

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19084

研究課題名（和文）人工プライベートシャペロンシステムの構築と難発現タンパク質生産への応用

研究課題名（英文）Reconstitution of artificial private chaperone systems and their application to the production of difficult-to-express proteins

研究代表者

安井 典久（Yasui, Norihisa）

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：90467514

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：自然界に見られるプライベートシャペロンの機能を人工的に再構成し、その知見を難発現タンパク質の生産へと応用することを目的に研究に取り組んだ。具体的には、「RAPとLDL受容体」および「HSP47とコラーゲン」というプライベートシャペロンと基質タンパク質のペアに着目した。プライベートシャペロンの機能を模倣する分子の作製を目的に、一本鎖モネリンを非抗体骨格タンパク質とするファージディスプレイライブラリーを基質タンパク質に対して選別した。その結果、LDL受容体の細胞外領域を構成し、RAPの結合部位であるLAモジュールに特異的に結合する人工タンパク質を作製することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の実施で得られたLDL受容体に結合する人工タンパク質群は、プライベートシャペロンRAPの機能を模倣する分子の候補となるものである。RAPはLDL受容体の細胞内輸送に異常があり家族性高コレステロール血症の原因となる変異体の膜移行を一部正常化することが知られている。本研究で得られた人工タンパク質は、RAPと同様のシャペロン機能を発揮するののかの否かの検証に直接用いることができるため重要である。

研究成果の概要（英文）：This research aimed to reconstitute private chaperone systems and apply the findings to the production of difficult-to-express proteins. We focused on the private chaperone-substrate protein pairs "RAP and LDL receptor" and "HSP47 and collagens". To generate molecules that mimic the function of the private chaperones, we sorted phage display libraries of synthetic binding proteins using single-chain monellin as a non-antibody molecular scaffold against the substrate proteins. As a result, we succeeded in generating synthetic proteins that specifically bind to the LA modules in the extracellular region of the LDL receptor that share binding sites with RAP.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：分子シャペロン プライベートシャペロン LDL受容体 コラーゲン ファージディスプレイ 一本鎖モネリン 人工タンパク質 難発現タンパク質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

多くのタンパク質は、生合成過程において分子シャペロンを必要とする。分子シャペロンには、特定のタンパク質立体構造に特化せず多様なタンパク質の構造形成を手助けするものと、ある特定の立体構造を持つタンパク質に特異的に作用しその適切な構造形成や細胞内局在を助けるもののが知られている。後者は「プライベートシャペロン」と総称される。一方で、基礎研究の対象ないし創薬ターゲットとして重要な細胞膜タンパク質や分泌タンパク質には、動物細胞で組換え発現しても、良好な細胞膜移行や分泌発現を達成できない「難発現タンパク質」も多い。難発現タンパク質生産の問題を、プライベートシャペロンの利用で解決できる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、自然に見いだされるプライベートシャペロンの分子機能を人工タンパク質で模倣することを第一の目的とした。次いで、得られた概念を拡張し、難発現タンパク質に対しプライベートシャペロン機能を発揮する人工タンパク質を創製することで、難発現タンパク質の生産を促進することを目的とした。

3. 研究の方法

自然に見いだされる基質タンパク質とプライベートシャペロンのペアとして、「コラーゲンと HSP47」および「低密度リポタンパク質受容体 (LDL 受容体) と RAP」を具体的な研究対象とした。これらプライベートシャペロンの分子機能の特徴として、特定の基質タンパク質に特異的に結合することがあげられる。そこで、基質タンパク質や難発現タンパク質に結合する人工タンパク質を作製し、それらが基質タンパク質の分泌に与える影響を評価することにした。

(1) LDL 受容体に結合する人工タンパク質の作製

N 末端にヒト成長ホルモンを、C 末端にビオチン化タグをそれぞれ融合したヒト LDL 受容体細胞外領域の様々な断片を、分泌シグナルを付加したビオチン化酵素 BirA と Expi293F 細胞で共発現させ、分泌画分より精製した。精製標品をストレプトアビジンでコートされた磁気ビーズに固定し、一本鎖モネリンを非抗体骨格タンパク質とする人工タンパク質のファージディスプレイライブラリーを選別した。4 ラウンドの選別を経てファージをクローン化し、ELISA により標的の LDL 受容体断片に結合する人工タンパク質を選別した。その後、人工タンパク質のアミノ酸配列をファージミドの塩基配列を解析することで推定した。

(2) Collagen I に結合する人工タンパク質ライブラリー選別

ウシ真皮由来の collagen I (KOKEN より購入) をファージディスプレイライブラリーの選別に用いた。Collagen I は、希釈後に ELISA プレートに直接コーティングないしアガロース単体に共有結合することで固定化し、上記のファージディスプレイライブラリーを選別した。

