

令和元年6月11日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04570

研究課題名(和文) ナノ集積が築く in-vitro 合成生物学ツール：代謝ネットワークの生体外模倣

研究課題名(英文) Application of hybrid nano-assembly for in-vitro synthetic biology tool

研究代表者

梅津 光央 (Umetsu, Mitsuo)

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：70333846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体内では、一連の酵素群が微小空間内に密集して酵素反応が共役している。本研究では、ナノ粒子への酵素集積化と自身が開発したナノ粒子の自発的階層集合化の技術を組み合わせて、生体内での酵素密集環境を再構築するプロセスの開発を目指し、混合操作のみで行えるナノ粒子への酵素集積化と材料表面特異なペプチド・タンパク質によるナノ粒子の階層的集合化技術を組み合わせることによって、生体内での酵素密集環境を生体外で再現できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内での酵素密集環境を生体外で再構築できれば、細胞内では変化させることができなかった様々なパラメータを変化させることができ、生体内での代謝ネットワークの解明に有用なツールとなり得る。本研究で開発した、酵素が集積したナノ粒子を凝集させる技術は、その再構築を可能とする要素技術として寄与する。

研究成果の概要(英文)：In vivo, a series of enzymes are closely packed in a minute space, and the enzyme reactions are coupled. In this study, enzymes are clustered on nanoparticles and the clustered enzymes are hierarchically assembled to reconstruct in-vivo-mimic enzyme-crowded environment. The utilization of material-binding peptides and proteins showed the possibility for spontaneous self-assembly of clustered enzymes.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：生体分子 酵素 ナノ粒子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脱化石資源の潮流は、微生物や植物細胞を用いて有用な有機分子を生産する研究を加速させ、ゲノム工学による代謝ネットワークの改変が様々な細胞でなされている。しかし、その改変は、均一希釈の環境で測定された酵素の各々の特性を元に設計されているため、酵素群が微小空間内に密集し酵素反応が共役的に連鎖している生体内では、予想通りの生産性を示さないことが多々ある。その解決策の一つとして、生体外で酵素密集環境を再現し、酵素反応間の共役効果や局所で高濃度化した代謝中間体による反応促進・活性阻害を数値化して代謝デザインに利用する方法があるが、多数の酵素を簡便に高密度集積させる技術がない。その中で研究代表者は、自身が開発したナノ粒子を核とした酵素のナノ集積とナノ粒子凝集のハンドリング技術を用いれば、生体内での酵素密集環境を再現した環境を生体外で再構築するプロセスを開発できると発想した。

### 2. 研究の目的

研究代表者は、近年ナノ粒子を核として異種酵素を混合操作のみで高密度集積させ、酵素反応間に共役的效果を誘導させることに成功した。本研究では、生体内において一連の酵素群が微小空間内に密集して酵素反応が共役していることに着目し、ナノ粒子への酵素集積化と自身が開発したナノ粒子の自発的階層集合化の技術を組み合わせて、生体内での酵素密集環境を再構築するプロセスを開発する。そのために、混合操作のみで行えるナノ粒子への酵素集積化と材料表面特異なペプチド・タンパク質によるナノ粒子の階層的集合化技術を組み合わせることによって、生体内での酵素密集環境を生体外で再現する技術を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 酵素集積ナノ粒子の作製

まず、ストレプトアビジンを固定化したナノ粒子とペプチドリンカーを介してビオチン化ペプチドを融合した組換え酵素を混合することで、ビオチン—アビジン相互作用によって酵素反応間が共役する酵素集積ナノ粒子が形成させる。また、無機ナノ粒子へ結合するペプチド・タンパク質をファージ提示法などで取得し、それらを酵素へ融合することによってストレプトアビジン無しで酵素をナノ粒子へ集積させる。

また、酵素ナノ粒子の核となるナノ粒子に関して、様々な粒子径とアビジン提示率を持つ無機ナノ粒子群を作製する。そして、その表面にストレプトアビジンを定量的に修飾させることによって、粒子径とビオチン結合数を変数に持つナノ粒子群を作製する。

