

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23658089

研究課題名（和文）

蛋白質架橋酵素の高反応性基質配列を接着ペプチドとして活用する

研究課題名（英文）

Utility of highly reactive substrate peptide for transglutaminase for attachment

研究代表者

人見 清隆 (HITOMI KIYOTAKA)

名古屋大学・創薬科学研究科・教授

研究者番号：00202276

研究成果の概要（和文）：

蛋白質架橋酵素(トランスグルタミナーゼ)は、微生物から高等動物まで幅広く存在する酵素で、蛋白質のグルタミン残基とリジン残基との間に架橋形成反応を触媒する。本研究はこの酵素に対する高反応性な基質配列(ペプチド)の性質を解析し更なる取得をすると共に、有用蛋白質の接着固相化を目指したものである。有用蛋白質として蛍光蛋白質を対象に融合させ、その反応性を検討した。固相化に向けた機能蛋白質との配列との融合形式、また反応に必要な組換え型酵素の大量生産を進めた。

研究成果の概要（英文）：

Transglutaminase is the enzyme family that catalyzes isopeptide bond formation between glutamine and lysine residues. We have obtained highly reactive substrate peptides which are available for immobilization of functional proteins via such substrate peptides and the enzyme. This project was attempted to use the peptide by characterization of the reaction between peptide and the enzyme.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：細胞生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：酵素、基質ペプチド、融合蛋白質

1. 研究開始当初の背景

蛋白質架橋酵素は、動物および微生物に存在し、蛋白質のグルタミン残基とリジン残基の間にイソペプチド結合としての架橋形成を触媒する酵素である。また、一級アミンもリジンに替って基質となる。本来、本酵素は翻訳後修飾として、蛋白質の特性変換を通じて多彩な生理機能に関与する。

本酵素は基質としての蛋白質を共有結合レベルで架橋(接着)することから、本酵素の有効活用として、有用な蛋白質の固相化などの応用を目指した。例えば、一級アミンを固相化した物質に酵素学的に、有用蛋白質を本酵素により自在に接着をさせることが可

能である。

この時、ランダムにグルタミン残基と一級アミン(あるいはリジン残基)を接着させるのではなく、特定の残基を「狙い撃ち」して接着に関与させなければならない(接着させるべき有用な蛋白質にもグルタミン残基やリジン残基が含まれるため)。しかしそのためには、基質となりやすい配列が必要であるが、研究代表者はこれまで、ランダムなペプチドライブラリから「高反応性な基質配列(12残基のペプチド)」を単離することに成功してきた。

その基質配列を活用することを考え、基質配列の特異性や、固相化に向けた有用蛋白質

の配列の導入、また固相化の実施をもくろんで実験を行う必要があった。

さらには、給源としてのトランスグルタミナーゼを大量に入手する必要もあったが、一般に哺乳類由来の酵素は大腸菌での発現が容易ではなかった。

2. 研究の目的

蛋白質架橋酵素は、どのグルタミン残基やリジン残基も等しく架橋を生じさせるのではなく、周辺配列に依存して特定の残基を好んで基質とする。我々がこれまで得てきた高反応性基質配列の更なる解析と、新たな基質配列の同定(新規アイソザイム等)を用いて、特定の機能蛋白質に配列を導入することを目的とした。これを活用して有用蛋白質の固定化を中心に、酵素の有効的な活用を展開することを目的とした。

そのため、これまでに行ってきた、高反応性基質配列の獲得を、新たなアイソザイムを対象として展開することにした。

また、高反応性基質配列を融合させる機能を持つ蛋白質としては蛍光蛋白質である(Cerulian)を対象にすることから始めた。

また、酵素の給源として、ヒト酵素は大腸菌での発現では不溶性になる場合や、発現量が十分でない場合が多い。そのため、給源をメダカ相当のTG 遺伝子を用いた組換え蛋白質に求める試みも行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 新規高反応性基質配列の探索と解析

蛋白質架橋酵素には、8つのアイソザイムが存在する。このうち、Factor XIII, TG1, TG2, TG3などの主要な酵素群についてはすでに、高反応な基質配列を得ている。さらに、活用の幅を広げるために、新規な酵素群であるTG6, TG7の2種についても、ファージ提示型ペプチドライブラリからの探索を試みた。またこれと並行して、前立腺に特異的に発現し、やはり機能の不明なTG4についてもスクリーニングを行った。

これは、まずビオチン標識一級アミンをグルタミン受容側基質として、ファージに提示されたペプチドに酵素の存在下で取り込ませる。反応性の高いグルタミン残基を含んだペプチドを提示したファージが標識アミンを取り込むので、これをアビジンカラムにて選別し、大腸菌に感染させて増幅する。この一連の操作を繰り返すことで、最終的に反応性の高いグルタミンを含むペプチドが同定できる。その配列群は、さらに大腸菌で組換え融合蛋白質として作製して、蛍光標識一級アミンの取り込み量で、反応性と特異性を評価して、最終的に配列を決定した。なお、ペ

