

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21008

研究課題名(和文)ハイパーブランチタンパク質ポリマーの分子設計指針の確立と足場材料としての利用

研究課題名(英文) Establishment of molecular design guideline for hyperbranched protein polymers and their use as scaffolds

研究代表者

南畑 孝介 (Minamihata, Kosuke)

九州大学・工学研究院・特任助教

研究者番号：90648586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質を集積化することで、その機能を更に亢進することが出来る。本研究では西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)の酵素反応を用いて調製した、高度に架橋し、多数の分岐構造を有するタンパク質ポリマー(ハイパーブランチタンパク質ポリマー：HBPP)を足場として、タンパク質の集積化条件の検討を行った。SpyCatcherを用いてHBPPを調製し、セルロース分解酵素類ならびにルシフェラーゼおよびプロテインGを集積化することで、人工セルロソームならびに高感度検出プローブ分子の創製を検討した。これらの検討を通して、HBPPの調製条件ならびに、HBPP上へ分子を集積化する条件についての知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Conjugating functional proteins into a large assembly often results in an enhancement of overall functionalities. Here, a SpyCatcher polymer is prepared through catalytic reaction of horseradish peroxidase (HRP) and serves as a polymeric proteinaceous scaffold for construction of protein assemblies. Taking advantage of the favorable SpyCatcher and SpyTag interaction, SpyTagged proteins can be easily assembled onto the polymeric SpyCatcher scaffold with controllable binding ratio and site specificity. We demonstrated construction of ratio-controllable binary artificial hemicellulosomes by assembling endoxylanase and arabinofuranosidase and biosensing probe by conjugating SpyTagged Nanoluc and protein G onto SpyCatcher polymer. Through this studies, we managed to obtain knowledge of condition of protein polymer preparation and assemblies of proteins onto the protein polymers.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：ポリマー 蛋白質 複合化 自己集合 セルロソーム 検出プローブ

### 1. 研究開始当初の背景

種々の機能性分子を集積化させることで、その機能を最大限に利用することが可能となる。例えば蛍光色素を集積させれば、局所範囲内から強い蛍光強度が得られ、高輝度化が達成できる。また酵素を集積させれば、協同的な酵素反応が起きることで高い酵素活性が得られる。

しかし、単純に多数の機能性分子を集積させるだけでは、往々にして所望の効果は得られない。蛍光色素は互いに近接することで自己消光することから、蛍光色素間の距離を適切に保った集積化が必要とされる。また、酵素の集積化によって高い活性を示すセルロソーム(セルラーゼ複合体)を例に挙げると、構成するセルラーゼの種類やセルロース結合ドメインの組合せ、さらに各タンパク質の比率によって大きく活性が変化することから、酵素を集積させる足場材料には、多種類の酵素を受け入れる汎用性と、その比率を任意に変えられる自由度が求められる。このような要望に答えることができる足場材料を得ることによって、機能性分子の効率的な集積化が可能となり、より機能を亢進した新規バイオ材料の創製へと繋がる。

### 2. 研究の目的

本研究では、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)の酵素反応を用いて調製したタンパク質ポリマーの利用を検討した。これまでに、遺伝子工学的手法を用いて、チロシンを含むペプチドタグ(以下 Y-tag)をタンパク質に導入し、HRP 酵素反応処理を施すことによって、**図 1** に示すような、極めて高度に架橋し、分岐した構造を持つ、ハイパーブランチタンパク質ポリマー(HBPP)の創製を達成した。

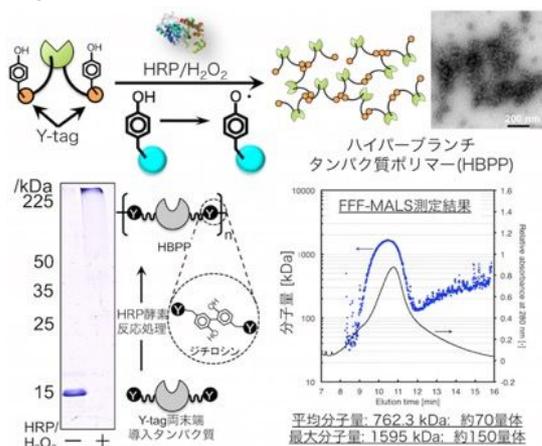


図 1 HRP 酵素反応による HBPP の調製

この HBPP は、ボトムアップ的アプローチによって調製されることから、重合させるタンパク質の種類や形状を選択することで、所望の機能と構造をもった HBPP をデザインすることが可能であり、様々な機能性分子を集積化させる用途に適している。そこで本研究では、この HBPP の機能性分子を集積化させ

