

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19180

研究課題名（和文）タンパク質を酵素的にポリアミンで修飾する技術の開発

研究課題名（英文）Development of a method for enzymatic protein modification with polyamine chains

研究代表者

池田 丈（Ikeda, Takeshi）

広島大学・統合生命科学研究科（先）・助教

研究者番号：10505754

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：一部の細菌が有すると予想される基質特異性の低いアミノプロピル基転移酵素を利用することで、タンパク質をポリアミンで修飾する技術の開発に取り組んだ。目的とする酵素活性の検出法を開発し、本酵素の基質特異性が予想通り低いことを確認した。タンパク質中のリジン残基に対しても活性を発揮できるか検証を試みたが、反応副産物の影響で正確な評価ができなかった。今後より詳細な検討が必要だと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以前からその存在が予想されていた基質特異性の低いアミノプロピル基転移酵素を同定し、その基質特異性を評価することに成功した。本酵素が、タンパク質をポリアミンで修飾する技術に利用できるかについては明らかにできなかったため、さらなる研究が必要である。タンパク質をポリアミンで修飾できれば、シリカへの親和性や細胞膜透過効果などの有用な性質をタンパク質に付与できると期待される。

研究成果の概要（英文）：Our previous results suggested that an aminopropyltransferase with low substrate specificity is present in some bacteria. We hypothesized that this enzyme could be used for protein modification by transferring aminopropyl groups to the side chain of lysine residues, whose chemical structure is similar to that of polyamines. In this study, the enzyme of interest was identified and found to show low substrate specificity as expected. However, unfortunately we could not confirm whether this enzyme transfers aminopropyl groups to a lysine side chain, because the detection of target products was interfered by the presence of reaction byproducts.

研究分野：生物学

キーワード：酵素 ポリアミン タンパク質修飾

1. 研究開始当初の背景

ポリアミンは 2 個以上のアミノ基を有する通例直鎖上の炭化水素であり、短鎖のポリアミンは全ての生物に共通して高濃度で存在する。一方、一部の生物(珪藻や海綿)が形成するシリカ(SiO₂)の内部には非常に多くのアミノ基を有する長鎖ポリアミン(long-chain polyamine; LCPA)が存在することが知られていたが(文献 1,2)、その生合成経路は不明であった。

研究代表者は過去の研究において、一部の *Bacillus* 属細菌が細胞内にてシリカを形成し、そのシリカ内部に LCPA が存在していることを発見した。代表的なポリアミンであるプトレッシンおよびスペルミジンの生合成経路を図 1A の上半分に示す。アルギニンを出発物質としてプトレッシンが合成され、それに続くアミノプロピル基の転移反応によってスペルミジンへと伸長される。発見された LCPA は、スペルミジンにさらに多くのアミノプロピル基が連結した構造を有していたことから、アミノプロピル基転移反応が繰り返されることで合成されていると予想された(図 1A 中の予測合成経路)。このことから LCPA を合成する酵素(以下 LCPA 合成酵素)はアミノプロピル基転移酵素であることが強く示唆された。ポリアミン合成に関わる既知のアミノプロピル基転移酵素(spermidine synthase や spermine synthase)は基質特異性が高く、対象の基質以外とはほとんど反応しない。一方、本菌の LCPA は異なる鎖長のものが多数検出されていることから、LCPA 合成酵素は長さの異なる複数のポリアミンを基質としうる基質特異性の低いアミノプロピル基転移酵素であると予想された。

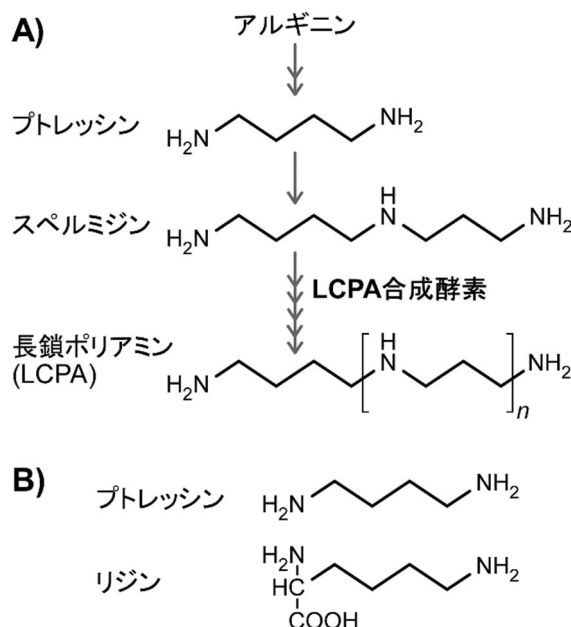


図 1.

