

令和元年6月19日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06865

研究課題名(和文)改良型トランスグルタミナーゼの近接依存反応を利用した複合タンパク質フィッシング法

研究課題名(英文)Complex protein fishing method using proximity dependent reaction of modified transglutaminase

研究代表者

後藤 猛(Gotoh, Takeshi)

秋田大学・理工学研究科・教授

研究者番号：10215494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、TGaseの近接依存標識反応を利用し、TGaseに融合させた既知タンパク質(Bait)に結合する未知タンパク質(Prey)を探索する方法の可能性を調べた。まず、TGase高反応性ペプチドを付加したTGaseを調製したが、自身の自己架橋反応によるBait-TGase融合体の調製は困難であった。一方、TGaseのC末端FRB(Baitのモデル)融合体をTGaseのpro配列と共に別々にペリプラズムに分泌発現させる組換え大腸菌を構築したところ、活性型のTGase-FRB融合体を直接生産することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞や組織に発現しているタンパク質の動態を把握し、それらのタンパク質が織りなす相互作用の実態を解析してこれを系統的・包括的に捉えようとするプロテオミクス研究の重要性が近年高まっている。本研究では、TGaseを利用した近接依存標識反応によって未知タンパク質を標識・同定するために必要な、未知タンパク質と相互作用する既知タンパク質とTGaseの融合体を調製する方法について、有益な方策を提案した。

研究成果の概要(英文)：Two approaches were examined to prepare a fusion protein of transglutaminase (TGase) and bait protein, to determine the possibility that the TGase-bait fusion protein may be used to explore unknown proteins (prey) that bind to the known protein (bait), by proximity-dependent labeling reaction of TGase. First, a modified TGase, in which a TGase-reactive peptide was attached to the C-terminus through a His tag, was prepared and used to couple with a bait protein by its own catalytic activity. However, this approach did not work well probably due to very low concentrations of the proteins. Then, a recombinant E. coli, which was engineered to secrete separately a TGase-FRB fusion and its pro peptide to the periplasm, was constructed. As a result, the TGase fusion protein with FRB attached to the C-terminus could be produced directly in E. coli periplasm and showed an enough TGase activity.

研究分野：生物化学工学

キーワード：トランスグルタミナーゼ プロテオミクス 組換えタンパク質生産

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

### 1. 研究開始当初の背景

細胞や組織に発現しているタンパク質の動態を把握し、これらのタンパク質が織りなす相互作用の実態を解析するプロテオミクス研究の重要性が高まっている。タンパク質複合体を形成する未知タンパク質の探索と同定を釣り (フィッシング) に例えて、既知タンパク質を Bait (餌)、Bait と複合体を形成する未知タンパク質を Prey (獲物) と呼ぶとき、Prey をフィッシングする方法に抗体を利用する共免疫沈降法やプルダウン法がある。しかし、Prey の高次構造形成が Bait との結合に不可欠である場合や結合が弱い場合には Bait-Prey 複合体を免疫沈降させることは困難である。最近、ビオチンリガーゼと Bait の融合体を利用して、近接依存反応によって Prey をビオチン化標識する BioID 法が開発された (Roux KJ et al., J. Cell Biol., 2012)。これは、例えば膜タンパク質のように特殊な条件で相互作用する場合でも、一旦ビオチン化標識することにより、その後この高次構造を破壊しても、最後まで追跡してアミノ酸配列、遺伝子配列を解析することを可能にする。しかし、天然物であるビオチンを基質とするため、融合タンパク質の調製時にも無関係な多くのタンパク質がビオチン化され、多くの擬陽性タンパク質が検出されるなどの様々な課題がある。これら課題の克服には、ビオチンリガーゼによらない新たなフィッシング方法の開発も望まれる。

### 2. 研究の目的

トランスグルタミナーゼ (TGase) を標識酵素として利用し、TGase 連結 Bait に相互作用する Prey を TGase の近接依存反応により蛍光標識・同定する、未知タンパク質の新規なフィッシング方法を開発する。TGase 自身が自発的に Bait と結合するような反応性の高いリジン含有ペプチドまたはグルタミン含有ペプチドを C 末端に有する改良型 (TGase) を分子設計し、その生産系を構築する。さらに、複合体を形成する既知のタンパク質 (FRB と FKBP) を Bait と Prey のモデルとし、FRB 融合 TGase を調製して本フィッシング法の可能性を評価する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 自己架橋性 TGase の調製