#### (2) 無機材料特異的ペプチドの取得

ファージ提示法を利用して酵素を集積させるナノ粒子表面へ結合するペプチド候補を選択し、酵素などのタンパク質と融合して、ナノ粒子へタンパク質を集積できる程度の結合力をもつペプチドを取得する。

#### (3) 酵素集積ナノ粒子間の相互作用と活性評価

作製した酵素集積ナノ粒子を相互作用させた状態での酵素活性変化を解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) ストレプトアビジンを介した酵素集積ナノ粒子の作製

ナノ粒子へ酵素を固定化するために、酵素のC末端にいくつかのペプチドリンカーを介してビオチン化ペプチドとポリヒスチジンタグを融合した組換え酵素を大腸菌にて調製した。ビオチン化ペプチドの融合により酵素の発現量の低下をおこすことがあったが、培養条件を検討することによって実験で用いる程度は調製できるようになった。酵素を固定化させる無機ナノ粒子は、50nm~200nmの粒子径の範囲で合成し、それぞれの粒子径をもつナノ粒子へストレプトアビジンを、粒子とストレプトアビジンの混合比を変化させて、粒子表面へストレプトアビジンを固定化させた。そして、組換え酵素とナノ粒子を、様々な比率で混合して酵素集積ナノ粒子を作製し、それらの活性評価を評価した。その結果、酵素とビオチン化ペプチド間のリンカーの特性によって、粒子に固定化されることによって酵素の活性が低下するものとならないものがあることが分かった。また、粒子表面に固定化されているストレプトアビジンの固定化量も酵素の失活に影響を与えることも分かった。

## (2) 無機材料特異的ペプチドの取得

ナノ粒子へ酵素を固定化するために、ファージ提示法を用いて金属や金属酸化物の無機材料表面へ結合するペプチドの取得を行い、数種のペプチド配列を同定した。そして、種としたペプチドを末端に融合した緑色蛍光タンパク質 GFP を用いて無機ナノ粒子への吸着特性を評価したところ、取得したペプチドはすべてペプチドを融合していない GFP よりも優位にナノ粒子へ吸着性を示した(図 1)。また、そのペプチドのうち種類について、アミノ酸配列を繰り返した配列をタ酵素に融合した組換えタンパク質を大腸菌で発現させたところ、繰り返し回数の増加は組換えタンパク質の発現量を低減させる傾向にあり、さらに繰り返し回数の増加は無機材料表面への結合力を相加的には向上させないことが分かった。

次に、取得した無機材料結合性ペプチドへ変異を導入し、タンパク質の結合解析を行った。まず、各アミノ酸残基位置をアラニンへ点変異した変異体の結合評価を行ったところ、点変異では標的への結合親和性および結合量はあまり変化しないことが分かった。このことから、用いた無機材料結合性タンパク質は界面的な広がりを使って無機材料表面を認識し結合していることが示唆された。

## (3) 酵素集積ナノ粒子間の相互作用と活性評価

無機ナノ粒子表面の荷電性を変化させてビオチン化酵素の結合に必要なアビチンを化学結合させたところ、荷電性が高いものは粒子が凝集しやすいことが分かる共に、本研究に必要な最適解を得ることができた。また、二つの無機ナノ粒子間を架橋するために、二つの無機材料結合性ペプチド・タンパク質を架橋させた組換えタンパク質を大腸菌にて調製した。そして、両ナノ粒子と共にこの組換えタンパク質を架橋すると、ナノ粒子は自発的に凝集し沈殿した。これより、無機ナノ粒子間を架橋し集積させる分子を設計できたと考えた。

そこで、組換え酵素群とナノ粒子を、様々な比率で混合して酵素集積ナノ粒子を網羅的に作製すると共に粒子間の凝集も引き起こした際の酵素活性の関係を評価した。その結果、粒子の集積性や凝集性を高めると酵素活性の低下を招きやすいことが分かったが、活性は維持される条件は存在することが分かった。

