

平成 30 年 8 月 22 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04359

研究課題名(和文) ペプチド系溶解性制御タグによるタンパク質抗原性の制御及びその分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis and modulation of protein immunogenicity using short Solubility Controlling Peptide tags (SCP tag)

研究代表者

黒田 裕 (Kuroda, Yutaka)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10312240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の溶解性は、その免疫原性(又は抗原性)に影響を及ぼす因子であると昔から考えられてきたが、タンパク質の溶解性を生体内で制御することが出来なため、その実験的な証明はなされていない。本研究では、研究代表者が開発したわずか5残基のペプチド系溶解性制御タグ(SCPタグ)を抗原タンパク質に付加することで、溶解性・会合性を溶媒条件を変えずに制御した。変異体の免疫原性を実験的に調べた結果、30～50量体の会合体を形成する変異体の免疫原性が向上することが明らかとなった。今後は、SCPタグによる免疫原性向上のメカニズムを更に詳細に解析し、本技術のワクチン開発やモノクローナル抗体の生成への応用を試みる。

研究成果の概要(英文)：Proteins solubility and aggregation have long been suspected to influence the immune response against small size proteins, but no direct experimental evidence have been reported so far. One reason for the lack of experimental support is that changing protein solubility requires changing the solution condition, which is not possible in vivo. In our study, we used short Solubility Controlling Peptide tags (SCP tag) peptide tags attached to the termini of our model proteins (Bovine Trypsin Pancreatic Trypsin Inhibitor, and Dengue Envelope protein domain 3) for modulating their solubility without affecting their function or biophysical properties. We showed that some SCP tags can oligomerize the proteins into 30-50 mers in a reversible manner, and that these aggregates increase their immunogenicity. In future, we plan to further investigate the molecular mechanisms of immune response increase induced by SCP tags, and explore its possible biotechnological applications.

研究分野：生物物理学、タンパク質科学

キーワード：生物物理 組換えタンパク質 バイオテクノロジー 免疫原性 抗原性 タンパク質断片 デング 溶解性制御タグ

1. 研究開始当初の背景

溶解性はタンパク質やペプチドの免疫原性に影響を及ぼす因子であると昔から考えられてきた(Larrin & Gallimore *J Hyg* 1971)。従来から免疫応答増強剤として用いられているアジュバント、PEG 化や、キャリアタンパク質においても、抗原タンパク質の溶解性の低下が免疫増強の要因であると考えられているが、増強の分子機構は厳密には明らかにされておらず、免疫原性の詳細な分子機構はまだ解明されていない(Ryan et al, *Expert Opin Drug Dev* 2008)。本計画では、研究代表者が開発したわずか5残基のペプチド系溶解性制御タグ(SCP タグ)を抗原タンパク質の末端に付加することで、その溶解性・会合性を制御する新しい技術を用いることで、タンパク質の溶解性と免疫原性の関係を実験的に解析した。

2. 研究の目的

本研究では、抗原タンパク質の溶解性が免疫応答に及ぼす影響を物理化学的な視点から系統的に解析する。具体的には、研究代表者が開発したペプチド系溶解性制御タグ(以下、SCP タグ)を用いて、抗原タンパク質の溶解性を向上・低下させ、SCP タグの付加が抗原タンパク質の物性や機能を変えずに溶解性のみを制御することを生物物理学的な手法を用いて検証する。次に、マウスを用いた免疫応答実験から SCP タグ付加による免疫原性の増強及び低下を測定する。以上の結果、免疫学において古くから存在する謎の一つである凝集性と免疫原性の関係を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本計画では、以下の(1)~(5)の実験によって、抗原タンパク質の溶解性・会合性が免疫原性に及ぼす影響を物理化学的な視点から系統的に解析した。

研究で観測する現象が普遍的であることを示すために2種類のタンパク質を用いた。まずは、タンパク質の折り畳み研究に古くから用いられている牛膵臓トリプシン阻害タンパク質(以下、BPTI;分子量=6.5kDa)を用いた。次に、アジアの広い地域で公衆衛生上の大きな問題となっているデング熱の病原体であるデングウイルス由来の糖エンベロプタンパク質第3ドメイン(以下、ED3;分子量=12kDa)を用いた。両モデルタンパク質を用いて、以下の実験を行った。

