

氏名	小林 直也
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	乙 第 2 4 0 号
学位授与の日付	平成 2 9 年 3 月 2 0 日
学位授与の要件	信州大学学位規程第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	Self-assembling nanostructures created from protein nanobuilding blocks using the intermolecular folding structure of a dimeric <i>de novo</i> protein. (分子間フォールディング二量体構造人工タンパク質を用いたタンパク質ナノブロック開発による自己組織化ナノ構造の創出)
論文審査委員	主査 教授 林田 信明 教授 志田 敏夫 教授 玉田 靖 教授 森脇 洋 准教授 新井 亮一 本田 真也 (国立研究開発法人 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 副研究部門長)

論 文 内 容 の 要 旨

生命活動はタンパク質や核酸、糖、脂質といったさまざまな自己組織化能力をもつ生体分子の複合体によって営まれている。生命体の化学的再構成は化学や合成生物学分野の究極的な目標の一つであり、自己組織的に超分子複合体構造へと組み上がる人工生体高分子の合理的な設計はこの目標を達成するための一つの重要なステップである。

生体高分子の中でも、タンパク質はナノスケールの複合体構造へと自己組織化することにより複雑で洗練された機能を発揮する多機能な生体高分子である。そのため、超分子複合体へと自己組織化する新規タンパク質のデザインは、合成生物学分野やナノバイオテクノロジー分野の発展に貢献できると考えられる。しかしながら、タンパク質及びタンパク質複合体の立体構造は、構成するアミノ酸鎖全体に広がる多くの相互作用が協同的に働くことで安定化されているため、新規に安定なタンパク質自己組織化ナノ構造複合体をデザインすることは困難であった。

そこで本研究では、特徴的な二量体構造を持つ人工タンパク質を、ナノスケールの構造体を構築するためのタンパク質ナノブロックの構成要素として用いて、多様な自己組織化超分子ナノ構造を創出することを目的とした。

まず、第一章では、本研究で用いた安定性が高い人工タンパク質 WA20 の立体構造解析について報告する。人工タンパク質 WA20 の X 線結晶構造解析の結果、極性と非極性アミノ酸残基のバイナリーパターンによって本来デザインされた通りの単量体の 4 本ヘリックスバンドル構造ではなく、二量体の 4 本ヘリックスバンドル構造であった。それぞれの単量体は長い α ヘリックス 2 本を互いに挟みこむように組み合わせることで、分子間でフォールディングした特徴的な 4 本ヘリックスバンドル二量体構造を形成していた。小角 X 線散乱(SAXS)による解析の結果、WA20 の分子量は約 25 kDa であり、その概形は棒状であった。このことより、WA20 が溶液中においても二量体の 4 本ヘリックスバンドル構造を形成することが明らかとなった。

次に、第二章・第三章では、この人工タンパク質 WA20 の特徴的な分子間フォールディング二量体構造を活かしたタンパク質ナノブロック (Protein Nanobuilding Block: PN-Block) を開発し、少数のシンプルな基本ブロックを組み合わせることで、多様な超分子ナノ構造複合体を創出することをコンセプトとして研究を行った。

第二章では、まず、タンパク質ナノブロック第一弾として、WA20 と T4 ファージ fibrin の三量体 foldon ドメインと融合した WA20-foldon タンパク質ナノブロックを設計開発し、複数の自己組織化ナノ構造の創出に成功したことを報告する。WA20-foldon を大腸菌で発現、精製し、native PAGE により分析すると、数種類の多量体構造を同時に形成していた。これらの複合体を分離精製し、ゲルろ過クロマトグラフィーや多角度光散乱(SEC-MALS)、超遠心分析、SAXS 等により分子量を測定することで会合数を求めたところ、各多量体は、それぞれ 6 量体、12 量体、18 量体、24 量体であった。このことは、WA20-foldon が幾何学的な対称性デザインの通りに、過不足なくお互いに組み合わせることで、6 の倍数量体の複合体を規則的に形成することを示唆している。さらに、複合体の溶液中での形状を評価するために、WA20 及び foldon の各立体構造と SAXS データに基づいて剛体モデリング解析を行ったところ、6 量体と 12 量体は、幾何学的対称性より予測されたナノ構造多量体である樽型構造と正四面体型構造をそれぞれ形成していることが強く示唆された。

第三章では、タンパク質ナノブロックの第二弾として、鎖状構造体へと自己組織化するタンパク質ナノブロックを構築するために、extender protein nanobuilding block (ePN-Block) を設計開発したことを報告する。ePN-Block は、様々なリンカーを介して、2 つの人工タンパク質 WA20 を直列に繋ぐことにより構築した。ePN-Block は大腸菌で可溶性タンパク質として発現した。可溶性分画から精製した ePN-Block は、native PAGE による分析においてラダー状の泳動バンドパターンを示し、複数のホモ多量体構造を形成することを示唆した。次に、変性及びリフォールディングにより extender PN-Block と stopper PN-Block (sPN-Block) からヘテロ複合体を再構成した。SEC-MALS 及び SAXS 解析により、extender PN-Block と stopper PN-Block のヘテロ複合体 esPN-Block は、リンカーの性質によって異なる伸長型直鎖状構造を形成することが示唆された。さらに、溶液中原子間力顕微鏡イメージングにより、金属イオンを持つ esPN-Block 複合体はマイカ表面上で超分子ナノ構造体へ自己組織化することを示した。

本研究では、分子間フォールディング二量体構造を持つ人工タンパク質を構成要素として用いたタンパク質ナノブロックを開発し、少数種類のシンプルなタンパク質ナノブロックの組合せから多様な自己組織化ナノ構造を創出することに成功した。これらの結果より、タンパク質ナノブロックの開発は、多様な自己組織化ナノ構造を創出するために有効な戦略であることが示唆された。