

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560963

研究課題名(和文)クッションタンパク質を用いた高感度バイオ分子間相互作用検出システムの開発

研究課題名(英文)Development of highly sensitive biomolecular interaction detection system utilizing affinity peptide conjugated cushion protein as the anchor domain

研究代表者

今中 洋行 (Imanaka, Hiroyuki)

岡山大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：10379711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：微量分析、医療診断やプロテオーム解析などの基盤技術であるバイオ分子の固定化に関し、申請者らが確立してきた固定化の精密制御技術を活用した、高感度バイオ分子間相互作用検出システムの開発を目指した。そして、新規に見出した金表面親和性ペプチドあるいは親水性ポリスチレン親和性ペプチドを構造が安定なクッションタンパク質に連結し、これをスペーサーとした標的バイオ分子の高度機能的固定化法を確立した。その結果、簡便かつ高感度なバイオ分子間相互作用検出システムを確立できた。

研究成果の概要(英文)：Biomolecular immobilization is one of the basic technologies for microanalysis, diagnosis and proteome analysis. We have tried to establish the highly sensitive biomolecular interaction detection system on solid substrate by utilizing techniques of precise control of biomolecular immobilization. As the results, high interaction detection sensitivity was achieved through the combination of selected cushion protein and solid surface affinity peptide for immobilization of target biomolecule.

研究分野：工学

キーワード：バイオ分子 固定化 相互作用 超好熱菌 タンパク質 ペプチド 親和性

## 1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム関連研究の急速な進展により、多くの生物種の全ゲノム配列が解読され、本格的なポストゲノム時代を迎えている。これまでに、多様なタンパク質の構造・機能の解析も進み、タンパク質を網羅的に解析するプロテオーム研究へと焦点が移りつつある。そのような状況下、とりわけ微量分析・医療診断やプロテオーム解析といった技術の開発・改良は重要である。そして、そのための中核技術の一つである、バイオ分子間相互作用の検出について、新たなブレークスルーが求められている。

## 2. 研究の目的

標的分子のラベル化の有無にかかわらず、高感度なバイオ分子間相互作用検出は主として固体表面上で繰り広げられる。そのため、相互作用検出の基盤技術として、バイオ分子の固定化が重要となる。そこで、本研究では、固定化の精密制御によるバイオ分子間相互作用検出の高感度化ならびに簡便・迅速化を可能とする手法の開発を目的とする。すなわち、固体表面に親和性を示すペプチドを固定化の部位特異性を規定するタグとして使用する。さらに、構造が安定なクッションタンパク質をスペーサーとして、目的タンパク質あるいはペプチドと固体表面の間に挟み込むバイオ分子の高度機能的固定化法の確立を進める。

## 3. 研究の方法

親水性ポリスチレン (phi-PS) あるいは金表面親和性ペプチド (それぞれPS-tag, Au-tag) 及びクッションタンパク質を用い、固定化標的バイオ分子を高い固定化密度で、立体障害を限りなく低減させつつ固定化し、アナライトとの相互作用を高感度で検出するシステムを固定化特性、構造安定性などの解析を通じて分子レベルからデザインする。

### (1) クッションタンパク質のリストアップおよびクローニング

クッション物質として機能し得ると考えられるタンパク質をコードする遺伝子をゲノムデータベース、PDB等から探索した。その際、構造安定性を考慮し、特に超好熱菌由

来のタンパク質から、単量体のTryptophan synthase alpha subunit (TrpA)および三量体のCutA1をリストアップした。各種超好熱菌のゲノムから遺伝子をそれぞれ単離し、サブクローニングを行った。

### (2) T7 ファージランダムペプチドライブラリーを用いた金表面親和性ペプチドのスクリーニング

構造が非常に小さく(直径約60 nm)、安定で、個々のアミノ酸出現比率の偏りが少ないT7ファージを用いて、ランダムペプチドライブラリーを構築した。構築したT7ファージライブラリー溶液を金板と接触させ、一定時間経過後、数回洗浄し、大腸菌BL21菌体懸濁液を添加し、感染・増幅させ、上清を回収した。これを1サイクルとし、5回程度繰り返した(バイオピング)。その後、ファージを単離し、ペプチドコーディング領域のDNAシーケンシングを行い、アミノ酸配列を決定した。

