

## 人工タンパク質ナノケージ TIP60 の再設計による金属イオン依存性会合の実現

大原直也<sup>1</sup>, 川上史<sup>2</sup>, 新井亮一<sup>3,4</sup>, 安達成彦<sup>5</sup>, 守屋俊夫<sup>6</sup>, 川崎政人<sup>6</sup>, 宮本憲二<sup>2</sup><sup>1</sup>慶應義塾大学 大学院理工学研究科, <sup>2</sup>慶應義塾大学 理工学部, <sup>3</sup>信州大学 繊維学部,<sup>4</sup>信州大学 バイオメディカル研究所, <sup>5</sup>筑波大学 生存ダイナミクス研究センター,<sup>6</sup>高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所

## Re-design of an artificial protein nanocage TIP60 for the metal-induced assembly

Naoya OHARA<sup>1</sup>, Norifumi KAWAKAMI<sup>2</sup>, Ryoichi ARAI<sup>3,4</sup>, Naruhiko ADACHI<sup>5</sup>,  
Toshio MORIYA<sup>6</sup>, Masato KAWASAKI<sup>6</sup>, Kenji MIYAMOTO<sup>2</sup><sup>1</sup>Graduate School of Fundamental Science and Technology, Keio University,<sup>2</sup>Faculty of Science and Technology, Keio University, <sup>3</sup>Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University,<sup>4</sup>Institute for Biomedical Sciences, Shinshu University, <sup>5</sup>Life Science Center for Survival Dynamics, Tsukuba University,<sup>6</sup>Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization

## Abstract

タンパク質ケージは、複数のサブユニットタンパク質が自発的に会合して形成されるナノ粒子である。その特徴的な中空球状構造から、内部空間に様々な異種分子を内包することができ、薬物輸送などへの応用が期待されている。しかし、多くのタンパク質ケージは自発的かつ不可逆に会合するため、その後の内部空間へのアクセスが限られてしまう。タンパク質ケージの会合と解離を外部刺激によって可逆的に制御することができれば、異種分子の内包と放出に有用であると考えられる。そこで本研究では、人工タンパク質ナノケージ TIP60 を用い、その会合と解離を金属イオン依存的に制御する系を開発した。

## 1. はじめに

本研究では、我々が以前構築した人工タンパク質ナノケージ TIP60 をもとに更なる再設計を行い、金属イオンに応答して可逆的に会合・解離する系を構築した [1]。TIP60 は 5 量体タンパク質 LSm と 2 量体タンパク質 MyoX coiled-coil を融合した融合タンパク質であり、これを大腸菌で発現させると自発的に会合し 60 量体タンパク質ケージとして得られる (Fig. 1) [2]。この 60 量体構造は極めて安定であり、他の多くのタンパク質ケージと同様に熱変性などを伴わずに解離させることは難しい。そこで、TIP60 の可逆的な会合・解離を実現するため、1) まず変異導入により自発的な会合を妨げ、2) 続いて金属イオンの配位により解離したサブユニットを架橋することで再び会合させる、というアプローチを試みた。金属イオンの配位は共有結合性の強い結合を提供する一方で、金属キレター

の添加により容易に解離させることもできることから、タンパク質の可逆的な会合制御に極めて有用である。本稿では、TIP60 の会合解離を実現した上記のデザインおよび、PF の施設を活用した構造解析の結果について述べる。

## 2. TIP60 の会合・解離制御に向けたデザイン

## 2-1. 自発的に会合しない変異体の構築

まず、解離した状態で精製される TIP60 変異体を獲得することを目的として、検討を行った。以前に決定した original TIP60 のクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) 構造 (PDB ID: 7EQ9) [3] について、特に TIP60 の会合に重要と思われるサブユニット間領域を中心に探索を行い、K67 残基を変異導入の標的として定めた。この残基は、サブユニット間で水素結合を形成していることから、60 量体の安定性に重要な寄与をしていると考えたためである (Fig. 2)。実

際、K67E 変異体を作製したところ、解離した状態で単離されることが Native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) により確認された。

