

令和元年5月28日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05370

研究課題名(和文)人工結合タンパク質を基盤としたプライベートシャペロンシステムの再構築

研究課題名(英文)Reconstitution of private chaperone systems using synthetic binding proteins

研究代表者

安井 典久(Yasui, Norihisa)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90467514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プライベートシャペロンのフォールド特異的な基質タンパク質認識と、分子シャペロン機能の相関関係を明確にすることを目的に、プライベートシャペロンの基質タンパク質に特異的に結合する人工結合タンパク質の作製基盤の構築に取り組んだ。一本鎖モネリンを非抗体分子骨格とする人工結合タンパク質の大規模なファージディスプレイライブラリーを設計・作製した。その選別により、モデル標的タンパク質であるGFPuvに結合する人工結合タンパク質(GBP-1)を作製した。GBP-1の分子特性解析を実施した結果、一本鎖モネリンが人工結合タンパク質の非抗体分子骨格として有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ファージディスプレイライブラリーの作製とその選別により検討を重ねた結果、一本鎖モネリンを非抗体分子骨格として利用すると、標的分子に親和性を示す人工結合タンパク質を作製できることを示した。本研究で構築した一本鎖モネリンを非抗体分子骨格とする人工結合タンパク質ライブラリーは、プライベートシャペロンの機能解析に留まらず、様々な研究で利用することができる点でも意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, to clarify the correlation between the fold-specific substrate recognition and the function of the private chaperones, the system for generation of the synthetic binding proteins that specifically bind to the target proteins has been developed. The phage display libraries of the synthetic binding proteins using single-chain monellin as a non-antibody molecular scaffold were designed and constructed. By sorting the phage display libraries against the green fluorescent protein variant (GFPuv), the synthetic binding protein that has the ability to bind to GFPuv (GBP-1) was generated. The characteristics of GBP-1 revealed in this study indicate that single-chain monellin is useful as a non-antibody molecule backbone of the synthetic binding proteins.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：人工タンパク質 タンパク質 進化分子工学 合成生物学 分子シャペロン 一本鎖モネリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くのタンパク質は、それらの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、多様な種類のタンパク質の構造形成を助けるものと、特定のフォールドを持ったタンパク質に特異的に作用するものが知られている。後者は、プライベートシャペロンと総称されている。これまで、プライベートシャペロンの機能は、主として、基質となるタンパク質との相互作用解析と、遺伝学的解析で研究されてきた。プライベートシャペロンを欠失させると、それら基質タンパク質のフォールディング異常や細胞外への分泌不全が起こることから、プライベートシャペロンは、基質タンパク質の成熟化に必須な因子であると推定されている。このような、遺伝学的アプローチは、プライベートシャペロンと基質タンパク質間相互作用の「消失」に基づいているため、(i) シャペロンとしての機能発現の実態が基質タンパク質との特異的な結合であると直接証明されておらず、(ii) プライベートシャペロンが基質タンパク質の構造形成・分泌に必須ではあっても、単独で必要かつ十分な因子であるのか否かを解明できない、という問題が残されている。

2. 研究の目的

上述のような従来の研究手法の限界のために、プライベートシャペロンの基質タンパク質結合とシャペロン機能の相関関係を明確にするためには、これまででない新しいアプローチが必要である。そこで本研究では、人工結合タンパク質を利用した構造的なアプローチにより、問題を解決することを目指した。具体的なプライベートシャペロンとその基質タンパク質のペアとして、(i) heat shock protein 47 (HSP47) とコラーゲン、(ii) receptor-associated protein (RAP) と low-density lipoprotein (LDL) 受容体の LA モジュール、および、(iii) mesoderm development candidate (MESD) と LDL 受容体の β -プロペラドメインをとりあげ、基質タンパク質への特異的結合能と細胞内シャペロン機能を併せ持つ人工結合タンパク質を作製すること、すなわち、プライベートシャペロンと基質タンパク質の機能的なペアを新たに創り、特異的な基質結合とシャペロン機能の相関関係を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ファージディスプレイライブラリーの作製

