

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630385

研究課題名(和文) タンパク質提示金ナノ粒子の大腸菌細胞質内調製法の開発

研究課題名(英文) Enzymatic fabrication of protein-decorated gold nanoparticles in Escherichia coli

研究代表者

神谷 典穂 (Kamiya, Noriho)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50302766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：機能を持ったタンパク質がその表面に固定化された金ナノ粒子(AuNP)は、基礎科学からバイオテクノロジーに至る幅広い分野で利用されているナノ材料である。本研究では、酵素触媒により金ナノ粒子を調製する新たな手法に基づき、機能性タンパク質がその表面に提示されたAuNPを、生体内で一段階合成することを目標とした。具体的には、グリセロールデヒドロゲナーゼ(GLD)に金結合性ペプチドと抗体結合タンパク質(pG)を融合した組換えタンパク質をコードする遺伝子で形質転換された大腸菌を金イオンとグリセロールの共存下で培養することで、抗体結合能を有するpGが提示されたAuNPを細胞質内に得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we explored a new approach for the biofabrication of protein-decorated gold nanoparticles (AuNP) by glycerol dehydrogenase (GLD) enzyme with gold-binding peptide-tagged recombinant proteins. The formation of AuNP was achieved via the GLD-catalyzed reduction of NAD to NADH with glycerol as a substrate. In the presence of the fusion protein comprised of protein G (pG) and a gold-binding peptide (GBP), the catalytic cofactor reduction resulted in the efficient in situ fabrication of AuNP immobilized with the fusion protein. Next, we designed a GLD fusion protein tagged with both pG and GBP. The recombinant pG-GLD-GBP protein promoted the synthesis of AuNP, and the pG moiety was self-displayed on the AuNPs with the protein G's binding capability for IgG antibody. Finally, we confirmed that an engineered E. coli harboring the pG-GLD-GBP fusion protein could produce AuNP decorated with functional pG, suggesting the possibility of in vivo fabrication of functional AuNPs.

研究分野：生体分子工学

キーワード：蛋白質 金ナノ粒子 生体触媒 補酵素 酸化還元酵素 ナノバイオ イムノクロマト 抗体

1. 研究開始当初の背景

金ナノ粒子(AuNP)は、ナノ及びバイオテクノロジー分野において、基礎から応用に至る幅広い領域で研究対象とされている基盤材料である。特に様々な機能性タンパク質が固定化された AuNP は、ナノバイオ分野における分子集合素子として注目されている。一般的に、タンパク質修飾 AuNP は、AuNP の合成と、タンパク質合成の反応場が相容れないため、化学的手法で調製された AuNP と、金表面に親和性を有するタンパク質を混合することで、AuNP 表面に目的タンパク質を固定化する手法が採用される。しかしながら、このような物理的吸着に基づく方法では、AuNP に対して配向性を持ってタンパク質を固定化することは一般に困難であった。そこで、目的タンパク質の配向性を担保可能な AuNP の新たな調製法の開発に着手した。

2. 研究の目的

AuNP 上に固定化されたタンパク質の配向性を担保する手段の1つとして、金表面に親和性を有するペプチドタグを、遺伝子工学的手法により目的タンパク質に導入する方法が提案されている。即ち、化学的手法で調製した AuNP と、上述の方法で得た目的タンパク質をそれぞれ別個に調製し、これらをハイブリッド化する2段階調製法により、AuNP に配向性を持ってタンパク質を固定化可能なことが示されている。本研究では、申請者らが開発した酵素触媒による AuNP 合成法を採用することで、大腸菌細胞質での AuNP 合成と金結合性を付与したタンパク質の発現を同一反応場で行うことにより、目的タンパク質がその表面に配向を持って提示された AuNP の‘細胞質内一段階合成法’の確立に挑戦した。本研究の最終目標を図1に示す。

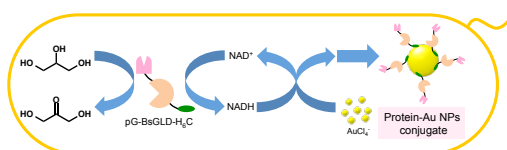


図1 大腸菌細胞質内での酵素反応を介したタンパク質修飾金ナノ粒子合成スキーム

3. 研究の方法

(1) グリセロールデヒドロゲナーゼ(GLD)触媒による AuNP 合成を介したタンパク質修飾 AuNP の *in vitro* 合成法

GLD が触媒する補酵素 NAD の還元反応場に、金結合性ペプチドを融合した抗体結合タンパク質(pG)、金イオン、グリセロールを共存させ、抗体結合能を有する AuNP の調製を試みた。具体的には、バルク金表面に親和性を示すことが報告されている A3 ペプチドを pG に融合した組換えタンパク質(pG-A3)を調製し、GLD 触媒による金ナノ粒子の合成過程で、pG-A3 が表面に提示された AuNP の調製と、表面提示タンパク質の機能性について抗体結合能を指標に評価した。

