

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656496

研究課題名(和文) 液液界面を識別するペプチド分子から発想する抗体ナノ操作

研究課題名(英文) nanomanipulation of antibody based on liquid-binding peptide

研究代表者

梅津 光央 (Umetsu, Mitsuo)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70333846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、液体界面を識別できるペプチドを用いて、あたかもリン脂質のような両親媒性分子を扱うかのように蛋白質分子をナノ操作できる技法を開発し、単なる蛋白質間相互作用だけに頼っていた蛋白質アセンブリ手法を拡張させ、蛋白質が均一配向したプロテインラングミュア単分子膜や超多価抗体クラスターの作製を行った。

研究成果の概要(英文)：Recently, we identified the peptide with affinity for liquid surface. In this study, we tried to use the peptide for manipulating proteins on liquid surface and clustering peptide in water solution. Consequently, the fusion of the liquid-binding peptide to GFP resulting in the formation of GFP membrane on the water-ionic liquid interface and the fusion of the peptide to antibody fragment led to the clustering of antibody fragment with avidity effect.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：ナノバイオ 分子認識 蛋白質

1. 研究開始当初の背景

進化工学的アプローチは、特定分子に結合性を持つペプチド分子の取得を容易にしつつあり、研究代表者はこれまで、分子でなく無機材料のような固体表面に選択的吸着するペプチド分子の取得に成功してきた。この成功から研究代表者は、「液体」に対してもペプチド分子の選択的結合機能は発現される可能性と考え、近年、非水系溶媒に選択的親和性を持つペプチド分子の取得に世界に初めて成功した。この発見から研究代表者は、特定液体に親和性を持つペプチドを蛋白質に融合すれば、不均一溶液を用いて、蛋白質をリン脂質のような両親媒性分子の様に操作できると発想した。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が取得に成功している液体界面を識別できるペプチドを用いて、あたかもリン脂質のような両親媒性分子を扱うかのように蛋白質分子をナノ操作できる技法を開発し、単なる蛋白質間相互作用だけに頼っていた蛋白質アセンブリ手法を拡張させ、蛋白質が均一配向したプロテインラングミュア単分子膜や超多価抗体クラスターを作製し、薬剤内包が可能な超多価抗体クラスターの作製技法を試みる。

3. 研究の方法

(1) 蛋白質が均一配向したプロテインラングミュア単分子膜の作製

疎水性イオン液体に親和なペプチド配列を C 末端に融合した緑色蛍光蛋白質(GFP)を大腸菌にて調製した。調製したペプチド融合 GFP 水溶液と疎水性イオン液体と混合し、水-疎水性イオン液体界面での GFP 蛍光を観測した。

(2) 疎水性イオン液体親和性ペプチドを利用した多価抗体クラスター化技術

上皮成長因子受容体(EGFR)に得意なラクダ抗体の可変領域断片(VHH)の C 末端に疎水性イオン液体に親和なペプチド配列を融合した組換え蛋白質を大腸菌にて調製した。調製したペプチド融合抗体 EGFR VHH を用いてがん細胞 A431 に対する結合評価を行った。

4. 研究成果

(1) 蛋白質が均一配向したプロテインラングミュア単分子膜の作製

大腸菌発現において、疎水性イオン液体親

和性ペプチドを融合した GFP は蛍光特性を持ちながら不溶性画分に発現した。そこで、高濃度 L-アルギニン水溶液を用いて可溶化することを試みたところ、蛍光活性を保持したまま可溶化させることに成功し、その後、透析によりアルギニンを除去しても沈殿せずに可溶性を保った。そこでゲルろ過クロマトグラフィーにより分子形状を測定したところ、多量体を形成していることが分かった。これより、ペプチドタグが疎水性であることを考えると、水溶液中において、ペプチドタグは自身が核となって見せる形成を誘導すると言える。

次に、ラングミュア膜を形成させるために、疎水性イオン液体を添加した後エマルジョン化し、遠心分離器によって水-疎水性イオン液体混合液を二相化した。その結果、水-疎水性イオン液体混合液の界面に GFP 由来の蛍光を観測することに成功した(図 1)。この結果より、液体界面を用いれば、疎水性イオン液体親和なペプチドを融合した蛋白質を薄膜化でき得ることが分かった。