非抗体分子骨格の候補となるタンパク質ドメインを M13 ファージ表面に提示させる目的で、ファージミドの設計と作製を行った。ファージミドの設計は、参考文献の記述に従って実施した。非抗体分子骨格のライブラリーの作製は、Kunkel 法に基づいて行ない、基本的に参考文献の記述に従った。

(2) ファージディスプレイライブラリーのモデル標的タンパク質に対する選別

Green fluorescent protein 変異体 (GFPuv) と yeast small ubiquitin-like modifier (ySUMO) にビオチン化タグ (Avi-Tag) を付加した組換えタンパク質を大腸菌で発現・ビオチン化させて精製し、標的タンパク質サンプルとした。ビオチン化標的タンパク質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化し、これに結合するファージ粒子を回収し、回収したファージを大腸菌に再感染させ増幅した。増幅させたファージを用いて次のラウンドの選別を行った。4 から 5 ラウンドの選別を実施した。ライブラリーの選別後、個別のクローンごとにファージを作製し、enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) 法により、標的タンパク質に結合するクローンを同定した。

(3) GFPuv および ySUMO に結合する一本鎖モネリン変異体の発現、精製および性状解析

得られた GFPuv および ySUMO に結合する一本鎖モネリン変異体について、それらの遺伝子を pET25b に組み込んだ発現ベクターを作製し、大腸菌 BL21 (DE3) 株で発現させた。可溶性画分から、固定化金属アフィニティークロマトグラフィーにより目的タンパク質を精製した。精製したタンパク質について、ゲルろ過クロマトグラフィーで溶液挙動および標的タンパク質との相互作用の有無を解析した。

(4) GFPuv に結合する一本鎖モネリン変異体 (GBP-1) の性状解析

GFPuv に結合することが確認された一本鎖モネリン変異体 (GBP-1) について、以下の性状解析を実施した。

表面プラズモン共鳴測定により、GFPuv との相互作用を定量的に解析した。
GFPuv との共結晶化を行い、共結晶構造を決定した。

4. 研究成果

(1) 非抗体分子骨格の設計

はじめに、人工結合タンパク質作製基盤の構築を目指して、新規な人工結合タンパク質の非抗体分子骨格の設計とその選別に取り組んだ。人工結合タンパク質の非抗体分子骨格として、(i) chitinase A1 のキチン結合ドメイン (ChBD)、(ii) keap-1 の kelch repeat ドメイン (KRD)、および (iii) シスタチン様フォールドを持つ一本鎖モネリンを候補とした。すべての候補について、M13 ファージ粒子表面上に提示されていることを ELISA 法により確認した。

ChBD については、2本のループ長を変化させ、アミノ酸配列をランダム化したライブラリーを設計し、サイズが $\sim 1 \times 10^{10}$ のファージディスプレイライブラリーを作製した。次いで、GFPuv と ySUMO をモデル標的タンパク質として用い、ファージディスプレイライブラリーの選別を行った。しかし、これらモデル標的タンパク質に親和性を示す ChBD 変異体を得ることができなかった。KRD については、 β -propeller フォールドの頂点に位置する6本のループのアミノ酸配列をランダム化させたファージディスプレイライブラリーを作製した(ライブラリーサイズ: $\sim 3 \times 10^8$)。これについても GFPuv と ySUMO に対して、ライブラリーの選別を行ったが、GFPuv と ySUMO に結合する KRD 変異体を得ることはできなかった。

(2) 一本鎖モネリンを非抗体分子骨格とする人工結合タンパク質のファージディスプレイライブラリーの作製とその選別

一本鎖モネリンを非抗体分子骨格として用い、次の2種類のファージディスプレイライブラリーを設計・作製した。

一本鎖モネリンの2本のループのアミノ酸配列を NNK コドンの使用により20種類のアミノ酸残基でランダム化させたファージディスプレイライブラリーを作製した(ライブラリーサイズ: $\sim 1 \times 10^9$)。そしてこのライブラリーを GFPuv と ySUMO に対して選別したところ、ELISA 法において GFPuv および ySUMO それぞれに対して結合活性を示す一本鎖モネリン変異体を取得できた。

より高効率に標的タンパク質に結合する人工結合タンパク質を作製するために、一本鎖モネリンの2本のループのアミノ酸配列を、アミノ酸組成に偏りを持たせてランダム化させたファージディスプレイライブラリーを作製した(ライブラリーサイズ: $\sim 2 \times 10^9$)。具体的なアミノ酸組成については、参考文献を参考にして決定した。

