

多量体タンパク質のサブユニット間相互作用を利用した新規機能性ハイドロゲルの構築と薬剤徐放システムへの活用

奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科物質創成科学領域

真 島 剛 史

Association-controllable hemoprotein assemblies and hydrogels were constructed from a fusion protein (FP) with two c-type cytochrome units utilizing 3D domain swapping (3D-DS), where the same structural region is exchanged three-dimensionally between molecules of the same protein. FP was expressed with *E. coli* and purified by ion exchange and size exclusion chromatography. The dimer and trimer of FP, oligomerized by 3D-DS, were prepared by the procedure of ethanol addition, lyophilization, and redissolution of the residual. The obtained 3D-DS FP dimer constructed hemoprotein assembly exhibiting a dynamic structural change between ring and linear forms, regulated by CO and imidazole binding. The oligomerization of the FP 3D-DS dimer depended on the temperature and protein concentration. The structural change between ring and linear structure of the dimer of FP 3D-DS dimer was directly observed by the high-speed atomic force microscopy in solution. Highly concentrated 3D-DS FP trimer formed protein hydrogels, which decomposed by CO and imidazole binding. In this study, protein nanostructures and protein hydrogels were constructed through the interaction between proteins. These results contribute as the basis of future functional supramolecular protein assemblies and drug delivery systems using protein-based structures.

1. 緒 言

ハイドロゲルは、水により膨潤するゲルであり、ドラッグデリバリーや生体代替・模倣材料への利用が可能なバイオマテリアルとして注目されている。中でもタンパク質を原料としたハイドロゲルは、生体親和性や生分解性の高さを持つ。これまでに、アルブミン等の球状タンパク質^{1,2)}やコラーゲン³⁾を用いたゲルの細胞培養足場や薬剤徐放への応用が報告されているが、多くのタンパク質ゲルは、タンパク質の立体構造が崩れ、内部の疎水性残基が表出することでゲル化が起こっているため、タンパク質自体に由来する機能は消失している。タンパク質ハイドロゲルへ生体適合性を失わずに高度な機能を付与するためには、材料となるタンパク質の構造と機能を維持した状態でのゲル化が必要であるが、未だ一般的な方法論が確立されていない。本研究では、多量化するタンパク質のサブユニット間相互作用を利用することで、ゲルの形成と分解を制御可能なタンパク質ハイドロゲルの構築に取り組んだ。

2. 方 法

2.1. ビルディングブロックタンパク質の設計

タンパク質ナノ構造体及びハイドロゲルのビルディングブロックを作成するにあたり、2種類のc型ヘムタンパ

ク質を融合したタンパク質を3Dドメインスワッピング(3D-DS)機構⁴⁾に基づいて設計した。3D-DSは同じタンパク質が3次的に同じ構造部位を交換することで多量化する、タンパク質の会合機構の一つであり、天然にも多く見られるものである。また、ヘムタンパク質とは、コファクターとして鉄プロトポルフィリンIX(ヘム)を持つタンパク質群であり、ヘムが機能発現に重要な役割を果たしている。まず超好熱菌 *Allochromatium vinosum* 由来のシトクロム *c'*(AVCP)に着目した^{5,6)}。AVCPは通常2量体で存在し、ヘムが還元条件下で一酸化炭素(CO)と結合、もしくは酸化条件下でイミダゾールと結合することで単量体へと解離する(Fig. 1a)。このAVCPの機能を利用することで、小分子による外部刺激により構造を制御可能なタンパク質ナノ構造体やタンパク質ハイドロゲルが構築できると考えた。次に、複数のAVCPを結合するため、超好熱菌 *Aquifexaerophilus* 由来のシトクロム *c*₅₅₅を円循環置換して構築したタンパク質(CPC)をAVCPの結合基盤部位として選択した⁷⁾。CPCはN末端部位とC末端部位の間に α ヘリックスをリンカーとして挿入することで、3D-DS機構により2量体、3量体を形成する(Fig. 1b)。CPCは大腸菌での発現時には単量体として得られ、エタノールの添加、凍結乾燥、再溶解の処理を行うことで多量化する。本研究では、AVCPをN末端側とC末端側の2つのユニットに分割し、それぞれをCPCのN末端側とC末端側に結合する形で融合タンパク質(FP)を設計した(Fig. 1c)。FPはCPCと同様に大腸菌での発現時には、単量体で得られ、エタノール添加、凍結乾燥、再溶解の処理を行うことで多量化すると考えられる。これにより、大腸菌の中でのタンパク質多量化による発現や精製時の問題を回避でき、精製を極めて簡便に行うことが可能となる。



