

人工タンパク質ナノ粒子を素材とした 刺激応答性材料の開発

2024 年度

那須 英里圭

学位論文 博士（理学）

人工タンパク質ナノ粒子を素材とした
刺激応答性材料の開発

2024 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

那須 英里圭

目次

第1章 序論

1-1 タンパク質ナノケージ.....	1
1-2 天然タンパク質ナノケージ.....	1
1-3 人工タンパク質ナノケージ.....	6
1-4 タンパク質ナノケージの表面修飾による機能化.....	8
1-5 本論文の構成.....	9

第2章 TIP60 の内外表面修飾による酸化還元応答性ナノキャリアとしての機能化

2-1 緒言.....	11
2-2 外部からの物質の取り込みにおける TIP60 表面孔のフィルター効果の検証.....	13
2-3 TIP60 表面孔を利用した内外表面のヘテロ修飾.....	19
2-4 結言.....	26
2-5 実験方法.....	27

第3章 TIP60 を超分子架橋剤とした刺激応答性ハイドロゲルの構築

3-1 緒言.....	30
3-2 TIP60 の大量精製系の構築.....	31
3-3 TIP60 を用いたハイドロゲル形成.....	44
3-4 TIP60 ゲルの熱応答性ゾルゲル転移の検証.....	46
3-5 TIP60 ゲルを用いた酸化還元に応答した化合物放出の検討.....	62
3-6 結言.....	66
3-7 実験方法.....	67

第4章 結論.....72

参考文献.....	75
-----------	----

謝辞

第1章 序論

1-1 タンパク質ナノケージ

タンパク質は複数のアミノ酸が重合してできる高分子であり、生体組織の構造、骨格の維持や運動の制御、生体内で起こる化学反応の触媒、物質の輸送や貯蔵など様々な機能を担う。タンパク質の中には、複数の分子が非共有結合的な相互作用により会合することでより大きな秩序構造体を形成するものが存在し、それらはタンパク質超分子と呼ばれる¹。このような自己組織化による原子レベルで均質な構造体の形成に加えて、生分解性、生体適合性を有し、遺伝的・化学的修飾による機能化が可能であるといった特徴から、近年タンパク質は材料構築のためのビルディングブロックとしても注目されている^{2,3}。

タンパク質が作り出す超分子構造のうち、タンパク質の殻によって外部から隔てられた内部空間を有する粒子はタンパク質ナノケージと呼ばれる⁴。その多くは表面にケージの内外を繋ぐ孔を有し、外部と物質のやり取りを行うことが可能である。こうしたタンパク質ナノケージの内部空間を利用して、(1) 無機ナノ粒子や有機ポリマーなどのナノ材料の合成においてサイズを制御するための合成場⁵⁻¹¹、(2) 金属触媒や有機金属複合体、酵素を内包したナノリアクターとしての利用¹²⁻¹⁵、(3) 薬剤や生理活性物質などの機能性分子を内包し輸送するためのナノキャリア^{16,17}、(4) 内包分子を保護する分子コンテナ^{18,19}などとしての機能化が検討されてきた。また、タンパク質ナノケージは、一次元、二次元、三次元に集積することでポリマーや膜、格子といったより大きな材料を構築するためのビルディングブロックとしての利用も検討されている²⁰⁻²⁴。

1-2 天然タンパク質ナノケージ

タンパク質ナノケージの利用可能性は、主に天然に存在するタンパク質ナノケージの人工的な機能化によって検討されてきた (図 1-1, 表 1-1)。

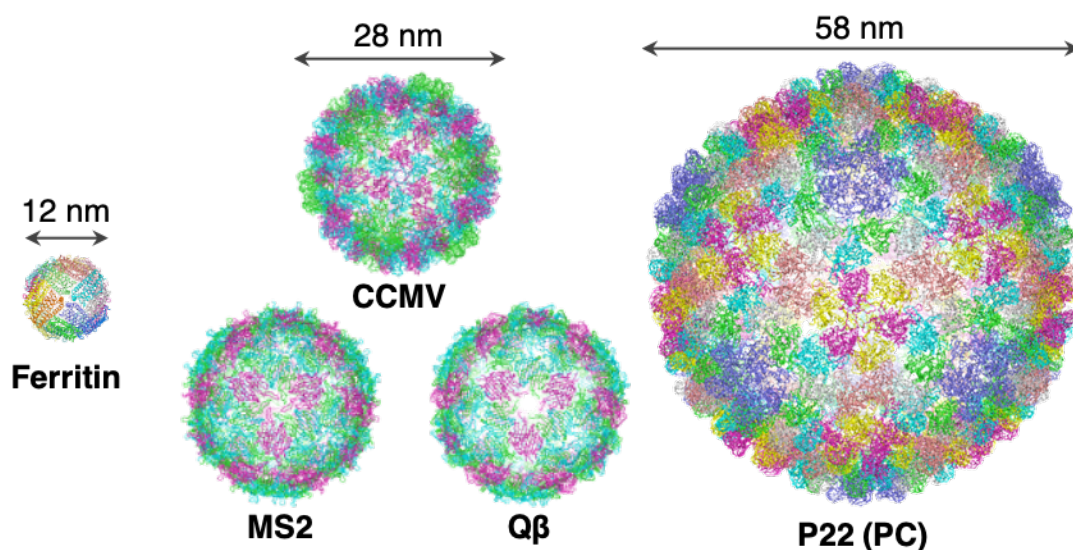


図 1-1. 天然タンパク質ナノケージの例。

Ferritin (PDB: 1mfr)、CCMV (PDB: 1cwp)、MS2 (PDB: 2ms2)、Qβ (PDB: 1qbe)、P22 (PC) (PDB: 2xyy)。

中でも最もよく研究されるものの 1 つにフェリチンが挙げられる²⁵⁻²⁷。フェリチンは、24 個のサブユニットの自己組織化によってできる外径 12 nm、内径 8 nm の球状粒子であり、8 個の 3 回対称軸と 6 個の 4 回対称軸部分に直径 0.3~0.5 nm の孔が存在する。フェリチンは天然にはその 3 回対称チャネルから鉄イオンを取り込み、酸化鉄として貯蔵する鉄貯蔵タンパク質として機能する。フェリチンは、幅広い pH、高温、変性剤に対して耐性のある安定な構造である。フェリチンから酸化鉄を除去したアポフェリチンは、異種物質の内包に利用されてきた。このとき、フェリチン表面の孔は金属イオンや小さな有機化合物の取り込みに利用できるが、多くの場合フェリチンに存在する孔は小さいため取り込み可能な物質は制限される²⁸。フェリチンの孔は尿素やグアニジン塩酸塩の添加、加熱、静水圧によって拡大することが示唆されており、これらを利用した取り込み効率の改善が検討された²⁹⁻³¹。また、4 回対称チャネル部分のループを切除することで孔を拡張したフェリチンの構築も試みられた³²。大きな物質を内包するための別のアプローチとして、pH やイオン強度に依存した可逆的な解離・会合

特性が利用される^{24,33-37}。しかし、特に極端な pH での解離会合は完全に可逆的ではなく、低い収率や構造の欠陥が生じることが指摘されている^{37,38}。

ウイルスのキャプシドから核酸を除去したウイルス様粒子 (VLP) も機能化のテンプレートとしてよく利用される天然タンパク質ナノケージである^{39,40}。VLP には直径数十～数百 nm の様々な構造のものが存在する。よく機能化に用いられる VLP として、植物ウイルス cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) やバクテリオファージ MS2、Q β 、P22 などの VLP が挙げられる。CCMV VLP は外径 28 nm、内径 18 nm の粒子である⁴¹。CCMV VLP の内腔には、カチオン性に帯電した N 末端が存在しアニオン性の物質の内包を促進する。CCMV VLP は pH 6.5 以上で膨潤し、準 3 回対称軸に 2 nm の孔が生じる。Douglas らは、この pH に応答した孔の開閉を利用して、CCMV VLP 内腔でのポリオキソメタレート生成とアニオン性ポリマーの内包を報告した⁴²。また、CCMV VLP のケージ構造は pH 7.5 以上で解離し pH 5.0 で再会合するため、これを利用した物質の内包も行われた^{43,44}。CCMV VLP の刺激応答的な構造変化はナノケージの機能化において魅力的な性質であるが、生理的 pH で不安定な構造はその用途を制限する可能性がある⁴⁵。また、低コストで大量発現が可能な宿主としてよく用いられる大腸菌では CCMV VLP が不溶性の封入体を形成しやすいことが知られている⁴⁶。一本鎖 RNA ウイルスである MS2⁴⁷ と Q β ⁴⁸ は、天然にはその殻を形成するコートタンパク質と RNA との相互作用を介して RNA の周りでタンパク質が会合することでゲノムをカプセル化する。この RNA とコートタンパク質の相互作用は、VLP への異種タンパク質の内包にも利用された⁴⁹⁻⁵³。Q β はモノマー間でジスルフィド結合を形成することでキャプシド構造を安定化している。MS2 はモノマーあたり 2 つのシステインが存在し、ジスルフィド結合は形成しないが、キャプシドの内部に埋もれて溶媒へのアクセス性が悪いため反応性は低い⁵⁴。MS2 と Q β はコートタンパク質のみを組み替えタンパク質として発現することでも RNA を含まない VLP を形成させることができる。MS2 VLP と Q β VLP の表面には直径 1.7 nm および 1.4 nm の孔が存在し、この孔を介して物質を取り込むことが可能

である^{55,56}。しかし、これらの VLP は発現精製の過程などで異なる形態のものが形成することも報告されている⁵⁷⁻⁵⁹。二本鎖 DNA ウイルス P22 の VLP は 420 分子のサブユニットからなる直径 58 nm の粒子である。P22 VLP は会合に数百分子の足場タンパク質を必要とし、コートタンパク質と足場タンパク質の相互作用によって会合が促進される。この相互作用を利用し、足場タンパク質に異種タンパク質を融合することで、in vitro あるいは in vivo での会合時に異種タンパク質の内包が可能である⁶⁰。このことから、P22 VLP では特に酵素などのタンパク質の内包が検討されてきた^{61,62}。P22 は、熱や変性剤によって不可逆的に構造変化を起こし、足場タンパク質の放出、粒径の拡大、表面孔のサイズの増減が起こることが知られている^{63,64}。

このように様々な構造、性質を有する天然タンパク質ナノケージが機能化のテンプレートとして利用されてきた。しかし、内部空間や表面孔の大きさ、構造の均質性と安定性、調整の容易さなどの点で応用に適さない場合もある^{32,37,45,65,66}。

表 1-1. 天然タンパク質ナノケージの例

分類	名称	構造 (量体)	外径/内径 (nm)	表面孔径 (nm)	Ref.
鉄貯蔵タンパク質	フェリチン	24	12 / 8	0.3~0.5	27
ウイルス様粒子	CCMV	180	28 / 18	~2 (pH >6.5)	41
	MS2	180	27 / 20	~1.7	47
	Q β	180	28 / 20	~1.4	48
	P22(PC)	420	58 / 47	~3	67
	P22(EX)	420	64 / 55	~2	68
	P22(WB)	360	64 / 55	~10	69
細菌の微小区画	エンカプスリン	60	24 / 22	0.5~0.6	70
		180	32 / 26	~0.6	71
		240	42 / 39	0.2~0.7	72
ピルビン酸脱水素 酵素複合体	E2 サブユニット	60	24 / 12	5	73

1-3 人工タンパク質ナノケージ

より機能化に適した構造や性質を有するタンパク質ナノケージを人工的に構築することができれば、その利用可能性の拡大につながることが期待される。そこで、天然タンパク質ナノケージの機能化と並行して、タンパク質ナノケージの人工的な設計についても研究が進められてきた。2001年に Padilla、Yeats らは天然の多量体タンパク質の有する対称性に着目して、超分子構造体を設計するための一般的な戦略を提唱し、2つの多量体タンパク質のモノマーを適切な二面角になるように硬いリンカーによって繋いだ融合タンパク質の設計によるケージやフィラメント構造の構築を報告した⁷⁴。これまでに、この戦略による様々な形状の人工タンパク質ナノケージの構築が報告されている^{75,76}。また、天然のウイルスキャプシド構造を模倣するペプチド設計⁷⁷、コイルドコイルの相互作用を利用した設計⁷⁸、サブユニット界面への金属配位サイトの導入⁷⁹、計算科学によるタンパク質サブユニット間の相互作用の人工的な設計⁸⁰⁻⁸²など、さまざまな手法が開発されてきた。しかし、研究の主眼は均質なタンパク質ナノケージを構築する設計手法自体にあり、その機能化が検討された例は少なく^{83,84}、天然タンパク質ナノケージにおける課題の克服は行われていなかった。

当研究室では、多面体の幾何学的な性質を利用した融合タンパク質の設計により、人工タンパク質ナノ粒子 TIP60 (Truncated Icosahedral Protein composed of 60-mer fusion proteins) を構築した (図 1-2)^{85,86}。TIP60 は、海洋メタゲノムから単離された五量体タンパク質 LSm⁸⁷ とヒト由来の反平行コイルドコイル二量体タンパク質 MyoX-coil⁸⁸ を融合したタンパク質 (分子量: ~17.8 kDa) が 60 分子自発的に会合してできる直径 22 nm の切頂二十面体型粒子である。融合タンパク質を大腸菌で発現することで、可溶性画分から均質な粒子として精製することができる。TIP60 の鋳型タンパク質はいずれもアニオン性のものを用いているため、TIP60 はアニオン性を帯びた粒子として振る舞い、高い単分散性を示す。TIP60 の内径は約 15 nm であり、酵素などの大きな物質を取り込むにも十分な大きさを有している。また、TIP60 の表面には辺 4 nm の比較的大きな三角形の

孔が 20 箇所存在する。TIP60 の鋳型タンパク質にはシステインが存在しないため、五量体表面に存在するセリン残基をシステイン残基に置換することで TIP60 の内外表面に選択的に化学修飾部位を導入することが可能である (図 1-3)。フルオレセインマレイミドによる修飾実験から、TIP60 内外表面に導入したシステインを化学的に修飾可能であることが示された⁸⁵。この時 TIP60 の内側表面に導入したシステインも修飾を受けたことから、TIP60 が表面の孔を介して内部へ小分子化合物を取り込めることが示唆された。TIP60 の表面孔は 1 辺 4 nm の三角形状であり、その内接円の直径は約 2.3 nm と比較的大きいことから、TIP60 はケージ構造を解離させることなく、ポリマーやタンパク質といった比較的大きな分子を内包可能であることが期待された。このように、容易な発現精製、高い均質性、広い内部空間、大きな表面孔といった構造・性質を有している人工タンパク質ナノケージ TIP60 は機能化のテンプレートとして適していると考えられる。

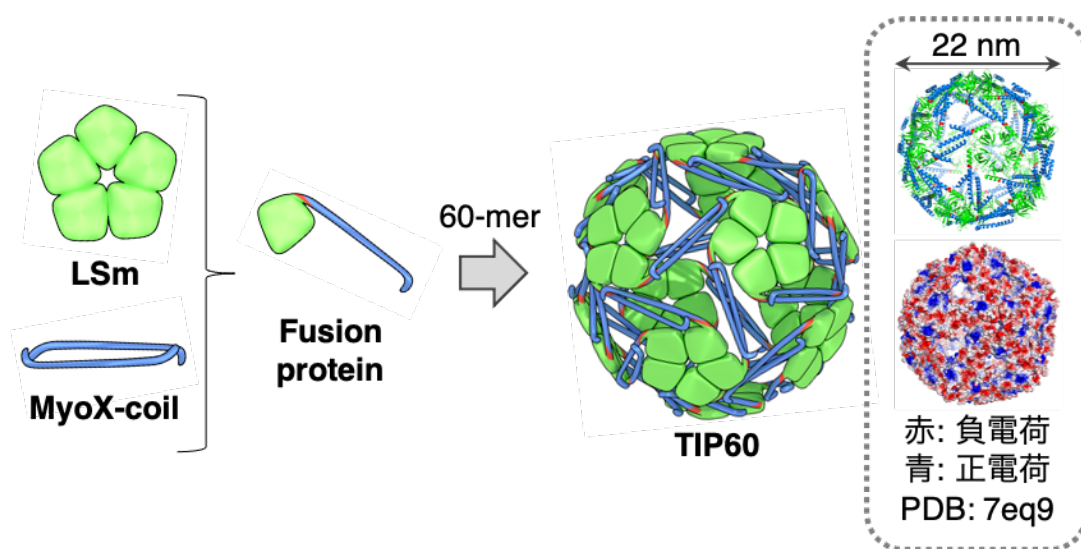


図 1-2. 人工タンパク質ナノ粒子 TIP60 の設計と構造。

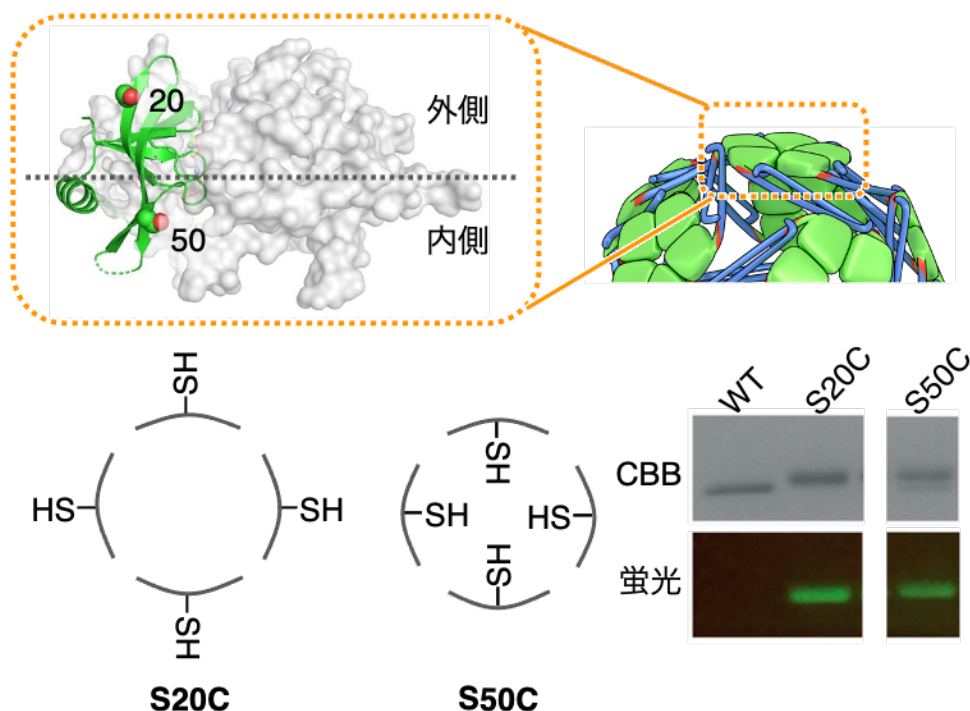


図 1-3. (上段) LSm を横から見た図。モノマーの 1 つをカートゥーンモデルで示し、20 番目と 50 番目のセリン残基を球モデルで示した。(下段) TIP60 シス테인変異体の模式図 (TIP60 変異体のシス테인残基の一部を図示) とフルオレセインマレイミドによる修飾実験の結果。⁸⁵

1-4 タンパク質ナノケージの表面修飾による機能化

遺伝的・化学的修飾による機能改変は、実用化におけるタンパク質の利点の 1 つである。タンパク質ナノケージの内側表面、外側表面、界面という 3 つの部位を修飾することで、目的に応じたタンパク質ナノケージの機能改変が検討されてきた⁸⁹。

遺伝的修飾には変異導入によるアミノ酸の改変や、異種タンパク質の遺伝的な融合が挙げられる。例えば、ケージの内側にカチオン性アミノ酸を導入することで核酸の内包率を向上させるというように、変異導入によってタンパク質表面の性質を改変し内包分子との相互作用を導入することで内包効率を向上させることができる⁸⁴。また、変異導入によってタンパク質ナノケージの刺激に応答

した会合・解離特性の調整や、形成されるケージ構造の大きさの調整なども行われた⁹⁰⁻⁹³。他にも、タンパク質サブユニットがナノケージの内側あるいは外側に向いた末端を有する場合、その末端に異種タンパク質を遺伝的に融合することで、ナノケージの内側あるいは外側に選択的にタンパク質やペプチドを提示することが可能である^{13,43,94,95}。一方で、変異導入や遺伝的なタンパク質の融合はケージ構造の不安定化を引き起こすこともある³²。

化学修飾では、タンパク質を発現した後でケージの組み立てとは独立して修飾を行うことが可能であり、ポリマーや金属錯体、蛍光色素、糖鎖、薬剤など、遺伝的な修飾と比較して多様な物質を修飾することができる^{26,50,55,95-102}。タンパク質の化学修飾法としては、リジンや N 末端のアミン、システイン、グルタミン酸や C 末端のカルボン酸、チロシンやトリプトファン、ヒスチジンなどを標的とした反応が開発されているが、特にリジンや N 末端のアミンとシステインのチオールを標的とした修飾がよく確立された手法として広く用いられている¹⁰³。システインの修飾では、ジスルフィド結合のように可逆的な修飾を利用して刺激に応答した化合物放出能を付与することも可能である^{104,105}。しかし、修飾の標的としてよく利用されるこれらのアミノ酸はもともとタンパク質ナノケージの内外に広く分布していることが多く、修飾部位や量を制御するために利用可能なアミノ酸が限定されるという点は課題である。これを克服するため、先行研究では非天然アミノ酸の導入なども検討された^{55,106}。

本研究では、すでに TIP60 システイン変異体の化学修飾により TIP60 の内外表面を修飾できることが明らかになっていたことから、TIP60 の機能化手法として化学修飾に着目した。

1-5 本論文の構成

第 1 章では、本研究の背景および目的を述べた。本研究では、人工タンパク質ナノケージ TIP60 が、容易な発現精製、高い均質性、広い内部空間、大きな表面孔などの機能化に適した構造・性質を有することに着目し、その機能化を通じて

天然タンパク質ナノケージでは検討されていないタンパク質ナノケージの利用可能性を提案することを目的とした。先行研究で TIP60 の内外に導入したシステインを化学修飾可能であったことから、特に化学修飾による機能化を検討した。

第 2 章では、TIP60 の表面孔からの物質の取り込みを利用したタンパク質ナノケージ内外のヘテロ修飾系を構築した。天然タンパク質ナノケージを用いた先行研究から、タンパク質ナノケージ表面の孔は物質をサイズ依存的に取り込むフィルターとして機能することが期待される^{28,66,107}。そこでまず、分子量の異なるポリマーを用いた TIP60 内側表面の化学修飾により、TIP60 が孔から取り込み可能な分子の大きさの評価を試みた。さらに、この結果をもとに TIP60 内外に導入したシステインを異なる化合物で修飾しわけけるヘテロ修飾系を構築し、酸化還元応答性ナノキャリアとしての TIP60 の機能化を検討した。

第 3 章では、第 2 章で行った TIP60 外側表面のポリマー修飾から着想を得て、TIP60 粒子同士をポリマーで架橋することによるハイドロゲルの構築を行った。そして、サブユニット間の非共有結合によって形成される超分子である TIP60 をハイドロゲルの刺激応答性架橋点として利用できるのではないかと考え、これを検討した。ハイドロゲルの形成には多量のタンパク質を必要とすることから、ゲル形成の検討に先立ち、まず TIP60 の大量精製系の確立を行った。その後、TIP60 粒子同士をポリマーで架橋することによるハイドロゲルの構築を検討した。本ゲルでは TIP60 がポリマーネットワーク構造の架橋点となることから、TIP60 の 60 量体構造を解離させる刺激によってゾルゲル転移を起こすと考えた。先行研究から TIP60 は加熱により 60 量体構造が解離することがわかっていたため、特にゲルの温度応答性を検証した。

第 4 章には本研究で得られた知見をまとめ、今後の展望を記した。

第2章 TIP60 の内外表面修飾による酸化還元応答性ナノキャリアとしての機能化

2-1 緒言

タンパク質ナノケージの内外表面を異なる化合物によって修飾するヘテロ修飾は、タンパク質ナノケージの機能化において重要な手法の 1 つである。先行研究では、内外で異なるアミノ酸をターゲットにした化学修飾法の利用や、遺伝的な修飾との組み合わせによる内外表面のヘテロな修飾が行われてきた^{55,56,95}。しかし、1 種類の官能基を標的としたシンプルな化学修飾による内外表面のヘテロ修飾は検討されてこなかった。本研究では、TIP60 が表面の孔から化合物を取り込むことを利用して、TIP60 内外に導入したシステインのヘテロ修飾系を構築した。そして、本ヘテロ修飾系による TIP60 の酸化還元応答性ナノキャリアとしての機能化を検討した(図 2-1)。まず、TIP60 が孔から取り込み可能な分子の大きさを評価するため、TIP60 の内側にシステインを導入した変異体に対して様々な大きさのポリマーによる化学修飾を行った。この結果から、TIP60 内外両表面にシステインを導入した二重変異体に対し、まず孔よりも大きな化合物による修飾を行うことで外側のシステインを優先的に修飾し、その後、孔よりも小さな化合物で内側のシステインを修飾することで、内外表面のヘテロ修飾が可能であると考えた。実際に、TIP60 外側表面のポリマー修飾と内側表面のジスルフィド結合を介した小分子化合物の修飾を行い、システインを標的とした化学修飾のみによる TIP60 の酸化還元応答性ナノケージとしての機能化を検討した。

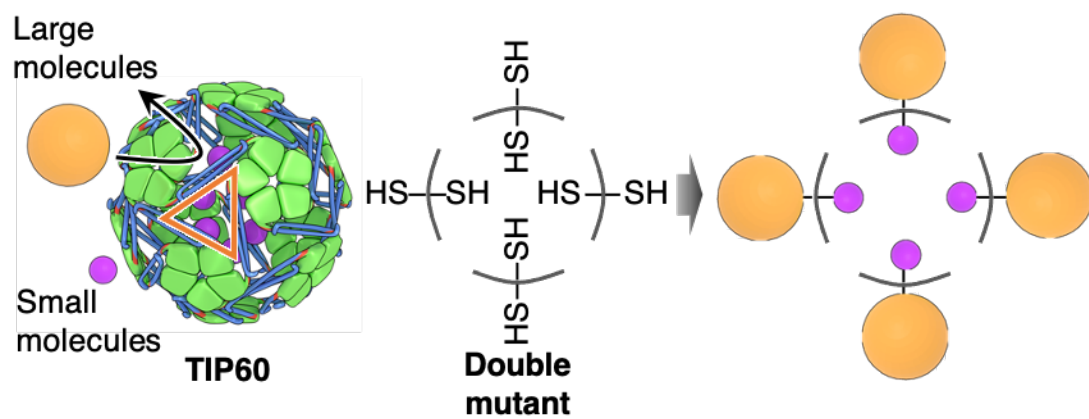


図 2-1. TIP60 の表面孔によるサイズ選択的な分子の取り込みと、二重変異体のヘテロ修飾の概念図

2-2 外部からの物質の取り込みにおける TIP60 表面孔のフィルター効果の検証

TIP60 表面の孔から取り込み可能な分子の大きさを調べるため、TIP60 の内側にシステインを導入した変異体 (S50C) について、大きさの異なる methyl polyethylene glycol maleimide (以降、PEG マレイミド、もしくは PEG-(分子量)と表記) による修飾実験を行った (図 2-2)。PEG は中性の直鎖状ポリマーであり、水中ではランダムコイル構造をとることが知られている。PEG のストークス径は分子量から算出することができ、濾過膜の孔径を調べるために一般に用いられる^{108,109}。修飾に用いた PEG マレイミドの分子量とストークス径を表 2-1 にまとめた。

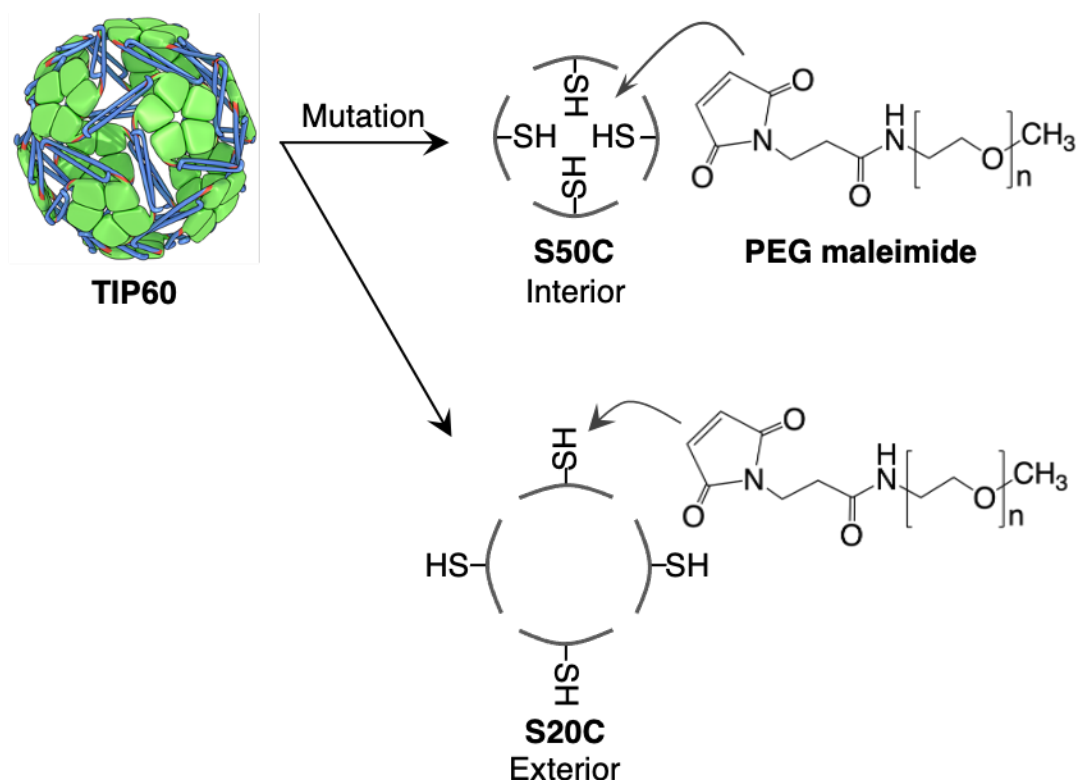


図 2-2. PEG マレイミドによる TIP60 システイン変異体の修飾実験

表 2-1. 修飾に用いた PEG マレイミドの分子量、ストークス径、修飾率と充填可能な PEG の推定数

表記	分子量	ストークス径 (nm)	修飾率 (%)		TIP60 内部に 充填可能な PEG の推定数
			S50C	S20C	
PEG-700	700	1.3	82 ± 2	94 ± 2	200 以上
PEG-1200	1200	1.8	65 ± 5	90 ± 0.4	200 以上
PEG-2000	2000	2.3	51 ± 3	91 ± 1	160
PEG-5000	5000	3.8	26 ± 5	86 ± 3	30
PEG-10000	10000	5.7	N. D.	89 ± 1	7
PEG-20000	20000	8.3	N. D.	65 ± 2	1

