*₅₆₂ の Arg98 と Tyr101 を Cys に置換することで、ヘムとタンパク質部位がチオエーテル結合した *c* 型 cyt *b*₅₆₂ (cyt *cb*₅₆₂) を作製した¹³。cyt *cb*₅₆₂ は cyt *b*₅₆₂ と同様の 4 ヘリックスバンドル構造を保持しているが、cyt *b*₅₆₂ と比較して高い安定性を示すことが報告されている¹⁴⁻¹⁶。また 1-3-3 項で述べたように、Tezcan らはタンパク質表面に金属結合モチーフを導入した cyt *cb*₅₆₂ 変異体を利用し、種々のナノ構造体を構築している¹⁷⁻²⁷。

昨今我々は、野生型ウマ Mb 2 量体のプロトマー間の界面に変異を導入することで、異なる 2 つの活性部位を有する Mb ヘテロ 2 量体の構築に成功している²⁸。また、cyt *c*₅₅₂ のヒンジループ領域にグリシン残基を導入した変異体をドメインスワッピングさせることで、リング構造を持つ高次多量体の構築にも成功しており (1-3-4 項)²⁹、ドメインスワッピングが人工タンパク質の構築に有用であることを示してきている。本章では、cyt *cb*₅₆₂ のドメインスワッピングによる多量化を利用することでナノ構造体の構築を試みた。

2-2. 実験方法

cyt *b*₅₆₂ および cyt *cb*₅₆₂ の発現系構築

人工合成した *E. coli* cyt *b*₅₆₂ 遺伝子 (Life Technologies Japan) を *NdeI-BamHI* の制限酵素サイトを有する pET29b ベクターに導入し, cyt *b*₅₆₂ を大量発現するプラスミド (pET29b-cyt *b*₅₆₂) を作製した。大腸菌 BL21 (DE3) 株のコンピテントセル (Novagen) に pET29b-cyt *b*₅₆₂ を導入することにより, cyt *b*₅₆₂ の発現系を構築した。

KOD plus Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用い, pET29b-cyt *b*₅₆₂ を鋳型として PCR を行うことで, Arg98 と Tyr101 が Cys に置換された pET29b-cyt *cb*₅₆₂ プラスミドを作製した。その後, pET29b-cyt *cb*₅₆₂ から得られた cyt *cb*₅₆₂ 遺伝子と pKK223-3 ベクターを用い, In-Fusion Premix (Takara) を使用してクローニングを行うことで, pKK223-3-cyt *cb*₅₆₂ プラスミドを作製した。さらに, pKK223-3-cyt *cb*₅₆₂ を鋳型として KOD plus Mutagenesis Kit を使用して PCR を行い, N 末端に *Rhodospseudomonas palustris* 由来 cyt *c*₅₅₆ のシグナル配列を導入した¹⁵。最後に, シグナル配列を導入した pKK223-3-cyt *cb*₅₆₂ プラスミドを, cyt *c* maturation (ccm) タンパク質 ABCDEFGHI をコードするプラスミド (pEC86) とともに, 大腸菌 JCB387 株のコンピテントセルに導入して発現系を構築した³⁰。

cyt *b*₅₆₂ および cyt *cb*₅₆₂ の精製

cyt *b*₅₆₂ を高発現する大腸菌 BL21 (DE3) 株を LB 培地中 37 °C で培養した。培養液の 600 nm における吸光度 (OD₆₀₀) が 0.4—0.5 に達した段階でイソプロピル-β-D(-)-チオガラクトピラノシド (IPTG) (Wako) を終濃度 0.25 mM になるように培養液へ加えることにより, cyt *b*₅₆₂ の発現を誘導した。IPTG による誘導後, OD₆₀₀ が 1.6 に達するまで 37 °C で培養を続け, 大腸菌を遠心分離により沈殿として捕集した。菌体を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁させ, 凍結融解により cyt *b*₅₆₂ を大腸菌から抽出した。cyt *b*₅₆₂ の 280 nm におけるモル吸光係数 ($\epsilon_{280} = 19.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) からおよそそのタンパク質濃度を見積もり, cyt *b*₅₆₂ に対して 1 等量以上のヘミン (Tokyo Chemical Industry) を含む 1 M NaOH をタンパク質溶液へ添加した。余剰のヘミン除去するため, タンパク質溶液を遠心分離して得られた上清を DE52 (Whatman) 陰イオン交換カラムに通した。回収したタンパク質溶液を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 4.8) 中で一晩透析した後, CM52 (Whatman) 陽イオン交換カラムにより精製した。精製後の cyt *b*₅₆₂ 溶液を, FPLC システム (BioLogic DuoFlow 10, Bio-rad) と HiLoad 26/60 Superdex 75 pg (GE Healthcare) カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC-FPLC) (流速: 0.8 mL/min, 検出波長: 418 nm, 溶媒: 50 mM リン酸緩衝液, pH: 7.0, 温度: 4 °C) によりさらに精製した。cyt *b*₅₆₂ 溶液に 10 等量 (cyt *b*₅₆₂ に対して) のフェリシアン化カリウムを加えて cyt *b*₅₆₂ を酸化型に変換した後, フェリシアン化カリウムを DE52 (Whatman) 陰イオン交換カラムによって取り除いた。cyt *b*₅₆₂ の純度は 418 nm と 280 nm における吸収の比を用いて確認した ($\text{Abs}_{418}/\text{Abs}_{280} > 6$)。また, cyt *b*₅₆₂ の濃度は 418 nm におけるモル吸光係数 ($\epsilon_{418} = 117.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を用いて決定した⁵。

cyt *cb*₅₆₂ を高発現する大腸菌 JCB387 株を LB 培地中 37 °C で OD₆₀₀ が 2.0 に達するまで培養した。菌体を遠心分離により沈殿として捕集した後、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁させ、再度遠心分離を行って上清を除いた。沈殿をスフエロプラスト緩衝液 (10 mM EDTA と 20% (w/v) スクロースを含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液) に懸濁させ、氷上で 10 分間インキュベートした後、遠心分離により上清を除いた。得られた沈殿に氷冷した MilliQ 水を加えて懸濁し、遠心分離により赤色の上清を回収した。cyt *cb*₅₆₂ を含む上清を 25 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中で透析した後、CM52 (Whatman) 陽イオン交換カラムにより精製した。緩衝液を 10 mM Tris-HCl (pH8.0) に置換した cyt *cb*₅₆₂ 溶液を、FPLC システム (BioLogic DuoFlow 10, Bio-rad) と UNO-Q6 (Bio-Rad) カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー (流速 3 mL/min, 検出波長 415 nm, 溶媒 10 mM Tris-HCl 緩衝液, pH: 8.0, 温度 4 °C) および HiLoad 26/60 Superdex 75 pg (GE Healthcare) カラムを用いた SEC-FPLC (流速 1 mL/min, 検出波長 415 nm, 溶媒 50 mM リン酸緩衝液, pH: 7.0, 温度 4 °C) により精製した。酸化型 cyt *cb*₅₆₂ は cyt *b*₅₆₂ と同様の方法で得られた。cyt *cb*₅₆₂ の純度は 415 nm と 280 nm における吸収の比を用いて確認した ($Abs_{415}/Abs_{280} > 8$)。また、cyt *cb*₅₆₂ の濃度は 418 nm におけるモル吸光係数 ($\epsilon_{418} = 136 \pm 1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を用いて決定した。

cyt *b*₅₆₂ 量体および cyt *cb*₅₆₂ 量体の調製

酸化型の cyt *b*₅₆₂ 単量体あるいは cyt *cb*₅₆₂ 単量体 (ヘム濃度 1 mM) を含む 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) へ酢酸を 40% (v/v) になるように添加し、凍結乾燥により酢酸を除いた。凍結乾燥で生じた沈殿を 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解させた後、フィルター (孔径 0.45 μm , Millipore) に通した。得られた cyt *b*₅₆₂ および cyt *cb*₅₆₂ 溶液について、FPLC システム (BioLogic DuoFlow 10, Bio-rad) と HiLoad 26/60 Superdex 75 pg (GE Healthcare) カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィー (流速: 1 mL/min, 検出波長: 418 nm <cyt *b*₅₆₂> もしくは 415 nm <cyt *cb*₅₆₂>, 溶媒: 50 mM リン酸緩衝液, pH: 7.0, 温度: 4 °C) を行い、cyt *b*₅₆₂ 量体および cyt *cb*₅₆₂ 量体を精製した。cyt *cb*₅₆₂ 量体を含むフラクションは 37 °C で 1 時間インキュベートし、不安定な 2 量体を解離させた。インキュベート後、cyt *cb*₅₆₂ 量体をサイズ排除クロマトグラフィーにより再精製した。

サイズ排除クロマトグラフィー分析

酸化型の cyt *b*₅₆₂ 量体および cyt *cb*₅₆₂ 量体の形成量を、FPLC システム (BioLogic DuoFlow 10, Bio-rad) と Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィー (流速: 0.5 mL/min, 検出波長: 418 nm <cyt *b*₅₆₂> もしくは 415 nm <cyt *cb*₅₆₂>, 溶媒: 50 mM リン酸緩衝液, pH: 7.0, 温度: 4 °C) により分析した。溶出曲線のピーク面積を Igor Pro 6.0 (WaveMetrics) を用いて求めることにより、単量体と 2 量体の形成量を見積もった。

吸収および CD スペクトル測定

吸収スペクトルは、分光光度計 UV-2450 (Shimadzu) と光路長 1 cm の石英セルを用いて 20 °C の条件で測定した。CD スペクトルは、円偏光二色性分散計 J-725 (JASCO) と光路長 1 cm の石英セルを用いて 20 °C の条件で測定した。測定サンプルは酸化型の *cyt cb₅₆₂* 単量体および 2 量体溶液 (ヘム濃度: 10 μM 〈吸収スペクトル〉 もしくは 8 μM 〈CD スペクトル〉, 溶媒: 50 mM リン酸緩衝液, pH: 7.0) を用いた。

サイクリックボルタンメトリー測定

サイクリックボルタンメトリー (CV) 測定には電気化学アナライザー ALS-612DN (BAS) を用いた。金電極を作用電極、白金線と銀/塩化銀電極 (3 M NaCl) をそれぞれ対極電極と参照電極として使用した。得られた酸化還元電位は標準水素電極を参照した値に変換した。修飾金電極を作製するため、まず金電極表面を 0.05 μm アルミナ懸濁液を用いて研磨し、MilliQ 水でさらに洗浄した³¹。さらに電気化学的酸化還元処理を施し電極表面を洗浄した。洗浄した金電極を 20 mM 2-メルカプトエタノール (Wako) 水溶液に 1 時間浸し、MilliQ 水で電極を洗った³²。測定サンプルは *cyt cb₅₆₂* 単量体および 2 量体溶液 (ヘム濃度 200 μ, 100 mM MgCl₂ 含有 50 mM リン酸緩衝液, pH: 7.0) を用いた。サンプルを真空ラインで脱気してアルゴンガスを流入させることで酸素を除いた後、室温、スキャン速度: 50 mV/s で測定を行った。

示差走査熱量測定

示差走査熱量測定 (DSC) は VP-DSC (MicroCal, GE Healthcare, セル容量 500 μL) を用いて行った。測定サンプルは *cyt cb₅₆₂* 単量体および 2 量体溶液 (ヘム濃度: 100 μM, 溶媒: 50 mM リン酸緩衝液, pH: 7.0) を用い、測定はスキャン速度 1 °C/min で行った。

X線結晶構造解析

cyt *cb*₅₆₂ 量体の結晶化には、蒸気拡散によるシッティングドロップ法を用いた。タンパク質溶液は、50 mM Tris-HCl 緩衝液中で cyt *cb*₅₆₂ 量体のタンパク質濃度が 24 mg/mL になるように調製した。リザーバー溶液は、75 mM MES 緩衝液 (pH 5.5)、6 mM 硫酸亜鉛、25% (v/v) ポリエチレングリコールモノメチルエーテル 350 の組成を用いた。タンパク質溶液 1 μ L とリザーバー溶液を 1 μ L を混合し、4 °C で1週間静置することで単結晶を得た。X線回折データは、Quantum315 detector (ADSC) を用いて SPring-8 (ビームライン: BL38B1) にて収集した。単結晶はクライオプロテクタントを添加せずにクライオループにマウントし、100 K の窒素ガスで瞬間冷却して 1.0 Å の波長でデータを測定した。回折データは HKL2000 により処理した³³。cyt *cb*₅₆₂ 量体の初期構造は、*E. coli* cyt *cb*₅₆₂ 単量体 (K59W/R98C/Y101C cyt *b*₅₆₂ 変異体) の原子座標 (PDB: 2BC5) をモデルに用いた分子置換法 (MOLREP) により得た。構造精密化には REFMAC を用いた³⁴。COOT を用いて分子モデルの細かな修正や水分子の配置を行った。回折データと精密化の統計値を Table 2-1 に示す。キャビティのサイズは VOIDOO を用いプローブ半径 1.4 Å の条件で計算した³⁵。

動的光散乱測定

動的光散乱 (DLS) 測定は Zetasizer Nano ZS analyzer (Malvern) を用いて行った。300 μ M の硫酸亜鉛、塩化亜鉛、あるいは硫酸ナトリウムを含む酸化型 cyt *cb*₅₆₂ 単量体および2量体溶液 [ヘム濃度: 50 μ M, 溶媒: 15 mM MES 緩衝液 (pH 5.5)] を室温で1.5時間インキュベートした後、フィルター (孔径 0.45 μ m, Millipore) を通して測定サンプルを調製した。測定は 25 °C で8回繰り返し、8回の平均値をデータとして取り扱った。

cyt *cb*₅₆₂ の架橋反応

1.2 mM 硫酸亜鉛あるいは硫酸ナトリウムを含む 15 mM MES 緩衝液 (pH 7.5) 中で酸化型 cyt *cb*₅₆₂ 量体溶液 (ヘム濃度: 50 μ M) を 25 mM BS3 と反応させることで、cyt *cb*₅₆₂ の架橋反応を行った。反応溶液を 25 °C で30時間インキュベートした後、Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を終濃度 50 mM となるように加えて反応をクエンチした。クエンチした反応液を SDS-PAGE により分析した。

2-3. 実験結果

2-3-1. *cyt b₅₆₂* 量体および *cyt cb₅₆₂* 量体の形成と安定性

エタノール (EtOH) あるいは酢酸で処理した *cyt b₅₆₂* をサイズ排除クロマトグラフィーにより分析したところ、いずれも約 12.7 mL の溶出位置に単量体のピークが観測された (**Figure 2-1, A**)。また、単量体のピークに加え、*cyt b₅₆₂* 量体のピークが約 11.1 mL に観測された。*cyt b₅₆₂* 量体は 4 °C で 2 時間インキュベートすると 45% が単量体へと解離し、12 時間のインキュベートでは 86% の 2 量体が単量体へと解離した (**Figure 2-1, C**)。この結果から、*cyt b₅₆₂* 量体は 4 °C の温度条件下で比較的不安定であることが分かった。

ヘムがタンパク質に結合したホロ Mb2 量体は、ヘムを持たないアポ Mb2 量体よりも安定であることが分かっている⁴。このため、*cyt b₅₆₂* のタンパク質部分にヘムを共有結合することは、2 量体構造の安定化につながると予想される。この仮説を確かめるために、我々は 2 つのチオエーテル結合を介してヘムがタンパク質部分に固定された *cyt cb₅₆₂* (R98C/Y101C *cyt b₅₆₂* 変異体) を作製した¹³⁻¹⁶。*cyt cb₅₆₂* は EtOH 処理ではほとんど多量体を形成しなかったが、酢酸処理では *cyt b₅₆₂* と比較して多くの多量体を形成した (**Figure 2-1, B**)。また *cyt b₅₆₂* 量体とは異なり、*cyt cb₅₆₂* 量体は 4 °C で 12 時間インキュベートした後も単量体への解離が見られなかった (**Figure 2-1, D**)。これらの結果は、*cyt cb₅₆₂* 量体が *cyt b₅₆₂* 量体よりも安定であることを示す。

