

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289308

研究課題名(和文) ヒト由来膜タンパク質の磁性粒子上での機能発現に向けたIVD法の開発

研究課題名(英文) Establishment of the in vitro docking (IVD) method for the functional expression of human membrane proteins on magnetic particles

研究代表者

吉野 知子 (Yoshino, Tomoko)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30409750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高い活性を保持した膜タンパク質を担持した磁性粒子の創製に向け、磁性細菌内で発現させたヒト由来タンパク質を、細胞外(in vitro)で磁性細菌粒子上に再構築するin vitro docking (IVD)法の確立を目的とした。IVD法のためのドッキングタンパク質を検討した後、甲状腺刺激ホルモン受容体(TSHR)をモデルとしてIVDに供し、リガンドとの結合能を評価した。更に、磁性粒子上への膜タンパク質発現の最適化に向けて、必要最低限の量のタンパク質を発現させて、適切なフォールディングを促す発現調節機構(Minimum expression system)の構築についても検討した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish the in vitro docking (IVD) method in the magnetotactic bacterium towards the development of the functional composites of bacterial magnetic particles (BacMPs) and human-derived membrane proteins. In the IVD method, recombinant proteins (including membrane proteins) expressed in the periplasmic space of the magnetotactic bacterium were assembled onto BacMPs, which were separately synthesized in the identical bacterium, with the aid of docking protein pairs after cell disruption. Several types of docking protein pairs were examined for the IVD method. Subsequently, as a proof-of-concept, thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) was displayed on the BacMPs through the IVD method. In addition, the minimum expression system was established in the magnetotactic bacterium for appropriate protein folding, which could be beneficial for functional expression of recombinant proteins.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：磁性粒子 膜タンパク質 in vitro docking 細胞内区画

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は、細胞の物質認識やシグナル伝達などの生命現象を司る重要な役割を果たしており、主な臨床治療標的である。治療薬の 60% が膜タンパク質に直接的または間接的に作用し、製薬メーカー各社はこの創薬探索研究に多くの資金を投入している。創薬探索の第一スクリーニングにはリガンド結合試験が欠かせないプロセスとなっているが、その前調製である「膜タンパク質の大量生産」、「精製」、「再構築膜の作製」に多くの技術的なハードルがあり、膜タンパク質ごとに条件設定をする必要があるため、多くの時間と労力がこの前調製に費やされている。そのため、リガンド結合試験用に簡易化・迅速化した膜タンパク質の調製法を確立することが創薬探索における革新的プロセスの提案に繋がると期待できる。

これまでに提案者は簡易な膜タンパク質調製法として、脂質二重膜で被覆されたナノメートルサイズの磁性粒子（マグネトソーム）を生合成する磁性細菌を用い、その磁性粒子上に外来（ヒト由来を含む）膜タンパク質を発現する“マグネトソームディスプレイ法”を開発してきた。本手法は磁性細菌を遺伝子組換えすることにより、膜タンパク質を発現させ、その細胞破砕物から磁性粒子を磁気分離することで、膜タンパク質調製の迅速化、簡易化、及び低コスト化を図ることが可能である。しかし、発現させた外来膜タンパク質により活性の低減や、活性をほとんど保持していない場合があることが課題であった。

そこで本研究では、磁性粒子上におけるヒト由来膜タンパク質の機能発現を目指し、新しい膜タンパク質の調製法である *in vitro* docking (IVD) 法 (図 1) の開発を目的とした。これまで膜タンパク質の活性（機能）が保持されない要因は膜タンパク質のフォールディングが行われていないことが原因と推測された。これはこれまでのマグネトソームディスプレイ法が還元的環境（細胞質内またはマグネトソーム）で膜タンパク質を発現する