TGase はカルシウム非依存性で基質特異性が低く反応性と利便性に優れた *Streptomyces mobaraensis* 由来のものとし、自己架橋反応のために付加する TGase 高反応性ペプチドとして、リジン含有ペプチド KKKKKK (以降 <K> と略記) およびグルタミン含有ペプチド RLQQP (以降 <Q> と略記) を用いた。正しく折りたたまれた活性型の TGase とするためには pro 配列を有する TGase 前駆体として発現させる必要があるため、<K> および <Q> を付加した TGase 前駆体の cDNA を調製し、これらを分泌シグナル下流に組み込んだ発現プラスミドを BIC 法により調製し (Fig. 1), *Brevibacillus choshinensis* を形質転換した。得られた組換え *B. choshinensis* を 30 °C で 60 時間培養して培養液を回収し、SDS-PAGE およびウェスタンブロットにより組換えタンパク質の発現確認を行った。精製には Ni-アフィニティカラムを用いた。また、Pro 配列の切断除去による TGase の活性化は Dispase により行った。

#### (2) モデル Prey/Bait タンパク質の調製

Prey および Bait のモデルタンパク質には、ラパマイシン存在下で複合体を形成する FRB と FKBP を用いた。FKBP の cDNA を有する pCold I 発現ベクター pCold I-FKBP および pCold I-FRB で形質転換した組換え大腸菌 BL21 株を培養し、菌体を超音波破砕して得た菌体可溶性画分を Ni-アフィニティカラムにより精製した。

#### (3) 活性型 FRB 融合 TGase の直接生産

TGase の C 末端側に FRB を付加した融合体 TGase-FRB および N 末端側に付加した融合体 FRB-TGase と Pro 配列をペリプラズム共発現するための発現ベクターの概略を Fig. 2 に示す。Pro 配列 cDNA および TGase 融合体 cDNA のそれぞれ 5' 側にリボソーム結合部位 (RBS) とペリプラズム輸送シグナル配列 (pelB) を配置した。線状化した

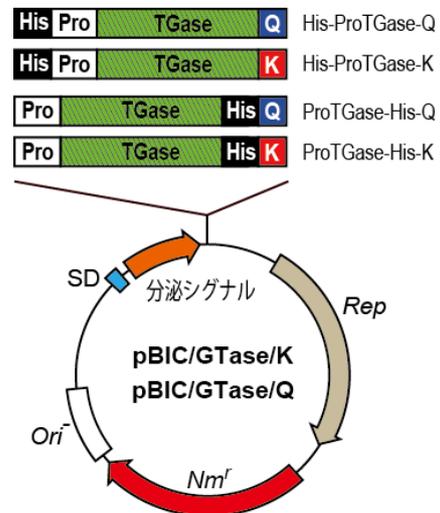


Fig. 1 Expression vectors of precursors of TGase-K/Q.

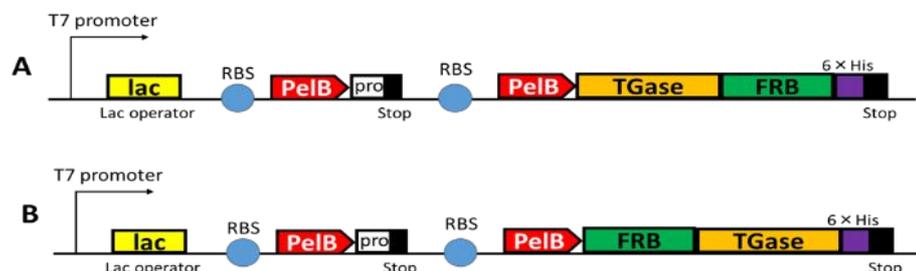


Fig. 2 Gene expression map of fusion protein of TGase and FRB. A: TGase-FRB, B: FRB-TGase.

