

生物のタンパク質材料とその展望

紙野 圭

はじめに

私たちの生活にさまざまな製品や材料があるように、生物にも“材料的”な役割を担う装置や分子がある。昆虫のシルクや、生物の骨格の位置付けにある海綿動物の骨片、植物の木質部を構成する多糖質やリグニン、細胞の裏打ち分子などは“材料的”である。また、細胞外マトリックスなどはシステムと呼ぶべき複雑さで生物を構成している。本稿で取り上げる水中で接着する生物の接着物質も、そのような材料系分子複合体の一つである。

私たちの生活は接着剤に支えられている。製品の製造過程で多用されるために日常的には気づかないが、あらゆる物の製造現場で使用されている。食品用を除く、接着剤のほとんどは石油から派生する合成高分子であり、安価であらゆるシーンを支えている。合成高分子については、分子のコンフォメーションや化学構造の多様性よりも、重合度や分子の絡み、剛性や弾性などの機械物性に多様性を求めることで、膨大なニーズに応えられる材料が安価で大量に供給されてきた。空気中での接着剤開発においては、十分に成熟した技術があるが、課題も残されており、その最たるものが“水”である。湿潤環境、すなわち、濡れた被着体や水中での接着剤の製造技術は空白状態にある。一方、多くの生物がどこかにくっついているが、そのほとんどは湿潤環境や水中である。合成高分子は、石油から派生するモノマーを原料に制約することで大きなメリットを受ける代償として、水との相性を犠牲にしているところがある。一方で、水の存在を大原則としている生物にとって、水中で物をくっつける物質の進化的獲得は必然であろう。

バイオのものづくりの主流は食に関連する機能性物質や医薬・中間体であるが、マテリアルへの出口は組換えに対してのアレルギーが低い点で優位であり、また多様な生体分子材料から得られる知見を活かすことができる。やや興味本位に見られる傾向の強かった生物の材料系タンパク質群が、スマートセルインダストリーの出口として現実味を帯びてきている。

生物の水中接着物質¹⁾

くっつく生物は多い。くっつくことは、それらの生物

にとって、さまざまな生理・生化学機能の土台である。それらの接着物質はその産生に特化した細胞で生合成されて、接着箇所分泌される。接着箇所は体外であり、溶液・流動性のある物質として分泌され、cmサイズの生物はcmサイズの二つの被着体をくっつける。プラスチックであろうが金属であろうが、生体表層であろうが、剛性の異なる素材を水中で接着できる。しかも、その表層は微生物バイオフィームなどで汚れているのである。

水中接着の生物材料の主役はタンパク質である。水の中の二つの物がくっつくのは、接着物質と、被着体表層に結合した水分子やイオンとの間、被着体表層分子との間、そして同種あるいは異種の接着タンパク質同士の間での相互作用や結合が適切に形成された結果である。すなわち、水中接着の本質はホモあるいはヘテロな分子間の相互作用や結合にある。そのような相互作用や結合を操るには、官能基の種類に富む高分子であるタンパク質という分子種は、生体分子の中で最適である。コンフォメーションによる官能基の配向の最適化や環境刺激による変化、翻訳後修飾による新たな分子間共有結合形成も材料として優位にあり、進化の過程でタンパク質が選ばれたことは頷ける。水中接着に関わるタンパク質は、独特の官能基と構造の使い方、モチーフの導入が見られ、またそれらは生体外で機能するため、細胞内では危険を伴う大胆な化学反応も取り入れている。分子レベルで研究が進んでいる生物は未だ限られているが、筆者らが研究に取り組んできた節足動物のフジツボと、米国のグループを中心に研究が大きく進んだ軟体動物のイガイ(ムール貝)の二つのモデル生物の接着について以下に紹介する。

フジツボの水中接着タンパク質材料^{2,3)}

フジツボは、その底面の殻^{*1}をセメントと呼ばれるタンパク質材料で被着体表面にくっつけている(図1)。この動物は、成長に伴って同心円状に広がった底面をさらに接着し、幼生期に着生したその場所で生涯を送る。後述のイガイは足糸を使い捨てて移動するが、フジツボのセメントは年単位でその生涯役割を担う材料である。