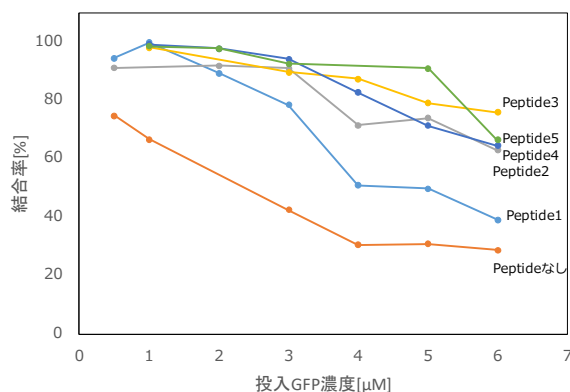


図 1. 取得した無機材料ペプチドを融合した GFP の無機ナノ粒子に対する吸着

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Yutaka Saito, Misaki Oikawa, [Hikaru Nakazawa](#), [Teppei Niide](#), Tomoshi Kameda, Koji Tsuda, and [Mitsuo Umetsu](#), Machine-Learning-Guided Mutagenesis for Directed Evolution of Fluorescent Proteins, ACS Synthetic Biology, 7, 2014-2022 (2018).  
査読有 DOI: 10.1021/acssynbio.8b00155
2. Hiroto Fujii, Yoshikazu Tanaka, [Hikaru Nakazawa](#), Aruto Sugiyama, Noriyoshi Manabe, Akira Shinoda, Nobutaka Shimizu, Takamitsu Hattori, Katsuhiro Hosokawa, Takuma Sujino, Tomoyuki Ito, [Teppei Niide](#), Ryutaro Asano, Izumi Kumagai, and [Mitsuo Umetsu](#), Compact seahorse-shaped T cell-activating antibody for cancer therapy, Advanced Therapeutics, 1700031, 1-10, (2018).  
査読有 DOI: 10.1002/adtp.201700031
3. Kyongwan Kim, Natsuhiko Yoshinaga, Sanjib Bhattacharyya, [Hikaru Nakazawa](#), [Mitsuo Umetsu](#), and Winfried Teizer, Large-scale chirality in an active layer of microtubules and kinesin motor proteins, Soft Matter, 14, 3221-3231 (2018).  
査読有 DOI: 10.1039/C7SM02298K
4. Zuzana Konvičková, Veronika Holišová, Marek Kolenčik, [Teppei Niide](#), Gabriela Kratošová, [Mitsuo Umetsu](#), and Jana Seidlerová, Photosynthesis of colloidal Ag-AgCl nanoparticles mediated by Tilia sp. leachate, evaluation of their behaviour in liquid phase and catalytic properties, Colloid and Polymer Science, 296, 677-687 (2018).  
査読有 DOI:doi.org/10.1007/s00396-018-4290-2
5. Aruto Sugiyama, [Mitsuo Umetsu](#), [Hikaru Nakazawa](#), [Teppei Niide](#), Ryutaro Asano, Takamitsu Hattori, and Izumi Kumagai, High-throughput cytotoxicity and antigen-binding assay for screening small bispecific antibodies without