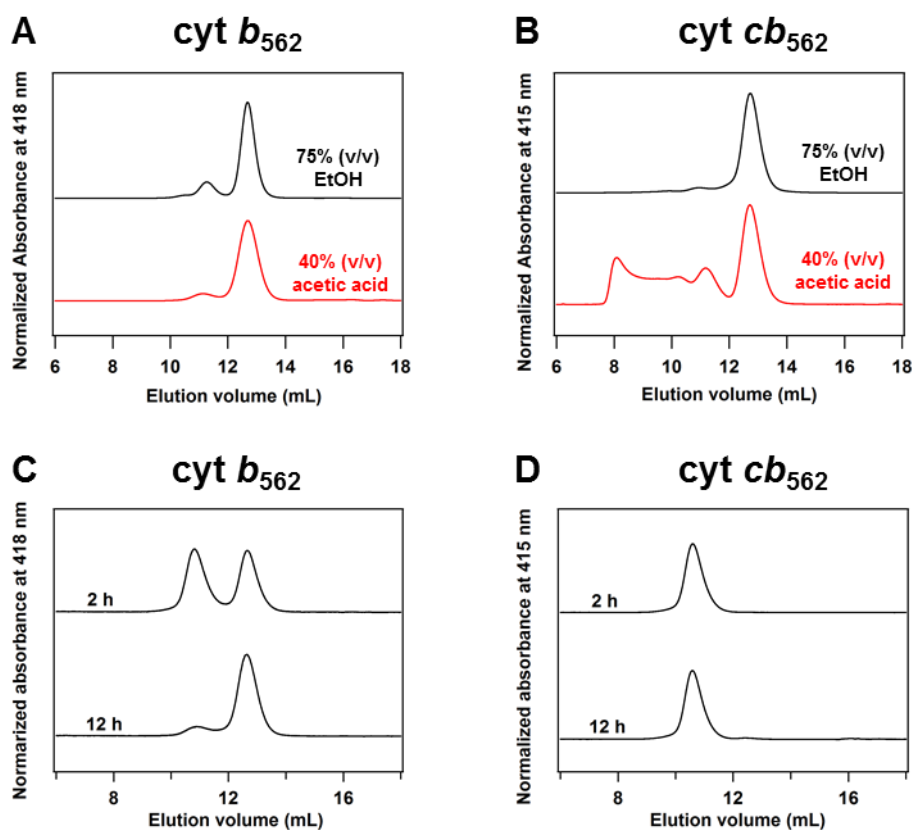


Figure 2-1. サイズ排除クロマトグラフィー。(A) $\text{cyt } b_{562}$ 単量体を 75% (v/v) EtOH (黒) あるいは 40% (v/v) 酢酸 (赤) で処理した後の溶出曲線。(B) $\text{cyt } cb_{562}$ 単量体を 75% (v/v) EtOH (黒) あるいは 40% (v/v) 酢酸 (赤) で処理した後の溶出曲線。(C) $\text{cyt } b_{562}$ 量体あるいは (D) $\text{cyt } cb_{562}$ 量体を 4 °C で 2 時間 (上) もしくは 12 時間 (下) インキュベートした後の溶出曲線。(カラム : Superdex 75 10/300 GL 〈GE Healthcare〉, 流速 : 0.5 mL/min, 検出波長 : 418 nm 〈 $\text{cyt } b_{562}$ 〉 もしくは 415 nm 〈 $\text{cyt } cb_{562}$ 〉, 溶媒 : 50 mM リン酸緩衝液, pH : 7.0, 温度 : 4 °C)。

2-3-2. cyt *cb*₅₆₂ 量体の吸収および CD スペクトル

Soret 帯および Q 帯の波長と強度は酸化型 cyt *cb*₅₆₂ 量体と単量体でほとんど同じであったため、2 量体のヘム配位構造は単量体と類似することが示唆された (Figure 2-2, A)。一方、酸化型 cyt *cb*₅₆₂ 量体および単量体の CD スペクトルにおいて、208 nm と 222 nm に α ヘリックス構造に由来する負のコットン効果が見られた (Figure 2-2, B)。208 nm と 222 nm のピーク強度は 2 量体と単量体で類似しており、この分光学的特徴は cyt *cb*₅₆₂ 量体の 2 次構造が単量体と同様であることを示唆している。また他の *c* 型シトクロムや Mb についても、単量体とドメインスワップ 2 量体が類似した 2 次構造を有することが報告されている^{2-4,36}。

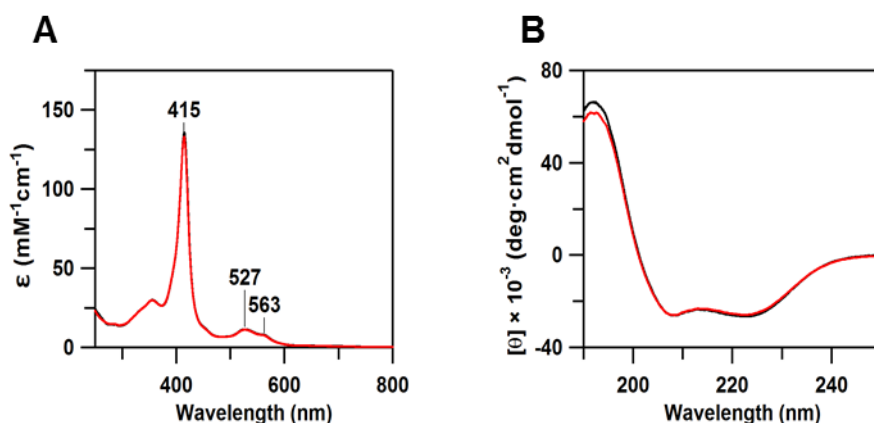


Figure 2-2. 酸化型 cyt *cb*₅₆₂ 単量体と 2 量体の (A) 吸収スペクトルおよび (B) CD スペクトル。単量体と 2 量体のスペクトルをそれぞれ黒と赤で示す。ヘム濃度 10 μ M のサンプル溶液を測定に用いた。

2-3-3. cyt *cb*₅₆₂ 量体の酸化還元電位

cyt *cb*₅₆₂ 量体の酸化還元電位を決定するために CV を測定し、cyt *cb*₅₆₂ 単量体および *E. coli* cyt *b*₅₆₂ 単量体と比較した。サイクリックボルタモグラムから求めた cyt *cb*₅₆₂-単量体の酸化還元電位は 203 mV であった (Figure 2-3, b)。この値は過去に報告された値 (199–204 mV) と類似しており³⁷⁻³⁸, *E. coli* cyt *b*₅₆₂ 単量体の酸化還元電位 (205 mV) とも類似していた (Figure 2-3, a)。cyt *cb*₅₆₂ 量体の酸化還元電位は cyt *cb*₅₆₂ 単量体と同様の高い値を示し (198 mV, Figure 2-3, c), このことは 2 量体の活性部位構造が単量体と類似することを示唆している。

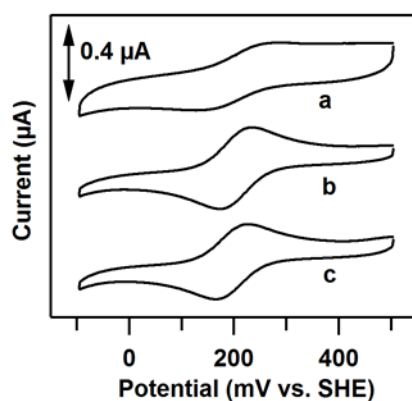


Figure 2-3. サイクリックボルタモグラム。 *E. coli* cyt *b*₅₆₂ 単量体 (a), cyt *cb*₅₆₂ 単量体 (b) および 2 量体 (c) についてヘム濃度 200 µM のサンプル溶液 (リン酸緩衝液, pH 7.0) を調製し、スキャン速度 50 mV/s, 室温の条件で測定した。

2-3-4. cyt *cb*₅₆₂ 量体の熱力学的特性

酸化型 cyt *cb*₅₆₂ 単量体と 2 量体について DSC を測定することにより、2 量体の熱安定性と熱力学的特性を調べた。単量体の熱容量曲線では、83.9 °C に正のピークが見られた (Figure 2-4, A, a)。この正のピークは cyt *cb*₅₆₂ 単量体の変性に帰属され、cyt *cb*₅₆₂ 単量体の変性温度は *E. coli* cyt *b*₅₆₂ 単量体 (pH 7.4 で 67 °C, pH 5–6 で 73.8 °C) よりも高いことが分かった¹¹。一方、酸化型 cyt *cb*₅₆₂ 2 量体では、83.9 °C の熱変性に相当するピークに加えて 50.1 °C に負のピークが観測された (Figure 2-4, A, b)。サンプル溶液を 70 °C まで熱して cyt *cb*₅₆₂ 2 量体を単量体へ解離させた後 (Figure 2-4, B, a) に DSC を再度測定したところ、50 °C 付近にピークは現れなかった (Figure 2-4, B, b)。このため、50.1 °C に観測された負のピークは cyt *cb*₅₆₂ 2 量体の単量体への解離に帰属された。この負のピークの面積は 2 量体が解離する際のエンタルピー変化 (ΔH) に相当する。解離に伴う ΔH は -13 ± 2 kcal/mol と負の値を示したため、2 量体は単量体よりもエンタルピー的に不利であることが分かった。一方、エントロピー変化 (ΔS) については、cyt *cb*₅₆₂ の単量体と 2 量体が平衡状態でないために、決定することができなかった。

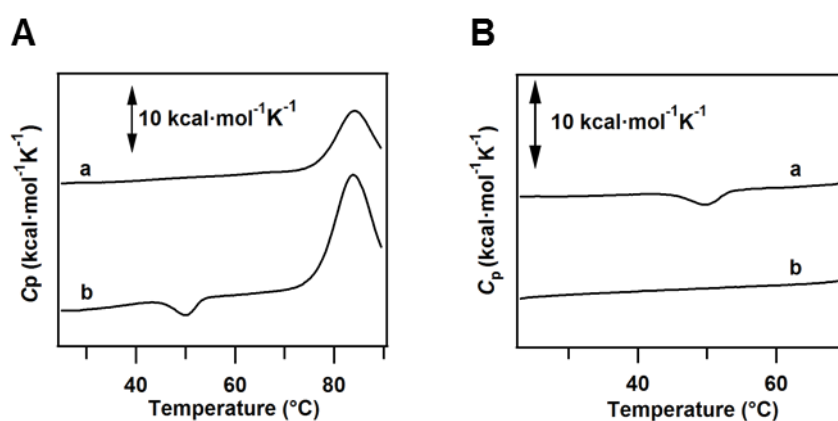


Figure 2-4. (A) 酸化型 cyt *cb*₅₆₂ 単量体 (a) と 2 量体 (b) の DSC 熱容量曲線。(B) 測定 1 回目 (a) および 2 回目 (b) の酸化型 cyt *cb*₅₆₂ 2 量体の DSC 熱容量曲線。へム濃度 100 μ M のサンプル溶液 (リン酸緩衝液, pH 7.0) を調製し、1 °C/min で測定した。

2-3-4. cyt *cb*₅₆₂ 量体の結晶構造

cyt *cb*₅₆₂ 量体の詳細な構造を明らかにする目的で X 線結晶構造解析を行ったところ、1.85 Å の分解能で 2 量体結晶構造が得られた (PDB : 5AWI)。結晶構造から、cyt *cb*₅₆₂ 量体はドメインスワップ構造を示すことが分かった (Figure 2-5, B)。具体的には、一方のプロトマーに属する N 末端側 2 本の α ヘリックス (helix 1 および 2) が、他方のプロトマーに属する C 末端側 2 本の α ヘリックス (helix 3 および 4) と相互作用していた。cyt *cb*₅₆₂ 量体結晶の非対称単位中には、2 量体を形成する独立した 2 分子の cyt *cb*₅₆₂ が存在した。2 量体の全体の主鎖構造は単量体とよく一致した (Figure 2-6, A)。単量体 (Figure 2-5, A, K59W/R98C/Y101C cyt *b*₅₆₂ 変異体, PDB : 2BC5) と 2 量体の α 炭素について、平均二条偏差 (RMSD) を計算した。2 量体のヒンジループ (Lys51–Asp54) を除いた一方のプロトマーに属する N 末端領域 (Ala1–Asp50) と他方のプロトマーに属する C 末端領域 (Ser55–Arg106) を単量体の相当する構造領域とそれぞれ比較したところ、RMSD はいずれも 0.36 Å 以下の値となった。このことは、単量体と 2 量体の構造が N 末端領域と C 末端領域のそれぞれで類似していることを示す。また、2 量体の活性部位構造におけるヘムの配向およびアミノ酸側鎖の位置は、単量体とよく重なった (Figure 2-6, B)。2 量体のヘム鉄にはヘムが属するものとは異なるプロトマー由来の Met7 が配位していたが (Figure 2-5, D), 単量体で見られた Met7 および His102 のヘム鉄への軸配位は 2 量体でも保たれていた (Figure 2-5, C)。

3 分子の cyt *cb*₅₆₂ ドメインスワップ 2 量体が中空のケージ構造を結晶中で形成した (Figure 2-7, A, B)。ケージ構造は 1 本の 3 回対称軸と 3 本の擬 2 回対称軸からなる擬 D_3 対称性を有しており、ケージの外径は 55–60 Å だった (Figure 2-7, B)。興味深いことに、ケージには 15 個の Zn^{2+} と 7 個の SO_4^{2-} からなるクラスターが内包されていた (Figure 2-7, C, D, Figure 2-8)。 Zn^{2+} は SO_4^{2-} で架橋されており、Asp2, Glu4, Asp5 および Glu8 の側鎖が Zn^{2+} と配位結合していた (Figure 2-9)。クラスターを構成する Zn^{2+} は 5 つの配位様式に分類され (Figure 2-9, A–E), ケージ内部空間には、クラスターに関与しない 6 つの Zn^{2+} も観測された (Figure 2-9, F, G)。結晶構造中では 2 量体界面に水素結合や疎水性相互作用が見られなかったため、cyt *cb*₅₆₂ のアミノ酸側鎖と Zn^{2+} の配位結合がケージ構造を安定化していることが示唆された。

Table 2-1. データ収集と構造精密化に用いた統計値

Data collection	
X-ray source	SPring-8 (BL38B1)
Wavelength (Å)	1.0000
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 3
Unit cell parameters <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	94.6, 94.6, 94.6
Resolution (Å)	20.0–1.85 (1.88–1.85)
Number of unique reflections	24682 (1241)
R_{merge}^a	0.061 (0.594)
Completeness (%)	100.0 (100.0)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	69.0 (6.2)
Redundancy	16.4 (16.6)
Refinement	
Resolution (Å)	19.3-1.85 (1.90-1.85)
Number of reflections	23154 (1774)
R_{work}^b	0.180 (0.268)
R_{free}^b	0.205 (0.391)
Completeness (%)	100.0 (99.9)
Number of atoms in an asymmetric unit	
Protein	1630
Water	61
Heme	86
Average <i>B</i> factors (Å ²)	
Protein	37.5
Water	32.4
Heme	25.3
Ramachandran plot (%)	
Favored	99.5
Allowed	0.5
Outlier	0.0

Statistics for the highest-resolution shell are given in parentheses.

$$^a R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} |I - \langle I \rangle|}{(\sum_{\text{hkl}} |I|)^{-1}}$$

$^b R_{\text{work}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} ||F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}||}{(\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|)^{-1}}$, *k*: scaling factor. R_{free} was computed identically, except where all reflections belong to a test set of 5 % of randomly selected data.

