総説

開閉可能な人工タンパク質ケージの構造と性質

岩崎憲治, 宮崎直幸 筑波大学生存ダイナミクス研究センター

An ultra-stable artificial protein cage was created by using TRAP (trp RNA-binding attenuation protein). Adding a gold (I) triphenylphosphine compound to a cysteine-substituted TRAP generated a cage 22 nm in diameter. The TRAP cage resisted severe conditions, such as high temperature, denaturing agents, and acidic and basic solvents. However, it was instantly disassembled when reducing agents were added to the solution. We can therefore fully control both assembly and disassembly of the TRAP cage. Cryo-EM single-particle analysis revealed a chiral pair of TRAP cages and their atomic structures, in which gold atoms acted as staples to connect the TRAP rings.

cryo-EM / protein cage / drug delivery / chirality

1. 人工タンパク質で可能なアーキテクチャ

生体分子を使ったナノスケール構造体の構築例としては DNA 折り紙が最も有名だろう¹⁾. しかしタンパク質を使用した試みも忘れてはならない. 本稿では, 従来は想像できなかった形状と性質を兼ね備えたタンパク質+金属のナノスケール構造体の作製に成功したので紹介する. 天然のタンパク質を改変して, それらの会合により天然にはない機能をもった人工ナノデバイスや人工ナノマシンなどナノスケールの構造体を創出するのがこの研究分野における研究者の夢である²⁾. しかし, タンパク質を改変し, 狙い通りに会合体を作り出すのは非常に難しい. その最大の理由は, タンパク質間の結合が幅広い領域にわたる“面と面”の複雑な相互作用ネットワークで構成されているからであろう. 正二十面体のウイルスキャプシドのような天然の会合体を見ればわかるが, あのような複雑な組み合わせを人工的な設計においてシミュレートしたり, 予測することは甚だ困難である.

我々は, この複雑なタンパク質間相互作用を金原子一個に“ホッチキス”のような役割をもたせることで, “点と点”の相互作用に単純化させることに偶然成功した³⁾. これでタンパク質による高次構造体を設計する問題の難しさを克服できる可能性が出てきたのである. さらに, 作製した会合体は熱に強く, なおかつ変性剤に強い, さらに広範囲の pH において安定であるにもかかわらず, その会合・解離を非常に単純かつ厳密に制御できたのである. さらに面白いことに, その会合体の形は, ユニットとなるタンパク質の形からは作ることのできない“凸面体”であった.

2. ケージ構造の作製

共同研究者の Jonathan G. Heddle 教授は長らく trp RNA-binding attenuation protein (TRAP)⁴⁾ を材料にナノスケールの構造体の作製に挑んできた. TRAP は, 枯草菌の RNA に結合するタンパク質であり, 細胞の中のトリプトファン濃度を感知してトリプトファン合成や輸送を制御するための中心的な役割をしている. この 74 残基のタンパク質は, 主に β -シートにより構成され, 非常に安定なリング状の 11 量体を形成する (図 1). それに加え, TRAP はいろいろな変異に対して構造を変えず, 安定性も劣化しないので, タンパク質工学に適した性質をもっている. TRAP リングの外側に位置している 35 番目のリジンをシステインに置換した TRAP (K35C) 変異体を作製し (図 1), 直径 1.4 nm の金原子のクラスター—いわゆるナノゴールド—と混合すると, 球状のナノ粒子に会合した. もちろん, 野生型 TRAP ではそのような会合は起こらなかった. 我々は, クライオ電子線トモグラフィーを用いて, TRAP により形成されたナノ粒子が, 中空のケージ構造であることを確かめた⁵⁾. その当時は, まだ今のようにクライオ電子顕微鏡単粒子解析によって原子モデルが矢継ぎ早に報告されるようなことがない時代である. このナノゴールドを用いた系では, 形成されるケージの大きさが大きく 2 種類あった. しかし, 金原子の提供源として, より小さくて均一なトリフェニルフォスフィン化合物を使用したところ, 均一のケージ構造が形成されるようになった. 実際の反応では, 変異体 TRAP (K35C/R64S) に monosulfonated chloro (triphenylphosphine) gold (I) (Au-TPPMS) を混合するこ

Structure and Biochemical Characters of Artificial Protein Cage: Assembly and Disassembly can be Controlled

Kenji IWASAKI and Naoyuki MIYAZAKI

Life Science Center for Survival Dynamics, Tsukuba Advanced Research Alliance, University of Tsukuba

図 1
TRAP の結晶構造 (PDB: 1QAW). 35 番目のリジン (黄色の球モデル) をシステインに置換した.