- purification” , Journal of Bioscience and Bioengineering, 126, 153-161 (2018).  
 査読有 DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.02.007
6. Ryota Saito, Yutaro Saito, Hikaru Nakazawa, Takamitsu Hattori, Izumi Kumagai, Mitsuo Umetsu, and Koki Makabe, Impact in stability during sequential CDR grafting to construct camelid VHH antibodies against zinc oxide and gold, The Journal of Biochemistry, 164, 21-25 (2018).  
 査読有 DOI: 10.1093/jb/mvy016
  7. Hikaru Nakazawa, Yasuko Seta, Tatsuya Hirose, Yoshitake Masuda, and Mitsuo Umetsu, Use of a Phage-Display Method to Identify Peptides That Bind to a Tin Oxide Nanosheets, Protein & Peptide Letters, 25, 68-75 (2018).  
 査読有 DOI : 10.2174/0929866525666171206114429
  8. Aruto Sugiyama, Mitsuo Umetsu, Hikaru Nakazawa, Tepei Niide, Tomoko Onodera, Katsuhiko Hosokawa, Shuhei Hattori, Ryutaro Asano, and Izumi Kumagai, A semi high-throughput method for screening small bispecific antibodies with high cytotoxicity, Scientific Reports, 7, 2862 (2017).  
 査読有 DOI:10.1038/s41598-017-03101-4
  9. 梅津 光央, 中澤 光, 二井手 哲平, 構造情報を取り入れた進化工学的アプローチによる分子認識タンパク質の設計, MEDCHEM NEWS, 27, 25-29 (2017)  
 査読無 [http://medchem.pharm.or.jp/medchem\\_news/medchem-news-vol-27-no-1/](http://medchem.pharm.or.jp/medchem_news/medchem-news-vol-27-no-1/)
  10. 梅津 光央, バイオ分子をツールとしたボトムアップな無機材料アセンブリ, 科学と工業, 91, 227-233 (2017)  
 査読無 <https://osakaira.com/magazine>
  11. 二井手 哲平, 中澤 光, 梅津 光央, 親和性ペプチド分子による有機結晶の構造制御と生体分子-半導体有機結晶ハイブリッド材料作製プロセスの開発, ケミカルエンジニアリング 62(7) 23-27 (2017).  
 査読無 <http://www.kako-sha.co.jp/chembackno.htm>
  12. 梅津 光央, タンパク質工学とナノ材料工学の相補完によるボトムアップ素子設計, 研究紹介, 化学工学会バイオ部会ニュースレター No.45, 11-16 (2017).  
 査読無
  13. Yuki Shibuya, Natsuki Haga, Ryutaro Asano, Hikaru Nakazawa, Takamitsu Hattori, Daisuke Takeda, Aruto Sugiyama, Reiko Kurotani, Izumi Kumagai, Mitsuo Umetsu, and Koki Makabe, Generation of camelid VHH bispecific constructs via in-cell intein-mediated protein trans-splicing, Protein Engineering, Design & Selection, 30, 15-21 (2016).  
 査読有 DOI:doi.org/10.1093/protein/gzw057
  14. Kyongwan Kim, Aurelien Sicora, Hikaru Nakazawa, Mitsuo Umetsu, Wonmuk Hwang, and Winfried Teizer, Isomorphic coalescence of aster cores formed in vitro from microtubules and kinesin motors, Physical Biology, 13, 056002(1-18), (2016).  
 査読有 DOI:10.1088/1478-3975/13/5/056002

[学会発表] (計 16 件)