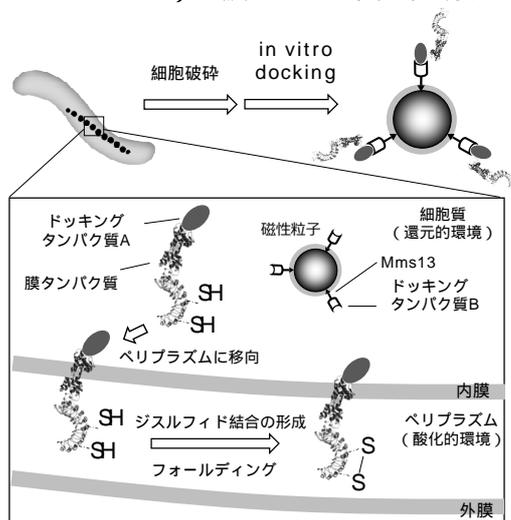


図 1. *in vitro* docking 法の概略

ことを前提としている為である。そこで IVD 法では、フォールディングを促す酸化的環境（ペリプラズム空間）で機能的なヒト由来膜タンパク質を発現させ、細胞破砕後に磁性粒子上に *in vitro* で docking (再構築) することとした。IVD 法により創製した膜タンパク質-磁性粒子複合体は、マグネトソームディスプレイ法の利点に加え、活性（機能）を有した状態で膜タンパク質を担持することができ、リガンド結合試験に応用可能であると考えられる。また本技術は創薬探索のみに留まらず、環境測定分野などの工学的応用や膜タンパク質の機能解析を始めとした基礎研究など多方面への波及効果が見込める革新的な技術である。

2. 研究の目的

本研究では、活性を保持した膜タンパク質-磁性粒子複合体の創製に向け、酸化的環境で発現させたヒト由来膜タンパク質を *in vitro* で docking (再構築) する IVD 法の開発を目的とした。標的タンパク質のペリプラズム空間での機能発現、IVD のためのドッキングタンパク質の検討を行い、ヒト由来膜タンパク質の標的リガンドとの結合能を評価した。また、磁性粒子上への膜タンパク質発現の最適化に向け、必要最低限の量を発現させて適切なフォールディングを促す Minimum expression system の構築のためのタンパク質発現調節の検討も実施した。

3. 研究の方法

ドッキングタンパク質を用いて *in vitro* docking における膜タンパク質の機能評価を行った。磁性粒子（マグネトソーム）上に局在するタンパク質である Mms13 にドッキングタンパク質 A を融合したアンカータンパク質を粒子上に発現させた。その一方で、ドッキングタンパク質 B にペリプラズム輸送シグナル配列、および粒子上へ固定化する標的タンパク質を融合し、ペリプラズム内で発現させた。それぞれを発現した磁性細菌を破砕し、粒子画分とペリプラズム画分を混合することで、粒子上への標的タンパク質の *in vitro* docking を行い、得られた磁性粒子上に標的タンパク質が固定化されているかを Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により確認した。ドッキングタンパク質 A、B のペアとして、細菌のセルロソームに見られるコヘシンとドックリンのペア、および抗体結合タンパク質 A の ZZ ドメインと IgG の Fc 領域のペアを検討した。

次いで、IVD 法より磁性粒子上に再構築した甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR、7 回膜貫通タンパク質) の機能評価を行った。まず、細胞内における TSHR-ドックリンと、Mms13-コヘシンの発現を、ウェスタンブロッティングにより確認した。次いで、酸化的環境であるペリプラズム空間で発現させた TSHR (TSHR_{ox}) を細胞破砕後に磁性粒子上に固定化

した際の TSHR 固定化量を ELISA により評価した。この時、対照実験として、IVD を用いず、従来通り還元的環境である細胞質で発現させた TSHR (TSHR_{red})を固定化した磁性粒子も実験に供し、TSHR 固定化量を比較した。その後、リガンドである甲状腺刺激ホルモン (TSH)との結合特性を評価するため、ビオチン標識した TSH とストレプトアビジン標識したアルカリフォスファターゼを用いて、粒子複合体上の TSHR (TSHR_{ox} または TSHR_{red}) と TSH の解離定数を測定した。更に TSHR の自己抗体への結合能及び構造保持を評価するために、TSHR に対する自己抗体であり、立体構造認識抗体である M22 モノクローナル抗体の結合を評価した。

加えて、必要最低限の標的タンパク質を細胞内に発現させる発現調節機構 (Minimum expression system)の構築のため、研究代表者が以前から構築してきたアンヒドロテトラサイクリン (ATc)による発現誘導システムを用いた、精密な膜タンパク質の発現制御条件を検討した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* docking (IVD)法による標的タンパク質の磁性粒子上への固定化

IVD法に用いるドッキングタンパク質のペアとして、コヘシンとドックリンのペア、および抗体結合タンパク質 Protein A の ZZ ドメインと IgG の Fc 領域のペアを評価し、いずれを用いた場合も、細胞破碎時に粒子画分とペリプラズム画分が混合されることで粒子上に標的タンパク質を固定化できることが確認された。これにより本研究の基盤技術である IVD 法を確立することができたと考える。以降の実験では、高い親和性 (K_d 値 $10^{-9} \sim 10^{-11}$ M)を示すコヘシンとドックリンのペアをドッキングタンパク質として用いることとした。

