

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05166

研究課題名(和文) 高度構造安定性を有するクッション性足場タンパク質を用いた機能的分子認識素子の創出

研究課題名(英文) Development of functional molecular recognition elements utilizing a highly stable cushioning scaffold protein

研究代表者

今中 洋行 (IMANAKA, Hiroyuki)

岡山大学・自然科学学域・助教

研究者番号：10379711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：固体基材上におけるバイオ分子間相互作用の高感度検出を可能とする簡便・迅速な測定システムの確立を目的に、新たな足場タンパク質CutA1の利用に関し、分子設計多様性の拡張を試み、機能検証を行った。そして、新規配列挿入サイトの同定による多価化、ホモ三量体CutA1の一本鎖化を達成した。生体分子間相互作用の検出については、リガンド分子の配置・配向制御およびナノバイオ界面における凹凸の導入によって検出感度を向上できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオセンサーへの適用に向け、簡便な調製が可能で、構造が極めて安定な超好熱菌由来タンパク質CutA1を用い、標的分子認識素子(ペプチドあるいはタンパク質)を提示するための足場として利用する新しいバイオ分子間相互作用制御システムの技術基盤を確立した。本研究の成果により、独自のアイデアに基づき、医療(診断)・創薬・食品・環境分野といった幅広い分野で適用可能な、多様で高感度なバイオセンサーの開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In order to establish a simple and rapid biosensing system for detection of biomolecular interactions on solid substrates, we attempted to expand the molecular design diversity of CutA1, a novel scaffold protein, and verified its function. An objective multivalent CutA1 was successfully developed by identifying a novel sequence insertion site. In addition, single-chained CutA1, for another type of multivalent molecular recognition element, was also constructed by the insertion of appropriate linker sequences between CutA1 subunits. As for the detection of biomolecular interactions, the detection sensitivity can be improved by controlling the arrangement and orientation of the ligand molecules and by introducing irregularities at the nanobio-interface.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：バイオセンサー 生体分子間相互作用 足場タンパク質 表面親和性ペプチド 固定化 分子認識素子

1 . 研究開始当初の背景

タンパク質 , ペプチド , 核酸や糖鎖などのバイオ分子間に生じる相互作用を細胞内外で制御し , 検出・解析を通じてその特性を明らかにすることは , 生命現象の解明のみならず , 医療診断 , 創薬 , 食品・環境分析やバイオセンサー開発など基礎から応用まで幅広い領域で役に立つ知見となる . しかし , 分子認識素子であるリガンド分子の構造安定性 , 標的分子との結合特異性や相互作用の検出感度のいずれについてもそれぞれ機能向上に向けて解決すべき課題がある . 汎用されるバイオ分子間相互作用を細胞外で制御する技術においては , リガンドバイオ分子はほとんどの場合であらかじめ基材表面上に固定化されるが , 従来法では , 主として疎水性相互作用や非特異的静電相互作用によって固体表面に付着する際 , これに伴う変性が無視できない . さらに , 非特異的な付着によって多くの場合不利な配向をとる . これらの要因により , 相互作用検出感度の著しい低下が生じる . 特にタンパク質間相互作用においては , 極微少な構造変化も , 相互作用形成に大きく影響する . これらを改善・改良できれば , ナノバイオ界面におけるバイオ分子間相互作用の高感度化および各種バイオセンサー開発における基盤技術となることが期待される .

2 . 研究の目的

バイオ分子の連結・挿入を通じて , 配向を精密に制御しうる新規な足場タンパク質 CutA1 を用い , より精密かつ迅速にバイオ分子間相互作用を制御するための鍵である , 分子認識特異性向上を志向した合理的分子設計による足場タンパク質の多価化と汎用性を担保しうる分子設計基盤の確立を目的とする . コア構造が安定な CutA1 の機能拡張を進め , 簡便・迅速かつ高感度なバイオセンシングシステムの基盤技術確立につなげる . 具体的には以下の項目について検討を進めた .

- (1) 新たなリガンド挿入サイトの探索を通じた多価化 CutA1 の開発
- (2) 一本鎖型 CutA1 (scCutA1 : single-chained CutA1) の分子設計と機能拡張性の検証

3 . 研究の方法

安定なコア構造を有する CutA1 タンパク質を足場とし , 分子内へのペプチド挿入候補サイトの探索やサブユニットの連結による一本鎖化のためのリンカー配列の検討などを通じ , 多様なタンパク質の発現を試み , その特性評価を進めた .