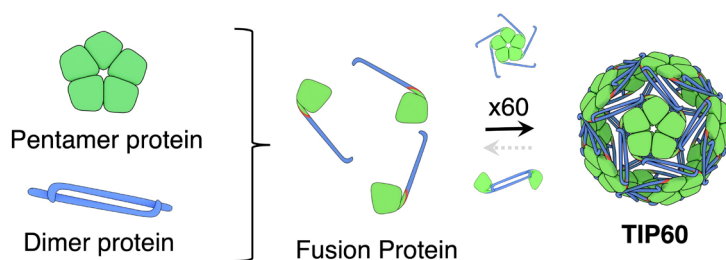
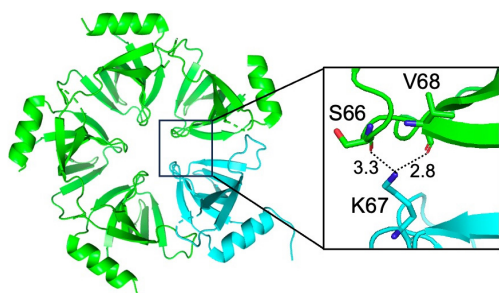


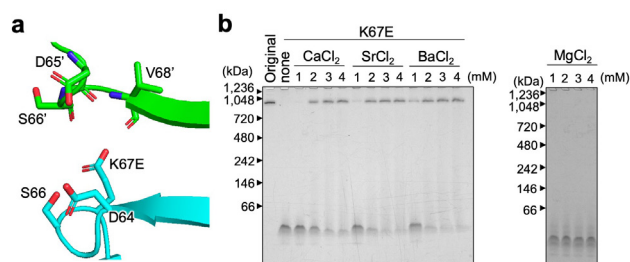
Figure 1 Schematic representation of the design of TIP60.



**Figure 2** Three-dimensional structure of the LSm pentamer (PDB ID: 3BY7). One of the subunits was highlighted in cyan. The close-up view of the interface region around the K67 residue was depicted in the right panel. The dotted lines show possible hydrogen bonds with the number of distance (Å). Reprinted with permission from Ref. [1]. Copyright 2023 American Chemical Society.

## 2-2. 金属誘導アセンブリ

K67E 変異体の予測モデル構造から、K67E 残基近傍の 5 量体界面領域には K67E や D64 残基の側鎖および隣接するサブユニットの主鎖に由来する複数の酸素原子が密集して位置していることがわかった (Fig. 3a)。これらは一般に Ca などのアルカリ土類金属イオンとよく相互作用し、カルモジュリンなどの天然の Ca 結合タンパク質において配位子として頻繁に見受けられる。これに基づき我々は、この領域にアルカリ土類金属が結合することで、隣接するサブユニットが配位結合により架橋され、金属イオン依存的に 60 量体への再会合が誘導されるのではないかと考えた。そこで実際に、精製した K67E 変異体に対して種々のアルカリ土類金属を添加し Native PAGE で分析したところ、CaCl<sub>2</sub> または SrCl<sub>2</sub>、BaCl<sub>2</sub> を添加した場合、その濃度依存的に 60 量体に対応するバンドが回復することが明らかとなった (Fig. 3b)。また、この構造体は金属イオンキレートである EDTA を添加することにより速やかに解離したことから、会合の金属イオン依存性が示された。興味深いことに、その他の遷移金属イオンはもちろんのこと、同族の Mg イオンでも会合は誘導されず、金属の選択的な



