

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

蛋白質ナノチューブを用いたバイオ超分子の創製

### 2. 氏名

小松 晃之

### 3. 研究のねらい

生命現象の根幹を支配し、多彩な機能をつかさどる蛋白質は、生物進化により創り出された究極の超構造体である。その蛋白質を機能材料創製の基本ユニットとして用いる戦略は、合理的分子設計の一つであり、バイオナノテクノロジーのフロンティアといえる。本研究では、蛋白質や人工的に合成した蛋白質変異体を所望の序列で階層的に組織化する方法により、中空シリンダー構造のナノチューブを構築し、その管壁や一次元内孔空間を利用した新しい機能の創出、さらにはそれらを用いたバイオ超分子の創製を目的とした。構造明確な蛋白質組織体では、個々の蛋白質が持っている高度な機能を三次元幾何学空間と協奏させた機能発現に拡張できる可能性がある。

### 4. 研究成果

#### 1) 機能性アルブミンの創製

ヒト血清アルブミン(HSA)は血漿蛋白質の約 60%を占める補欠分子族を持たない単純蛋白質(Mw: 66,500)であり、血流中では膠質浸透圧維持のほか、各種内因性・外因性物質(脂肪酸、ビリルビン、金属イオン、薬物)の運搬・貯蔵、pH緩衝作用などの役割を担っている。先ずナノチューブの素材となり得るユニークな機能性アルブミンの開発を行った。生体内でヘモグロビン(Hb)から解離した鉄プロトポルフィリン(ヘム)は HSA に捕捉され、肝臓へと運ばれる。ヘムは HSA のサブドメイン IB にチロシン(Tyr)-161 との軸配位を介して結合するが(図 1(A))、面白いことに軸配位子をヒスチジン(His)に変換すると、酸素を可逆的に吸脱着できる人工ヘム蛋白質となる。しかし、その酸素親和性は Hb に比べ遙かに低い。部位特異的アミノ酸置換によるヘムポケット空間の構造制御により、30 種類を超える組換え HSA(rHSA)-ヘム錯体を合成し、Hb やヒト赤血球と同じ酸素親和性を有する一群の酸素輸送アルブミンを創製した(図 1(B))。本来、補欠分子族すら持たない単純蛋白質の HSA に、Hb のような酸素結合能を付与することに成功した成果は、医学・薬学領域からも多くの注目を集めている。

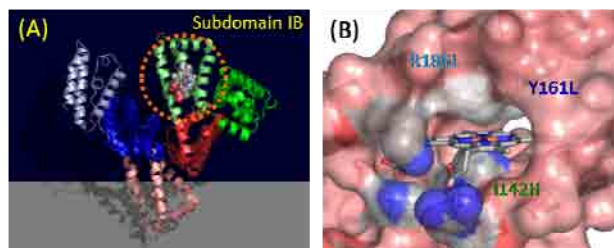


図 1. アルブミン-ヘム錯体とそのサブドメイン IB に構築された人工ヘムポケット(三重変位構造空間)に結合したヘム。

一方、ヘムの中心金属を亜鉛に置換した亜鉛プロトポルフィリン(ZnPP)も、HSA のサブドメイン

IB に結合する。HSA-ZnPP 錯体が水の光還元による水素発生反応の増感剤として作用することを見出した。また、HSA-フラレーン錯体が一重項酸素生成の光増感剤として、腫瘍光線力学療法に有効であることも明らかにした。多分子結合能のみならず、高い水溶性、光や熱に対する安定性といった血漿蛋白質アルブミンならではの特徴が、これら新物質系において、重要な役割を果たしている。

## 2) アルブミンナノチューブの創製と分子捕捉

機能デザイン可能なアルブミンをビルディングブロックとして、構造明確な中空管を創るプロセスへと研究を展開した。ナノチューブ構造の最大の魅力は、内孔・管壁・外表面にそれぞれ所望の蛋白質を配置することによって、様々な機能を付与できる点にある。これらの特徴を組み合わせることにより、新しい医薬品、捕捉・分離剤、触媒、ナリアクターとしての応用が期待される。多孔性ポリカーボネート(PC)膜の内孔表面にHSAと高分子電解質[例:ポリ-L-アルギニン(PLA)]の交互積層(Layer-by-Layer)膜を作成し、最後にテンプレートを溶解除去する方法(鋳型内交互積層法)により、HSAからなる均一で柔軟なナノチューブが合成できることを見出した。孔径400 nmのPC膜を用いて調製した(PLA/HSA)<sub>3</sub>ナノチューブ(計6層構造)の外径は407±10 nm、管壁厚は50±4 nm、長さはテンプレートの厚みに依存して最大9 μmであった(図2(A))。チューブの外径は使用するテンプレートの孔径サイズを変えることで精密に制御可能。水中では管壁が膨潤するため、チューブの内径は約200 nmまで減少した(図2(B))。