るための足場材料としての利用検討を行い、人工セルロソーム(セルラーゼ類の複合体)の創製ならびに、高感度検出用プローブ分子の創製を目指した。

### 3. 研究の方法

HBPP を構成するモジュール分子として SpyCatcher(以下 SC)を利用することとした。この SC は SpyTag(以下 ST)と呼ばれる 13 アミノ酸残基のペプチドと自発的に共有結合を形成するタンパク質である。この SC の N/C 両末端に Y-tag 配列を導入した Y-SC-Y を調製し、HRP 酵素反応により SC で構成される HBPP を調製する。この HBPP 上に対して、種々の ST 導入組換えタンパク質を反応させることで、集積化を行い、得られたタンパク質集積体の活性評価を行うことで、HBPP の分子設計手法ならびに機能性分子の集積方法に関する知見を得る(**図 2**)。

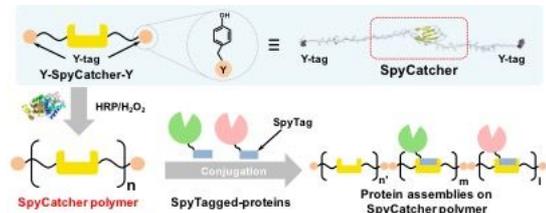


図 2 SC をベースとした HBPP 上への集積化

### 4. 研究成果

まず、HBPP のベースとなる SC について、野生型 SC ならびに Y-tag(N 末端: YGGGG; C 末端: GGGGY)を N/C 両末端に付与した Y-SC-Y を調製し、HRP 酵素反応への反応性を SDS-PAGE によって評価した(**図 3**)。

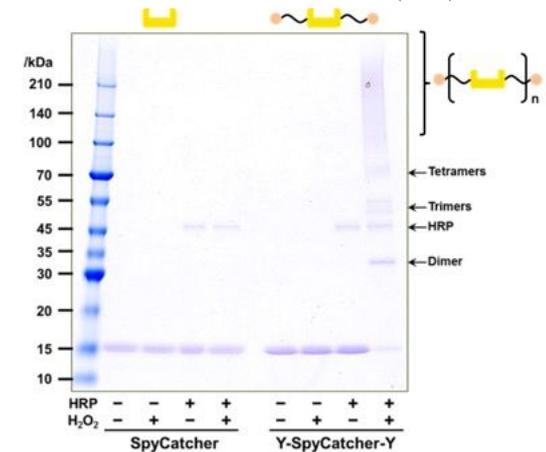


図 3 SC ならびに Y-SC-Y の HRP 処理に対する反応性評価結果

図 3 より、野生型 SC は HRP 処理を施してもバンドに変化は見られなかった一方、Y-SC-Y は HRP 処理後に、極めて高度に架橋した高分子量体のバンドが確認された。この結果から、SC 中の固有のチロシン残基は HRP に認識されることなく、Y-tag として導入したチロシン残基が部位選択的に HRP に認識され、HBPP が生成していることが示唆された。

HRP 濃度や、添加する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度の最適化を行い、SC をベースとした HBPP の調製条件を確立することに成功した。

次に、HBPP 中の SC ユニットの ST 導入タンパク質との複合体形成能について評価を行った。具体的には、ST を導入した緑色蛍光タンパク質(GFP-ST)をモデル機能性分子として、HBPP に対して過剰の GFP-ST を反応させ、HBPP 中の反応する全ての SC ユニットを GFP-ST と複合体を形成させた。次にサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって、HBPP と GFP の複合体を含む画分のみを単離し(図 4)、予め Y-tag 配列と SC 間に導入していたプロテアーゼ配列によって、モノマー単位に HBPP を分解することで、GFP-ST と複合体を形成した SC ユニットの量を見積もった(図 5)。