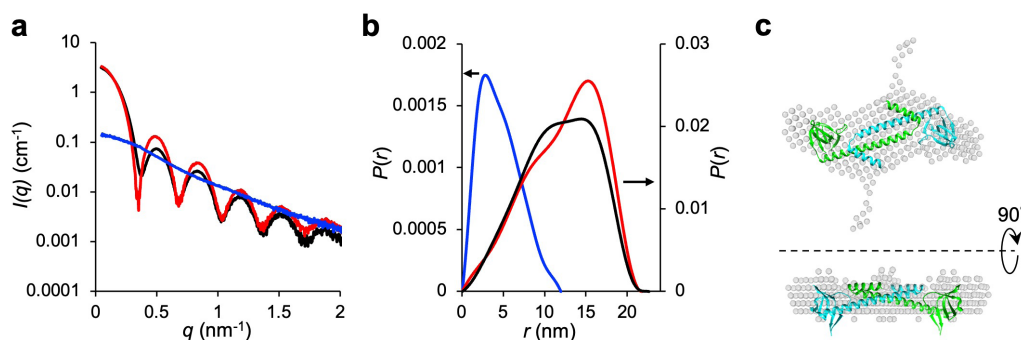
**Figure 3** Metal-induced assembly of the K67E mutant. (a) The predicted structure of the K67E mutant. The adjacent subunits were shown in green and cyan. (b) Native PAGE analysis of the original TIP60 and the K67E mutant w/o alkaline earth metal ions: Mg, Ca, Sr and Ba. Reprinted with permission from Ref. [1]. Copyright 2023 American Chemical Society.

配位が会合に関与していることが示唆された。以上の結果から、Ca や Sr, Ba の存在下で形成される会合体について、金属イオン依存的に形成される TIP60 として、mTIP60 (metal-induced TIP60) と命名した。mTIP60 の金属添加による会合効率は極めて高く、60 量体構造の収率は Ba イオンの場合で最も高い 94% となった。

## 3. mTIP60 の立体構造解析

### 3-1. X 線小角散乱 (SAXS)

PF の Bio-SAXS ビームライン (BL-10C) において SAXS による立体構造解析を実施した。まず、Ba イオン添加により形成された mTIP60-Ba について分析したところ、original TIP60 と類似した散乱曲線が得られ、同様の球状粒子を形成していることが示唆された (Fig. 4a)。ギニエ解析から求めた粒子の回転半径  $R_g$  は 9.4 nm、二点間距離分布関数  $P(r)$  から求めた最大長  $D_{max}$  (球状粒子の場合合直径に対応) は 21.8 nm であった。 $P(r)$  は長距離側にシフトした分布を示し、粒子が中空であることが示された (Fig. 4b)。興味深いことに、このシフトは original TIP60 よりも大きく、より高い中空度が示唆された。これは、発現と同時に自発的に会合する original TIP60 が発現宿主由来の夾雑分子を一部内包するのに対し、解離した状態



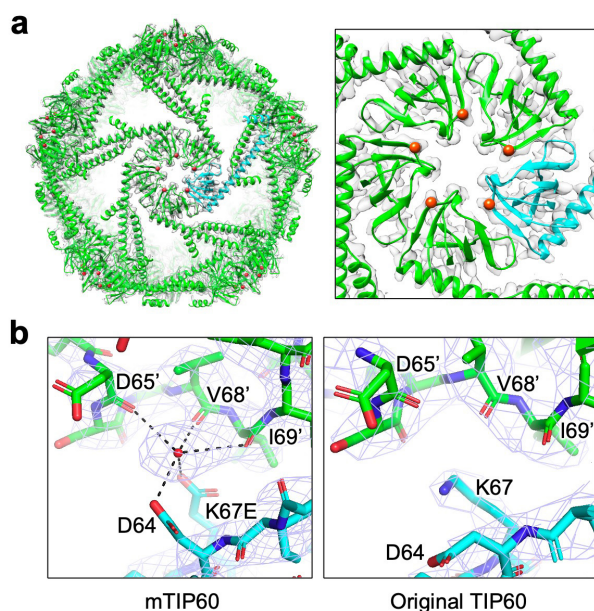
**Figure 4** SAXS analysis of the metal-induced assembly. (a) X-ray scattering curves and (b) pair-distance distributions of the original TIP60 (black), K67E with Ba ions (mTIP60-Ba; red), and K67E with EDTA (blue). (c) Dummy atom model constructed with DAMMIF/DAMMIN for the K67E mutant with EDTA (gray sphere). The cartoon model is the part of the cryo-EM structure of the original TIP60 (PDB ID:7EQ9). Reprinted with permission from Ref. [1]. Copyright 2023 American Chemical Society.