pET22b(+)ベクターと、その両末端に相同な配列と pelB 配列を付加したインサート DNA (Pro配列と FRB 融合 TGase の cDNA) を PCR により調製した。これらを In-fusion 法により連結してコンストラクトを調製した。大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換して得られた組換え体をアンピシリン含有 LB 培地で OD<sub>600</sub> 値が 0.6 になるまで 37°C で培養し、IPTG を終濃度が 0.4 mM になるように加えて、24 h 培養した。菌体を回収した後、浸透圧ショック法によりペリプラズム画分を抽出した。さらに菌体を超音波破碎し、可溶性画分と不溶性画分に分離した。精製および分析方法は 1) と同様である。

#### 4. 研究成果

##### (1) 組換え *B. choshinensis* による自己架橋性 TGase の発現と反応性

Fig. 1 に示す発現ベクターを有する組換え *B. choshinensis* をそれぞれ TM 培地を用いて 30 で 64 h 培養し、組換え体を分泌発現させた。この培養液を抗 His タグ抗体を用いた Western Blotting により分析したところ、TGase-Q および TGase-K の前駆体が培地画分に分泌生産されたことが確認された。これらを精製して Dispase 処理したところ、約 30 min でプロ配列が特異的に完全に除去され、得られた活性型の TGase-Q および TGase-K は培養体積 100 ml あたりそれぞれ 4.2 mg と 3.6 mg であり、比活性は 8.1 U/mg, 3.0 U/mg と求められた (Table 1)。

次に TGase の自己架橋反応性を調べるため Bait のモデルとして牛乳 Casein を用い、TGase-Q または標品 TGase と共に所定時間インキュベートした。生成物を SDS-PAGE で分析した結果を Fig. 3 に示す。どちらの酵素反応溶液においても時間の経過と共にほとんど泳動されない巨大分子の生成が認められる。

これは TGase 反応によって Casein 同士が架橋したためと考えられる。しかし、Casein と TGase-Q の 1:1 融合体の分子量に相当する位置に反応時間 15 min からバンドが現れている。一方、標品 TGase の場合にはこのバンドは見られない。これより、TGase-Q および-K は自身の自己架橋反応によって Bait タンパク質と融合体を形成できる可能性が示された。

そこで、TGase-Q と Bait のモデル FKBP との架橋実験を試みた。Fig. 4 は、TGase-Q と FKBP をそれぞれ 1 mg/mL で混合し、所定時間インキュベートしたものを SDS-PAGE で分析した結果を示している。FKBP のバンドは消失しているが、TGase-Q と FKBP の融合体の位置にバンドは見られない。しかし、12 h に比べて 24 h の TGase-Q のバンドは薄くなっていることから TGase-Q と FKBP の融合体は形成されるものの反応速度は低く、FKBP 同士が電気泳動されない程の巨大な架橋構造体を形成してしまったと考えられる。また、His タグが<Q>ペプチドのスペーサーとしてもはたらくことを期待した TGase-His-Q においても同様の結果であった。TGase-Q は酵素でもあると同時に自身の基質でもあるため、あまり TGase

Table 1 Productions of TGase-Q and TGase-K.

	Total medium (mL)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)
TGase-Q	100	17.2	2.1	8.1
TGase-K	50	5.53	1.8	3.0
TGase (Ajinomoto)	-	-	-	1.0