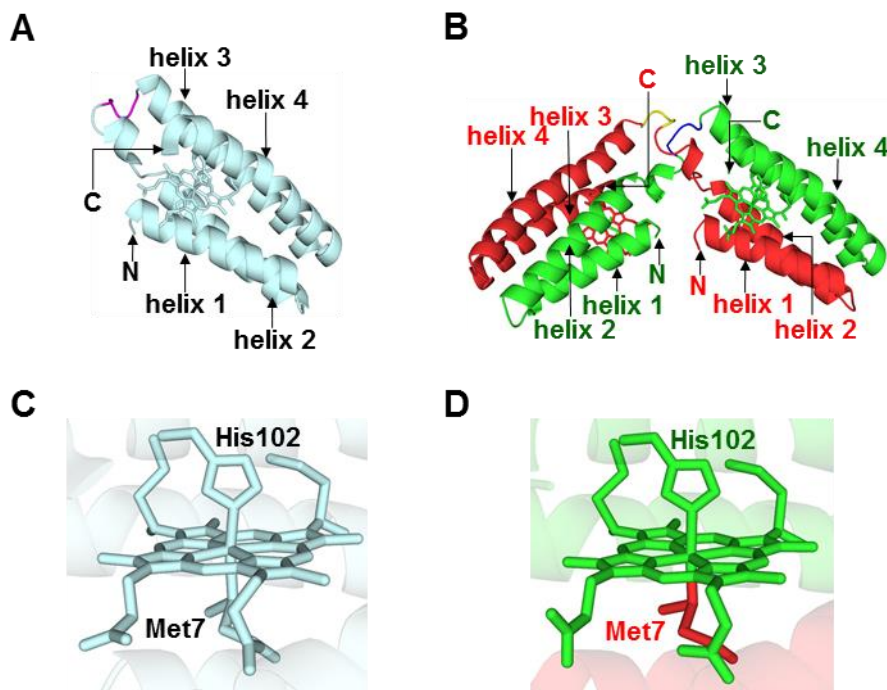


Figure 2-5. *cyt cb₅₆₂* 単量体と 2 量体の結晶構造。(A) 単量体のタンパク質構造 (K59W/R98C/Y101C *cyt b₅₆₂* 変異体, PDB : 2BC5)。(B) 2 量体のタンパク質構造 (PDB : 5AWI)。(C) 単量体の活性部位構造 (PDB : 2BC5)。(D) 2 量体の活性部位構造 (PDB : 5AWI)。2 量体のプロトマーをそれぞれ赤と緑で示す。ヘム, Met7, His102, Cys98, Cys101 をスティックモデルで示す。単量体と 2 量体のプロトマーの N および C 末端をそれぞれ N と C で示す。α ヘリックスを N 末端から順に helix 1, helix2, helix 3, helix 4 で示す。単量体構造中のヒンジループ (Lys51–Asp54) を紫, 2 量体構造中のものを青と黄で示す。

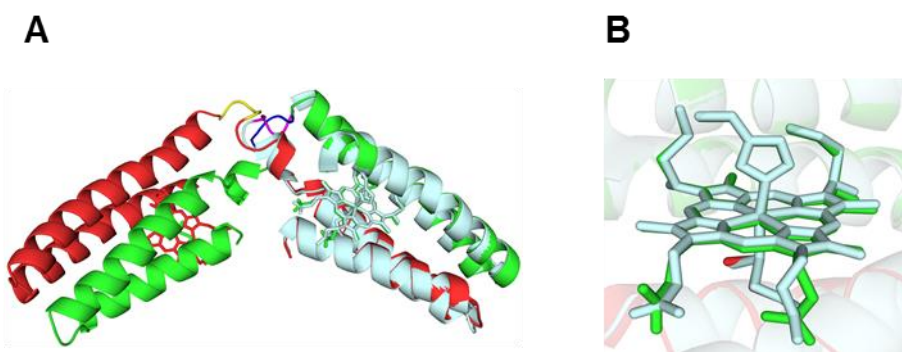


Figure 2-6. *cyt cb₅₆₂* 単量体 (PDB : 2BC5) と 2 量体構造 (PDB : 5AWI) の重ね合わせ。(A) 主鎖構造。(B) 活性部位構造。2 量体のプロトマーをそれぞれ赤と緑で示す。ヘム, Met7, His102, Cys98, Cys101 をスティックモデルで示す。

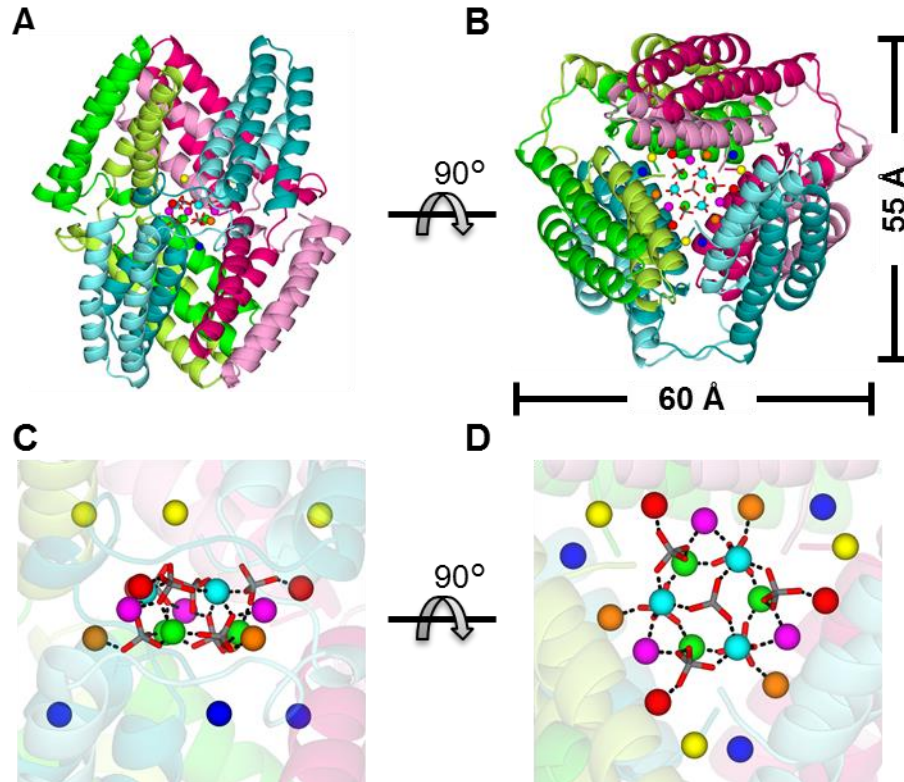


Figure 2-7. *cyt cb₅₆₂* 2 量体が結晶中で形成するケージ構造 (PDB : 5AWI)。(A, B) ケージ全体構造。(B) は (A) を 90°回転したときの図。ケージを形成する 3 分子の 2 量体をそれぞれ緑と黄緑, 青緑と水色, 赤とピンクの組み合わせで示す。水平方向のスケールバー (60 Å) は, 緑とピンクで示された各プロトマーにおける Pro56 の α 炭素間の距離に相当する。垂直方向のスケールバー (55 Å) は, 青緑で示されたプロトマーにおける Pro53 と赤で示されたプロトマーにおける Thr96 の α 炭素間の距離に相当する。(C, D) ケージ内部に存在する Zn²⁺ および SO₄²⁻ の拡大図。(D) は (C) を 90°回転したときの図。Zn²⁺ と SO₄²⁻ の配位結合を黒の破線で示す。Zn²⁺ を緑, 水色, 赤紫, オレンジ, 赤, 黄, 青で示す。SO₄²⁻ をスティックモデルで示し, SO₄²⁻ 中の硫黄および酸素原子をそれぞれ灰色と赤色で示す。

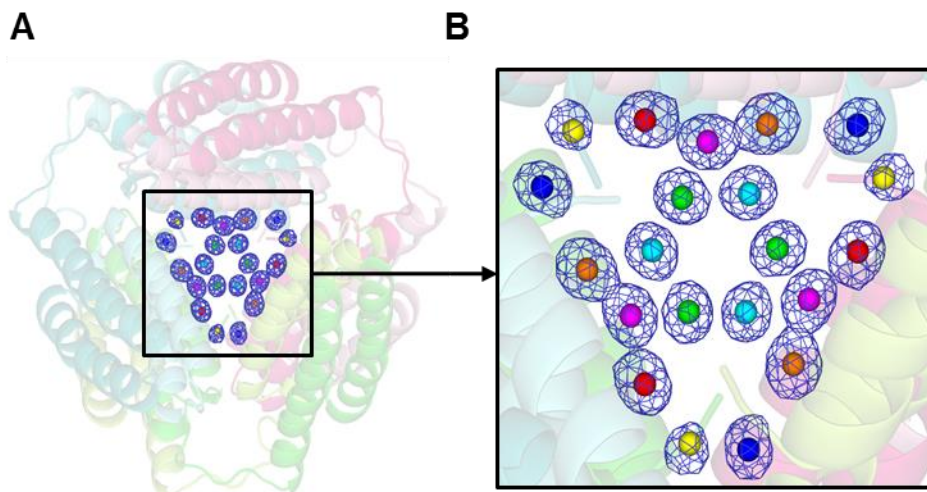


Figure 2-8. *cyt cb₅₆₂* 2 量体ケージ内部空間に存在する Zn^{2+} の F_0 - F_c オミットマップ (PDB: 5AWI)。(A) ケージ全体構造。(B) Zn^{2+} の拡大図。 Zn^{2+} を除去して計算したオミットマップを青のメッシュ状に示す (3.0σ)。ケージを形成する 3 分子の 2 量体をそれぞれ緑と黄緑, 青緑と水色, 赤とピンクの組み合わせで示す。 Zn^{2+} を緑, 水色, 赤紫, オレンジ, 赤, 黄, 青で示す。

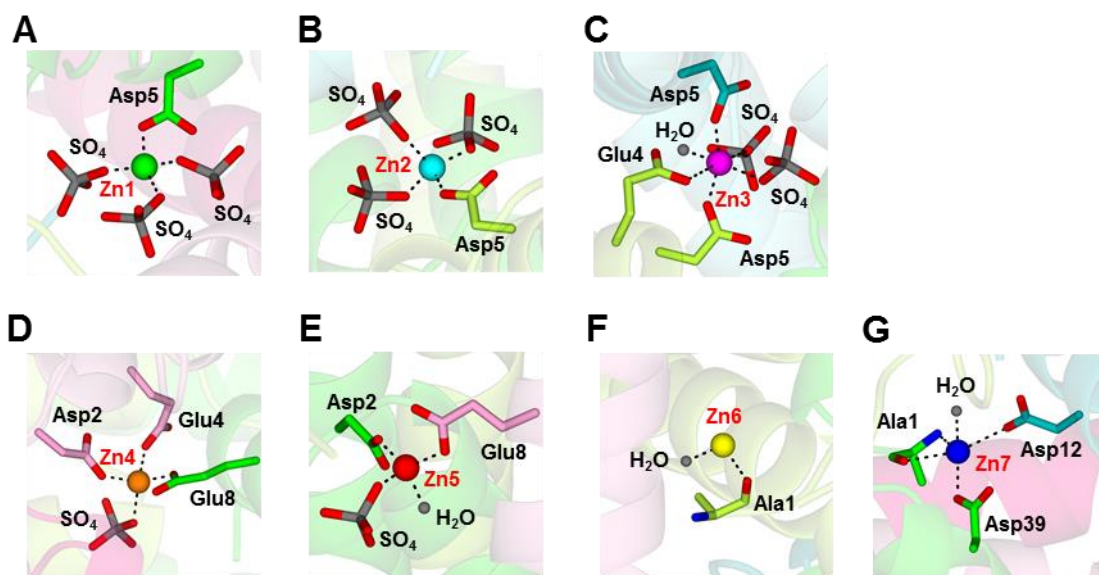


Figure 2-9. *cyt cb₅₆₂* 2量体ケージ内部空間に存在する 21 個の Zn^{2+} と 7 個の SO_4^{2-} の配位構造 (PDB : 5AWI)。15 個の Zn^{2+} (Zn1–Zn5) と 7 個の SO_4^{2-} (SO_4 と表記) は 1 つの Zn- SO_4 クラスターを形成する。別の 6 個の Zn^{2+} (Zn6 と Zn7) はクラスターの形成に関与しない。(A) Zn1 は 3 個の SO_4^{2-} の酸素原子と Asp5 の側鎖と配位している。(B) Zn2 は 3 個の SO_4^{2-} の酸素原子と Asp5 の側鎖と配位している。(C) Zn3 は 2 個の SO_4^{2-} の酸素原子, Glu4 と 2 つの Asp5 の側鎖, 1 個の水分子 (H_2O と表記) と配位している。Glu4 と一方の Asp5 は同一の 2 量体由来だが, もう一方の Asp5 は別の 2 量体に由来する。(D) Zn4 は 1 個の SO_4^{2-} の酸素原子, Asp2, Glu4, Glu8 の側鎖と配位している。Asp2 と Glu4 は同一の 2 量体由来だが, Glu8 は別の 2 量体に由来する。(E) Zn5 は 1 個の SO_4^{2-} の酸素原子, Asp2 と Glu8 の側鎖, 1 個の水分子と配位している。Asp2 と Glu8 は別の 2 量体に由来する。(F) Zn6 は Ala1 のカルボニル基の酸素原子および 1 個の水分子と配位している。電子密度は確認できなかったが Zn6 はさらに別の水分子とも配位しているかもしれない。(G) Zn7 は Ala1 のアミノ基の窒素原子とカルボニル基の酸素原子, Asp12 と Asp39 の側鎖, 1 個の水分子と配位している。Ala1 と Asp39 は同一の 2 量体由来だが, Asp12 は別の 2 量体に由来する。Ala1, SO_4^{2-} , および Asp2, Glu4, Asp5, Glu8, Asp12, Asp39 の側鎖をスティックモデルで示す。配位に関与する窒素, 酸素, 硫黄原子をそれぞれ青, 赤, 灰色で示す。配位水を灰色の球で示す。 Zn^{2+} とその配位子の配位結合 ($< 2.65 \text{ \AA}$) を黒の破線で示す。

2-3-5. cyt *cb*₅₆₂ 量体と Zn²⁺の溶液中での相互作用

cyt *cb*₅₆₂ 量体と Zn²⁺の溶液中での相互作用を調べるために、酸化型 cyt *cb*₅₆₂ 量体に ZnSO₄, ZnCl₂, Na₂SO₄ をそれぞれ加えて動的光散乱 (DLS) 測定を行った (Figure 2-10, A)。2 量体に ZnSO₄ (Zn²⁺と SO₄²⁻) を加えたときの平均粒子径 (4.6 ± 0.3 nm) は、ZnCl₂ (Zn²⁺と Cl⁻) あるいは Na₂SO₄ (Na⁺と SO₄²⁻) を加えたとき平均粒子径 (ZnCl₂: 3.4 ± 0.4 nm, Na₂SO₄: 3.1 ± 0.6 nm) よりも大きくなった。この結果から、Zn²⁺と SO₄²⁻を含む溶液中では複数の cyt *cb*₅₆₂ 量体分子が相互作用しているが、所定のケージ構造は形成されていないことが分かった。

溶液中での cyt *cb*₅₆₂ の分子間相互作用をより詳細に調べるために、酸化型 cyt *cb*₅₆₂ 量体を含む溶液にビス(スルホスクシンイミジル)スペラート (BS3) を加えて cyt *cb*₅₆₂ 量体を架橋した。Zn²⁺と SO₄²⁻存在下で cyt *cb*₅₆₂ 量体を BS3 で架橋した後、反応液を SDS-PAGE で分析した。その結果、単, 2, 3, 4 量体の分子量にそれぞれ相当する約 15, 30, 45, 65 kDa の位置にバンドが検出された (Figure 2-10, B, a)。3 量体に相当するバンドが見られたのは、架橋反応中に 2 量体が単量体へと解離したことが原因かもしれない。また、100 kDa 以上の位置にブロードなバンドも見られた。一方、Na⁺と SO₄²⁻存在下で 2 量体を架橋すると、SDS-PAGE のゲル上には、単量体と 2 量体に相当する 15, 30 kDa の位置にのみバンドが検出された (Figure 2-10, B, b)。これらの結果は、Zn²⁺と SO₄²⁻存在下では cyt *cb*₅₆₂ が 4 量体以上の多量体を形成するが、Zn²⁺と SO₄²⁻が存在しない条件では多量体が形成されないことを示唆する。