で精製され *in vitro* で会合させる mTIP60 ではそのような可能性が無いことに起因していると推測される。

次に、EDTA 添加時の構造についても同様に分析したところ、その粒子径は大幅に減少しており ( $R_g$ : 3.7 nm,  $D_{max}$ : 12.0 nm), 金属非存在下での解離を確認した。P( $r$ ) は、Rod 状の分子で特徴的にみられる短距離側に偏った分布を示した (Fig. 4b)。P( $r$ ) をもとに DAMMIF/DAMMIN プログラムにより作製した dummy atom model は、MyoX ドメインを介した 2 量体の構造とよく一致した (Fig. 4c)。このことは、ビームタイム中に PF で実施したサイズ排除クロマトグラフィー / 多角度光散乱法 (SEC-MALS) による分子量定量の結果からも支持された。

### 3-2. Cryo-EM, 単粒子解析

KEK-SBRC の cryo-EM (Talos Arctica G2) を用い、mTIP60-Ba の立体構造解析を行った。最終的に、61,251 粒子から 3.96 Å (gold standard FSC@0.143;  $I$  symmetry) の分解能で構造を決定した (PDB ID: 7XM1, Fig. 5a)。その結果、全体の構造は original TIP60 とほぼ同様であった (原子位置の平均二乗偏差 RMSD = 0.78Å)。一方で、K67E 残基周辺の 5 量体界面領域において、余剰の EM マップが確認された (Fig. 5b)。これは、original TIP60 の cryo-EM マップとの顕著な違いであり、結合した Ba イオンに対応するものと考えられる。周囲に位置する K67E, D64 残基の側鎖カルボン酸および、隣接するサブユニットに由来す



**Figure 5** Cryo-EM structure of mTIP60-Ba. (a) The EM map and the refined model structure of mTIP60-Ba. One of the subunits was highlighted in cyan. Red sphere refers coordinated Ba ions. Close-up view of one of the pentameric domain was depicted in the right panel. (b) Close-up view of the cryo-EM structure and the EM map of mTIP60-Ba around the K67E residue (left panel). Corresponding region of the original TIP60 was shown in the right panel. Reprinted with permission from Ref. [1]. Copyright 2023 American Chemical Society.

る D65', V68', I69' 残基の主鎖カルボニルはそれぞれ Ba イオンの配位子として機能していると推測される。実際、D64A 変異体を作製したところ、金属イオンに対する応答が失われた。以上の結果から、当初の設計通り、金属イオンが 5 量体の界面に対してサブユニット間を架橋するように結合することで、60 量体構造への会合を誘導していることが明らかとなった。

### 4. まとめ

本研究では、人工タンパク質ナノケージ TIP60 についてサブユニット間相互作用に着目した再設計を行い、アルカリ土類金属により会合・解離を制御する系の構築に成功した。KEK PF における種々の構造解析の結果から、金属添加前後の構造が 2 量体および 60 量体であることが示された。また、金属イオンによる会合誘導の仕組みを明らかにすることができた。タンパク質ケージの会合解離を外部刺激により制御可能な本系は、異種分子の効率的な内包と任意のタイミングでの放出に有用である。実際、既に mTIP60 を用いて核酸や異種タンパク質の内包を実証しており、今後 TIP60 のナノキャリアとしての応用が大いに期待される [4]。

### 謝辞

SAXS 実験は、KEK PF の BL-10C において実施しました (課題番号: 2020G674)。清水伸隆先生をはじめ、ビームライン担当者の皆様に御礼申し上げます。Cryo-EM による立体構造解析は、AMED-BINDS (JP22ama121001) の支援のもと、KEK-SBRC において実施しました。千田俊哉先生をはじめ、スタッフの皆様にも御礼申し上げます。本研究は、JSPS 科研費 (JP18K05324/JP17KK0104/JP19H02522/JP22J13988) および JACI 第 8 回新化学技術研究奨励賞、慶應義塾大学博士課程学生支援プログラム潮田記念基金の支援を受けて実施しました。