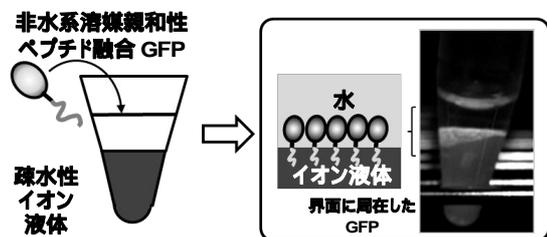


図 1. 疎水性イオン液体親和性ペプチドを融合した GFP の水-疎水性イオン液体界面での挙動

(2) 疎水性イオン液体親和性ペプチドを利用した多価抗体クラスター化技術

大腸菌発現において、疎水性イオン液体親和性ペプチドを融合した VHH は不溶性画分に発現した。この組換え蛋白質は GFP とは異なり高濃度アルギニンを用いては可溶化させることができなかった。そこで、通常の蛋白質可溶化に用いられる変性剤のグアニジン塩酸塩を用いて可溶化し、その後、透析によりグアニジンを除去することにより巻き戻しを試みた。しかし、すべてのペプチド融合 VHH は沈殿してしまった。そこで、L-アルギニン水溶液を用いて可溶化することを試みたところ、蛍光活性を保持したまま可溶化させることに成功し、その後、透析によりアルギニンを除去しても沈殿せずに可溶性を保った。そこで、透析開始前に界面活性剤を入れた後透析操作を行った。その結果、変性剤と界面活性剤を完全に除去後も蛋白質は可溶性を保った。そこで、ゲルろ過クロマトグラフィーにより分子形状を測定したところ、ペプチド融合 VHH はおよそ 5~7 量体の多量体を形成していることが分かった。

そこで次に、フローサイトメトリーを用いてEGFRを高発現しているがん細胞 A431 に対して結合評価を行った。その結果、細胞表面へ強く結合する様子が観測された(図 2)。ペプチドを融合していない VHH 単独(単量体)と結合競争をさせた場合も、単量体である VHH 単独よりも優位に結合している結果がでた。これより、疎水性イオン液体親和性ペプチドを用いることにより、多価抗体クラスターを作製できることが分かった。

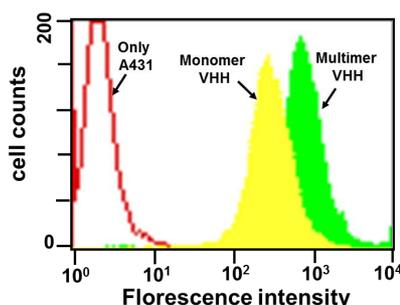


図2. フローサイトメトリーによる A431 細胞に対するペプチド融合 VHH(Multimer VHH)の結合評価

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

1. Keiko Tawa, Mitsuo Umetsu, Hikaru Nakazawa, Takamitsu Hattori, and Izumi Kumagai, Application of 300x enhanced-fluorescence on a plasmonic chip modified with bispecific antibody to a sensitive immunosensor, ACS Applied Materials & Interfaces, 査読有, 5, 8628-8632 (2013). DOI: 10.1021/am402173y
2. Hikaru Nakazawa, Do-Myoung Kim, Takeshi Matsuyama, Nobuhiro Ishida, Akinori Ikeuchi, Yuri Ishigaki, Izumi Kumagai, and Mitsuo Umetsu, Hybrid nanocellulosome design from cellulase modules on nanoparticles: Synergistic effect of catalytically divergent cellulase modules on cellulose degradation activity, ACS Catalysis, 査読有, 3, 1342-1348 (2013). DOI: 10.1021/cs400012v
3. Keiko Tawa, Mari Satoh, Koichi Uegaki, Tomoko Hara, Masami Kojima, Hiroyuki Aota, Yoshiki Yokota, Takahiko Nakaoki, Mitsuo Umetsu, Hikaru Nakazawa, and Izumi Kumagai, Rapid and sensitive detection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) with a plasmonic chip, Japanese Journal of Applied Physics, 査読有, 52, 6GK01 (2013). DOI: 10.7567/JJAP.52.06GK01