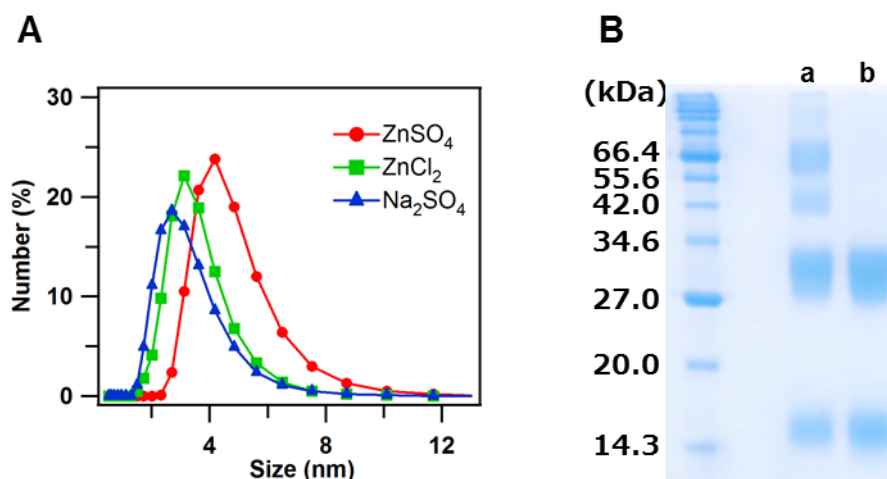


Figure 2-10. (A) 酸化型 cyt *cb*₅₆₂ 量体に ZnSO₄ (赤, 丸), ZnCl₂ (緑, 四角), Na₂SO₄ (青, 三角) をそれぞれ添加した際の DLS サイズ分布曲線。ヘム濃度 50 μM の cyt *cb*₅₆₂ 量体溶液 (15 mM MES 緩衝液, pH 5.5) に 300 μM の ZnSO₄ (赤, 丸), ZnCl₂ (緑, 四角), Na₂SO₄ (青, 三角) をそれぞれ添加して 25 °C で DLS を測定した。(B) ZnSO₄ (a) もしくは Na₂SO₄ (b) を添加した cyt *cb*₅₆₂ 量体を架橋した後の SDS-PAGE 分析。ヘム濃度 200 μM の cyt *cb*₅₆₂ 量体に 1.2 mM の ZnSO₄ もしくは Na₂SO₄ を添加した後、25 mM BS₃ を用い、室温、pH 7.5 の条件で架橋反応を行った。

2-4. 考察

様々なヘムタンパク質がドメインスワッピングにより多量体を形成することが報告されてきている^{1-4,36,39-42}。種々の *c* 型シトクロムや Mb では、ドメインスワップ多量体の活性部位構造が2つのプロトマーにより構成される。*c* 型シトクロムでは、ヘムが別々のプロトマーに由来するアミノ酸残基と配位しており^{1-3,36}、このことがドメインスワップ構造の安定化に寄与しているのかもしれない。cyt *cb*₅₆₂ のドメインスワップ2量体は cyt *b*₅₆₂ 量体と比較して4 °C で単量体へと解離するものが少なかった (Figure 2-1, B, C)。酸化型 cyt *cb*₅₆₂ (K59W/R98C/Y101C cyt *b*₅₆₂ 変異体) 単量体のフォールディングに伴う Gibbs 自由エネルギー変化は -10 kcal mol⁻¹ と報告されているが、ヘムがタンパク質部分と共有結合していない野生型 cyt *b*₅₆₂ 単量体では -7.2 kcal mol⁻¹ である¹⁵。酸化型 HT cyt *c*₅₅₂ 単量体の Gibbs 自由エネルギー変化は酸化型ウマ cyt *c* 単量体よりも大きな負の値を示し (HT cyt *c*₅₅₂, -18 kcal mol⁻¹, ウマ cyt *c*, -5.5 kcal mol⁻¹, 25 °C, pH 7.0)⁴³⁻⁴⁴, HT cyt *c*₅₅₂ ドメインスワップ2量体の解離温度 (92 °C) はウマ cyt *c* 2量体 (58 °C) よりも高い^{1,3}。ドメインスワップ2量体は単量体と類似の3次元構造 (ヒンジループを除く) を有するため、フォールディングに伴う Gibbs 自由エネルギー変化は2量体と単量体で相関があると考えられる。事実、RNase A, cyanovirin-N, Stefin A, M^{Pro}-C, p13suc1 などの多くのタンパク質で、ドメインスワップ2量体の解離がポリペプチド鎖の変性を経て起こると示唆されている⁴⁵⁻⁴⁹。以上を考慮すると、単量体への解離に対するドメインスワップ2量体の安定性は、単量体のフォールディングに伴う Gibbs 自由エネルギー変化の値に相関するのかもしれない。

cyt *cb*₅₆₂ 2量体が単量体へ解離する際のエンタルピー変化 (ΔH) は2量体あたり -13 kcal mol⁻¹ であった。*c* 型シトクロムでは、2量体の解離に伴う ΔH は正から負のさまざまな値を示す。例えば、ウマ cyt *c* 2量体の ΔH は2量体あたり -40 kcal mol⁻¹ と報告されているが¹, HT cyt *c*₅₅₂, PA cyt *c*₅₅₁, および *Aquifex aeolicus* cyt *c*₅₅₂ 2量体の ΔH はそれぞれ ~0, +14, -14 kcal mol⁻¹ である^{2-3,36}。 ΔH の値は水和などのさまざまな因子に影響されるが、cyt *cb*₅₆₂ ではヒンジループ部分の水素結合の数が2量化により減少しており (Figure 2-11), この水素結合数の減少が cyt *cb*₅₆₂ 2量体の ΔH が負の値を示すことにつながっているのかもしれない。

cyt *cb*₅₆₂ ドメインスワップ2量体では、一方のプロトマーに属する N 末端領域の helix 1 と helix 2 が、他方のプロトマーに属する C 末端領域の helix 3 および helix 4 と相互作用していた (Figure 2-5, B)。2量体のヘム活性部位は2つのプロトマーで構成され、ヘム鉄の軸配位子はそれぞれ異なるプロトマーに由来するが、活性部位構造は単量体と2量体で類似していた (Figure 2-5, C, D)。単量体とドメインスワップ2量体の結晶構造を比較した結果と一致して、吸収スペクトルと酸化還元電位は両方で類似していた (Figures 2-2, 2-3)。ウマ cyt *c* のドメインスワップ多量体は、フォールディング初期過程における N 末端と C 末端 α ヘリックスの分子間疎水性相互作用により形成されることが過去の研究で示されている⁵⁰。最近では、フォールディングのシミュレーションにより、アポ Mb もウマ cyt *c* と類似した機構でドメインスワッピン

グすることが報告されている⁵¹。すなわち、アポ Mb のドメインスワップ 2 量体は、一方の分子のヘリックス A–B 領域と他方の分子のヘリックス G–H 領域がフォールディングの初期過程で分子間相互作用することにより形成される。野生型アポ cyt *b*₅₆₂ およびその変異体（疎水性残基を Asp と Gly に置換）では、フォールディングの初期過程で helix 2 と helix 3 が最初に形成されると示唆されている^{10,52}。cyt *cb*₅₆₂ は 40% (v/v) の酢酸を添加することにより沈殿し、緩衝液で沈殿を再溶解させることでリフォールドしていると考えられる (**Figure 2-1, B**)。cyt *cb*₅₆₂ のドメインスワッピングでは、helix 2 と helix 3 をつなぐループがヒンジループの役割を果たしており、このことは、上述のフォールディングの初期過程で helix 2 と helix 3 が最初に形成されることと一致する。すなわち、cyt *cb*₅₆₂ ドメインスワップ 2 量体はフォールディングの初期過程で helix 2 と helix 3 が分子間相互作用することで形成され、helix 2 と helix 3 が分子内で相互作用した場合は単量体が形成されると推察される (**Figure 2-12**)。しかし、cyt *cb*₅₆₂ は安定な中間体を経ずにフォールディングすると報告されているため、helix 2 と helix 3 が分子間相互作用した中間体はおそらく短寿命と予想される¹⁶。

3 分子の cyt *cb*₅₆₂ 2 量体が集まって結晶中でケージ構造が形成されたが (**Figure 2-7, A, B**)、結晶中で見られたケージ構造は溶液中では形成されなかった (**Figure 2-10, B**)。また、Zn²⁺非存在下では cyt *cb*₅₆₂ 2 量体の単結晶は得られなかった。Asp 残基 (Asp2, Asp5, Asp12, Asp39) と Glu 残基 (Glu4, Glu8) のカルボキシル基および Ala1 のアミノ基とカルボニル基は、cyt *cb*₅₆₂ ケージの内部空間で Zn²⁺と配位結合していた (**Figure 2-9**)。この配位結合が 3 分子の cyt *cb*₅₆₂ 2 量体のケージ構造形成に寄与していると考えられるが、水素結合や疎水性相互作用は 2 量体界面に見られなかった。Zn²⁺との配位結合によりタンパク質分子が対称に配置されることで、タンパク質の結晶化が促進されることが報告されている⁵³。cyt *cb*₅₆₂ 2 量体のケージ構造は擬 D₃ 対称性を示しており、Zn²⁺が cyt *cb*₅₆₂ 2 量体の結晶化を促進していると推察される。

タンパク質ケージは、薬物や遺伝子の輸送担体⁵⁴、ナノリアクター⁵⁵、ナノメディシン⁵⁶、ナノデバイスなどへの応用が期待されているが⁵⁷、ケージ構築の成功例は限られている⁵⁸⁻⁶¹。Ni と Tezcan は cyt *cb*₅₆₂ 表面変異体 (CFMC-1) を作製し、直径約 35 Å のキャビティーを持つ結晶性のケージ構造体を構築した (**Figure 2-13**)²²。さらに、ヘムが結合したペプチド断片を CFMC-1 ケージに内包することにも成功した。一方、本研究では、3 分子の cyt *cb*₅₆₂ ドメインスワップ 2 量体からなるケージ構造体を得られ、このケージは Zn-SO₄ クラスターを内包していた。Zn²⁺と SO₄²⁻をモデルから除外して VOIDOO プログラム (プローブ半径 1.4 Å) によりケージのキャビティー体積を計算したところ³⁵、1860 Å³となった。この値は、Ni と Tezcan により報告された CFMC-1 ケージのキャビティー体積 (32,740 Å³) よりも小さかった。CFMC-1 ケージは Zn-SO₄ クラスターを内包していないため、タンパク質部分と Zn-SO₄ クラスターとの相互作用がドメインスワップ cyt *cb*₅₆₂ ケージのキャビティー体積を小さくしているのかもしれない。

CFMC-1 ケージでは 3 箇所の Zn^{2+} 結合サイトが確認されている²²。CFMC-1 ケージにおいて Zn^{2+} と配位結合しているアミノ酸残基 (Ala1, Glu8, Asp12, Asp39) は、ドメインスワップ *cyt cb₅₆₂* ケージにおいても同様に Zn^{2+} と配位結合していた。特にドメインスワップ *cyt cb₅₆₂* ケージの Ala1, Asp12, Asp39 からなる Zn7 結合サイトは、CFMC-1 ケージの Ala1, Asp39 からなる Zn^{2+} 結合サイトとよく対応していた (**Figure 2-14**)。このことは、N 末端の Ala1 と Asp39 が互いに Zn^{2+} と結合しやすい性質を持つことを示している。

cyt cb₅₆₂ 単量体と 2 量体は類似する 2 次構造を持つが、単量体は 2 量体の単結晶が得られた条件では結晶化しなかった。従って、ドメインスワップ構造が結晶中での *cyt cb₅₆₂* 2 量体ケージ構造の形成に重要な役割を果たしていると考えられる。ケージ構造が形成されるためには、2 量体のアミノ酸残基が Zn^{2+} と適切な位置で配位結合する必要がある。2 量体では 2 つの 4 ヘリックスバンドル構造がヒンジループでつながっているため、2 つの 4 ヘリックスバンドルは Zn^{2+} との配位に適した相対配置をとりやすいと考えられる。また、6 分子の単量体でケージを形成するよりも、3 分子のドメインスワップ 2 量体でケージを形成した方がエントロピーの損失は小さいと予想される。これらの理由により、*cyt cb₅₆₂* ドメインスワップ 2 量体はケージ構造を形成するのかもしれない。

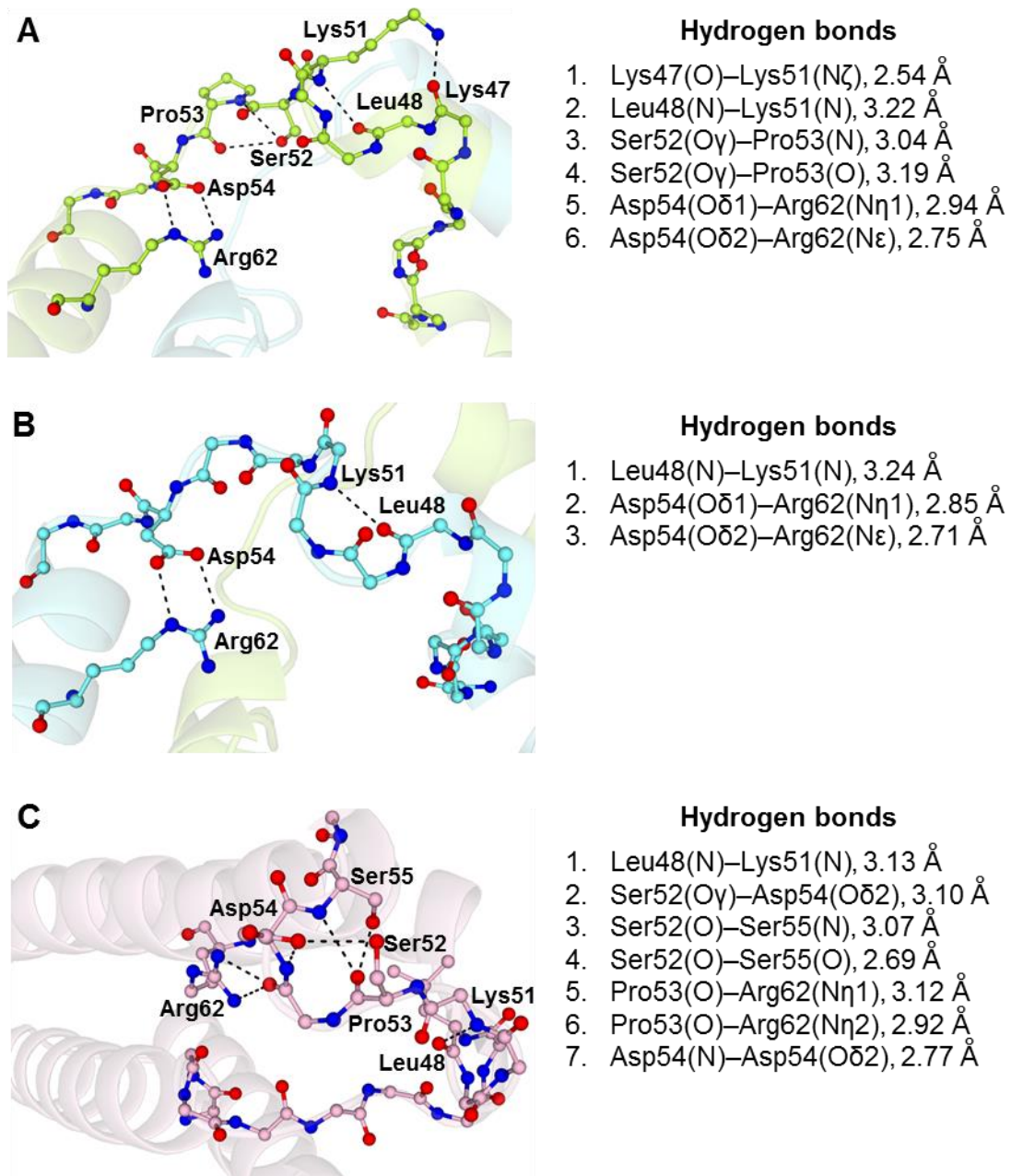


Figure 2-11. (A, B) *cyt cb₅₆₂* 2 量のプロトマー (PDB : 5AWI) と (C) *cyt b₅₆₂* 単量体 (PDB : 256B) のヒンジループ領域 (Lys51–Asp54) における水素結合。水素結合を黒破線で示す。*cyt cb₅₆₂* 単量体結晶構造 (K59W/R98C/Y101C *cyt b₅₆₂* 変異体, PDB : 2BC5) では変異箇所の W59 がヒンジループと水素結合していたため、*cyt cb₅₆₂* 2 量体との比較には *cyt b₅₆₂* 単量体の結晶構造を用いた。*cyt cb₅₆₂* 2 量のプロトマーをそれぞれ黄緑水色で示す。水素結合を形成するアミノ酸残基の側鎖と helix 2 と helix 3 をつなぐループの主鎖をボール&スティックモデルで示す。窒素原子と酸素原子をそれぞれ青と赤で示す。