PEG マレイミドによる修飾は、Sodium dodecyl sulfate ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって確認した (図 2-3 A)。分子量 700~5,000 の PEG マレイミド (PEG-700, PEG-1200, PEG-2000, PEG-5000) で修飾した場合、未修飾の S50C と比較して高分子量側にシフトしたバンドが観察され、PEG マレイミドによる S50C の修飾が示唆された。一方、分子量 10,000 および 20,000 の PEG マレイミド (PEG-10000, PEG-20000) ではバンドの移動度の変化は見られなかった。各 PEG マレイミドについて、バンド強度から算出した S50C の修飾率と、PEG の分子量から算出されたストークス径¹¹⁰の関係を図 2-3 B に示す。PEG マレイミドの分子量の増加に伴って S50C 変異体の修飾率が低下することが明らかになった。一方、TIP60 の外側にシステインを導入した S20C 変異体についても同様の修飾実験を行ったところ、全ての PEG マレイミドで高分子量側へのバンドシフトが観察され、S20C 変異体の修飾が示唆された (図 2-3 C)。S50C 変異体の修飾実験の結果とは異なり、PEG-700~PEG-10000 で 90%前後のシステインの修飾が示唆された (図 2-3 D)。PEG-20000 を用いた場合のみわずかに修飾率の低下が見られたが、これは TIP60 表面における PEG の立体障害によると考えられる。

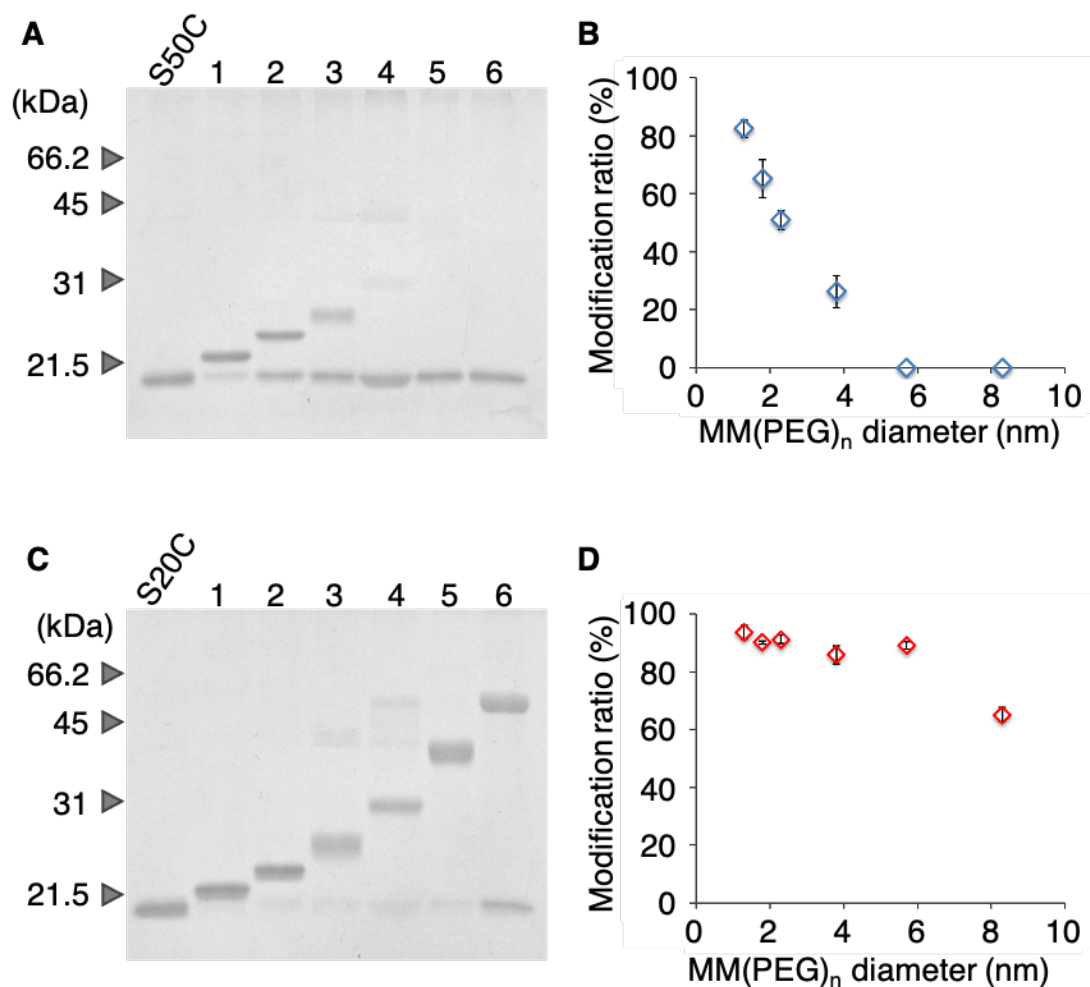


図 2-3. PEG マレイミドによる (A, B) S50C 変異体および (C, D) S20C 変異体修飾。

(A, C) SDS-PAGE の結果。S50C or S20C: 未修飾変異体。レーン 1: PEG-700、レーン 2: PEG-1200、レーン 3: PEG-2000、レーン 4: PEG-5000、レーン 5: PEG-10000、レーン 6: PEG-20000 で修飾した変異体。(B, D) PEG マレイミドのストークス径と修飾率の関係。各エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。

S50C 変異体の修飾率は、PEG-2000 (2.3 nm) では約 50%、PEG-5000 (3.8 nm) では約 30%に修飾率が低下した。孔の内接円の直径約 2.3 nm を超える、直径 3.8 nm の PEG-5000 が TIP60 の内側のシステインを修飾できたのは、表面孔が辺 4

nm の三角形の形状を有することや、PEG 分子の柔軟性のためだと考えられる。分子量の大きな PEG マレイミドによる S50C の修飾率は、表面孔の大きさによる分子のふり分け以外に TIP60 の内部空間の体積にも影響を受ける可能性がある。そこで、球状空間に大きさの等しい球を充填するシミュレーションの先行研究¹¹¹ から、TIP60 内部に充填可能な PEG 分子の数の推定を行った。TIP60 の内部空間の半径およそ 7.5 nm から推定される内部空間に充填可能な PEG 分子の数を表 2-1 に示す。充填可能な PEG-10000 は 7 分子と推定され、これは修飾率 12%に相当する。しかし、SDS-PAGE では修飾を示唆するバンドは見られなかったことから、内部空間の体積による制限だけでは S50C 変異体の修飾率の低下を説明できないことが示唆された。

PEG 修飾後の TIP60 の粒子構造は Native PAGE によって確認した(図 2-4)。S20C 変異体では PEG 修飾後のサンプル全てでバンドが高分子量側へシフトした。一方、S50C 変異体では PEG-700~PEG-5000 で修飾した場合、バンドシフトは見られず、これは S50C 変異体では修飾した PEG 分子が TIP60 の内部空間に存在するためだと考えられる (図 2-5)。PEG-10000 および PEG-20000 で修飾した場合、S50C 変異体では未修飾の場合と同様の位置のバンドに加えて、わずかに高分子量側にシフトしたバンドが見られた。このことから、S50C 変異体のごく一部が高分子量の PEG マレイミドと反応しており、これは SDS-PAGE では検出が困難であったと考えられる。小さなバンドシフトは、PEG-10000 および PEG-20000 による S50C 変異体の修飾では PEG 分子全体が TIP60 の内部空間に侵入することはできず、マレイミド基のついた PEG の末端が内部に侵入することで S50C と反応し、PEG の反対側の末端は粒子の外側に突き出た状態になったために生じたと考えられる (図 2-5)。動的光散乱 (DLS) の結果からも、S20C に比べて S50C では PEG 修飾による粒径の変化が小さいことが示唆された(図 2-6)。

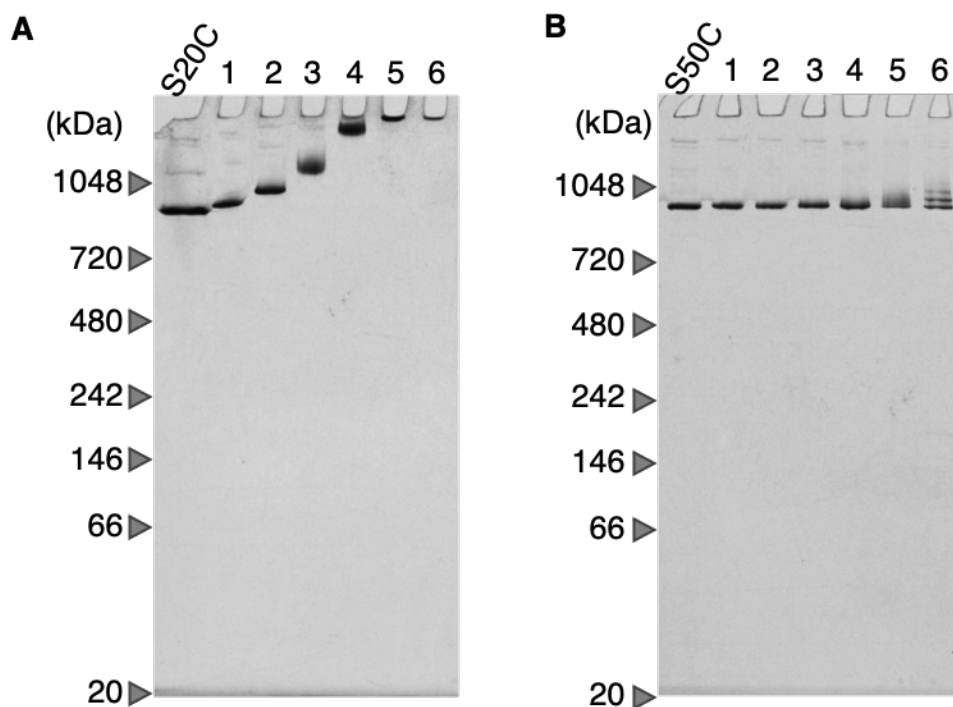


図 2-4. Native PAGE の結果。(A) PEG 修飾前後の S20C 変異体。(B) PEG 修飾前後の S50C 変異体。

S50C or S20C: 未修飾変異体、レーン 1: PEG-700、レーン 2: PEG-1200、レーン 3: PEG-2000、レーン 4: PEG-5000、レーン 5: PEG-10000、レーン 6: PEG-20000 で修飾した変異体。

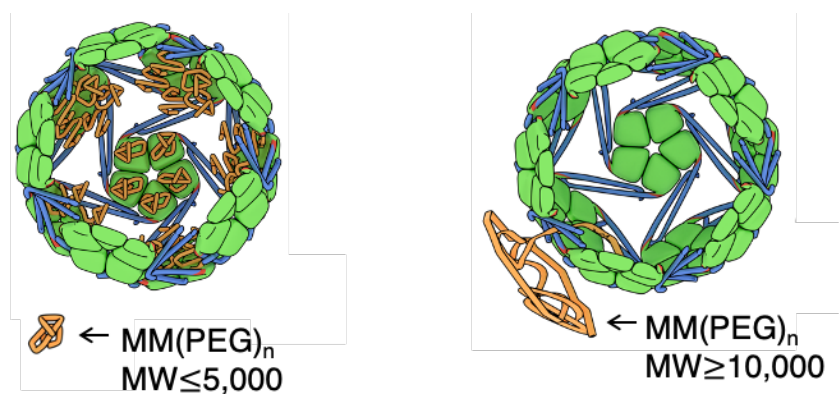


図 2-5. Native PAGE の結果から推測した PEG 化 S50C 変異体の模式図。

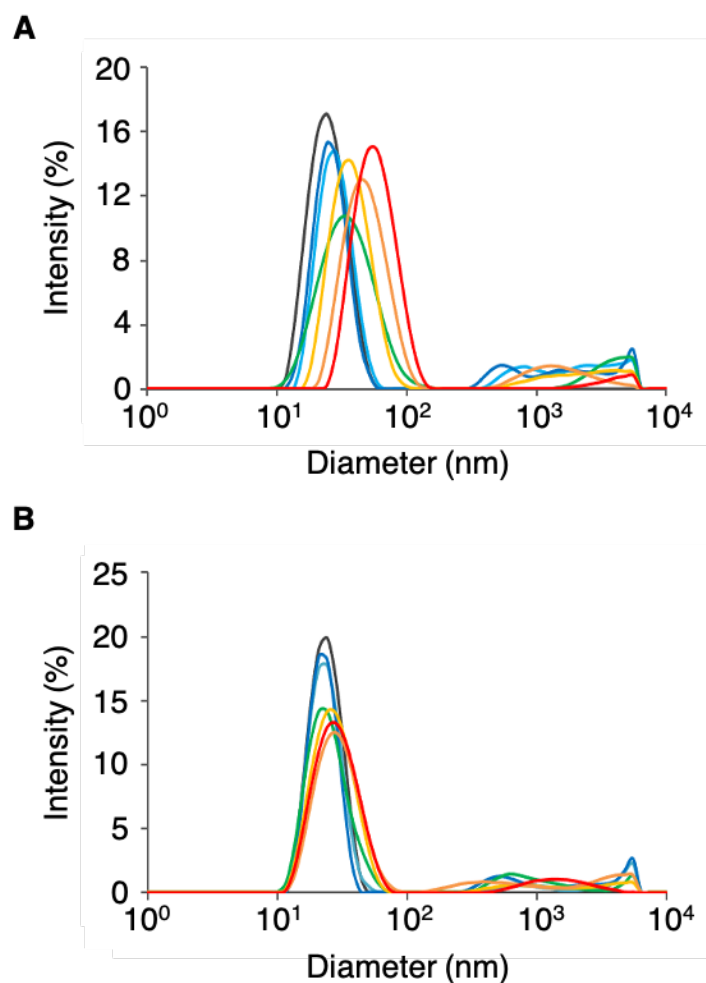


図 2-6. DLS の結果。(A) PEG 修飾前後の S20C 変異体 (B) PEG 修飾前後の S50C 変異体。

黒: 未修飾 TIP60。水色: PEG-700、青: PEG-1200、緑: PEG-2000、紫: PEG-5000、橙: PEG-10000、赤: PEG-20000 で修飾した変異体。

PEG-20000 で修飾した TIP60 について、TEM による観察を行った(図 2-7)。S50C 変異体の TEM 像から、修飾反応後も TIP60 がその球状構造を維持していることが確認できた。一方、S20C 変異体の TEM 像では粒子の境界が白くぼやけた画像が得られた。この理由としては、TIP60 表面に修飾した PEG によってモリブデン酸アンモニウムによる染色が不均一になった可能性が考えられる。

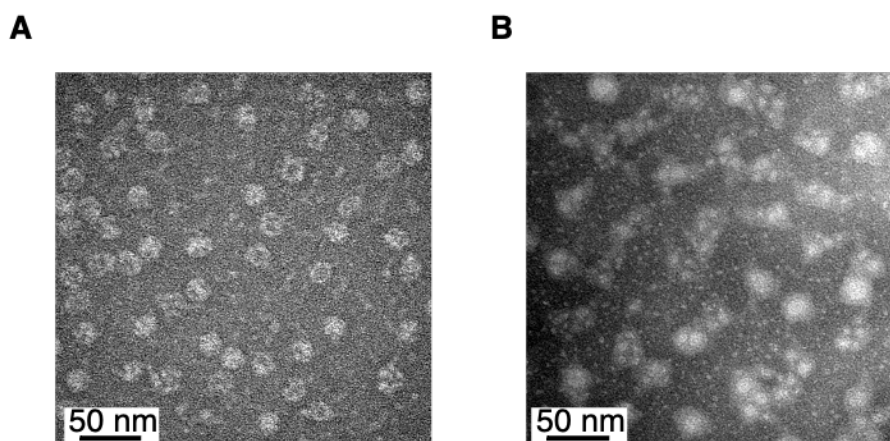


図 2-7. PEG-20000 で修飾した (A) S50C 変異体および (B) S20C 変異体の TEM 画像。

2-3 TIP60 表面孔を利用した内外表面のヘテロ修飾

TIP60 表面の孔が内部空間にアクセス可能な分子を大きさでふるいわけするフィルターとして機能することを利用して、TIP60 の内外表面に導入したシステインを大きさの異なる分子で修飾しわけることができるのではないかと考えた。具体的な手順を図 2-8 に示す。TIP60 の内外両面にシステインを導入した二重変異体 (S20C, S50C) に対して、まず分子量 10,000 および 20,000 の PEG マレイミドのような表面孔よりも大きな分子を修飾する。これらの大きな分子は TIP60 の内部に侵入できないため、外側のシステイン (S20C) と優先的に反応すると考えられる。続いて、TIP60 の表面孔よりも小さな分子と反応させることで、未修飾の内側システイン (S50C) を修飾することができると考えた。内側を修飾する分子として、5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) を用いた^{112,113}。DTNB は TNB 二分子がジスルフィド結合で結合した化合物であり、遊離のチオールとチオール-ジスルフィド交換によって反応し、一分子の TNB を放出する (図 2-9)。もう一方の TNB 分子はタンパク質と結合し (Cys-TNB)、これは還元剤の添加によって放出されると考えられる。DTNB、Cys-TNB は 323 nm に、TNB は 412 nm に最大吸収波長を持つことから、反応は吸光度測定によって確認した。

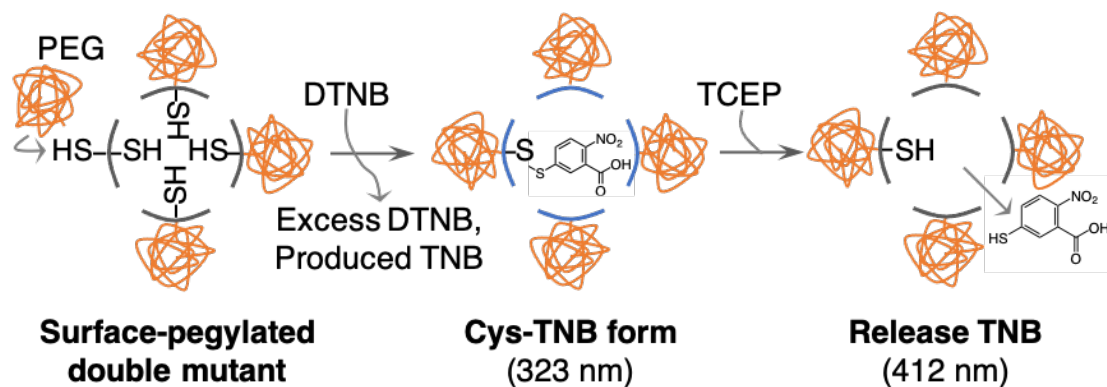


図 2-8. TIP60 二重変異体 (S20C, S50C) の内外表面修飾の模式図。

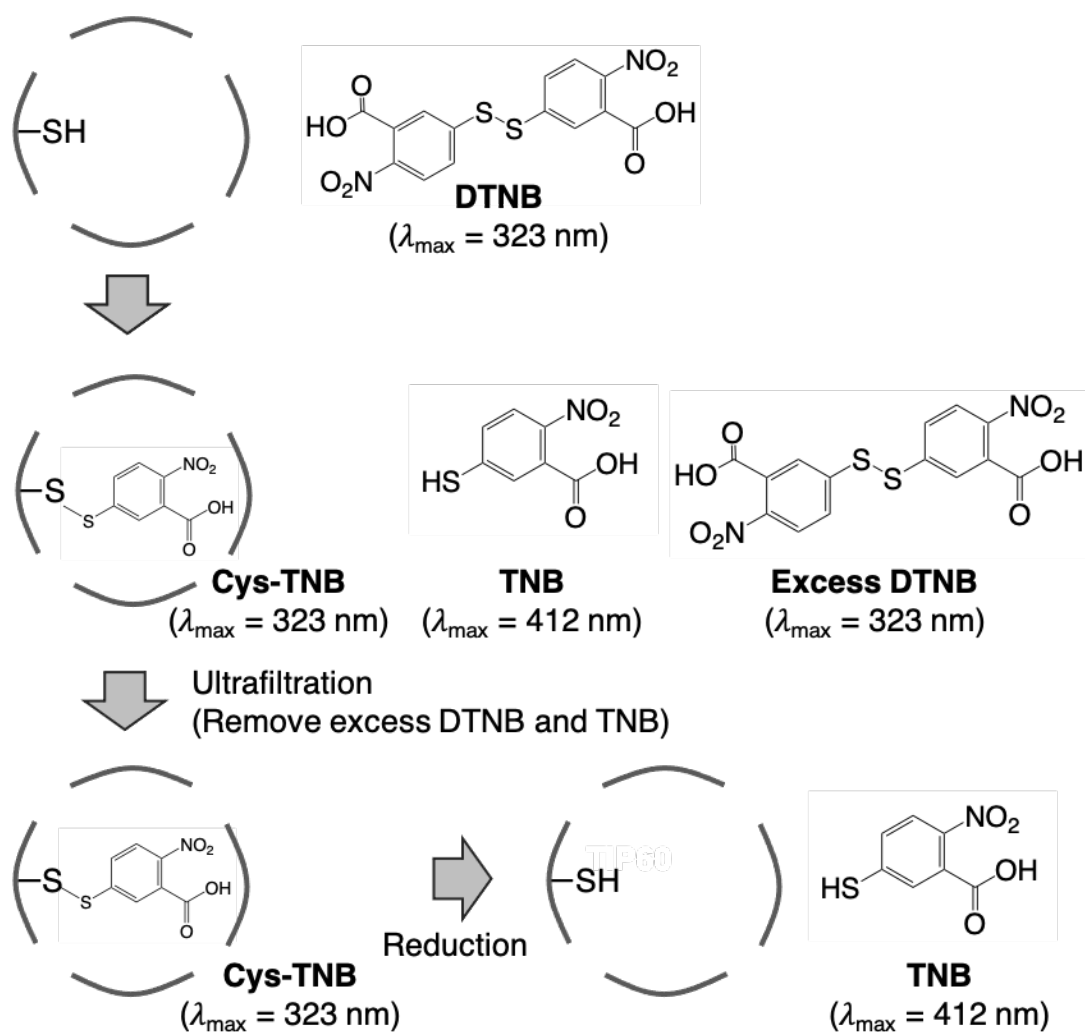


図 2-9. TIP60 システイン変異体と DTNB の反応のスキーム。TIP60 変異体の 1 つのシステイン残基を図示した。

分子量 10,000 および 20,000 の PEG マレイミドによる二重変異体の修飾は SDS-PAGE によって確認した (図 2-10)。修飾率は PEG-10000 では $87 \pm 2\%$ 、PEG-20000 では $71 \pm 1\%$ であり、S20C 単独変異体の修飾率と同様であった。TIP60 一分子について考えると、PEG-10000 では 52/60 個の外側システインが、PEG-20000 では 43/60 個の外側システインが修飾されたと考えられる。

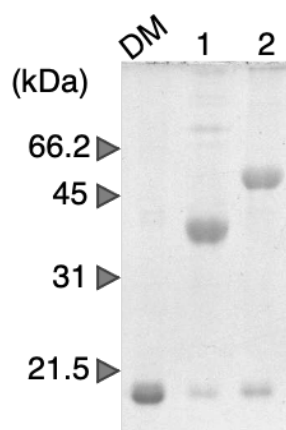


図 2-10. SDS-PAGE による TIP60 二重変異体の PEG 修飾の確認。

DM: 未修飾二重変異体。レーン 1: PEG-10000、レーン 2: PEG-20000 による修飾後。

続いて、PEG 化二重変異体を DTNB と反応させた (図 2-11)。反応により生成した TNB は 412 nm の吸光度から算出し、分子量 10,000 の PEG で修飾した二重変異体では TIP60 一分子あたり 37 個のシステインが、分子量 20,000 の PEG で修飾した二重変異体では 34 個のシステインが DTNB によって修飾されたと考えられる。これらは、PEG 修飾後に未修飾のまま残っている外側システインの数 (PEG-10000 修飾後: 8 個, PEG-20000 修飾後: 17 個) よりも多く、内側のシステインが DTNB によって修飾されることが示唆された。余剰の DTNB と生成した TNB を限外濾過によって取り除いた後も、サンプルは 323 nm に吸収を有し、これは Cys-TNB の状態で TNB が TIP60 の内部空間に存在することを示唆する。

Cys-TNB の結合を切断するため還元剤である tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) を添加すると、323 nm の吸収は減少し、412 nm の吸収が増大したことから TNB の生成が示唆された。限外濾過後のサンプルでは 412 nm の吸収が見られないことから、TNB は TIP60 の内側から外側へと放出され、限外濾過により除去されたと考えられる。

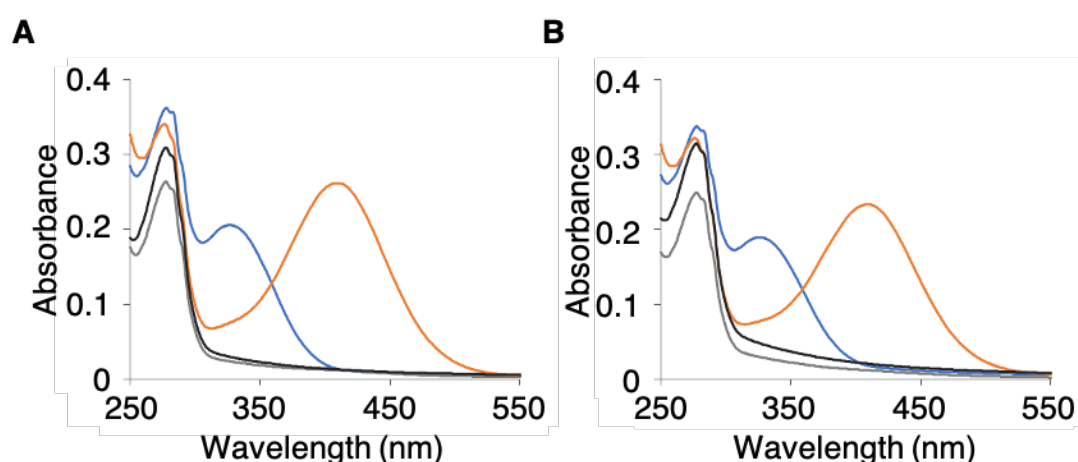


図2-11. PEG 化二重変異体の DTNB 修飾。(A) PEG-10000 修飾二重変異体の結果。
(B) PEG-20000 修飾二重変異体の結果。

黒:DTNB 修飾前。青:DTNB 修飾後。橙:TCEP 添加後。灰: 限外濾過による TNB 除去後。

コントロールとして、S20C 単独変異体と S50C 単独変異体についても DTNB による修飾を行った(図 2-12)。いずれの変異体も同様の修飾率 (S20C: $74 \pm 1\%$, S50C: $77 \pm 1\%$) を示し、PEG 化二重変異体よりもわずかに修飾率は高かった (PEG-10000 修飾二重変異体: $62 \pm 1\%$, PEG-20000 修飾二重変異体: $56 \pm 2\%$, DTNB が内側のシステインのみと反応したと仮定して算出)。DTNB 修飾後の TIP60 の形状は Native PAGE で確認した(図 2-13)。さらに、PEG 化 S20C 変異体についても DTNB 修飾を行ったところ、TIP60 一分子あたり 7 個 (PEG-10000 修飾 S20C: $11 \pm 0.5\%$) もしくは 8 個 (PEG-20000 修飾 S20C: $13 \pm 2\%$) のシステイ

ンの修飾が示唆された (図 2-14)。PEG-20000 の場合、S20C 変異体の PEG 修飾後に残っていると考えられる全てのシステインが DTNB と反応するわけではなかったが、これは PEG の立体障害によると考えられる。以上より、PEG 化二重変異体の DTNB 修飾で生じた Cys-TNB 結合の多くは DTNB が内側のシステインと反応して生成したと考えられる。

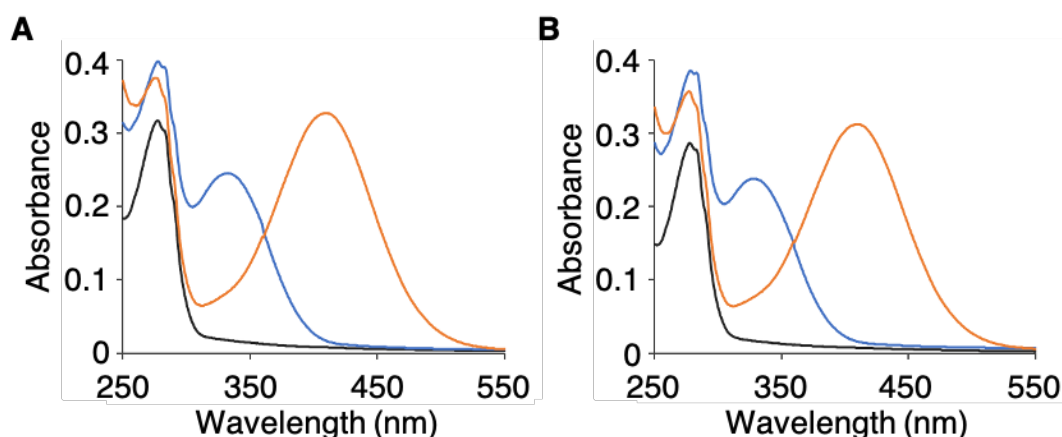


図 2-12 (A) S20C 変異体および(B) S50C 変異体の DTNB 修飾。

黒:DTNB 修飾前。青:DTNB 修飾後。橙:TCEP 添加後。

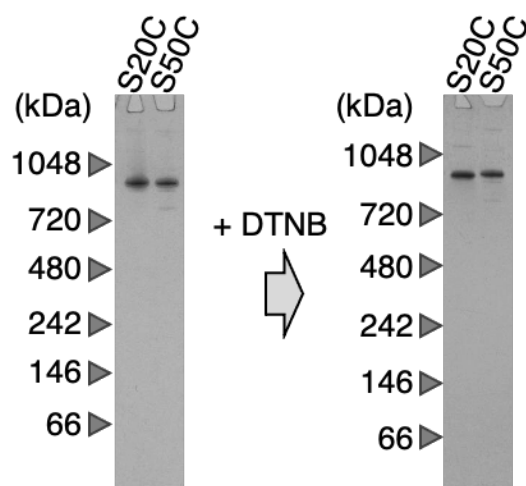


図 2-13. Native PAGE の結果。(左側) 未修飾の S20C および S50C 変異体。(右側) DTNB 修飾後の S20C および S50C 変異体。

修飾後には S50C に対して S20C は移動度が上昇した。修飾後の S20C の移動度の変化は外側にアニオン性の TNB が修飾されたことに起因する可能性がある。