- (1) ED3 変異体の発現系を作製し、大腸菌で発現した。発現したタンパク質を Ni-NTA レジンと逆相 HPLC を用いて高純度に精製した(SCP タグは複数種類用いた)。
- (2) SCP タグ付加 ED3 の溶解性及び、会合状態(分子量、二次構造含量)を実験的に測定した。

- (3) SCP タグ付加 ED3 の免疫原性をマウスの免疫実験から求めた。
- (4) 上記の実験結果を基にタンパク質の溶解性・会合状態と免疫原性の関係を評価した。
- (5) BPTI をモデルに用いて、上記(1)~(4)の実験を繰り返して、タンパク質溶解性・会合性と免疫原性の関係の普遍性を検証した。

4. 研究成果

まず平成 27~28 年度研究で、SCP タグを BPTI 及び ED3 の両モデルタンパク質の末端に付加することで会合度が制御可能であることを示し、会合度の温度、濃度及び SCP タグ配列種の依存性を、生物物理学的な測定を用いて詳細に検証した。その結果、SCP タグを用いてタンパク質の溶解性を低下させることで、10nm 程度の約 30~50 量体の会合体を可逆的に凝集させることに成功した(図1)。ここで用いた SCP タグは、わずか 4~7 残基の短い配列であるため、タンパク質の機能に影響を与えないことを確認している。

次に、平成 28 年度後半から、マウスを用いた免疫応答実験を実施し、SCP タグ付加による免疫原性と、会合度の変化を詳細に比較評価することで、両者の関係の解明を試みた。その結果、免疫原性を飛躍的に向上する 4~7 残基から成る SCP タグを同定した。将来的には、これらの SCP タグによる免疫原性向上のメカニズムを更に詳細に解析し、ワクチン開発やモノクローナル抗体の生成への応用を試みる予定である。

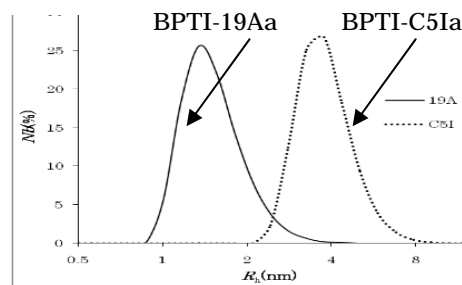


図 1: 可溶性会合体の粒子半径。タンパク質濃度 1mg/mL。BPTI-19Aa(実線)と BPTI-C5Ia(点線)の動的散乱スペクトル。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 16 件)

Nautiyal Kalpana, Kuroda Yutaka, A SEP tag enhances the expression, solubility and yield of recombinant TEV protease without altering its activity, *New Biotechnology*, 査読有, 42, 2018, 77-84

DOI:10.1016/j.nbt.2018.02.006

Kuroda Yutaka, Biophysical studies of protein solubility and amorphous aggregation by systematic mutational analysis and a helical polymerization model, *Biophysical Reviews*, 査読有, 10(2), 2018, 473-480

DOI:10.1007/s12551-017-0342-y

Kabir Md. Golam, Islam Mohammad Monirul, Kuroda Yutaka, Reversible association of proteins into sub-visible amorphous aggregates using short solubility controlling peptide tags, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 査読有, 1866(2), 2018, 366-372

DOI:10.1016/j.bbapap.2017.09.012

Islam Mohammad Monirul, Kuroda Yutaka, A hetero-micro-seeding strategy for readily crystallizing closely related protein variants, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 493(1), 2017, 504-508

DOI:10.1016/j.bbrc.2017.08.161

Nakamura Shigeyoshi, Saotome Tomonori, Nakazawa Akiko, Fukuda Masao, Kuroda Yutaka, Kidokoro Shun-ichi, Thermodynamics of the thermal denaturation of acid molten globule state of cytochrome *c* Indicate a reversible high-temperature oligomerization process, *Biochemistry*, 査読有, 56(18), 2017, pp2372-2378

DOI:10.1021/acs.biochem.6b01225

Islam Mohammad Monirul, Yohda Masafumi, Kidokoro Shun-ichi, Kuroda Yutaka, Crystal structures of highly simplified BPTIs provide insights into hydration-driven increase of unfolding enthalpy, *Scientific Reports*, 査読有, 7, 2017, 41205

DOI:10.1038/srep41205

Richa Tambi, Ide Soichiro, Suzuki Ryosuke, Ebina Teppei, Kuroda Yutaka, Fast H-DROP: A thirty times accelerated version of H-DROP for interactive SVM-based prediction of helical domain linkers, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 査読有, 31(2), 2017, 237-244