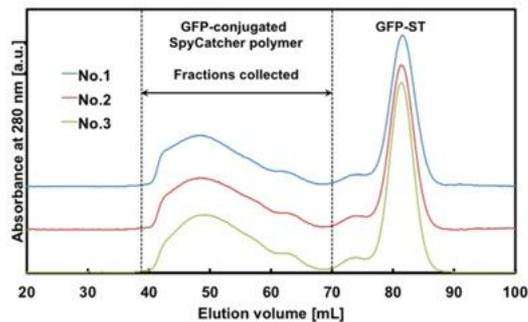


図 4 SEC による GFP-HBPP 複合体の単離

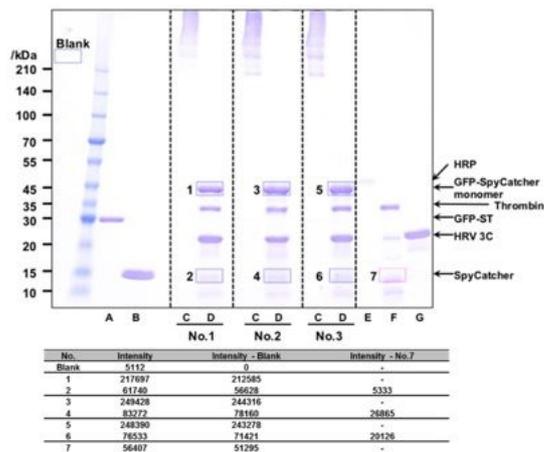


図 5 HBPP 中の SC の複合体形成能評価結果

図 5 における、GFP-SC ならびに未反応の SC のバンド強度比から、HBPP 中の SC ユニットの反応率を算出したところ、83%の値が得られた。これより、非常に高度に架橋し、分岐した複雑な構造を有する HBPP において、多くの構成ユニットが、適切に機能し、外来の機能性分子を集積化させるための、足場として機能することが示された。また、図 5 において、Y-tag を特異的にプロテアーゼによって切断することで、全ての高分子量体がモノマーへと分解されていることから、HRP 反応を用いた HBPP の形成反応は、極めて部位特異的に Y-tag のみを介して架橋していることが示された。

続いて、ST を導入した endo- $\alpha$ -D-glucanase(Xyn)、arabinofuranosidase(AraF)の調製を行い、SC を

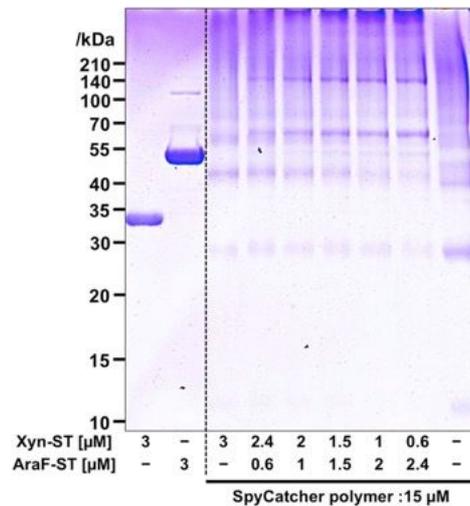


図 6 Xyn-ST ならびに AraF-ST の SC で構成される HBPP への複合体化検討結果

ベースとした HBPP と複合体を形成させることで、人工ヘミセルロソームの構築を検討した。

様々な混合比率で Xyn-ST および AraF-ST を HBPP に混合した結果、いずれの条件においてもほぼ定量的に複合体を形成することが明らかとなった(図 6)。この結果より、SC をベースとした HBPP は任意のタンパク質を任意の比率で集積化出来るということが示された。この得られた人工ヘミセルロソームを用いて、Wheat arabinoxylan の酵素分解を検討した結果、Xyn と AraF の比率に応じて、分解されて生じる糖の割合が変化したことから、集積化した各酵素が活性を失うことなく、機能していることが明らかとなった。

次に、SC をベースとした HBPP を用いて、高感度検出用のプローブ分子の創製を検討した。集積化させる機能性分子として、抗体に対して強いアフィニティを有する Protein G(pG)ならびに発光反応を触媒する Nanoluc を選択し、それらに ST を導入した変異体を構築した。pG-ST ならびに Nanoluc-ST を HBPP 上に集積化することで ELISA などに利用可能なバイオプローブ分子となる(図 7)。

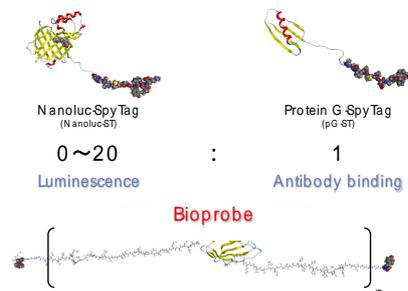


図 7 Nanoluc ならびに pG を用いた高感度バイオプローブ分子の創製

まず、pG-ST と Nanoluc-ST の HBPP 上への集積化を検討した。ここで、高感度検出プローブを創製するには、Nanoluc-ST の比率を pG-ST に対して大きくする必要がある。また、pG-ST を分子内に持たない集積体はプローブ

分子として機能することはないため、pG-STの量は少なくしつても、確実に全ての HBPP 分子に pG-ST を導入する必要がある。そこで、HBPP に対してまずは少量の pG-ST のみを反応させ、確実に全ての pG-ST を反応させた後に、Nanoluc-ST を反応させる 2 段階での集積化を行った(図 8)。