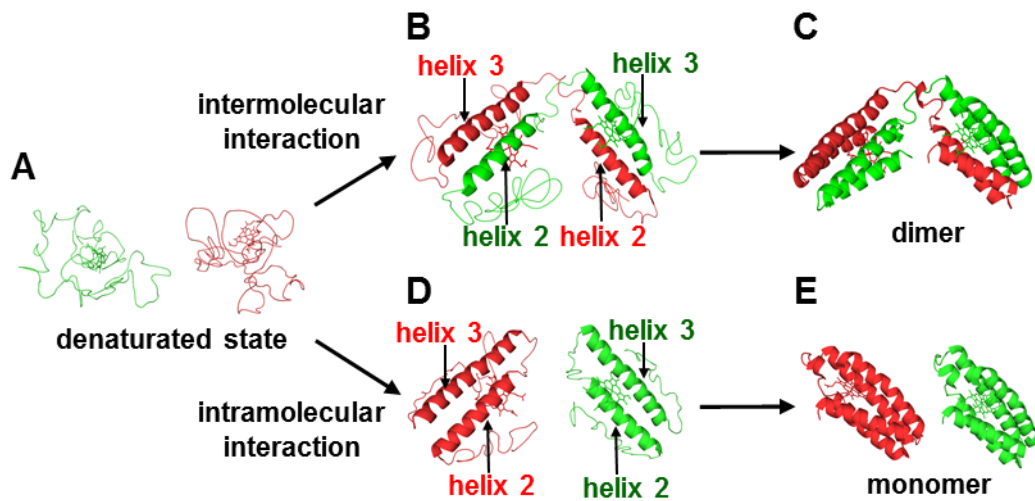


Figure 2-12. フォールディング過程における *cyt cb*₅₆₂ 単量体と 2 量体の形成機構。(A) 変性状態の *cyt cb*₅₆₂。(B) helix 2 と helix 3 が分子間相互作用した *cyt cb*₅₆₂ 2 量体の中間体。(C) *cyt cb*₅₆₂ 2 量体 (PDB : 5AWI)。(D) helix 2 と helix 3 が分子内相互作用した *cyt cb*₅₆₂ 単量体の中間体。(E) *cyt cb*₅₆₂ 単量体 (PDB : 2BC5)。

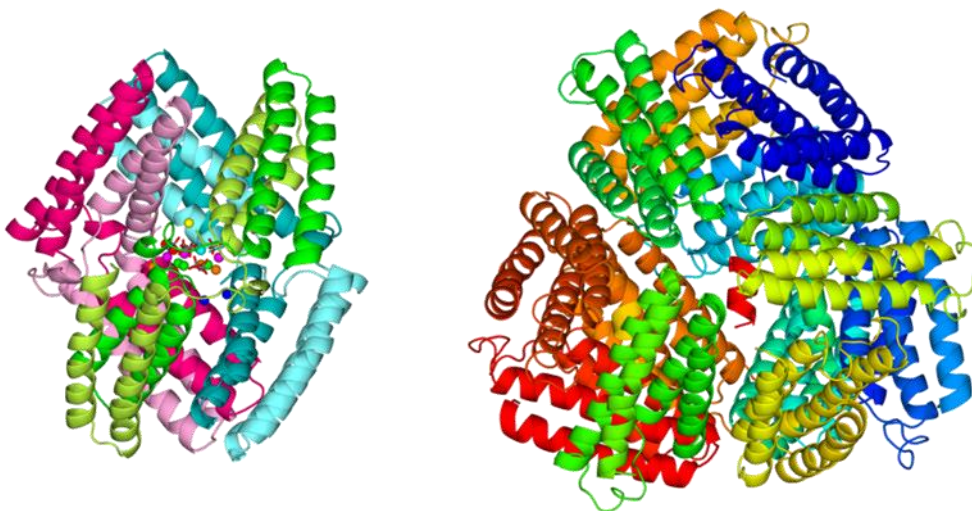


Figure 2-13. *cyt cb*₅₆₂ ドメインスワップ 2 量体ケージ (左, PDB : 5AWI) と CFMC-1 ケージ (右, PDB : 3M4B) の比較。

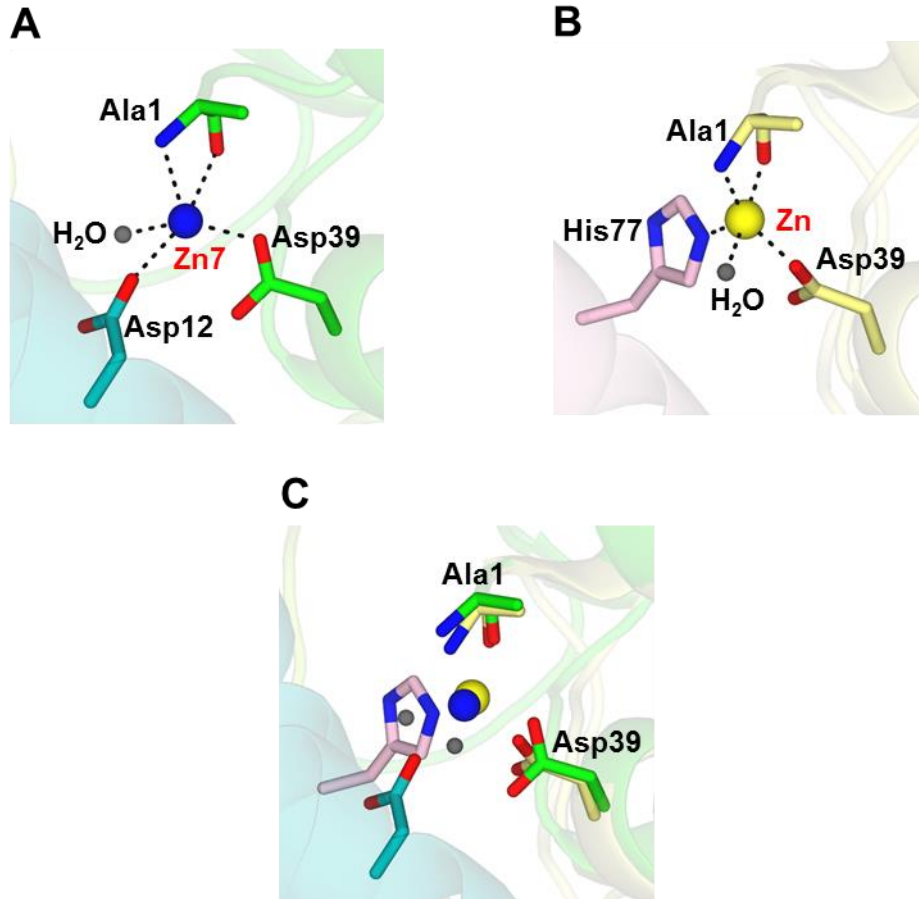


Figure 2-14. Ala1 と Asp39 からなる Zn 結合サイト。(A) *cyt cb*₅₆₂ ドメインスワップ 2 量体ケージ (PDB : 5AWI)。(B) CFMC-1 ケージ (PDB : 3M4B)。(C) (A) と (B) の重ね合わせ。Zn²⁺とその配位子の配位結合 (<2.65 Å) を黒の破線で示す。Ala1 の主鎖および側鎖, Asp12, Asp39, His77 の側鎖をスティックモデルで示す。配位に関与する窒素, 酸素原子をそれぞれ青, 赤で示す。配位水を灰色の球で示す。

2-5. 本章の結論

cyt *b*₅₆₂ および cyt *cb*₅₆₂ は酢酸処理により多量体を形成した。cyt *cb*₅₆₂ 量体は 4 °C の条件で cyt *b*₅₆₂ よりも安定であり、ヘムをタンパク質部位に共有結合することにより 2 量体構造が安定化されることが示された。また、cyt *cb*₅₆₂ 量体は、単量体と類似する活性部位構造、2 次構造、酸化還元電位を示し、50.1°C で単量体へと解離することが分かった。X 線結晶構造解析により、cyt *cb*₅₆₂ 量体はドメインスワップ構造を取ることが示された。すなわち、cyt *cb*₅₆₂ 量体では、一方のプロトマーに属する N 末端側 2 本の α ヘリックス (helix 1 および 2) が、他方のプロトマーに属する C 末端側 2 本の α ヘリックス (helix 3 および 4) と相互作用していた。cyt *cb*₅₆₂ 量体のドメインスワップ構造は、フォールディングの初期過程で最初に形成される helix 2 と 3 が分子間相互作用することにより形成されると推測される。結晶中では、3 分子の cyt *cb*₅₆₂ 量体が Zn-SO₄ クラスターを内包するケージ構造体を形成した。2 量体界面に水素結合や疎水性相互作用は見られなかったが、cyt *cb*₅₆₂ のアミノ酸残基と Zn²⁺ の配位結合がケージ構造を安定化していた。cyt *cb*₅₆₂ ドメインスワップ 2 量体ケージのキャビティーサイズは、過去に報告された cyt *cb*₅₆₂ 表面変異体 (CFMC-1) ケージよりも小さかった。CFMC-1 ケージは Zn-SO₄ クラスターを内包していないため、タンパク質部分と Zn-SO₄ クラスターの相互作用が cyt *cb*₅₆₂ ドメインスワップ 2 量体ケージのサイズを小さく留めているのかもしれない。ドメインスワップ 2 量体では 2 つの 4 ヘリックスバンドル構造がヒンジループを介してつながっており、このことはケージ構造の安定化に寄与していると推察される。本研究で得られた結果は、ドメインスワッピングが人工タンパク質ナノ構造体の構築に有用であることを示す。

参考文献

1. S. Hirota, Y. Hattori, S. Nagao, M. Taketa, H. Komori, H. Kamikubo, Z. Wang, I. Takahashi, S. Negi, Y. Sugiura, M. Kataoka and Y. Higuchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 12854.
2. S. Nagao, M. Ueda, H. Osuka, H. Komori, H. Kamikubo, M. Kataoka, Y. Higuchi and S. Hirota, *PLoS One*, 2015, **10**, e0123653.
3. Y. Hayashi, S. Nagao, H. Osuka, H. Komori, Y. Higuchi and S. Hirota, *Biochemistry*, 2012, **51**, 8608.
4. S. Nagao, H. Osuka, T. Yamada, T. Uni, Y. Shomura, K. Imai, Y. Higuchi and S. Hirota, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 11378.
5. E. Itagaki and L. P. Hager, *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 3687.
6. F. Lederer, A. Glatigny, P. H. Bethge, H. D. Bellamy and F. S. Matthew, *J. Mol. Biol.*, 1981, **148**, 427.
7. F. Arnesano, L. Banci, I. Bertini, J. Faraone-Mennella, A. Rosato, P. D. Barker and A. R. Fersht, *Biochemistry*, 1999, **38**, 8657.
8. M. T. Fisher, *Biochemistry*, 1991, **30**, 10012.
9. C. R. Robinson, Y. Liu, J. A. Thomson, J. M. Sturtevant and S. G. Sligar, *Biochemistry*, 1997, **36**, 16141.
10. E. J. Fuentes and A. J. Wand, *Biochemistry*, 1998, **37**, 3687.
11. C. R. Robinson, Y. Liu, R. O'Brien, S. G. Sligar and J. M. Sturtevant, *Protein Sci.*, 1998, **7**, 961.
12. P. Wittung-Stafshede, J. C. Lee, J. R. Winkler and H. B. Gray, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, **96**, 6587.
13. P. D. Barker, E. P. Nerou, S. M. Freund and I. M. Fearnley, *Biochemistry*, 1995, **34**, 15191.
14. J. Faraone-Mennella, H. B. Gray and J. R. Winkler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 6315.
15. J. Faraone-Mennella, F. A. Tezcan, H. B. Gray and J. R. Winkler, *Biochemistry*, 2006, **45**, 10504.
16. T. Kimura, J. C. Lee, H. B. Gray and J. R. Winkler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**, 7834.
17. E. N. Salgado, J. Faraone-Mennella and F. A. Tezcan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 13374.
18. E. N. Salgado, R. A. Lewis, J. Faraone-Mennella and F. A. Tezcan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 6082.
19. R. J. Radford and F. A. Tezcan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 9136.
20. E. N. Salgado, R. A. Lewis, S. Mossin, A. L. Rheingold and F. A. Tezcan, *Inorg. Chem.*, 2009, **48**, 2726.
21. J. D. Brodin, A. Medina-Morales, T. Ni, E. N. Salgado, X. I. Ambroggio and F. A. Tezcan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 8610.
22. T. W. Ni and F. A. Tezcan, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 7014.

23. R. J. Radford, P. C. Nguyen, T. B. Ditri, J. S. Figueroa and F. A. Tezcan, *Inorg. Chem.*, 2010, **49**, 4362.
24. E. N. Salgado, X. I. Ambroggio, J. D. Brodin, R. A. Lewis, B. Kuhlman and F. A. Tezcan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 1827.
25. J. D. Brodin, X. I. Ambroggio, C. Tang, K. N. Parent, T. S. Baker and F. A. Tezcan, *Nat. Chem.*, 2012, **4**, 375.
26. A. Medina-Morales, A. Perez, J. D. Brodin and F. A. Tezcan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 12013.
27. W. J. Song and F. A. Tezcan, *Science*, 2014, **346**, 1525.
28. Y. W. Lin, S. Nagao, M. Zhang, Y. Shomura, Y. Higuchi and S. Hirota, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**, 511.
29. C. Ren, S. Nagao, M. Yamanaka, H. Komori, Y. Shomura, Y. Higuchi and S. Hirota, *Molecular BioSystems*, 2015, **11**, 3218.
30. E. Arslan, H. Schulz, R. Zufferey, P. Künzler and L. Thöny-Meyer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, **251**, 744.
31. G. Battistuzzi, M. Borsari, M. Sola and F. Francia, *Biochemistry*, 1997, **36**, 16247.
32. M. Yoshida, K. Igarashi, M. Wada, S. Kaneko, N. Suzuki, H. Matsumura, N. Nakamura, H. Ohno and M. Samejima, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 4548.
33. Z. Otwinowski and W. Minor, *Methods Enzymol.*, 1997, **276**, 307.
34. G. N. Murshudov, P. Skubak, A. A. Lebedev, N. S. Pannu, R. A. Steiner, R. A. Nicholls, M. D. Winn, F. Long and A. A. Vagin, *Acta. Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2011, **67**, 355.
35. G. J. Kleywegt and T. A. Jones, *Acta. Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 1994, **50**, 178.
36. M. Yamanaka, S. Nagao, H. Komori, Y. Higuchi and S. Hirota, *Protein Sci.*, 2015, **24**, 366.
37. P. D. Barker, J. L. Butler, P. de Oliveira, H. A. O. Hill and N. I. Hunt, *Inorg. Chim. Acta*, 1996, **252**, 71.
38. Y. Mie, F. Mizutani, T. Uno, C. Yamada, K. Nishiyama and I. Taniguchi, *J. Inorg. Biochem.*, 2005, **99**, 1245.
39. D. Nurizzo, M. C. Silvestrini, M. Mathieu, F. Cutruzzolà, D. Bourgeois, V. Fülöp, J. Hajdu, M. Brunori, M. Tegoni and C. Cambillau, *Structure*, 1997, **5**, 1157.
40. B. R. Crane, R. J. Rosenfeld, A. S. Arvai, D. K. Ghosh, S. Ghosh, J. A. Tainer, D. J. Stuehr and E. D. Getzoff, *EMBO J.*, 1999, **18**, 6271.
41. M. Czjzek, S. Létoffé, C. Wandersman, M. Delepierre, A. Lecroisey and N. Izadi-Pruneyre, *J. Mol. Biol.*, 2007, **365**, 1176.
42. M. A. Silva, T. G. Lucas, C. A. Salgueiro and C. M. Gomes, *PLoS One*, 2012, **7**, e46328.
43. J. Bágel'ová, M. Antalík and Z. Tomori, *IUBMB Life*, 1997, **43**, 891.
44. S. Uchiyama, A. Ohshima, S. Nakamura, J. Hasegawa, N. Terui, S. J. Takayama, Y. Yamamoto, Y. Sambongi and Y. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 14684.

