

2021年9月15日

報道関係者各位

信州大学
慶應義塾大学

クライオ電子顕微鏡により人工設計タンパク質ナノ粒子 TIP60 の 立体構造を解明

—さまざまな応用が期待される多孔性中空ナノ粒子構造—

信州大学繊維学部・バイオメディカル研究所の新井亮一准教授、慶應義塾大学理工学部の川上了史専任講師、宮本憲二教授、東京大学大学院医学系研究科の吉川雅英教授らの共同研究グループは、人工的に設計されたタンパク質ナノ粒子 TIP60 の詳細な立体構造をクライオ電子顕微鏡単粒子解析^{*1}により解明することに成功しました。TIP60 は、正三角形の孔を 20 個持つ特徴的な正二十面体型 60 量体の多孔性中空ナノ粒子構造であることが明らかとなりました。今後、この特徴的な立体構造をもとにして部位特異的変異や化学修飾などにより、薬物を導入したナノカプセルとしての利用や新たなナノ材料の開発など、ナノバイオテクノロジー分野の発展や応用につながることを期待されます。

本研究成果は英国王立化学会学術雑誌 *Chemical Communications* への掲載に先立ち、同誌 Web サイトにてオンライン速報版が 9 月 4 日に公開されました。

1. 本研究のポイント

- ・人工的に設計されたタンパク質ナノ粒子 TIP60 のクライオ電子顕微鏡単粒子解析に成功
- ・TIP60 の立体構造が、正三角形の孔を 20 個持つ、特徴的な正二十面体型 60 量体中空ナノ粒子構造であることを解明
- ・TIP60 の立体構造を利用して、部位特異的変異や化学修飾等を加えることにより、タンパク質ナノ粒子の応用が期待

2. 研究背景

ナノ粒子^{*2}は、発色剤、触媒、あるいは薬物輸送体など、幅広い分野に応用が期待される魅力的な物質材料です。実用化には、サイズや形状が均質な多数のナノ粒子の形成を行う必要があります。これまで、金属等を原料としたナノ粒子形成手法が広く研究されており、形状、サイズがある程度そろったナノ粒子の形成が実現されています。しかし、個々のナノ粒子は、原子のランダムな集合によって形成されるため、原子レベルで同一の構造を有するナノ粒子群を作り出すことは容易ではありません。そこで、信州大学繊維学部・バイオメディカル研究所の新井亮一准教授と慶應義塾大学理工学部の川上了史専任講師らの共同研究グループでは、基本的に原子レベルで同一の構造を有する生体高分子のタンパク質に着目しました。タンパク質を利用することで、部位特異的変異導入や化学修飾等による機能性の改変も可能であり、均質で有用なタンパク質ナノ粒子の開発に取り組んできました。

これまでに本グループは、60個の人工融合タンパク質*3から自発的に組み上がるタンパク質ナノ粒子を設計・作製しました。図1に示すように、五角形状の5量体タンパク質(Sm-like protein)とそれを繋ぐ手となる2量体タンパク質(MyoX-coil domain)を人工的に連結し、この2種類のタンパク質を連結した人工融合タンパク質同士が60個自発的に組み上がって、最終的にサッカーボールのような形状になるように設計しました。実際にこの人工融合タンパク質の作製に成功し、小角X線散乱などのさまざまな解析結果から、予想通りに直径約22 nmのナノ粒子を形成していることを解明し、2018年に発表しました(参考文献1)。このサッカーボールのような形状は切頂二十面体と呼ばれる多面体であり、人工融合タンパク質が60個集合して形成することからTIP60(Truncated Icosahedral Protein composed of 60-mer fusion protein)と命名されました。

