

「医療に向けた自己組織化等の分子配列制御による機能性材料・システムの創製」
平成 14 年度採択研究代表者

林崎 良英

(独)理化学研究所林崎生体分子機能研究室 主任研究員)

「ゲノムレベルの生体分子相互作用探索と医療に向けたナノレゴ開発」

1. 研究実施の概要

生命が 40 億年の歳月をかけて創り出してきた特異的に相互作用するタンパク質を「結合素子 (ナノレゴ素子)」という概念で捕らえ、複数個のナノレゴ素子から人工融合タンパク (ナノレゴ) を設計・作製し、制御可能な秩序ある自己組織化能力をもった新しい機能性材料を開発する。これまで、新規解析技術の開発、有用なナノレゴ素子候補を得るためのスクリーニング、ナノレゴ素子候補の物性解析、ナノレゴ新規概念の創出、SOR fusion ナノレゴを用いた新規線状構造体の創出を達成してきた。平成 18 年度は上記線状構造体形成過程の解明を行い、多点結合による伸長メカニズムを明らかにした。また、伸長を完全制御するためには結合が不可逆的となるように接着素子を改変することが必要であることが判明した。そこでコンピュータを用いた改変ナノレゴ (素子) のシミュレーションを行い、最適な改変ナノレゴの選び出しに成功している。この成果を受けて改変ナノレゴを用いてナノレゴ新規線状構造体を完全制御下で創出し、論文化を目指す。その他、18 年度は平面状ナノレゴ形成に関する研究、条件付ナノレゴの創出、ナノレゴの応用研究を展開するとともに、これまでの成果について数編の論文にまとめた。これら研究についても未発表の成果については論文化を目指す。

2. 研究実施内容

研究目的: 特異的相互作用するタンパク質 (ナノレゴ素子) から人工融合タンパク (ナノレゴ) を設計・作製し、制御可能な秩序ある自己組織化能力をもった新しい機能性材料を開発する。

方法: SPR を用いて新規構造体形成のメカニズムを解析するとともに、コンピュータによるナノレゴ設計のシミュレーションを行う。

研究成果

1) 条件付きナノレゴの創製 (理研グループ)

一定の条件下で働くナノレゴ素子として、 Ca^{2+} イオン存在下で相互作用を持つ、*Clostridium thermocellum* 由来の Cohesin と Dockerin ペアを接着因子として選び、4 量体タンパク質 SOR を骨格素子としたナノレゴ (SOR-Cohesin および SOR-Dockerin) を作成した。このナノレゴの接着因子間の結合は Ca^{2+} イオン存在下で安定する事が確認され、さらに結合は EGTA によって脱離可能であることが観察された。

2) ナノレゴ設計および自己組織化動態のコンピュータシミュレーション (理研グループ)

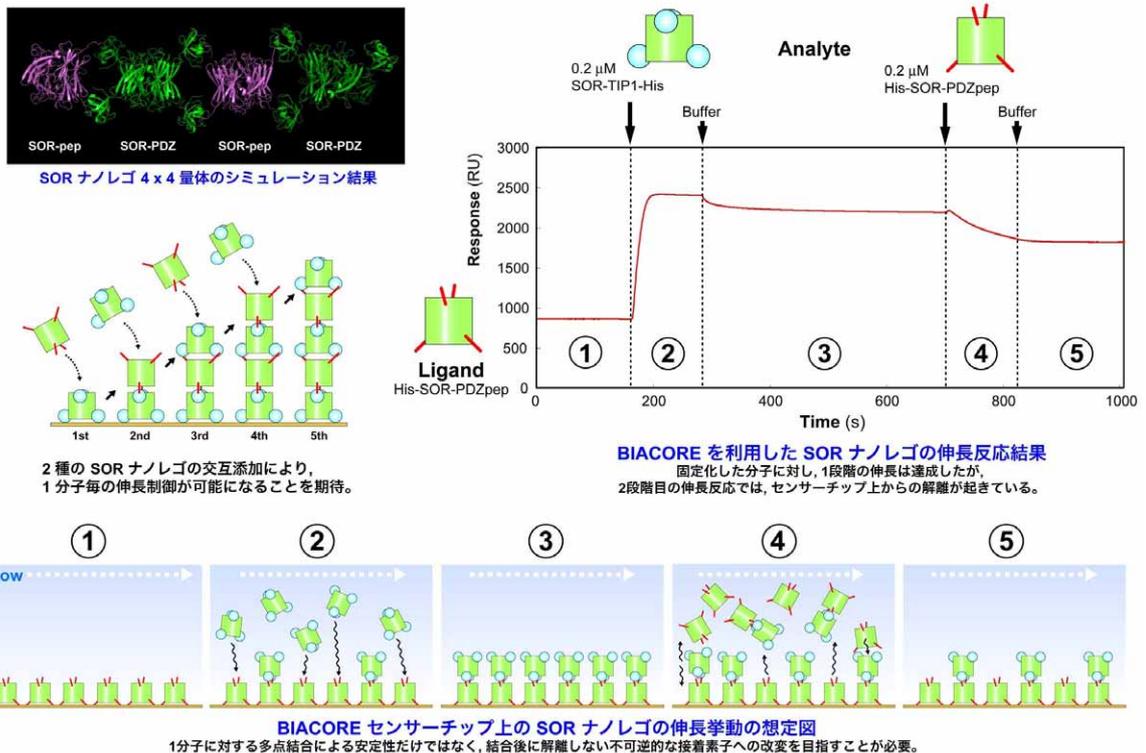
有用なナノレゴ創製の効率をあげるため、計算機による以下のシミュレーションを行った。