Construction of functional protein hydrogels utilizing the interaction between subunits of oligomeric proteins

Tsuyoshi Mashima

Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology

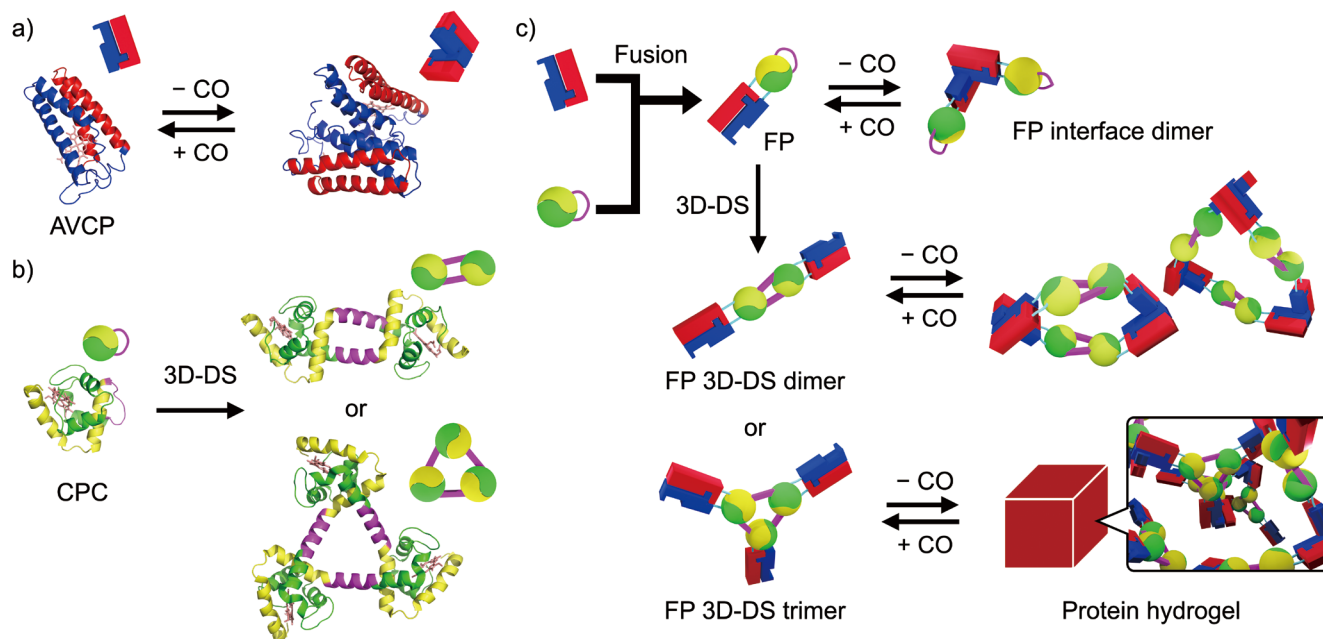


Fig. 1 タンパク質ナノ構造体とハイドロゲル構築の概略図。a) AVCP の構造とモノマー・ダイマー間平衡の模式図。N 末端側を青、C 末端側を赤で示す。b) CPC の予測構造と 3D-DS 2 量体の予測構造と 3 量体の結晶構造 (PDB ID: 5Z25)。c) AVCP と CPC の融合による FP の構築と FP 3D-DS 多量体によるナノ構造体とハイドロゲル構築の模式図。