(1) 各種タンパク質変異体の調製

発現ベクターとして pET22b(+)を用いた . 各種 CutA1 変異体あるいは各種 scCutA1 変異体をコードする DNA 断片が挿入された発現用ベクターをそれぞれ構築した . 相互作用モデルのリガンドペプチドとして StrepTagII (STII : WSHYPQFEK , 8 aa) , また , 親水性ポリスチレン (PS) 表面に固定化するための親和性ペプチドとして PS-tag (RAFIASRRIRKP , 12 aa) などを適宜挿入・連結する形とした . 各種タンパク質発現ベクターを用いて , 宿主大腸菌 BL21(DE3)株の形質転換を行った後 , LB-Amp 培地中で 25°C , IPTG (終濃度 0.1 mM) で発現を誘導した . 超音波破碎による菌体内タンパク質の抽出後 , His GraviTrap™ (Cytiva) , PD-10 Column (Cytiva) を用いて精製した . SDS-PAGE によりタンパク質の発現特性や耐熱性の評価を行った .

(2) バイオ分子間相互作用 (Enzyme-Linked Assay : ELA)

各種固定化タンパク質を 10 ~ 100 pmol/well となるよう希釈した溶液を , 親水性 PS プレートの

ウェルに 100 μL 添加し固定化した (30°C, 1 h). 固定化後, ウェルを PBST で 3 回, 1 \times PBS で 2 回洗浄し, BSA (2 mg/mL) 200 μL を添加しブロッキングした (30°C, 1.5 h). 上記と同様に洗浄し, 次いで, 各濃度に調整した HRP 標識 StrepTactin (ST) 100 μL を添加した (30°C, 1 h). 上記と同様に洗浄し, 発色基質 TMB 溶液を 100 μL 添加し, 30°C で 15 min 静置した. 最後に, 1 NH_2SO_4 100 μL を加え反応を停止し, 450 nm の吸光度を測定した.

(3) サイズ排除クロマトグラフィー

COSMOSIL[®] 5Diol-300-II Packed Column (7.5 mm I.D. x 600 mm, nacalai tesque) を用い, 移動相 PBS, 流速 0.5 mL/min, 60 min の条件にてタンパク質を分離し, 各種精製タンパク質の分子量分布を調査した.

4. 研究成果

(1) 新たなリガンド挿入サイトの探索を通じた多価化 CutA1 の開発

ペプチド挿入による CutA1 の構造安定性への影響について検討するため, CutA1 構成アミノ酸残基に関し, 結晶構造情報を基にした分子間相互作用エネルギーの網羅的解析などによりペプチド挿入候補サイトを複数 (6 か所) 選抜した. そして, CutA1 配列中のこれらのサイトへ, 単独あるいは組み合わせの異なる複数のサイトにペプチド挿入を行った. それぞれ Flexible linker + Strep-tag II のペプチドを linker 配列の長さを変えたものなどを含め様々に挿入し, タンパク質の発現を試みた. その結果, いずれの挿入候補サイトについても単独でペプチドを挿入した場合では可溶性発現し, 1 つのクローンを除いて十分な耐熱性 (100°C, 1.5 hr) を有することがわかった. 高い耐熱性を示したペプチド挿入 CutA1 を用いて ELA による相互作用検出を行った結果, 提示ペプチドの配向が相互作用検出感度に大きく影響することがわかった (図 1).

2 か所同時にペプチドを挿入した場合も, 単独挿入後に耐熱性が維持されていたサイト同士の組み合わせではほとんどのクローンについて可溶性発現および耐熱性が確認された. 一部のクローンについては挿入ペプチドの長さを短くすることで耐熱性が維持されることがわかった. さらにシングルサブユニット配列中に 3 か所同時にペプチドを挿入できる組み合わせも明らかにできたが, これについては耐熱性の低下などもみられた. 今後は, 挿入配列長さや提示ペプチドの配向性を考慮した分子設計を通じたさらなる検討が必要と考えられる.

