

令和 3 年 2 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14483

研究課題名(和文) ナノ材を抗原とする抗体の発見から展開する分子標的有機ナノ結晶粒子のワンポット合成

研究課題名(英文) Synthesis of organic nanocrystals with the function of molecular recognition via material-binding proteins

研究代表者

梅津 光央 (Umetsu, Mitsuo)

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：70333846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ナノサイズの蛍光性有機結晶はバイオイメージングにとって魅力的である。しかし、蛍光分子の基本骨格は疎水性であるため作製したナノ結晶が水溶液中で分散しにくいことや、結晶表面に抗体などの分子標的機能を付与させる汎用的方法がないことから、ほとんど利用されていない。本研究では、水に親和な蛋白質フォーマットをもつ材料結合性タンパク質を開発し、そのタンパク質を足場として材料表面とバイオ分子を架橋するインターフェイス構造を設計することで、有機ナノ結晶へ簡単に分子標的機能を持たせられるプロセスを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有機蛍光分子の結晶粒子は、分子の配向構造によっては輝度・寿命が飛躍的に向上し、発光波長も変化させることができるが、蛍光分子の基本骨格は疎水性であるため作製したナノ結晶は水溶液中では分散しにくく、結晶表面に抗体などの分子標的機能を付与させる汎用的方法がない。本研究の成果より、特定の有機材料表面に吸着できるペプチドやタンパク質を取得することによって、有機ナノ素材の物性を変化させることができ、有機ナノ材および有機界面のバイオイメージングやセンシングへの展開範囲を拡張させることができた。

研究成果の概要(英文)：Nano-sized organic crystal particles are applicable for bioimaging. However, the particles are too hydrophobic to be dispersed in water, and the binding of antibody on the surface is difficult. In this study, we generated an interface molecule which can make a linkage between organic material surface and antibody, and we proposed a new method for immobilize antibodies on the surface of organic materials in one pot.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：生体分子 生体機能利用 ナノ材料

1. 研究開始当初の背景

有機蛍光分子はバイオイメージングのプローブとして用いられているが、光励起により酸化してしまうため発光寿命が短い。一方、近年、電子材料分野で利用されている蛍光分子の結晶粒子は、分子の配向構造によっては輝度・寿命が飛躍的に向上し、発光波長も変化させることができる。そのため、ナノサイズの蛍光性有機結晶はバイオイメージングにとって魅力的であるが、蛍光分子の基本骨格は疎水性であるため作製したナノ結晶は水溶液中では分散しないことや、結晶表面に抗体などの分子標的機能を付与させる汎用的方法がないことから、ほとんど利用されていない。その中で研究代表者は、近年、分子集合体や無機素材の表面が提供する固体結晶面を識別して結合できるペプチドや、さらにそのペプチドから結合力が数十～数百倍向上したタンパク質を開発し、それらペプチド・タンパク質を足場として材料表面へ様々なタンパク質を固定化できることを報告している。そこで本研究では、水に親和な蛋白質フォーマットをもつ材料結合性ペプチド・タンパク質を用いて、バイオイメージングに有用な抗体分子を有機ナノ結晶粒子へ簡便に固定化できると発想した。

2. 研究の目的

本研究では、蛋白質工学を用いて、有機材料表面に結合するペプチド・タンパク質を調製する。そして、有機材料表面とバイオ分子を架橋するインターフェイス構造を設計し、有機ナノ結晶へワンポットで分子標的機能を持たせられるプロセスを開発する。

3. 研究の方法

(1) 人工選択系による有機材料へ結合性するペプチド・抗体の取得

ファージ提示法を用いて有機材料表面へ結合するペプチドの取得を行い、その後、そのペプチドを抗体へ移植しペプチドよりも結合力が高い抗体断片を取得する。

(2) 有機材料結合性タンパク質を利用したバイオインターフェイス設計

有機材料結合性タンパク質を錨として、抗体分子を有機材料表面へ固定化できるインターフェイス構造を設計する。

(3) 水中分散するナノ結晶粒子の合成：

貧溶媒化合成系に有機材料結合性ペプチド・タンパク質を添加することで、ナノ結晶粒子の形成を行う。

(4) バイオインターフェイスの設計による分子標的ナノ粒子の作製：

(2)で開発したバイオインターフェイス設計を用いて、ナノ粒子表面へ抗体を集積化させる。

4. 研究成果

(1) 人工選択系による有機材料へ結合性するペプチド・抗体の取得

有機ナノ結晶に結合するペプチドを進化工学的的手法により取得を試みた。有機ナノ結晶を抗原として用い、ペプチドの選択操作を行ったところ、いくつかの結合陽性ペプチドを得ることができた。そこで、ペプチドの数十～数百倍の結合力をもつラクダ抗体の結合機能ドメインの作製を試みるために、結合機能ドメインにある CDR ループの一つを材料結合性ペプチドに交換した結合機能ドメインを作製した。その結果、移植に用いたペプチドによって、その機能が保持される結合ドメインと保持されていないドメインが存在することが分かった。これより、材料結合性ペプチドは、ある確率で結合ドメインへ移植することで機能が発現しないものがあることが示唆された。