a) SOR ナノレゴの会合安定化を図るため、接着素子である PDZ ドメイン及び PDZ 結合ペプチドの改変を、アミノ酸点突然変異体の作製によって達成することとした。既知の立体構造情報を元にコンピュータシミュレーションを行い、PDZ-PDZ 結合ペプチド間の結合能を損なうことなく置換が可能なアミノ酸残基のスクリーニングを実施した。シミュレーション結果から得られた部位に関し、実際に変異を導入した接着素子を作製したところ、結合活性が保持されていることが確認された。

b) SOR ナノレゴにおける接着素子と骨格素子間の最適スペーサー配列を知るため、スペーサーの長さを変化させた場合の接着素子の配向性を分子動力学計算を用いてシミュレーションした。結果、各素子の構造ドメイン以外のアミノ酸配列を完全に除去したものでは、接着素子が安定して 4 方向に突き出ることが予測された。さらにシミュレーションにより得られた構造から、骨格素子に対して特定方向に位置する 2 組の接着素子を選ばれることで線状構造を形成することが予測された。

3) 制御可能なナノレゴの創製とそれを用いた直線状新規構造体の創製 (理研グループ)

SOR ナノレゴ (SOR-PDZ 及び SOR-Peptide) は 1 分子中に 4 つの接着素子を持っており、PDZ-Peptide 間のヘテロ相互作用により、溶液中での 1:1 の混合において線状構造を形成する。そこで、BIACORE による SPR 解析を用いて SOR ナノレゴの伸長体形成について、接着素子 1 分子間の結合と比較観察した。接着素子 1 分子間の結合においては、結合後の速やかな解離が観察された。SOR ナノレゴでは、固定化したナノレゴに対するもう一方のナノレゴは結合後の解離遅延が観察された。これは、SOR ナノレゴ 1 分子に対して 2 ヶ所の接着素子が結合に預かっているためであると判断した。次に SOR ナノレゴを順次添加し、更なる伸長反応を実施した結果、固定化した分子に会合していた SOR ナノレゴが遊離する様子が観察された。SOR ナノレゴの添加濃度を変化させたところ、添加濃度が低下するにつれて遊離効果が減少することから、可逆性を伴う濃度依存的な結合特性に起因することが明らかとなった。よって、固定化分子からの SOR ナノレゴの伸長化には、分子間の多点結合による安定化以外に、結合が不可逆的となるような接着素子の改変が必要であると判断された。現在、アミノ酸点突然変位導入によって解離抑制が可能な PDZ ドメイン及び PDZ 結合ペプチドの利用、又は Ca^{2+} で結合安定性を制御できる Dockerin-Cohesin 相互作用を利用することより、伸長化が達成できるかについて検討中である。



4) 多項からなるナノレゴ素子候補の諸性質の解明 (理研グループ)