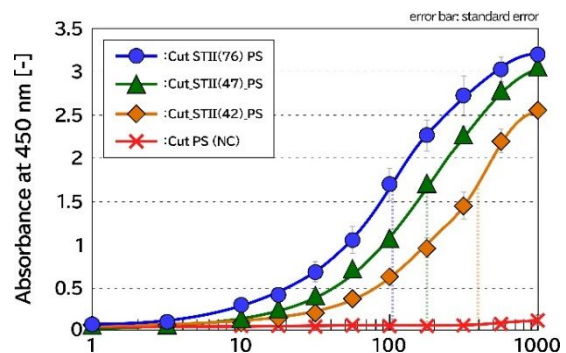


図 1 リガンドペプチドの配向が分子間相互作用検出感度に及ぼす影響

(2) 一本鎖型 CutA1 (scCutA1) の分子設計と機能拡張性の検証

CutA1 量体構造改変を基盤とした多価化分子認識素子の分子設計として, 高次構造体を用いた相互作用検出, 選択的多価化分子認識素子調製法の検討を進めた. まず, 各サブユニット配列をリンカーで 3~6 個タンデムに繋ぐことによって各種 scCutA1 変異体を作製した. いずれの連結数においても可溶性発現し, 高い構造安定性を示した. また, サイズ排除クロマトグラフィーによる分子量分布解析の結果, それぞれ三量体の整数倍の分子量分布がみられ, 三量体基本構造が維持された複数の高次構造体形成が示唆された. これらを用いた ELA では, 基板表面親和性ペプチドの複数挿入により様々な配向でリガンド提示分子が固定化され, リガンド提示面の有効相互作用サイト数を増加させることで, 標的分子の検出感

度向上が可能であることが示唆された。同時に、異なる分子間のサブユニットスワップの高次構造形成への大きな関与も分かった。そこで、リガンド提示分子の高次構造体形成および固定化配向制御が可能となるよう、Coiled-coil 複合体形成を利用する分子デザインを施したところ、リガンド - アナライト間相互作用の検出感度の顕著な向上がみられた (図 2)。すなわち、標的分子を効率よく捕捉しうる表面を設計できることがわかった。これらの検討を通じ、CutA1 量体構造改変を基盤とした多価化分子認識素子の安定な取得が可能であることがわかった。

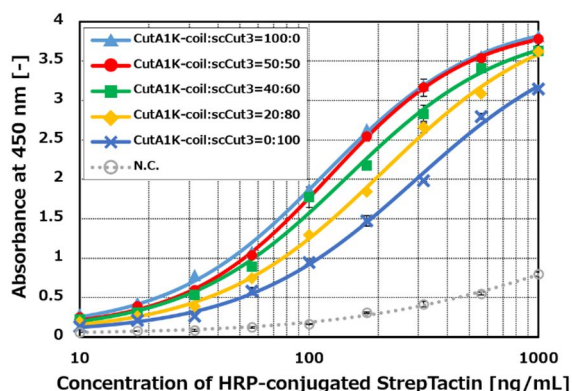


図 2 Coiled-coil を介した複合体形成が分子間相互作用検出感度に及ぼす影響

一方、scCutA1 を足場、Barnase (Bn) 及び Barstar (Bs) をタンパク質性分子糊として利用した機能性ナノバイオ界面の設計を試みた。Bn あるいは Bs を scCutA1 に挿入したキメラタンパク質を発現させたところ、可溶化発現がみられたことから、scCutA1 はペプチド及びタンパク質を同時に挿入可能な有用な足場分子であることが示唆された。続いて Bn_scCut_PS/Bs_scCut_STII 複合体と scCutA1-STII を一定濃度条件下で混合比率を変化させて固定化し、ナノバイオ界面への凹凸の導入によるリガンド分子 STII の局在分布が相互作用検出感度に及ぼす影響について調べた (図 3 参照)。その結果、リガンド表面における Bn_scCut_PS/Bs_scCut_STII 複合体の割合が 80% 以上の場合、複合体を含まない scCut-STII 固定化表面 (P.C.) と比較すると感度が低下し、50% 以下では感度が向上した。また、相互作用測定結果について回帰分析を行った結果、Bn_scCut_PS/Bs_scCut_STII 複合体含有率が 20% で、 K_d 値が最小となり、相互作用検出感度が向上することがわかった。