^{*1} 種によってはキチン質の膜。

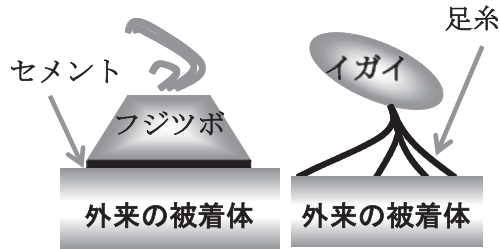


図1. フジツボとイガイのくっつき方

セメントは複合タンパク質材料で、そのタンパク質は三つに大別できる(図2)。親水性で水酸基に富むcement protein (cp) 19k^{*2}とcp68k, 荷電アミノ酸残基が非常に多くCys残基に富むcp20k, そして疎水性の高いcp100kとcp52kである。これら5種のcpの一次構造には互いに相同性は見られない。フジツボのcpには翻訳後修飾がほとんど見られないが、cp19k, cp68k, cp20kにはアミノ酸組成に大きな偏りがある。単純繰り返し配列は見られないが、繰り返しの痕跡やドメイン様構造が見られ、cp19kでは40残基程度の繰り返しが4回、cp20kは25残基程度が4~6回、cp52kは100残基程度が4回繰り返している。cp68kは約350残基と約50残基の二つの領域で構成されている。いずれも一次構造上の相同な配列をフジツボ以外に見つけることはできない。

これらのcpが協調することでフジツボの殻底と不特定の被着体が海水中でくっつくのであるが、そこに至る短い時間に複数の機能が関与する。大きくは、1) 被着体表面に結合した水やイオンと接着物質の置換、2) 被着体と接着物質の結合、3) 接着物質の自己集合と固化、に分けることができる。これらの機能を複数のcpが分担しており、1) にはcp68kのN末端領域やcp19kが、2) にはcp68kのC末端領域やcp20kが、3) にはcp100や

cp52kが主な役割を果たすと考えられている。

1) に関与するcpはSer, Thr, Gly, Alaの組成が50-60%を占め、いずれも大腸菌組換え体のCDスペクトルでは構造に乏しい。被着体表面に結合した水分子やイオンと、それらcpの水酸基や荷電性側鎖との置換に適した構造戦略であると考えられている。2) に関与するcp20kは、荷電アミノ酸に富み、疎水性残基に非常に乏しいが、17%存在するCys残基のすべてが分子内ジスルフィドを形成することで安定な構造をとっており、石灰質や酸化金属と結合する。一方、cp68kのC末端領域は芳香族、荷電性、疎水性などのあらゆるアミノ酸が50残基の領域に詰め込まれており、不特定の被着体と結合するには適している。構成アミノ酸残基から推察する限り、このC末端領域が構造をとらずに溶液中に存在するとは考え難い。産性細胞貯蔵体としては、構造をとって親水性基を露出させるのか、親水性に富むN末端領域に内包されるのか、他の分子と会合しているのか、と想像させられるが、被着体との結合に至る過程も含めて、未だ構造面での戦略は明らかではない。3) に関与するcpは疎水性が高く、やはり貯蔵体が構造をとらずに溶液として存在することは困難と思われる(少なくとも大腸菌組み換え時は封入体となる)。溶液か流動性のある貯蔵体は、分泌後のなんらかの刺激に反応して分子間の相互作用を強め、速やかに自己集合することが求められる。その構造戦略を考えるヒントとして、cp52kの一部の配列が、pHあるいは塩濃度に反応してアミロイド様の二次構造への転移を示し、β-シート構造を介して自己集合することがあげられる⁴⁾。セメント全体ではβ-シート構造に富むことがIRの全反射測定法で確認されており、これはcp52kとcp100kの性質を主に反映していると考えられる。また、固化した接着層のセメントは、グアニジン塩酸と還元剤存在下で加温処理すると大部分が溶解し、上記cpが変性モノマー分子として回収される⁵⁾。