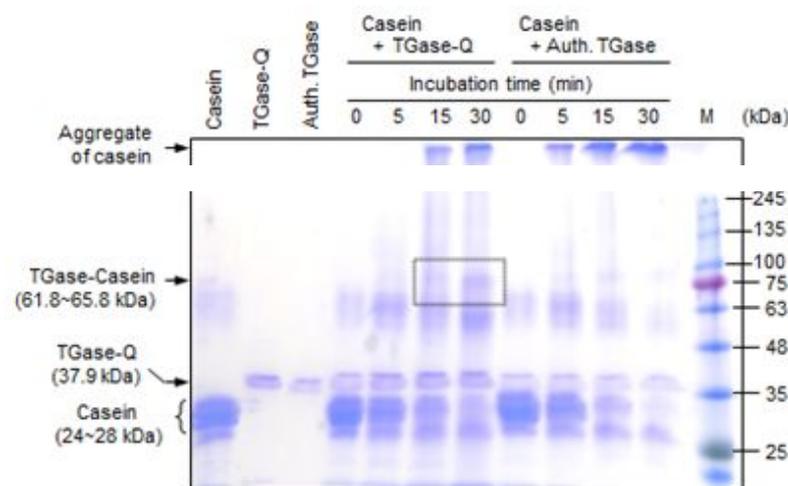


Fig. 3 Self-crosslinking reaction of TGase-Q with milk casein.

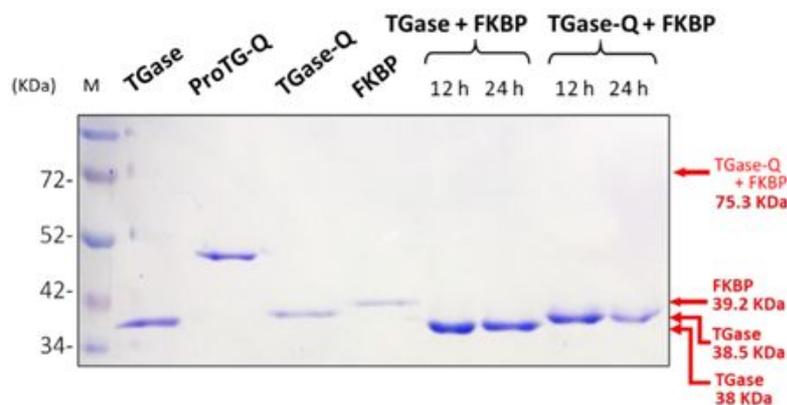


Fig. 4 Self-crosslinking reaction of TGase-Q with FKBP.

反応性が低いタンパク質の場合には、より高いタンパク質濃度で反応を行う必要があったと考えられる。しかし、TGase 濃度が十分に高い酵素反応溶液を調製することは困難であったことから、Bait 融合 TGase を遺伝子的に調製する方が現実的と判断した。

### (2) 大腸菌ペリプラズムでの活性型 Bait 融合 TGase の直接生産

TGase を遺伝的に Bait に連結して融合体を調製するにあたり、TGase 前駆体と Bait の融合体を調製してから Dispase による活性化処理を行う方法では、Bait の種類によっては pro 配列の切断と共に Bait も加水分解される恐れがある。最近、Song Liu らは、TGase を大腸菌のペリプラズム内に TGase と共に、しかし別々に pro 配列を分泌発現させることにより、TGase は活性型に正しく折りたたまれることを報告した。そこで、本研究ではこの方法を応用し、ペリプラズム内での活性型 Bait 融合 TGase の直接生産を試みた。

Fig. 5 は各画分における FRB 融合 TGase の発現を Western Blot に分析した結果を示す。50.5 kDa 付近に不溶性の封入体の生成が多量に認められるが、ペリプラズム画分にも FRB 融合 TGase の発現が確認された。しかし、N 末端に FRB を付加した TGase (FRB-TGase) のペリプラズム画分発現量は C 末端付加体 (TGase-FRB) と比較して少なかった。また、培養温度を変化させても、どちらの融合タンパク質の可溶性発現量に顕著な違いは見られなかった。

精製した融合タンパク質 TGase-FRB および FRB-TGase について、菌体量あたりの TGase 活性を比較した結果を Fig. 6 に示す。これより、FRB-TGase の TGase 活性は極めて低い値であったが、TGase-FRB は十分に高い TGase 活性を示した。

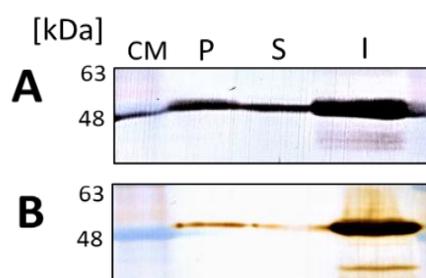


Fig. 5 Western blot of fusion proteins of TGase and FRB

A: TGase-FRB, B: FRB-TGase, CM: Molecular Weight Markers, P: Periplasm fraction, S: Soluble