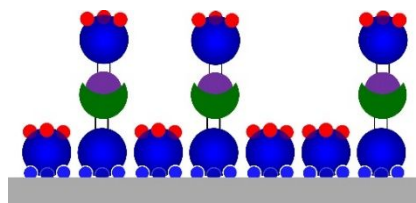


図 3 ナノバイオ界面への凹凸の導入

以上の結果から、STII-ST 間相互作用検出系において、タンパク質性分子糊である Bn 及び Bs を scCutA1 間に挟み込み、アナライト分子である ST の分子サイズ (およそ 5 nm) を超える高低差を生じさせることで、相互作用における立体障害が緩和され、効率的な標的分子の捕捉が可能となるナノバイオ界面が形成されたと考えられた。つまり、本コンセプトは生体分子間相互作用検出感度をさらに向上しうる機能的ナノバイオ界面設計への技術拡張の基盤たり得ることがわかった。

(3) まとめ

本研究では、ホモ三量体タンパク質 CutA1 の足場分子としての機能拡張を目的とし、様々な分子設計・改変を施し、発現特性および機能評価を行った。まず、サブユニット配列中に複数のペプチドを同時に挿入するための分子基盤を確立し、シングルサブユニットを軸とした多価化が可能であることを示した。さらに、一本鎖化、タンパク質性分子糊あるいは剛直なリンカー配列を適用することによる量体構造改変を基盤とした検討も進め、多様な多価化複合体設計を可能とする分子プラットフォームとして CutA1 が有用であることを明らかにした。いずれの場合についても、ナノバイオ界面制御を通じた分子間相互作用検出感度の向上が図れることがわかり、今後の簡便・迅速かつ高感度なバイオセンシングシステム開発への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 山田航大, 東秀隆, 石田尚之, 今村維克, 今中洋行
2. 発表標題 新規多価化分子認識素子の創出に向けた一本鎖型CutA1量体構造改変の試み
3. 学会等名 日本生物工学会西日本支部大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒瀬志帆, 石田尚之, 今村維克, 今中洋行
2. 発表標題 CutA1とBarnase-Barstar間相互作用を利用したナノバイオ界面デザイン
3. 学会等名 日本生物工学会西日本支部大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Imanaka, Yu Ikeda, Haruka Matoba, Naoyuki Ishida and Koreyoshi Imamura
2. 発表標題 Functionalization of AuNPs by one-step ligand immobilization with designer scaffold protein and its application for sensitive colorimetric interaction detection
3. 学会等名 Asian Congress on Biotechnology 2019 (ACB2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田 湧, 石田 尚之, 今村 維克, 今中 洋行
2. 発表標題 VHH抗体提示型分子認識素子を用いたAuNPのワンステップ機能化
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 山田航大, 東秀隆, 石田尚之, 今村維克, 今中洋行
2. 発表標題 CutA1量体構造改変による新規多価化分子認識素子の創出
3. 学会等名 第22回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今中 洋行・池田 湧・黒瀬 志帆・東 秀隆・石田 尚之・今村 維克
2. 発表標題 分子認識における多点相互作用の検証とタンパク性足場分子の機能開発
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Imanaka, H., Y. Ikeda, N. Ishida and K. Imamura
2. 発表標題 Characterization of VHH-EGFP interaction for the construction of functional molecular recognition elements
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroyuki Imanaka
2. 発表標題 Design of functional nano-bio interfaces using CutA1 as a proteinaceous scaffold
3. 学会等名 2021 Fall meeting of the KSBM (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田航大, 石田尚之, 今村維克, 今中洋行
2. 発表標題 自発的アセンブリを介した多価化CutA1の分子デザイン
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒瀬志帆, 石田尚之, 今村維克, 今中洋行
2. 発表標題 CutA1とタンパク質性分子糊を利用した機能性ナノバイオ界面の設計
3. 学会等名 2021年度日本農芸化学会 西日本・中四国・関西支部 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Imanaka, H., H. Azuma, S. Kurose and K. Imamura
2. 発表標題 Development and Application of Multivalent CutA1
3. 学会等名 The 26th Symposium of YABEC (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroyuki Imanaka
2. 発表標題 Design of functional nano-bio interfaces using CutA1 as a proteinaceous scaffold
3. 学会等名 2021 KSIEC Spring Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------