とにより、直径 22 nm の球状構造が形成された。その構造体が形成されるまでの至適 pH は 8.0 であった。他の金属も試したところ、水銀でも同様のサイズの球状構造が形成された。しかし、どのような化学反応過程を通じて、ケージ構造が形成されるのかはまだ明確ではない。

3. TRAP ケージの構造と鏡像異性体の存在

次に、この均一なサイズをした球状のケージ構造の正体を追った。まずケージ全体の分子量は、2,160 kDa であることが Single molecule mass photometry によりわかった。ここでクライオ電子顕微鏡単粒子解析法である。最先端クライオ電子顕微鏡 Titan Krios (FEI 社) を用いて、TRAP の粒子像を収集し、RELION⁶⁾ を用いて 3 次元再構成した結果、正八面体対称をもつケージ構造が FSC 分解能 (以下単に分解能) 0.47 nm で得られた。当初は、やはり人工的に作製した構造体なので構造が不均一となり、分解能がこれ以上改善しなかったのだと判断した。しかし、このリング構造の会合体を、紙などを使ってモデルを組むと、鏡像関係にあるケージ構造ができることがわかった。鏡像異性にあるケージ構造物が混ざった状態で、一種類の構造体しかないとして誤って解析したとすれば、一つ一つの TRAP リング構造が不自然な対称性をもつことになる。X 線結晶構造解析の原子モデルを見ればわかるが (図 1)、TRAP を自転車の車輪だとすると、スポークに相当する部分は、決して真っ直ぐ中心から突き出ているわけではない。ところが、クライオ電子顕微鏡単粒子解析の結果は、真っ直ぐで対称性の高い形をしていた。そこで、RELION における 3 次元クラス分類の条件を検討したところ、鏡像関係にある構造の分類に成功した。加えて、分解能も一挙に改善し、0.37 nm に達した (図 2)。このような 3 次元クラス分類は、RELION 以前の単粒子解析ソフトウェアでも原理的にはできたはずだが、筆者も含めあまり成功していたとは言えない

図 2
クライオ電子顕微鏡単粒子解析で明らかになった TRAP ケージの構造 (鏡像体の一つ)。

い。RELION という解析ソフトウェアの登場はもちろんだが、自動撮影による多量の画像取得がこうした構造多型の解析を実行可能なレベルに引き上げたと言えるだろう。RELION の 3 次元クラス分類の結果が、実際の粒子形状の分布を正確に表しているかどうかはわからないが、鏡像体のそれぞれを構成する粒子数の割合は、46.3% と 53.5%、つまり、ほぼ 1:1 であった (図 3)。

4. アルキメデスの変形立方体

TRAP リングの構造はこの 3 次元密度図から明確にわかる。全部で 24 の TRAP リングからケージは構成されていた (図 2)。一見、正凸面体に見える。TRAP リング単体は、 C_{11} 対称軸をもつ 11 量体である。実は、 C_{11} 対称の多角形が、正凸面体を作ることはできない。かといって、ケージ内の TRAP リングの構造は、リング単体のときと同型であり、構造の変形はなかった。このケージ構造を多面体の集合でできていると解釈すると、図 4 のようになる。相同な五角形が 24 個集まって、ケージが形成されている。しかし、よく見ると、五角形に見える部分は正五角形ではない。これはアルキメデスの立体に分類され、より詳細にはその中の変形立方体に相当する。アルキメデス立体の中の変形立方体は鏡像をもつ。よって、前節の鏡像異性体の存在が幾何学的にも保証されることになる。また、アルキメデスの立体では、我々のケージの

図 3

会合体の鏡像ペア。TRAP ケージは鏡像体の関係にある 2 つの会合体を形成していた。これを構成する単位である TRAP (K35C/R64S) リングの構造は共通である。アルキメデスの変形立方体であることを示すために正三角形と正方形を重ねて示した。赤の正方形の中心には 4 回軸、黄色の正三角形のペアが共有する辺には 2 回軸、紫色の正三角形の中心には 3 回軸が存在する。

図 4

五角二十四面体と正十一角形。TRAP ケージをアルキメデスの立体である五角二十四面体（左図）とし、 C_{11} 対称をもつ TRAP リングを正十一角形（緑の図形）だとすると、正十一角形は五角形にほぼ内接する。右図で拡大した部分は、わずかなが、それぞれの辺が重ならない部分を示している。

正方形部分のように大きな開口部が存在する。核酸など生体分子の運搬分子として働くには、不向きだろう。そのためこのような構造は天然には存在していないと解釈できる。ここである発見をした。実は正十一角形がこの五角形に正確には内接していない（図 4 右）。つまり、TRAP ケージの構造をこのような多面体で解釈しようとしたものの、数学的には、 C_{11} 対称をもつ面から、このケージ構造を作ることはできないということである。しかし、その逸脱がわずかであることを考えると、実際にはこの極めて小さいずれをどこかで吸収することで変形立方体ができてしまったのだと我々は推測した。

5. TRAP ケージ形成のメカニズム

それでは、どのようにしてこのケージ構造が作られ

図 5

TRAP (K35C/R64S) ケージのリング間の拡大図。金原子（赤色の球）に 35 番目のシステイン（黄色の棒球モデル）が配位している。半透明の水色は、クライオ電子顕微鏡単粒子解析で得られた 3 次元再構成像。

図 6

TRAP ケージにおける“ホッチキス”のネットワーク。金原子（橙色の球）に 35 番目のシステイン残基の側鎖（黄色の球モデル）が配位している。大きくあいた正方形の空間に対して、11 個のうち余った 1 個のシステインが露出している。