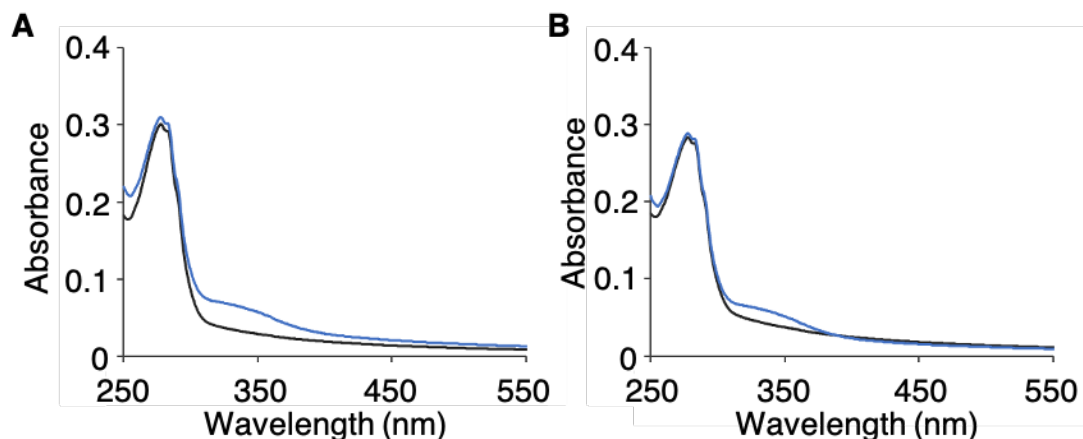


図 2-14. PEG 化 S20C 変異体の DTNB 修飾。(A) PEG-10000 修飾 S20C の修飾結果。(B) PEG-20000 修飾 S20C の修飾結果。

黒: DTNB 修飾前。青: DTNB 修飾後。

次に、還元剤である TCEP の添加による TIP60 からの TNB 放出速度を比較した。すると、TIP60 の外側システイン (S20C) を修飾した場合よりも、内側システイン (S50C) を修飾した場合の方が TNB の放出に時間がかかることがわかった(図 2-15)。内側システインに修飾した TNB は約 40 分で放出されるのに対し、外側システインに修飾した TNB は約 10 分で放出された。擬一次速度定数は S20C 変異体では $0.39 \pm 0.03 \text{ min}^{-1}$ 、S50C 変異体では $0.11 \pm 0.004 \text{ min}^{-1}$ であった。これは、内側システインへの TCEP のアクセスが遅いためである可能性が考えられる。PEG-10000 と PEG-20000 で表面を修飾した二重変異体からの TNB 放出の時間依存性は、S50C 変異体からの TNB 放出の時間依存性に近く、擬一次速度定数はそれぞれ $0.10 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$ (PEG-10000 修飾二重変異体) と $0.10 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ (PEG-20000 修飾二重変異体) であった。この結果は、二重変異体の修飾において TNB が内側のシステインを修飾していることをサポートし、TIP60 表面に修飾した PEG 分子は TNB の放出速度に影響しないことを示唆する。

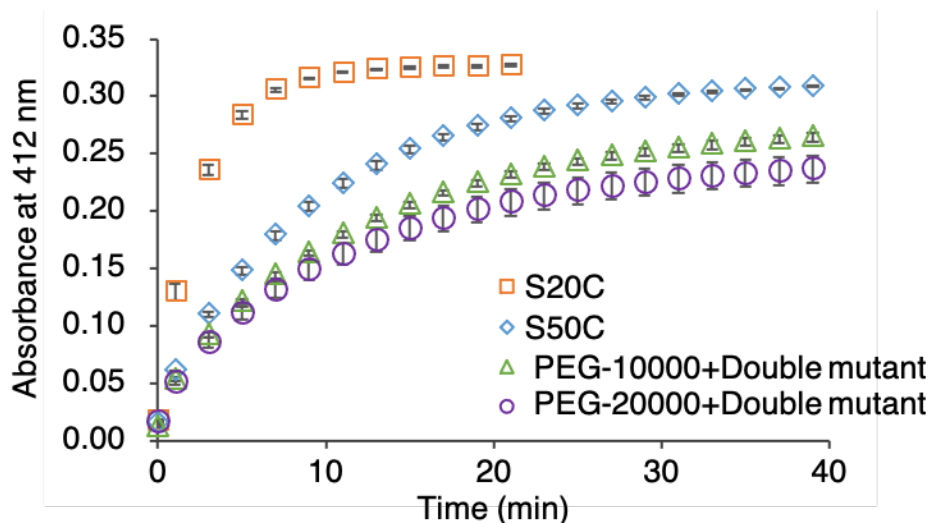


図 2-15. TCEP と DTNB 修飾 TIP60 変異体の反応の時間依存性。

TCEP の代わりにチオールを含まない強い還元剤である水素化ホウ素ナトリウムを用いた場合にも、同様に内側システインからの遅い TNB 放出が観察された (図 2-16)。TCEP は TIP60 表面の孔よりも小さいため、TCEP と内側のシステインの反応が遅いのは分子の大きさ以外の理由によると考えられる。TIP60 のクライオ電子顕微鏡による構造解析の結果、表面孔の周辺にカチオン性の領域が存在することがわかった⁸⁶。このカチオン性領域と、アニオン性の還元剤の間で相互作用が生じ、TIP60 内側への TCEP のアクセスが阻害されている可能性が考えられた。実際に、TCEP と似た構造を持つクエン酸イオンを添加した条件下での TCEP による TNB 放出実験の結果、内側に TNB を修飾した TIP60 からの TNB 放出速度が上昇し、内側に修飾した TNB の遅い放出速度は TCEP と TIP60 の孔の周りでの静電的な相互作用によることが示唆された⁸⁶。

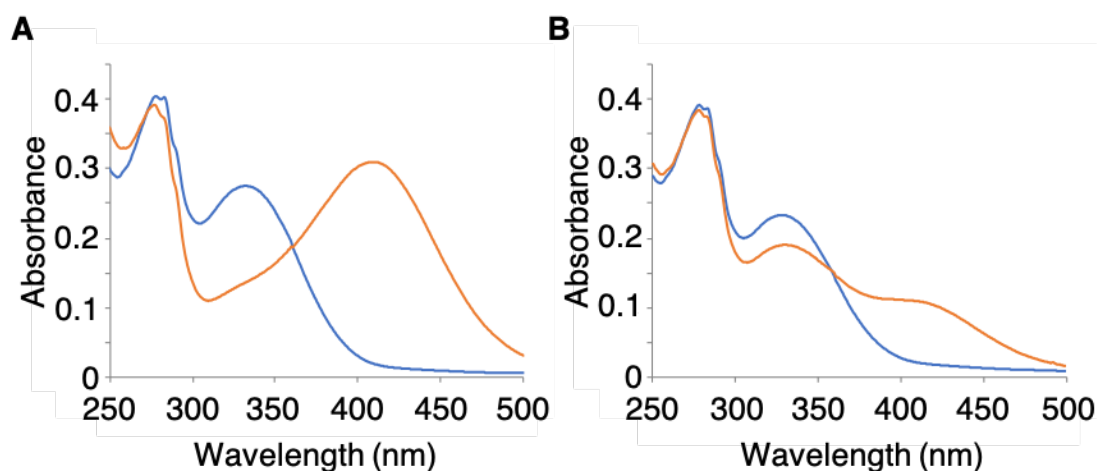


図 2-16. 水素化ホウ素ナトリウムと (A) DTNB 修飾 S20C 変異体、(B) DTNB 修飾 S50C の反応。

青: 反応前。橙: 反応後。

2-4 結言

本章では、均質な構造を有するタンパク質ナノ粒子 TIP60 を用いて、その表面に存在する三角形状の孔が TIP60 の内部空間に侵入可能な分子を大きさによってふるいわけするフィルターとして機能することを明らかにした。この性質を利用して、TIP60 の内外表面に導入したシステイン変異体を大きさの異なる分子で修飾しわけられることを示した。TIP60 内部にジスルフィド結合によって修飾した化合物は還元剤の添加によって放出することが可能であった。TIP60 の外側にジスルフィド結合で分子を修飾した場合と比較して、内側に分子を修飾した場合の還元剤添加による化合物の放出速度は遅く、これは還元剤と TIP60 表面孔周辺のカチオン性残基との間の静電相互作用による可能性が示唆された。以上の結果は、TIP60 の刺激応答性ナノキャリアとしての利用可能性を示している。

2-5 実験方法

使用した試薬

タンパク質マーカー(10 倍濃縮, SDS-PAGE 用, MW6,500~200,000), CBB ステインワン (Ready to use), イミダゾール, エチレンジアミン四酢酸, トリスヒドロキシメチルアミノメタン, ジチオスレイトール, イソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド, クロラムフェニコール, 水素化ホウ素ナトリウム (以上、ナカライテスク), NativeMark Unstained Protein Standard, NativePAGE 4-16% Bis-Tris Protein Gels, NativePAGE Running buffer (20 $\times$), NativePAGE Sample buffer (4 $\times$) (以上、Invitrogen), 0.5 mol/L TCEP 溶液 中性, 2-メルカプトエタノール (以上、富士フイルム和光純薬), Methyl-PEG₁₂-Maleimide, Methyl-PEG₂₄-Maleimide (以上、東京化成工業), PEG マレイミド (分子量 2,000, 5,000, 10,000, 20,000) (以上、Biochempeg Scientific), N, N-ジメチルホルムアミド (脱水) (以上、関東化学株式会社)を用いた。

二重変異体の構築

二重変異体は、すでに先行研究⁸⁵で構築済みであった S50C 変異体に対し、S20C 変異を導入するプライマーを用いた部位特異的変異導入によって行った。

表 2-2. 使用したプライマー

S20C プライマー	5'-AATATTTGTGAATCTCAAGGCCTGATTACGATT-3' 5'-AGATTCACAAATATTCCCGATAATATCTTCGCC-3'
------------	--

タンパク質の発現

pACYC-Duet1 ベクターにクローニングした TIP60 とその変異体を *Escherichia coli* BL21(DE3)で発現した。クロラムフェニコールを添加した LB 培地で 37 °C、200 rpm で 16 時間前培養した。本培養液 (クロラムフェニコール含有 LB 培地) に 1/100 量の前培養液を添加し、37 °C 200 rpm で浸透培養した。2 時間後に IPTG を終濃度 0.1 mM で添加し、さらに 6 時間培養した。遠心分離により回収した菌体は使用するまで-80 °C で保存した。

Ni-NTA カラムクロマトグラフィーによるタンパク質の精製

20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)に懸濁した菌体を超音波によって破碎し、10000 $\times$ g、4 °C で 10 分間遠心分離した。可溶性画分を、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化した Ni-NTA カラムにアプライした。20 mM Tris-HCl, 20 mM Imidazole (pH 8.0)で洗浄した後、20 mM Tris-HCl, 500 mM Imidazole (pH8.0)でタンパク質を溶出し、冷蔵庫で保存した。

システイン変異体の場合、菌体破碎とカラムの平衡化のバッファーには 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT(pH 8.0)を使用した。Ni-NTA カラムに可溶性画分をアプライ後、まず 20 mM Tris-HCl, 20 mM Imidazole, 10 mM DTT (pH8.0)で洗浄した後、20 mM Tris-HCl, 20 mM Imidazole (pH 8.0)で洗浄し DTT を除去した。20 mM Tris-HCl, 500 mM Imidazole (pH 8.0)で溶出したタンパク質溶液に 1 mM TCEP を添加し冷蔵庫で保存した。

タンパク質濃度の測定

TIP60 のモル吸光係数 $8480 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を使用し、280 nm の吸光度からタンパク質の濃度を決定した。タンパク質の濃度は特に断りがない限り 60 量体のタンパク質濃度を表す。

UV-Vis 吸収測定

紫外可視分光光度計(UV-1900, Shimadzu Corporation)と石英セル (ASLAB)を用い、光路長 1 cm で測定を行った。

DLS 測定

Zetasizer Nano ZS と ZEN0040 (Malvern Instruments Inc.)を使用し測定を行った。

SDS-PAGE

サンプルをサンプルバッファーと混合 (2% SDS, 終濃度) し、15%のポリアクリルアミドゲルで分離した (20~30 mA, 定電流)。CBB で染色したゲルは FAS-V gel imaging system (Nippon Genetics Co., Ltd.)で撮影した。バンド強度は Image J を用いて解析した¹¹⁴。

Native PAGE

サンプルをサンプルバッファーと混合し、NativePAGE Bis-Tris ゲル(4–16%, Invitrogen)で分離した (150 V, 2 時間)。CBB で染色したゲルは FAS-V gel imaging system (Nippon Genetics Co., Ltd.)で撮影した。

TEM 観察

エクセルサポートフィルム (Nisshin EM Co., Ltd.)にマウントしたサンプルを 2% モリブデン酸アンモニウムで染色し、TEM-120 (FEI Tecnai)で観察した。

PEG マレイミドによる TIP60 システイン変異体の修飾

TIP60 システイン変異体は 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH7.4)のバッファーで

透析した。PEG マレイミドは DMF に溶解した。0.2 μ M のタンパク質と 1 mM の PEG マレイミドを 30 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた。二重変異体の PEG 修飾では、1 μ M のタンパク質を 1 mM の PEG マレイミド (分子量 10000 あるいは 20000) と反応させた。5% の 2ME を添加して反応を停止し、余剰な PEG マレイミドを限外濾過によって除去した。

S20C、S50C、PEG 化二重変異体の DTNB 修飾

S20C、S50C および PEG 化二重変異体を 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0) のバッファーで透析した。0.6 μ M のタンパク質を 360 μ M の DTNB と 30 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させた。反応後のサンプルは Amicon Ultra-15 (MWCO 10 kDa, Merck) を使用して限外濾過し、余剰の DTNB と生成した TNB を除去した。紫外可視分光光度計 (UV-1900, Shimadzu Corporation) を用いてサンプルの吸光度を測定した。TNB 放出では、サンプルに終濃度 1 mM で TCEP を添加した後の 412 nm の吸光度の時間変化を測定した。生成した TNB は限外濾過によって除去した。

ホウ素化水素ナトリウムによる DTNB 修飾 S20C および S50C の還元

S20C および S50C 変異体を 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0) のバッファーで透析した。0.6 μ M のタンパク質を 360 μ M の DTNB と 30 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させた。反応後のサンプルは Amicon Ultra-15 (MWCO 10 kDa, Merck) を使用して限外濾過し、余剰の DTNB と生成した TNB を除去した。紫外可視分光光度計 (UV-1900, Shimadzu Corporation) を用いてサンプルの吸光度を測定した後、10 mM NaBH₄ (0.1 M NaOH に溶解) と反応させた。中性の水溶液中では NaBH₄ は加水分解し水素ガスを発生する。水素ガスによる気泡の発生によって反応中の吸光度の測定は困難であったため、20 分後の吸光度を反応の終点として測定した。

第3章 TIP60 を超分子架橋剤とした刺激応答性ハイドロゲルの構築

3-1 緒言

ハイドロゲルは水を豊富に含むソフトマテリアルであり、食品や医療、化粧品、農業などといった様々な分野で利用されている¹¹⁵⁻¹¹⁹。特に熱や光、pH などの外部刺激に応答して構造や性質が変化するゲルは刺激応答性ゲルと呼ばれ、刺激に応答した物質の放出やセンサーなどの用途で利用される¹²⁰⁻¹²⁶。第3章では、TIP60 の 60 量体構造が刺激によって解離するという超分子の性質を利用して、TIP60 を構成要素とした刺激応答性ハイドロゲルの構築を検討した (図 3-1)。第2章で行った TIP60 外側表面の PEG マレイミドによる修飾実験から着想を得て、TIP60 の外側表面を両端にマレイミド基のついたビスマレイミド PEG で修飾することで、TIP60 粒子がポリマーで架橋されたネットワーク構造を構築でき、TIP60 をゲル化できるのではないかと考えた。本ゲルでは超分子である TIP60 がネットワーク構造の架橋点となることから、TIP60 の 60 量体構造を破壊する刺激によってゾルゲル転移するという刺激応答性を示すことが期待された。天然タンパク質ナノケージであるフェリチンやウイルス様粒子を用いた先行研究では、これらをゲルに組み込むことで刺激に応答した化合物内包・放出能の付与やゲルの機械特性の調整が可能であることが報告されていた¹²⁷⁻¹³²。しかし、これまでタンパク質ナノケージの超分子構造の刺激応答性がゲル構造に与える影響について検討した例はない。先行研究より TIP60 は加熱により解離することがわかっていたため、本研究ではゲルの温度応答性を検証し、TIP60 がゾルゲル転移を引き起こす超分子架橋点として機能する可能性を検討した。

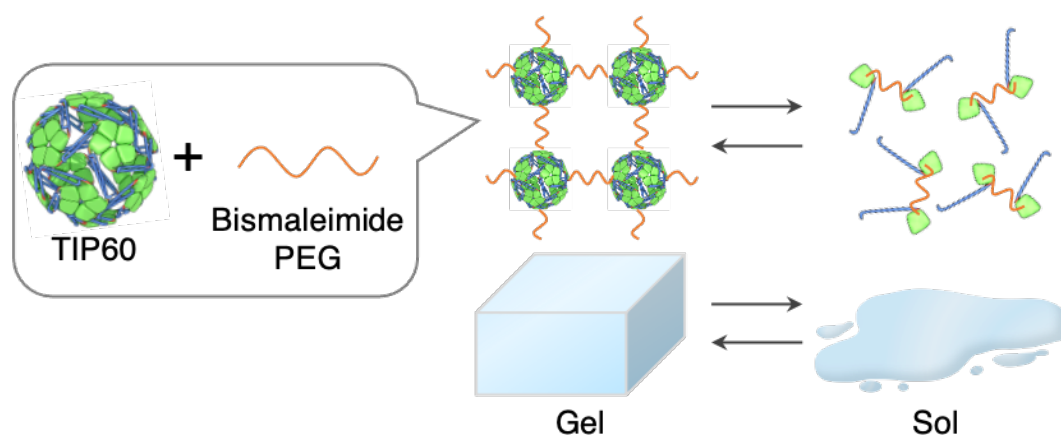


図 3-1. ハイドロゲルの刺激応答性架橋点としての TIP60 の利用の概念図。

3-2 TIP60 の大量精製系の構築

アフィニティクロマトグラフィーのような時間とコストのかかる精製プロセスと低い収量は、ゲルのようなマクロな材料の構成要素としてのタンパク質の利用を妨げる課題の 1 つである^{133,134}。そこで、TIP60 を構成要素としたゲルの構築を検討に先立ち、ゲル化に十分な TIP60 を獲得するための簡便な精製系の構築を検討した。TIP60 はアニオン性の粒子であり、アミノ酸配列から計算される等電点はおよそ 5.5 である。そこで、pH 8.0 の TIP60 溶液に pH 4.5 の酢酸バッファを加えて溶液の pH を約 5.5 に調整したところ、溶液が白濁し TIP60 が凝集したことが示唆された (図 3-2 A 写真 2)。溶液を遠心分離して凝集体を回収し、pH 8.0 のバッファを加えると、目視では沈殿が確認できなくなり、TIP60 が中性バッファに再度溶解したことが示唆された (図 3-2 A 写真 3)。沈殿前後の TIP60 の構造は Native PAGE と DLS で確認し、TIP60 の粒子構造が維持されていることが示唆された (図 3-2 B, C)。

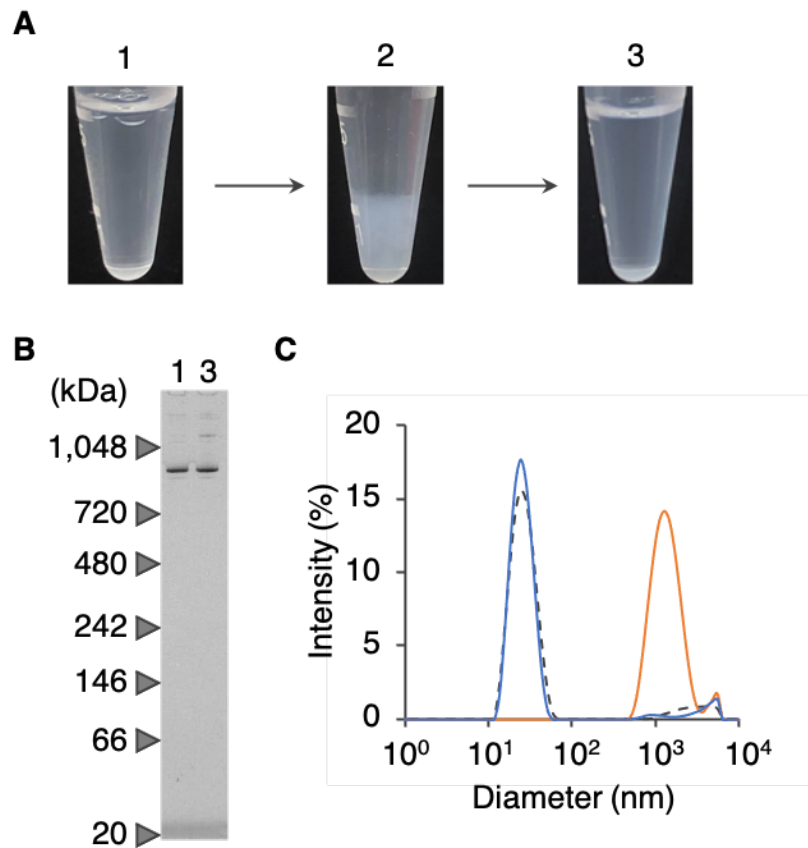


図 3-2. (A) TIP60 の pH 依存的な沈殿の様子。1: 中性バッファー中 2: 酸性バッファー中 3: 中性バッファー再溶解後。(B) Native PAGE の結果。レーン番号はパネル A のサンプル番号を表す。(C) DLS の結果。黒点線: 中性バッファー中、橙線: 酸性バッファー中、青線: 中性バッファー再溶解後の TIP60。

pH 5.5 における沈殿形成と再溶解を 3 回繰り返したところ、90%近くの TIP60 を再可溶化することができた。Native PAGE とサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) の結果、その形状に大きな変化は見られなかった (図 3-3)。

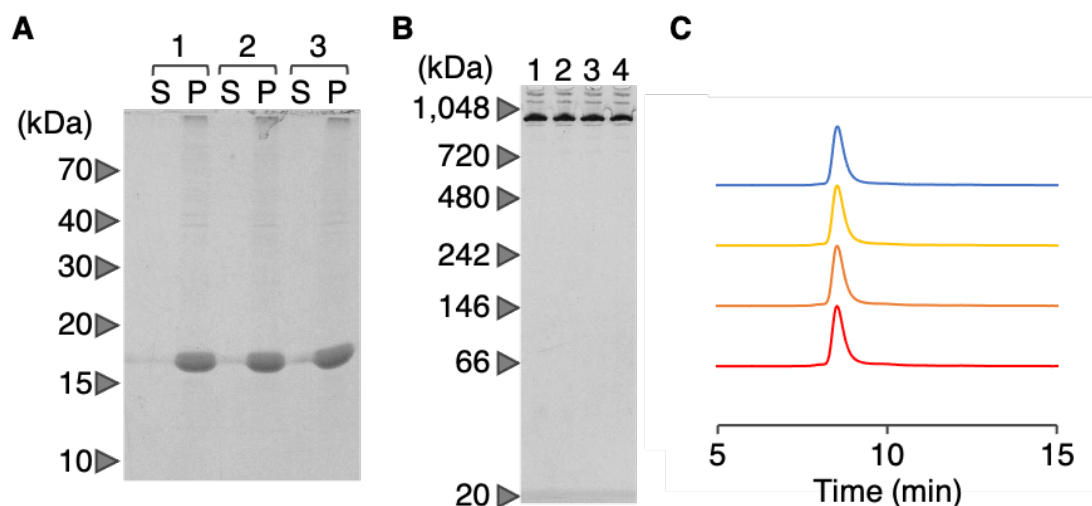


図 3-3. TIP60 沈殿-最可溶化サイクルの繰り返し結果。(A) SDS-PAGE の結果。S: 上清、P: 沈殿。ゲル上部の数字は、沈殿サイクルの繰り返し回数。(B) Native PAGE の結果。レーン 1: カラム精製 TIP60。レーン 2~4: 1~3 回目の沈殿を再溶解したサンプル。(C) SEC の結果。青: カラム精製 TIP60、黄、橙、赤: 1~3 回目の沈殿を再溶解したサンプル。

溶液の pH と TIP60 の沈殿割合の関係を調べたところ、pH 6.5 以下の溶液では 90%以上の TIP60 が沈殿し、TIP60 の 50%が沈殿する pH は 6.60 ± 0.01 と計算された (図 3-4)。TIP60 の鋳型タンパク質である LSm と MyoX-coil の等電点はそれぞれ 5.7 と 4.6 である。そのため、マイルドな酸性 pH での TIP60 の沈殿は LSm の正味電荷の減少によって起こると考えられる。LSm を単独で発現精製したサンプルについて pH に依存した沈殿形成を検証したところ、わずかではあるが pH 6.5 と 7.0 で沈殿が認められた。沈殿が認められた pH は His tag を含めて計算された LSm の等電点~6.4 と近い値であった (図 3-5)。この結果から、TIP60 で

は 1 粒子あたり 12 個の LSm における多価の相互作用がマイルドな酸性 pH での沈殿形成を促進したと考えられる。

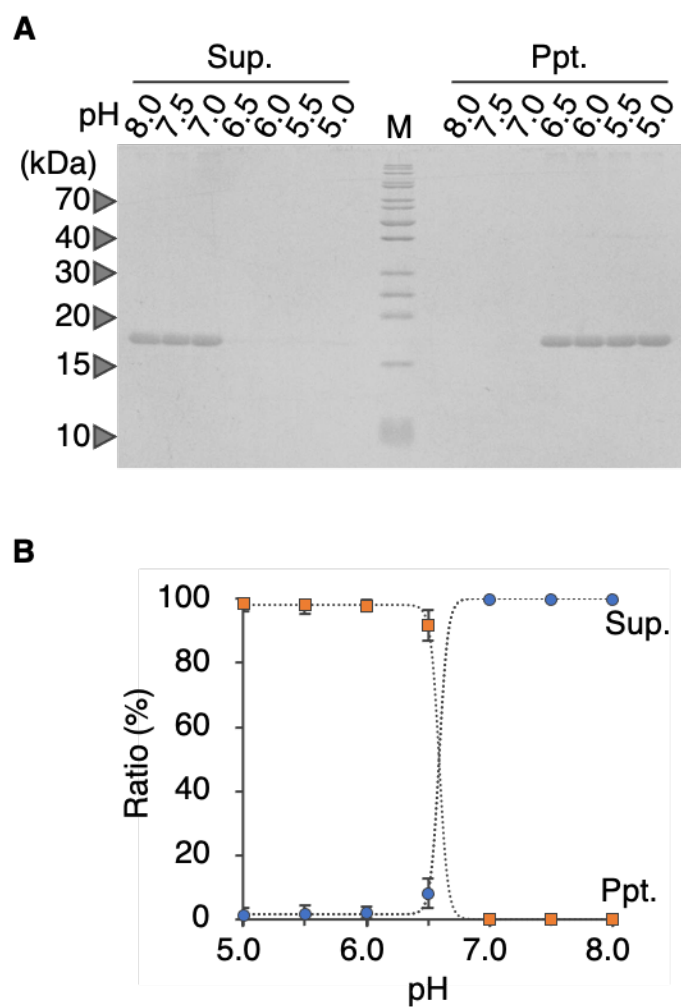


図 3-4. (A) SDS-PAGE の結果。各レーンの数字は溶液の pH を表す。(B) 上清および沈殿中の TIP60 の割合と溶液の pH の関係。Sup.: 上清。Ppt.: 沈殿。各エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。

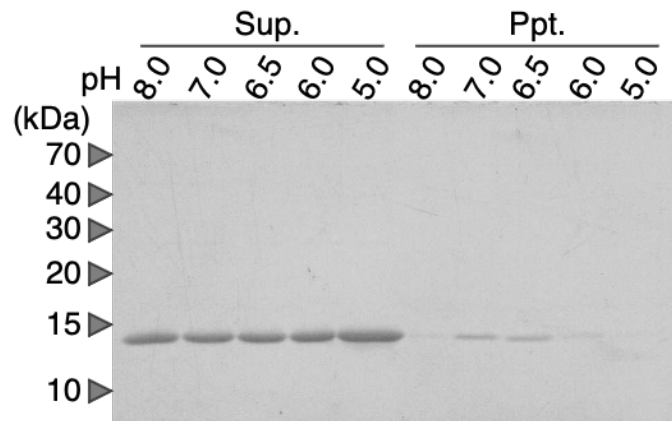


図 3-5. LSm の pH に依存した沈殿形成実験での SDS-PAGE 結果。各レーンの数字は溶液の pH を表す。

pH に依存した TIP60 の沈殿を利用して、TIP60 を発現した大腸菌の可溶性画分から TIP60 を精製できるのではないかと考えた。そこで、大腸菌の可溶性画分からの pH に依存した TIP60 の沈殿挙動を調べたところ、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーで精製した TIP60 溶液の結果とは異なり、pH5.5~6.5 で沈殿する TIP60 の割合は約 50%にとどまった(図 3-6 A, B)。これは、可溶性画分中の不純物によって TIP60 の沈殿が妨げられたためだと考えられる。可溶性画分から回収した TIP60 の沈殿を中性バッファーで再溶解した溶液について、吸光度測定を行ったところ、260 nm 付近に最大吸収波長を有するスペクトルが見られ、核酸が存在することが示唆された (図 3-6 C)。アガロースゲル電気泳動の結果からも、pH 5.0 から 6.5 で TIP60 は核酸とともに沈殿することが示唆された (図 3-6 D)。TIP60 の鋳型タンパク質の 1 つである五量体タンパク質 LSm は RNA 結合タンパク質のファミリーとして知られている⁸⁷。したがって、核酸との相互作用が TIP60 の可溶性画分からの沈殿を阻害する主要因であると考えた。