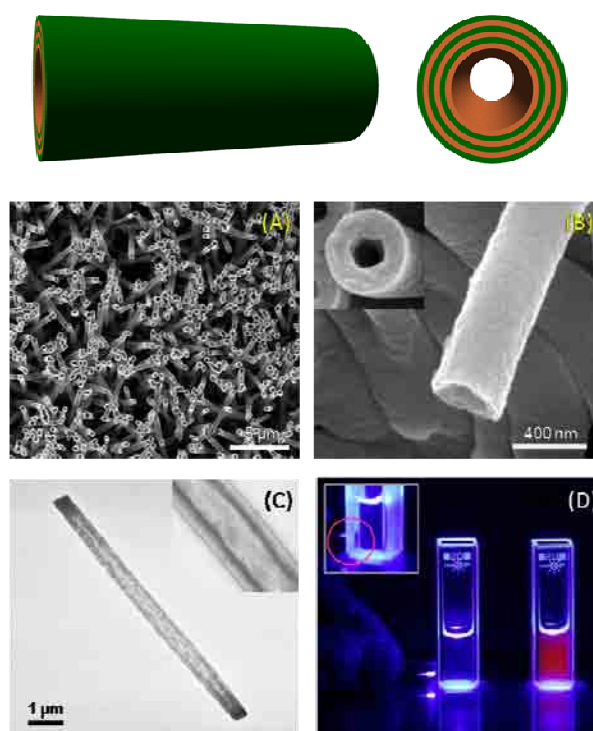


図2. アルブミンナノチューブのSEM像[(A)乾燥状態、(B)膨潤状態]と(C)TEM像。(D)ZnPP捕捉ナノチューブの磁力による捕捉。

TEM観察において、ウラニルイオンがナノチューブを鮮明に染色する現象に気がつき(図2(C))、ナノチューブの分子捕捉能を系統的に評価したところ、予想通り、シアニン系色素、ヘム、ZnPPなど、HSAのリガンド分子は管壁内のHSA層に効率よく捕捉された。サブドメインIBにHisを変異導入したrHSAで調製したナノチューブのZnPP捕捉率はさらに高く(95%以上)、これはrHSAとZnPPの強い結合( $K = 1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ )に起因する。予めZnPPを捕捉させたナノチューブの水溶液にミリスチン酸を添加すると、リガンド交換反応が起こり、ZnPPが水中へ放出されることもわかった。HSAの

構造制御による分子捕捉能の向上、pH変化を必要としない分子放出などが達成できた。

また、階層成分としてマグネタイトを組み込んだ HSA ナノチューブは、分子捕捉能を保持したまま、磁力により簡単に捕集することが可能であった(図 2(D))。

### 3) 一次元内孔空間を利用した分子捕捉とバイオ超分子

蛋白質ナノチューブの魅力は、管内に広がるオープンエンドな一次元微小空間の活用にある。チューブ内孔に標的とする分子を効率よく取り込む仕掛けとして、ナノチューブの最内層にアビジンを配置した。アビジンはビオチン化合物を強く結合( $K \approx 10^{15} \text{ M}^{-1}$ )する卵白由来の糖蛋白質である。期待通り、溶液中に添加した蛍光標識ビオチンは、ナノチューブの内孔表面を構成するアビジン層に捕捉された。この高い反応性を利用することにより、ビオチン修飾ナノビーズ(粒径 100 nm)をサイズ選択的にチューブの中(内径:約 200 nm)へ取り込ませることができた(図 3(A))。さらに、これを生体分子へ応用すると、例えば球状ウイルスの捕捉が可能となる。ヒトB型肝炎ウイルス(HBV、径 42 nm)の表面抗原(HBs抗原)の抗体、すなわち抗HBs抗体を最内層に配置したナノチューブを作成した。階層成分として抗体を導入した場合でも均一なナノチューブが得られる。HBs抗原を含む水溶液に抗体ナノチューブを添加すると、抗原量は 10%以下まで減少した。

また、最内層に  $\alpha$ -グルコシダーゼ( $\alpha$ -GluD、Mw: 68,500)などの酵素を担持させたナノチューブの微小内孔空間では、酵素反応が進行した。溶液中の  $\alpha$ -GluD に比べると非競合的阻害を受けるため活性は低下するが、反応溶液からナノチューブのみを遠心分離または磁場印加により除くことで、反応生成物を簡単に単離することができた。