多項からなるナノレゴ素子候補として、SMN(survival motor neuron)タンパク質複合体をモデルにして解析を行った。この複合体は RNA splicing に必須である snRNP 生成に関わっている。Gemin2-SMN 相互作用において新規の相互作用である Gemin2 間相互作用が SMN タンパク質間のアミノ末側の相互作用の安定化に寄与すること、この作用が複合体オリゴマーの安定化に寄与すること、複合体のオリゴマー化が snRNP 生成に重要であることを示した。さらに神経疾患である SMA を発症する変異 SMN タンパク質のひとつにおいて、Gemin2-SMN 間の相互作用が減弱していることを発見し、この変異 SMN タンパク質による SMA 発症機構を示唆する結果を得た。上記の内容の論文を完了した。

5) レゴ素子対間相互作用力の実測と PPI 諸特性の理解の強化 (九大グループ)

レゴ素子間結合強度の分子構造的基礎の理解の強化および分子構造設計からの結合強度制御の基礎指針の確立を目的とし、ナノレゴ結合素子対として選定された PDZ タンパク質 TIP-1 およびその認識ペプチド (PDZ-pep) 間の相互作用力の精密解析の総仕上げとして、PDZ 認識ペプチドのアミノ酸残基配列改変による素子間結合力・平衡定数・速度論定数への影響の系統的解析を完了させた。特に、それらリガンド・レセプター対間相互作用の Dynamic Force Spectroscopy 解析を新たに取り入れ、TIP-1/PDZ-pep 間相互作用のエネルギーランドスケープ情報を明らかにした。レゴ素子間の結合強度の設定・選択を行う上では、エネルギーランドスケープ上でどの結合・解離経路へ誘導するかが本質的であり、その具体的な調節はタンパク質の立体構造およびナノレゴ集合体内での立体配置に依存することを明確にした。結果について論文を完了した。

6) ナノレゴタンパク質の自発的秩序集合体の形成と構造解析 (九大グループ)

開発されたナノレゴ分子 SOR fusions および CutA fusions について、その秩序集合体の構築および構造解析法の確立を検討した。各々のナノレゴ分子の構造と相互作用特性を踏まえ、SOR fusions については鎖状集合体の形成 (一次元秩序構造体) とその鎖長制御の方

法論・条件の探索を行った。CutA fusions については、気液界面上での単分子膜形成を活用し膜状集合体（二次元秩序構造体）の構築を検討した。タンパク質一分子レベルでの可視化を行うにあたり、タンパク質の透過電子顕微鏡観察の新技法を工夫することにより、再現性が良く安定した観察像の取得が可能となりつつある。また、気液界面を活用した膜状秩序集合体の構築技法についても、タンパク質の変成防止脂質膜と下層グルコース溶液を導入することで、安定した膜構造構築の基礎を確立した。

7) ナノレゴタンパク質の応用研究（金沢工大グループ）

ナノレゴタンパク質の直接的な応用としてハイドロゲル（三次元集合体）の作製が考えられ、既に予備試験においてゲル状物質の形成に成功している。この研究を本格的に進めるべく、ナノレゴタンパク質と多官能性架橋高分子とのハイブリッド型ハイドロゲルの作製を試みている。具体的には、PDZ タンパク質 TIP-1 を組み込んだ CutA（3量体）と PDZ 認識ペプチドを末端にマレイミド・チオール間結合したポリエチレングリコール（線状および分岐体）を水溶液中で混合して自発的にゲル形成させるものである。ゲル形成の過程の粘弾性変化の測定を行いつつある。また、CutA 部分に細胞接着 motif である RGD ペプチドを組み込み、その細胞接着能を検討した。フィブロネクチンと比べると低い接着能であったが、RGD 組み込みによって接着能が増大した。

3. 研究実施体制

(1) 理化学研究所グループ

① 研究者名

林崎 良英（理化学研究所 主任研究員）

② 研究項目

- ・ ナノレゴタンパク質の設計および作製とそれを用いた新規構造体の創製

概要：接着素子と骨格素子の組み合わせからなるナノレゴを設計し、発現精製する。

これを用いて新規構造体の創製を行い、マクロレベルでの解析を行う。伸長が完全制御可能なナノレゴの創製のため、コンピュータシミュレーションによるナノレゴ（素子）の改変設計をおこなう。作製したナノレゴ一部は九大グループに提供し、TEM、AFMなどの1分子レベルの解析を行うとともに、九大での新規構造体創製に供する。