(3) 人工タンパク質の LDL 受容体結合特性解析

酵母表層ディスプレイ法により、人工タンパク質と LDL 受容体の結合を評価した。具体的には、得られた人工タンパク質を酵母 (EBY100 株) 表層に提示させ、様々な濃度のビオチン化された LDL 受容体の精製サンプルと混合した。次いで、酵母表層上のビオチン化 LDL 受容体を蛍光標識ストレプトアビジンと結合させ、フローサイトメトリーに供することで結合を定量的に解析した。

(4) 人工タンパク質のシャペロン機能の評価

作製した LDL 受容体に結合する人工タンパク質について、プライベートシャペロン RAP と同様に、動物細胞において小胞体内で局在するよう発現プラスミドを設計・作製した。すなわち、N 末端に分泌シグナルを、C 末端に小胞体停留シグナル KDEL 配列をそれぞれ付加した。小胞体局在型の人工タンパク質と LDL 受容体の LA モジュール断片を HEK293T 細胞で共発現させ、培養上清に分泌された LDL 受容体 LA モジュール断片を精製し、SDS-PAGE で分離することにより、人工タンパク質の共発現の有無による分泌量の違いを比較した。

4. 研究成果

(1) 一本鎖モネリンを非抗体骨格タンパク質とする人工タンパク質ファージディスプレイライブラリーの改良

研究初期においては、基質タンパク質に結合する人工タンパク質の作製は、以前に構築した一本鎖モノリンを非抗体骨格タンパク質とする人工タンパク質のファージディスプレイライブラリー [1] を利用した。1 残基の変異導入 (C41A) により一本鎖モノリンが熱安定化することを見だし、人工タンパク質の分子骨格を安定化させることができた (従来よりも熱変性温度が約 8°C 上昇した) [2]。この成果に基づき、ループ長を伸長した一本鎖モノリンのファージディスプレイライブラリーを新しく設計・作製した。

(2) 基質タンパク質に結合する人工タンパク質の作製

① LDL 受容体の細胞外ドメインのうち、プライベートシャペロン RAP の結合部位が存在する LA モジュールに結合する人工タンパク質を作製することにした。7 つある LA モジュールを 2 ずつタンデムに連結させた組換えタンパク質を準備した。上記 (1) のファージディスプレイライブラリーを選別することで、様々な LA モジュールに結合する人工タンパク質を作製することができた。

② プライベートシャペロン HSP47 が作用するコラーゲンのうち、ウシ由来 collagen I に結合する人工結合タンパク質の作製を試みた。Collagen I の固定化方法、改良したファージディスプレイライブラリーの使用、ライブラリー選別条件など様々な条件検討を行ったが、collagen I に結合する人工タンパク質を作製することができなかった。人工タンパク質の組合せ変異導入箇所を変更するなど、これまでとは全く異なるデザインのライブラリーを作製・利用する必要があると考えられた。そのための予備的な検討を実施し、ライブラリーの設計を完了させた。

(3) 人工結合タンパク質の結合特性解析

作製した LDL 受容体細胞外領域に結合する人工タンパク質について、酵母表層ディスプレイ法を用いて、結合の親和性と特異性を解析した。その結果、LDL 受容体の細胞外領域の LA2, LA4 および LA5 モジュールそれぞれに特異性を示す人工タンパク質が得られた (図 1)。また、標的の LA モジュールに対する結合の解離定数を見積もったところ、0.1~0.8 μM であった。この親和性は、RAP と LA モジュール間の相互作用と比べてやや弱いか、ほぼ同等である。また、このような特定の LA モジュールに高い特異性を示すという分子特性は、RAP の様々な LA モジュールに広範に結合するという結合特性とは大きく異なる。

一方で、RAP と同様に様々な LA モジュールに広範に結合する人工タンパク質も作製できた。これら特異性の低い人工タンパク質は、LA モジュールに対する親和性も低く、解離定数は 10 μM よりも大きいことが分かった。

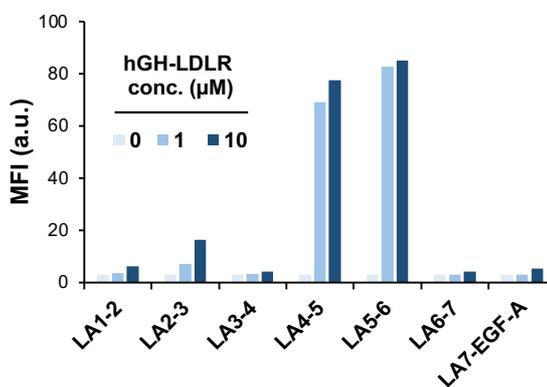


図1. 人工タンパク質の結合特異性解析

作製した人工タンパク質を酵母表層に提示し、様々な LA モジュールからなる組換えタンパク質との結合を調べた。0, 1 および 10 μM の各 LA モジュールに対する結合シグナルを示した。この人工タンパク質は、LA4-5 と LA5-6 に対して、他の LA モジュールペアに対してよりも大きな結合シグナルを示したことから、LA5 に特異的に結合することが示唆された。