2. 2. ビルディングブロックタンパク質の発現と精製

FPはc型ヘムタンパク質を生産可能なCCM(cytochrome c maturation) システムを有する大腸菌を用いて発現させた。FPは大腸菌の細胞膜と外膜間のペリプラズムに発現されるため、コールド・オスモティック・ショック法により、FPを大腸菌から抽出した。得られたFPをフェリシアン化カリウムで酸化した後、イオン交換クロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により精製した。FPの純度をSDS-PAGEで確認し、得られたFPの状態をSEC及びUV-visスペクトル、CDスペクトル測定から確認した。

2. 3. ビルディングブロックタンパク質の多量化

精製したFPに対して、エタノール添加、凍結乾燥、再溶解の処理を行い、多量化させた後、SECにより精製を行った。エタノール添加の終濃度を比較したところ、2量体 (3D-DS FP dimer)、3量体 (3D-DS FP trimer) とともに40% (v/v) で最も多く得られた。SECはCOをバブリングした還元剤を含む緩衝液を移動相に用いて行った。得られた3D-DS FP dimer及びtrimerについては、SEC-多角度光散乱 (MALS) 測定により、設計通りの会合数の会合体が得られていることを確認した。3D-DS多量化によるタンパク質構造の変化については、酸化、還元、CO付加状態のUV-visスペクトルを比較した。またイミダゾール結合能の変化についても、イミダゾール滴定によるヘムの吸収ピーク変化から評価した。

2. 4. 3D-DS FP dimerによるタンパク質ナノ構造体の構築と構造評価

単離した3D-DS FP dimerをCOまたはイミダゾール存在下と非存在下で静置した後、SECにより会合状態の変化を評価した。また、一度会合した3D-DS FP dimerにCOまたはイミダゾールが再度付加することで、離散することを確認した。さらに、高速分子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、会合状態の3D-DS FP dimerの動的な構造を観察した。

2. 5. 3D-DS FP trimerによるタンパク質ハイドロゲルの構築

単離した3D-DS FP trimerを酸化条件下で限外ろ過により濃縮し、ゲルを作成した。得られたゲルに対し、COまたはイミダゾールを付加することで、ゲルが分解されるか観察した。さらに分解後に酸化条件下で濃縮することで再度ゲル化が可能か確認した。

3. 結果・考察

3. 1. ビルディングブロックタンパク質の培養と精製

大腸菌を用いて培養、精製されたFPは全てAVCPサブユニット部分で結合した2量体 (FP interface dimer) として得られた。FP interface dimerのUV-visスペクトルはAVCPとCPCのスペクトルの和と完全に合致し、FPのAVCPとCPCサブユニットのヘム周辺環境は融合後も維持されていることが明らかになった (Fig. 2a)。CDスペクトルについても同様に、AVCPとCPCのスペクトル

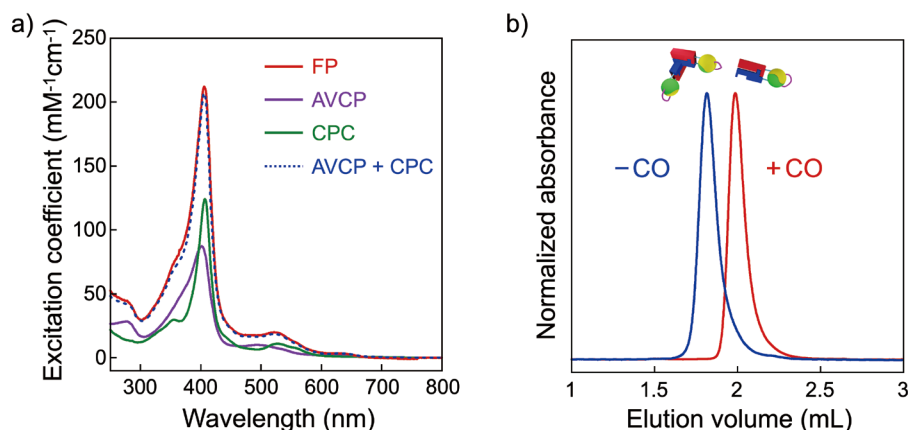


Fig. 2 a) FP (赤), AVCP (紫), CPC (緑) の UV-vis スペクトル。青点線は AVCP と CPC のスペクトルの和を示す。b) FP の SEC 測定の溶出曲線。移動相は 50mM リン酸カリウム緩衝液, pH7 (青), 及び同様の緩衝液に 5mM ジチオナイトを添加し CO をバブリングしたもの(赤)。