プチドのみで反応性や特異性を再現できるかどうかをさらに確かめて、新たな高反応性基質配列とした。

(2) 機能性蛋白質として、高反応性基質配列を導入した融合蛍光蛋白質の作製

作製に用いた高反応性基質配列は微生物TG2の基質配列T26 (HQSIVDPWMLDH)と微生物TG (MTG)に対する基質配列

(GGGSFYPLQMRG)とである。なお、MTGについては連携研究者の神谷典徳博士(九州大工・教授)作製の高反応性の配列を基に合成した。

これらを、蛍光蛋白質として頻用されているCerulianを発現蛋白質用ベクターに遺伝子組換えにより融合させて発現するように構築した。なお、両者とも、精製のためにヒスチジンタグを付加するように構築した。構築したベクターは、大腸菌BL21株を形質転換し、これを大量培養して発現誘導し、アフィニティークロマトグラフィー及びゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。基質配列の付加の後も、蛍光を発することを確認する実験を行った。

(3) メダカ蛋白質架橋酵素の大量精製

メダカは魚類のモデル生物として近年医薬学分野でも注目され始めている。これまでに、給源としての酵素がメダカでも十分に架橋活性があることを確認しており、大量生産させる上で、大腸菌で十分量の作製が可能であるところによる。

メダカには、オルソログがあり、TG1とTG2それぞれに相当する酵素の遺伝子を取得した。これを、ヒスチジンタグを付加して発現できる大腸菌用のベクター(pET24d)に組み込むよう、遺伝子構築を行った。形質転換株をBL21(DE3)LysSにおいて行い、ここでの誘導発現を行った。

大量に大腸菌の培養を行って菌を回収し、抽出物からの精製は、メタルアフィニティークロマトグラフィー及び、ゲルろ過クロマトグラフィーによって行うこととした。

4. 研究成果

(1) より多彩な高反応性基質を得る目的で、蛋白質架橋酵素である、TG4, TG6, TG7についてスクリーニングを行い、ファージが提示するいくつかの反応に好まれる配列(グルタミン残基提供側基質)を、それぞれの酵素群について得た。

GST融合蛋白質として配列を大腸菌で発現、反応性と特異性の高いものを選別した。

TG6とTG7については、いくつかの配列を得ることに成功した。しかし、TG4について

は、ファージスクリーニングで得た配列はどれも、高い反応性を示すものではなく、配列を得ることはできなかった。

そこで TG6, TG7 の 2 つの蛋白質架橋酵素についてのみ、さらに配列の反応性と特異性について解析を進めた結果、それぞれについて最終的に Y25 (DDWDAMDEQIWF) と Z3S (YSLQLPVWNDWA) を得ることができた。図 1 に、これらも含めた高反応性基質の一覧を示す。後述するように、今回は TG6, TG7 については配列を得たのみで、機能性蛋白質への融合は、T26 (TG2) と以前に神谷 (連携研究者) らが取得していた MTG について行った。

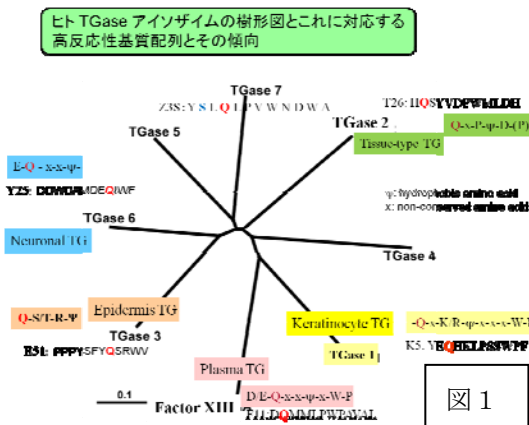


図 1

(2) 高反応性基質を介した、蛋白質の接着を行う上で、蛍光蛋白質を対象とした。Cerulean は、有用で広く用いられている蛍光蛋白質である。これに 2 種類の高反応性基質 (pepT26, または MTG 基質配列) を融合させて発現したところ、大腸菌で可溶性となり、蛋白質としても十分な量が得られた (右図)。一級アミン固相化した系への接着についてはまだ試行が未了であるが、

図 2

共に蛍光標識一級アミンの取り込みは酵素活性依存的に行われ、かつ蛍光蛋白質としての性質は保持していたので、基質ペプチドは目的通り機能したと言える。

(3) メダカトランスグルタミナーゼについては、方法に記載した通り、3 種類について大腸菌で発現・精製を行い、図 3 に示される

ような結果を得た。図は、このうち、O1TGT と O1TGO について示した精製図である。タグを用いた精製と、さらにゲルろ過クロマトグラフィーによって、精製物として回収できたものを示してある。

いずれも、カルシウム依存性で活性も十分に保持しており、今後一連の実験において、給源として用いるためには十分量を得るめどがたった。大量精製したメダカ由来の蛋白質架橋化酵素について、その活性を評価した結果を図 3 に示す。