(2) IVD 法によるヒト由来膜タンパク質の機能向上

ヒト由来膜タンパク質のモデルとして TSHR を用いて、IVD 法による磁性粒子上への固定化を評価した。TSHR の N 末端にシグナル配列を融合し、ペリプラズム空間で発現するように設計した融合タンパク質が、全長発現していることをウェスタンブロッティングにより確認した。同様に、磁性粒子上のアンカー分子である Mms13 に融合したコヘシンの発現も確認した。これらのタンパク質を IVD 法で再構築し、TSHR_{ox}-磁性粒子複合体を構築した。

TSHR_{ox}-磁性粒子複合体と、従来のマグネトソームディスプレイ法により構築した TSHR_{red}-磁性粒子複合体における TSHR 固定化量を比較したところ、手法の違いによる固定化量に顕著な差は確認されなかった (表 1)。

表 1 磁性粒子上の TSHR 発現量及び自己抗体 (M22 IgG)結合量

	TSHR (ng/mg particles)	M22 IgG (ng/mg particles)
<i>in vitro</i> docking (IVD) 法	1.7 ± 0.7	0.54 ± 0.01
マグネトソーム ディスプレイ法 (従来法)	1.3 ± 0.1	0.06 ± 0.01

次に、IVD 法で構築した TSHR_{ox}-磁性粒子複合体と、従来法により構築した TSHR_{red}-磁性粒子複合体における TSH との親和性を評価したところ、それぞれの K_d 値は 3.3×10^{-7} M、および 1.0×10^{-6} M であった。このことから、IVD 法により構築した膜タンパク受容体は、従来法と比較して高いリガンド結合活性が保持されていることが示唆された。更に、立体構造を認識する TSHR に対する自己抗体を用いた結合試験では Mms13-TSHR と比較して結合量の向上が確認された (表 1)。この結果はペリプラズム空間の酸化的環境下で TSHR 中の S-S 結合の形成が促され、TSHR の機能の向上及び高次構造の保持につながったことを示唆している。

本検討よりヒト由来膜タンパク質を用いた場合においてもペリプラズム内で発現させることで高い機能を有した状態で発現可能であり、IVD 法によりそれらを効率的に磁性粒子上にディスプレイ可能であることが示唆された。

(3) Minimum expression system の構築に向けた発現調節の検討

磁性粒子上への標的タンパク質発現の最適化に向けて、必要最低限の標的タンパク質を細胞内に発現させる発現調節機構 (Minimum expression system)の構築を行った。前述した通り、ドックリン融合タンパク質発現を ATc により発現誘導を行えるよう調節した。細胞質内及び磁性粒子上における標的タンパク質の発現量を ELISA により評価したところ、細胞質での発現量は ATc 濃度 (0-500 ng/ml)依存的に向上していくことが確認された (図 2A)。一方で、磁性粒子上においては 200 ng/ml 以上の ATc を添加した場合、磁性粒子上へのドックリン融合タンパク質の固定化量は一定となった (図 2B)。これらの結果は、200 ng/ml の ATc 添加により、磁性粒子上のコヘシンへの結合は飽和に達し、それ以上の発現誘導は必要ないことを意味する。このことから、Minimum expression system のためには 200 ng/ml 程度の ATc 添加による発現誘導が適していることが示唆された。本検討により構築した発現制御系を利用し、効率的に磁性粒子上にディスプレイすることで細胞毒性を大きく低減させることが可能になると期待できる。膜タンパク質はその多くが過剰発現による細胞毒性が問題視されていることから、それらの問題点解決においても、