### (3) 金表面親和性ペプチドの評価・同定

各種金表面高親和性ペプチドをモデルタンパク質である *Archaeoglobus fulgidus* 由来 Esterase (EstAf)に連結させ、金表面固定化後の残存活性を測定した。また連結様式がそれぞれ異なる各種組換えEstAfも調製し、金表面固定化後の残存活性測定による機能維持効果を評価した。さらに、表面プラズモン共鳴法 (SPR) により金表面に対する親和性を系統的に調べた。

### (4) 表面親和性ペプチド連結クッションタンパク質の固定化特性および相互作用検出システムの検証

各種固体表面親和性ペプチドタグを候補クッションタンパク質中に様々な様式で組み込み、各種発現ベクターを構築した。これらのベクターを用いて、宿主とする大腸菌 Rosetta2 (DE3)株等を形質転換し、遺伝子を過剰発現させた後、精製した。調製した各種クッションタンパク質について、構造安定性などを調べ、その後 phi-PS あるいは金表面に固定化し、固定化量および親和性を評価した。そして、ELISA あるいは水晶振動子マイクロバランス法 (QCM) によりアナライトバイオ分子との相互作用検出量、検出感度などについて評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) クッションタンパク質の決定

固体表面親和性ペプチドおよび構造が安定なクッションタンパク質をスペーサーとして利用する新しいアイデアに基づいた標的バイオ分子の高度機能的固定化法を確立すべく、モデルクッションタンパク質である超好熱菌由来のTryptophan synthase alpha subunit (TrpA)の適用可能性について検討した。複数の超好熱菌ゲノムよりそれぞれTrpA遺伝子をクローニングし、各種組換えTrpAの発現、精製を行った。そして、精製タンパク質の耐熱性を指標に絞り込みを進め、最終的に*Pyrococcus furiosus*由来のTrpAの利用を決定した。続いて、TrpA 基盤構造( $\beta$ -barrel)の形成に関与しないと予想される $\alpha$ ヘリックスループ構造を利用して複数の部位・形態でリガンドペプチドの挿入を試みた。しかし、どの発現タンパク質の熱安定性も著しく損なわれたことから、TrpAをクッションタンパク質として用いることが困難であることがわかった。そこで新たに、耐熱性および構造安定性に優れるとされる超好熱菌由来の三量体タンパク質であるCutA1をリストアップし、その適用について検討した。超好熱菌*Pyrococcus furiosus*のゲノムよりCutA1遺伝子をクローニングし、組換えCutA1および表面親和性タグをC末端に連結した変異型CutA1をそれぞれ発現させたところ、いずれも高い熱安定性を有していた。さらに、表面親和性ペプチド連結部位(C末端)と反対方向に位置し、構造安定性への負荷が低いと考えられる部位へのリガンドバイオ分子(ペプチド)の挿入を試みた。その結果、発現 精製した変異型CutA1は熱安定性が維持されていたことから、十数残基程度のペプチドであれば、少なくともCutA1への挿入によって重大な構造変化を引き起こす可能性が低いことが示唆された。したがって、CutA1がクッションタンパク質として極めて有望であると結論づけた。

##### (2) 金表面親和性ペプチドの同定

一方、T7 ファージを用いて、ランダムペプチドライブラリーを構築した。ライブラリーにおける提示ペプチドは、ファージ表面における自由度を向上させるためのフレキシブ

ルリンカー(GGGS)を末端に挿入し、その下流に6残基のアミノ酸から構成されるランダム配列を配置する形とした。構築した T7 ファージライブラリー溶液を用いて、バイオパニングにより金表面親和性ペプチド(Au-tag)を提示するファージを計64クローン単離した。そして、それぞれの表層提示ペプチドをコードする領域の塩基配列を決定し、候補ペプチド配列を14種(Au1~14)決定した。得られた金表面高親和性候補ペプチドをモデルタンパク質である超好熱菌 *Archaeoglobus fulgidus* 由来 Esterase (EstAf)に連結させ、各種変異型 EstAf をそれぞれ調製し、金板固定化後の残存活性測定を行った(図1)。