45. R. Jerala and E. Žerovnik, *J. Mol. Biol.*, 1999, **291**, 1079.
46. F. Rousseau, J. W. Schymkowitz, H. R. Wilkinson and L. S. Itzhaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**, 5596.
47. E. Bucci, L. Vitagliano, R. Barone, S. Sorrentino, G. D'Alessio and G. Graziano, *Biophys. Chem.*, 2005, **116**, 89.
48. X. Kang, N. Zhong, P. Zou, S. Zhang, C. Jin and B. Xia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, **109**, 14900.
49. L. Liu, I. J. Byeon, I. Bahar and A. M. Gronenborn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 4229.
50. P. P. Parui, M. S. Deshpande, S. Nagao, H. Kamikubo, H. Komori, Y. Higuchi, M. Kataoka and S. Hirota, *Biochemistry*, 2013, **52**, 8732.
51. K. Ono, M. Ito, S. Hirota and S. Takada, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 5006.
52. H. Feng, Z. Zhou and Y. Bai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 5026.
53. A. Laganowsky, M. Zhao, A. B. Soriaga, M. R. Sawaya, D. Cascio and T. O. Yeates, *Protein Sci.*, 2011, **20**, 1876.
54. N. M. Molino and S. W. Wang, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2014, **28**, 75.
55. T. Ueno, *Chem. Eur. J.*, 2013, **19**, 9096.
56. D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit and R. Langer, *Nat. Nanotechnol.*, 2007, **2**, 751.
57. I. Yamashita, K. Iwahori and S. Kumagai, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, 2010, **1800**, 846.
58. N. P. King, W. Sheffler, M. R. Sawaya, B. S. Vollmar, J. P. Sumida, I. André, T. Gonen, T. O. Yeates and D. Baker, *Science*, 2012, **336**, 1171.
59. Y. T. Lai, K. L. Tsai, M. R. Sawaya, F. J. Asturias and T. O. Yeates, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 7738.
60. N. P. King, J. B. Bale, W. Sheffler, D. E. McNamara, S. Gonen, T. Gonen, T. O. Yeates and D. Baker, *Nature*, 2014, **510**, 103.
61. Y. L. Lai, E. Reading, G. L. Hura, K. L. Tsai, A. Laganowsky, F. J. Asturias, J. A. Tainer, C. V. Robinson and T. O. Yeates, *Nat. Chem.*, 2014, **6**, 1065.

第3章

3 ヘリックスバンドルタンパク質で2種類の多量体形成タンパク質を連結した融合タンパク質によるナノ構造体構築

3-1. 導入

水溶液中で安定なタンパク質ナノ構造体を構築することは、ナノ材料としての応用の観点から重要である。昨今、コンピューターデザイン (1-3-1 項) あるいは対称性に基づく融合タンパク質の多量体形成 (1-3-2 項) を利用した手法により、水溶液中において安定な種々のタンパク質ナノ構造体が構築されつつある¹⁻⁹。第2章では、cyt *cb*₅₆₂ ドメインスワップ2量体を利用することにより、結晶中でZn-SO₄ クラスタを内包するタンパク質ケージの構築に成功した。これはドメインスワッピングを利用したケージ構築の初めての例であり、新しい概念によるケージ構築法を提供することができた。しかし、溶液中ではcyt *cb*₅₆₂ ケージ構造体のみを選択的に得ることはできなかった (2-3-5 項)。cyt *cb*₅₆₂ ケージの場合、ビルディングブロックとなる2量体の構造自由度が大きいため、Zn²⁺とタンパク質の配位結合で得られるエンタルピーでは、溶液中でのケージ形成で生じるエントロピー損失を補償できないことが問題と予想される。溶液中で強力に分子間相互作用する剛直なビルディングブロックタンパク質を設計することにより、この問題点が解決できると考えられる。

自己集合する剛直なビルディングブロックをコンピューターによりデザインすることが考えられるが、コンピューターデザインは大規模計算に耐え得る計算資源が必要となり汎用性に欠ける。また、この手法ではビルディングブロックの自己集合を駆動する新たな相互作用界面を設計する必要があるが、適切な相互作用界面の設計は未だに困難であり、大きな労力を要する。一方、融合タンパク質を利用する構築法では、既知の多量体タンパク質をビルディングブロックの構成要素とすることで、新たな相互作用界面の設計を回避できる。これまでの報告では、剛直な α ヘリックスリンカー、あるいはフレキシブルなペプチドリンカーにより、2種類の2量体タンパク質を連結した融合タンパク質がビルディングブロックとして利用されている (1-3-2 項)。融合タンパク質に α ヘリックスリンカーを用いた場合、2種類の多量体ドメインの相対配置を制限することができるが、構築できる構造体が限定的である^{6,8}。加えて、融合タンパク質の構成要素として利用できる多量体タンパク質が制限される問題もある。フレキシブルなペプチドリンカーを用いた場合では、構成要素として利用できる多量体タンパク質の幅が広がる。しかし、設計された融合タンパク質の自由度が大きくなるため、様々な構造体が不均一に形成されてしまい⁵、望みの構造体を構築することが難しい。本章では、従来の融合タンパク質による構築法を改良するという観点から、2種類の多量体タンパク質(3MLI, 1WRS)を3ヘリックスバンドルタンパク質(1BR0)でつないだ融合タンパク質(3MLI-1BR0-1WRS)を新たに設計し、四角形のナノ構造体の溶液中での構築を試みた。

3-2. 実験方法

3MLI-1BR0-1WRS の発現系構築

In-Fusion HD Enzyme Premix (Takara) を用いたクローニングにより, 3MLI-1BR0-1WRS- pET15b プラスミドを作製した。トランスフォーメーションにより, 大腸菌 Rosetta2 (DE3) 株のコンピテントセルにプラスミドを導入することで, 3MLI-1BR0-1WRS の発現系を構築した。以下に構築したプラスミドから発現される融合タンパク質のアミノ酸配列を示す。

[アミノ酸配列]

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMRDYSELEIFEGNPLDKWNDIIFHASKKASKKELERL
LELLALCETFIEKEDLEEKFESFAKALRIDEELQQKIESRKTDIVIQSMANILSALFMDE
FFEQVEEIRGFIDKIAENVVEEVKRKHSAILASPNDDEKTKEELEELMSDIKKTANKVRS
KLKSIEQSIEQEEGLNRSSADLRIRKTQHSTLSRKFFVEVMSEYNATQSDYGS GSGRHHQ
EWLRFVDLLKNAYQNDLHLPLLNLMLTPDEREALGTRVRIVEELLRGEMSQRELKNE
LGAGIATITRGSNSLKAAPVELRQWLEEVLLKSD

3MLI-1BR0-1WRS の発現・抽出・リフォールディング

3MLI-1BR0-1WRS を高発現する大腸菌 Rosetta2 (DE3) 株を LB 培地 (100 µg/mL アンピシリン, 30 µg/mL クロラムフェニコールを含む) 中 37 °C で培養した。培養液の OD₆₀₀ が 0.6 に達した段階で IPTG (Wako) を終濃度 500 µM になるように培養液へ加えることにより, 3MLI-1BR0-1WRS の発現を誘導した。IPTG による誘導後, 37 °C で 4 時間培養を続け, 大腸菌を遠心分離により沈殿として捕集した。菌体を 150 mM NaCl を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中に懸濁させ, 凍結融解を 3 度繰り返した後, 超音波処理により菌体を破碎した。菌体破碎後の懸濁液を遠心分離することにより, 3MLI-1BR0-1WRS の封入体を沈殿として得た。沈殿を 0.2 % Tween20 および 150 mM NaCl を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中に懸濁させ, 遠心分離により上清を除く操作を 2 度繰り返して膜成分を除去した。その後, 沈殿を 150 mM NaCl を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中に懸濁させ遠心分離により上清を除くことで Tween20 を除去した。得られた沈殿にリフォールディング緩衝液 (6 M グアニジン塩酸塩, 100 mM アルギニン, 10 mM ジチオスレイトール (DTT), 10 mM EDTA, 500 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl) を加えて溶解させた後, 遠心分離により上清を回収した。回収した上清は 200 mM NaCl を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中で 1 晩透析した。この間, 透析外液は 4 度交換した。透析後のタンパク質溶液について遠心分離により沈殿を除いた後, ストレプトマイシンを加え, 遠心分離を再度行うことで核酸を除去した。回収したタンパク質溶液を FPLC システム (AKTAprime plus, GE Healthcare) と HisTrap HP カラム (5 mL, GE Healthcare) を用いた固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー (IMAC) (流速 3 mL/min, 検出波長 280 nm, 溶媒 A 500 mM NaCl を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0), 溶媒 B 1 M イミダゾールと 500 mM NaCl

を含む 25mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0), 温度 4 °C) により精製した。
回収したタンパク質溶液をフィルター (孔径 0.45 μm, Millipore) に通した後, FPLC システム (AKTAprime plus, GE Healthcare) と HiLoad 26/60 Superdex 200 pg (GE Healthcare) カラムを用いた SEC-FPLC (流速: 2.5 mL/min, 検出波長: 280 nm, 溶媒: 150 mM NaCl を含む 25mM Tris-HCl 緩衝液, pH: 8.0, 温度: 4 °C) を 2 度行い, 3MLI-1BR0-1WRS の 4 量体を精製した。

サイズ排除クロマトグラフィー分析

タンパク質濃度が 25–250 μM の 3MLI-1BR0-1WRS の 4 量体溶液 (150 mM NaCl を含む 25mM Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0) を調製し, FPLC システム (BioLogic DuoFlow 10, Bio-rad) と Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) カラムを用いた SEC-FPLC (流速: 0.5 mL/min, 検出波長: 280 nm, 溶媒: 150 mM NaCl を含む 25mM Tris-HCl 緩衝液, pH: 8.0, 温度: 4 °C) により分析することで濃度平衡を調べた。

X 線小角散乱測定

3MLI-1BR0-1WRS の 4 量体について, タンパク質濃度を変調させながら X 線小角散乱 (SAXS) 測定を行った。タンパク質濃度は, アミノ酸配列から計算したモル吸光係数 ($\epsilon_{280} = 22.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) により決定した¹⁰。分子量を決定するための標準試料としてオボアルブミンを用いた。測定は以下の条件で行った。

[測定条件]

X 線回折装置: Nano-Viewer (RIGAKU)

検出器: PILATUS 200K

X 線: Cu-K α , 1.542 Å

露光時間: 180 min (total)

測定範囲: 0.0147–0.2 (q)

試料濃度: 11.2 mg/mL

緩衝液: 150 mM NaCl を含む 25mM Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0

高速原子間力顕微鏡観察

3MLI-1BR0-1WRS の 4 量体について, 高速原子間力顕微鏡 (AFM) 観察を行った。タンパク質試料は, 3-aminopropyl-triethoxysilane (0.2%) で表面を修飾したマイカ基板上に固定した。撮像は過去に報告された装置, 手順で行われた¹¹。

3-3. 実験結果

3-3-1. 3MLI-1BR0-1WRS の設計戦略

溶液中でのナノ構造体構築を達成するために、融合タンパク質の多量体形成を利用する構築法に着目した。過去に報告された設計戦略では、2種類の多量体タンパク質が剛直な α ヘリックスやフレキシブルなペプチドリンカーにより連結されていたが、これらの設計戦略は3-1節で述べた問題点を有している。本研究では、N末端側2量体タンパク質(3MLI)、3ヘリックスバンドルリンカー(1BR0)、C末端2量体タンパク質(1WRS)の3つの構成要素を組み合わせることで融合タンパク質(3MLI-1BR0-1WRS)を設計した(**Figure 3-1, A, B**)。3MLI-1BR0-1WRSは四角形の構造を持つ4量体を形成することが期待される(**Figure 3-1, C**)。

3MLIは*Helicobacter pylori*由来の機能未知タンパク質HP0242の1置換変異体(L44C)であり、2量体の安定性やフォールディングに関する研究が報告されている¹²。重要なことは、3MLIの2量体構造においてC末端ヘリックスが決まった角度で分子間相互作用することである(**Figure 3-1, A**)。2量化により一定の角度で分子間相互作用するC末端ヘリックスに剛直なリンカーを連結し、その先にさらに別の2量体タンパク質をつなぐことで、形成する多量体の構造を対称な四角形に制御できると考えた。すなわち、「く」の字型のビルディングブロックが2つ合わさることで四角形が形成されると期待した。3MLIのフォールディングでは、変性状態の単量体(U)が2量化した中間体(I₂)を形成して、最終的に天然状態の2量体(N₂)を形成する経路が報告されている¹²。つまり、3MLIには明確な構造を持つ単量体の中間体は存在しない。このため、融合タンパク質は確実に「く」の字構造を取ると考えられる。リンカーには剛直な3ヘリックスバンドル構造を持つ、シタキシシンN末端ドメインの1BR0を用いた。1BR0は構造安定(熱変性温度:約85°C)で構造の全長が比較的長い(約50Å)ことから¹³、リンカーに適していると考えた。1BR0のN末端ヘリックスと3MLIのC末端ヘリックスを直接連結することにより、融合タンパク質における3MLI部位と1BR0部位の相対配置を固定できると考えた。また、3ヘリックスバンドル構造は3本の α ヘリックスが疎水性相互作用で束になっているため、1BR0は1本の α ヘリックス構造よりも剛直である。このことから、リンカーの不安定性による意図しない構造体の形成が抑制できると期待した。立体障害を回避するために、1WRSは5残基のフレキシブルなスペーサー(GSGSG)を介して1BR0のC末端に連結させた(**Figure 3-1, B**)。1WRSは構造安定な2量体タンパク質(大腸菌由来Trpリプレッサー)であり¹⁴、融合タンパク質において、別分子の1WRS部位と強力に相互作用することが期待される。3MLIと同様に、1WRSには明確な構造を持つ単量体の中間体は存在しないため¹⁵、融合タンパク質の多量体が平衡状態となることを回避できる。なお、本研究で用いた3MLI-1BR0-1WRSのN末端には、精製のためのヘキサヒスチジンタグが付与されている(3-2節)。

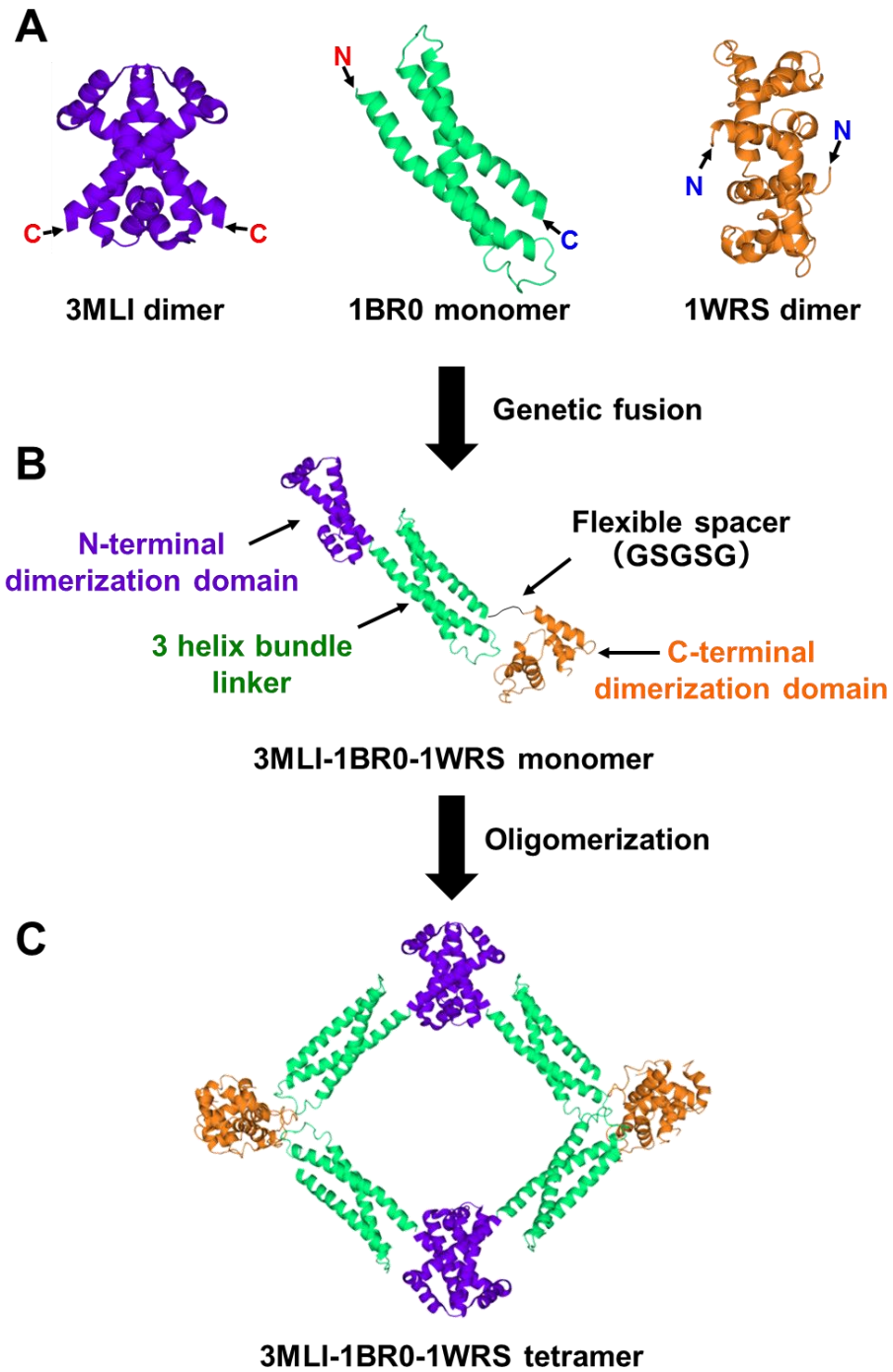


Figure 3-1. 3MLI-1BR0-1WRS の設計。(A) 3MLI の 2 量体結晶構造 (左, PDB : 3MLI), 1BR0 の単量体 NMR 構造 (中央, PDB : 1BR0), 1WRS の 2 量体 NMR 構造 (右, PDB : 1WRS)。N : N 末端, C : C 末端。(B) 3MLI-1BR0-1WRS の単量体モデル構造。(C) 3MLI-1BR0-1WRS の 4 量体モデル構造。