DOI: 10.1007/s10822-016-9999-8

Jozawa Hiroki, Kabir Md. Golam, Zako Tamotsu, Maeda Mizuo, Chiba Kazuhiro, Kuroda Yutaka, Amorphous protein aggregation monitored using fluorescence self-quenching, *FEBS Letters*, 査読有, 590(20), 2016, 3501-3509

DOI:10.1002/1873-3468.12439

Saotome Tomonori, Nakamura Shigeyoshi, Islam Mohammad M., Nakazawa Akiko, Dellarole Mariano, Arisaka Fumio, Kidokoro Shun-ichi, Kuroda Yutaka, Unusual reversible oligomerization of unfolded Dengue envelope protein domain 3 at high temperature and its abolition by a point mutation, *Biochemistry*, 査読有, 55(32) 2016, pp 4469-4475

DOI:10.1021/acs.biochem.6b00431

Wu Nan, Kamioka Tetsuya, Kuroda Yutaka, A novel screening system based on VanX mediated autolysis - application to *Gaussia luciferase*. *Biotechnology and Bioengineering*, 査読有, 113(7)2016, 1413-1420

DOI:10.1002/bit.25910

Kulkarni Manjiri Ravindra, Numoto Nobutaka, Ito Nobutoshi, Kuroda Yutaka Modeling and experimental assessment of a buried Leu-Ile mutation in Dengue envelope protein domain III, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有 471(1), 2016, 163-168

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.159

Kuroda Yutaka, Suenaga Atsushi, Sato Yuji, Kosuda Satoshi, Makoto Taiji, All-atom molecular dynamics analysis of multi-peptide systems reproduces peptide solubility in line with experimental observations, *Scientific Reports*, 査読有, 6, 2016, 19479

DOI:10.1038/srep19479

Kulkarni Manjiri Ravindra, Islam Mohammad Monirul, Numoto Nobutaka, Elahi Montasir, Mahib R Mamunur, Ito Nobutoshi, Kuroda Yutaka, Structural and biophysical analysis

of sero-specific immune responses using epitope grafted Dengue ED3 mutants, *Biochim Biophys Acta*, 査読有, 1854, 2015, pp1438-1443

DOI: 10.1016/j.bbapap.2015.07.004

Islam Mohammad Monirul, Nakamura Shigeyoshi, Noguchi Keiichi, Yohda Masafumi, Kidokoro Shun-ichi, Kuroda Yutaka, Analysis and Control of Protein Crystallization Using Short Peptide Tags That Change Solubility without Affecting Structure, Thermal Stability, and Function *Crystal Growth & Design*, 査読有, 15(6), 2015, pp2703-2711

DOI:10.1021/acs.cgd.5b00010

Wu Nan, Rathnayaka Tharangani, Yutaka Kuroda, Bacterial expression and re-engineering of *Gaussia princeps* luciferase and its use as a reporter protein, *Biochim Biophys Acta*, 査読有, 1854, 2015, pp1392-1399

DOI:10.1016/j.bbapap.2015.05.008

如澤浩樹, 座古保, 前田瑞夫, 千葉一裕, 黒田裕, 蛍光セルフクエンチを用いたアモルファス凝集形成機構の解析, 月刊「バイオインダストリー」シーエムシー出版, 査読無, 2105, 36-41

https://www.cmcbooks.co.jp/product/s/detail.php?product_id=4947

〔学会発表〕(計 40 件)

山本裕子, 早乙女友規, 沼本修孝, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 黒田裕, デングウイルス由来 ED3 における Pro331 のシストランス異性化がフォールディングとミスフォールディングに与える影響の探求, 第 7 回日本生物物理学会関東支部会, 2018

松沢佑紀, 河村直樹, 黒田裕, 機械学習 (SVM) を用いたドメインリンカー予測, 第 7 回日本生物物理学会関東支部会, 2018

廣瀬克彦, Kalpana Nautiyal, Md. Golam Kibria, 黒田裕, 分子シミュレーション及び実験による Anti-EGFR scfv の溶解性予測と評価, 第 7 回日本生物物理学会関東支部会, 2018

小原真, 河村直樹, 黒田裕, 格子モデルシミュレーションによるタンパク質凝集形成の分析, 第 7 回日本生物物理学会関東支部会, 2018

Islam Mohammad Monirul, Kuroda Yutaka, A hetero-micro-seeding strategy for readily crystallizing closely related protein variants, Fourth National Conference of Bangladesh