(4) 人工タンパク質の LDL 受容体 LA モジュール断片の分泌に与える影響の解析

作製した人工タンパク質のうち、LA2 に特異的に結合するもの複数種類について、LA2 と LA3 からなる LDL 受容体の断片 (LDLR LA2-3) とを Expi293 細胞に一過性で共発現させた。培養上清に分泌された LDLR LA2-3 を精製し、SDS-PAGE で分離後にバンドを CBB 染色により検出した。その結果、小胞体局在型の人工タンパク質を共発現させても、LDLR LA2-3 の分泌量は増加しなかった。RAP と共発現させた場合でも、LDLR LA2-3 の分泌量の増加は限定的であったことから、実験系の改良が必要であることが考えられた。

LDL 受容体の変異体には、細胞内輸送に異常があり家族性高コレステロール血症の原因となるものが知られている。先行研究において、RAP はこれら LDL 受容体の細胞膜への移行を一部正常化することが報告されている [3]。LDL 受容体の細胞膜への移行や細胞外領域の分泌に対する効果が、野生型の場合よりもより明確となる可能性があることから、本研究で作製した人工タンパク質の細胞内輸送に異常がある LDL 受容体の変異体に対する作用を調べる必要がある。

引用文献

- [1] Yasui, N., Nakamura, K., & Yamashita, A. (2021). A sweet protein monellin as a non-antibody scaffold for synthetic binding proteins. *J. Biochem.*, **169**, 585–599.
- [2] Ohnuma, K., Yamashita, A., & Yasui, N. (2023). Investigating the Effect of Substituting a Single

Cysteine Residue on the Thermal Stability of an Engineered Sweet Protein, Single-Chain Monellin. *Protein J*, **42**, 698–708.

- [3] Li, Y., Lu, W., Schwartz, A. L., & Bu, G. (2002). Receptor-associated protein facilitates proper folding and maturation of the low-density lipoprotein receptor and its class 2 mutants. *Biochemistry*, **41**, 4921–4928.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Okuda K, Nakahara K, (中略15名)、Yasui N, (中略10名)、Lipton S A., Uehara T	4. 巻 14
2. 論文標題 Pivotal role for S-nitrosylation of DNA methyltransferase 3B in epigenetic regulation of tumorigenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-36232-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Atsumi Nanako, Yasumatsu Keiko, Takashina Yuriko, Ito Chiaki, Yasui Norihisa, Margolskee Robert F, Yamashita Atsuko	4. 巻 12
2. 論文標題 Chloride ions evoke taste sensations by binding to the extracellular ligand-binding domain of sweet/umami taste receptors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e84291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.84291	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshida Atsuki, Ito Ayumi, Yasui Norihisa, Yamashita Atsuko	4. 巻 174
2. 論文標題 Direct binding of calmodulin to the cytosolic C-terminal regions of sweet/umami taste receptors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 451 ~ 459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ohnuma Kyosuke, Yamashita Atsuko, Yasui Norihisa	4. 巻 42
2. 論文標題 Investigating the Effect of Substituting a Single Cysteine Residue on the Thermal Stability of an Engineered Sweet Protein, Single-Chain Monellin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Protein Journal	6. 最初と最後の頁 698 ~ 708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10930-023-10154-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishida Hikaru, Yasui Norihisa, Yamashita Atsuko	4. 巻 19
2. 論文標題 Chemical range recognized by the ligand-binding domain in a representative amino acid-sensing taste receptor, T1r2a/T1r3, from medaka fish	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0300981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0300981	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 石田 光, 安井 典久, 山下 敦子
2. 発表標題 メダカ由来味覚受容体T1r2a/T1r3細胞外領域のリガンド結合解析
3. 学会等名 日本味と匂学会第56回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安井 典久, 中村 祐介, 山下 敦子
2. 発表標題 LDL受容体リガンド結合領域を標的とする人工結合タンパク質の作製
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新田 純矢, 安井 典久, 堤 尚孝, 山下 敦子
2. 発表標題 メダカ由来味覚受容体T1r2a/T1r3リガンド結合領域に対する疎水性アミノ酸の作用解析および結合構造解析
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大沼 恭介, 山下 敦子, 安井 典久
2. 発表標題 システイン残基への変異導入がもたらす一本鎖モネリンの 安定性変化
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安井 典久, 中村 祐介, 山下 敦子
2. 発表標題 LDL受容体とそれを標的とする人工結合タンパク質の相互作用の構造基盤
3. 学会等名 第23回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hikaru Ishida, Norihisa Yasui, Atsuko Yamashita
2. 発表標題 Ligand-binding analysis of the ligand-binding domain of taste receptor T1r2a/T1r3 from medaka fish
3. 学会等名 The 20th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究 分担 者	山下 敦子 (Yamashita Atsuko) (10321738)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

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
---------	---------