本発現調節機構は重要な知見となる。

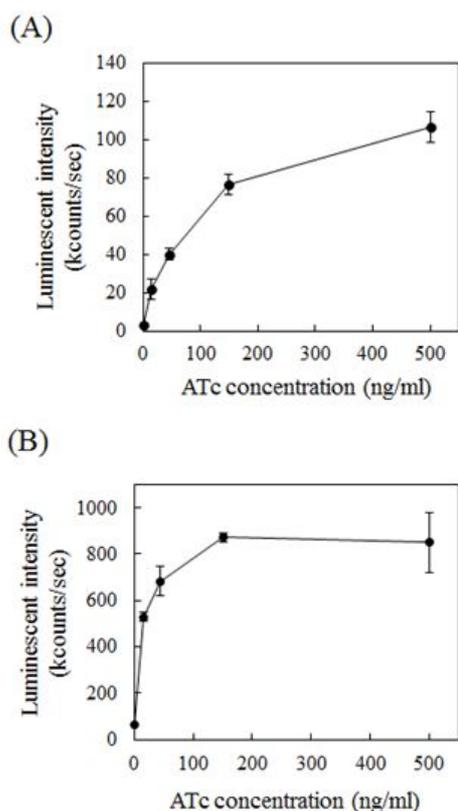


図2. 磁性細菌の細胞内(A)、または磁性粒子上(B)における標的タンパク質誘導発現量と添加した発現誘導剤 (ATc)濃度との相関

(4) 細胞内におけるドッキング (*In vivo* docking) の原理検証

本研究では、細胞外領域に S-S 結合を多数有する TSHR をモデル膜タンパク質として用い、酸化的環境であるペリプラズムにおいて S-S 結合の形成を促した。その後、異なる細胞内区画 (ペリプラズムと細胞質) でそれぞれ発現した組み換えタンパク質をドッキングタンパク質ペアの相互作用を介して磁性粒子上に固定化した。

一方、ドッキングタンパク質を介した固定化法を利用すれば、標的タンパク質の磁性粒子上への固定化を細胞内 (*in vivo*) で完了させることも原理上可能である。この *in vivo* docking 法は、含まれる少数の S-S 結合が少数であるタンパク質や水溶性タンパク質をドッキングさせる場合に適用できると考えられる。従来のマグネトソームディスプレイ法と異なり、アンカータンパク質 (Mms13) と標的タンパク質を別々に発現できるため、サイズの大いタンパク質を固定化する場合などにおいて特に有効であると考えられる。

そこで、本研究で確立したドッキング法の更なる適用性拡充を目指し、*in vivo* docking 法の原理検証を行った。ドッキングさせるタンパク質のモデルとして蛍光タンパク質を

採用し、磁性細菌の磁性粒子上に Mms13-コヘシンを、細胞質に蛍光タンパク質融合ドッキングタンパク質をそれぞれ発現させ、蛍光タンパク質の細胞内の局在解析をした。その結果、マグネトソーム上に蛍光が観察され、細胞質に発現した蛍光タンパク質融合ドッキングタンパク質が、磁性粒子上に発現しているコヘシンと結合していることが示唆された。更に、異なる細菌由来のコヘシンとドッキングタンパク質のペアを用いることで、GFP、mCherry という 2 種類の蛍光タンパク質を特異的に固定化することも確認された (図 3)。固定化された 2 種類の蛍光タンパク質間において蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が確認され、2 種類の組み換えタンパク質が極近傍に固定化されていることも示唆された。

以上の結果から、本研究で確立したドッキングタンパク質を利用した組み換えタンパク質-磁性粒子複合体の構築法は、磁性細菌の細胞外 (*in vitro*) のみならず細胞内 (*in vivo*) においても有効であり、様々なタンパク質-磁性粒子複合体の構築に応用できると期待される。

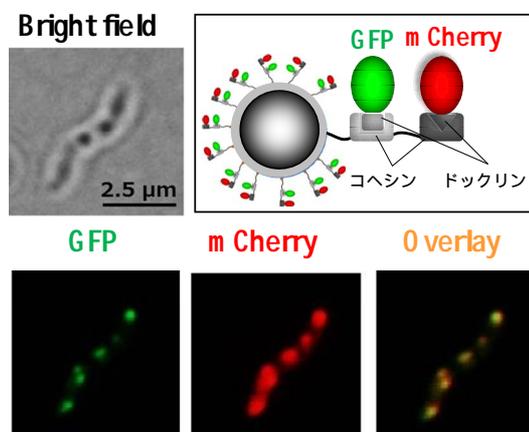


図3. *In vivo* docking を用いた 2 種類の蛍光タンパク質 (GFP および mCherry) の磁性粒子上へ固定化

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 7 件)

1) 吉野知子「磁性細菌が生合成する磁気微粒子のインターフェイス設計」*生物工学会誌*, vol. 94, 690-692 (2016) (査読無し)
https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9411/9411_tokushu_3.pdf

2) 吉野知子、本多亨「効率的なセルロース分解に向けた多酵素-磁性粒子複合体の生合成」*月刊バイオインダストリー*, vol. 33, 79-85 (2016) (査読無し)
https://www.cmcbooks.co.jp/products/detail.php?product_id=5144

3) Toru Honda, Takayuki Yasuda, Tsuyoshi Tanaka, Koji Hagiwara, Tohru Arai, Tomoko

Yoshino "Functional Expression of Full-Length TrkA in the Prokaryotic Host *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 by Using a Magnetosome Display System" Appl. Environ. Microbiol., 81, 1472-1476 (2015) (査読有り)

doi:10.1128/AEM.03112-14.