Crystallographic Association, 2018

Golam Md. Kabir, Islam Mohammad Monirul, Kuroda Yutaka, Control and Characterization of Sub-Visible Amorphous Protein Aggregates Using Short Solubility Controlling Peptide Tags, Fourth National Conference of Bangladesh Crystallographic Association, 2018

黒田裕, 計算機シミュレーションを用いた蛋白質・ペプチドの凝集性・溶解性の研究, 蛋白研セミナー「産業応用を志向するタンパク質溶液研究」, 2017

早乙女友規, 熱測定と光散乱測定によるアモルファス凝集の解析, 蛋白研セミナー「産業応用を志向するタンパク質溶液研究」, 2017

Islam Mohammad Monirul, Yohda Masafumi, Shun-ichi Kidokoro, Kuroda Yutaka, Crystal structures of highly simplified BPTIs provide insights into hydration driven increase of unfolding enthalpy, 第 17 回日本蛋白質科学会年会, 2017

Golam MD. Kabir, Islam Mohammad Monirul, Kuroda Yutaka, 溶解性制御ペプチドタグ (SCP) タグを用いた蛋白質の可溶で不定形な凝集体形成の制御, 第 17 回日本蛋白質科学会年会, 2017

Kalpana Nautiyal, Nafsoon Rahman, Kuroda Yutaka, SEP tags enhance the solubility and yield of recombinant TEV protease without altering its activity, 第 17 回日本蛋白質科学会年会, 2017

Kulkarni Manjiri Ravindra, Islam Mohammad Monirul, Numoto Nobutaka, Elahi MD. Montasir, Ito Nobutoshi, Kuroda Yutaka, Crystallographic studies of sero-specific Dengue ED3 immune response, American Crystallographic Association annual meeting, 2017

Kulkarni Manjiri Ravindra, Islam Mohammad Monirul, Numoto Nobutaka, Elahi MD. Montasir, Ito Nobutoshi, Kuroda Yutaka, Crystal structures of dengue virus protein revealed ED3 sero-specificity, 24th Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr), 2017

Islam Mohammad Monirul, Kuroda Yutaka, Short peptide tags in academic research and biotechnological applications of proteins, National Conference on Natural Science and Technology at Asian University for Women, 2017