4. Hikaru Nakazawa, Akinori Ikeuchi, Do-Myoung Kim, Yuri Ishigaki, Hidetaka Asano, Katsunori Kouda, Izumi Kumagai, and Mitsuo Umetsu, Biomass-binding peptides designed by molecular evolution for efficient degradation of cellulose in biomass by cellulase, Green Chemistry, 査読有, 15, 365-369 (2013). DOI: 10.1039/c2gc36914a
5. Hikaru Nakazawa, Rui Todokoro, Yuri Ishigaki, Izumi Kumagai, and Mitsuo Umetsu, "In-one-pot-at-a-time ligation for high-throughput construction of a protein expression vector library", Chemistry Letters, 査読有, 42, 424-426 (2013). DOI: 10.1246/cl.2013.424
6. Takashi Matsuyama, Do-Myoung Kim, Mitsuo Umetsu, Taiji Ikawa, Mamoru Yamanishi, Nobuhiro Ishida, Izumi Kumagai, and Haruo Takahashi, "Ionic liquid/water interfacial localization of a green fluorescent protein fused to a tryptophan-rich peptide", Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, 113, 160-165 (2012). DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.09.016
7. Takamitsu Hattori, Mitsuo Umetsu, Takeshi Nakanishi, Satoko Sawai, Shinsuke Kikuchi, Ryutaro Asano, and Izumi Kumagai, A high-affinity gold-binding camel antibody: Antibody engineering for one-pot functionalization of gold nanoparticles as biointerface molecules, Bioconjugate Chemistry, 査読有, 23, 1934-1944 (2012). DOI: 10.1021/bc300316p
8. Do-Myoung Kim, Hikaru Nakazawa, Mitsuo Umetsu, Takashi Matsuyama, Nobuhiro Ishida, Akinori Ikeuchi, Haruo Takahashi, Ryutaro Asano, and Izumi Kumagai, Nanocluster design for the construction of artificial cellulosomes, Catalysis Science & Technology, 査読有, 2, 499-503 (2012). DOI: 10.1039/c2cy00371f
9. Aurélien Sikora, Daniel Oliveira, Kyongwan Kim, Andrew L. Liao, Mitsuo Umetsu, Izumi Kumagai, Tadafumi Adschiri, Wonmuk Hwang, and Winfried Teizer, "Quantum Dot Motion on Microtubules", Chemistry Letters, 査読有, 41, 1215-1217 (2012). DOI: 10.1246/cl.2012.1215
10. Daniel Oliveira, Do-Myoung Kim, Mitsuo Umetsu, Izumi Kumagai, Tadafumi Adschiri, and Winfried Teizer, "The assembly of kinesin-based nanotransport systems", Journal of Applied Physics, 査読有, 112, 124703(1-8) (2012). DOI: 10.1063/1.4769870

[学会発表](計 11 件)

1. 梅津 光央, 抗体フォールドを用いたイン

- ターフェイスデザイン:ナノ世界の糊として, 未来化学創造センター ナノバイオアセンブリワークショップ, 2013年11月15日, 福岡
2. Mitsuo Umetsu, Smart bio-design for interface molecules between nanomaterials, 日本化学会東北支部 70周年記念国際会議, 2013年9月28日, 仙台
 3. 梅津 光央, ナノを意識した蛋白質スマートデザイン, 生体機能関連化学部会 第28回若手フォーラム, 2013年9月26日, 名古屋
 4. Mitsuo Umetsu, Smart antibody designed from protein engineering, 2013 Korean Society for Biotechnology and Bioengineering (KSBB) Spring Meeting & International Symposium, 2013年4月12日, Gwangju, Korea
 5. Mitsuo Umetsu, Takamitsu Hattori, Takeshi Nakanishi, and Izumi Kumagai, Material-binding antibody as an interface tool for manipulating nano-materials, 2013 MRS Spring Meeting, 2013年4月2日, San Francisco, USA
 6. Rui Todokoro, Mitsuo Umetsu, Hikaru Nakazawa, Ryutaro Asano, Izumi Kumagai, Build up Design for Multivalent Antibodies on Multimeric Protein Platform, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月14日, 福岡
 7. Yasuko Seta, Mitsuo Umetsu, Hikaru Nakazawa, Seiichi Takami, Izumi Kumagai, Restructure of Sequential CDR Walking Approach in CAnIGET Method, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月12日, 福岡
 8. Rui Todokoro, Hikaru Nakazawa, Ryutaro Asano, Mitsuo Umetsu, Izumi Kumagai, LEGO design for multivalent antibodies expressed in E.coli, Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC) 2012, 2012年10月27日, 徳島
 9. Mitsuo Umetsu, Smart Bio-Design from Protein Engineering in the Field of Nanobiotechnology, The 19th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC) 2012, 2012年10月27日, 徳島
 10. Mitsuo Umetsu, Asami Ueda, Takeshi Nakanishi, Kentaro Hashikami, Ryutaro Asano, Izumi Kumagai, Protein engineering for site-specific bioconjugation chemistry: Construction of multiple functional lowmolecular antibodies, 第50回日本生物物理学会年会, 2012年9月22日, 名古屋
 11. Mitsuo Umetsu, Protein Engineering for Nano Engineering, 2012 Northeastern Asian Symposium, 2012年9月20日, 仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅津 光央 (UMETSU, MITSUO)

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 70333846