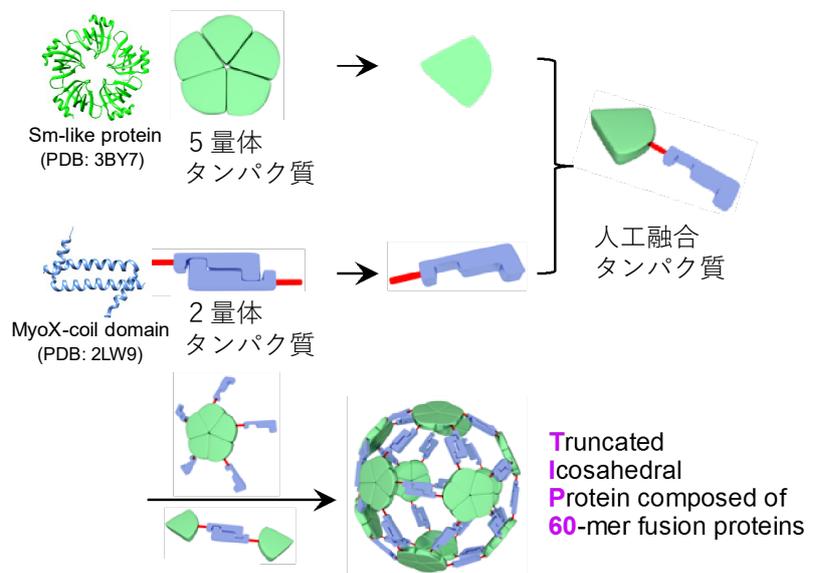


図1 人工融合タンパク質の設計とタンパク質ナノ粒子TIP60の形成
5量体タンパク質と2量体タンパク質を連結した人工融合タンパク質同士が60個自発的に組み上がってTIP60が形成される。

3. 研究内容・成果

本研究では、この人工的に設計されたタンパク質ナノ粒子TIP60の詳細な立体構造を解明するために、クライオ電子顕微鏡を用いて単粒子解析に取り組みました。TIP60を大腸菌で大量発現し、精製した試料について、東京大学のクライオ電子顕微鏡施設で観察しました。得られた大量の画像データをもとに計算機を用いて単粒子解析することによって約3.3 Åの分解能で三次元像を再構成し、TIP60の立体構造解析に成功しました(図2)。TIP60は、設計通りに中空球状の60量体ナノ粒子を形成しており、1辺約4 nmの三角形の孔が20個存在する正二十面体型構造であることが明らかとなりました。また、5量体形成部位と2量体形成部位をつなぐリンカー部分が前後と連続したαヘリックスにより構成された構造など、特徴的な立体構造を詳細に解明することができました。

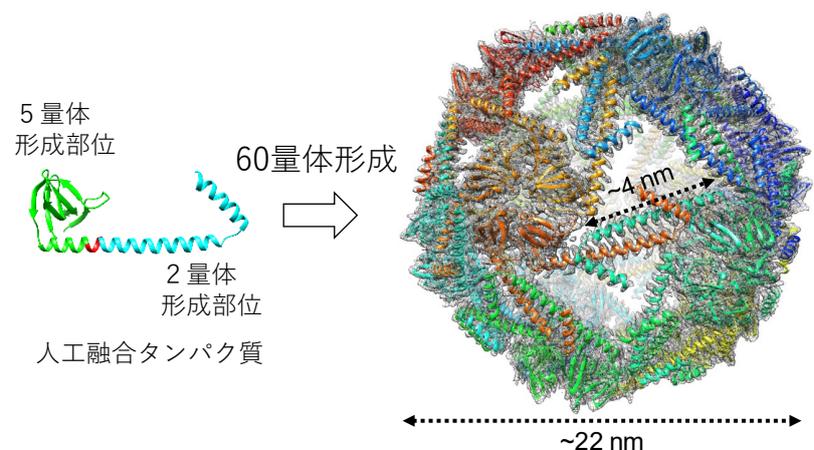


図2 クライオ電子顕微鏡単粒子解析によって得られたタンパク質ナノ粒子TIP60の立体構造

5量体形成部位と2量体形成部位を結合した人工融合タンパク質(左)が自発的に60個集合して、直径約22 nmのタンパク質ナノ粒子TIP60(右)を形成している。

さらに、この立体構造解析結果から着想を得て、高分子化合物で TIP60 の外部表面のみを特異的に化学修飾した後に低分子化合物を添加すると、低分子化合物が内部空洞に入り込んで内部表面を化学修飾できることが分かりました（参考文献 2）。つまり、TIP60 の多孔性の構造は、分子サイズによるフィルターとして働き、TIP60 の外部表面と内部表面をサイズの異なる別々の分子で特異的に化学修飾できることがわかりました。