(2) 触媒部位と機能部位を連結した融合タンパク質(pG-GLD)による *in vitro* AuNP 合成

新規融合タンパク質 pG-GLD を設計し、これに金結合性ペプチドを付加した融合タンパク質を調製した。得られた組換えタンパク質を(1)と同条件下に供し、GLD 部位が AuNP 合成を触媒し、且つ得られた AuNP 上に自己犠牲的に pG を提示する系の構築について検討した。

(3) 新規 pG-GLD 融合タンパク質による *in vivo* タンパク質修飾 AuNP 合成

最適化された金結合性ペプチド融合 pG-GLD をコードする遺伝子により形質転換された大腸菌を調製し、金イオンとグリセロールの共存下、組換え大腸菌を培養することにより、抗体結合能を有する AuNP の生細胞内一段階調製の可能性を評価した。

4. 研究成果

(1) GLD 触媒によるタンパク質修飾 AuNP の *in vitro* 合成法の確立

まず、GLD 触媒による pG-A3 提示 AuNP の調製を試みたところ、抗体結合能が維持された AuNP の調製に成功した。AuNP 表面に提示されたタンパク質組成を評価したところ、意外なことに AuNP 合成の触媒として添加した GLD そのものが相当量固定化されていることが明らかとなった。AuNP 上に提示されたタンパク質種の詳細な評価の結果、GLD の精製用に融合発現したヘキサヒスチジンタグ(His-tag)が AuNP 表面と比較的高い親和性を示すことが明らかとなった。また、His-tag の C 末端に Cys を1残基付加すると、目的タンパク質を AuNP 上へより強固に固定化可能なことを確認した。

(2) 新規融合タンパク質の設計による1タンパク質成分での *in vitro* AuNP 合成

細胞質内には多種多様な生体分子が共存する。そこで、抗体結合部位、酵素部位、金親和性部位を併せ持つ融合タンパク質を設計することで、1種類のタンパク質成分で AuNP の調製を可能にする系の構築を試みた。具体的には、pG-GLD の C 末端に His₆Cys タグを付加した融合タンパク質(pG-GLD-His₆Cys)を設計し(図2)、大腸菌による発現、精製を行い、試験管内で AuNP の調製を試みた。その結果、得られた AuNP は抗体結合能を示し、当該融合タンパク質が自己犠牲的に AuNP 上へ目的タンパク質を提示する一段階調製法の概念実証を達成した。

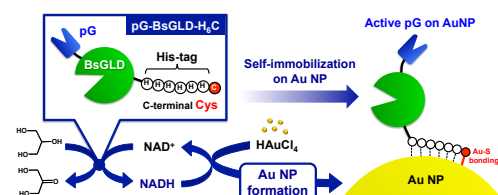


図2 1種類の融合タンパク質によるタンパク質修飾金ナノ粒子合成スキーム

(3) 新規融合タンパク質による組換え大腸菌内でのタンパク質修飾 AuNP 合成の試み

最後に、前述のスキームが、細胞質内でも機能するか確認した。pG-GLD-His₆Cys 遺伝子がコードされたプラスミドベクターで形質転換された大腸菌を準備し、これを金イオンとグリセロールの共存下で培養した。72 時間後に大腸菌を回収し、細胞破碎処理を施し、可溶性画分と不溶性画分に分離したところ、前者に AuNP 由来のプラズモン吸収が確認された (図 3 (i))。GLD の誘導発現を抑制した条件、ならびにグリセロールの外部添加無しの条件下では、特異的な吸収が確認されず、赤みがかかった呈色も観察されなかったことから (図 3 (ii~iv))、GLD 触媒系が生細胞内で機能することにより、AuNP が生合成されたことが示唆され、タンパク質修飾 AuNP の細胞質内での一段階調製が可能なが示唆された。

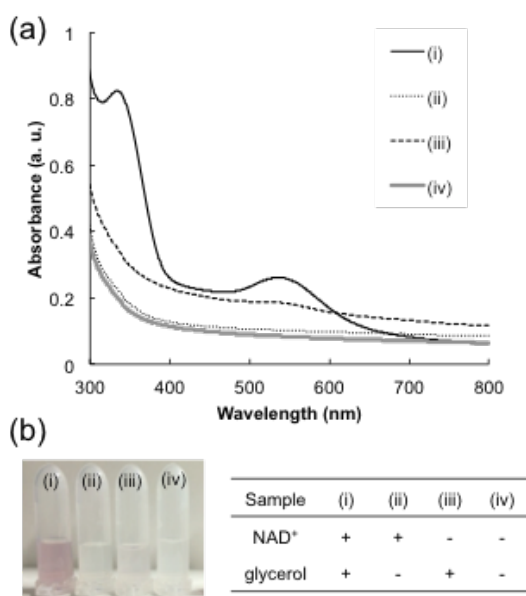


図2 大腸菌細胞質内での酵素反応を介したタンパク質修飾金ナノ粒子の合成. (a) (i)-(iv)の異なる培養条件下、組換え大腸菌で調製された金ナノ粒子の UV-vis.スペクトル. (b) 37°C, 72 時間培養後に得られた金ナノ粒子溶液の写真.