の和が FP interface dimer のスペクトルと合致し、FP の AVCP と CPC サブユニットにおいて融合後もタンパク質構造に大きな変化が無いことが示された。さらに、還元条件下で CO をバブリングし UV-vis スペクトルを測定したところ、CO がヘムに結合した典型的なスペクトルが得られ、FP interface dimer は CO 結合能を維持していることが明らかになった。そして、還元条件 CO 雰囲気下において、FP interface dimer は単量体に解離した (Fig. 2b)。また、酸化条件下でイミダゾールを添加すると、FP interface dimer は単量体へと解離した。これらの結果から、FP は AVCP サブユニット間の相互作用により 2 量化しており、AVCP と同様に CO とイミダゾールへの応答性を維持していることが明らかになった。

3. 2. ビルディングブロックタンパク質 2 量体または 3 量体の構築と物性評価

3D-DS 処理後に SEC により単離・精製された FP 3D-DS dimer 及び trimer は、還元条件 CO 雰囲気下においても安定的に 2 量体及び 3 量体として存在しており、設計通りに AVCP サブユニット間の相互作用ではなく、3D-DS によって多量化していることが示唆された。次にイミダゾールを含む移動相を用いて、AVCP サブユニット間の相互作用が働かない状況で SEC-MALS 測定を行ったところ、FP 3D-DS dimer 及び trimer の推定分子量は 47.1 kDa と 76.6 kDa で、それぞれの計算値 50.6 kDa と 75.9 kDa に合致し、単量体 (25.3 kDa) がそれぞれ 2 量化及び 3 量化していることが確認された (Fig. 3a)。

また、還元後の FP 3D-DS dimer 及び trimer の大気下及び CO 雰囲気下の UV スペクトルは、FP から大きな変化は無く、3D-DS による多量体化後もヘム周囲の構造や

CO 結合能が失われていないことが示された。また、FP と FP 3D-DS dimer のイミダゾール結合能を比較したところ、FP 3D-DS dimer の結合定数 ($K_a = 16.6 \text{ mM}^{-1}$) は FP の結合定数 ($K_a = 10.0 \text{ mM}^{-1}$) から大きな変化がなく、3D-DS 多量化後もイミダゾール結合能が維持されていることが確認された。さらに FP 3D-DS 多量体は酸化条件下でさらに会合し、より大きな多量体を形成した (Fig. 3b)。この多量体は再度 CO またはイミダゾールを付加することで、FP 3D-DS dimer または trimer へと解離し、AVCP サブユニット間の相互作用により、より高次の会合体を可逆的に形成することが示された。

3. 3. タンパク質ナノ構造体の構築

FP 3D-DS dimer の多量化は温度とタンパク質濃度に強く依存しており、室温では FP 3D-DS dimer の 2 量体のみが得られるのに対し、4℃ 下では 3 量体及びより高次の多量体が形成された (Fig. 4a)。さらに、4℃ 下においてはタンパク質濃度によって 3D-DS FP dimer の 2 量体、3 量体、及び高次多量体の比率に大きな変化が見られた (Fig. 4b)。3D-DS FP dimer の濃度が 0.5 μM では主に 2 量体が形成されたのに対し、25 μM や 50 μM 等の高濃度では 3 量体やより高次の多量体が主成分となった。これらの結果から、FP 3D-DS dimer が形成する多量体構造が平衡状態にあることが示された。

次に、FP 3D-DS dimer の 2 量体が設計通りの構造をとっているか確認するために、AFM を用いて非常に低濃度 (25 nM) の FP 3D-DS dimer 2 量体の溶液中の構造をマイカ基板上で観察したところ、直径約 20 nm の環状の構造体が観察された (Fig. 5a-d)。これらの構造は、FP 3D-DS dimer 2 量体の AlphaFold2 予測構造から計算された