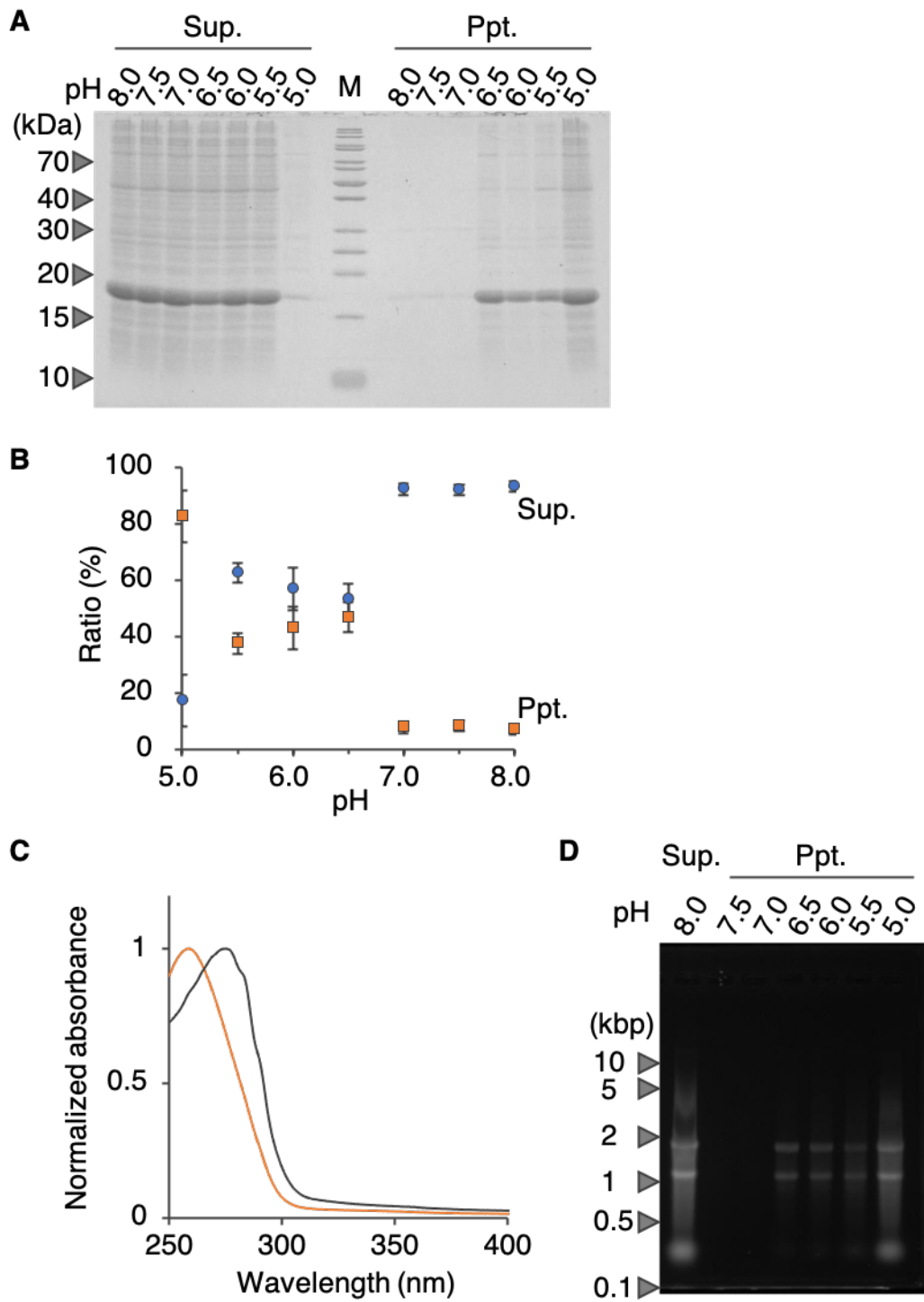


図 3-6. 可溶性画分からの TIP60 の沈澱。(A) SDS-PAGE の結果。(B) pH と上清および沈澱中の TIP60 の割合の関係。各エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。(C) 吸光度測定の結果。橙線: 可溶性画分から沈澱を再溶解した溶液。黒線: カラム精製した TIP60 溶液。(D) アガロースゲル電気泳動の結果。

そこで、核酸とタンパク質間の相互作用を弱めるため 1 M KCl の存在下で可溶性画分からの TIP60 の沈殿実験を行った(図 3-7)。その結果、pH 5.0 から 6.5 の範囲で、80~90%の TIP60 が沈殿し、ほとんどの夾雑タンパク質は上清に残った。50%の TIP60 が沈殿する pH は 6.97 ± 0.16 と計算された。アガロースゲル電気泳動の結果、pH 6.0 から 7.0 の沈殿物には核酸がほとんど存在しないことが示唆された。以上の結果から、1 M KCl の存在下 pH 6.0~6.5 が可溶性画分から TIP60 を沈殿させるのに適した条件であることが示唆された。

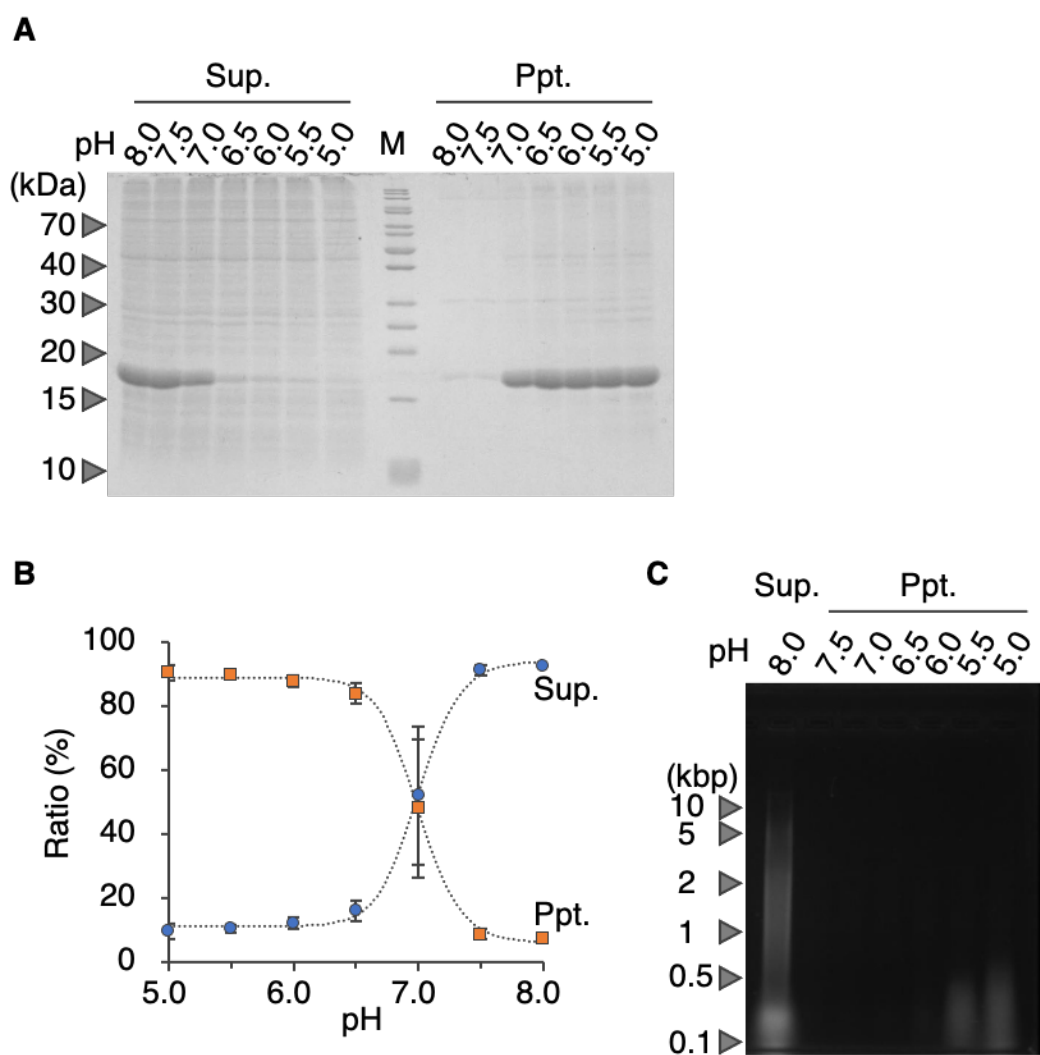


図 3-7. 1 M KCl 存在下での可溶性画分からの pH に依存した TIP60 の沈殿。(A) SDS-PAGE の結果。(B) pH と上清および沈殿中の TIP60 の割合の関係。各エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。(C) アガロースゲル電気泳動の結果。

また、核酸の除去におけるヌクレアーゼの効果も検討した(図 3-8)。ヌクレアーゼの添加によって pH 6.0 における可溶性画分からの TIP60 の沈殿は 80%以上に増加した。この結果は、TIP60 と相互作用した核酸が TIP60 の沈殿形成を阻害していたという仮説を支持する。しかし、KCl 添加時とは異なり、ヌクレアーゼ処理によって得られた TIP60 の沈殿には多くの核酸と夾雑タンパク質が含まれていた。この結果は、KCl の添加が核酸だけでなく夾雑タンパク質の除去にも効果があることを示していた。

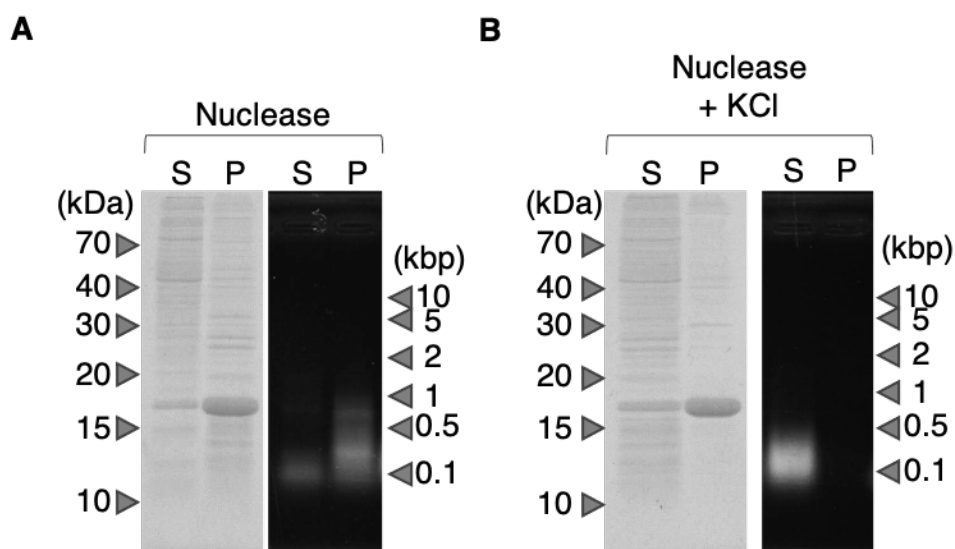


図 3-8.ヌクレアーゼ処理した可溶性画分からの pH 6.0 での TIP60 の沈殿実験の結果。左は SDS-PAGE、右はアガロースゲル電気泳動の結果である。(A) KCl 非存在下。(B) KCl 存在下。

以上の結果をもとに、溶液の pH 制御による可溶性画分からの TIP60 の精製法を検討した。精製の手順を図 3-9 に示す。

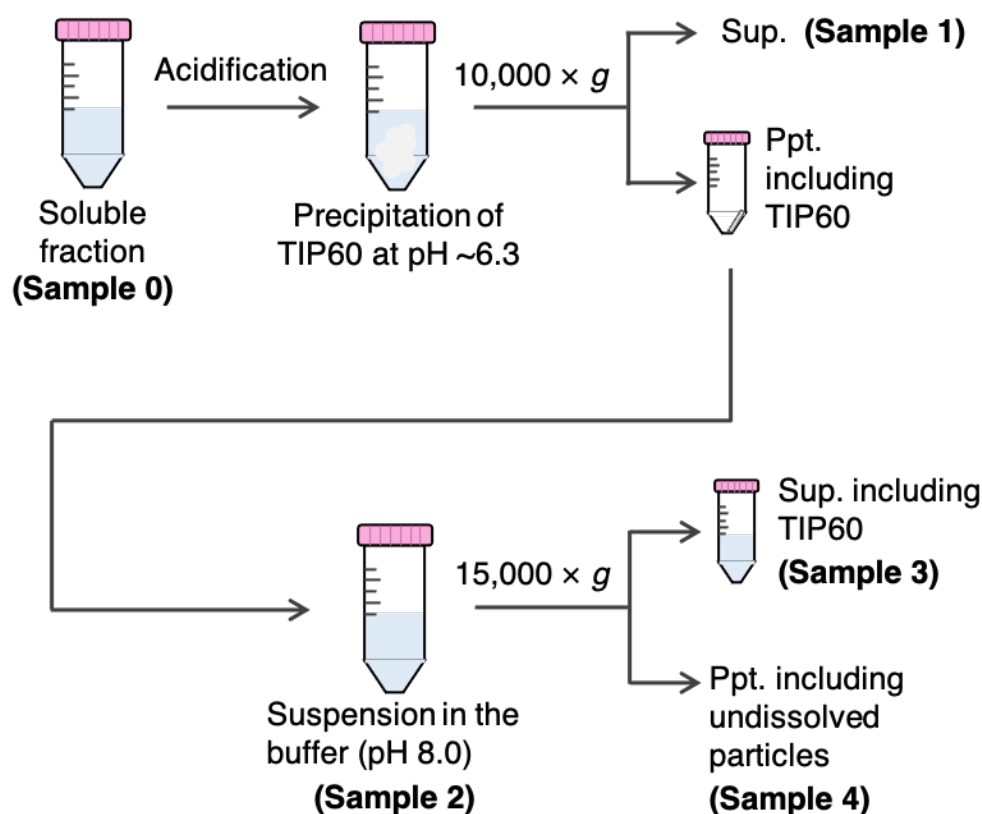


図 3-9. pH 制御による TIP60 の精製スキーム。

100 ml の培養液から回収した菌体を 20 mM Tris-HCl (pH 8) に懸濁し、超音波破碎後に遠心分離することで可溶性画分を得た (Sample 0)。可溶性画分に KCl を 1 M になるよう添加した後、20 mM 酢酸バッファ (1 M KCl 含有, pH 4.5) と混合し、溶液の pH が約 6.3 になるようにした。氷上で 30 分間静置した後、遠心分離によって沈殿を回収し、pH 8.0 のバッファに懸濁した (Sample 2)。SDS-PAGE の結果、TIP60 の大部分は沈殿の再懸濁液 (Sample 2) 中に含まれ、夾雑タンパク質は多くが上清中 (Sample 1) に残っていた (図 3-10 A)。再懸濁液 (Sample 2) の吸光度測定の結果、280 nm 付近に吸収極大をもつスペクトルが

得られ、核酸が除去されていることが示唆された (図 3-10 B)。短波長領域 (350-500 nm) において高いベースラインが見られたが、これは溶解していない粒子からの散乱に由来すると考えられる。そこで、さらに遠心分離を行い、溶解していない粒子を除去した。遠心分離後、TIP60 の大部分は上清 (Sample 3) に含まれ、未溶解のタンパク質は沈殿として除去された (Sample 4)。上清は、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーで精製した TIP60 溶液と同様の吸収スペクトルを示した (図 3-11 A)。沈澱法で精製した TIP60 の収率は $75.1 \pm 2.8\%$ であり、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーによる精製での収率 $42.7 \pm 5.5\%$ よりも向上した (図 3-11 B)。また、精製した TIP60 の純度は沈澱法では $81.2 \pm 1.3\%$ であり、Ni-NTA カラムクロマトグラフィー精製での純度 $81.0 \pm 2.6\%$ と同様の値であった (図 3-11 C)。

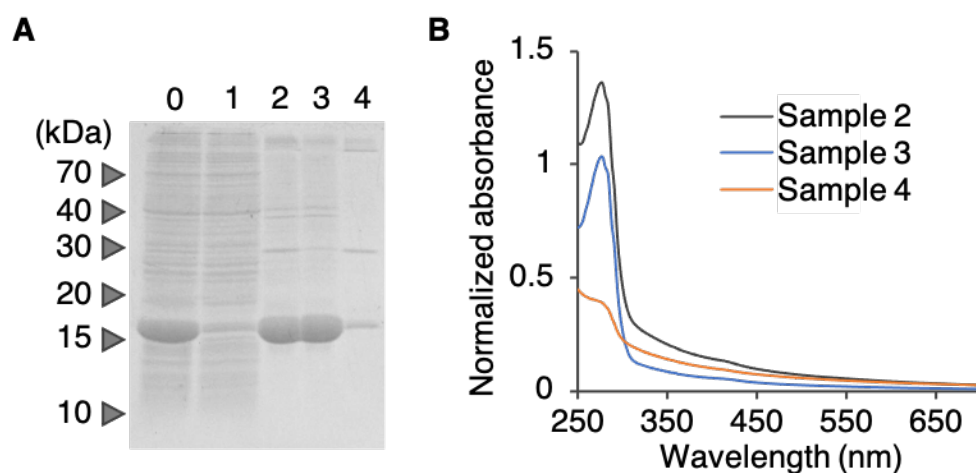


図 3-10. 沈澱法による精製の結果。(A) SDS-PAGE の結果。各レーンの番号は図 3-9 のサンプル番号を表す。(B) 吸光度測定の結果。Sample 2~4 は図 3-9 のサンプル番号を表す。

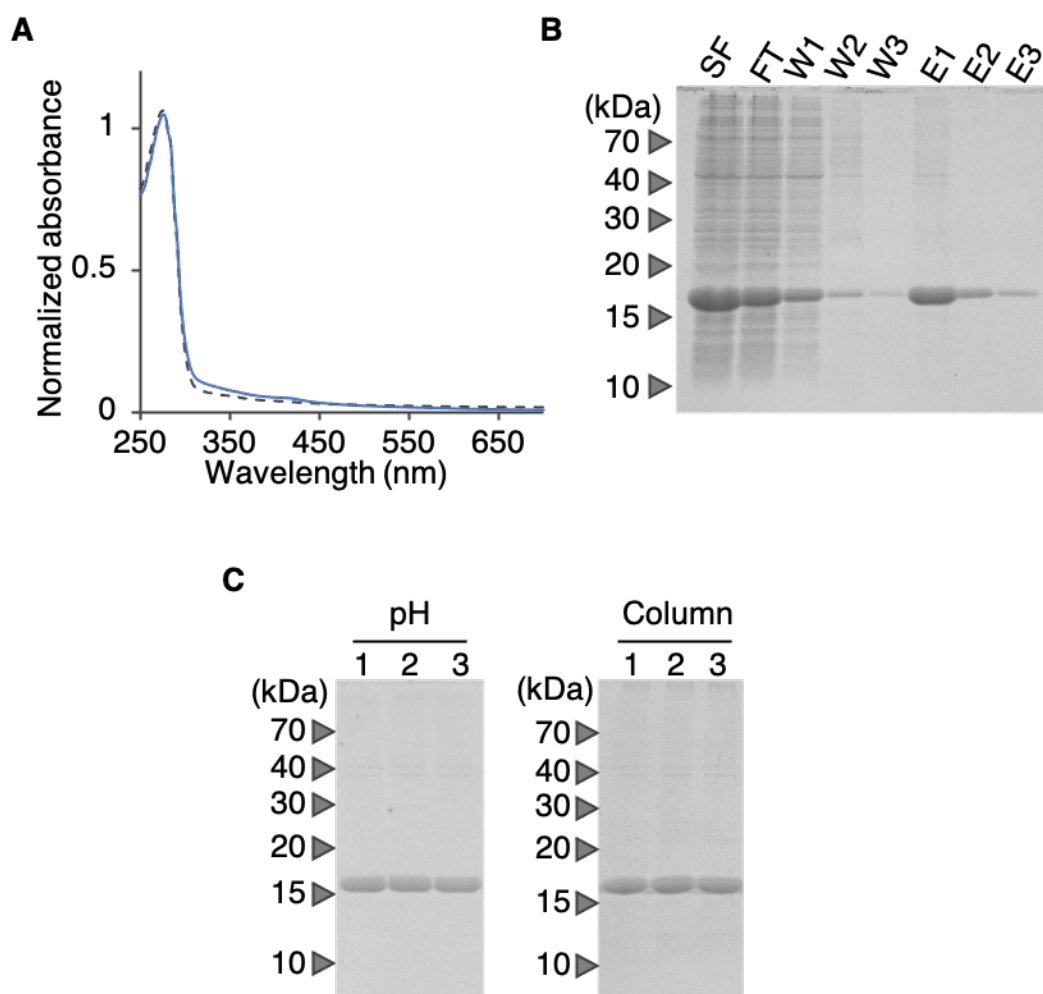


図 3-11. (A) 沈澱法により精製した TIP60 溶液(青線)と Ni-NTA カラムクロマトグラフィーにより精製した TIP60 溶液(黒点線)の吸収スペクトルの比較。(B) Ni-NTA カラムクロマトグラフィーによる精製の SDS-PAGE の結果。SF: 可溶性画分。FT: フロースルー。W1~3: 洗浄画分。E1~3: 溶出画分。(C) 沈澱法(左)およびカラムクロマトグラフィー(右)で精製した TIP60 溶液の SDS-PAGE による純度の確認。

沈澱法によって精製した TIP60 の構造は、Native PAGE、SEC、TEM によって確認された (図 3-12)。また、沈澱法により精製した TIP60 と Ni-NTA カラムクロマトグラフィーで精製した TIP60 の耐熱性を Trp 蛍光測定によって確認したところ、融解温度は~62 °C いずれの精製法でも同様の値であった (図 3-13)。

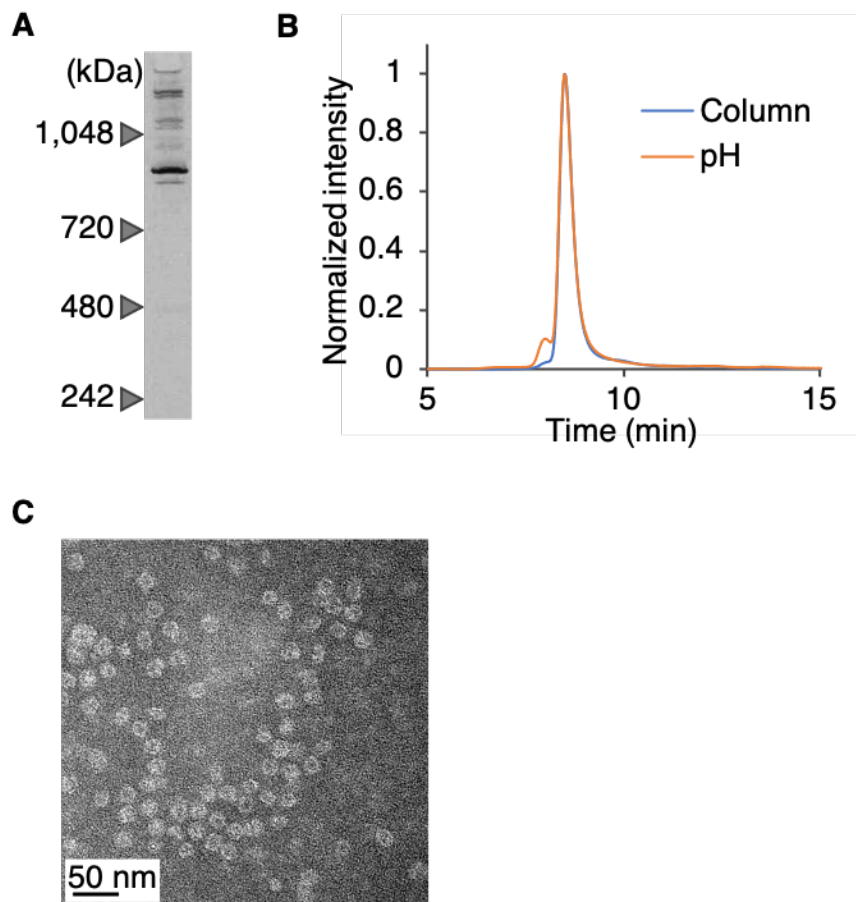


図 3-12. (A) 沈殿法により精製した TIP60 の Native PAGE の結果。(B) SEC の結果。(C) 沈殿法により精製した TIP60 の TEM 像。

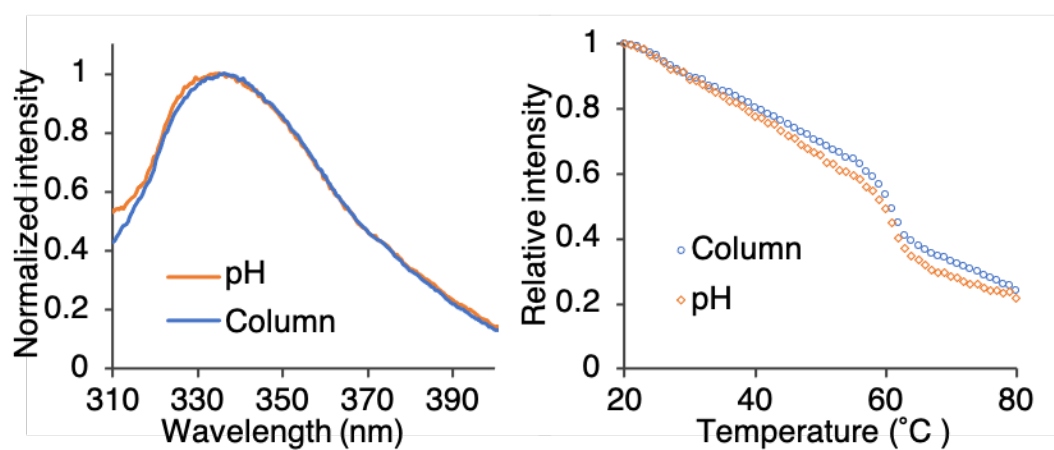


図 3-13. Trp 蛍光測定の結果。左: 20 °C における発光スペクトル。右: 336 nm の発光強度の変化の温度依存性。

500 mL の培養液から回収した野生型 (WT) および S20C 変異体についても pH 沈殿法による精製を検討した。その結果、100 mL 培養液から回収した菌体からの精製と同様の結果を示し、沈殿法をより大きなスケールに適用できることがわかった (図 3-14)。

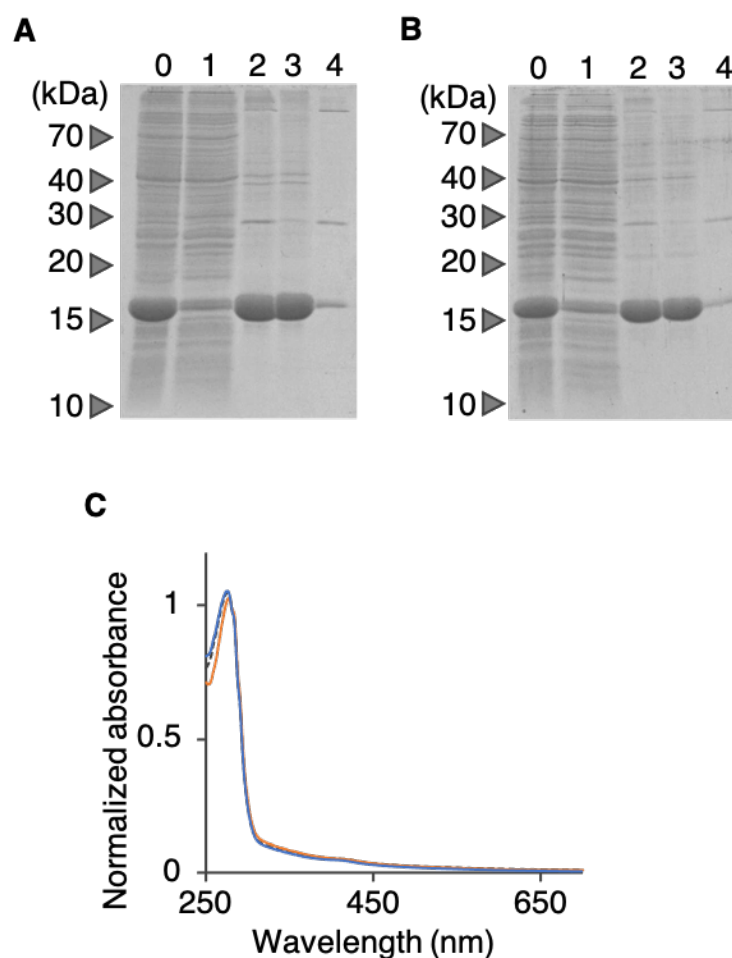


図 3-14. 500 mL 培養液から回収した菌体からの沈殿法による精製結果。(A) WT の精製における SDS-PAGE の結果。(B) S20C 変異体の精製における SDS-PAGE の結果。(C) 精製した TIP60 の吸収スペクトル。青: WT。橙: S20C。黒点線: 100 mL 培養液から回収した菌体から沈殿法で精製した WT。

3-3 TIP60 を用いたハイドロゲル形成

TIP60 の外側にシステインを導入した変異体 S20C を両端にマレイミド基を有するビスマレイミド PEG (BM-PEG, 分子量 10,000) で修飾することにより、TIP60 の 60 量体構造が分岐点となったゲルの構築を検討した (図 3-15)。

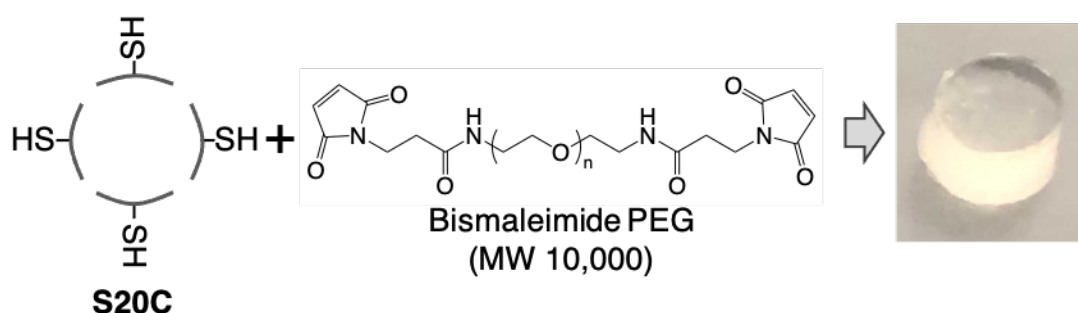


図 3-15. TIP60 ゲルの設計と 50 μM TIP60 を含む TIP60 ゲルの写真。

実際に、10~50 μM の TIP60 を BM-PEG で修飾したところ、20 μM 以上の TIP60 を用いた場合にバイアルを反転させてもサンプルが底から流れ落ちなくなり、ゲル化が示唆された(図 3-16)。

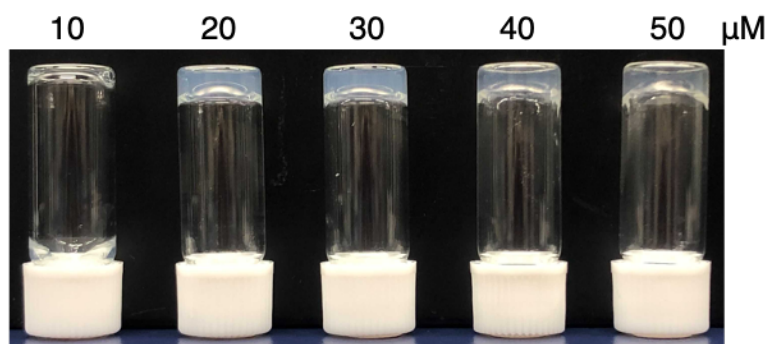


図 3-16. BM-PEG 修飾後の TIP60 (濃度: 10~50 μM)の様子。

ゲル中で TIP60 がネットワーク構造の架橋点となっていることを確認するため、SDS による TIP60 の変性がゲルに与える影響を検討した。TIP60 ゲル (50 μ M TIP60) を 2% SDS 溶液とインキュベートしたところゲルが溶解し、TIP60 の 60 量体構造がゲル構造の維持に必要であることが示唆された (図 3-17A)。TIP60 ゲルの溶解液を SDS-PAGE で分析した結果、 $49 \pm 2\%$ の TIP60 モノマーが BM-PEG で架橋され、 $21 \pm 3\%$ の TIP60 モノマーが BM-PEG の一方のマレイミドと反応し、 $30 \pm 3\%$ の TIP60 モノマーが未修飾の状態であることが示唆された (図 3-17B)。