4) Toru Honda, Yoshiaki Maeda, Takayuki Yasuda, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino "Novel Designs of Single-chain MHC 1/peptide Complex for the Magnetosome Display System" Protein Eng. Des. Sel., 28, 53-58 (2015) (査読有り) doi: 10.1093/protein/gzu056

5) Toru Honda, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino "Stoichiometrically Controlled Immobilization of Multiple Enzymes on Magnetic Nanoparticles by the Magnetosome Display System for Efficient Cellulose Hydrolysis" Biomacromolecules, 16, 3863-3868 (2015) (査読有り)

doi: 10.1021/acs.biomac.5b01174

6) 吉野知子, 本多亨「タンパク質-磁性粒子複合体の in vivo 合成と創薬への展開」BIO INDUSTRY, vol. 32(4), 65-70 (2015) (査読無し)

https://www.cmcbooks.co.jp/products/detail.php?product_id=4865

7) 吉野知子, 前田義昌「微生物を用いたタンパク質-ナノ磁性粒子複合体の生合成」オレオサイエンス, vol.14, 433-438 (2014) (査読無し)

<http://doi.org/10.5650/oleoscience.14.433>

〔学会発表〕(計 9 件)

1) 田山爽也華、本多亨、伊藤康仁、田中剛、吉野知子「磁性粒子上へのセルラーゼ複合体の共局在によるセルロース分解能の向上」日本化学会 第97春季年会, 2017年3月16日-19日, 慶應義塾大学 日吉キャンパス (神奈川県)

2) 吉野知子「Production of functional biomaterials using genetically engineered microbes」Malaysia-Japan Joint International Conference, 2016年9月6日-7日, Seri pacific hotel, Kuala Lumpur, Malaysia

3) 吉野知子「マグネトソームディスプレイ法による磁気微粒子インターフェイスの分子デザイン」最新バイオインターフェース研究会, 2016年3月31日, 三重大大学生物資源学部 (三重県)

4) 吉野知子「磁性細菌を用いたナノ磁性粒子表面の分子設計とバイオプロセス創成」第89回日本生化学会大会, 2016年9月25日-27日, 東北大学川内北キャンパス (宮城県)

5) 萩原優里、本多亨、田中剛、吉野知子「自己抗体計測に向けた甲状腺刺激ホルモン受容体-ナノ磁性粒子複合体の開発」日本化学会 第96春季年会, 2016年3月24日-27日, 同志社大学 京田辺キャンパス (京都府)

6) 本多亨、田中剛、吉野知子「マグネトソームディスプレイによる磁性粒子上へのセル

ラーゼ複合体の固定化制御」第67回日本生
物工学会大会, 2015年10月26日-28日, 城山
観光ホテル (鹿児島)

7) 鹿島大揮、本多亨、前田義昌、田中剛、吉野知子「リガンドハンティングに向けた神経成長因子受容体-ナノ磁性粒子の開発」日本化学会 第95春季年会, 2015年3月26日-29日, 日本大学 理工学部船橋キャンパス/薬学部 (千葉県)

8) 萩原優里、本多亨、菅又泰博、田中剛、松永是、吉野知子「in vitro docking 法による単鎖抗体の磁性細菌粒子上への機能発現」第66回日本生化学会大会, 2014年9月9日-11日, 札幌コンベンションセンター (北海道)

9) 吉野知子「タンパク質-磁性粒子複合体の生合成と創薬探索ツールとしての活用」新技術説明会, 2014年6月17日, JST東京本部別館ホール (東京都)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~biomol/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉野 知子 (YOSHINO TOMOKO)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：30409750

(2)研究分担者

前田 義昌 (MAEDA YOSHIAKI)

東京農工大学・大学院工学府・助教

研究者番号：30711155

(3)連携研究者

田中 剛 (TANAKA TSUYOSHI)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：20345333

(4)研究協力者

該当なし