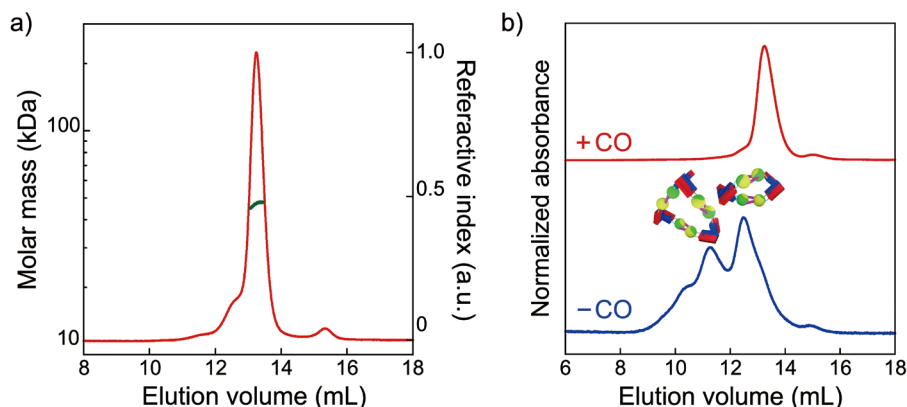


Fig. 3 a) FP 3D-DS dimer の SEC-MALS 解析。移動相は 10mM イミダゾールを含む 50mM リン酸カリウム緩衝液, pH7。b) FP 3D-DS dimer の SEC 測定の溶出曲線。移動相は 50mM リン酸カリウム緩衝液, pH7 (青)、及び同様の緩衝液に 5mM ジチオナイトを添加し CO をバブリングしたもの(赤)。

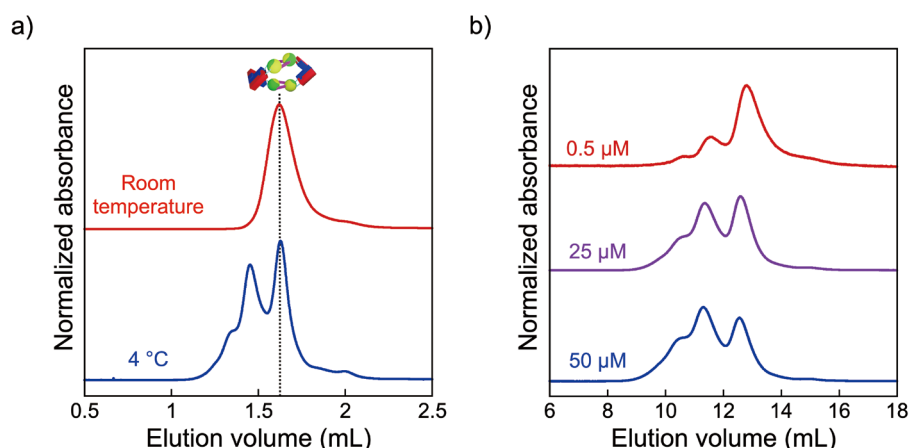


Fig. 4 a) 異なる温度での FP 3D-DS dimer の SEC 測定の溶出曲線。移動相は 50mM リン酸カリウム緩衝液, pH7, 室温 (赤), 4 °C (青)。b) 様々な濃度での FP 3D-DS dimer の SEC 測定の溶出曲線。移動相は 50mM リン酸カリウム緩衝液, pH7。濃度は 0.5 μM (赤), 25 μM (紫), 50 μM (青)。

シミュレーション構造とよく一致した。また、直線状の構造体も同様に観察され (Fig. 5e-f)、こちらは FP 3D-DS dimer が片方の AVCP サブユニットのみで結合した構造のシミュレーション構造とよく一致した。これらの FP 3D-DS dimer 2 量体の環状と線形の 2 構造は AFM 観察中に相互に変化を繰り返しており、FP 3D-DS dimer が形成する多量体が動的な構造体であることが示唆された。

3.4. タンパク質ハイドロゲルの構築

FP 3D-DS trimer を大気下において限外ろ過により 1mM (FP 濃度) まで濃縮したところ、ゲルが得られた (Fig. 6)。得られたゲルは、還元条件 CO 雰囲気下におくことで、分解され、再度大気下で濃縮することで、ゲルを形成した。よって本ゲルは FP 3D-DS trimer が AVCP サブユニット