*2 数字は電気泳動上の分子量。

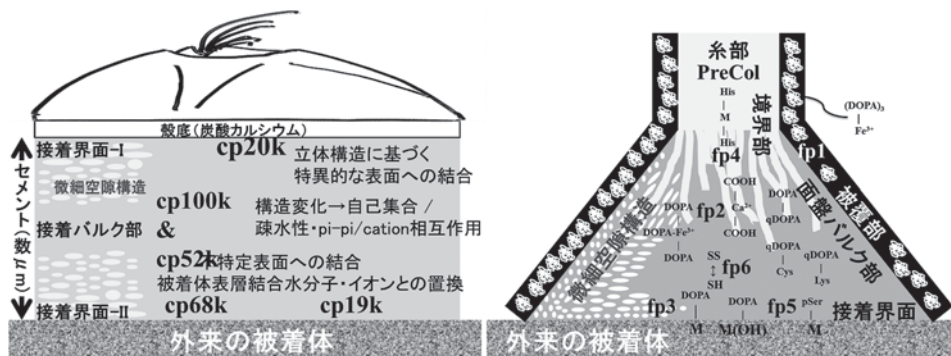


図2. フジツボとイガイの水中接着タンパク質

この単純な事実も接着層の固化に疎水性相互作用が大きな役割を果たしている⁶⁾ことを示しており、また分子間架橋結合が存在しないか、あるいは限られていることを示している。これは、後述のイガイの足糸においては、疎水性の高いタンパク質が見られない代わりに、分子間での配位や共有結合が豊富に存在し、足糸自体があらゆる溶解処理に抵抗性であることとは対照的であり、これら2種の生物が大きく異なる分子機構を進化させてきたことを示している。

セメントには上記5種のcp以外にリゾチームが含まれている。環境中の被着体表層は基本的に汚れており、微生物が付着バイオフィルムを形成している。このタンパク質は主に抗菌の役割を果たすと考えられている。セメントは天然の抗菌材料でもある。

ところで、セメントの被着体は二つある。一つは外来の被着体で、岩などのミネラルや酸化金属、合成高分子、他の生物表層などのさまざまな不特定の表面である。もう一つは自己の炭酸カルシウムの殻底で、これは必ずくっつけなければならない表面である。このようなフジツボにとっての被着体の事情が炭酸カルシウムや金属に特化した結合タンパク質であるcp20kを進化させたようである。特定の被着体への結合には立体構造に基づく分子デザインを進化させ、一方で、不特定の被着体への結合には、アミノ酸側鎖官能基の結合性を最大化する分子デザインを進化させてきたのではないだろうか。

イガイに代表される水中接着タンパク質材料^{7,8)}

イガイは2–6 cmの長さの足糸と呼ばれる糸を被着体に張り巡らせ、その束にぶら下がるようにくっつく(図1)。足糸はタンパク質材料であり、被着体との接着界面 (foot protein; fp-3, 5, 6)、面盤バルク部 (fp-2)、面盤バルク部と糸部の境界部 (fp-4)、糸部 (PreCol-D, -P)、そして足糸全体を覆う被覆部 (fp-1) に大きくは分けられ、各部位で機能するタンパク質が異なっている(図2)。糸の先端の少し広がった面盤部が外来被着体との直接の接着部であるが、この動物は糸部を合わせた足糸全体の機械物性のバランスで荒波の中で安定にくっついている。糸部にもさまざまな構造と機能(物性)の関係があるが、紙面の関係で面盤部を中心に紹介する。一次構造上で既知配列と相同性が明確なのは、fp2の一次構造の大半を占めるepidermal growth factor (EGF)モチーフ^{*3}と、PreColのコラーゲン様配列であり、それ