A: 一般的なポリアミン合成経路と LCPA の予測合成経路。プトレッシンの末端にアミノプロピル基が転移されることで、スペルミジンへと伸長する。LCPA 合成酵素(未同定)によって、さらにアミノプロピル基の転移反応が繰り返されることで LCPA が合成されると考えられる。

B: プトレッシンとリジンの化学構造。リジン側鎖の構造はポリアミンとよく似ている。

2. 研究の目的

本菌と同じくシリカを形成する珪藻では、シリカの重合を促進するペプチド silaffin 中のリジン残基側鎖が LCPA で修飾されていることが報告されている(文献 3)。しかし、生体内でどのように LCPA が合成されているか、また、どのようにしてリジン残基側鎖が LCPA で修飾されているかは明らかとなっていない。ペプチド・タンパク質を構成するアミノ酸のひとつであるリジンの側鎖はポリアミンとよく似た構造をしているため(図 1B)、ペプチド中のリジン残基を基質としてアミノプロピル基の転移反応が繰り返されることで、ペプチドが LCPA で修飾されたのではないかと仮説が提唱されている。

これらのことから、一部の *Bacillus* 属細菌が有すると予想される基質特異性の低い LCPA 合成酵素を利用することで、タンパク質中のリジン残基側鎖に対してアミノプロピル基を付加できるのではないかと、すなわち、タンパク質をポリアミンで修飾できるのではないかと予想した。そこで本研究では、本菌の LCPA 合成酵素の活性を利用して、タンパク質中のリジン残基側鎖をポリアミンで修飾するという新規のタンパク質修飾法を開発することを目的とした。タンパク質をポリアミン修飾することで例えば以下のような効果が期待される。

(1) 細胞膜透過効果の付与: ポリアルギニンのような多数の正電荷を有するペプチドをタンパク質に融合すると、細胞内への取り込みが促進されることが知られている。ポリアミンも多数の正電荷を有しているため、タンパク質をポリアミン修飾することで同様の細胞膜透過効果を付与できると期待される。例えば抗体をポリアミン修飾することで効率的な細胞内移行が可能となれば、細胞内の物質を標的とした抗体医薬の開発が可能となる。細胞膜透過ペプチドとは異なり、ポリアミンは元々生体内に存在する物質であるため、抗原性がないことも利点と考えられる。

(2) シリカ形成能とシリカへの結合性の付与：LCPA は、可溶性のケイ酸($\text{Si}[\text{OH}]_4$)の重合を促進して、固体であるシリカを形成することが報告されている(文献 1,4)。ポリアミン修飾したタンパク質にケイ酸を加えることで、タンパク質を内包したシリカ粒子を温和な条件で形成できると期待される。また、シリカに対して親和性を有するポリアミンを介してシリカ表面にタンパク質を固定化できると考えられるため、固定化酵素の作製やバイオデバイス開発などへの応用が期待される。

3. 研究の方法

(1) 組換えタンパク質の発現と精製

Bacillus 属細菌において、破壊すると LCPA が検出されなくなる遺伝子群を本研究開始以前に見出していたが、本遺伝子群がコードするタンパク質が LCPA 合成酵素であることは証明できていなかった。タンパク質の機能を確認するために、本遺伝子群を挿入したプラスミドを大腸菌に導入し、組換えタンパク質の発現を行った。また、発現した 2 種の組換えタンパク質をそれぞれ精製した。

(2) HPLC による LCPA の検出

Bridoux らの手法(文献 5)を参考にして、イオンペア試薬を用いた逆相クロマトグラフィーによって鎖長の異なる LCPA を分離し、分離後の LCPA をポストカラム誘導体化することで LCPA の検出を試みた。

(3) SDS-PAGE による LCPA の検出

試料を Tris-Tricine SDS-PAGE に供し、電気泳動後のポリアクリルアミドゲルを Coomassie brilliant blue R-250 で染色した。

(4) LCPA 合成酵素の基質特異性の評価

精製した組換えタンパク質に基質候補分子を加えて反応を試みた。前項の手法により反応産物の検出を行った。

4. 研究成果

(1) 組換え大腸菌からのポリアミン抽出と HPLC による LCPA の検出

LCPA 合成酵素をコードしていると予想される候補遺伝子群を本研究開始以前に発見していた。これらの遺伝子の産物が実際に LCPA 合成酵素であることを証明するためには、酵素反応によって生じた産物が LCPA であることを示す必要がある。そこで、発見した候補遺伝子群を大腸菌に導入し、組換えタンパク質を発現させ、細胞内で LCPA が合成されるかどうかを検証した。また、LCPA の検出のために、Bridoux らの手法(文献 5)を参考にして、イオンペア試薬を用いた逆相クロマトグラフィーとポストカラム誘導体化を組み合わせた LCPA 検出法の開発を行った。