間の相互作用により架橋構造を構築しゲル化していると考えられる。本ゲルはタンパク質の機能を活用した可逆的に分解構築が可能なハイドロゲルである。

4. 総括

本研究では、小分子である CO やイミダゾールに反応して会合するタンパク質に着目し、3D-DS 機構を基盤として融合タンパク質を設計することで、タンパク質間相互作用により、タンパク質のみからなるナノ構造体及びタンパク質ハイドロゲルの構築を達成した。本成果は、タンパク質をビルディングブロックとする、ナノサイズの機能性タンパク質構造体や、ドラッグデリバリーシステムの構築に貢献するものである。

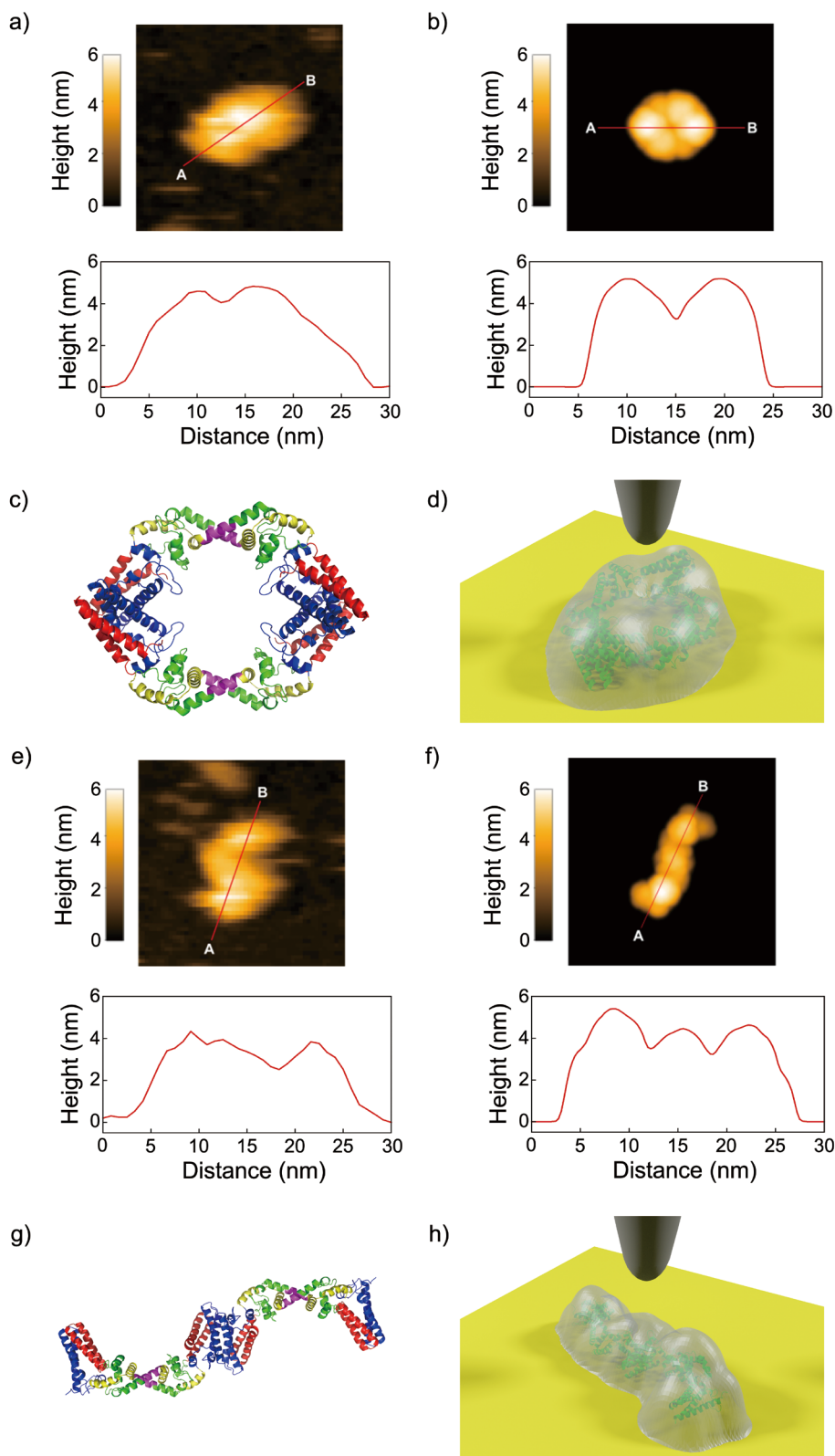


Fig. 5 高速原子間力顕微鏡 (AFM) 測定 a) 測定された AFM 画像 (上) と環状の FP 3D-DS dimer 2 量体の断面高さ (下) と b) そのシミュレーション画像。c) AlphaFold を用いて予測された環状の FP 3D-DS dimer2 量体の立体構造。d) マイカ基板 (黄色) 上の環状 FP 3D-DS dimer2 量体の AFM 測定の概略図。FP 3D-DSdimer 2 量体を緑色で示す。e) 測定された AFM 画像 (上) と直線状の FP 3D-DS dimer 2 量体の断面高さ (下) と f) そのシミュレーション画像。g) AlphaFold を用いて予測された直線状の FP 3D-DS dimer 2 量体の立体構造。h) マイカ基板 (黄色) 上の直線状 FP 3D-DS dimer2 量体の AFM 測定の概略図。FP 3D-DS dimer 2 量体を緑色で示す。

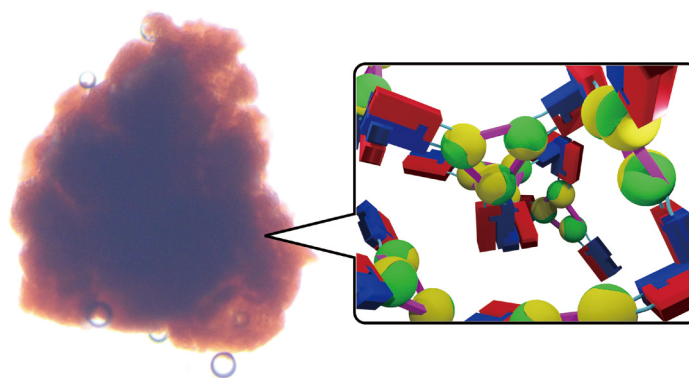


Fig. 6 FP 3D-DS trimer ゲルの写真と、内部構造の模式図。

(引用文献)

- 1) Kong, F.; Mehwish, N.; Lee, H. B., Emerging albumin hydrogels as personalized biomaterials. *Acta Biomaterialia* **2023**, 157, 67–90.
- 2) Meng, R.; Zhu, H.; Deng, P.; Li, M.; Ji, Q.; He, H.; Jin, L.; Wang, B., Research progress on albumin-based hydrogels: Properties, preparation methods, types and its application for antitumor-drug delivery and tissue engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, 11. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1137145.