図 3
A: 可溶性画分
E: アフィニティー精製画分
P: ゲル濾過精製画分

2 種類の組換え型蛋白質 (O1TGT, O1TGO) についての結果を示してある。いずれも可溶性画分に回収されたため、ヒスチジンタグを用いてのアフィニティー精製と、ゲルろ過クロマトグラフィーによる再精製を行ったものを示している。

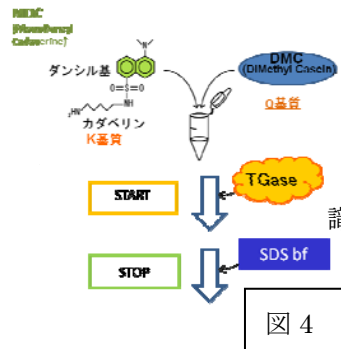


図 4

活性の評価は、モノダンシルカダベリン (MDC; 蛍光標識一級アミン) を用いて行った。

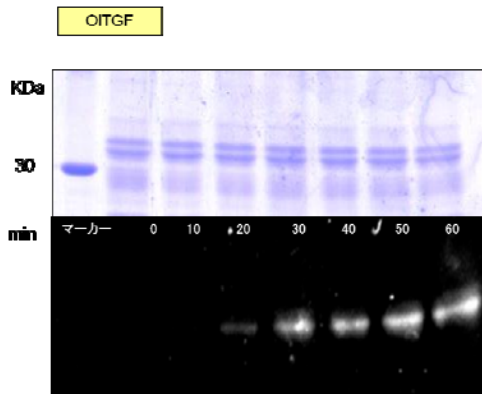


図 5

図5は、大量に調製した組換え型メダカ TGのうち、01TGFの活性を確認したものである。反応時間依存的にジメチルカゼイン (DMC) への蛍光標識一級アミン(MDC)の取り込みが行われ、活性が保持されていることを明らかにした。他の2種も同様に活性を確認し、いずれも酵素給源として十分な量を得た。

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3件)

①Transglutaminase 2 and Factor XIII catalyze distinct substrates in differentiating osteoblastic cell line: utility of highly reactive substrate peptides. FEBS Journal 査読有 280, 1420-1429 (2013)

Fukui M., Kuramoto K., Itoh M., Kawamoto T., Hitomi K.,

②A distinct effect of transient and sustained up-regulation of cellular factor XIII in the goldfish and optic nerve on optic nerve regeneration. Neurochemistry International 査読有 61 423-432 (2012)

Sugitani K Hitomi K., Kato S (他7名)

③タンパク質架橋化酵素の高反応性基質の探索と活用 バイオサイエンスとバイオインダストリー 査読無 vol. 70, 442-447 (2012) 人見清隆

[学会発表] (計9件)

①皮膚表皮におけるタンパク質架橋化酵素の基質ペプチド探索と関連疾患診断への活用 人見清隆、山崎梨沙、鞍本克真、辰川英樹 日本薬学会 2013年03月28日 横浜

②モデル生物としてのメダカにおけるタンパク質架橋化酵素ファミリーに関する解析 小河亮太、斉藤麻衣、菅沼名津季、辰川英樹、人見清隆 日本農芸化学会 2013年3月25日 仙台

③皮膚表皮に存在する新規タンパク質架橋化酵素 TG6 の高反応性基質配列の解析 山崎梨沙、鞍本克真、辰川英樹、人見清隆 2012年12月16日 日本生化学会大会 福岡

④モデル生物としてのメダカにおけるタンパク質架橋化酵素ファミリーの生化学的解析 菅沼名津季、斉藤麻衣、辰川英樹、人見清隆 2012年12月16日 日本生化学会大会 福岡

⑤Identification and applications of the highly reactive substrate peptides for transglutaminases. Kiyotaka HITOMI, Gordon Research Conference 2012年07月19日 ノースカロライナ、米国

⑥Identification and application of highly reactive peptide substrate for mammalian transglutaminase, a protein cross-linking enzyme 人見清隆 日中韓酵素工学会 2012年05月29日 金沢

⑦トランスグルタミナーゼが触媒するタンパク質のポリアミン修飾による生理機能の調節 人見清隆 日本農芸化学会大会 (招待講演) 2012年3月25日 京都

⑧タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼの高反応性基質配列の探索と多面的活用 人見清隆 酵素工学研究会 (招待講演) 2011年9月29日 東京

⑨Identification of the preferred substrate sequence for transglutaminase and utility for detection of activity in an isozyme-specific manner. 人見清隆 日本生化学会 (招待講演) 2011年9月21日 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者
人見清隆 (HITOMI KIYOTAKA)

研究者番号: 00202276

(2) 研究分担者
なし ()

(3) 連携研究者
神谷典穂 (KAMIYA NORIHO)

研究者番号: 50302766