(2) 有機材料結合性タンパク質を利用したバイオインターフェイス設計

有機材料結合性タンパク質としてセルロースに吸着特性をもつセルロース結合ドメイン(CBD)に着目した。ProteinA 由来の Z domain を由来の異なる複数の CBD の C 末端へペプチドリンカーを介して融合した ProteinA 融合 CBD を大腸菌にて調製した。各々の ProteinA 融合 CBD 溶液をニトロセルロース(NC)膜上に添加した後、西洋ワサビペ

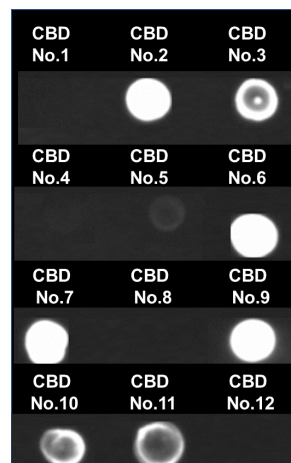


図 1. ProteinA 融合 CBD を介した抗体分子のセルロース膜結合評価

ルオキシダーゼ(HRP)修飾マウス由来 IgG を添加し HRP の基質を加えたところ、ほとんどの ProteinA 融合 CBD について酵素反応による発光が観測され、抗体が固定化されていることが分かった(図 1)。

次に、表面が疎水的なポリスチレン(PS)プレートに対しての結合性評価を行った。ProteinA 融合 CBD を用いて PS プレート表面への抗体固定化の評価を行った。その結果、ProteinA 融合 CBD を用いない場合と比較し、ほとんどのものについて抗体の固定化量が増加し、特に No.2 は 5.6 倍の増加が示された(図 2)。このことから、これより、ProteinA 融合 CBD はセルロースだけではなく疎水性材料にも適用可能であり、疎水性が高いものほど抗体固定化量の向上が期待できることが示唆された。

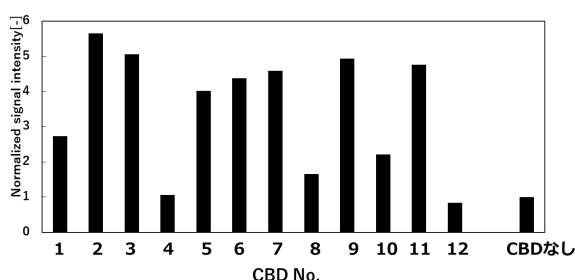


図 2. ProteinA 融合 CBD を介した抗体分子のポリスチレンプレートへの結合特性評価

(3) 水中分散するナノ結晶粒子の合成

有機ナノ結晶の作製において、貧溶媒化合成系に目的材に結合性をもつペプチド・タンパク質を添加することで、水中で分散しやすい有機ナノ結晶粒子の作製を行ったところ、未添加のものと比較し、水中でも分散性を向上させることができた。さらに材料結合性ペプチド・タンパク質へ ProteinA を融合したものを添加した場合、ナノ粒子へ抗体を固定化できることも分かった。

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 9 件)

- Aruto Sugiyama, Mitsuo Umetsu, Hikaru Nakazawa, Teppei Niide, Ryutaro Asano, Takamitsu Hattori, and Izumi Kumagai, “High-throughput cytotoxicity and antigen-binding assay for screening small bispecific antibodies without purification”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **126**, 153-161 (2018). 査読有
doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.02.007.
- Ryota Saito, Yutaro Saito, Hikaru Nakazawa, Takamitsu Hattori, Izumi Kumagai, Mitsuo Umetsu, and Koki Makabe, “Impact in stability during sequential CDR grafting to construct camelid VHH antibodies against zinc oxide and gold”, *The Journal of Biochemistry*, **164**, 21-25 (2018). 査読有
DOI: 10.1093/jb/mvy016
- Hikaru Nakazawa, Yasuko Seta, Tatsuya Hirose, Yoshitake Masuda, and Mitsuo Umetsu, “Use of a Phage-Display Method to Identify Peptides That Bind to a Tin Oxide Nanosheets”, *Protein & Peptide Letters*, **25**, 68-75 (2018). 査読有
DOI :10.2174/0929866525666171206114429
- Zuzana Konvičková, Veronika Holíšová, Marek Kolenčík, Teppei Niide, Gabriela Kratošová, Mitsuo Umetsu, and Jana Seidlerová, “Photosynthesis of colloidal Ag-AgCl nanoparticles mediated by *Tilia sp.* leachate, evaluation of their behaviour in liquid phase and catalytic properties”, *Colloid and Polymer Science*, **296**, 677–687 (2018). 査読有
DOI : doi.org/10.1007/s00396-018-4290-2
- Ryutaro Asano, Keisuke Nagai, Koki Makabe, Kento Takahashi, Takashi Kumagai, Hiroko Kawaguchi, Hiromi Ogata, Kyoko Arai, Mitsuo Umetsu, and Izumi Kumagai, “Structural considerations for functional anti-EGFR × anti-CD3 bispecific diabodies in light of domain order and binding affinity”, *Oncotarget*, **9**, 13884–13893 (2018). 査読有
DOI: 10.18632/oncotarget.24490
- Hideaki Sanada, Kazuki Kobayashi, Kenji Oyama, Takamitsu Maru, Takeshi Nakanishi, Mitsuo Umetsu, Ryutaro Asano, and Izumi Kumagai, “Affinity maturation of humanized anti-epidermal growth factor receptor antibody using a modified phage-based open sandwich selection method”, *Scientific Reports*, **8**, 5414 (2018). 査読有
DOI: 10.1038/s41598-018-23796-3
- Aruto Sugiyama, Mitsuo Umetsu, Hikaru Nakazawa, Teppei Niide, Tomoko Onodera, Katsuhiko Hosokawa, Shuhei Hattori, Ryutaro Asano, and Izumi Kumagai, “A semi high-throughput method for screening small bispecific antibodies with high cytotoxicity”, *Scientific Reports*, **7**, 2862 (2017). 査読有
DOI:10.1038/s41598-017-03101-4
- Yuki Shibuya, Natsuki Haga, Ryutaro Asano, Hikaru Nakazawa, Takamitsu Hattori, Daisuke Takeda, Aruto Sugiyama, Reiko Kurotani, Izumi Kumagai, Mitsuo Umetsu, and Koki Makabe, “Generation of camelid VHH bispecific constructs via in-cell intein-mediated protein trans-splicing”, *Protein Engineering, Design & Selection*, **30**, 15-21 (2016). 査読有
DOI: doi.org/10.1093/protein/gzw057