以外のfpでは相同な配列は見られない。いずれのfpも親水性アミノ酸残基の組成が非常に高く、cp100kやcp52kのように疎水性の高いfpはない。fpのpIはいずれも塩基性で、界面で機能するタンパク質は比較的分子量(6–12 kDa)であり、面盤バルク部、糸部、被覆層を構成するタンパク質はより高分子量(45–110 kDa)である。fp1やfp2、PreColには明瞭な繰り返し配列が見られる。それ以外のfpに繰り返し配列は見られないものの、アミノ酸組成に偏りがあり、組成上で特徴的なアミノ酸残基が機能に重要な役割を果たしていることが多い。

fpのすべてが何らかの翻訳後修飾を受けている。Tyr残基がtyrosinaseによる翻訳後修飾を受けたL-3,4-dihydroxy phenylalanine (DOPA)残基はfpのすべてに共通して見られ、かつ機能的に多芸で、この動物の水中接着に非常に大きな役割を果たしている。その他にはphosphoserine, hydroxyproline/dihydroxyproline, hydroxyarginineなどが確認されているが、DOPA残基に比べてその役割はほとんど明らかではない。

いずれのタンパク質の機能に対しても構造の役割は概して低く、多くがintrinsically disordered protein (IDP)に位置付けられるが、fp2についてはEGF様モチーフの繰り返し配列を有するため、それぞれがEGFフォールドをとっている可能性がある。

被着体との接着界面を形成するタンパク質は酸性pH下で被着体表層に分泌される。海水のpHは8付近であるが、塩基性pHでDOPA残基のカテコール基は速やかに活性なキノン体(qDOPA)に酸化され、それがさらに他のアミノ酸側鎖のアミノ基やチオール基、カテコール基と架橋結合を形成するため、分泌時の酸性pHは接着界面形成前のDOPA残基の安定化に意味がある。

この動物の接着機構全体を通してDOPA残基の担う役割は非常に大きい。前述の通りqDOPAは活性が高く、分子間架橋結合形成の能力が高い。これはfpの固化に重要な役割を果たすと考えられるが、それだけが優先的に進むと物性の低い単なる塊になってしまう可能性が高く、複合機能としての水中接着にはむしろカテコール基の役割がより大きいようである。DOPA残基のカテコール基は金属や酸化金属の被着体表層と一重・二重配位や水素結合を形成し、溶解性のFe³⁺とは三重配位結合を形成する。前者は接着界面形成に、また後者は面盤バルク部や足糸被覆層の形成に重要な役割を果たす。いずれもqDOPAに酸化されなければ可逆性があるため、sacrificial bondとして材料の弾性や修復性の付与にも貢献する。この動物の進化は可逆性のある配位結合をも導

*3 EGF機能に関与するアミノ酸残基は置換しており、EGFとしての機能はない。

入することで、環境応答性と、より高度な物性を実現している。カテコール基は海水のアルカリ性pHではqDOPAへと酸化されやすいが、qDOPAへと傾くと密着材料としての物性に不都合が生じる。このトレードオフの関係の制御には、高いCys残基組成（約10%）のfp6が関与しており、カテコール基の保護とqDOPAからの還元による救済に役割を果たしている。

ところで、海水の溶解性Fe³⁺濃度は非常に低い。そのため、この動物はFe²⁺との一座・二座配位の状態でfpを産生細胞から分泌し、海水のアルカリ性pHによるFe³⁺への酸化と三座配位へのシフトにより、材料としての性質をコントロールしているようである。

面盤バルク部と糸部の境界部に局在するfp4はHis残基に富む領域を有している。糸部のPreColのコラーゲンモチーフの末端にもHis残基に富む領域があり、これら分子間での可逆的な配位結合形成が面盤バルク部と糸部の境界部の形成に寄与している。このような金属イオンの結合モチーフはヒトの接着タンパク質や、バイオミネラル化に関連するタンパク質、細胞外マトリックスを形成するタンパク質にも見られ、同様の構造モチーフを分子進化の過程で使い回している例である。