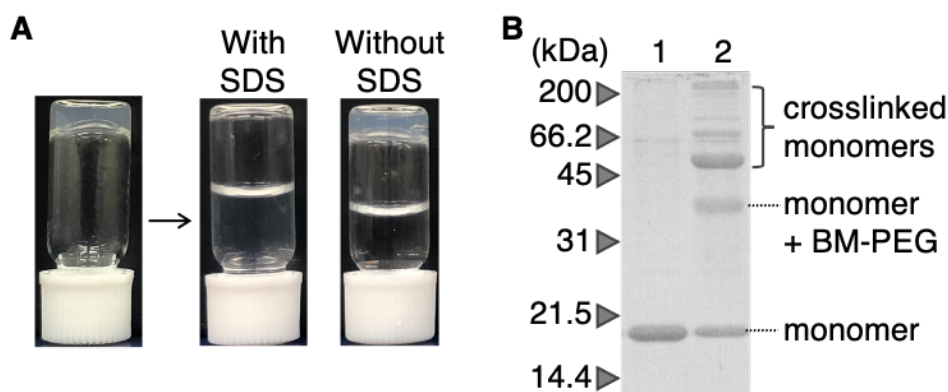


図 3-17. (A) SDS による TIP60 ゲル (50 μ M TIP60) の溶解。 (B) TIP60 ゲル溶解液の SDS-PAGE の結果。レーン 1: 未修飾 S20C 変異体。レーン 2: ゲル溶解液。

50 μ M TIP60 を含むゲルについて、回転式レオメーターを用いてレオロジー特性を評価した。25 $^{\circ}$ C で 0.01-8% のひずみでひずみ掃引試験を行い、ゲルの線形粘弾性領域を調べた (図 3-18 A)。周波数掃引試験では、25 $^{\circ}$ C での実験周波数範囲 (0.1-10 Hz) において、貯蔵弾性率 (G') が損失弾性率 (G'') よりも約 1 桁大きいことが示され、ゲル状態であることが示唆された (図 3-18 B) ¹³⁵。

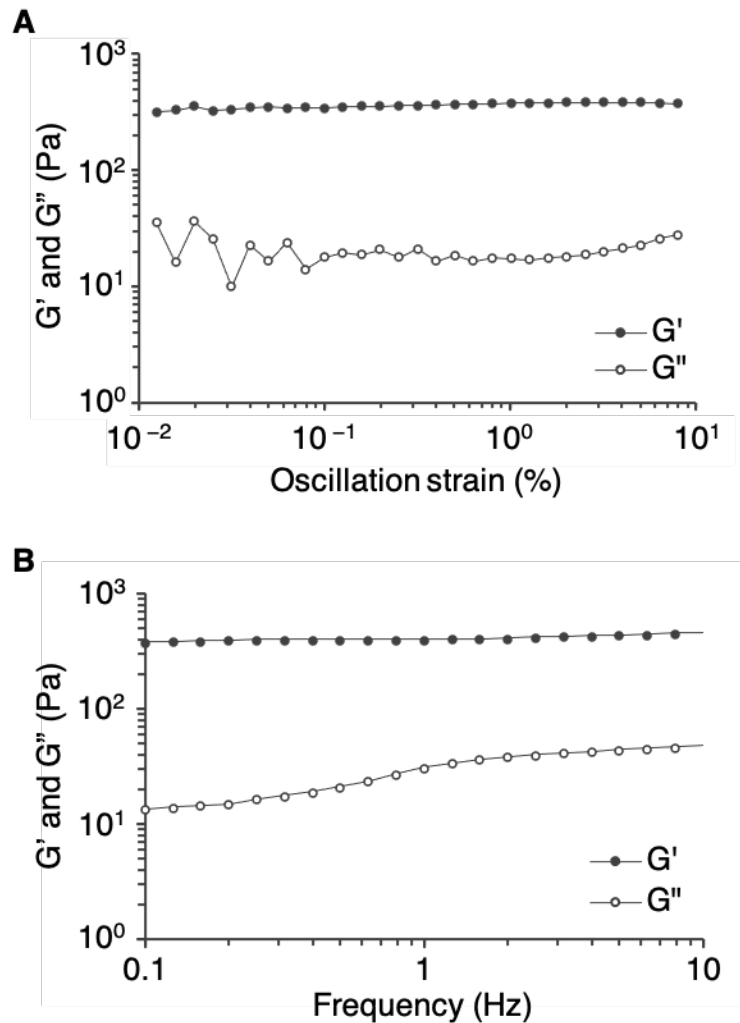


図 3-18. 50 μM TIP60 を含むゲルのレオロジー特性。(A) ひずみ掃引試験の結果。(B) 周波数掃引試験の結果。

3-4 TIP60 ゲルの熱応答性ゾルゲル転移の検証

以前の研究結果から、TIP60 の 60 量体構造は加熱によっても壊れることが明らかになっている⁸⁵。そこで、TIP60 ゲルの構造に対する加熱の影響を検証した。30~80 $^{\circ}\text{C}$ に設定した湯浴で 5 分間加熱した後の TIP60 ゲルの様子を観察したところ、70 $^{\circ}\text{C}$ および 80 $^{\circ}\text{C}$ で加熱したゲルは加熱後にバイアルを反転させるとサンプルがバイアルの底から流れ落ち、ゾル化したことが確認された(図 3-19 A)。一方で、30~60 $^{\circ}\text{C}$ で加熱したゲルでは目視でゲルの状態に大きな変化は見られ

なかった。TIP60 の変性温度は $\sim 61^{\circ}\text{C}$ であることから⁸⁵、加熱によるゲルからゾルへの転移は TIP60 の変性に関連していると考えられる。 60°C の湯浴で2 時間加熱したところ、溶媒の染み出しによる収縮は見られたが、ゾル化は観察されなかった (図 3-19 B)。

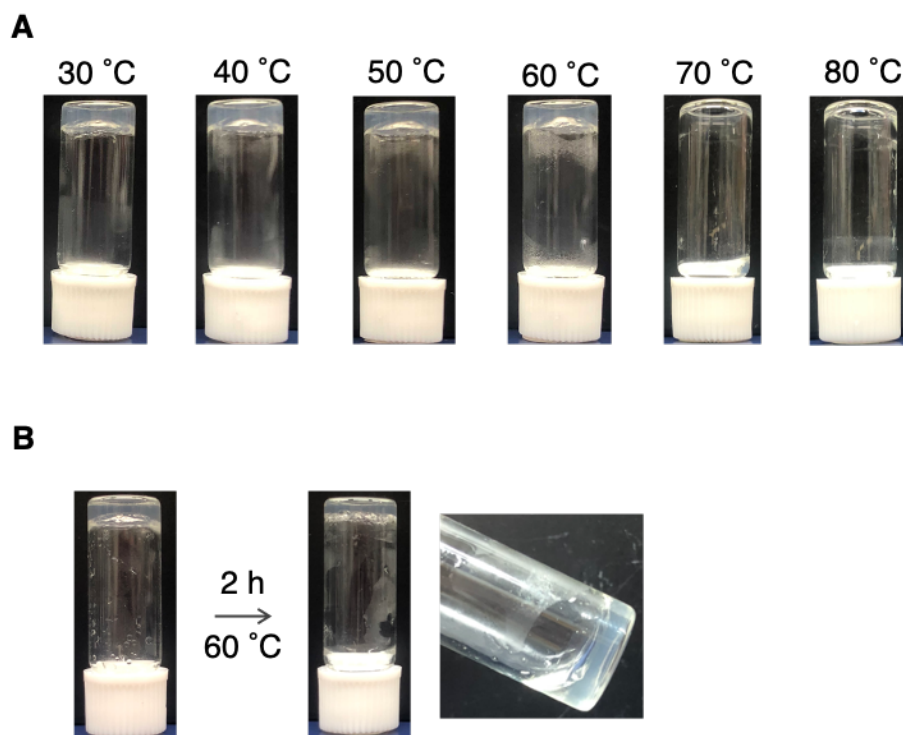


図 3-19. (A) $30\sim 80^{\circ}\text{C}$ の湯浴で5 分間加熱した後の TIP60 ゲルの様子。(B) 60°C で2 時間加熱した後の TIP60 ゲルの様子。

興味深いことに、 80°C 5 分間の加熱によりゾル化したサンプルは、室温で冷却すると再び素早くゲル化した (図 3-20)。この可逆的なゾルゲル転移は、 80°C 5 分間加熱の条件では少なくとも10 回繰り返すことができた (図 3-21 A)。また、 80°C での加熱時間を30 分、60 分に延長しても、室温での冷却による可逆的なゲル化が観察された (図 3-21 B)。

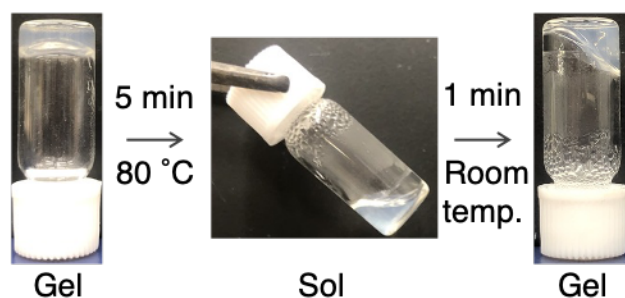


図 3-20. TIP60 ゲルの加熱冷却による可逆的なゾルゲル転移の様子。

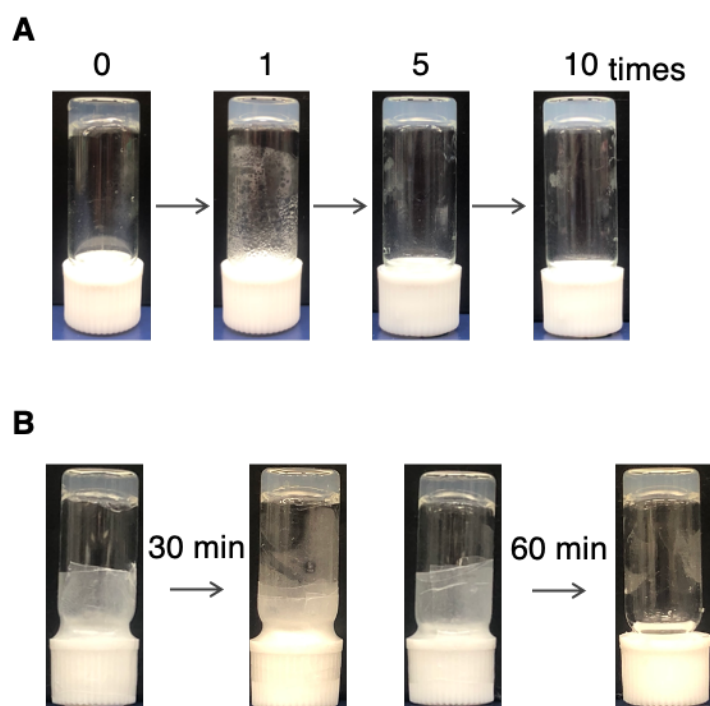


図 3-21. (A) 80 °C で 5 分加熱を繰り返した後の再ゲル化の様子。(B) 80 °C で 30 分および 60 分加熱後の再ゲル化の様子。

ゲルの加熱冷却による G' と G'' の変化を図 3-22 に示す。ゲルの乾燥が測定結果に与える影響を最小限にするため、測定は 50 °C から開始し、5 °C/min の速度で 70 °C まで昇温した。50 °C でのデータは、 G' が G'' よりも大きいことから、試料がゲル状態にあることを示唆した。 G' の値は温度の上昇とともに減少し、63.2 °C から 64.2 °C の間で $G'=G''$ となるクロスオーバー点が見られたことから、

この温度以上でゲルがゾルに変化したことが示唆された。冷却すると、58.9 °C から 57.9 °C の間に再び $G' = G''$ となるクロスオーバー点が観察され、ゾルからゲルへの可逆的な転移が示唆された。クロスオーバー点 ($G' = G''$) の温度は、TIP60 の変性温度とよく一致していた。

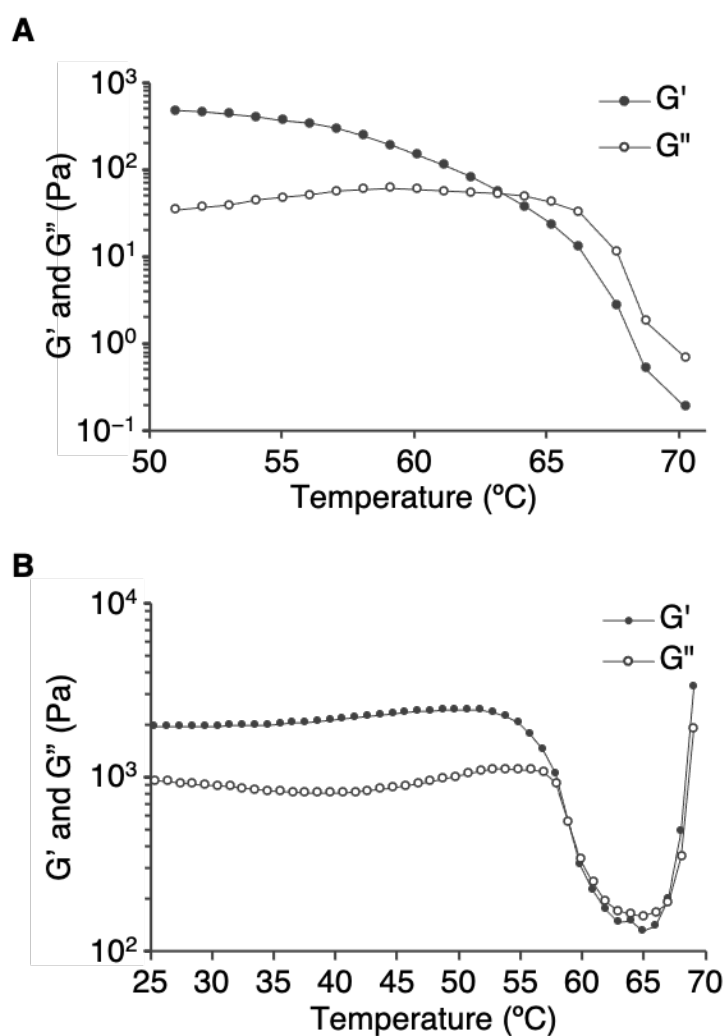


図 3-22. 貯蔵弾性率および損失弾性率 (G' および G'') の温度依存性。(A) 加熱過程 (50 °C~70 °C)。(B) 冷却過程 (70 °C~25 °C)。

加熱による TIP60 ゲルのゾルゲル転移と TIP60 の構造変化の関係を調べるため、小角 X 線散乱 (SAXS) による解析を行った。希薄な TIP60 溶液は、図 3-23A のように周期的な散乱強度の極大を有する、均質な球状粒子に特徴的な散乱パターンを示すことが先行研究でわかっている⁸⁵。TIP60 ゲルは、TIP60 溶液と同様の位置に周期的な極大を有する散乱パターンを示し、ゲル中で TIP60 が粒子構造を維持していることが示唆された (図 3-23 A)。低角側ではゲルサンプルは希薄な TIP60 溶液とは異なる散乱パターンを示したが、これはゲル化に必要な高濃度のタンパク質存在下での粒子間干渉によると考えられる。粒子間干渉の影響により、ギニエプロットによる慣性半径 R_g の推定は困難であった。二点間距離分布関数 ($P(r)$) を図 3-23B に示す。右側にシフトしたピークを有する $P(r)$ の分布は、TIP60 の中空構造を反映していると考えられる。 $P(r)$ から推定された実空間 R_g はゲルでは 8.92 nm, 希薄な TIP60 溶液では 8.90 nm であった。また、ゲルサンプルの最大長 (D_{max}) は 22 nm であり、溶液中の TIP60 の測定結果から得られた値と同等であった。したがって、ゲルサンプルからの散乱パターンは主に TIP60 に由来するものであり、PEG 分子の寄与はほとんどないと考えられる。

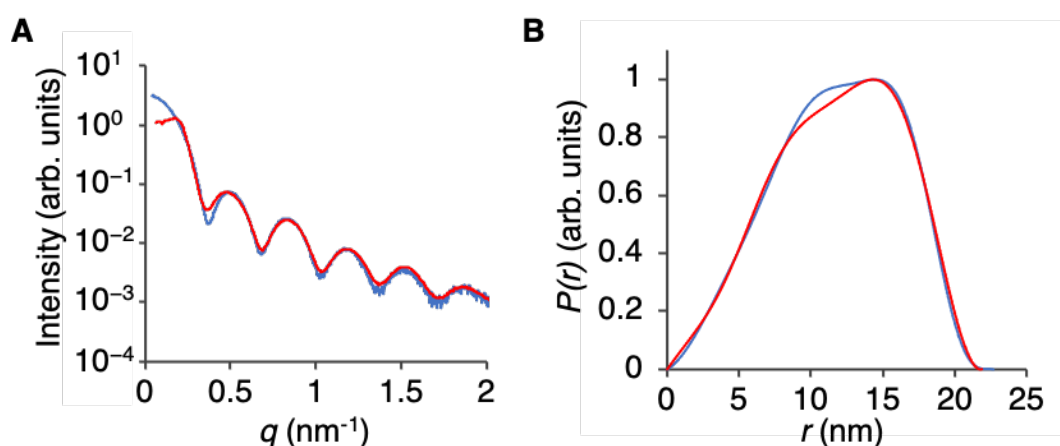


図 3-23. (A) ゲル (赤) および希薄な TIP60 溶液 (青) の SAXS の散乱パターン。希薄な TIP60 溶液の SAXS の散乱強度は無限濃度に外挿した。(B) ゲル (赤) および希薄な TIP60 溶液 (青) の二点間距離分布関数 ($P(r)$)。

加熱、冷却処理を行った後の TIP60 ゲルサンプルからも、周期的な極大を有する散乱パターンが観察された (図 3-24 A)。加熱前と比較してパターンはわずかに平坦化したが、これはおそらく粒子構造の均一性が低下したためだと考えられる。この結果は、TIP60 の粒子構造が熱によるゾルゲル転移後も残っていることを示唆していた。加熱冷却中のタンパク質の変性についてさらに調べるため、20 °C から 80 °C まで昇温 (5 °C/min) し、80 °C で 5 分間インキュベート、80 °C から 20 °C まで冷却 (5 °C/min) する過程での SAXS の散乱パターンを測定した (図 3-24 B)。ゲルからの散乱パターンは、20 °C から 70 °C の昇温過程では低角側のピーク強度が減少する以外にほとんど変化は見られなかった。70 °C 以上になると徐々に周期的な極大が消失し、TIP60 の粒子構造が加熱により崩壊していることが示唆された。散乱パターンの変化が起こった温度は TIP60 のゲルからゾルへの転移が目視で観察された温度と一致していた。80 °C で 5 分間インキュベートした後のクラツキープロットは、 $q \sim 0.3 \text{ nm}^{-1}$ に単一のピークを持つベル型のパターンを示し、TIP60 の構造とは異なる球状構造の存在を示唆した。冷却過程ではサンプルが 70 °C 以下になると周期的な極大を有する散乱パターンが回復し始め、散乱パターンの変化は 50 °C でほとんど完了した。70 °C ~ 80 °C への加熱過程と 70 °C ~ 50 °C への冷却過程の詳細なデータは図 3-25 に示す。以上のデータは、ゲルの加熱により粒子構造が失われても冷却過程で再会合し粒子構造を再形成できる TIP60 が存在することを示唆していた。繰り返しの加熱冷却処理による散乱パターンの変化は、1 回目が最も顕著であり、6 回および 12 回の加熱冷却処理後も周期的な極大を有する散乱パターンが見られた (図 3-26 A)。30 分および 60 分間加熱処理をした後冷却したサンプルでも、周期的な極大を有する散乱パターンが観察された (図 3-26 B)。

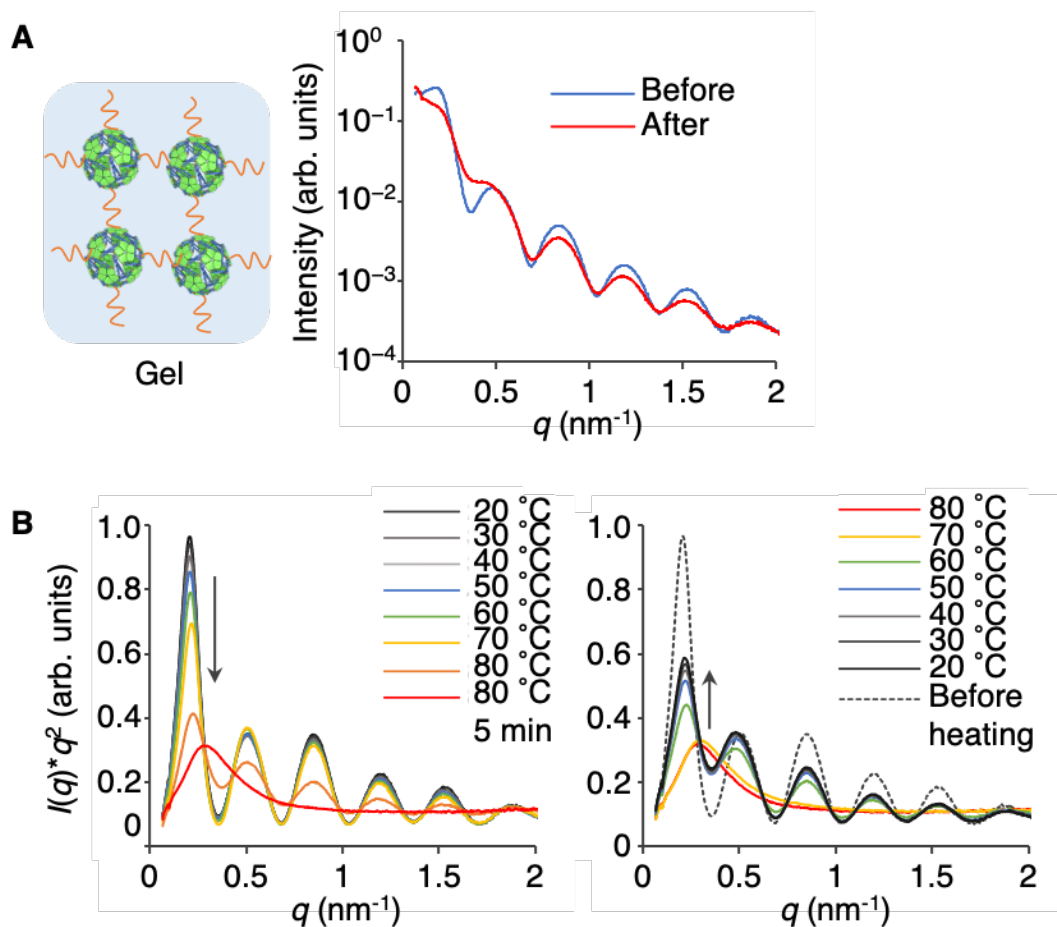


図 3-24. TIP60 ゲル (50 μM) の SAXS 測定結果。(A) 加熱冷却前後の散乱パターン。(B) 加熱過程 (左) および冷却過程 (右) でのクラツキープロット。

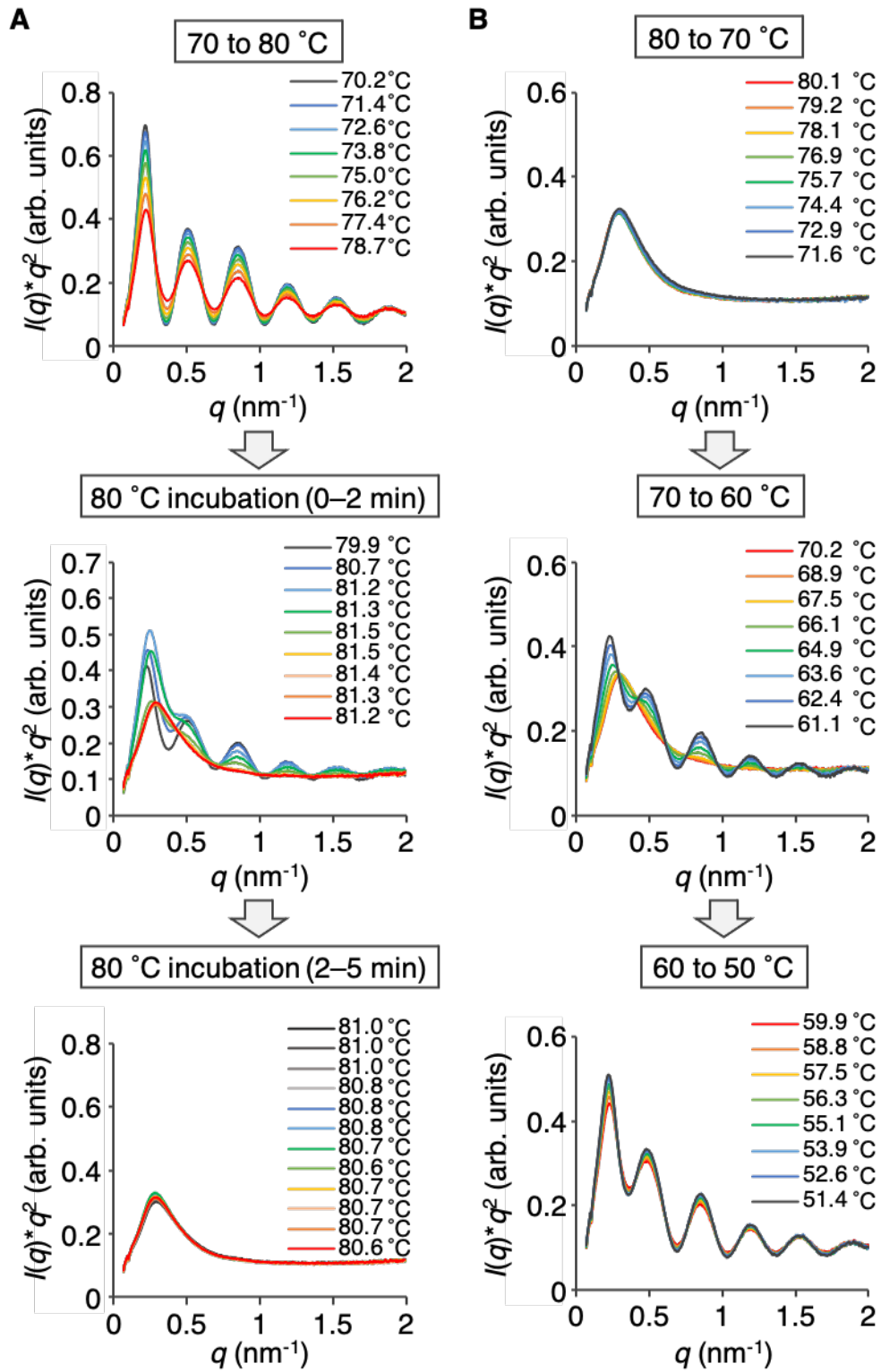


図 3-25. TIP60 ゲルの加熱冷却過程でのクラツキープロットの詳細。(A) 70 °C~80 °C インキュベート過程。(B) 80~50 °C 冷却過程。

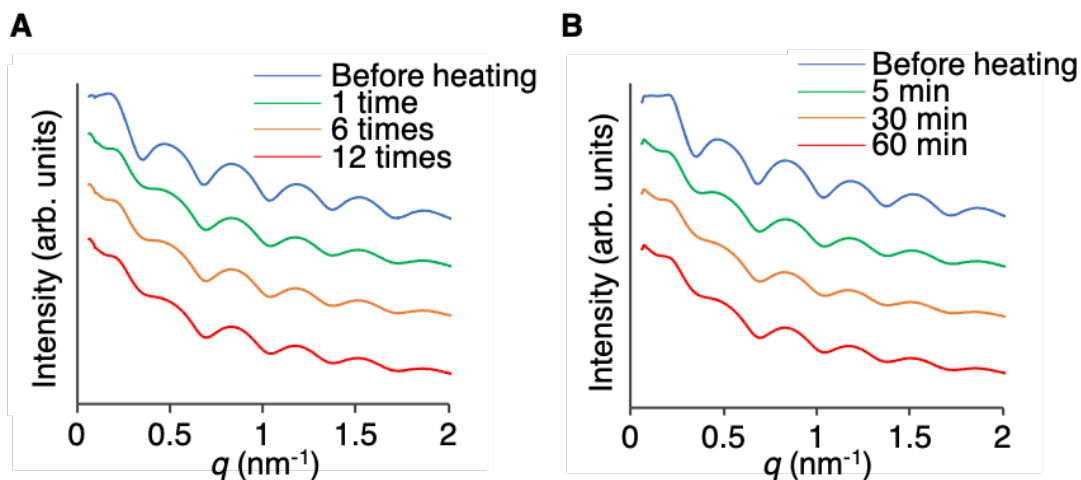


図 3-26. (A) 繰り返し加熱後のゲルの SAXS 測定結果。(B) 長時間加熱後のゲルの SAXS 測定結果。

比較のため、システインを持たず、PEG 修飾もしていない高濃度の TIP60 溶液 (50 μ M) についても SAXS 測定を行った (図 3-27, 3-28)。高濃度 TIP60 溶液では、加熱冷却処理の後で、周期的な極大を有する散乱パターンの回復はほとんど見られなかった。加熱過程でのクラツキープロットの変化はゲルと同様であった。80 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした後、クラツキープロットは $q \approx 0.24 \text{ nm}^{-1}$ にシャープなピークを有するベル型パターンを示し、その散乱強度はゲルサンプルで見られたものよりも高かった。また、80 $^{\circ}$ C、5 分間インキュベートの後に見られたピークの形状は冷却後もほとんど変化しなかった。加熱冷却処理後の TIP60 溶液を Native PAGE で分析したところ、60 量体構造を示唆するバンドは減少し、低分子量側にスメアなバンドが見られた (図 3-29)。これは、加熱冷却処理後に可溶性の凝集体が存在することを示唆しており、クラツキープロットで見られた不可逆なベル型パターンはこの凝集体に起因する可能性があると考えられた。

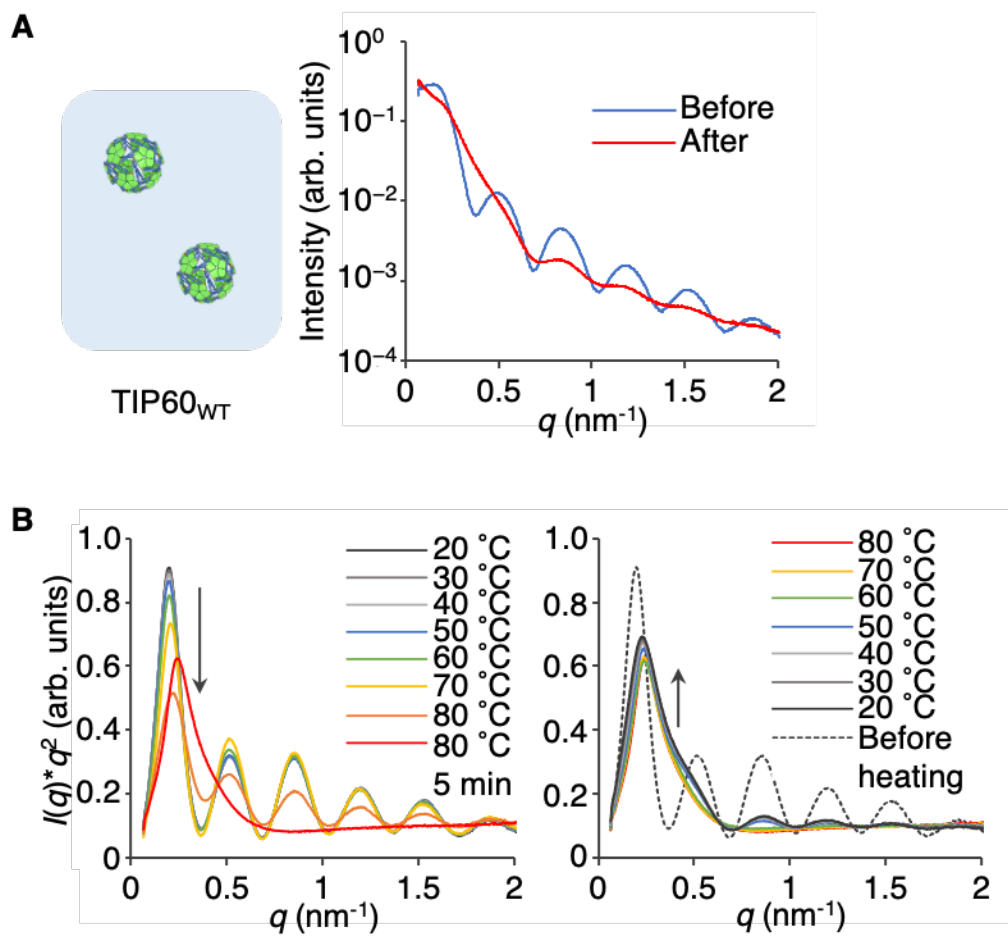


図 3-27. TIP60 溶液 (50 μ M) の加熱冷却処理による変化。(A) 加熱冷却処理前後での SAXS の散乱パターン。(B) 加熱過程 (左) と冷却過程 (右) でのクラツキープロット。