4. 今後の展開

今後の研究では、今回解明した TIP60 の立体構造をもとに部位特異的変異体の設計や機能的改変等を進めることにより、人工設計タンパク質ナノ粒子をナノスケールのカプセルとして利用し、薬物輸送（ドラッグデリバリー）やナノ分子材料などへのさまざまな応用が期待されます。

<謝辞>

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業(JP16K05841, JP17KK0104, JP18K05324, JP19H02522)の助成を受けて行われました。また、本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)の課題番号 JP20am0101115 の御支援を受けました（支援番号 1427）。初期のサンプル調製では、信州大学卒業生の笹原健嗣氏にもご助力頂きました。この場を借りて心より御礼申し上げます。

<原論文情報>

タイトル: Icosahedral 60-meric porous structure of designed supramolecular protein nanoparticle TIP60

タイトル和訳: 人工設計超分子タンパク質ナノ粒子の正二十面体型 60 量体多孔質構造

著者: 小幡 隼也^{1‡}、川上 了史^{2‡}、包 明久^{3‡}、那須 英里圭²、宮本 憲二²、吉川 雅英³、新井 亮一^{1*}（[‡]同程度貢献の著者、*責任著者）

¹信州大学繊維学部応用生物科学科・バイオメディカル研究所生体分子ノベーション部門

²慶應義塾大学理工学部生命情報学科

³東京大学大学院医学系研究科

掲載誌: Chemical Communications (出版元: Royal Society of Chemistry)

DOI: 10.1039/D1CC03114G

構造データ: Protein Data Bank (PDB) 7EQ9, Electron Microscopy Data Bank (EMDB) EMD-31256

<参考文献>

1. N. Kawakami, H. Kondo, Y. Matsuzawa, K. Hayasaka, E. Nasu, K. Sasahara, R. Arai, K. Miyamoto, Design of hollow protein nanoparticles with modifiable interior and exterior surfaces. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 12400-12404 (2018).
2. E. Nasu, N. Kawakami, K. Miyamoto, Nanopore-controlled dual-surface modifications on artificial protein nanocages as nanocarriers. *ACS Appl. Nano Mater.* **4**, 2434-2439 (2021).

<用語説明>

※1 クライオ電子顕微鏡 単粒子解析

クライオ電子顕微鏡は、サンプルを極低温下に保ち電子線写真を撮影することのできる透過型顕微鏡である。タンパク質の粒子を多数撮影し、データ処理により三次元再構成することで詳細な構造情報

を得る解析法が単粒子解析である。近年、急速凍結によるサンプル調製法、単粒子解析の方法論や計算プログラムの開発、電子検出器の発展など、各技術開発が飛躍的に発展してきた結果、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって近原子分解能のタンパク質複合体構造が数多く報告されるようになった。2017年のノーベル化学賞は「クライオ電子顕微鏡法の開発」に貢献した研究者3氏に授与された。

※2 ナノ粒子

100万分の1～1万分の1ミリメートル程度のサイズの粒子。

※3 人工融合タンパク質

複数のタンパク質が、遺伝子工学の技術によって連結され、一分子のタンパク質となったもの。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、各社科学部等に送信させていただいております。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。なお、社会情勢に配慮し、原則としてオンライン等による対応とさせて頂きたいと存じます。

・研究内容についてのお問い合わせ先

信州大学 繊維学部応用生物科学科・バイオメディカル研究所生体分子ノーベーション部門
准教授 新井 亮一（あらい りょういち）
TEL：0268-21-5881 E-mail：rarai@shinshu-u.ac.jp

慶應義塾大学 理工学部生命情報学科
専任講師 川上 了史（かわかみ のりふみ）
TEL：045-566-1527 E-mail：norikawakami@bio.keio.ac.jp

・本リリースの配信元

信州大学 繊維学部 総務グループ
TEL：0268-21-5303 FAX：0268-21-5318
E-mail：tex_koho@shinshu-u.ac.jp
Website: <http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/textiles/>

慶應義塾 広報室
TEL：03-5427-1541 FAX：03-5441-7640
E-mail：m-pr@adst.keio.ac.jp
Website: <https://www.keio.ac.jp/>