3-3-2. リフォールディングにより得られた 3MLI-1BR0-1WRS の多量体形成

3MLI-1BR0-1WRS を大腸菌により大量発現すると、封入体が形成された。このため、封入体を可溶化してリフォールディングさせることにより目的タンパク質を得た。IMAC による精製後に SDS-PAGE でタンパク質の純度を確認した結果、3MLI-1BR0-1WRS 単量体の分子量 (37.4 kDa) に相当する位置に単一バンドが確認された (**Figure 3-2, A**)。精製した 3MLI-1BR0-1WRS の多量体形成を SEC-FPLC により調べたところ、180 mL および 155 mL 付近にそれぞれピークが観測された他、110–140 mL にもブロードなピークが見られた (**Figure 3-2, B**)。検量線から、180 mL と 155 mL のピークに含まれる多量体は、それぞれ~93 kDa および~215 kDa と見積もられ、これらの分子量はおおよそで単量体 2.5 および 5.5 分子分に相当した。3MLI-1BR0-1WRS 単量体は 2 量体を形成する界面を N 末端 (3MLI 部位) と C 末端 (1WRS 部位) にそれぞれ持つが、分子間で相互作用していない 2 量体形成界面は疎水的な領域が溶媒に曝露されて不安定である。このため、3MLI-1BR0-1WRS では、全ての 2 量体形成界面が分子間相互作用するために、2 の倍数の多量体が形成されると予想された。また、タンパク質の SEC 分析では、同じ分子量のタンパク質でも溶液中でのサイズ (流体力学半径や慣性半径) により溶出位置が異なることはよく知られている¹⁶。3MLI-1BR0-1WRS の 4 量体は特異な四角形の構造を取るよう設計されており、同じ分子量を持つコンパクトな球状タンパク質よりも慣性半径が大きいため、溶出位置が比較的早くなると考えられた。以上より、180 mL と 155 mL に溶出したピークはそれぞれ 2 量体と 4 量体であると帰属され、110–140 mL のブロードなピークは 4 量体よりも大きい種々の高次多量体が含まれていると推察された。

3MLI-1BR0-1WRS について平衡状態が存在するかを確認する目的で、異なるタンパク質濃度の 2, 4 量体を用いて SEC-FPLC による分析を行った。25–250 μ M の濃度範囲では、2, 4 量体ともに溶出位置の変化は見られなかったことから (**Figure 3-3**)、2, 4 量体はいずれも濃度平衡を示さないことが分かった。また、リフォールディング時の融合タンパク質濃度が多量体形成量に与える影響を調べた。高タンパク質濃度でリフォールディングすると、低タンパク質濃度のときと比較して、サイズの大きい多量体が多く形成されることが分かった (**Figure 3-4**)。

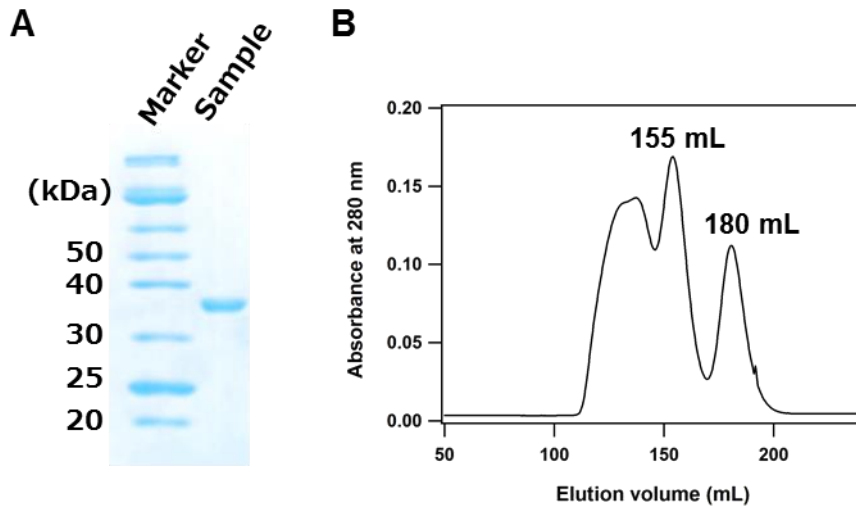


Figure 3-2. リフォールディング後に IMAC で精製した 3MLI-1BR0-1WRS のキャラクタライズ。(A) SDS-PAGE 分析。Sample : IMAC で溶出したフラクション。電気泳動には 14% アクリルアミドゲルを用い、泳動後にゲルを CBB 染色することにより分析した。(B) SEC-FPLC 溶出曲線。(カラム: HiLoad 26/60 Superdex 200 pg〈GE Healthcare〉, 流速: 2.5 mL/min, 検出波長: 280 nm, 溶媒: 150 mM NaCl を含む 25mM Tris-HCl 緩衝液, pH : 8.0, 温度: 4 °C, サンプルロード量: 4 mL)。

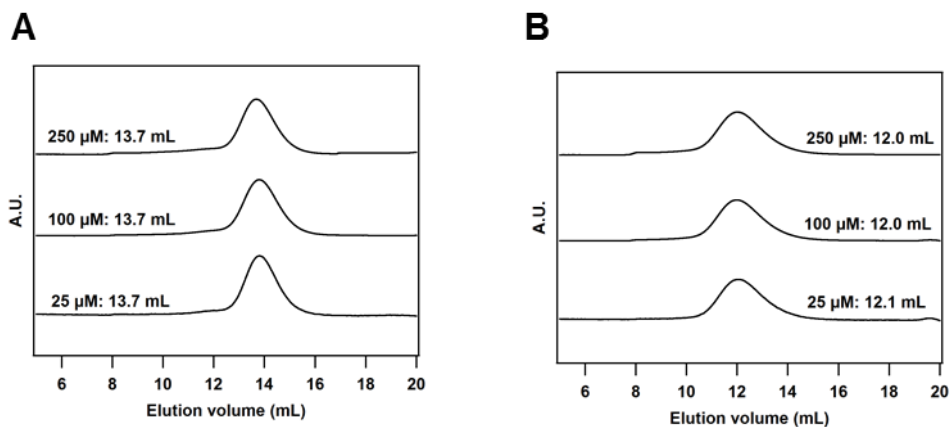


Figure 3-3. 3MLI-1BR0-1WRS の 2, 4 量体における平衡状態の確認。(A) 2 量体および (B) 4 量体の SEC-FPLC 溶出曲線。(カラム: Superdex 200 10/300 GL 〈GE Healthcare〉, 流速: 0.5 mL/min, 検出波長: 280 nm, 溶媒: 150 mM NaCl を含む 25mM Tris-HCl 緩衝液, pH : 8.0, 温度: 4 °C, サンプルロード量: 100 μ L, サンプル濃度: 25–250 μ M)。

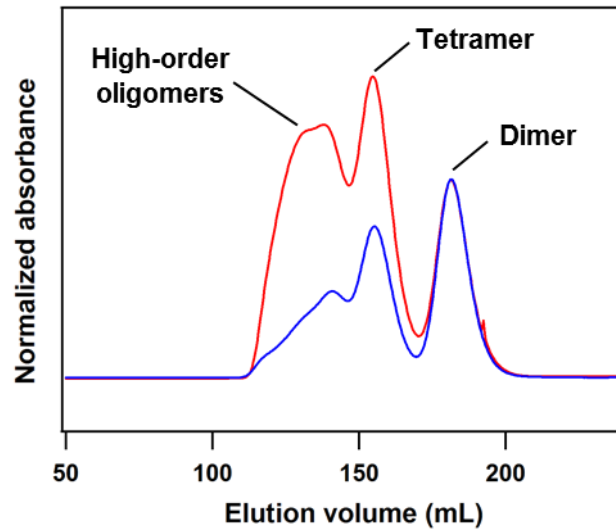


Figure 3-4. 高タンパク質濃度（赤）および低タンパク質濃度（青）でリフォールディングさせた 3MLI-1BR0-1WRS の SEC-FPLC 溶出曲線。（カラム：HiLoad 26/60 Superdex 200 pg 〈GE Healthcare〉, 流速：2.5 mL/min, 検出波長：280 nm, 溶媒：150 mM NaCl を含む 25mM Tris-HCl 緩衝液, pH：8.0, 温度：4 °C, サンプルロード量：4 mL）。リフォールディング時には、大腸菌の内在性タンパク質が夾雑物として含まれるため、タンパク質濃度を正確に求めることができなかった。同じ条件で 3MLI-1BR0-1WRS を大量発現させた大腸菌の菌体重量 (g) を、リフォールディングに用いたタンパク質溶液の量 (mL) で割った値 (g/mL) をタンパク質濃度の指標とした。タンパク質の濃度の指標となる値は (A) 0.263 g/mL, (B) 0.15 g/mL だった。

3-3-3. 3MLI-1BR0-1WRS の 4 量体溶液構造

水溶液中での 3MLI-1BR0-1WRS の 4 量体構造を明らかにする目的で, SAXS 法による構造評価を行った。散乱データから得られた原点散乱強度 ($I_0=31.1$) をタンパク質試料の重量濃度 (11.2 mg/mL) で規格化した値を用いて分子量を見積もった。その結果, タンパク質試料の分子量は 112 kDa と求まり, これはおよそ 3MLI-1BR0-1WRS 単量体 3 分子分に相当する。また, 散乱データより求めたタンパク質分子の慣性半径は約 50 Å, 最大長 (D_{\max}) は 190 Å であり, 4 量体の設計モデルから見積もった D_{\max} (180 Å) に近い値を示した (Figure 3-5, C, D)。さらに, 測定データをもとにビーズモデリングにより計算した低分解能の溶液構造はひずんだ四角形の構造を示した (Figure 3-5, A, B)。内部に穴は見られなかったものの, ビーズモデル構造のサイズと形状は 4 量体設計時のモデル構造に類似するものであった (Figure 3-5, E, F)。これらの結果は, 3MLI-1BR0-1WRS が水溶液中で四角形構造の 4 量体を形成することを示唆する。

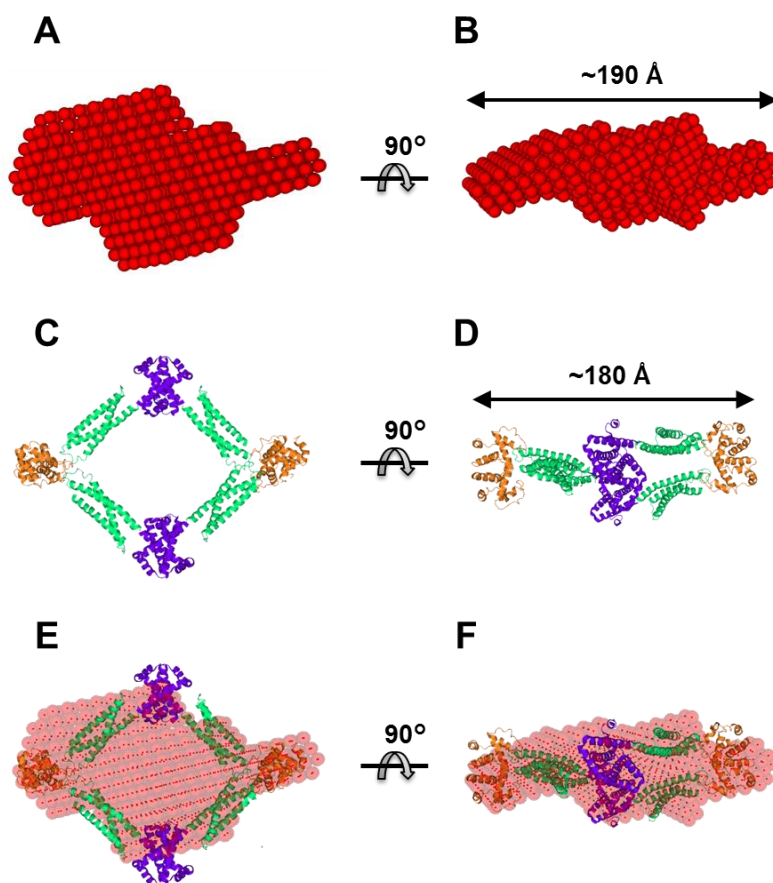


Figure 3-5. SAXS 測定により得られた 3MLI-1BR0-1WRS の 4 量体溶液構造と設計時のモデル構造の比較。(A) *ab initio* 計算により求められた 4 量体の低分解能ビーズモデル構造。(B) (A) を 90°回転したときの図。(C) 設計時の 4 量体モデル構造。(D) (C) を 90°回転したときの図。(E) (A) と (C) を重ね合わせた図。(F) (B) と (D) を重ね合わせた図。

3-3-4. 3MLI-1BR0-1WRS 4 量体の高速原子間力顕微鏡 (AFM) 観察

3MLI-1BR0-1WRS の 4 量体について分子の形状および動的な情報を得るために高速 AFM による観察を行った。観察の結果, 3MLI および 1WRS ドメインと思われる 4 つのユニットが基板上で四角形を形成していた (**Figure 3-6, A**)。4 つのユニットのうち, 対角線上に並んだ 2 つのユニットは基板に強く吸着していたが, 残りの 2 つのユニットは激しく運動している様子が観察された。高速 AFM 観察に用いた基板の表面は正電荷を帯びているため, 表面に負電荷を帯びる 3MLI ドメインが基板に強く吸着し, 激しく運動していた 2 つのユニットは 1WRS ドメインと推察される (**Figure 3-6, B**)。この観察結果は, 融合タンパク質において, フレキシブルなスペーサーで連結された 1WRS ドメインが自由度を持つことと矛盾しない。なお, リンカー部位の 1BR0 は基板に強く吸着していないため, 像として観察できなかったと考えられる。

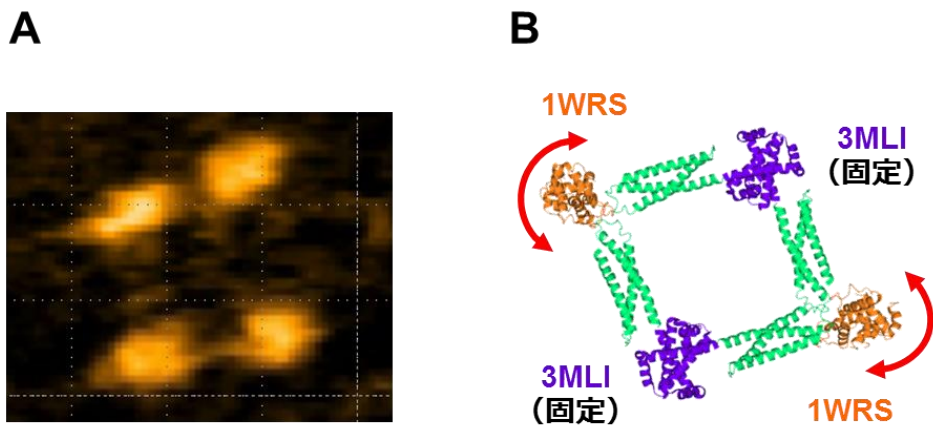


Figure 3-6. (A) 3MLI-1BR0-1WRS の 4 量体高速 AFM 像。(B) 設計当初の 4 量体モデル構造。

3-4. 考察

2種類の多量体形成タンパク質を融合する戦略によりナノ構造体を構築する手法はこれまでも報告されてきたが、望みの構造体の構築に成功した例は限られている⁵⁻⁹。本研究では、2量体タンパク質 3MLI と 1WRS を 3ヘリックスバンドルリンカー 1BR0 で連結した融合タンパク質 3MLI-1BR0-1WRS を設計した (**Figure 3-1, A, B**)。リフォールディングにより得られた 3MLI-1BR0-1WRS を SEC で分析すると、2量体、4量体、および高次多量体に相当するピークがそれぞれ観測された (**Figure 3-2, B**)。SEC-FPLC から見積もった4量体の分子量 (~215 kDa) は理論値 (150 kDa) よりも大きくなったが、SEC-FPLC の溶出位置から見積もった慣性半径 (約 49 Å) は SAXS によって決定された4量体の慣性半径 (約 50 Å) と一致した。四角形構造の4量体は同じ分子量の球状タンパク質よりも慣性半径が大きいため、溶出位置が比較的早くなったと考えられる。一方で、散乱データから求めた分子量 (112 kDa) は理論値 (150 kDa) よりも小さくなった。この原因は、アミノ酸配列から計算したモル吸光係数 (ϵ_{280}) が真のモル吸光係数からずれており、SAXS 測定に用いたタンパク質試料の濃度に誤差が生じたためと考えられる。