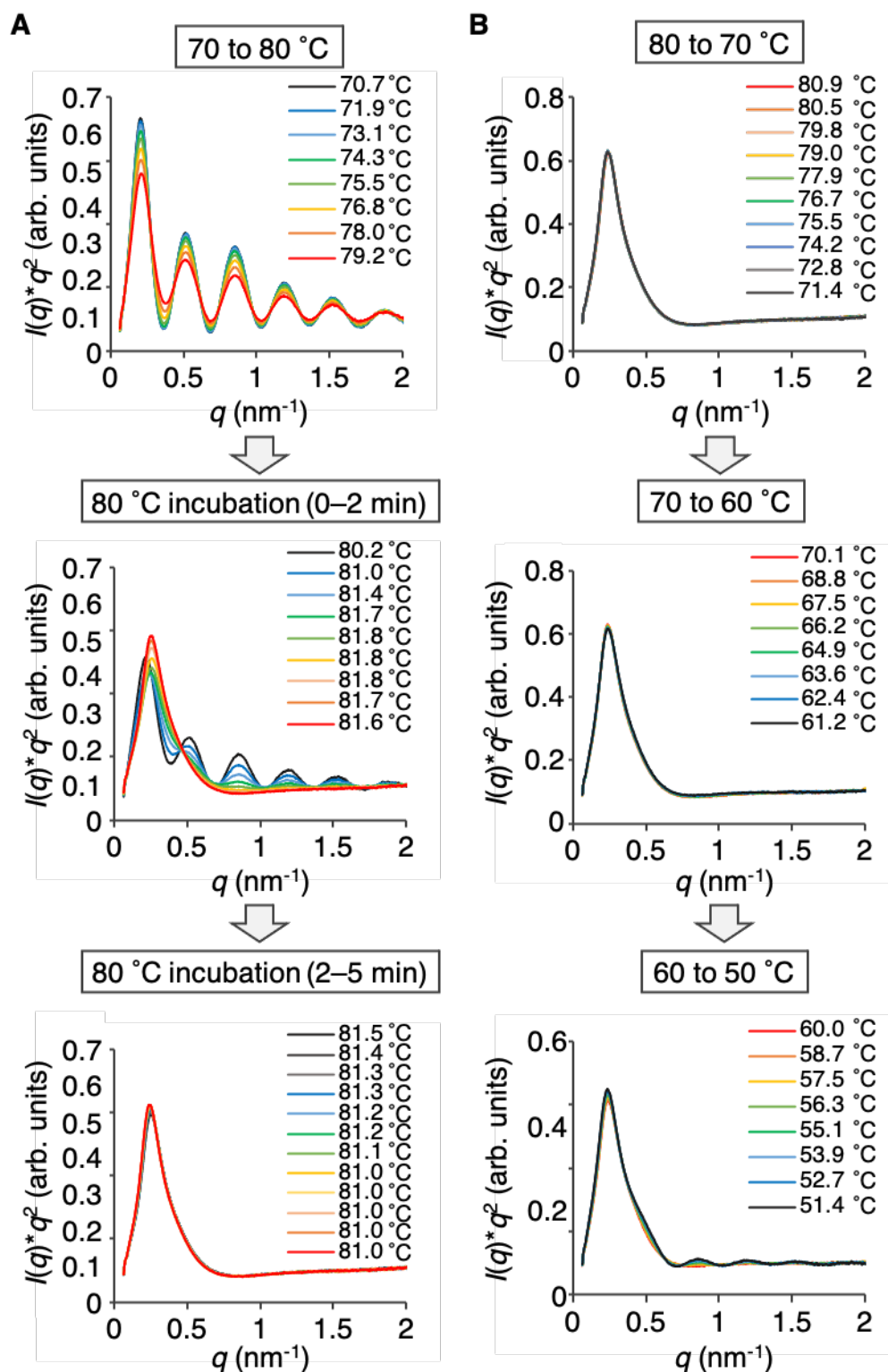


図 3-28. TIP60 溶液 (50 μ M) の加熱冷却過程でのクラツキープロットの詳細。
(A) 70 °C~80 °C インキュベート過程。(B) 80~50 °C 冷却過程。

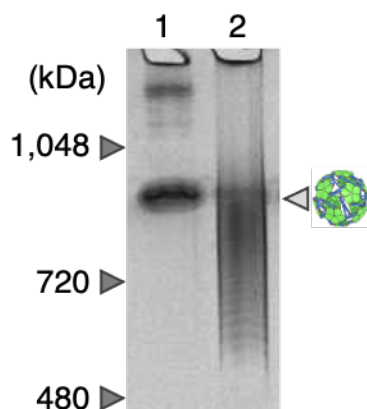


図 3-29. 加熱冷却処理前後の TIP60 溶液 (50 μ M) の Native PAGE の結果。レーン 1: 加熱冷却処理前。レーン 2: 加熱冷却処理後。

加熱冷却処理後の TIP60 の可逆的な構造変化がゲル化の影響であるかを確認するため、表面 PEG 化 TIP60 溶液についても実験を行った(図 3-30)。50 μ M TIP60 (S20C) の PEG マレイミド (分子量 10,000)による修飾率は $59 \pm 2\%$ であった。SAXS 測定の結果、表面 PEG 化 S20C 溶液中でも TIP60 の可逆的な構造変化が示唆された。このことから、タンパク質の PEG 化が凝集体の形成を防ぎ¹³⁶⁻¹³⁸、球状構造の回復率の向上をもたらしたことが示唆された。トリプトファン蛍光測定の結果、表面 PEG 化 TIP60 の耐熱性は TIP60 (WT) と同様であった ($T_m = \sim 65^\circ\text{C}$) (図 3-31)。

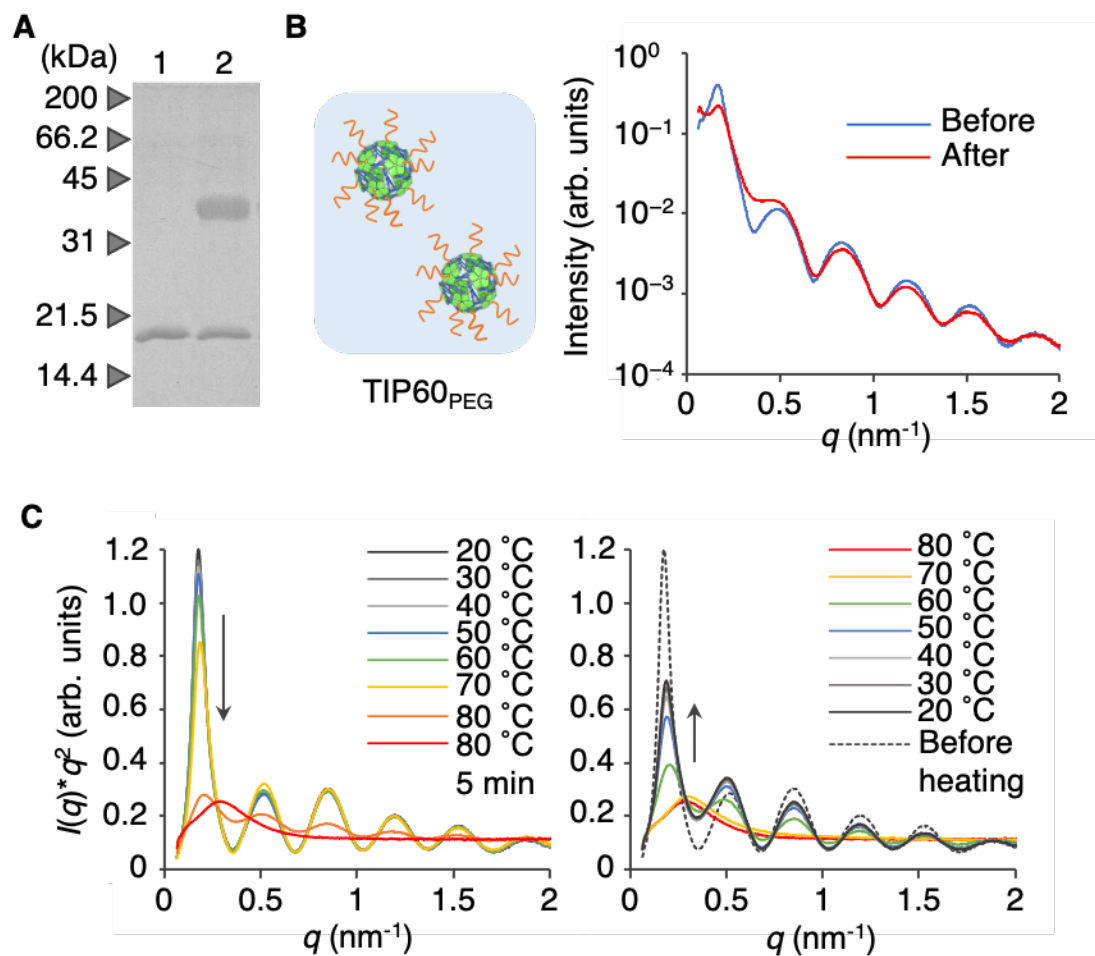


図 3-30. 表面 PEG 化 TIP60 (S20C) の加熱冷却処理による変化。(A) SDS-PAGE の結果。レーン 1: 未修飾 S20C。レーン 2: PEG マレイミド (分子量 10,000) で修飾した S20C。(B) 加熱冷却処理前後での SAXS の散乱パターン。(C) 加熱過程 (左) と冷却過程 (右) でのクラツキープロット。

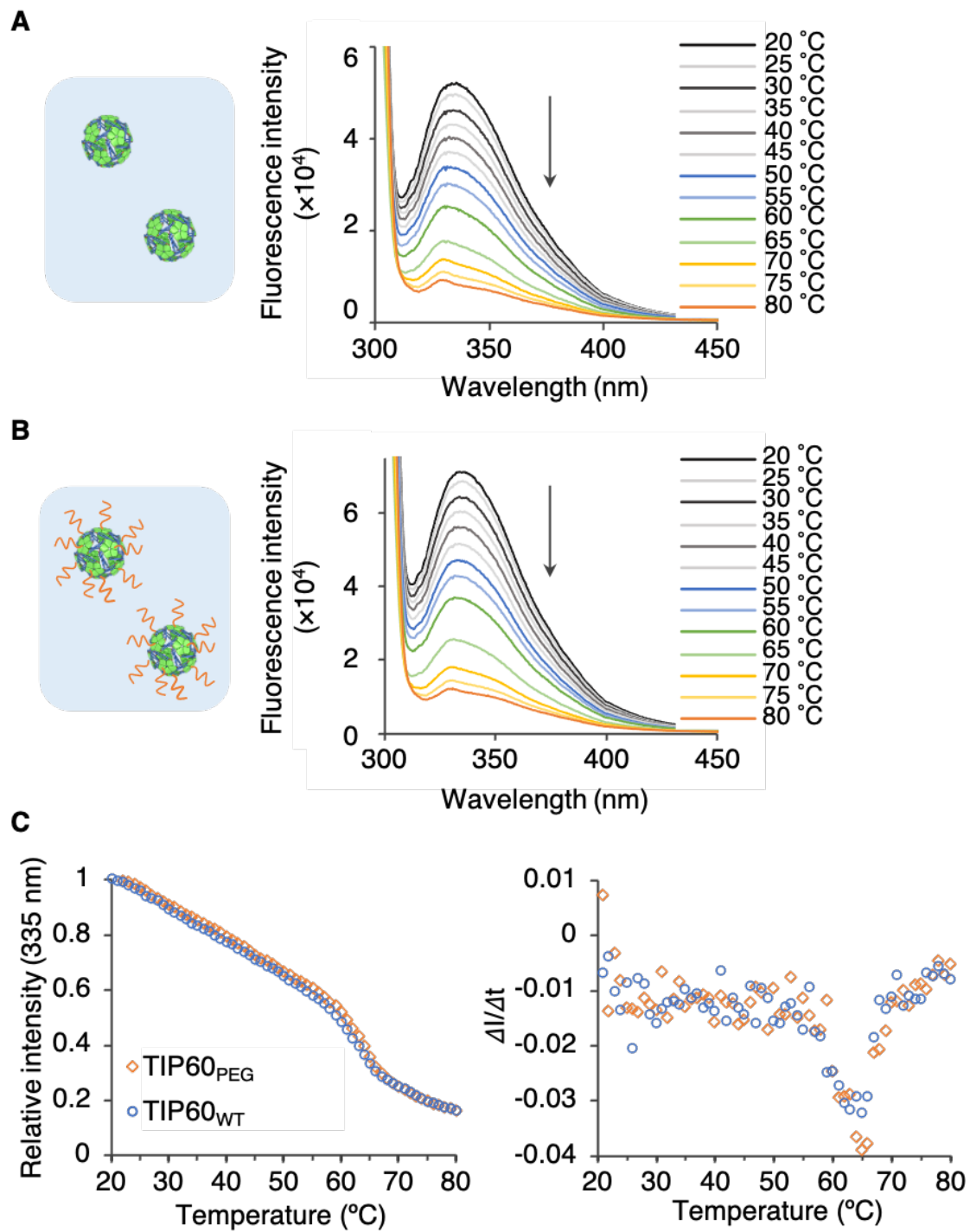


図 3-31. トリプトファン蛍光測定の結果。(A) 昇温過程での TIP60 (WT) 溶液の発光スペクトルの変化。(B) 昇温過程での表面 PEG 化 TIP60 (S20C) 溶液の発光スペクトルの変化。(C) 左: 335 nm の相対散乱強度の温度依存的な変化。20 °C での散乱強度を 1 とした。右: 相対散乱強度の変化量と温度の関係。

加熱前のゲルの散乱パターンでは、低角側 $q = 0.05\text{--}0.35\text{ nm}^{-1}$ にピークが存在し、粒子間干渉の影響を示唆していた (図 3-23 A)。TIP60 粒子の空間相関についての示唆を実験的構造因子 $S_{\text{eff}}(q)$ から得ることができる^{139,140}。定性的には、 $S_{\text{eff}}(q)$ の q^* におけるピークは、平均最近接距離 $d \approx 2\pi/q^*$ で粒子が整列した平面からのブラッグ反射に由来すると解釈できる。ゲルと TIP60 溶液 (50 μM) の見かけの実験的構造因子 $S_{\text{eff}}(q)$ は、それぞれの散乱強度を、濃度を無限希釈に外挿した TIP6 溶液の散乱強度で割ることで得られた (図 3-32 A)。ゲルサンプルにおける平均最近接距離 d は $q^* \approx 0.22\text{ nm}^{-1}$ (ピークトップ) から $\sim 29\text{ nm}$ と推定された。TIP60 の直径が $\sim 22\text{ nm}$ であることから、タンパク質表面間の距離は $\sim 7\text{ nm}$ と推定される。これは、PEG の分子量から推定される直径 ($\sim 9.2\text{ nm}$) と近い値であった¹⁴¹。 $S_{\text{eff}}(q)$ 中のシャープなピークは表面 PEG 化 S20C 変異体でも見られ、平均最近接距離 d は $q^* \approx 0.18\text{ nm}^{-1}$ (ピークトップ) から $\sim 35\text{ nm}$ と推定された (図 3-32 A)。タンパク質表面間の距離は $\sim 13\text{ nm}$ と推定され、ゲルサンプルのおよそ 2 倍であった。これは、表面 PEG 化 S20C 変異体では TIP60 間に 2 分子の PEG が存在することを反映していると考えられる。TIP60 表面に PEG が存在することで分子間での反発が強まったことが、凝集抑制に繋がった可能性がある。加熱後のサンプルでは、ゲルと表面 PEG 化 S20C 変異体では実験的構造因子 $S_{\text{eff}}(q)$ も回復する傾向にあった (図 3-32 B-D)。

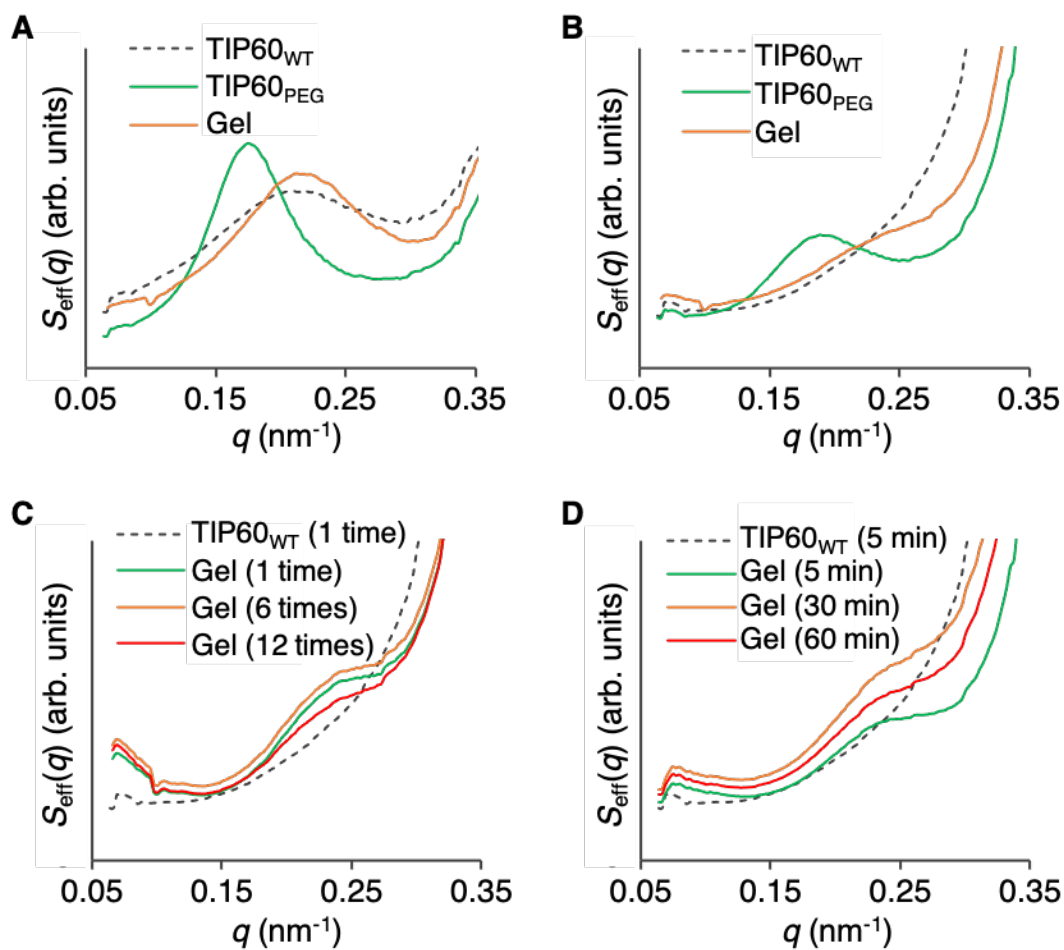


図 3-32. 加熱冷却前後のサンプルの実験的構造因子 $S_{\text{eff}}(q)$ 。(A) 加熱前のサンプル。(B) 加熱後のサンプル。(C) 繰り返し加熱冷却後のゲルサンプル。(D) 長時間加熱後のゲルサンプル。(C),(D)中の TIP60_{WT} のデータは(B)中のものと同じである。

熱によるゾルゲル転移実験中に、1 回目のゾルゲル転移の前後によるゲルの見た目の変化を観察した(図 3-33)。加熱前のゲルは不均質なモザイク状の見た目であったが、これはチオールとマレイミドの反応が速く、系が均質に混合される前にゲル化が進行するためだと考えられる。熱によるゾルゲル転移を経たゲルでは、モザイク状の見た目が減少し、見た目の均質性が上昇したことから、ゾルゲル転移の過程でゲルネットワーク構造が再構成されている可能性が示唆された。

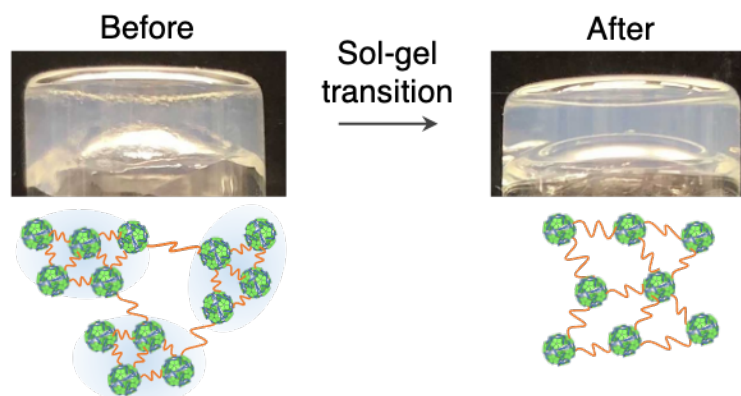


図 3-33. 熱によるゾルゲル転移前後でのゲルの見た目の変化。

3-5 TIP60 ゲルを用いた酸化還元に応答した化合物放出の検討

第 2 章での実験結果より、TIP60 の内側に導入したシステインを酸化還元に応答した化合物の内包・放出に利用できることがわかっている。そこで、TIP60 ゲルの構築に、TIP60 の内外両方にシステインを導入した二重変異体(S20C, S50C)を用いることで、TIP60 ゲルを刺激応答的な化合物の内包と放出に利用できる可能性を検討した。二重変異体を BM-PEG と反応させて形成したゲルは、S20C 変異体をゲル化した際と同様の修飾率を示した (図 3-34 A)。二重変異体ゲルは 80 °C で 20 秒間 (ゾルゲル転移が起こる最短の加熱時間) 加熱してゾルゲル転移させた。SAXS 測定の結果、二重変異体ゲルでも 80 °C で 20 秒間の加熱と冷却の後にゲル中で TIP60 が粒子構造を維持していることが示唆された (図 3-34 B)。酸化還元に応答した二重変異体ゲルからの化合物放出実験のスキームを図 3-35 に示す。ゲルを 30 °C で 10 時間、DTNB 溶液中でインキュベートし、二重変異体ゲル中の未修飾のシステインを修飾した。インキュベート後、ゲルは黄色くなり、チオール-ジスルフィド交換反応による TNB の生成が示唆された (図 3-36 A)。ゲル中に残っている未反応の DTNB と、生成した TNB を除去するためゲルをバッファで洗浄すると、ゲルの色も消失した。コントロールとして、S20C ゲルでも同様の実験を行った (図 3-36 B)。修飾反応により生成した TNB

の量から、内側に導入したシステインの DTNB による修飾率はおよそ 60%と推定された。続いて、TCEP の添加によるゲルからの化合物放出を検証した。TCEP の添加後、ゲルは徐々に黄色く呈色し、TNB の生成が示唆された。ゲルから 80% の TNB が放出される時間は、二重変異体ゲルではおよそ 3.9 時間であったのに対し、S20C ゲルでは 2 時間であった (図 3-36 C, D)。二重変異体ゲルでの長い放出時間は、第 2 章で見られたように TCEP の TIP60 内側へのアクセスが遅いことと関係している可能性がある。二重変異体ゲルの DTNB 修飾実験は、TIP60 の内部空間がゲル化後も化合物修飾に利用できることを示し、ゲルのネットワーク構造や TIP60 の構造に影響を与えずに、刺激応答的に化合物を放出させられることを示唆した。

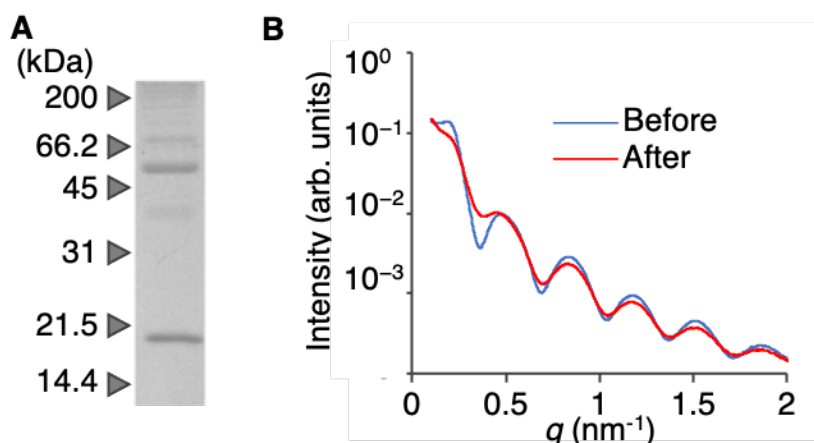


図 3-34. (A) DM ゲルの SDS-PAGE の結果。(B) 未処理および 80 °C 20 秒間で加熱後冷却した DM ゲルの SAXS 測定結果。

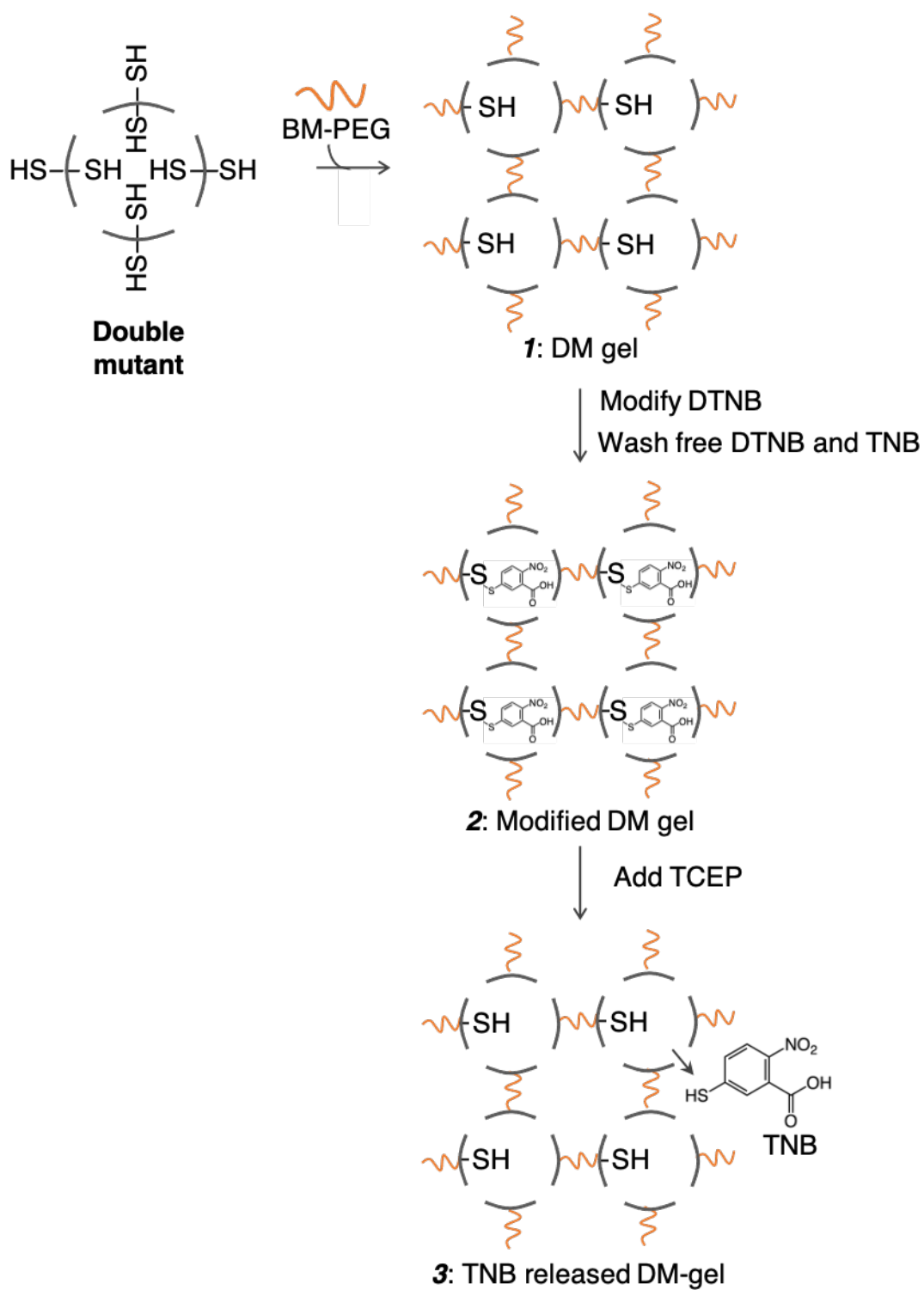


図 3-35. TIP60 ゲルの DTNB 修飾のスキーム。

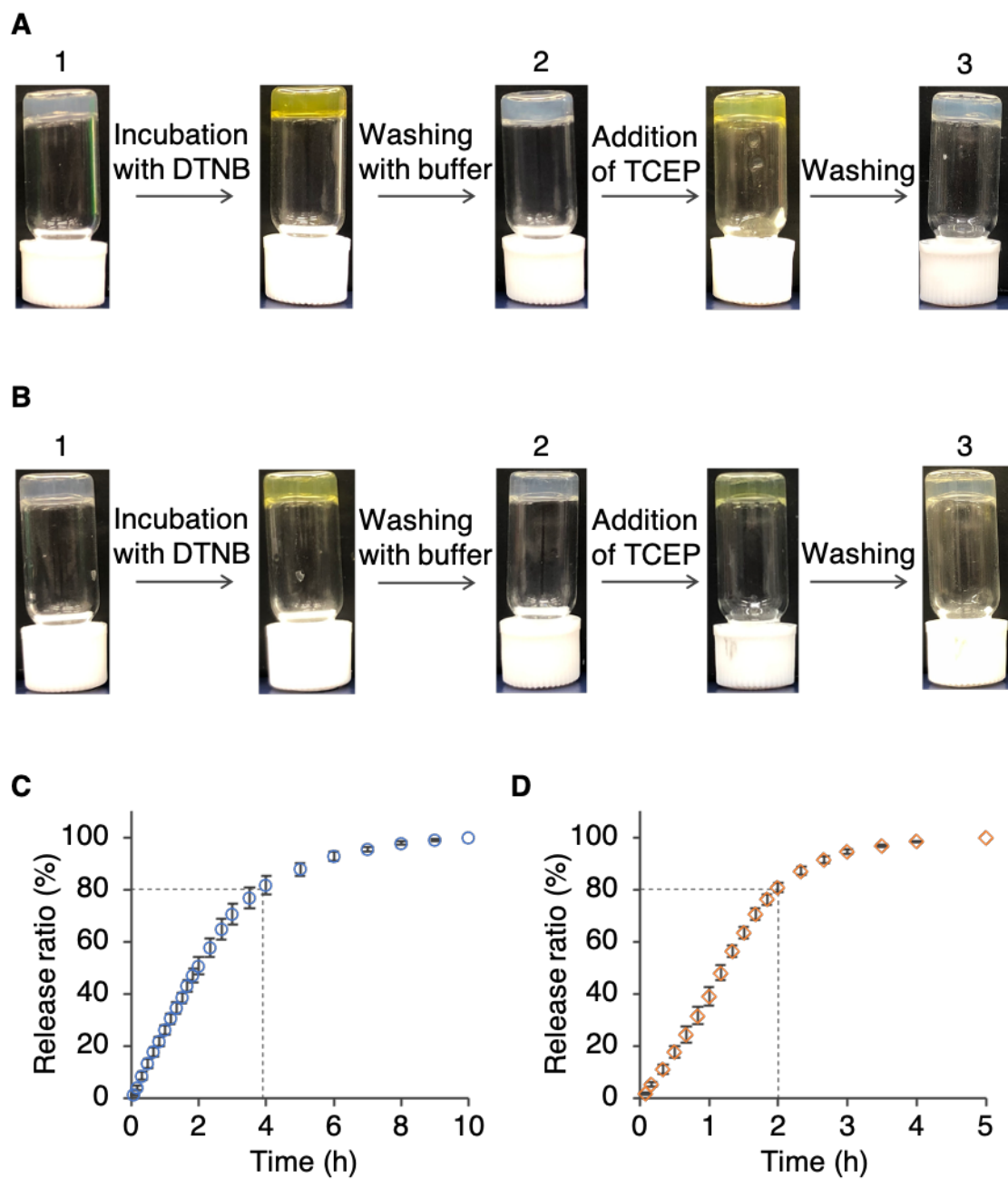


図 3-36. (A) DM ゲルの DTNB 修飾の様子。(B) S20C ゲルの DTNB 修飾の様子。写真の番号は図 3-35 中の番号に対応。(C) DM ゲルからの TNB 放出の時間依存性。(D) S20C ゲルからの TNB 放出の時間依存性。各エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。