一方、生体内で鉄イオンの捕捉・貯蔵の役割を担う球殻状蛋白質フェリチン(Mw: 460,000)でナノチューブ(外径 400 nm)を調製し、蛋白質殻成分を焼成すると、酸化鉄( $\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )からなるナノチューブ(外径 200 nm)が得られた(図 3(B))。このナノチューブは高い光触媒活性を示す。4-クロロフェノールの光分解反応では、市販の酸化鉄粒子(粒径:約 400 nm)を用いた場合に比べて反応速度は格段に増大した。これは、ナノチューブの比表面積が酸化鉄粒子より約 7 倍大きいことに起因する。センサー、磁性材料などの応用はもちろん、フェリチン内部の金属置換により、様々な金属酸化物ナノチューブを合成することができる。

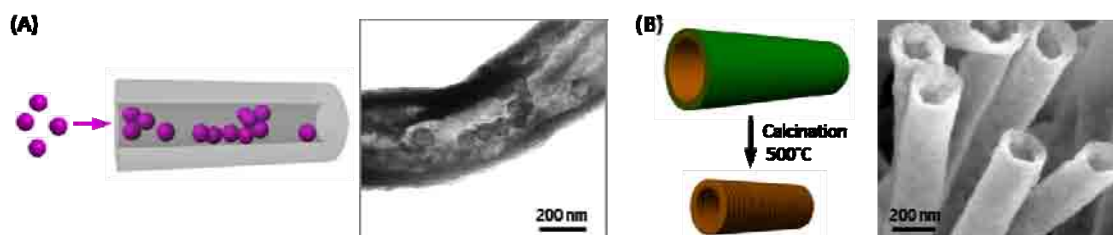


図 3. (A) 一次元内孔空間にビオチン修飾ナノビーズを捕捉したアビジンナノチューブの TEM 像。(B) フェリチンナノチューブを焼成して得た酸化鉄ナノチューブの SEM 像。

## 5. 自己評価

本研究では、蛋白質を階層的に組織化する方法により、一群のナノチューブを構築し、三次元構造と相関させた機能発現を示すことができた。まずは、ナノチューブの素材となり得る機能性アルブミンの開発を実施した。その結果、酸素結合能や光増感能を持った人工 HSA を合成することに成功した。並行して、蛋白質を中空シリンダー状に組織化する方法の開拓に着手したが、基礎データも充分にない状況からのスタートであったため、手探り状態の試行錯誤が続いた。酸化アルミナ膜の利用や架橋による安定化などに多くの時間を費やした末、ようやく多孔性 PC 膜を使用した調製法を確立し、ナノチューブの構造解析、機能評価のステージへ進むことができた。最終的には、管壁を活用した可逆的な分子捕捉や空間サイズによる選択的分子包接など、当初目標としていた機能を具体化することに成功した。本方法論は、蛋白質のみならず他の生体分子にも広く適用できるので、新しいバイオナノ構造体の分子設計に新たな指針を与えるものと確信している。

一方、構造設計の自由度が高く、応用研究に発展させやすいテーマであったが、基礎科学の粋を出た革新的応用技術の創出という点では、今後の課題となった。現在、本研究で得られた知見を足懸かりとして、バイオ領域での応用、機能分子デバイスの開発に踏み込んでいる。

## 6. 研究総括の見解

タンパク質のアルブミンを所望の序列で階層的に組織化する方法により、中空シリンダー構造のナノチューブを構築し、その管壁や一次元内孔空間を利用した新しい機能の創出、さらにはそれらを用いたバイオ超分子の創製を目的とした研究である。アルブミンのナノチューブの管壁を活用した可逆的な分子捕捉や空間サイズによる選択的分子包接など、目標としていた機能のいくつかを具体化した。ここで確立した手法は、蛋白質のみならず他の生体分子にも広く適用できるので、新しいバイオナノ構造体の設計と創製への展開を期待する。

## 7. 研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- 1) T. Komatsu, R.-M. Wang, P. A. Zunszain, S. Curry, E. Tsuchida, "Photosensitized Reduction of Water to Hydrogen using Human Serum Albumin Complexed with Zinc Protoporphyrin IX", *J. Am. Chem. Soc.* 128 (50), 16297–16301 (2006).
- 2) G. Lu, T. Komatsu, E. Tsuchida, "Artificial Hemoprotein Nanotubes", *Chem. Commun.* (28), 2980–2982 (2007). [Highlighted in *Chem. Sci.*]
- 3) T. Komatsu, A. Nakagawa, P. A. Zunszain, S. Curry, E. Tsuchida, "Genetic Engineering of the Heme Pocket in Human Serum Albumin: Modulation of O<sub>2</sub> Binding of Iron Protoporphyrin IX by Variation of Distal Amino Acids", *J. Am. Chem. Soc.* 129 (36), 11286–11295 (2007).
- 4) X. Qu, G. Lu, E. Tsuchida, T. Komatsu, "Protein Nanotubes Comprised of an Alternate Layer-by-Layer Assembly using a Polycation as an Electrostatic Glue", *Chem. Eur. J.* 14 (33), 10303–10308 (2008).
- 5) X. Qu, T. Komatsu, "Molecular Capture in Protein Nanotubes", *ACS Nano* 4 (1), 563–573 (2010). [Highlighted in *Nanowerk*]