図 8 HBPP 上への pG-ST ならびに Nanoluc-ST の集積化検討結果

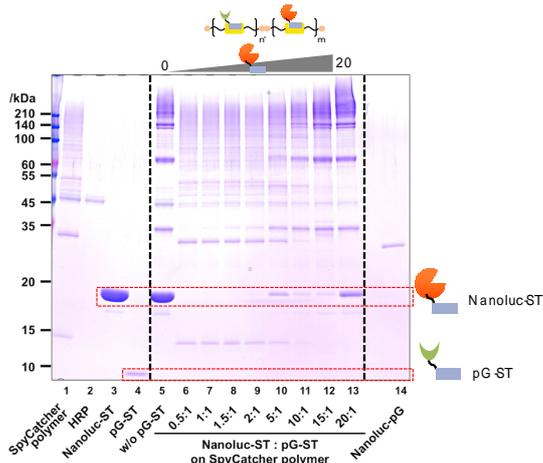


図 8 の結果より、いずれの混合比率においても pG-ST のバンドは全て消失し、HBPP 中に pG-ST が確実に取り込まれていることが示された。更に Nanoluc-ST も高効率に取り込まれ、pG-ST に対して高い比率で HBPP 上に集積化させることに成功した。

最後にこの Nanoluc-ST ならびに pG-ST を集積化させた HBPP について、ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)によるバイオプローブとしての性能評価を行った(図 9)。

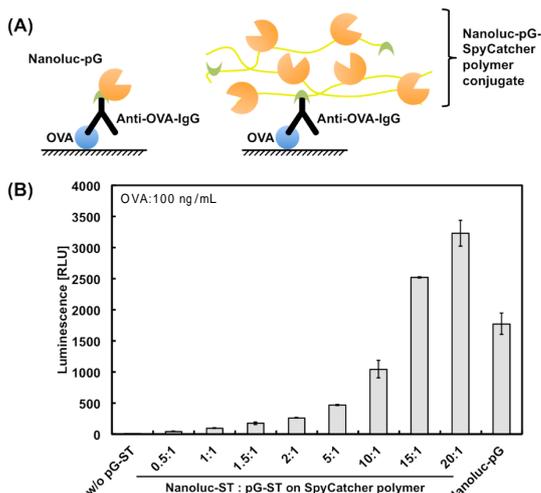


図 9 HBPP を用いたバイオプローブ分子の性能評価、(A):ELISA 系の概念図; (B):ELISA 測定結果

図 9 より、コントロールとして用いた Nanoluc と pG を遺伝子工学的に 1:1 で繋いだ Nanoluc-pG よりも高いシグナルを示すプローブ分子の創製に成功した。しかしながら、pG-ST に対する Nanoluc-ST の比率は 10 等量

以上を必要としたことから、固相表面上における HBPP 分子が専有する面積の大きさから、大過剰の Nanoluc を用いて初めて 1:1 で複合化した Nanoluc-pG の性能を上回る事ができたと言える。この結果より、HBPP の固相表面上における吸着挙動なども考慮した分子設計、すなわち、高度に分岐した構造ではなく、固相表面上においてパッキング効率の良い、直鎖状の構造への制御の必要性が示された。

これらの結果から、HBPP 上へのタンパク質集積化に必要とされる条件ならびに、集積方法に関する知見を得ることに成功し、またタンパク質ポリマーをベースとした機能性分子の集積化において、さらに高度な機能を発揮するためには、その分子が作用する環境において最適な状態に、分子全体の構造を制御する必要があることが示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)(全て査読有)

Patmawati, Kosuke Minamihata, Tsuneyuki Tatsuke, Jae Man Lee, Takahiro Kusakabe, and Kamiya Noriho, "Expression and activation of Horseradish Peroxidase Protein A/G Fusion Protein in Silkworm Larvae for Diagnostic Purposes." *Biotechnol. J.*, 2018, **13**, 1700624, DOI: 10.1002/biot.201700624

Lili Jia, Kosuke Minamihata, Hirofumi Ichinose, Kouhei Tsumoto, and Noriho Kamiya, "Polymeric SpyCatcher Scaffold Enables Bioconjugation in a Ratio-Controllable Manner", *Biotechnol. J.*, 2017, **12**, 1700195, DOI: 10.1002/biot.201700195

[学会発表](計 3 件)

南畑孝介, "ペルオキシダーゼ酵素反応を利用したタンパク質ポリマーの創製とその応用に関する研究", 酵素工学研究会第 78 回講演会(招待講演), 2017 年 10 月 6 日, 秋田県秋田市カレッジプラザ

Lili Jia, Kosuke Minamihata, Hirofumi Ichinose, and Noriho Kamiya, "Functionalization of magnetic nanoparticles with protein polymer.", 22<sup>nd</sup> Young Asian Biochemical Engineers' Community 2016 (YABEC2016)(国際学会), 2016 年 10 月 27~29 日, 宮崎シーガイア国際会議場.

南畑孝介, "ペプチドタグで作るタンパク質の集合体", 材料化学システム工学討論会(招待講演), 2016 年 8 月 24 日, 25 日, 東京大学

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕該当なし

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

南畑 孝介（Kosuke Minamihata）  
九州大学・工学研究院・特任助教  
研究者番号：90648586

### (2)研究分担者 該当なし

### (3)連携研究者 該当なし

### (4)研究協力者 Lili Jia, Patmawati,