9. Kyongwan Kim, Aurelien Sicora, Hikaru Nakazawa, Mitsuo Umetsu, Wonmuk Hwang, Winfried Teizer, "Isomorphic coalescence of aster cores formed in vitro from microtubules and kinesin motors", *Physical Biology*, **13**, 056002 (2016). 査読有
DOI: 10.1088/1478-3975/13/5/056002

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Tatsuki Miyaki, Hikaru Nakazawa, Takuma Sujino, and Mitsuo Umetsu, Development of material-binding proteins fused device to improve sensitivity of biosensor, International Conference On Nanomedicine And Nanobiotechnology – ICONAN 2017, 2017 年 9 月 12 日, Barcelona, Spain
2. 宮木 達輝, 中澤 光, 筋野 拓馬, 梅津 光央, 基板材料結合タンパク質を用いたナノデバイス指向インターフェイス分子開発, 第 69 回日本生物工学会, 2017 年 9 月 12 日, 西早稲田キャンパス, 東京
3. 梅津 光央, ナノとバイオをつなぐインターフェイスプロテイン, 第 174 委員会第 59 回研究会, 2017 年 9 月 12 日, キャンパスプラザ京都, 京都
4. Tatsuki Miyaki, Hikaru Nakazawa, Takuma Sujino, and Mitsuo Umetsu, Easy design of nano-oriented interface molecule on material chip: application of using substrate material binding protein for biosensing, The 13rd The Asian Congress on Biotechnology, 2017 年 7 月 24 日, Khon Kaen, Thailand.
5. Mitsuo Umetsu, Nanobiotechnology from material-binding biomolecules for nanomaterial engineering, International Workshop on Advanced Smart Materials and Engineering for Nano- and BioTechnologies, 2017 年 7 月 13 日, Kobe University, Kobe.
6. Mitsuo Umetsu, Smart bio-design for hybrid protein molecules, UNIST seminar, 2017 年 6 月 28 日, Bosan, Korea
7. Mitsuo Umetsu, Takamitsu Hattori, Takeshi Nakanishi, Satoko Sawai, Shinsuke Kikuchi, Ryutaro Asano, Izumi Kumagai, A high-affinity material-binding camel antibody: antibody engineering for one-step functionalization of material surfaces, 5th International Conference on Bio-Sensing Technology, 2017 年 5 月 8 日, Riva del Garda, Italy
8. 二井手 哲平, 真鍋 法義, 中澤 光, 服部 峰充, 熊谷 泉, 梅津 光央, 材料表面特異的抗体から発想するプラズモニク膜と多孔質膜のボトムアップ作製プロセス, 化学工学会第 82 回年会, 2017 年 3 月 6 日, 芝浦工業大学, 東京
9. Mitsuo Umetsu, Protein engineering for interface design on inorganic nanomaterials,

29th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2016), 2016 年 11 月 9 日, ANA Crowne Plaza Kyoto, Kyoto

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

1. 親和性ペプチドを用いて難水溶性薬物から成るナノ粒子を作製する方法, 二井手 哲平, 梅津 光央, 中澤 光, 東北大学, 特願 2019-161922, 2019 年 9 月 5 日, 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.che.tohoku.ac.jp/~prn/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅津 光央 (UMETSU, MITSUO)

東北大学大学院工学研究科・教授

研究者番号: 70333846

(2) 連携研究者

松井 淳 (MATSUI, JUN)

山形大学理学部・准教授

研究者番号: 50361184