### 引用文献

- [1] N. Ohara, N. Kawakami, R. Arai, N. Adachi, T. Moriya, M. Kawasaki, and K. Miyamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **145**, 1, 216 (2023).
- [2] N. Kawakami, H. Kondo, Y. Matsuzawa, K. Hayasaka, E. Nasu, K. Sasahara, R. Arai, and K. Miyamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 38, 12400 (2018).
- [3] J. Obata, N. Kawakami, A. Tsutsumi, E. Nasu, K. Miyamoto, M. Kikkawa, and R. Arai, *Chem. Commun.* **57**, 79, 10226 (2021).
- [4] N. Ohara, N. Kawakami, R. Arai, N. Adachi, A. Ikeda, T. Senda, and K. Miyamoto, *Chem. Commun.* **60**, 4605 (2024).

(原稿受付: 2024 年 5 月 13 日)

## 著者紹介

大原直也 Naoya OHARA



慶應義塾大学 大学院理工学研究科 後期博士課程

〒 223-0061 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1

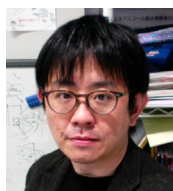
e-mail: naoya.ohara@keio.jp

略歴：2024 年慶應義塾大学大学院理工学研究科後期博士課程単位取得退学，同年博士（理学）取得。2024 年 4 月～中外製薬株式会社。

最近の研究：タンパク質複合体のデザイン，抗体創薬

趣味：アニメ，音楽ライブ，お香

川上了史 Norifumi KAWAKAMI



慶應義塾大学 理工学部 専任講師

〒 223-0061 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1

e-mail: norikawakami@bio.keio.ac.jp

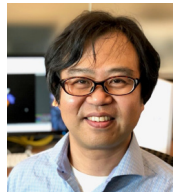
略歴：2009 年広島大学大学院理学研究科生物科学専攻博士課程後期修了，博士

（理学），2009～2014 年名古屋大学博士研究員，2014 年～慶應義塾大学理工学部生命情報学科。

最近の研究：タンパク質設計，生命金属と進化

趣味：CG アニメ制作（YouTube）

新井亮一 Ryoichi ARAI



信州大学 繊維学部 教授

〒 386-8567 長野県上田市常田 3-15-1

e-mail: rarai@shinshu-u.ac.jp

略歴：2001 年東京大学工学系研究科博士課程修了，2001 年理化学研究所 GSC 研究員，2006 年日本学術振興会海外特

別研究員，2007 年信州大学繊維学部助教，2016 年同准教授，2024 年同教授。博士（工学）。

最近の研究：人工タンパク質複合体の設計開発等

趣味：アニメ鑑賞等

安達成彦 Naruhiko ADACHI

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 准教授

〒 305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1

e-mail: naruhiko.adachi@kek.jp

略歴：2003 年東京大学大学院薬学系研究科博士号取得，2005 年 JBIC 特別研究職員，2013 年 KEK 物構研特別助教，2019 年特任准教授，2023 年筑波大学生存ダイナミクス研究センター准教授。薬学博士。

最近の研究：転写研究，クライオ電顕単粒子解析，microED

趣味：読書，映画鑑賞

守屋俊夫 Toshio MORIYA



高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 特任准教授

〒 305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

e-mail: toshio.moriya@kek.jp

略歴：2013 年筑波大学大学院人間総合科学学術院博士号取得，2013 年タンペレ工科大学ポスドク，2014 年マックスプランク分子生理学研究所ポスドク / 上級研究員，2018 年 KEK 物構研特任准教授。

最近の研究：クライオ電顕単粒子解析の手法論およびソフトウェア開発

趣味：映画鑑賞

川崎政人 Masato KAWASAKI

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 准教授

〒 305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

e-mail: masato.kawasaki@kek.jp

宮本憲二 Kenji MIYAMOTO



慶應義塾大学 理工学部 教授

〒 223-0061 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1

e-mail: kmiyamoto@bio.keio.ac.jp

略歴：1992 年慶應義塾大学大学院理工学研究科博士課程修了（博士（理学），

1992 年～2002 年株式会社カネカ研究員，2002 年～慶應義塾大学理工学部生命情報学科。

最近の研究：プラスチックの微生物分解

趣味：バイク，釣り