

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成26年 10月 5日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22760617

研究課題名（和文） 自律的にフォールドする短鎖セグメントを起点とした
小型人工蛋白質のビルドアップ研究課題名（英文） A buildup approach to the design of a small-sized protein
via an autonomously-folded short segment

研究代表者

渡邊 秀樹（WATANABE HIDEKI）

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：90422089

研究成果の概要（和文）：

本研究では、微小蛋白質シニョリンを構造規制要素として用いた小型人工蛋白質の設計手法を確立した。シニョリンを起点としてこれにランダム配列を付加した T7 ファージディスプレイライブラリーを構築し、モデル標的とした抗体定常領域に対する親和性選択により、結合性を有する小型人工蛋白質を複数取得した。表面プラズモン共鳴、核磁気共鳴、X線結晶構造解析によって作製した人工蛋白質の機能・構造を詳細に解析した。

研究成果の概要（英文）：

This study established a methodology for the design of small-sized proteins on the basis of segment elongation by using chignolin that was introduced as a structural support. Using T7 phage displayed library, we selected artificial proteins with affinity for antibody Fc region that was used as a model target. Function and three dimensional structures of artificial proteins were analyzed in detail by using surface plasmon resonance, NMR, and X-ray crystallography.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：生物機能工学、人工蛋白質、分子進化学、抗体医薬

1. 研究開始当初の背景

人工蛋白質を新規に作製する際のボトルネックは、その配列空間の天文学的なまでの膨大さにある。30 アミノ酸残基の小型蛋白質であっても、その配列多様性は 20 の 30 乗（ $\approx 10^{39}$ ）にも上り、これは既存のコンビナトリアルライブラリー規模が 10^{15} 程度に限定されることを考慮した場合、全ての多様性を

実験的に網羅するには困難な規模であることを意味している。この膨大な多様性を考慮し、効率的な人工蛋白質設計として以下の 2 点、「短鎖セグメント単位での段階的伸長」と「自律的な構造規制要素の導入が柔軟性の高いペプチドに構造規制を与え、それにより進化が効果的に促進される」とする設計指針を提案した。我々のグループは、10 残基から

なる微小蛋白質シニョリンを理論的に設計し、その構造物性について詳細な解析を進めてきた。シニョリンは蛋白質の局所構造程度の大きさでありながら、それ自身が単独で、高分子量の球状蛋白質と同様に協同的なフォールディングを実現する。我々はこのシニョリンがセグメント伸長における分子進化において、効果的な構造規制要素として機能すると仮定した。

2. 研究の目的

本研究では、「自律的にフォールドする 10 残基の微小蛋白質を起点としたセグメント伸長」による小型人工蛋白質の設計手法確立を目的とする。本手法の妥当性・汎用性を検証するため、以下 3 項目について研究を実施した。

- (1) シニョリンを介したセグメント伸長による低親和性ペプチドの分子進化を行い、シニョリンによる構造規制が分子設計に有効であるとする本手法の妥当性を検証する。
- (2) シニョリンを蛋白質骨格とするランダムペプチドライブラリーの構築と新規分子の取得を行い、先見情報無しに新たに機能性人工蛋白質を創出できる系の確立を検証する。
- (3) 血管内皮増殖因子 (VEGF) 結合蛋白質の作製を行い、抗体医薬など分子標的医薬のターゲットとされている VEGF に結合する小型蛋白質を設計することで、本手法の妥当性、抗体代替医薬品の可能性について検証する。

3. 研究の方法

- (1) シニョリンを介した低親和性ペプチドの分子進化

進化させるペプチドのモデルとして、抗体 Fc 領域に低親和性を有する 13 残基ペプチド FcIII のアラニン変異体 FcIII-Ala を用いた。

蛋白質設計は二段階で行った。セグメント伸長の第一段階として、シニョリン (CLN) を介して 10 残基長のランダム領域 (X10) を付加した FcIII-CLN-X10 をコードする遺伝子断片を調製し、これを T7 ファージゲノムの外殻蛋白質遺伝子に組み込み、第一世代ファージライブラリーを構築した。抗体 Fc 領域に対する親和性選択により高い親和性を有するクローンのアミノ酸配列を同定した。このアミノ酸配列を C 末端領域として固定し、続いて新たに N 末端にシニョリンを介して 10 残基のランダム領域を付加した第二世代ライブラリーを作製し、高機能化クローン選択のため同様の選択操作を行った。選択後のクローンについて ELISA による簡易アッセイにより親和性クローンを単離した。これらについて機能・構造の観点から詳細に解析するため、表面プラズモン共鳴 (SPR) に基づく親和性評価と X 線結晶構造解析を行った。