(3) GFPuv および ySUMO に結合する一本鎖モネリン変異体の発現、精製および性状解析

ファージディスプレイライブラリーの選別によって得られた GFPuv および ySUMO それぞれに結合する一本鎖モネリン変異体について、大腸菌で組換えタンパク質を発現させて精製した。40 mL 培養スケールの大腸菌の可溶性画分から、数 mg の精製サンプルを得ることができた。(i) 精製した一本鎖モネリン変異体のすべてについて溶液挙動がよいこと、(ii) それらの内の複数の一本鎖モネリン変異体については標的モデルタンパク質に親和性を示すこと、がゲルろ過クロマトグラフィーによる解析により明らかになった。

(4) GFPuv に結合する一本鎖モネリン変異体の性状解析

上述の(3)において、GFPuv に結合することが確認できた一本鎖モネリン変異体(GBP-1)について、より詳細に性状解析を行った。表面プラズモン共鳴測定により、GFPuv と GBP-1 の相互作用を定量的に解析した結果、結合速度定数と解離速度定数ともに大きな相互作用であることが判明し、解離定数を $\sim 20 \mu\text{M}$ と見積もった(図1)。また、GFPuv/GBP-1 複合体の共結晶構造解析を行った。その結果、GBP-1 は設計した通り、アミノ酸配列をランダム化させた2本のループを用いて GFPuv を認識していることが明らかになった(図2)。

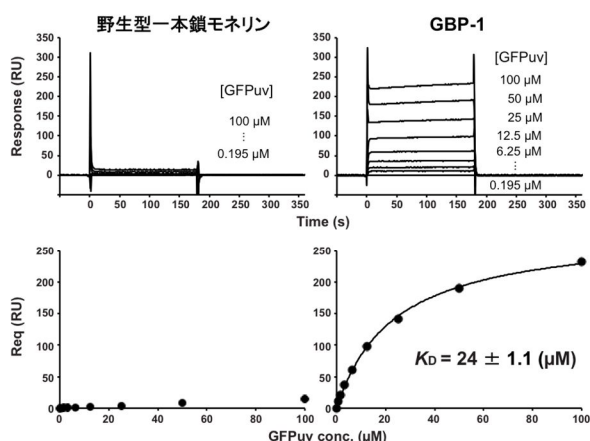


図1. 表面プラズモン共鳴測定によるGFPuvとGBP-1の相互作用解析

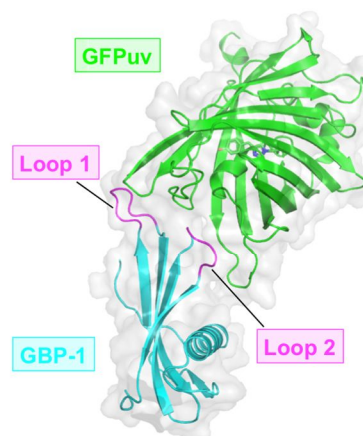


図2. GFPuv/GBP-1複合体の共結晶構造

(5) コラーゲン I に対するファージディスプレイライブラリーの選別の試み

ウシ真皮由来のコラーゲン I を担体に固定化し、これを用いて、(2) で作製したファージディスプレイライブラリーの選別を行った。しかしながら、コラーゲン I に結合する一本鎖モネリン変異体の取得には至らなかった。

(6) LDL 受容体細胞外ドメインの組換えタンパク質発現系の構築

ファージディスプレイライブラリーの選別に利用するために、LDL 受容体細胞外領域の各ド

メインをヒト成長ホルモン融合タンパク質として、HEK293T 細胞において分泌発現させる系を確立した。LA モジュールからなる断片の組換えタンパク質については、RAP との相互作用を共沈降実験により確かめることができ、組換えタンパク質の品質に問題がないことが示唆された。