3-6 結言

本章では、超分子である TIP60 がゲルの刺激応答性架橋剤として利用できることを示した。熱によるタンパク質の構造変化は多くの場合不可逆的であり、特に球状タンパク質を素材としたハイドロゲルで熱によるゾルゲル転移を検討した例はほとんどない。それに対して、TIP60 を PEG ネットワークの架橋点として構築したゲルは熱によるゾルゲル転移を示し、SAXS 測定の結果から転移は TIP60 の粒子構造の崩壊と再構築に起因することが示唆された。さらに、TIP60 ゲルは刺激に応答した化合物の内包・放出にも利用できることを示した。本結果は、よりマクロな材料構築のための刺激応答性素材としての TIP60 の利用可能性を示すものである。

3-7 実験方法

使用した試薬

PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific, 3-2 での実験のみで使用。), Gene Ladder Wide 1 (ニッポンジーン), 酢酸 (富士フィルム和光純薬), Pierce Universal Nuclease for Cell Lysis (Thermo Scientific), 酢酸ナトリウム, 塩化カリウム (以上、ナカライテスク), ビスマレイミド PEG (分子量 10,000, Biochempeg Scientific)を使用した。その他の試薬は 2-5 と同様のものを使用した。

タンパク質発現と Ni-NTA カラムクロマトグラフィーによるタンパク質の精製
TIP60 とその変異体については、2-5 と同様の方法で行った。

pETDuet-1 ベクターにクローニングした LSm は、アンピシリンを含む LB 培地を用い、*Escherichia coli* BL21(DE3)で発現した。精製は 2-5 と同様に行った。

UV-Vis 吸収測定、DLS 測定、SDS-PAGE、Native PAGE、TEM 観察
2-5 と同様の方法で行った。

Ni-NTA カラムで精製した TIP60 の酸性溶液中での沈殿形成

精製した TIP60 は 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)で透析し、1 μ M に調製した。溶液の pH がおよそ 5.5 になるようにタンパク質溶液を 20 mM 酢酸バッファ (pH 4.5)と混合し、4 $^{\circ}$ C で 1 晩静置した。10000 $\times$ g で 10 分間遠心分離して沈殿を回収し、20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)に再溶解した。

繰り返しの沈殿形成実験でも、基本的には上述の方法で実験を行った。pH をおよそ 5.5 になるように混合した溶液は、氷上で 5 分間静置した後遠心分離した。

pH に応答した Ni-NTA カラム精製 TIP60 および LSm の沈殿挙動

精製した TIP60 と LSm は、20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)で透析し、それぞれ 1 μ M と 10 μ M に調製した。溶液の pH が 5.0~7.5 になるようにタンパク質溶液を 20 mM 酢酸バッファ (pH 4.5)と混合した。氷上で 5 分間インキュベートした後、10,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心して上清と沈殿を分離した。沈殿は 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)に再溶解した。サンプルを SDS-PAGE し、各 pH のサンプルで上清と沈殿中の TIP60 のバンド強度の合計を 100%として、上清と沈殿中に含まれる TIP60 の割合を算出した。

可溶性画分からの pH に応答した TIP60 の沈殿挙動

20 mM Tris-HCl (pH 8.0)に懸濁した菌体を超音波で破碎後、遠心分離して可溶性

画分を得た。溶液の pH が 5.0~7.5 になるように可溶性画分を 20 mM 酢酸バッファ (pH 4.5) と混合した。必要に応じて、可溶性画分と酢酸バッファに KCl を終濃度 1 M になるように添加した。氷上で 5 分間インキュベートした後、10,000×g、4 °C で 10 分間遠心して上清と沈殿を分離した。

ヌクレアーゼ処理では、Pierce Universal Nuclease for Cell Lysis (Thermo Scientific) を終濃度 50 units/mL になるように可溶性画分に添加した。30 °C で 1 時間インキュベートした後、溶液の pH が 6.0 になるように 20 mM 酢酸バッファ (pH 4.5) と混合した。必要に応じて、可溶性画分と酢酸バッファに KCl を終濃度 1 M になるように添加した。氷上で 5 分間インキュベートした後、10000×g、4 °C で 10 分間遠心して上清と沈殿を分離した。

pH に応答した沈殿挙動を利用した TIP60 の精製

LB 培地 100 mL から回収した大腸菌を 20 mM Tris-HCl 5 mL (pH 8.0) に懸濁した。超音波破碎後、10000×g、4 °C で 10 分間遠心分離して不溶性画分を除去した。可溶性画分に終濃度 1 M になるように KCl を添加した。溶液の pH がだいたい 6.3 になるように、可溶性画分を冷えた 20 mM 酢酸バッファ (pH 4.5) と混合し、氷上で 30 分間静置した。10,000×g、4 °C で 10 分間遠心分離して回収した沈殿を 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0) に懸濁した。溶解せずに残った粒子を除去するため、15000×g、4 °C で 10 分間遠心し上清を回収した。回収した精製溶液は 4 °C で保存した。

500 mL の培養液から菌体を回収した場合、菌体を 5 倍量のバッファに懸濁した。また、システイン変異体を精製する場合は、20 mM Tris-HCl, 10 mM DTT (pH 8.0) に菌体を懸濁した。

サイズ排除カラムクロマトグラフィー

Cosmosil 5Diol-1000-II column (ナカライテスク) を装着した LC-2030C Plus (Shimadzu Corporation) を用いて分析を行った。0.5 μM の TIP60 のサンプルを 20 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) に透析した。サンプルは 20 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) 中、30 °C、流速 1.0 mL/min で分析し、280 nm で検出した。

トリプトファン蛍光測定

DUETTA (Horiba Scientific) を用いて測定を行った。0.05 μM のタンパク質溶液を 20 °C から 80 °C まで加熱し、1 °C ごとに発光スペクトル (励起波長: 295 nm) の測定を行った。

ハイドロゲルの調製

Amicon Ultra-15 (MWCO 100 kDa, Merck)を用いて、S20C、二重変異体を 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7.4)で洗浄した後、100 μ M まで濃縮した。ビスマレイミド PEG のストック溶液は 15 mM になるように DMF に溶解して調製した。ストック溶液を 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7.4)で希釈し、3 mM ビスマレイミド PEG 溶液を調製した。100 μ M のタンパク質溶液と 3 mM のビスマレイミド溶液を等量混合し、20 分間室温で静置してゲル化した。

動的粘弾性測定

測定は回転式レオメーター (ARES-G2, TA Instruments)を用いて行った。直径 25 mm の上部平行プレートと下部ペルチェプレートを使用した。100 μ M タンパク質溶液と 3 mM BM-PEG 溶液を 10 °C で 160 s⁻¹ のせん断速度で混合し、500 μ L のハイドロゲルをプレート間に配置した。ゲル調製後、ペルチェプレートの温度を 25 °C まで上昇させた。線形粘弾性領域を確認するため、固定周波数 1Hz、25 °C で、0.01%から 8%までひずみ掃引測定を行った。周波数掃引測定は、0.1Hz から 10Hz まで行った。振動温度ランプ測定では、固定周波数 1Hz で、50 °C から 70 °C まで 5 °C/min の速度で加熱し、70 °C から 25 °C まで同じ速度で冷却する際の動的粘弾性の変化を測定した。

ハイドロゲルの SDS 処理

バイアル中に調製したゲルを、20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5% 2ME (pH 7.4)中で 1 晩室温でインキュベートした。その後、ゲルは 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5% 2ME, 2% SDS (pH 7.4)中で室温でインキュベートした。

ハイドロゲルの熱処理

バイアル中に調製したゲルは 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C に設定した湯浴 (TR-1 α , AS ONE)で 5 分間インキュベートした。インキュベート後のゲルの状態はバイアルを反転させて目視で観察した。

PEG 化 S20C 変異体の調製

ハイドロゲルの調製と同様に S20C 変異体を 100 μ M まで濃縮した。Methyl-PEG-maleimide (分子量 10000)を DMF に溶解し 15 mM のストック溶液を調製した。ストック溶液を 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7.4)で希釈し、3 mM PEG マレイミド溶液を調製した。100 μ M のタンパク質溶液と 3 mM の PEG マレイミド溶液を等量混合し反応させた。

SAXS 測定のためのサンプル調製

50 μ M の TIP60 および PEG 化 S20C 溶液 (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10% DMF (pH 7.4)) をキャピラリー (Quartz capillaries 2.5 mm in diameter, WJM-Glas/Müller GmbH) にアプライして測定を行った。ハイドロゲルはキャピラリー中で 100 μ M タンパク質溶液と 3 mM ビスマレイミド PEG 溶液を混合することで調製した。複数回加熱あるいは長時間加熱したゲルサンプルは、キャピラリー中で調製したゲルを 80 $^{\circ}$ C に設定した湯浴で加熱することで調製した。

SAXS 測定

フォトンファクトリー BL-10C ビームライン (KEK、つくば、日本) で、放射光 ($\lambda = 0.1$ nm) を用いて行った。二次元散乱パターンは PILATUS3 2M 検出器 (Dectris) で収集した。カメラ長は 2 m とした。1 枚あたりの露光時間 5 秒、間隔 0.01 秒で、各サンプルから 30 枚の二次元散乱パターンを収集した。

加熱冷却処理中の SAXS 分析では、加熱冷却ステージ (HCS302, INSTEC)、精密温度コントローラー (mK2000, INSTEC)、液体窒素冷却システム (LN2, INSTEC) を使用して試料温度を制御した。試料温度は 20 $^{\circ}$ C から 80 $^{\circ}$ C まで 5 $^{\circ}$ C/min の速度で上昇させ、80 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした後、試料温度を 5 $^{\circ}$ C/min の速度で 80 $^{\circ}$ C から 20 $^{\circ}$ C に下げた。この温度変化の間、試料からの二次元散乱パターンを露光時間 5 秒、間隔 0.01 秒のサイクルで収集した。

散乱データはソフトウェア SAnGlar を用いて解析した。ビームセンターとカメラ長はベヘン酸銀を用いて校正した。二次元散乱パターンの円周平均を行い、散乱ベクトル $q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$ の大きさの関数として一次元散乱強度 $I(q)$ を得た。加熱・冷却処理中の SAXS 解析では、約 400 枚の二次元散乱パターンを取得し、連続する 3 個の二次元散乱パターンの平均値として $I(q)$ を算出した。各 $I(q)$ の測定温度は、3 枚の二次元散乱パターンが得られた間の平均温度とした。強度は、水を標準として絶対強度に正規化した。さらなる解析は ATSAS 3.2.1 を用いて行った。ペア距離分布関数は、GNOM を用いた間接フーリエ変換法を用いて計算した。実験的構造因子 $S_{\text{em}}(q)$ は、ATSAS の PRIMUS を用いて計算した。

ハイドロゲルの DTNB 修飾

200 μ L のハイドロゲルをバイアルに調製した。ゲルは、80 $^{\circ}$ C で 20 秒間加熱した後、室温まで冷却して再ゲル化した。ゲルを 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8) を含むバッファー中で一晩インキュベートした。DTNB を 20 mM Tris-HCl と 1 mM EDTA (pH 8) を含むバッファーに溶解した。800 μ L の DTNB 溶液を終濃度が 2.5 mM になるようにゲルに加えた。30 $^{\circ}$ C で 10 時間インキュベートした後、溶液を除去した。除去した溶液に含まれる DTNB と TNB の量は、紫外可視

分光光度計 (UV-1900, Shimadzu Corporation) を用いて測定した。20mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 8) を含む 800 μ L のバッファーでゲルを洗浄し、ゲル中の遊離 DTNB と TNB を除去した。洗浄では、一定時間ごとにバイアル中のバッファーを回収し、新しいバッファーと交換することを繰り返した。紫外可視分光光度計を用いて、回収したバッファー中に含まれる DTNB と TNB の量をモニターした。DTNB と TNB の吸収がほとんど観察されなくなるまで、このプロセスを繰り返した。DTNB によるゲル中の TIP60 の修飾率は、各バッファー中に含まれる TNB の総量から計算した。

800 μ L 20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM TCEP (pH8) のバッファー中でゲルをインキュベートし、ゲルに修飾した TNB を放出させた。一定時間ごとに、バイアル中のバッファーを回収し、TCEP を含む新しいバッファーに交換した。回収したバッファー中の TNB 量は紫外可視分光光度計でモニターした。バッファー中の TNB の吸収がほとんど観察されなくなるまで、このプロセスを繰り返した。各時点でゲルから放出された TNB の量は、その時点までに回収したバッファー中の TNB 量の合計として計算した。各時点での放出率は、DM ゲルでは 10 時間後、S20C ゲルでは 5 時間後に放出された TNB の総量を 100%と仮定して計算した。

S20C ゲルおよび DM ゲルの DTNB 修飾率の算出

S20C ゲルの場合、SDS-PAGE の結果からおおよそ 30%の Cys 残基が未修飾のまま残っていることが示唆された。DTNB による S20C ゲルの修飾率は $33.9 \pm 4.7\%$ と計算され、DTNB がゲル化後に修飾されずに残った外側の Cys 残基と反応したことを示唆した。S20C 変異体では、TIP60 一分子あたり、外側表面に 60 個の Cys 残基が存在する。算出した DTNB の修飾率から、TIP60 一分子あたり約 20/60 の Cys 残基が DTNB によって修飾されたと考えられる。

二重変異体では、TIP60 一分子あたり 120 の Cys 残基が存在する (外側表面 60 + 内側表面 60)。DM ゲル中のビスマレイミド PEG による TIP60 の修飾率は S20C ゲルと同様であったことから、DM ゲルでもおおよそ 30%の外側 Cys 残基が未修飾のまま残っていると考えられる。DTNB による DM ゲルの修飾率は、外側表面と内側表面の Cys 残基の総量を 100%としたとき、 $46.7 \pm 1.8\%$ と計算された。つまり、一分子あたり約 56/120 の Cys 残基が DTNB によって修飾されたことになる。外側表面の未修飾 Cys 残基 (~20/60)が優先的に修飾されたと仮定すると、内側表面の約 36/60 の Cys 残基が DTNB によって修飾されたと推定される。したがって、DTNB による内部の Cys 残基の修飾率は約 60%と推定された。

第4章 結論

本研究では、人工タンパク質ナノケージ TIP60 が機能化に適した構造、性質を有することに着目し、それを活かした化学修飾による刺激応答性材料の構築を検討した。

第 2 章では、外部との物質のやり取りに重要な役割を担うタンパク質ナノケージ表面の孔に着目し、孔の大きさと取り込み可能な分子の大きさの関係の評価を行った。分子量の異なる PEG マレイミドによる TIP60 システイン変異体の修飾実験は、内側に導入したシステインを修飾できなくなる PEG マレイミドの大きさと TIP60 の構造から推定される孔の大きさがよく一致することを示し、TIP60 の内部に侵入可能な分子を大きさでふるいわけするサイズ選択的なフィルターとしての孔の性質を明らかにした。孔のフィルター効果は、タンパク質ナノケージに触媒や酵素を内包したナノリアクターにおける基質のサイズ依存的な酵素反応や、内包した核酸やタンパク質を分解酵素から保護するナノコンテナとしての利用の文脈などで示唆されていた^{19,28,32,66,84}。しかし、その体系的な評価はほとんど行われていなかった。本研究で用いた TIP60 は大きな表面孔を有するため、電荷的に中性なポリマーである PEG を用いて、修飾分子の大きさだけを変えた体系的な評価が可能であり、共有結合によるケージ内側への化学修飾というより直接的な観察手法で内部への分子の侵入可能性を評価することができた。また、還元剤の添加によって観察された内外での TNB 生成速度の違いは、孔周りの正電荷領域とアニオン性の還元剤との静電的な相互作用に起因していたことが示唆された⁸⁶。このことから、溶液のイオン強度の調整や、変異導入による孔周りの電荷の調整が分子の取り込み速度の制御に繋がる可能性がある。カチオン性あるいはアニオン性のポリマーを用いたさらなる検証によって、孔を介した分子の取り込みにおける電荷の影響を明らかにしていくことができるだろう。また、本研究では、従来の孔のフィルター効果の利用法とは異なる、同一アミノ酸を標的としたナノケージ内外表面のヘテロ修飾を提案した。本研

究では TIP60 の内外ヘテロ修飾のモデルとして PEG と DTNB を用いた。内側の修飾に用いた DTNB のジスルフィド交換反応は、チオールを有する別の分子の修飾にも利用することができる¹⁰⁵。例えば、ステルス性の向上や免疫原性の低下などの効果が知られている PEG 化と組み合わせて、TIP60 の内側を修飾する分子を薬剤や光増感剤、造影剤などの機能性分子に変更することで、ドラッグデリバリーやイメージングの用途での機能化を検討可能であると期待される。また、PEG は 2 つ以上の分子を架橋する際にその距離や相互作用を調節するためのスペーサーとしても利用される¹⁴²。このことから、適切なスペーサーを利用することで、TIP60 表面に小さな機能性分子を修飾することも可能ではないかと期待される。このように、目的に応じて修飾分子を変更することで TIP60 の機能をさらに拡張することができるだろう。

第 3 章では、超分子構造であるタンパク質ナノケージの刺激応答的な解離に着目し、温度可逆的にゾルゲル転移を示すハイドロゲルを構築した。ゲル形成の準備段階として行った大量精製系の構築では、TIP60 の負の表面電荷を利用して、溶液の pH を変化させるだけで大腸菌で発現した TIP60 を精製可能であることを示した。本手法において、TIP60 は比較的穏やかな酸性条件下で回収可能であり、精製のための新たなタグの導入や PEG などの高分子量の添加物を必要としない。この簡便な精製手法は、本研究における TIP60 のゲル化の検討に限らず、今後の TIP60 を用いた材料開発を促進すると期待する。本手法で精製した TIP60 の外側にシステインを導入した変異体をビスマレイミド PEG で架橋することで、TIP60 を架橋点としたゲルを構築できた。変性剤とのインキュベート後にゲルが分解したことから、TIP60 の多量体構造がゲル構造を維持する架橋点として重要であることが示唆された。TIP60 の多量体構造を解離させる刺激として温度の影響を検証したところ、TIP60 ゲルが加熱冷却により可逆的なゾルゲル転移を示すことが明らかになった。SAXS による構造解析の結果は、温度変化による可逆的なゾルゲル転移は TIP60 の多量体構造の解離と再会合に伴って起こることを示した。野生型 TIP60 や表面 PEG 化 TIP60 の解析結果から、加熱冷却による TIP60

の可逆的な構造変化は PEG 化によってもたらされたことが示唆された。先行研究で報告されているように PEG による変性タンパク質の凝集の抑制や、変性状態の構造の変化などが生じている可能性があると考えられる^{136-138,143} が、PEG 化が TIP60 の多量体構造の熱可逆性を向上させるメカニズムの詳細についてはさらなる解析が必要である。また、第 2 章で行った酸化還元応答性ナノキャリアとしての機能化と組み合わせることで、ゲルからの刺激に応答した化合物放出を行えることも示した。フェリチンや VLP を組み込むことによるゲルの化合物放出能の調節を行った先行研究では、化合物放出のためにゲルからのタンパク質ナノケージの溶出やタンパク質ケージ構造の破壊が必要であった。本研究で構築した TIP60 ゲルではゲル中のタンパク質ナノケージの構造を破壊することなく化合物を放出できるため、繰り返しの利用可能性に優れていると期待される。TIP60 のゲル化により、先行研究でも示されていた化合物内包放出の制御だけでなく、タンパク質ナノケージの超分子構造をゲルネットワーク構造に刺激応答性を付与するための架橋点としても利用できることを示した。

以上のように、本研究では化学修飾によって TIP60 を刺激応答性ナノキャリアとハイドロゲルといったスケールの異なる材料へ機能化できることを示した。TIP60 の高い均質性や広い内部空間、大きな表面孔といった構造的な特徴に加えて、内外表面に化学修飾可能なシステインを選択的に導入可能であるという性質を利用することで、従来のタンパク質ナノケージを用いた研究では検討されていなかった、孔のフィルター効果を利用した内外表面のヘテロ修飾や超分子構造の刺激応答性ゲル架橋点としての利用可能性といったタンパク質ナノケージの新たな機能化手法や利用可能性を示した。本研究で得られたこれらの知見が、TIP60 を含むタンパク質ナノケージの機能化における基盤技術となることを願っている。

参考文献

- (1) Pieters, B. J. G. E.; Van Eldijk, M. B.; Nolte, R. J. M.; Mecnović, J. Natural Supramolecular Protein Assemblies. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 24.
- (2) Shen, Y.; Levin, A.; Kamada, A.; Toprakcioglu, Z.; Rodriguez-Garcia, M.; Xu, Y.; Knowles, T. P. J. From Protein Building Blocks to Functional Materials. *ACS Nano* **2021**, *15*, 5819.
- (3) Zhang, W.; Mo, S.; Liu, M.; Liu, L.; Yu, L.; Wang, C. Rationally Designed Protein Building Blocks for Programmable Hierarchical Architectures. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 1.
- (4) Zhang, Y.; Ardejani, M. S.; Orner, B. P. Design and Applications of Protein-Cage-Based Nanomaterials. *Chem. Asian J.* **2016**, *11*, 2814.
- (5) Abedin, M. J.; Liepold, L.; Suci, P.; Young, M.; Douglas, T. Synthesis of a Cross-Linked Branched Polymer Network in the Interior of a Protein Cage. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4346.
- (6) Reichhardt, C.; Uchida, M.; O'Neil, A.; Li, R.; Prevelige, P. E.; Douglas, T. Templated Assembly of Organic-Inorganic Materials Using the Core Shell Structure of the P22 Bacteriophage. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6326.
- (7) Bedwell, G. J.; Zhou, Z.; Uchida, M.; Douglas, T.; Gupta, A.; Prevelige, P. E. Selective Biotemplated Synthesis of TiO₂ inside a Protein Cage. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 214.
- (8) Kramer, R. M.; Li, C.; Carter, D. C.; Stone, M. O.; Naik, R. R. Engineered Protein Cages for Nanomaterial Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13282.
- (9) Naik, R. R.; Stringer, S. J.; Agarwal, G.; Jones, S. E.; Stone, M. O. Biomimetic Synthesis and Patterning of Silver Nanoparticles. *Nat. Mater.* **2002**, *1*, 169.
- (10) Fan, R.; Chew, S. W.; Cheong, V. V.; Orner, B. P. Fabrication of Gold Nanoparticles inside Unmodified Horse Spleen Apoferritin. *Small* **2010**, *6*, 1483.
- (11) Giessen, T. W.; Silver, P. A. Converting a Natural Protein Compartment into a Nanofactory for the Size-Constrained Synthesis of Antimicrobial Silver Nanoparticles. *ACS Synth. Biol.* **2016**, *5*, 1497.
- (12) Ren, H.; Zhu, S.; Zheng, G. Nanoreactor Design Based on Self-Assembling Protein Nanocages. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 592.
- (13) Zhen, Z.; Tang, W.; Guo, C.; Chen, H.; Lin, X.; Liu, G.; Fei, B.; Chen, X.; Xu, B.; Xie, J. Ferritin Nanocages to Encapsulate and Deliver Photosensitizers for Efficient Photodynamic Therapy against Cancer. *ACS Nano* **2013**, *7*, 6988.
- (14) Brasch, M.; Putri, R. M.; De Ruiter, M. V.; Luque, D.; Koay, M. S. T.; Castón, J. R.; Cornelissen, J. J. L. M. Assembling Enzymatic Cascade Pathways inside Virus-Based Nanocages Using Dual-Tasking Nucleic Acid Tags. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 1512.
- (15) Patterson, D. P.; Schwarz, B.; Waters, R. S.; Gedeon, T.; Douglas, T. Encapsulation of an Enzyme Cascade within the Bacteriophage P22 Virus-like Particle. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 359.
- (16) Chen, H.; Tan, X.; Fu, Y.; Dai, H.; Wang, H.; Zhao, G.; Zhang, Y. The Development of Natural and Designed Protein Nanocages for Encapsulation and Delivery of Active Compounds. *Food Hydrocoll.* **2021**, *121*, 107004.
- (17) Lee, E. J.; Lee, N. K.; Kim, I. S. Bioengineered Protein-Based Nanocage for Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *106*, 157.
- (18) Patterson, D. P.; LaFrance, B.; Douglas, T. Rescuing Recombinant Proteins by Sequestration into the P22 VLP. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10412.
- (19) Azuma, Y.; Edwardson, T. G. W.; Terasaka, N.; Hilvert, D. Modular Protein Cages for Size-Selective RNA Packaging in Vivo. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 566.

- (20) Sun, R.; Lim, S. Protein Cages as Building Blocks for Superstructures. *Eng. Biol.* **2021**, *5*, 35.
- (21) Peng, X.; Jin, J.; Nakamura, Y.; Ohno, T.; Ichinose, I. Ultrafast Permeation of Water through Protein-Based Membranes. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 353.
- (22) Uchida, M.; McCoy, K.; Fukuto, M.; Yang, L.; Yoshimura, H.; Miettinen, H. M.; LaFrance, B.; Patterson, D. P.; Schwarz, B.; Karty, J. A.; Prevelige, P. E.; Lee, B.; Douglas, T. Modular Self-Assembly of Protein Cage Lattices for Multistep Catalysis. *ACS Nano* **2018**, *12*, 942.
- (23) Yang, R.; Chen, L.; Zhang, T.; Yang, S.; Leng, X.; Zhao, G. Self-Assembly of Ferritin Nanocages into Linear Chains Induced by Poly(α , l-Lysine). *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 481.
- (24) Chakraborti, S.; Korpi, A.; Kumar, M.; Stępień, P.; Kostianen, M. A.; Hedde, J. G. Three-Dimensional Protein Cage Array Capable of Active Enzyme Capture and Artificial Chaperone Activity. *Nano Lett.* **2019**, *19*, 3918.
- (25) Wang, Z.; Gao, H.; Zhang, Y.; Liu, G.; Niu, G.; Chen, X. Functional Ferritin Nanoparticles for Biomedical Applications. *Front. Chem. Sci. Eng.* **2017**, *11*, 633.
- (26) Du, B.; Jia, S.; Wang, Q.; Ding, X.; Liu, Y.; Yao, H.; Zhou, J. A Self-Targeting, Dual ROS/PH-Responsive Apoferritin Nanocage for Spatiotemporally Controlled Drug Delivery to Breast Cancer. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 1026.
- (27) Ha, Y.; Shi, D.; Small, G. W.; Theil, E. C.; Allewell, N. M. Crystal Structure of Bullfrog M Ferritin at 2.8 Å Resolution: Analysis of Subunit Interactions and the Binuclear Metal Center. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 243.
- (28) Ueno, T.; Suzuki, M.; Goto, T.; Matsumoto, T.; Nagayama, K.; Watanabe, Y. Size-Selective Olefin Hydrogenation by a Pd Nanocluster Provided in an Apo-Ferritin Cage. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2527.
- (29) Yang, R.; Liu, Y.; Meng, D.; Chen, Z.; Blanchard, C. L.; Zhou, Z. Urea-Driven Epigallocatechin Gallate (EGCG) Permeation into the Ferritin Cage, an Innovative Method for Fabrication of Protein-Polyphenol Co-Assemblies. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 1410.
- (30) Yang, R.; Liu, Y.; Blanchard, C.; Zhou, Z. Channel Directed Rutin Nano-Encapsulation in Phytoferritin Induced by Guanidine Hydrochloride. *Food Chem.* **2018**, *240*, 935.
- (31) Wang, Q.; Zhang, C.; Liu, L.; Li, Z.; Guo, F.; Li, X.; Luo, J.; Zhao, D.; Liu, Y.; Su, Z. High Hydrostatic Pressure Encapsulation of Doxorubicin in Ferritin Nanocages with Enhanced Efficiency. *J. Biotechnol.* **2017**, *254*, 34.
- (32) Ahn, B.; Lee, S.-G.; Yoon, H. R.; Lee, J. M.; Oh, H. J.; Kim, H. M.; Jung, Y. Four-Fold Channel-Nicked Human Ferritin Nanocages for Active Drug Loading and PH-Responsive Drug Release. *Angew. Chemie* **2018**, *130*, 2959.
- (33) Zhang, T.; Lv, C.; Chen, L.; Bai, G.; Zhao, G.; Xu, C. Encapsulation of Anthocyanin Molecules within a Ferritin Nanocage Increases Their Stability and Cell Uptake Efficiency. *Food Res. Int.* **2014**, *62*, 183.
- (34) Hestericová, M.; Heinisch, T.; Lenz, M.; Ward, T. R. Ferritin Encapsulation of Artificial Metalloenzymes: Engineering a Tertiary Coordination Sphere for an Artificial Transfer Hydrogenase. *Dalt. Trans.* **2018**, *47*, 10837.
- (35) Swift, J.; Butts, C. A.; Cheung-Lau, J.; Yerubandi, V.; Dmochowski, I. J. Efficient Self-Assembly of Archaeoglobus Fulgidus Ferritin around Metallic Cores. *Langmuir* **2009**, *25*, 5219.
- (36) Maccone, A.; Masciarelli, S.; Palombarini, F.; Quaglio, D.; Boffi, A.; Trabuco, M. C.; Baiocco, P.; Fazi, F.; Bonamore, A. Ferritin Nanovehicle for Targeted Delivery of Cytochrome C to Cancer Cells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11749.
- (37) Chen, H.; Zhang, S.; Xu, C.; Zhao, G. Engineering Protein Interfaces Yields Ferritin Disassembly and Reassembly under Benign Experimental Conditions. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 7402.