3MLI-1BR0-1WRS は四角形の構造を持つ4量体が最安定状態となるように設計されているため、4量体を選択的に形成すると期待された (**Figure 3-1, C**)。しかし、3MLI-1BR0-1WRS は、リフォールディングにより、望みの4量体の他に2量体や高次多量体も形成した (**Figure 3-2, B**)。精製した2量体と4量体について、25–250 μ M のタンパク質濃度範囲では、平衡状態は確認されなかった (**Figure 3-3**)。また、各サイズの多量体形成量は、リフォールディング時のタンパク質濃度によって変化した。すなわち、高濃度条件でのリフォールディングでは、低濃度条件と比較して、4量体と高次多量体の形成量が増加し、2量体の割合が減少した (**Figure 3-4**)。これらの結果から、2量体と高次多量体は速度論的にトラップされた準安定状態と考えられる。3MLI-1BR0-1WRS では、1BR0 リンカーと 1WRS ドメインがフレキシブルなスペーサーを介して連結されており、1WRS ドメインは自由度を持つ。1WRS ドメインに自由度を持たせる設計では、2量体や高次多量体が十分に不安定化されないために、速度論的トラップが生じているのかもしれない。

SAXS 法による構造解析で得られた 3MLI-1BR0-1WRS の4量体ビーズモデル構造は、ひずんだ四角形の構造を示した (**Figure 3-5, A, B**)。4量体の分子全体の形状と大きさはビーズモデル構造と融合タンパク質設計当初のモデル構造とで類似していたが、ビーズモデル構造では内部に空洞が見られなかった (**Figure 3-5, C, D**)。4量体を高速 AFM により観察した結果、3MLI ドメインと 1WRS ドメインと思われる4つのユニットが撮像された (**Figure 3-6**)。このうち 3MLI ドメインと予想される2つのユニットは基板上に固定されていたが、残りの 1WRS ドメインと予想されるユニットは激しく運動していた。高速 AFM の観察結果から、3MLI-1BR0-1WRS の4量体は多様なコンフォメーションを取ると予想され、SAXS 測定で得られたビーズモデルは、

溶液中での4量体の構造アンサンブルを平均したものと考えられる。ビーズモデルで分子中央の空洞が見られなかったのは、自由度の大きい1WRSが空洞を埋めるようなコンフォメーションを取ることが原因なのかもしれない。これと類似する例として、Kobayashiらが報告した融合タンパク質によるバレル型と四面体型のナノ構造体がある⁵。これらのナノ構造体は、内部空間（サブユニット間の隙間）がなるべく小さくなるような溶液構造を取っていた。構造安定性の観点から、一般的にタンパク質の溶媒露出表面積は小さい方が有利であるため、3MLI-1BR0-1WRSの4量体においても、中央に穴が開いた構造よりも穴が埋まった構造の方が安定なのかもしれない。

過去の融合タンパク質の設計では、2種類の多量体タンパク質がフレキシブルなペプチドリンカーや α ヘリックスリンカーにより連結されていた^{5,9}。フレキシブルなペプチドリンカーを用いる戦略では、対称性の高い様々な構造体が不均一に形成されるため⁵、望みの構造体を事前に設計する工夫が必要となる。一方、 α ヘリックスリンカーを用いる戦略では、融合タンパク質の設計に利用できる多量体タンパク質や構築可能な構造体が限定されることが課題であった^{6,8}。本研究では2種類の2量体タンパク質を3ヘリックスバンドルリンカーで連結した3MLI-1BR0-1WRSを設計し、望みのモデル構造と類似の形状・大きさを持つ四角形の構造体の構築に成功した。また、3MLI-1BR0-1WRSでは、C末端の1WRS部位をフレキシブルなスペーサーを介して連結するため、1WRSを他の多量体タンパク質に変更することで様々なナノ構造体を構築できる可能性がある。

3-5. 本章の結論

本研究では、2種類の2量体タンパク質 3MLI と 1WRS を3ヘリックスバンドルリンカー1BR0 で連結した融合タンパク質 3MLI-1BR0-1WRS をナノ構造体構築のためのビルディングブロックとしてデザインした。リフォールディングにより得られた 3MLI-1BR0-1WRS は4量体の他に2量体と4量体以上の高次多量体も形成したが、一度形成された2量体と4量体は濃度平衡を示さず、サイズの異なる多量体に変換されることはなかった。SAXS 法による構造評価から、4量体は溶液中でひずんだ四角形構造を取ることが示され、分子全体の形状とサイズは設計したモデル構造のものと類似することが分かった。これらの結果から、3ヘリックスバンドルリンカーで2種類の2量体タンパク質を融合する戦略により、形状・サイズが制御されたナノ構造体を構築できることが示された。

参考文献

1. J. B. Bale, S. Gonen, Y. Liu, W. Sheffler, D. Ellis, C. Thomas, D. Cascio, T. O. Yeates, T. Gonen, N. P. King and D. Baker, *Science*, 2016, **353**, 389.
2. Y. Hsia, J. B. Bale, S. Gonen, D. Shi, W. Sheffler, K. K. Fong, U. Nattermann, C. Xu, P. S. Huang, R. Ravichandran, S. Yi, T. N. Davis, T. Gonen, N. P. King and D. Baker, *Nature*, 2016, **535**, 136.
3. N. P. King, J. B. Bale, W. Sheffler, D. E. McNamara, S. Gonen, T. Gonen, T. O. Yeates and D. Baker, *Nature*, 2014, **510**, 103.
4. N. P. King, W. Sheffler, M. R. Sawaya, B. S. Vollmar, J. P. Sumida, I. André, T. Gonen, T. O. Yeates and D. Baker, *Science*, 2012, **336**, 1171.
5. N. Kobayashi, K. Yanase, T. Sato, S. Unzai, M. H. Hecht and R. Arai, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 11285.
6. Y. L. Lai, E. Reading, G. L. Hura, K. L. Tsai, A. Laganowsky, F. J. Asturias, J. A. Tainer, C. V. Robinson and T. O. Yeates, *Nat. Chem.*, 2014, **6**, 1065.
7. Y. T. Lai, D. Cascio and T. O. Yeates, *Science*, 2012, **336**, 1129.
8. Y. T. Lai, K. L. Tsai, M. R. Sawaya, F. J. Asturias and T. O. Yeates, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 7738.
9. A. Sciore, M. Su, P. Koldewey, J. D. Eschweiler, K. A. Diffley, B. M. Linhares, B. T. Ruotolo, J. C. Bardwell, G. Skiniotis and E. N. Marsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2016, **113**, 8681.
10. C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley and T. Gray, *Protein. Sci.*, 1995, **4**, 2411.
11. T. Uchihashi, R. Iino, T. Ando and H. Noji, *Science*, 2011, **333**, 755.
12. N. P. King, A. W. Jacobitz, M. R. Sawaya, L. Goldschmidt and T. O. Yeates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 20732.
13. I. Fernandez, J. Ubach, I. Dulubova, X. Zhang, T. C. Sudhof and J. Rizo, *Cell*, 1998, **94**, 841.
14. M. S. Gittelman and C. R. Matthews, *Biochemistry*, 1990, **29**, 7011.
15. L. M. Gloss, B. R. Simler and C. R. Matthews, *J. Mol. Biol.*, 2001, **312**, 1121.
16. B. Batas, H. R. Jones and J. B. Chaudhuri, *J. Chromatogr. A*, 1997, **766**, 109.

第 4 章 結論

4-1. 結論

タンパク質ナノ構造体は新規なナノ材料として広い分野で注目されており、様々な手法によるナノ構造体の構築が試みられている。しかし、タンパク質特有のフォールディングや複合体形成の複雑さのために、人の手によってタンパク質ナノ構造体を自在に設計・構築することは未だに挑戦的な課題である。現状では、タンパク質ナノ構造体の構築方法が未成熟であることが、その応用可能性を制限しており、構築方法を確立するためのさらなる知見が求められている。本博士論文研究では、ドメインスワッピングおよび融合タンパク質デザインによる多量体形成に着目して、新たなタンパク質ナノ構造体を構築した。

第 2 章では、新しい概念によるナノ構造体の構築を目指して、4 ヘリックスバンドル構造を持つヘムタンパク質 *cyt cb₅₆₂* について、ドメインスワッピングによる多量体形成を調べた。*cyt cb₅₆₂* は酢酸処理により多量体を形成した。*cyt cb₅₆₂* 量体は、単量体と類似する活性部位構造、2 次構造、酸化還元電位を示し、50°C 以上になると単量体へと解離することが分かった。X 線結晶構造解析により、*cyt cb₅₆₂* 量体はドメインスワップ構造を取ることが示された。すなわち、*cyt cb₅₆₂* 量体では、一方のプロトマーに属する N 末端側 2 本の α ヘリックスが、他方のプロトマーに属する C 末端側 2 本の α ヘリックスと相互作用していた。*cyt cb₅₆₂* 量体のドメインスワップ構造は、フォールディングの初期過程で最初に形成される helix 2 と 3 が分子間相互作用することにより形成されると考えられる。結晶中では、3 分子の *cyt cb₅₆₂* 量体が Zn-SO₄ クラスタを内包するケージ構造体を形成した。2 量体界面に水素結合や疎水性相互作用は見られなかったが、*cyt cb₅₆₂* のアミノ酸残基と Zn²⁺ の配位結合がケージ構造を安定化していた。*cyt cb₅₆₂* ケージを溶液中で選択的に得ることはできなかったが、金属クラスタを内包するケージ構造体は珍しく、*cyt cb₅₆₂* ケージはドメインスワッピングを利用したタンパク質ナノケージ構築の初めての例である。

第 3 章では、既存の構築法を改良するという観点から融合タンパク質に着目し、2 種類の 2 量体タンパク質 3MLI と 1WRS を 3 ヘリックスバンドルリンカー 1BR0 で連結した 3MLI-1BR0-1WRS をデザインした。3MLI-1BR0-1WRS は「く」の字型のビルディングブロックを形成し、これが 2 つ合わさることで四角形の 4 量体が構築できると期待された。リフォールディングにより得られた 3MLI-1BR0-1WRS は、望みの 4 量体の他に 2 量体と高次多量体も形成した。SAXS 法による構造評価から、4 量体は溶液中でひずんだ四角形構造を取ることが示され、分子全体の形状とサイズは設計したモデル構造のものと類似することが明らかになった。本章で得られた結果から、「く」の字型のビルディングブロックを形成する融合タンパク質の設計戦略により、形状・サイズが制御されたナノ構造体を構築できることが示された。

本博士論文研究より、ドメインスワッピングが新しいナノ構造体の構築に有用であることが示されたとともに、融合タンパク質を利用する新しいナノ構造体の構築手法も提供された。

4-2. 今後の展望

本研究により、ドメインスワッピングを利用することでユニークなタンパク質ナノ構造体を構築できることが示された。現状ではドメインスワッピングにより形成される多量体の構造を制御することは難しく、スワップ領域を決定する要因などを明らかにする必要があると考えられる。しかし、ドメインスワッピングには、新たな相互作用界面などをデザインすることなく、天然のタンパク質から自然界には存在しない新たな構造を作り出せる利点がある。ドメインスワップした *cyt cb₅₆₂* 量体が金属配位によりケージを形成したように、ドメインスワップを利用してユニークな構造を持つビルディングブロックを作り出し、これに金属配位やタンパク質融合などの手法を組み合わせることで、新たなタンパク質ナノ構造体が構築できると期待される。すなわち、ナノ構造体構築を、(1) ビルディングブロックの作製、(2) 作製したビルディングブロックの集積という 2 段階で考えると、ドメインスワッピングは (1) のステップにおいて有用と考えられる。

2 種類の 2 量体タンパク質を 3 ヘリックスバンドルリンカーで連結する戦略により設計された 3MLI-1BR0-1WRS は、溶液中で四角形の構造体を形成した。この設計戦略では、C 末端の 2 量体タンパク質を他の多量体タンパク質に変更することにより、多様な融合タンパク質が構築できると期待される。例えば、C 末端に 3 量体や 4 量体タンパク質を連結した融合タンパク質を設計することで、3 次元のケージ構造体を構築できるかもしれない。今後、融合タンパク質の構成要素に用いる各タンパク質の選択指針や、C 末端部位を連結するスペーサーの長さに関する知見などを得ることができれば、より精密な構造体の構築が可能になると考えられる。

人工タンパク質ナノ構造体の構築に関する研究は黎明期にあり、望みの構造体を自由自在に設計・構築するための普遍的な指針は未だに得られていない。このため、構造制御に重点を置いた研究が精力的に行われているが、ナノ構造体に望みの機能を付与することは未だに達成できていない。今後、構造制御の技術が成熟することにより、人工タンパク質ナノ構造体の研究は構造デザインから機能デザインへと進展し、医療や工業などの様々な分野に貢献していくと予想される。本研究が今後の人工タンパク質ナノ構造体の構造デザイン研究、ひいては新たな機能を持つナノ材料の開発につながることを期待する。

謝辞

本研究の遂行にあたって懇切丁寧なご指導を賜りました物質創成科学研究科の廣田俊教授に深く感謝申し上げます。また、スーパーバイザーならびに論文審査委員としての的確な助言をいただきました谷原正夫教授，荒谷直樹准教授，長尾聡助教に厚く御礼申し上げます。

本研究の実施にあたり、実験方法などをご指導いただきました山中優助教に感謝いたします。セミナーにて的確なアドバイスをいただきました松尾貴史准教授，太虎林特任助教に感謝いたします。

X線結晶構造解析にご協力いただきました兵庫県立大学の樋口芳樹教授，茨城大学の庄村康人准教授に心よりお礼申し上げます。X線小角散乱測定にて大変お世話になりました上久保裕生准教授，林有吾博士，吉田桂人様に深く感謝いたします。高速原子間力顕微鏡観察を行っていただきました金沢大学の内橋貴之教授に感謝の意を表します。

事務手続き、予算管理などで大変お世話になりました超分子集合体科学研究室秘書の田代雅子さんに御礼申し上げます。研究室生活で苦楽を共にした超分子集合体科学研究室内の皆様に感謝します。

本研究を行うにあたり、公益財団法人日本科学協会には資金面において多大なご支援を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

宮本 昂明

目録

学位論文の主たる部分を公表した論文

1. Domain-swapped cytochrome *cb*₅₆₂ dimer and its nanocage encapsulating a Zn–SO₄ cluster in the internal cavity
Takaaki Miyamoto, Mai Kuribayashi, Satoshi Nagao, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, and Shun Hirota
Chemical Science, 6(12), 7336–7342 (2015).

参考論文

1. Enhanced stability of Cu²⁺-ATCUN complexes under physiologically relevant conditions by insertion of structurally bulky and hydrophobic amino acid residues into ATCUN motif
Takaaki Miyamoto, Yuta Fukino, Shinichiro Kamino, Masashi Ueda, and Shuichi Enomoto *Dalton Transactions*, 45(23), 9436–9445 (2016).
2. Basicity of N-terminal amine in ATCUN peptide regulates stability constant of albumin-like Cu²⁺ complex
Takaaki Miyamoto, Shinichiro Kamino, Akira Odani, Makoto Hiromura, and Shuichi Enomoto
Chemistry Letters, 42(9), 1099–1101 (2013).