(7) 一本鎖モネリンを非抗体分子骨格とする人工結合タンパク質のファージディスプレイライブラリーの改良・高度化

一本鎖モネリンが人工結合タンパク質の非抗体分子骨格として有望であると考えられたので、ファージディスプレイライブラリーの改良・高度化を実施した。(2) - のファージディスプレイライブラリーでは、一本鎖モネリン中の 2 本のループ長が固定されており、標的分子との相互作用様式に制限が生じる可能性があった。そこで、一本鎖モネリンの 2 本のループのアミノ酸配列をアミノ酸組成に偏りも持たせてランダム化し、かつ長さを多様化させたファージディスプレイライブラリーを設計・作製することにした。サイズが $\sim 7 \times 10^{10}$ にもおよぶファージディスプレイライブラリーを作製することに成功した。今後、このファージディスプレイライブラリーを利用することにより、コラーゲンや LDL 受容体細胞外領域の各ドメインを含む様々な標的タンパク質に親和性を示す人工結合タンパク質の作製効率が、大きく向上することが期待される。

<引用文献>

- Wojcik J, Hantschel O, Grebien F, Kaupe I, Bennett KL, Barkinge J, Jones RB, Koide A, Superti-Furga G, Koide S (2010) A potent and highly specific FN3 monobody inhibitor of the Abl SH2 domain. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**, 519-527.
- Sidhu SS, Weiss GA (2004) Constructing phage display libraries by oligonucleotide-directed mutagenesis. In *Phage Display—A Practical Approach*, T. C, H.B. L (eds), pp 27–41. Oxford, UK: Oxford University Press

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

- Nakatani, T.[‡], Yasui, N.^{‡,*}, Tamura, I., Yamashita, A.* (2019) Specific modification at the C-terminal lysine residue of the green fluorescent protein variant, GFPuv, expressed in *Escherichia coli*. *Sci Rep.* **9**:4722 ([‡]co-first author, *co-corresponding author). [査読あり]
DOI: 10.1038/s41598-019-41309-8
- Hirai, H.* , Yasui, N.* , Yamashita, K., Tabata, S. Yamamoto, M., Takagi, J., Nogi, T. (2017) Structural basis for ligand capture and release by an endocytic receptor ApoER2. *EMBO Rep.* **18**, 982-999 (*co-first author). [査読あり]
DOI: 10.15252/embr.201643521
- Nuemket, N.* , Yasui, N.* , Kusakabe, Y., Nomura, Y., Atsumi, N. Akiyama, S., Nango, E., Kato, Y., Kaneko, M.K., Takagi, J., Hosotani, M., Yamashita, A. (2017) Structural basis for perception of diverse chemical substances by T1r taste receptors. *Nat Commun.* **8**, 15530 (*co-first author). [査読あり]
DOI: 10.1038/ncomms15530
- Nango, E., Akiyama, S., Maki-Yonekura, S., Ashikawa, Y., Kusakabe, Y., Krayukhina, E., Maruno, T., Uchiyama, S., Nuemket, N., Yonekura, K., Shimizu, M., Atsumi, N., Yasui, N., Hikima, T., Yamamoto, M., Kobayashi, Y., Yamashita, A. (2016) Taste substance binding elicits conformational change of taste receptor T1r heterodimer extracellular domains. *Sci Rep.* **6**: 25745. [査読あり]
DOI: 10.1038/srep25745

[学会発表](計 15 件)

- 吉田 涼希, 安井 典久, 山下 敦子; 表面プラズモン共鳴法による味覚受容体 T1R 細胞内 C 末端領域とカルシウム結合タンパク質の相互作用の速度論的解析, 第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2018 年 11 月 30 日 . (3P-0078)
- 安井 典久, 山下 敦子; 分子骨格として一本鎖モネリンを用いた GFP を標的とする人工結合タンパク質の作製とその分子特性解析, 第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2018 年 11 月 30 日 . (3P-0724)
- 吉田 高志, 安井 典久, 渥美 菜奈子, 山下 敦子; サーマルシフトアッセイによる味覚受容体細胞外領域に対するアミノ酸の結合解析, 第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2018 年 11 月 28 日 . (1P-0061)
- 安井 典久, 山下 敦子; 一本鎖モネリンを分子骨格とする人工結合タンパク質ファージディスプレイライブラリーの構築, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 新潟, 2018 年 6 月 26 日 .
- 平澤輝一, 安井典久, 山下敦子; カルシウム感知受容体リガンド結合領域の結晶構造解析, 第 95 回日本生理学会大会, 香川, 2018 年 3 月 28 日. (1P-053)