- (2) シニョリンを蛋白質骨格とするランダムペプチドライブラリーの構築と新規分子の取得

シニョリンを蛋白質骨格としてこれに 8 残基ランダム配列 X_8 のみを付加した T7 ファージライブラリーを構築し、抗体 Fc 領域に対する親和性クローンの取得を試みた。分子設計は上記と同様二段階で行い、ELISA による簡易アッセイにより親和性クローンを単離した。取得クローンについて SPR および核磁気共鳴により、その機能と構造を詳細に解析した。

- (3) 血管内皮増殖因子 (VEGF) 結合蛋白質の作製

人工蛋白質構築の開始点となるペプチドのモデルとして、血管内皮増殖因子 (VEGF) 受容体由来する 17 残基ペプチド Je-11 を用いた。セグメント伸長の第一段階として、シニョリンを介して 10 残基長のランダム領域を付加した第一世代ライブラリーを構築し、これを基に親和性クローンを選択した。続いて新たに N 末端にシニョリンを介して 10 残基のランダム領域を付加した第二世代ライブラリーを作製し、再度 VEGF に対する選択を行った。濃縮されたクローン集団について配列解析、ELISA による簡易アッセイを行い、親和性クローンを同定した。

4. 研究成果

- (1) シニョリンを介した低親和性ペプチドの分子進化

二段階によるセグメント伸長の結果、10 種類の高活性クローンを取得した。第一世代ライブラリーから取得した 32 残基長の人工蛋白質 pep24、第二世代ライブラリーから取得した 55 残基長の人工蛋白質 p17 は、表面プラズモン共鳴による親和性評価試験の結果、それぞれ平衡解離定数 $K_D = 220$ nM, 1.6 nM の値を示した。最も親和性の高い p17 はセグメント伸長の開始ペプチドとして用いた FcIII-Ala に比べ、40, 600 倍の親和性向上を示していた。また、第一世代 (pep24)、第二世代 (p17) と二段階の伸長を経ることで親和性はそれぞれ 197, 206 倍の親和性向上が確認できており、段階的な伸長により逐次的な親和性向上を実現できることが明らかとなった。

作製した人工蛋白質 p17 について構造的観点から解析するため、p17-Fc 領域複合体の X 線結晶構造解析を行った。30% PEG4000, 0.2 M 酢酸アンモニウム、0.1 M クエン酸ナトリウム、pH 5.6 の条件下で単結晶の成長が確認でき、分解能 2.8 Å で回折データを収集した。分子置換法によって位相を決定し、構造精密化を進めた。Fc との結合界面におけるアミノ

酸残基側鎖の寄与を原子レベルで確認した。Fc 領域へ結合している FeIII 部分は、ジスルフィド架橋された FeIII の 3 次元構造と類似の主鎖構造を維持していた。伸長したセグメントのアミノ酸残基は、水素結合などにより主鎖の局所的な構造を固定し、同時に Fc 領域への結合に重要な残基の配向性を決定する役割を担っていた。以上の結果は、シニョリンを構造規制要素としたセグメント伸長により、低活性分子の高機能化を効率的に行えることを実証している。

(2) シニョリンを蛋白質骨格とするランダムペプチドライブラリーの構築と新規人工蛋白質の取得

第一世代・第二世代ライブラリーを用いた親和性選択の結果、アミノ酸配列の収束したクローン 2A1 を活性クローンとして単離した。合成ペプチドとして調製した 2A1 を用いて SPR による結合活性評価を行った結果、2A1 は結合解離定数 22 nM の親和性で標的に結合した。結合様式をさらに詳細に検討した結果、興味深い分子認識特性が明らかとなった。2A1 は天然型構造の Fc 領域、IgG には全く結合を示さない。一方、酸変性、熱変性、還元剤処理などを施した非天然型構造の IgG および Fc 領域に対しては強固な結合を示し、天然型との構造的差異を厳密に識別することが判明した (図 1)。

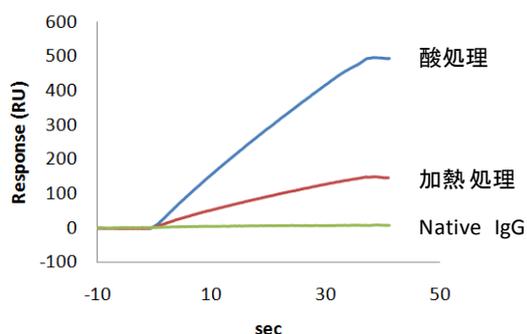


図 1. 2A1 による非天然型 IgG の認識

2A1 が非天然型構造を認識していることから、これを解析素子とした変性抗体の検出系を作製した。2A1 を固定化したセンサーチップを用い、天然型 IgG に非天然型 IgG を一定希釈率で混合したサンプルを用いて結合を測定したところ、天然型 IgG に 0.001% の割合で混入した変性 IgG を ng オーダーで検出することが可能であった。治療用抗体の変性・凝集体は抗原性惹起の懸念が指摘されており、本検出系は、治療用抗体の品質管理における有用な評価系となることが期待される。

