

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K06519
研究課題名(和文) 無細胞タンパク質合成系とペプチドタグを利用したフォールディング進化系の確立

研究課題名(英文) Establishment of protein folding evolution using cell-free protein synthesis and peptide tags

研究代表者
丹羽 達也 (Niwa, Tatsuya)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：50588530
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)：未だ予測することが難しいタンパク質フォールディングについての理解を深めるために、ペプチドタグとナノLC-タンデム質量分析装置を利用した試験管内でタンパク質フォールディングを進化させる実験系の構築を目指してきた。約100種類程度の定量可能なペプチドタグを設計し、無細胞タンパク質合成系による測定条件の検討・最適化などを行い、モデルとなるタンパク質のフォールディング進化実験を試みたが、現状ではまだ成功には至っていない。問題点として、測定コストが高いこととサンプル調製および測定の効率の悪さが挙げられる。このうち一部は実験条件の工夫などで改善が見込まれるため、可能であればチャレンジしていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究の成果によって、質量分析装置を用いたターゲットMS解析をタンパク質の分子進化系に利用できる可能性が示されたと考えている。一方で、その実現のためには測定条件や適切なペプチドタグの設計など、考慮しなければならない点が多数あることも判明した。これらの結果は今後ターゲットMSを似たような実験系に用いる際に非常に有用な知見となるはずである。

研究成果の概要(英文)：To deepen our understanding of protein folding, which is still difficult to predict, we have been trying to establish an experimental system for in vitro protein folding evolution using peptide tags and a nano-LC-tandem mass spectrometer. We have designed about 100 types of quantifiable peptide tags, investigated and optimized the measurement conditions using a cell-free protein synthesis system, and attempted folding evolution experiments of model proteins but have not yet succeeded in doing so. The problems are the high cost of measurement and the inefficiency of sample preparation and measurement. Some of these problems are expected to be improved by devising experimental conditions, and we would like to challenge these problems if possible.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：タンパク質フォールディング 試験管内分子進化 質量分析装置 無細胞タンパク質合成系

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は非常に多種多様な機能を持つ、万能の生体高分子である。ほとんどのタンパク質は、それぞれのアミノ酸配列によって規定される立体構造(天然構造)へと正しくフォールディングすることで初めてその機能を発揮するが、タンパク質のフォールディングは物理化学的に非常に複雑なプロセスであり、普遍的な理解が十分なされているとは言い難い。例えばアミノ酸配列等の情報からフォールディングのしやすさを予測したり、どのアミノ酸残基を変換したらフォールディングが良くなるか等を予測するなどといったことを自在に行うことはいまだにできていないのが現状である。タンパク質のフォールディングを理解することは生命自身の理解のために重要なだけでなく、タンパク質を応用として利用する際にも非常に重要な現象である。それを理解するため、およびタンパク質の応用をより幅広く押し進めることを目的として、タンパク質のフォールディングを改善するという試みが古くからなされてきた。しかしそれぞれの実験系において、適用範囲に制限があったり、検出力が低いなどの問題があり、より多くの種類のタンパク質に適用できる普遍的なフォールディングの分子進化手法の開発が強く望まれてきた。

2. 研究の目的

そのような背景のもと、私たちは網羅的な遺伝子発現を可能とする無細胞タンパク質合成系を利用したタンパク質発現系と、高感度検出が可能である質量分析装置を組み合わせることによって、幅広いタンパク質に対して適用可能なタンパク質フォールディングの分子進化実験系を開発することを目指した。その際、質量分析装置での高感度検出のための「ペプチドタグ」を導入し、かつそのペプチドタグを DNA バーコードのように利用することで、遺伝子情報を切り離した状態で表現系を調べることが可能な実験系の構築を目指す。ファージディスプレイや mRNA ディスプレイ等のタンパク質翻訳反応を伴う多くの分子進化実験系は、遺伝子情報と表現系が物理的に繋がった状態で評価をする必要があるため、フォールディングの評価などの進化実験に適用するのは難しい。一方、本申請内容で開発する方法であれば、両者を切り離した状態で調べることが可能となるため、より幅広いスクリーニング系への応用が期待される。

3. 研究の方法

実験の方法としては、ランダム PCR を用いた変異遺伝子ライブラリを作成し、それを再構築型の無細胞タンパク質合成系である PURE system でそれぞれの遺伝子を発現させ、反応液を遠心分離によってフォールディング状態を評価するために遠心前と遠心後の上清をそれぞれ回収し、質量分析装置を用いた定量解析 (Parallel Reaction Monitoring; PRM 法) でペプチドタグ部分を測定する、という方法で行う。その際、ランダム変異ライブラリを薄めて平均で 10 種類程度の遺伝子が含まれるような状態で各ペプチドタグを付加することで、一回の測定で 1000 種類程度の遺伝子についてまとめて評価をすることができるような系を作成することを目指す。

実際の検討においては、まず評価のためのペプチドタグを開発し、その上で、モデルタンパク質を用いて実際の実験系の構築および評価をし、最適な実験条件を確立することを目指す。