安井 典久; キチン結合ドメインを分子骨格とする人工結合タンパク質ファージディスブ

レイブラリー製の作製, ConBio2017, 神戸, 2017年12月6日. 1P-1366

Yohei Kono, Norihisa Yasui, Hisao Moriya, Atsuko Yamashita; "Attempt for recombinant expression of the extracellular domains of human T1R taste receptors" The 16th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (ISMNTOP2017), 2017年11月3日. (ISP-07)

Nipawan Nuemket, Norihisa Yasui, Yuko Kusakabe, Yukiyo Nomura, Nanako Atsumi, Atsuko Yamashita "Crystal structures of the ligand-binding domains of taste receptor T1r heterodimer" The 16th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (ISMNTOP2017), 2017年11月3日. (IS4-2)

渥美 菜奈子, 安井 典久, 山下 敦子; X線結晶構造解析によるメダカ T1r2a/T1r3 細胞外領域への無機金属イオン結合解析, 日本味と匂学会第51回大会, 神戸 2017年9月26日. P-001

Hiroki Maruhashi, Daisuke Noshiro, Norihisa Yasui, Toshio Ando, Atsuko Yamashita; Expression, purification, and characterization of the entire heterodimeric extracellular regions of fish taste receptor, 第55回日本生物物理学会年会, 熊本, 2017年9月21日. 3Pos038

岩谷 達, 安井 典久, 山下 敦子; マウス由来フェロモン受容体V2R細胞外領域の昆虫培養細胞による組換え発現, 日本農芸化学会2017年度大会, 京都, 2017年3月19日.

Nanako Atsumi, Yukiyo Nomura, Maude W. Baldwin, Norihisa Yasui, Atsuko Yamashita; Fish taste receptor type 1 (T1R) extracellular domains exhibit broad specificity for ligand binding, The 15th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, Fukuoka, Japan, December 4, 2016.

安井 典久, 中谷 隆寛, 山下 敦子; 大腸菌組換え発現した GFP で見いだされる C 末端 Lys 残基の翻訳後修飾, 第39回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016年12月1日.

伊藤 愛優美, 安井 典久, Nipawan Nuemket, 山下 敦子; 味覚受容体 T1R 細胞内領域と Ca²⁺結合タンパク質の相互作用に関する研究, 日本薬学会第136回年会, 横浜, 2016年3月29日.

平井 秀憲, 安井 典久, 田畑 早苗, 山下 恵太郎, 山本 雅貴, 高木 淳一, 禾 晃和; ApoER2細胞外領域 - リガンド複合体が明らかにする LDLR ファミリーのリガンド認識メカニズム, 第15回蛋白質科学学会年会, 徳島, 2015年6月26日.

〔図書〕(計1件)

Nogi T, Mihara E, Yasui N, Takagi J. (2017) Immunoaffinity Purification of the Glycosylated Extracellular Fragment of Mouse Plexin A2 Produced in a Mammalian Expression System. *Methods Mol Biol.* **1493**, 57-72.

DOI: 10.1007/978-1-4939-6448-2_4

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

日本語総説

安井 典久; "Affinity clamp 法を用いたタンパク質間相互作用ネットワークにおける特定相互作用の機能解析", 生化学, 第89巻第2号, pp.293-297 (2017)

安井 典久, 服部 峰充, 小出 昌平; "翻訳後修飾を含むアミノ酸配列を高特異的に認識する人工結合タンパク質", バイオサイエンスとインダストリー, Vol. 73, 292-296 (2015).

安井 典久; "人工タンパク質を用いたタンパク質間相互作用構築による細胞内シグナル伝達ネットワークの詳細解析", 生物物理, Vol. 55, 151-153 (2015).

ホームページ等

researchmap

<https://researchmap.jp/norihisayasui/>

岡山大学 研究者総覧

<http://soran.cc.okayama-u.ac.jp/view?l=ja&u=66591bb3d29d4cf874506e4da22f6611>

所属研究室

http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/a_yama/Structure/Top.html

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、研究者個人に帰属されます。