菅棲多毛虫（チューブワーム）は砂粒などをくっつけて、棲むための管を作るために接着物質を使用する。やはりDOPA残基の多様な化学に支えられており、イガイの接着機構と同じカテゴリーにくることができるが、より単純化された系として研究が進められている⁹⁾。

生物の水中接着に関する酵素

イガイやチューブワームの水中接着でもっとも重要な役割を果たすDOPA残基は、tyrosinaseによる翻訳後修飾により生成されるが、これらの動物のtyrosinaseの酵素学的な性質は十分明らかではない。In vitroでの実験では、イガイから酸性変性条件下で抽出、精製された翻訳後修飾済みのfpを用いるか、あるいは化学合成ペプチドや組換えタンパク質を市販の担子菌由来tyrosinaseで酵素変換することがほとんどであるが、後者は変換効率が悪く、ペプチド・タンパク質性材料開発の課題の一つとなっている。また、イガイのhydroxylaseやoxidaseなどの修飾酵素の報告もほとんどない。

応用研究と今後の展望

応用研究では、自己集合や固化、金属材料表面の被覆や表面への機能性物質の固相化といった観点で、カテコールの化学が高分子化学の分野にインパクトを与えてきた¹⁰⁾。また、ペプチドはアミノ酸側鎖の多様性や分子

のコンフォメーションと、化学合成の両面の適応性からタンパク質と合成高分子の中間の位置にあり、ある種の優位性があるため、自己集合性ペプチドの研究^{4,11)}などが進められている。高分子化学へのインパクトには単純な化学構造が求められるため、生物のさまざまな分子戦略がある中で、カテコールの化学しか活用されてこなかったのが実際であり、生物のシステムを読み解く側としては残念な思いがある。近年の自然に倣うトレンドは、2000年初頭のヤモリの指先のナノ繊維性構造に端を発する。合成高分子の研究開発がそれらをリードしたことは記憶に新しいが、分子に対する、生体分子と合成高分子の考え方の違いがあまりにも大きく、協調する動きは少なかった。たとえばバイオプロセスの観点から見れば、酸化に鋭敏でかつ導入効率のよくないDOPA残基に依存するイガイの戦略に対して、翻訳後修飾に依存しないフジツボのタンパク質らしい分子戦略は、応用に相性が良いとも言える。水中でコンフォメーションを変換させることによる物性の制御、さまざまなモチーフ配列を連結したタンパク質デザインに、遺伝子コドンの拡張や分子の接合技術の進歩も加えることができる。何より自然の生物分子材料に直に倣うことができることは有利である。豊富なアイデアが生物には溢れていて、そのほとんどの分子戦略を私たちは未だ知らない。今後のスマートセルインダストリーにおけるバイオのものづくりの展開によっては、材料に対する認識も変わっていくのかもしれない¹²⁾。

本稿執筆の機会を賜りました浅野泰久先生に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kamino, K.: *Structural interfaces and attachments in biology*, p. 175, Springer-Verlag (2012).
- 2) Kamino, K. et al.: *Biofouling*, **29**, 735 (2013).
- 3) 紙野 圭 (西 敏夫 監修): 表面界面技術ハンドブック - 材料創製・分析・評価の最新技術から先端産業への適用, p. 409, エス・ティー・エス (2016).
- 4) Nakano, M. et al.: *Biochemistry (ACS)*, **54**, 826 (2015).
- 5) Kamino, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **275**, 27360 (2000).
- 6) Kamino, K. et al.: *FEBS J.*, **279**, 1750 (2012).
- 7) Waite, J. H.: *J. Exp. Biol.*, **220**, 517 (2017).
- 8) Kamino, K.: *J. Adhe.*, **86**, 96 (2010).
- 9) Stewart, R. J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 27 (2011).
- 10) Forooshani, P. K. and Lee, B. P.: *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, **55**, 9 (2017).
- 11) Nakano, M. et al.: *Biomacromolecules (ACS)*, **8**, 1830 (2007).
- 12) Nguyen P. Q. et al.: *Nat. Commun.*, **5**, 4945 (2014).