たのだろうか。TRAP リング間のインターフェースを拡大すると、隣接するリングをつなぐ棒状の密度があった（図 5）。丁度、35 番目のシステイン残基が向かい合っている場所である。よって、この棒状の伸びた密度は金原子と、それに対して 2 つのリングから延びているシステイン残基の側鎖を反映したものであると解釈した。そうであれば、ケージ全体では、120 個

のこうした配位構造が存在することになる(図6)。まるでホッチキスのように2つのリングをつないでいるように見える。これが金原子であることを確かめるために電熱原子吸光分光分析など多数の測定を行い、35番目のシステイン残基の硫黄原子がAu^Iに配位したものと結論することができた。この結合以外では、隣接するTRAPリングにおいて、N17とD37だけは水素結合ができる距離にはあったが、それ以外にはTRAPリング間で相互作用できそうな距離にある原子はなかった。この結果は、通常の“面と面”によるタンパク質間相互作用を金原子を介した“点と点”による相互作用に単純化できたことを示している。さらに、察しの良い読者はおわかりになると思うが、このS-Au^I-S結合こそが正五角形からのずれを吸収している部分なのである。本来は不可能なC₁₁対称構造によるアルキメデスの変形立方体生成を可能にしている部分はここにあった。まさしく接着剤やネジによる強固な結合ではなく、それよりは少し緩いホッチキスによる結合のイメージである。

6. TRAP ケージの特異な性質

TRAP (K35C/R64S) ケージの特異な長所は、二点ある。一点は、異様に安定なことである。例えば、95°Cで3時間加熱してもケージ構造は保たれる。また、7 M 尿素、5% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) や2 M グアニジン塩酸などのタンパク質変性剤存在下でもケージ構造は壊れない。さらに、広範囲のpH (pH 3~12の間) においても安定である。ところが、一旦、DTTやGSHなど還元剤を添加すると、ケージはたちまちTRAPリングへと解離する。安定で丈夫な構造だが、会合と解離を簡単に制御できる。このケージ形成のON/OFFを制御できることこそが第二の長所である。正二十面体のウイルスキャプシドなどは、天然のナノケージの最たるものであるが、その場合、会合解離を人工的に制御するのは非常に難しい。

7. ナノ構造体のデザイン

4項で述べたC₁₁対称構造が変形立方体を構成する五角形面に“ほぼ”内接するという事実と、5項で述べたTRAP (K35C/R64S) リングに11カ所等価に存在するシステイン残基が金原子に配位することでホッチキスの役割を果たしているという結果を合わせると、

正方形面には、フリーのシステイン残基が露出していることがわかる(図6)。天然のタンパク質間相互作用では、このような相互作用に使われない面が露出すれば、それは凝集や望まない形への会合の結果になるだろう。また、正二十面体ウイルスのキャプシドでは、相互作用の問題だけでなく、quasi-equivalence (準等価) まで考えないといけない⁷⁾。非常に複雑な計算で予測しなければならなくなる。TRAP ナノケージは一種類のサブユニットにわずか二種類の変異で会合体を形成することに成功した。非常にシンプルである。何よりも、その構造は数学的にはありえない構造だったことを考えると、今まで探索されていなかった構造体を他のタンパク質を使ってデザインすることもできるようになるかもしれない。そしてそれが、新機能創出につながれば、面白い。

文 献

- 1) Rothmund, P. W. K. (2006) *Nature* **440**, 297-302. DOI: 10.1038/nature04586.
- 2) Heddle, G. H. *et al.* (2017) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **43**, 148-155. DOI: 10.1016/j.sbi.2017.03.007.
- 3) Malay, A. D. *et al.* (2019) *Nature* **569**, 438-442. DOI: 10.1038/s41586-019-1185-4.
- 4) Antson, A. A. (1995) *Nature* **374**, 693-700. DOI: 10.1038/374693a0.
- 5) Malay, A. D. *et al.* (2012) *Nano Lett.* **12**, 2056-2059. DOI: 10.1021/nl3002155.
- 6) Scheres, S. H. (2012) *J. Struct. Biol.* **180**, 519-530. DOI: 10.1016/j.jsb.2012.09.006.
- 7) Casper, D. L., Klug, A. (1962) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **27**, 1-24. DOI: 10.1101/sqb.1962.027.001.005.

岩崎憲治

岩崎憲治 (いわさき けんじ)

筑波大学生存ダイナミクス研究センター教授
1992年京都大学理学部卒、1994年京都大学大学院理学研究科修士課程修了、1998年大阪大学大学院基礎工学研究科博士後期課程修了(博士(理学))。2018年より現職。

研究内容: 病態解明と創薬を目指した構造生物化学

連絡先: 〒305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1

E-mail: ikenji@tara.tsukuba.ac.jp

URL: <https://www.tsukiwaken.com>

宮崎直幸

宮崎直幸 (みやざき なおゆき)

筑波大学生存ダイナミクス研究センター助教
2005年大阪大学理学研究科修了、博士(理学)。2019年より現職。

研究内容: 生体超分子複合体の構造生物化学

連絡先: 同上

E-mail: naomiyazaki@tara.tsukuba.ac.jp

URL: 同上