1. Mitsuo Umetsu, Can proteins be engineered to generate a desired function from slim library ?, 分子研研究会 New Frontier in Protein Design & Engineering, 2019 年 3 月 16 日, 分子科学研究所, 岡崎
2. 梅津 光央, ライブラリーデザインサイクル: スマートなライブラリーでのタンパク質の機能改変, 第 14 回理研「バイオものづくり」シンポジウム, 2019 年 3 月 8 日, 理研, 和光
3. Misaki Oikawa, Yutaka Saito, Tomoshi Kameda, Hikaru Nakazawa, Tepei Niide, Koji Tsuda, Mitsuo Umetsu, Machine-learning-guided mutagenesis platform for desired evolution: in the case of Fluorescent protein?, 10th Annual PEGS Summit, Protein&Antibody Engineering Summit, 2018 年 11 月 13 日, Lisbon Congress Center, Portugal
4. 梅津 光央, 進化分子工学を援用した無機材料とタンパク質の直接結合界面の創製, 第 174 委員会「第 2 回インタラクティブナノ界面分科会」, 2018 年 10 月 13 日, 大阪大学中之島センター, 大阪
5. 梅津 光央, 進化工学からみた材料結合性ペプチド・タンパク質の雰囲気, 第 70 回日本生物工学会大会, 2018 年 9 月 7 日, 関西大学 千里山キャンパス, 大阪
6. 及川 未早来, 二井手 哲平, 中澤 光, 亀田倫史, 津田宏治, 斉藤裕, 梅津 光央, AI はタンパク質進化を導くか?: 機械学習支援による GFP の YFP 化検証, 第 70 回日本生物工学会大会, 2018 年 9 月 6 日, 関西大学 千里山キャンパス, 大阪
7. 及川 未早来, 二井手 哲平, 中澤 光, 亀田倫史, 津田宏治, 斉藤裕, 梅津 光央, AI を利用したスマートホットライブラリーデザイン: AI は GFP を YFP 化できるか?, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 2018 年 6 月 27 日, 朱鷺メッセ, 新潟
8. 梅津 光央, ナノとバイオをつなぐインターフェイスプロテイン, 第 174 委員会第 59

- 回研究会, 2017年9月12日, キャンパスプラザ京都, 京都
9. 宮木 達輝, 中澤 光, 筋野 拓馬, 梅津 光央, 基板材料結合タンパク質を用いたナノデバイス指向インターフェイス分子開発, 第69回日本生物工学会, 2017年9月12日, 西早稲田キャンパス, 東京
  10. Mitsuo Umetsu, Nanobiotechnology from material-binding biomolecules for nanomaterial engineering, International Workshop on Advanced Smart Materials and Engineering for Nano- and BioTechnologies, 2017年7月13日, 神戸大学, 神戸
  11. 及川 未早来, 中澤 光, 二井手 哲平, 亀田 倫史, 斎藤 裕, 津田 浩二, 梅津 光央, 機械学習へ向けた迅速な変異体群の作製と機能評価プロセスの開発, バイオ工学シンポジウム, 2017年7月3日, 道後温泉大和屋本店, 松山
  12. Mitsuo Umetsu, Module library approach for bottom-up chimera/hybrid protein design, 2017 KMB International Symposium & Annual Meeting, 2017年6月29日, UNIST, Ulsan, Korea
  13. 梅津 光央, タンパク質工学とナノ材料の相補完によるハイブリッド酵素設計, バイオマスの総合的有効利用に関するシンポジウム, 2016年11月9日, 神戸大学先端融合研究環境統合研究拠点, 神戸
  14. Yuji Tsukazaki, Keisuke Murakami, Hikaru Nakazawa and Mitsuo Umetsu, A design of artificial cellulosome using the cohesin-dockerin interaction, 2016年10月28日, The 23th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC) 2015, 宮崎県 シーガイアコンベンションセンター
  15. 中澤 光, 岡田 和, 石垣 友理, 小林 栄子, 梅津 光央, CBDの結合挙動から見るハイブリッドナノセルロソームの高機能化設計, 化学工学会第48回秋季大会, 2016年9月6日, 徳島大学, 徳島
  16. 梅津 光央, ライブラリーの発想によるタンパク質のキメラ設計, ネオバイオ研究会, 2016年6月11日, 鹿児島大学, 鹿児島

[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]

ホームページ等

<http://www.che.tohoku.ac.jp/~prn/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 中澤 光

ローマ字氏名: NAKAZAWA, hikaru

所属研究機関名: 東北大学

部局名: 大学院工学研究科

職名: 助教

研究者番号 (8桁): 40584991

研究分担者氏名: 二井手 哲平

ローマ字氏名: NIIDE, teppei

所属研究機関名: 東北大学

部局名: 大学院工学研究科

職名: 助教

研究者番号 (8桁): 20802705

研究分担者氏名: 高見 誠一

ローマ字氏名: TAKAMI, Seiichi

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院工学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：40311550

※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。