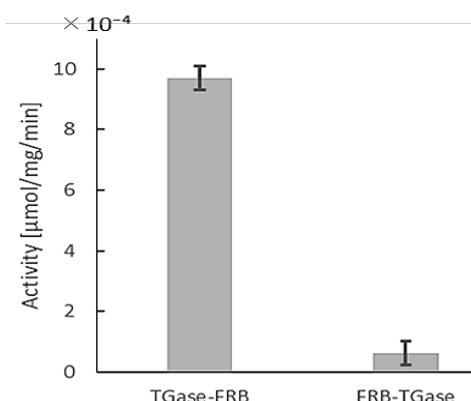


Fig. 6 TGase activity of TGase-FRB and FRB-TGase

### (3) まとめ

本研究では、TGase の近接依存標識反応を利用し、TGase に融合させた既知タンパク質 (Bait) に結合する未知タンパク質 (Prey) を探索する方法の可能性を調べた。まず、TGase 高反応性ペプチドを付加した TGase を調製したが、自身の自己架橋反応による酵素的な Bait-TGase 融合体の調製は困難であった。一方、TGase の C 末端 FRB (Bait のモデル) 融合体を TGase の pro 配列と共に別々にペリプラズムに分泌発現させる組換え大腸菌を構築したところ、活性型の TGase-FRB 融合体を直接生産することが出来た。現在、得られた融合体を用いて、FRB に結合する FKBP の蛍光標識反応を調べている。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 4 件)

Yokota, S., Gotoh, T.: Effects of rubber elongation factor and small rubber particle protein from rubber producing plants on lipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.*, in Press (2019) 査読あり

Yokota, S., Gotoh, T.: Aggregation properties as potential markers for classifying rubber particle proteins, *Atlas Sci.*, Electronic file, 2 pages (2019) 査読無し, <https://atlasofscience.org/aggregation-properties-as-potential-markers-for-classifying-rubber-particle-proteins/>

Bentley, William E., Martin, Donald K., Gotoh, T.: Biomimetic and Bioinspired Biotechnology, *Biotechnol. J.*, **13**, 1800670 ~ 1800670 (2018) 査読無し, DOI: 10.1002/biot.201800670

Yokota, S., Suzuki, Y., Saitoh, K., Kitajima, S., Ohya, N., Gotoh, T.: Cloning and aggregation characterization of rubber elongation factor and small rubber particle protein from *Ficus carica*, *Mol. Biotechnol.*, **60**, 83-91 (2018) 査読あり, DOI: 10.1007/s12033-017-0051-6.

〔学会発表〕(計 5 件)

大池健太, 荒木菜那, 向山遥香, 横田早希, 後藤猛: 大腸菌による活性型トランスグルタミナーゼ融合タンパク質の直接生産, 化学工学会第 84 年会, 東京 (2019)

Stevens, M. GF., Ishibashi, N., Adachi, M., Yokota, S., Gotoh, T.: Development of Imprinted L-Dopa-Peptide Silica Particles for Selective Recovery of Ni(II) Ions from Aqueous Solutions, 化学工学会第 84 年会, 東京 (2019)

Morlu G.F. Stevens, Naoya Ishibashi, Masataka Adachi, Saki Yokota, Takeshi Gotoh: Metal Imprinted L-DOPA Peptide Silica Particles for the Selective Recovery of Metals, 秋田化学技術協会第 53 回研究技術発表会, 秋田 (2019)

大池健太, 横田早希, 佐藤大地, 佐々木瞬, 齋藤樹, 後藤猛: Secretory production of self cross-linkable transglutaminase by Brevibacillus, 平成 29 年度化学系学協会東北大会, 盛岡 (2017)

佐藤大地, 横田早希, 佐々木瞬, 齋藤樹, 後藤猛: 改良型トランスグルタミナーゼの生産と自己架橋反応による融合タンパク質の調製, 秋田化学技術協会第 51 回研究技術発表会, 秋田 (2017)

〔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〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 横田早希

ローマ字氏名: Yokota, Saki