4. 研究成果

4-1: ペプチドタグの開発

上述した通り、この実験を効率よく進めるためには多くの種類のペプチドタグを準備することが必要となる。過去の報告で、特定のペプチド配列に対して 1~2 アミノ酸程度の置換の導入程度であれば、質量分析装置での検出感度に大きな影響が出ないということがわかっていたため、それに倣ってアミノ酸変異を導入することにした。変異を導入する際、トリプシンで消化されてしまう Lys および Arg、酸化されやすい Cys、Met、His、Trp、脱アミド化しやすい Asn、Gln、Leu と分子量が同一である Ile の 9 種を除いた 11 種類のアミノ酸を変異として用いることにした。ペプチドタグの元となる配列については、当初は過去の報告にあった *lacZ* 遺伝子由来のペプチド断片 (LVTDLTK) の 2 および 3 残基目のアミノ酸を置換したものを利用しようと考えていたが、所属センターが保持する質量分析装置ではこのペプチド断片の感度があまり良くないことが判明したので、新しく 3 つのモデルタンパク質からそれぞれ感度が高いペプチド配列を選定することにした。具体的には、大腸菌 MetK タンパク質由来の FFINPTGR、大腸菌 DHFR タ

ンパク質由来の VYEQFLPK、大腸菌 Enolase タンパク質由来の DAGYTAVISHR、の3種類である。これらについて、3～4番目ないし4～5番目のアミノ酸を変異させたペプチドタグを設計した。この際分子量が同一となるような変異や、著しく分子量が近くなるような組み合わせについては除外した。最終的に、モデルとなるタンパク質のC末端に付加することでペプチドタグとして機能することができるものを約100種類程度準備することができた。

4-2: PURE system による翻訳反応条件の検討

次に、モデルとなるタンパク質の遺伝子を使って、PURE system での反応溶液量などについての条件検討をおこなった。当初、10～20 μ L の反応系をそれぞれ別々の反応チューブで反応させてから遠心前に混合することを検討していたが、20 サンプル程度の条件検討実験でも大きなばらつきが生じてしまうことが判明したため、多少発現タンパク質の多寡に対してバイアスがかかってしまう可能性があるものの、先に異なるペプチドタグを付加した PCR 産物を1つに混ぜて、one-pot で翻訳反応をさせるほうが測定数値が安定するという結果が確認された。

4-3: PRM 法による測定条件の検討

PRM 法等の、いわゆる「ターゲット MS」と呼ばれる測定手法において、1測定あたりにかかる時間の間隔 (cycle time) は非常に重要なパラメータとなる。この時間間隔が短いほど、より正確なクロマトグラムを描くことができるようになるため、定量の精度が良くなる。汎用される nanoLC の条件では、だいたい1～2秒程度が最適値とされている。この時間間隔は一度に測定したいペプチドの数と、1回の MS/MS 測定にかかる時間によって決まるが、当然一度に多くのペプチドを測定できるほうが良く、また測定にかかる時間を短くしすぎると感度が足りなくなる恐れが出てきてしまう。

そこでモデルタンパク質を用いた系でこの条件について検討をおこなった。まずは Data Dependent Acquisition (通常のショットガン解析に用いられる測定モード) で汎用される測定時間 (Maximum IT 60msec) で測定をおこなったところ、ペプチド50本程度の測定でクロマトグラムがだいぶ粗になってしまうことが確認されたため、その半分の測定時間 (Maximum IT 30msec) で同様の測定をおこなったところ、ペプチドタグの選定が良かったこともあってか、ほぼ全てのペプチドタグについて十分な感度で検出することができることが確認された。今回の検討ではここまでとしたが、一度に測定するペプチドの数をもっと増やしたい場合は、測定時間をさらに減らすことも十分できそうであった。

4-4: モデルタンパク質のフォールディング進化への適用と現状の問題点

上記の条件を設定したのち、フォールディング進化のモデルとして、過去に私たちのグループでフォールディング進化に成功したタンパク質である大腸菌 U1aF タンパク質を用いて系の評価をおこなった。市販のランダム変異ライブラリ作成キットを用いてランダムライブラリを作成した後、それを平均10分子くらい含まれるように希釈・分注し、それぞれに異なるペプチドタグを付加した。これを多数準備して、PURE system で発現させた後に遠心分離し、質量分析装置による測定までおこなったが、現状ではフォールディングが進化した変異体を取得するところまでは至っていない。モデルを用いた実験からわかってきた問題点として、

- ・ランダム PCR 後の PCR が安定しない (増幅しないところが出てしまう)
- ・サンプル調製のプロセスが単純化しきれず、具体的な操作方法を含めてもっと煮詰める必要がある
- ・PURE system の発現系のボリュームを減らすことが現状ではできておらず、測定コストが非常に高くなってしまふ

などが挙げられる。特にコスト面については当初予想していたよりもだいぶ大きなボリュームでの反応となってしまったため、より小さな反応スケールでも評価できるような実験系を組直す必要があることが判明した。

また質量分析装置を用いた測定についても、現状はマシンタイムを豊富に利用して検討を行ってきたが、こちらについてもより短時間で多くのサンプルを測定できるような条件を組んだほうがより効率的に行える可能性があることがわかった。上記のより小さな反応スケールでの評価とも関係するが、サンプルを測定前に陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて分画するなどの方法を併用することで、コストを減らしつつ質量分析装置での測定も効率化することができる余地が残されているので、測定コストと結果の安定性についてうまくバランスを取りながら再度実験系の最適化に取り組む必要があることが一連の実験により判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水城真智子、田口英樹、丹羽達也
2. 発表標題 ペプチドタグとLC-MS/MSを用いたタンパク質フォールディングの進化実験の確立
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会14.0
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
---------	---------