(2) 九州大学グループ

① 研究者名

木戸 秋悟（九州大学先導物質化学研究所分子集積化学部門生命分子化学分野 教授）

② 研究項目

- ・ ナノレゴタンパク質の自発的秩序集合体の形成と構造解析

概要：ナノレゴ素子の候補対について、原子間力顕微鏡法を用いた1分子レベルでの相互作用力の精密決定およびDynamic Force Spectroscopy解析を行うことにより、レゴ素子間相互作用のエネルギーランドスケープ情報を明らかにし

た。また、ナノレゴ分子集合体の鎖状構造体および膜状構造体の構築条件と手法を検討するとともに、主として透過型電子顕微鏡を活用してそれら集合体の微細構造をタンパク質 1 分子レベルでの分解能での観察を行った。

(3) 金沢工業大学グループ

①研究者名

松田 武久 (金沢工業大学ゲノム生物工学研究所 教授)

②研究項目

- ・ ナノレゴの医療応用

概要：ナノレゴの結合素子を水溶性合成高分子と化学接合させることによって、リガンド-レセプター結合の三次元的ネットワークによる自発的ゲルを形成させる。細胞包埋実験等を行い、有用性を評価する。

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Alistair Forrest, Darrin Taylor, Mark Crowe, Alistair Chalk, Nic Waddell, Gabriel Kolle, Geoffrey Faulkner, Rimantas Kodzius, Shintaro Katayama, Christine Wells, Chikatoshi Kai, Jun Kawai, Piero Carninci, Yoshihide Hayashizaki, Sean Grimmond, Genome wide review of transcriptional complexity in mouse protein kinases and phosphatases, *Genome Biology*, 7, R5 (2006).
- Martin C Frith, Alistair R Forrest, Ehsan Nourbakhsh, Chikatoshi Kai, Jun Kawai, Piero Carninci, Yoshihide Hayashizaki, Timothy L Bailey, Sean M Grimmond. The Abundance of Short Proteins in the Mammalian Proteome. *PLoS Genetics*. 2006 Apr;2(4):e52.
- Melissa J. Davis, Kelly A. Hanson, Francis Clark, J. Lynn Fink, Fasheng Zhang, Takeya Kasukawa, Chikatoshi Kai, Jun Kawai, Piero Carninci, Yoshihide Hayashizaki, Rohan D. Teasdale. Differential Use of Signal Peptides and Membrane Domains Is a Common Occurrence in the Protein Output of Transcriptional Units. *PLoS Genetics*. 2006 Apr;2(4):e29.
- Aturaliya RN, Fink JL, Davis MJ, Teasdale MS, Hanson KA, Miranda KC, Forrest AR, Grimmond SM, Suzuki H, Kanamori M, Kai C, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Teasdale RD. Subcellular localization of mammalian type II membrane proteins. *Traffic*. 2006 May;7(5):613-25.
- Masayoshi Itoh, Ayako Yasunishi, Kengo Imamura, Mutsumi Kanamori, Harukazu Suzuki, Masanori Suzuki, Piero Carninci, Jun Kawai, Yoshihide Hayashizaki, Constructing ORFeome resources with removable termination codons, *BioTechniques* 41(1) 44-48, 6th July (2006). *PMID*: 16869512
- Harukazu Suzuki, Protein-protein interactions in the mammalian brain, *The Journal of*

Physiology, 575(Pt 2): 373-7, Epub 13th July (2006). PMID: 16840513.

- Chihiro Ogawa, Kengo Usui, Makoto Aoki, Fuyu Ito, Masayoshi Itoh, Chikatoshi Kai, Mutsumi Kanamori-Katayama, Yoshihide Hayashizaki, Harukazu Suzuki, Gemin2 plays an important role for stabilization of the SMN complex, Journal of Biological Chemistry, 2007, Feb, 16
- Tei Maki, Satoru Kidoaki, Kengo Usui, Harukazu Suzuki, Masayoshi Ito, Fuyu Ito Yoshihide Hayashizaki, Takehisa Matsuda, Dynamic force spectrometry of the specific interaction between PDZ-domain and its redobnition peptides, Langmuir, 2007, Feb, 27 27;23(5).

(2) 特許出願

平成18年度特許出願:0件(CREST 研究期間累積件数:2件)