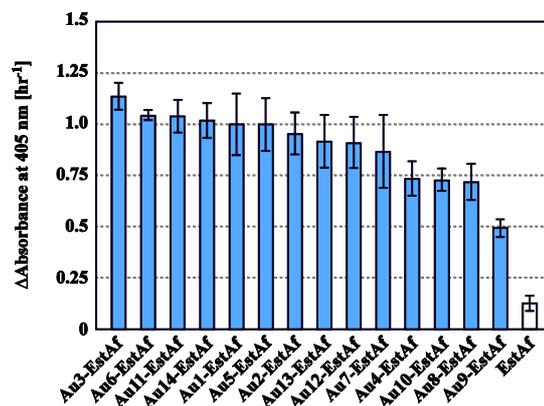


図1 各種 Au-tag 連結 EstAf 固定化後残存活性

その結果、Au-tag 連結 EstAf は EstAf に比べて、顕著に高い残存活性を示した。また、表面プラズモン共鳴法(SPR)による吸着特性解析を行った結果、Au3-tag 連結 EstAf が優れた吸着動力学パラメータを示したことから、固定化後残存活性測定結果と併せて、Au3-tag を金表面親和性ペプチドとして同定した。さらに、この Au3-tag について、連結様式がそれぞれ異なる各種組換え耐熱性 Esterase (EstAf)を調製し、金表面固定化後の残存活性測定による機能維持効果を評価した。その結果、タグ連結末端の差異、タンデム化などにより残存活性に違いが見られ、固定化の配向性による構造変化の影響や固定化様式の違いが示唆された。さらに、SPR を用いて固定化特性を調べ(図2)、吸着動力学パラメータを決定し、比較評価を行った。その結果、Au3-tag の連結により、EstAf の金表面への親和性が向上すること、および Au3-tag 連結 EstAf の濃度に依存した固定化形態のシフトが強く示唆された。これらの検討を通じて6

アミノ酸残基からなる Au<sub>3</sub> が金表面への高い親和性を有するだけでなく、タンデム化などを通じて固定化後の機能向上が図れることがわかった。

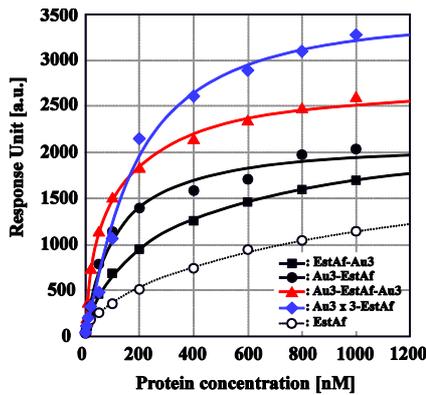


図2 Au-tag 連結様式の異なる各種 EstAf の金表面への固定化特性

### (3) リガンドバイオ分子固定化形態のデザインおよび相互作用検出

前述の通り、各種組換えCutA1を調製したところ、リガンドペプチドを構造内に束縛した状態で挿入しても、発現タンパク質の構造安定性が十分に維持されていた。したがって、CutA1を用いることにより、リガンドペプチドの自由度を制限し、エントロピーを低減させ、アナライト分子との結合自由エネルギー的に有利となる相互作用検出システムが構築できると考えた。さらに、空間的な配置も考慮し、立体障害を低減すべく、人工コイルドコイル構造へのリガンドペプチドの挿入も試みた。具体的には相互作用力の弱いStrepTagII (STII) - Streptavidin (SA)あるいはStreptactin (ST)間(解離定数はそれぞれ $K_d = 72 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$ )を検出モデルとした。相互作用検出システムの検証はphi-PS上ではSandwich ELISA、金表面上ではQCMにより行った。その結果、PS-tagにリガンドペプチドを連結させて固定化した場合には検出できなかったSTII-SA間相互作用をPS-tag連結CutA1を用いることで検出することができた。STII-ST間相互作用に関して、PS-tag連結CutA1を介してSTIIを固定化することにより、顕著に高い感度で相互作用が検出された(図3)。これらいずれについても、スペーサーの挿入あるいはコイルドコイル