人工蛋白質 2A1 を構造的観点から評価するため、核磁気共鳴によりその 3 次元構造を決定した (図 2)。シニョリンに由来する β ターン

構造は 2A1 においてもよく保存されていた。伸長した N 末端と C 末端のセグメントは空間的に近接しており、全体として球状構造を形成していた。シニョリン由来のトリプトファン残基は空間的に近接するイソロイシン残基とともに分子内部に埋没しており、この埋没はトリプトファン内部蛍光スペクトルによっても確認された。すなわち、シニョリン由来のトリプトファン残基を核として疎水コアを形成する、タンパク質様の構造を持つことが示された。

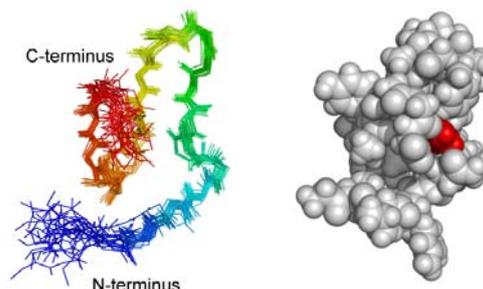


図 2. 2A1 立体構造。トリプトファン残基を右図の赤で示す。

NMR より得た立体構造と、親和性選択の結果として収束が確認されたアミノ酸残基部位に系統的なアラニン置換を導入した変異体を作製し、その機能を SPR によって測定した。結合に大きな影響を与える残基が 4 部位決定され、さらにトリプトファン残基とともに疎水コアを形成するイソロイシン残基の置換も、結合能の大幅な損失をもたらすことが明らかとなった。これらの結果は、一般に蛋白質間相互作用に見られる結合の Hot spot が存在すること、および構造安定性が親和性にも影響を与えていることを示しており、人工蛋白質 2A1 が機能・構造の両面において蛋白質様の物性を有することを示している。

(3) 血管内皮増殖因子 (VEGF) 結合蛋白質の作製

Je-11 にシニョリンを介して 10 残基のランダム配列を付加した 33 残基長の小型蛋白質を提示した T7 ファージライブラリーを構築した。実験に用いる可溶性 VEGF として、大腸菌発現および菌体内封入体リフォールディングによる VEGF 大量調製系を構築した。T7 ファージライブラリーと VEGF を用いて選択操作を行い、VEGF に結合陽性を示すクローンを濃縮した。ELISA および配列解析の結果、数種類のクローンへの有意な収束が認められたため、これらを結合活性クローンの候補として単離した。チオレドキシシン融合蛋白質として調製したクローンを用い、SPR によって VEGF への結合を確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) Hideki Watanabe, Kengo Kanazaki, Takeshi Nakanishi, Hidenori Shiotsuka, Satoru Hatakeyama, Masaru Kaieda, Takeshi Imamura, Mitsuo Umetsu, Izumi Kumagai, “Biomimetic engineering of modular bispecific antibodies for biomolecule immobilization” 査読有 Langmuir vol.27, 9656-9661, 2011, DOI: 10.1021/la2006259

(2) Hideki Watanabe, Hiroyuki Matsumaru, Ayako Ooishi, Shinya Honda, “Structure-based histidine substitution for optimizing pH-sensitive Staphylococcus protein A” 査読有 J. Chromatogr. B, vol.929, 155-160, 2013, DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.04.029

(3) Hideki Watanabe, Kazuhiko Yamasaki, Shinya Honda, “Tracing primordial protein evolution through structurally guided stepwise segment elongation” 査読有 J. Biol. Chem., vol.289, 3394-3404, 2014, DOI: 10.1074/jbc.M113.530592

(4) 渡邊秀樹, 梅津光央, 熊谷泉, (～抗体医療研究の技術を工業材料開発へ～ 抗体分子の「ナノ糊(のり)としての利用」, 査読無 Material Stage vol.10, pp.6-9, 2011

(5) 渡邊秀樹, 本田真也, 分子デザインによる抗体精製用蛋白質プロテイン G の安定性および pH 応答性の論理的改変, 査読無, BIO INDUSTRY vol.27, 72-78, 2010

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 抗体結合性ペプチド

発明者: 渡邊秀樹, 本田真也

権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所

種類: 特許出願

番号: PCT/JP2013/007583

出願年月日: 2013/12/25

国内外の別: 国際

名称: 微小タンパク質の骨格構造に基づく分子ライブラリ

発明者: 本田真也, 渡邊秀樹, 山崎和彦

権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所

種類: 特許出願

番号: PCT/JP2013/007238

出願年月日: 2013/12/09

国内外の別: 国際

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 秀樹 (WATANABE HIDEKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメ
ディカル研究部門・研究員

研究者番号: 90422089