組換えタンパク質を発現させた大腸菌の菌体よりポリアミンを抽出し、開発した検出法に供したところ、特徴的なピーク群が観察された。本ピーク群を含む画分を質量分析に供したところ、鎖長の異なる複数の LCPA が含まれていることが確認された。これらの結果から、発見した遺伝子が予想通り LCPA 合成酵素をコードしていることが支持された。また、開発した検出法によって鎖長の異なる LCPA を分離して検出できることが示された。

(2) 組換えタンパク質による LCPA 合成と SDS-PAGE による LCPA の検出

続いて、組換えタンパク質を精製し、*in vitro* 反応による LCPA 合成を試みたが、前述の検出法では LCPA のピークが認められなかった。そこで、酵素反応の条件を検討するとともに、生成物の検出法について見直した。LCPA を含む試料を SDS-PAGE に供し、電気泳動後のポリアクリルアミドゲルを Coomassie brilliant blue R-250 で染色すると、タンパク質と同様に LCPA がバンドとして検出される。この性質を利用して、染色後のバンドの有無によって LCPA が合成されたかどうかを判定する方式に変更した。これらの検討の結果、精製組換えタンパク質を用いた *in vitro* 反応によって LCPA が合成されることを確認できた。

(3) LCPA 合成酵素の基質特異性の評価

前項の手法を用いることで、LCPA 合成酵素の基質特異性の評価が可能となった。市販されている短鎖のポリアミンを基質として基質特異性の評価を行ったところ、予想通り鎖長の異なる複数のポリアミンを基質としうる基質特異性の低い酵素であることが確かめられた。リジンに対してもアミノプロピル基を転移できるかについて検証を試みたが、本反応においてアミノプロピル基の供与体として働く decarboxylated *S*-adenosylmethionine もしくはその前駆体である *S*-adenosylmethionine に対してアミノプロピル基が付加された反応産物が生じたため、正確な評価ができなかった。リジンに対する活性については今後より詳細な検討が必要だと考えられる。

<引用文献>

- N. Kröger, R. Deutzmann, C. Bergsdorf, M. Sumper, Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 2000, 14133 - 14138
- S. Matsunaga, R. Sakai, M. Jimbo, H. Kamiya, Long-chain polyamines (LCPAs) from marine sponge: Possible implication in spicule formation, *ChemBioChem*, 8, 2007 1729 - 1735
- N. Kröger, R. Deutzmann, M. Sumper, Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation, *Science*, 286, 1999, 1129 - 1132
- M. Sumper, S. Lorenz, E. Brunner, Biomimetic control of size in the polyamine-directed formation of silica nanospheres, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 2003 5192 - 5195
- M.C. Bridoux, V.V. Annenkov, H. Menzel, R.G. Keil, A.E. Ingalls, A new liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry method for the analysis of underivatized aliphatic long-chain polyamines: application to diatom-rich sediments, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 25, 2011, 877 - 888

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池田 丈, 中川 美樹, 山本 光太郎, 廣田 隆一, 黒田 章夫
2. 発表標題 中温性グラム陽性細菌 <i>Bacillus cereus</i> における長鎖ポリアミンの生合成系の解析
3. 学会等名 日本ポリアミン学会第10回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Ikeda, Kohjiro Yamamoto, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda
2. 発表標題 Discovery of long-chain polyamines and their biosynthetic enzyme in the biosilicifying bacterium <i>Bacillus cereus</i>
3. 学会等名 BIOMIN XV (15th International Symposium on Biomineralization) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 光太郎, 池田 丈, 舟橋 久景, 廣田 隆一, 黒田 章夫
2. 発表標題 <i>Bacillus cereus</i> が形成するシリカ層より発見された長鎖ポリアミンの合成メカニズムの解析
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田 丈, 山本 光太郎, 廣田 隆一, 黒田 章夫
2. 発表標題 中温性グラム陽性細菌 <i>Bacillus cereus</i> が孢子表面に形成するシリカ層より発見された長鎖ポリアミンの生合成系の解析
3. 学会等名 日本ポリアミン学会第11回年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 化合物、化合物の製造方法、および、これらの利用	発明者 池田 丈, 黒田 章夫	権利者 広島大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-223968	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----