構造中への挿入により、検出感度はさらに向上した。また、金表面上でのSTII-SA間相互作用の検出についても、Au-tag連結CutA1を介した固定化により感度は顕著に増加した。

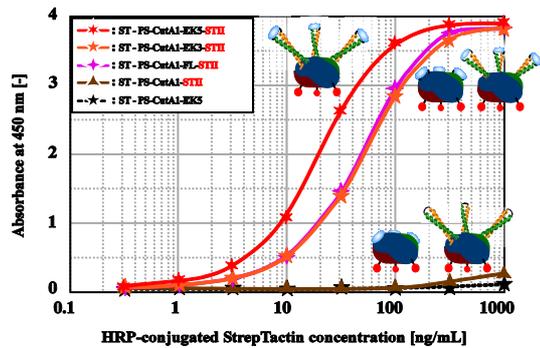


図3 CutA1を用いて固定化した各種STIIとSTとの相互作用検出

以上の結果より、クッションタンパク質CutA1を用いて、同じ配列のリガンドペプチドを異なる形態で提示(固定化)させることによって、様々な固体表面上において顕著なバイオ分子間相互作用検出の高感度化が可能であることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計12件)

H. Imanaka, M. Ishimaru, T. Fujii, N. Ishida and K. Imamura, Influence of Conformational Constraint and Spatial Arrangement of Ligand Peptide on the Detection of Peptide-Protein Interaction, Young Asian Biochemical Engineers' Community 2014, 2014年11月07日, 嘉義市, 台湾

松下瑠奈, 石田尚之, 今村維克, 今中洋行, CS 複合体形成をモデルとした高感度ペプチド-タンパク質間相互作用検出系のデザイン, 第52回日本生物物理学会年会, 2014年9月26日, 札幌

松下瑠奈, 石田尚之, 今村維克, 今中洋行, ペプチド-タンパク質間相互作用を制御する因子の検討, 第46回化学工学会秋季

大会, 2014 年 09 月 17 日, 福岡・九州大学

今中洋行, バイオ分子と固体材料をつなぐ, 農芸化学会中四国支部第 17 回若手シンポジウム, 2014 年 5 月 16 日, 岡山・岡山大学

今中洋行, 石丸実季, 藤井崇史, 石田尚之, 今村維克, ペプチド - タンパク質間相互作用検出に及ぼすリガンドペプチド束縛の影響, 化学工学会 第 79 回年会, 2014 年 3 月 20 日, 岐阜・岐阜大学

重森陽士郎, 石田尚之, 今村維克, 高橋裕一郎, 今中洋行, 新規金表面親和性ペプチドの同定及びタンパク質固定化への応用, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 09 月 20 日, 広島

今中洋行, 重森陽士郎, 松下瑠奈, 瀧本貴之, 今村維克, 固体材料親和性ペプチドタグを用いた機能的バイオ分子固定化技術の開発とその応用, 化学工学会 第 45 回秋季大会, 2013 年 09 月 16 日, 岡山・岡山大学

H. Imanaka, R. Matsushita, T. Takimoto, T. Kunikata, K. Imamura, and K. Nakanishi, Utilization of hydrophilic polystyrene affinity peptide for functional biomolecular immobilization and effective site specific peptide binder screening, 23rd American Peptide Symposium, 2013 年 06 月 23 日, ハワイ (アメリカ合衆国)

重森陽士郎, 今村維克, 高橋裕一郎, 今中洋行, 金表面親和性ペプチドを用いた機能的タンパク質固定化, 日本農芸化学会中四国支部第 36 回講演会, 2013 年 06 月 08 日, 島根・島根大学

松下瑠奈, 石田尚之, 今村維克, 今中洋行, CS 複合体形成をモデルとしたバイオ分子間相互作用に及ぼすリガンド固定化の影響, 化学工学会 第 78 年会, 2013 年 03 月

17 日, 大阪・大阪大学

重森陽士郎, 吉田香織, 石田尚之, 今村維克, 今中洋行, 高橋裕一郎, 新規金表面親和性ペプチドのスクリーニングおよび結合特性解析評価, 化学工学会 第 78 年会, 2013 年 03 月 17 日, 大阪・大阪大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今中 洋行 (IMANAKA HIROYUKI)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教  
研究者番号: 10379711