次に、得られた可溶性画分から、遠心分離、洗浄、限外ろ過による非特異吸着タンパク質の除去を経て、AuNP を精製した。AuNP 表面に提示されたタンパク質種を確認したところ、目的タンパク質が優先的に固定化されていることを示唆する結果を得た。

最後に、精製 AuNP を用いた固相免疫測定系を構築し、抗原検出能を評価したところ、pG 部位に由来する抗体結合能を有し、且つ、複合化した抗体の対象抗原を検出可能なことが明らかとなった。以上のことから、本研究で提案したシステムにより、免疫クロマト等の診断試薬として利用可能な AuNP を、簡便な培養操作により直接得ることが可能なことを明らかにした。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Teppei Niide, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, 'Enzymatic self-sacrificial display of an active protein on gold nanoparticles.', RSC Advances, 査読有, vol.4, 5995-5998 (2014)
DOI: 10.1039/C3RA46384B

② Teppei Niide, Kojiro Shimojo, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, 'Enzymatic fabrication of protein-decorated gold nanoparticles by the aid of artificial peptides with gold-binding affinity.', Langmuir, 査読有, vol.29, 15596-15605 (2013)
DOI: 10.1021/la401327h

[学会発表] (計 11 件)

①細縦侑貴穂、二井手哲平、久保田富生子、後藤雅宏、神谷典穂、'大腸菌内での金ナノ粒子の合成とその表面修飾による高機能化'、化学工学会 第 80 年会, 2015 年 3 月 19-21 日「芝浦工業大学 (東京都・江東区)」

②Noriho Kamiya, Kousuke Moriyama, Teppei Niide, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, 'Potential use of oxidoreductases for the fabrication of biomaterials', Active Enzyme Molecule 2014, 2014 年 12 月 18-19 日「富山国際会議場 (富山県・富山市)」

③ Yukiho Hosomomi, Teppei Niide, Rie Wakabayashi, Fukiko Kubota, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, 'Enzyme-catalyzed formation of gold nanoparticle by *Escherichia coli*', The 27th International Symposium on Chemical Engineering, 2014 年 12 月 5-7 日「Kuala Lumpur (Malaysia)」

④Noriho Kamiya, Kousuke Moriyama, Teppei Niide, Rie Wakabayashi and Masahiro Goto, 'Enzyme as a Catalytic Tool for Fabrication of Biomaterials', The 13th China-Japan-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, 2014 年 11 月 16-20 日「Jeju (Korea)」

⑤Noriho Kamiya, Teppei Niide, Masahiro Goto, 'Self-sacrificial display of an active protein on gold nanoparticles', YABEC 2014, 2014 年 11 月 6-8 日「Chiayi (Taiwan)」

⑥Noriho Kamiya, 'Biomolecular assembly by enzymatic conjugation and scaffolding', 2014 KSBB Spring Meeting and

International Symposium, 2014年4月9-11日「Gyeongju (Korea)」

⑦ Teppei Niide, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, 'Enzymatic fabrication of protein-gold nanoparticle conjugates by a one-pot, one-protein-component system', Korea-Japan Smart Biodesign WS, 2014年1月21日「東北大学(宮城県・仙台市)」

⑧ 二井手哲平、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂、'酵素反応を利用したタンパク質修飾金ナノ粒子の一段階合成' 酵素工学研究会 第70回講演会, 2013年10月25日「東京大学(東京都・文京区)」

⑨ Teppei Niide, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, 'Enzymatic synthesis of protein-gold nanoparticle conjugates: Stable immobilization by artificial peptide-tag for gold surface', Enzyme Engineering XXII Conference, 2013年9月22-26日「富山国際会議場(富山県・富山市)」

⑩ Teppei Niide, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, 'Enzymatic production of protein-gold nanoparticle conjugates; stable immobilized by artificial peptide tag with gold binding affinity', IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, 2013年9月1-3日「名古屋大学(愛知県・名古屋市)」

⑪ Teppei Niide, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, 'Biocatalytic synthesis of protein-decorated gold nanoparticles', YABEC 2013, 2013年8月7-9日「Urumqi (China)」

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: Method of Producing Metal Nanoparticles Decorated with a Protein

発明者: 神谷典穂、二井手哲平

権利者: 国立大学法人 九州大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-264657

出願年月日: 平成 25 年 12 月 20 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.kyushu-u.ac.jp/~kamiya/CFC-BT/Welcome.html>

JST-ALCA 新技術説明会(バイオ分野)にて本

成果の一部を発表。(平成 27 年 2 月 17 日)

(公社)新化学技術推進協会 JACI 第1回学産交流ポスターセッションにて本成果を発表。(平成 26 年 10 月 30 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 典穂 (KAMIYA, Noriho)

九州大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号: 50302766