- 3) Dinescu, S.; Kaya, M. A.; Chitoiu, L.; Ignat, A.; Kaya, D. A.; Costache, M., Collagen-Based Hydrogels and Their Applications for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels* **2018**, 1–21.
- 4) Hirota, S.; Mashima, T.; Kobayashi, N., Use of 3D domain swapping in constructing supramolecular metalloproteins. *Chem. Commun.* **2021**, 57, 12074–12086.
- 5) Doyle, M. L.; Gill, S. J.; Cusanovich, M. A., Ligand-controlled dissociation of Chromatium vinosum cytochrome *c'* *Biochemistry* **1986**, 25, 2509–2516.
- 6) Evers, T. H.; Merks, M., Successful recombinant production of Allochromatium vinosum cytochrome *c'* requires coexpression of *cmm* genes in heme-rich Escherichia coli JCB712 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 327, 668–674.
- 7) Oda, A. ; Nagao, S.; Yamanaka, M.; Ueda, I.; Watanabe, M.; Uchihashi, T.; Shibata, N.; Higuchi Y.; Hirota, S., Construction of a Triangle-Shaped Trimer and a Tetrahedron Using an alpha-Helix-Inserted Circular Permutant of Cytochrome *c*₅₅₅ *Chem. Asian. J.* **2018**, 13, 964–967.