- Golam MD. Kabir, Islam Mohammad Monirul, Kuroda Yutaka, Control and characterization of soluble amorphous protein oligomers using short solubility controlling peptide tags, 第 6 回日本生物物理学会関東支部会、2017
- Kalpna Nautiyal, Nafsoon Rahman, Kuroda Yutaka, SEP tags enhance the solubility and yield of recombinant TEV protease without altering its activity, 第 6 回日本生物物理学会関東支部会、2017
- 早乙女友規、中村成芳、モハマド イスラム、中澤晶子、マリアノ デラロー、有坂文雄、城所俊一、黒田裕、高温条件下で変性した DEN4 ED3 の可逆的なオリゴマー形成の残基置換による阻害、第 6 回日本生物物理学会関東支部会、2017
- 萩原くるみ、沼本修孝、伊藤暢聡、黒田裕、複数変異導入 Dengue ウィルス由来 ED3 に対するモデリングと熱安定性評価、第 6 回日本生物物理学会関東支部会、2017
- 三浦史帆、上岡哲矢、黒田裕、短いペプチドタグを付加した D3ED3 の会合状態の評価、第 6 回日本生物物理学会関東支部会、2017
- リムザン万凜、Kalpna Nautiyal、黒田裕、ブラウン動力学シミュレーションを用いた蛋白質の溶解性の予測、第 6 回日本生物物理学会関東支部会、2017
- 21 黒田裕、蛋白質工学を用いた会合と溶解性の最新の研究、第 54 回日本生物物理学会年会、2016
- 22 黒田裕、ペプチド溶解性の全原子分子動力学シミュレーション及びその実験的検証、第 54 回日本生物物理学会年会、2016
- 23 Golam MD. Kabir, Islam Mohammad Monirul, Saotome Tomonori, Kuroda Yutaka, Control and biophysical characterization of soluble protein oligomers using short peptide tags, 第 54 回日本生物物理学会年会、2016
- 24 Saotome Tomonori, Nakamura Shigeyoshi, Islam Mohammad M., Nakazawa Akiko, Dellarole Mariano, Arisaka Fumio, Kidokoro Shun-ichi, Kuroda Yutaka, Unusual reversible oligomerization of unfolded Dengue envelope protein domain 3 at high temperature and its abolition by a point mutation, 第 54 回日本生物物理学会年会、2016
- 25 Islam Mohammad Monirul, Nakamura Shigeyoshi, Noguchi Keiichi, Yohda Masafumi, Kidokoro Shun-ichi, Kuroda Yutaka, Analysis and control of protein crystallization using short peptide tags without affecting structure, thermal stability and function, 第 54 回日本生物物理学会年会、2016
- 26 Kuroda Yutaka, Large scale all-atom molecular dynamics analysis of multi-peptide systems reproduces peptide aggregation propensity in line with experimental observations, PEGS-Europe 2016, 2016
- 27 黒田裕、タンパク質の溶解性の物理化学的解析及びその制御、第 16 回日本蛋白質科学学会年会、2016
- 28 Kalpna Nautiyal, Sakurai Hiromitsu, Kosuda Satoshi, Ide Soichiro, Ogawa Yoko, Hagihara Yoshihisa, Kuroda Yutaka, Enhancing Solubility of Antibody Fragments via Solubility Enhancing Peptides (SEP) Tags, 第 16 回日本蛋白質科学学会年会、2016
- 29 早乙女友規、中村成芳、イスラム モハマド、中澤明子、城所俊一、黒田裕、高温条件下で変性した DEN4 ED3 の可逆的なオリゴマー形成の一残基置換による阻害、第 16 回日本蛋白質科学学会年会、2016
- 30 Kurotani Atsushi, Tokmakov Alexander, Kuroda Yutaka, Shinozaki Kazuo, Sakurai Tetsuya, Plant-PrAS: a database of physicochemical and structural properties and the comparative analysis in plant proteomes, 第 57 回植物生理学会年会、2016
- 31 黒田裕、ペプチド溶解性の分子動力学シミュレーション、第 5 回日本生物物理学会関東支部会、2016
- 32 黒田裕、分子動力学シミュレーションを用いたタンパク質・ペプチドの溶解性解析、蛋白質研究所セミナー：構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題、2016
- 33 Kulkarni Manjiri Ravindra, Numoto Nobutaka, Ito Nobutoshi, Kuroda Yutaka, Modeling and experimental assessment of buried Leu-Ile mutation in DEN4 ED3, 蛋白質研究所セミナー：構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題、2016
- 34 河村直樹、鈴木涼祐、黒田裕、格子モデルを用いたタンパク質凝集のシミュレーション、蛋白質研究所セミナー：構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題、2016

- 35 井出宗一郎、Tambi Richa、鈴木涼祐、蝦名鉄平、黒田裕、機械学習法 SVM を用いたヘリカルリンカー予測機 H-DROP、蛋白質研究所セミナー：構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題、2016
- 36 黒田裕、佐藤雄士、末永敦、泰地真弘人、多数ペプチドから成る系の全原子分子動力学シミュレーションによるペプチド溶解性、第 53 回日本生物物理学会年会、2015
- 37 Tambi Richa, Ide Soichiro, Suzuki Ryosuke, Ebina Teppei, Kuroda Yutaka, Accelerated H-DROP: An SVM based Helical Domain linker pRedictor trained with OPTimized features, 第 53 回日本生物物理学会年会、2015
- 38 Kabir Md. Golam, Islam Mohammad Monirul, 黒田裕, Control of protein aggregation and oligomerization using short SEP (Solubility Enhancing Peptide) tags, 第 53 回日本生物物理学会年会、2015
- 39 小須田慧司、末永敦、森本元太郎、泰地真弘人、黒田裕、全原子 MD シミュレーションによるアラニンスキャニング変異を導入したアミロイド形成ペプチドの凝集解析、第 53 回日本生物物理学会年会、2015
- 40 Yutaka Kuroda, Peptides solubility estimated by all-atom molecular dynamics simulation of multipeptide systems concur with experimental values, IUPAC 45th World Chemistry Congress, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：組換ポリペプチドの発現量及び収量の向上方法

発明者：黒田裕、NAUTIYAL Kalpana、上岡哲矢

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2017-247019

出願年月日：平成 29 年 12 月 22 日

国内外の別：国内

名称：抗原組成物

発明者：黒田裕、Islam Mohammad Monirul、三浦史帆、Rahman Nafsoon、上岡哲矢

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2017-152123

出願年月日：平成 29 年 8 月 8 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 裕 (KURODA, Yutaka)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：10312240

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()