- (38) Kim, M.; Rho, Y.; Jin, K. S.; Ahn, B.; Jung, S.; Kim, H.; Ree, M. PH-Dependent Structures of Ferritin and Apoferritin in Solution: Disassembly and Reassembly. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1629.
- (39) Ma, Y.; Nolte, R. J. M.; Cornelissen, J. J. L. M. Virus-Based Nanocarriers for Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 811.
- (40) McNeale, D.; Dashti, N.; Cheah, L. C.; Sainsbury, F. Protein Cargo Encapsulation by Virus-like Particles: Strategies and Applications. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2023**, *15*, 1.
- (41) Speir, J. A.; Munshi, S.; Wang, G.; Baker, T. S.; Johnson, J. E. Structures of the Native and Swollen Forms of Cowpea Chlorotic Mottle Virus Determined by X-Ray Crystallography and Cryo-Electron Microscopy. *Structure* **1995**, *3*, 63.
- (42) Douglas, T.; Young, M. Host-Guest Encapsulation of Materials by Assembled Virus Protein Cages. *Nature* **1998**, *393*, 152.
- (43) Frederik Rurup, W.; Verbij, F.; Koay, M. S. T.; Blum, C.; Subramaniam, V.; Cornelissen, J. J. L. M. Predicting the Loading of Virus-like Particles with Fluorescent Proteins. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 558.
- (44) Brasch, M.; De La Escosura, A.; Ma, Y.; Uetrecht, C.; Heck, A. J. R.; Torres, T.; Cornelissen, J. J. L. M. Encapsulation of Phthalocyanine Supramolecular Stacks into Virus-like Particles. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6878.
- (45) Schoonen, L.; Maassen, S.; Nolte, R. J. M.; Van Hest, J. C. M. Stabilization of a Virus-Like Particle and Its Application as a Nanoreactor at Physiological Conditions. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 3492.
- (46) Yang, J.; Zhang, L.; Zhang, C.; Lu, Y. Exploration on the Expression and Assembly of Virus-like Particles. *Biotechnol. Notes* **2021**, *2*, 51.
- (47) Golmohammadi, R.; Valegård, K.; Fridborg, K.; Liljas, L. The Refined Structure of Bacteriophage MS2 at 2.8 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 620.
- (48) Golmohammadi, R.; Fridborg, K.; Bundule, M.; Valegård, K.; Liljas, L. The Crystal Structure of Bacteriophage Q β at 3.5 Å Resolution. *Structure* **1996**, *4*, 543.
- (49) Fiedler, J. D.; Brown, S. D.; Lau, J. L.; Finn, M. G. RNA-Directed Packaging of Enzymes within Virus-like Particles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9648.
- (50) Ashley, C. E.; Carnes, E. C.; Phillips, G. K.; Durfee, P. N.; Buley, M. D.; Lino, C. A.; Padilla, D. P.; Phillips, B.; Carter, M. B.; Willman, C. L.; Brinker, C. J.; do Carmo Caldeira, J.; Chackerian, B.; Wharton, W.; Peabody, D. S. Cell-Specific Delivery of Diverse Cargos by Bacteriophage MS2 Virus-like Particles. *ACS Nano* **2011**, *5*, 5729.
- (51) Wu, M.; Brown, W. L.; Stockley, P. G. Cell-Specific Delivery of Bacteriophage-Encapsidated Ricin a Chain. *Bioconjug. Chem.* **1995**, *6*, 587.
- (52) Rhee, J. K.; Hovlid, M.; Fiedler, J. D.; Brown, S. D.; Manzenrieder, F.; Kitagishi, H.; Nycholat, C.; Paulson, J. C.; Finn, M. G. Colorful Virus-like Particles: Fluorescent Protein Packaging by the Q β l Capsid. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3977.
- (53) Das, S.; Zhao, L.; Elofson, K.; Finn, M. G. Enzyme Stabilization by Virus-Like Particles. *Biochemistry* **2020**, *59*, 2870.
- (54) Tong, G. J.; Hsiao, S. C.; Carrico, Z. M.; Francis, M. B. Viral Capsid DNA Aptamer Conjugates as Multivalent Cell-Targeting Vehicles. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11174.
- (55) Stephanopoulos, N.; Tong, G. J.; Hsiao, S. C.; Francis, M. B. Dual-Surface Modified Virus Capsids for Targeted Delivery of Photodynamic Agents to Cancer Cells. *ACS Nano* **2010**, *4*, 6014.
- (56) Kovacs, E. W.; Hooker, J. M.; Romanini, D. W.; Holder, P. G.; Berry, K. E.; Francis, M. B. Dual-Surface-Modified Bacteriophage MS2 as an Ideal Scaffold for a Viral Capsid-Based Drug Delivery System. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 1140.

- (57) Hashemi, K.; Ghahramani Seno, M. M.; Ahmadian, M. R.; Malaekheh-Nikouei, B.; Bassami, M. R.; Dehghani, H.; Afkhami-Goli, A. Optimizing the Synthesis and Purification of MS2 Virus like Particles. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1.
- (58) de Martín Garrido, N.; Crone, M. A.; Ramlaul, K.; Simpson, P. A.; Freemont, P. S.; Aylett, C. H. S. Bacteriophage MS2 Displays Unreported Capsid Variability Assembling T = 4 and Mixed Capsids. *Mol. Microbiol.* **2020**, *113*, 143.
- (59) Lie, F.; Szyszka, T. N.; Lau, Y. H. Structural Polymorphism in Protein Cages and Virus-like Particles. *J. Mater. Chem. B* **2023**, *11*, 6516.
- (60) O'Neil, A.; Reichhardt, C.; Johnson, B.; Prevelige, P. E.; Douglas, T. Genetically Programmed in Vivo Packaging of Protein Cargo and Its Controlled Release from Bacteriophage P22. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7425.
- (61) Sharma, J.; Douglas, T. Tuning the Catalytic Properties of P22 Nanoreactors through Compositional Control. *Nanoscale* **2020**, *12*, 336.
- (62) Patterson, D. P.; Schwarz, B.; El-Boubbou, K.; Van Der Oost, J.; Prevelige, P. E.; Douglas, T. Virus-like Particle Nanoreactors: Programmed Encapsulation of the Thermostable CelB Glycosidase inside the P22 Capsid. *Soft Matter* **2012**, *8*, 10158.
- (63) Kant, R.; Llauro, A.; Rayaprolu, V.; Qazi, S.; de Pablo, P. J.; Douglas, T.; Bothner, B. Changes in the Stability and Biomechanics of P22 Bacteriophage Capsid during Maturation. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2018**, *1862*, 1492.
- (64) Patterson, D. P.; Prevelige, P. E.; Douglas, T. Nanoreactors by Programmed Enzyme Encapsulation inside the Capsid of the Bacteriophage P22. *ACS Nano* **2012**, *6*, 5000.
- (65) Gu, C.; Zhang, T.; Lv, C.; Liu, Y.; Wang, Y.; Zhao, G. His-Mediated Reversible Self-Assembly of Ferritin Nanocages through Two Different Switches for Encapsulation of Cargo Molecules. *ACS Nano* **2020**, *14*, 17080.
- (66) Williams, E. M.; Jung, S. M.; Coffman, J. L.; Lutz, S. Pore Engineering for Enhanced Mass Transport in Encapsulin Nanocompartments. *ACS Synth. Biol.* **2018**, *7*, 2514.
- (67) Chen, D. H.; Baker, M. L.; Hryc, C. F.; DiMaio, F.; Jakana, J.; Wu, W.; Dougherty, M.; Haase-Pettingell, C.; Schmid, M. F.; Jiang, W.; Baker, D.; King, J. A.; Chiu, W. Structural Basis for Scaffolding-Mediated Assembly and Maturation of a DsDNA Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 1355.
- (68) Hryc, C. F.; Chen, D. H.; Afonine, P. V.; Jakan, J.; Wang, Z.; Haase-Pettingell, C.; Jiang, W.; Adams, P. D.; King, J. A.; Schmid, M. F.; Chiu, W. Accurate Model Annotation of a Near-Atomic Resolution Cryo-EM Map. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 3103.
- (69) Parent, K. N.; Khayat, R.; Tu, L. H.; Suhanovsky, M. M.; Cortines, J. R.; Teschke, C. M.; Johnson, J. E.; Baker, T. S. P22 Coat Protein Structures Reveal a Novel Mechanism for Capsid Maturation: Stability without Auxiliary Proteins or Chemical Crosslinks. *Structure* **2010**, *18*, 390.
- (70) Sutter, M.; Boehringer, D.; Gutmann, S.; Günther, S.; Prangishvili, D.; Loessner, M. J.; Stetter, K. O.; Weber-Ban, E.; Ban, N. Structural Basis of Enzyme Encapsulation into a Bacterial Nanocompartment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 939.
- (71) McHugh, C. A.; Fontana, J.; Nemecek, D.; Cheng, N.; Aksyuk, A. A.; Heymann, J. B.; Winkler, D. C.; Lam, A. S.; Wall, J. S.; Steven, A. C.; Hoiczyk, E. A Virus Capsid-like Nanocompartment That Stores Iron and Protects Bacteria from Oxidative Stress. *EMBO J.* **2014**, *33*, 1896.
- (72) Giessen, T. W.; Orlando, B. J.; Verdegaal, A. A.; Chambers, M. G.; Gardener, J.; Bell, D. C.; Birrane, G.; Liao, M.; Silver, P. A. Large Protein Organelles Form a New Iron Sequestration System with High Storage Capacity. *Elife* **2019**, *8*, 1.
- (73) Izard, T.; Årvarsson, A.; Allen, M. D.; Westphal, A. H.; Perham, R. N.; De Kok,

- A.; Hol, W. G. J. Principles of Quasi-Equivalence and Euclidean Geometry Govern the Assembly of Cubic and Dodecahedral Cores of Pyruvate Dehydrogenase Complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 1240.
- (74) Padilla, J. E.; Colovos, C.; Yeates, T. O. Nanohedra: Using Symmetry to Design Self Assembling Protein Cages, Layers, Crystals, and Filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 2217.
- (75) Lai, Y. T.; Reading, E.; Hura, G. L.; Tsai, K. L.; Laganowsky, A.; Asturias, F. J.; Tainer, J. A.; Robinson, C. V.; Yeates, T. O. Structure of a Designed Protein Cage That Self-Assembles into a Highly Porous Cube. *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 1065.
- (76) Kobayashi, N.; Yanase, K.; Sato, T.; Unzai, S.; Hecht, M. H.; Arai, R. Self-Assembling Nano-Architectures Created from a Protein Nano-Building Block Using an Intermolecularly Folded Dimeric de Novo Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11285.
- (77) Matsuura, K.; Murasato, K.; Kimizuka, N. Artificial Peptide-Nanospheres Self-Assembled from Three-Way Junctions of β -Sheet-Forming Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10148.
- (78) Cristie-David, A. S.; Chen, J.; Nowak, D. B.; Bondy, A. L.; Sun, K.; Park, S. I.; Banaszak Holl, M. M.; Su, M.; Marsh, E. N. G. Coiled-Coil-Mediated Assembly of an Icosahedral Protein Cage with Extremely High Thermal and Chemical Stability. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 9207.
- (79) Malay, A. D.; Miyazaki, N.; Biela, A.; Chakraborti, S.; Majsterkiewicz, K.; Stupka, I.; Kaplan, C. S.; Kowalczyk, A.; Piette, B. M. A. G.; Hochberg, G. K. A.; Wu, D.; Wrobel, T. P.; Fineberg, A.; Kushwah, M. S.; Kelemen, M.; Vavpetič, P.; Pelicon, P.; Kukura, P.; Benesch, J. L. P.; Iwasaki, K.; Heddle, J. G. An Ultra-Stable Gold-Coordinated Protein Cage Displaying Reversible Assembly. *Nature* **2019**, *569*, 438.
- (80) King, N. P.; Sheffler, W.; Sawaya, M. R.; Vollmar, B. S.; Sumida, J. P.; André, I.; Gonen, T.; Yeates, T. O.; Baker, D. Computational Design of Self-Assembling Protein Nanomaterials with Atomic Level Accuracy. *Science (80-.)*. **2012**, *336*, 1171.
- (81) Hsia, Y.; Bale, J. B.; Gonen, S.; Shi, D.; Sheffler, W.; Fong, K. K.; Nattermann, U.; Xu, C.; Huang, P. S.; Ravichandran, R.; Yi, S.; Davis, T. N.; Gonen, T.; King, N. P.; Baker, D. Design of a Hyperstable 60-Subunit Protein Icosahedron. *Nature* **2016**, *535*, 136.
- (82) Bale, J. B.; Gonen, S.; Liu, Y.; Sheffler, W.; Ellis, D.; Thomas, C.; Cascio, D.; Yeates, T. O.; Gonen, T.; King, N. P.; Baker, D. Accurate Design of Megadalton-Scale Two-Component Icosahedral Protein Complexes. *Science (80-.)*. **2016**, *353*, 389.
- (83) Matsuura, K. Dressing up Artificial Viral Capsids Self-Assembled from C-Terminal-Modified β -Annulus Peptides. *Polym. J.* **2020**, *52*, 1035.
- (84) Edwardson, T. G. W.; Mori, T.; Hilvert, D. Rational Engineering of a Designed Protein Cage for siRNA Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 10439.
- (85) Kawakami, N.; Kondo, H.; Matsuzawa, Y.; Hayasaka, K.; Nasu, E.; Sasahara, K.; Arai, R.; Miyamoto, K. Design of Hollow Protein Nanoparticles with Modifiable Interior and Exterior Surfaces. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 12400.
- (86) Obata, J.; Kawakami, N.; Tsutsumi, A.; Nasu, E.; Miyamoto, K.; Kikkawa, M.; Arai, R. Icosahedral 60-Meric Porous Structure of Designed Supramolecular Protein Nanoparticle TIP60. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 10226.
- (87) Das, D.; Kozbial, P.; Axelrod, H. L.; Miller, M. D.; McMullan, D.; Krishna, S. S.; Abdubek, P.; Acosta, C.; Astakhova, T.; Burra, P.; Carlton, D.; Chen, C.; Chiu, H. J.; Clayton, T.; Deller, M. C.; Duan, L.; Elias, Y.; Elsliger, M. A.; Ernst, D.; Farr, C.; Feuerhelm, J.; Grzechnik, A.; Grzechnik, S. K.; Hale, J.; Han, G. W.; Jaroszewski, L.; Jin, K. K.; Johnson, H. A.; Klock, H. E.; Knuth, M. W.;

- Kumar, A.; Marciano, D.; Morse, A. T.; Murphy, K. D.; Nigoghossian, E.; Nopakun, A.; Okach, L.; Oommachen, S.; Paulsen, J.; Puckett, C.; Reyes, R.; Rife, C. L.; Sefcovic, N.; Sudek, S.; Tien, H.; Trame, C.; Trout, C. V.; Van Den Bedem, H.; Weekes, D.; White, A.; Xu, Q.; Hodgson, K. O.; Wooley, J.; Deacon, A. M.; Godzik, A.; Lesley, S. A.; Wilson, I. A. Crystal Structure of a Novel Sm-like Protein of Putative Cyanophage Origin at 2.60 Å Resolution. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2009**, *75*, 296.
- (88) Lu, Q.; Ye, F.; Wei, Z.; Wen, Z.; Zhang, M. Antiparallel Coiled-Coil-Mediated Dimerization of Myosin X. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 17388.
 - (89) Uchida, M.; Klem, M. T.; Allen, M.; Suci, P.; Flenniken, M.; Gillitzer, E.; Varpness, Z.; Liepold, L. O.; Young, M.; Douglas, T. Biological Containers: Protein Cages as Multifunctional Nanoplatfoms. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1025.
 - (90) Biela, A. P.; Naskalska, A.; Fatehi, F.; Twarock, R.; Heddle, J. G. Programmable Polymorphism of a Virus-like Particle. *Commun. Mater.* **2022**, *3*, 1.
 - (91) Asensio, M. A.; Morella, N. M.; Jakobson, C. M.; Hartman, E. C.; Glasgow, J. E.; Sankaran, B.; Zwart, P. H.; Tullman-Ereck, D. A Selection for Assembly Reveals That a Single Amino Acid Mutant of the Bacteriophage MS2 Coat Protein Forms a Smaller Virus-like Particle. *Nano Lett.* **2016**, *16*, 5944.
 - (92) Hartman, E. C.; Jakobson, C. M.; Favor, A. H.; Lobba, M. J.; Álvarez-Benedicto, E.; Francis, M. B.; Tullman-Ereck, D. Quantitative Characterization of All Single Amino Acid Variants of a Viral Capsid-Based Drug Delivery Vehicle. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1.
 - (93) Zang, J.; Chen, H.; Zhang, X.; Zhang, C.; Guo, J.; Du, M.; Zhao, G. Disulfide-Mediated Conversion of 8-Mer Bowl-like Protein Architecture into Three Different Nanocages. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 778.
 - (94) Chen, Q.; Men, D.; Sun, T.; Zhang, Y.; Yuan, Q.; Hu, T.; Hu, Z.; Wu, J.; Deng, Y.; Zhang, X.-E.; Wen, J. Supreme Catalytic Properties of Enzyme Nanoparticles Based on Ferritin Self-Assembly. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3*, 7158.
 - (95) Uchida, M.; Kosuge, H.; Terashima, M.; Willits, D. A.; Liepold, L. O.; Young, M. J.; McConnell, M. V.; Douglas, T. Protein Cage Nanoparticles Bearing the LyP-1 Peptide for Enhanced Imaging of Macrophage-Rich Vascular Lesions. *ACS Nano* **2011**, *5*, 2493.
 - (96) Wu, W.; Hsiao, S. C.; Carrico, Z. M.; Francis, M. B. Genome-Free Viral Capsids as Multivalent Carriers for Taxol Delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9493.
 - (97) Suei, P. A.; Varpness, Z.; Gillitzer, E.; Douglas, T.; Young, M. Targeting and Photodynamic Killing of a Microbial Pathogen Using Protein Cage Architectures Functionalized with a Photosensitizer. *Langmuir* **2007**, *23*, 12280.
 - (98) Ren, D.; Kratz, F.; Wang, S. W. Protein Nanocapsules Containing Doxorubicin as a PH-Responsive Delivery System. *Small* **2011**, *7*, 1051.
 - (99) Flenniken, M. L.; Liepold, L. O.; Crowley, B. E.; Willits, D. A.; Young, M. J.; Douglas, T. Selective Attachment and Release of a Chemotherapeutic Agent from the Interior of a Protein Cage Architecture. *Chem. Commun.* **2005**, *2*, 447.
 - (100) Steinmetz, N. F.; Hong, V.; Spoerke, E. D.; Lu, P.; Breitenkamp, K.; Finn, M. G.; Manchester, M. Buckyballs Meet Viral Nanoparticles: Candidates for Biomedicine. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17093.
 - (101) Rhee, J. K.; Baksh, M.; Nycholat, C.; Paulson, J. C.; Kitagishi, H.; Finn, M. G. Glycan-Targeted Virus-like Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2333.
 - (102) Chauhan, K.; Hernandez-Meza, J. M.; Rodríguez-Hernández, A. G.; Juárez-Moreno, K.; Sengar, P.; Vazquez-Duhalt, R. Multifunctionalized Biocatalytic P22 Nanoreactor for Combinatory Treatment of ER+ Breast Cancer. *J. Nanobiotechnology* **2018**, *16*, 1.
 - (103) Schoonen, L.; Van Hest, J. C. M. Functionalization of Protein-Based Nanocages

- for Drug Delivery Applications. *Nanoscale* **2014**, *6*, 7124.
- (104) Niikura, K.; Sugimura, N.; Musashi, Y.; Mikuni, S.; Matsuo, Y.; Kobayashi, S.; Nagakawa, K.; Takahara, S.; Takeuchi, C.; Sawa, H.; Kinjo, M.; Ijio, K. Virus-like Particles with Removable Cyclodextrins Enable Glutathione-Triggered Drug Release in Cells. *Mol. Biosyst.* **2013**, *9*, 501.
 - (105) Guo, Q.; Thomas, G. C.; Woycechowsky, K. J. Reversible Loading of Thiol-Modified Curcumin in an Engineered Protein Capsid. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 34676.
 - (106) Carrico, Z. M.; Romanini, D. W.; Mehl, R. A.; Francis, M. B. Oxidative Coupling of Peptides to a Virus Capsid Containing Unnatural Amino Acids. *Chem. Commun.* **2008**, No. 10, 1205.
 - (107) Bhattacharya, A.; Chatterjee, S.; Prajapati, R.; Mukherjee, T. K. Size-Dependent Penetration of Carbon Dots inside the Ferritin Nanocages: Evidence for the Quantum Confinement Effect in Carbon Dots. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 12833.
 - (108) Zhang, S.; Zhang, J.; Fang, W.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Jin, J. Ultralarge Single-Layer Porous Protein Nanosheet for Precise Nanosize Separation. *Nano Lett.* **2018**, *18*, 6563.
 - (109) Yang, F.; Tao, F.; Li, C.; Gao, L.; Yang, P. Self-Assembled Membrane Composed of Amyloid-like Proteins for Efficient Size-Selective Molecular Separation and Dialysis. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5443.
 - (110) Singh, S.; Khulbe, K. C.; Matsuura, T.; Ramamurthy, P. Membrane Characterization by Solute Transport and Atomic Force Microscopy. *J. Memb. Sci.* **1998**, *142*, 111.
 - (111) Huang, W.; Yu, L. Serial Symmetrical Relocation Algorithm for the Equal Sphere Packing Problem. *arXiv:1202.4149* **2012**.
 - (112) Ellman, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70.
 - (113) Eyer, P.; Worek, F.; Kiderlen, D.; Sinko, G.; Stuglin, A.; Simeon-Rudolf, V.; Elsa, R. Molar Absorption Coefficients for the Reduced Ellman Reagent: Reassessment. *Anal. Biochem.* **2003**, *312*, 224.
 - (114) Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J. Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676.
 - (115) Buwalda, S. J.; Boere, K. W. M.; Dijkstra, P. J.; Feijen, J.; Vermonden, T.; Hennink, W. E. Hydrogels in a Historical Perspective: From Simple Networks to Smart Materials. *J. Control. Release* **2014**, *190*, 254.
 - (116) Li, J.; Jia, X.; Yin, L. Hydrogel: Diversity of Structures and Applications in Food Science. *Food Rev. Int.* **2021**, *37*, 313.
 - (117) Singh, N.; Agarwal, S.; Jain, A.; Khan, S. 3-Dimensional Cross Linked Hydrophilic Polymeric Network “Hydrogels”: An Agriculture Boom. *Agric. Water Manag.* **2021**, *253*, 106939.
 - (118) Mitura, S.; Sionkowska, A.; Jaiswal, A. Biopolymers for Hydrogels in Cosmetics: Review. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2020**, *31*, 50.
 - (119) Jayakumar, A.; Jose, V. K.; Lee, J. M. Hydrogels for Medical and Environmental Applications. *Small Methods* **2020**, *4*, 1900735.
 - (120) Koetting, M. C.; Peters, J. T.; Steichen, S. D.; Peppas, N. A. Stimulus-Responsive Hydrogels: Theory, Modern Advances, and Applications. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2015**, *93*, 1.
 - (121) Cao, M.; Wang, Y.; Hu, X.; Gong, H.; Li, R.; Cox, H.; Zhang, J.; Waigh, T. A.; Xu, H.; Lu, J. R. Reversible Thermoresponsive Peptide-PNIPAM Hydrogels for Controlled Drug Delivery. *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 3601.
 - (122) Steinman, N. Y.; Haim-Zada, M.; Goldstein, I. A.; Goldberg, A. H.; Haber, T.; Berlin, J. M.; Domb, A. J. Effect of PLGA Block Molecular Weight on Gelling Temperature of PLGA-PEG-PLGA Thermoresponsive Copolymers. *J. Polym.*

- Sci. Part A Polym. Chem.* **2019**, *57*, 35.
- (123) Dura, G.; Peters, D. T.; Waller, H.; Yemm, A. I.; Perkins, N. D.; Ferreira, A. M.; Crespo-Cuadrado, M.; Lakey, J. H.; Fulton, D. A. A Thermally Reformable Protein Polymer. *Chem* **2020**, *6*, 3132.
 - (124) Sponchioni, M.; Palmiero, U. C.; Moscatelli, D. Thermo-Responsive Polymers: Applications of Smart Materials in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *102*, 589.
 - (125) Li, L.; Scheiger, J. M.; Levkin, P. A. Design and Applications of Photoresponsive Hydrogels. *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1807333.
 - (126) Kocak, G.; Tuncer, C.; Bütün, V. PH-Responsive Polymers. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 144.
 - (127) Schoenmakers, D. C.; Schoonen, L.; Rutten, M. G. T. A.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E.; Van Hest, J. C. M.; Kouwer, P. H. J. Virus-like Particles as Crosslinkers in Fibrous Biomimetic Hydrogels: Approaches towards Capsid Rupture and Gel Repair. *Soft Matter* **2018**, *14*, 1442.
 - (128) Yang, L.; Liu, A.; De Ruiter, M. V.; Hommersom, C. A.; Katsonis, N.; Jonkheijm, P.; Cornelissen, J. J. L. M. Compartmentalized Supramolecular Hydrogels Based on Viral Nanocages towards Sophisticated Cargo Administration. *Nanoscale* **2018**, *10*, 4123.
 - (129) Shin, M. K.; Spinks, G. M.; Shin, S. R.; Kim, S. I.; Kim, S. J. Nanocomposite Hydrogel with High Toughness for Bioactuators. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 1712.
 - (130) Wang, R.; Chi, W.; Wan, F.; Wei, J.; Ping, H.; Zou, Z.; Xie, J.; Wang, W.; Fu, Z. Nanocage Ferritin Reinforced Polyacrylamide Hydrogel for Wearable Flexible Strain Sensors. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14*, 21278.
 - (131) Kumari, S.; Kulkarni, A.; Kumaraswamy, G.; Sen Gupta, S. Large Centimeter-Sized Macroporous Ferritin Gels as Versatile Nanoreactors. *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 4813.
 - (132) Samanipour, R.; Wang, T.; Werb, M.; Hassannezhad, H.; Rangel, J. M. L.; Hoorfar, M.; Hasan, A.; Lee, C. K.; Shin, S. R. Ferritin Nanocage Conjugated Hybrid Hydrogel for Tissue Engineering and Drug Delivery Applications. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6*, 277.
 - (133) Yang, X.; Pistolozzi, M.; Lin, Z. New Trends in Aggregating Tags for Therapeutic Protein Purification. *Biotechnol. Lett.* **2018**, *40*, 745.
 - (134) Fong, B. A.; Wu, W. Y.; Wood, D. W. The Potential Role of Self-Cleaving Purification Tags in Commercial-Scale Processes. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 272.
 - (135) Zhang, Q.; Zhao, Y.; Feng, J. Systematic Investigation on Shape Stability of High-Efficiency SEBS/Paraffin Form-Stable Phase Change Materials. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2013**, *118*, 54.
 - (136) Plesner, B.; Fee, C. J.; Westh, P.; Nielsen, A. D. Effects of PEG Size on Structure, Function and Stability of PEGylated BSA. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *79*, 399.
 - (137) Pelosi, C.; Saitta, F.; Wurm, F. R.; Fessas, D.; Tinè, M. R.; Duce, C. Thermodynamic Stability of Myoglobin-Poly(Ethylene Glycol) Bioconjugates: A Calorimetric Study. *Thermochim. Acta* **2019**, *671*, 26.
 - (138) Liu, X.; Kouassi, K. G. W.; Vanbever, R.; Dumoulin, M. Impact of the PEG Length and PEGylation Site on the Structural, Thermodynamic, Thermal, and Proteolytic Stability of Mono-PEGylated Alpha-1 Antitrypsin. *Protein Sci.* **2022**, *31*, e4392.
 - (139) Stradner, A.; Sedgwick, H.; Cardinaux, F.; Poon, W. C. K.; Egelhaaf, S. U.; Schurtenberger, P. Equilibrium Cluster Formation in Concentrated Protein Solutions and Colloids. *Nature* **2004**, *432*, 492.
 - (140) Sato, T.; Komatsu, T.; Nakagawa, A.; Tsuchida, E. Induced Long-Range Attractive Potentials of Human Serum Albumin by Ligand Binding. *Phys. Rev.*

- Lett.* **2007**, 98, 208101.
- (141) Devanand, K.; Selser, J. C. Asymptotic Behavior and Long-Range Interactions in Aqueous Solutions of Poly(Ethylene Oxide). *Macromolecules* **1991**, 24, 5943.
 - (142) Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M. Chemistry for Peptide and Protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V. 2002, p 459.
 - (143) Hsieh, Y. P.; Lin, S. C. Effect of PEGylation on the Activity and Stability of Horseradish Peroxidase and L-N-Carbamoylase in Aqueous Phases. *Process Biochem.* **2015**, 50, 1372.

謝辞

本研究は、慶應義塾大学理工学部教授 宮本憲二 博士のご指導のもと行いました。本研究を実施する機会をいただき、また研究を行うにあたり終始ご指導、ご鞭撻を賜りましたことに深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、慶應義塾大学理工学部専任講師 川上了史 博士には、日々の議論を通じて研究の進め方や論文執筆などをご指導いただき、研究者としての姿勢や考え方を学ぶことができました。深く感謝申し上げます。

本論文の執筆にあたり、慶應義塾大学理工学部教授 土居信英 博士、同学部教授 荒井緑 博士、同学部准教授 松原輝彦 博士には副査として貴重なご指導、ご助言をいただきました。厚く御礼申し上げます。

DLS 測定の実施にあたり、自然科学研究機構分子科学研究所長 渡辺芳人 博士、名古屋大学大学院理学研究科教授 莊司長三 博士に測定の機会をいただきました。厚く御礼申し上げます。また、滞在中にお世話になりました同研究科生物無機化学研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

SAXS 測定の実施にあたり、信州大学繊維学部准教授 新井亮一 博士に分析の機会をいただき、測定や解析手法をご指導いただきました。また、結果についての議論や論文の執筆においてもご指導、ご助言をいただきました。厚く御礼申し上げます。

動的粘弾性測定の実施にあたり、慶應義塾大学理工学部教授 堀田篤 博士に測定の機会をいただき、同学部機械工学科堀田研究室 高村修平 学士に測定を行っていただきました。また、結果についての議論や論文の執筆においてもご指導、ご助言をいただきました。厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、お世話になりました生物機能化学研究室の皆様にも感謝いたします。

最後に、本研究を行うにあたり、支えてくださった方々に深く感謝いたします。