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 2 件

- 1) 発明者: 小松晃之、土田英俊、中川晶人  
発明の名称: 組換えヒト血清アルブミン-金属ポルフィリン錯体と人工酸素運搬体  
出願人: 科学技術振興機構

出願日:2008年4月24日

2) 発明者:小松晃之、土田英俊

発明の名称:蛋白質積層構造体とその製造方法

出願人:科学技術振興機構

出願日:2008年4月24日

(3) 著書

1) 小松晃之、“交互積層法による蛋白質ナノチューブの合成”、*有機・無機・金属ナノチューブ-非カーボンナノチューブ系の最新技術と応用展開*、清水敏美、木島剛編、p. 82-88、フロンティア出版(東京, 2008)(分担執筆)

(4) 学会発表

【国際】

1) G. Lu, T. Komatsu, E. Tsuchida, “O<sub>2</sub>-Binding Nanotubes Made of Human Serum Albumin Incorporating Synthetic Heme”, 12<sup>th</sup> International Symposium on Macro-Molecular Complexes (MMC-12), Fukuoka, 27-31 August 2007.

2) T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida, “Genetic Engineering of the Heme Pocket in Human Serum Albumin: Modulation of O<sub>2</sub> Binding of Iron Protoporphyrin IX”, 9<sup>th</sup> International Symposium on Polymers for Advanced Technologies (PAT-9), Shanghai (China), 22-25 October 2007.

3) A. Nakagawa, T. Komatsu, E. Tsuchida, “O<sub>2</sub> Binding Properties of Recombinant Albumin-Heme Complexes Having Arginine at the Entrance of the Heme Pocket” 6<sup>th</sup> Current Issues on Blood Substitute Research, Tokyo, 24-25 October 2008.

4) T. Komatsu, X. Qu, “Protein Nanotubes: Synthesis, Structure and Molecular Capturing Ability”, 13<sup>th</sup> International Symposium on Macro-Molecular Complexes (MMC-13), Concepcion (Chile), 15-18 November 2009.

【国内】

1) 中川晶人、小松晃之、土田英俊 “組換えヒト血清アルブミン-プロトヘム複合体のヘムポケット構造と酸素結合能” 第56回高分子学会年次大会、京都、2007年5月

2) 小松晃之、屈雪、盧剛、土田英俊 “蛋白質ナノチューブの合成と構造制御(依頼講演)” 第57回高分子学会年次大会、横浜、2008年5月

3) 屈雪、小松晃之、土田英俊 “蛋白質ナノチューブの鑄型合成とその特徴” 第57回高分子討論会、大阪、2008年9月

4) 小松晃之、屈雪、土田英俊、堀之内宏久、小林紘一 “アルブミン-フラレン錯体の光物性と細胞毒性” 第15回日本血液代替物学会年次大会、東京、2008年10月

5) 小松晃之、屈雪 “蛋白質ナノチューブの構造制御と分子捕捉” 第58回高分子討論会、熊本、2009年9月(依頼講演)

(5) 招待講演

1) T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida, “Genetically Engineered Hemepocket in Human Serum Albumin: Modulation of O<sub>2</sub> Binding to Iron Protoporphyrin IX”, 12<sup>th</sup> International Symposium on Macro-Molecular Complexes (MMC-12), Fukuoka, 27-31 August 2007.

2) 小松晃之、“アルブミンを用いた機能蛋白質の創製とバイオナノチューブの構築”、第56回高分子討論会、名古屋、2007年9月

3) T. Komatsu, “Albumin-Heme Complexes: Heme Pocket Architecture for Modulation of Oxygen-Binding Property”, International Symposium on Development of Albumins with New Functions and Clinical Applications, Kumamoto, 30 October-1 November 2008.

4) T. Komatsu, X. Qu, “Protein Nanotubes for Biomolecular Separation”, IUPAC 5<sup>th</sup> International Symposium on Novel Materials and their Synthesis (NMS-5) & 19<sup>th</sup> International Symposium on Fine Chemistry and Functional Polymers (FCFP-XIX), Shanghai (China), 18-22 October (2009).

5) 小松晃之、“血漿蛋白質を用いた機能分子・材料の創製”、日本学術振興会分子ナノテクノロジー第174委員会第31回研究会、東京、2009年12月