

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06582

研究課題名(和文)合理的デザインによる高感度バイオ分子間相互作用検出用クッションタンパク質の創製

研究課題名(英文)Creation of functional cushion protein for a highly sensitive bimolecular interaction detection system by rational molecular design

研究代表者

今中 洋行 (Imanaka, Hiroyuki)

岡山大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：10379711

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)：バイオ分子間相互作用検出の基盤技術であるバイオ分子の固体表面上への固定化に関し、表面親和性ペプチドタグと超好熱菌由来のCutA1タンパク質をクッション性足場タンパク質として利用した高度機能的固定化法の検証を行った。水晶振動子マイクロバランス法による評価を通じ、合理的デザインによって金表面上における精密固定化配向制御が可能で相互作用検出感度の向上が可能なりガンド分子を創製できた。また、金ナノ粒子親和性ペプチドを独自に開発し、比色法による相互作用の高感度検出への応用が可能であることを示した。さらにCutA1へのVHH抗体の挿入が可能な部位を見出し、高い分子デザイン許容性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The applications of combinations of surface affinity peptide-tag and cushioning scaffold protein, CutA1 from a hyperthermophilic archaeon, were examined in detail to construct functional ligand biomolecular immobilized surfaces. Through the evaluations of non-labelled biomolecular interaction detection after immobilizations of rationally designed various CutA1s by quartz crystal microbalance (QCM), the importance of precise control of ligand orientation with avoiding steric hindrance to construct highly sensitive interaction detection system was clarified. On the other hand, an original affinity peptide of gold nanoparticle (AuNP-tag) was screened and its applications for sensitive colorimetric interaction detection was demonstrated with CutA1 scaffold. In addition, possible VHH antibody insertion site was successfully found in CutA1 and thus expansion of molecular design tolerance of CutA1 was verified.

研究分野：生体分子工学

キーワード：生体分子 固定化 相互作用 蛋白質 ペプチド リガンド 超好熱菌

1. 研究開始当初の背景

昨今のポストゲノム時代における研究は急速に進展しており、生命現象をより深く理解すべく、転写プロファイルを網羅的に評価するトランスクリプトーム解析や、多様なタンパク質の構造・機能を解析するプロテオーム研究が進められてきている。さらには、メタボロームを含めたオミックス解析技術の発展は顕著である。そのような状況下、生命現象が複雑なバイオ分子間相互作用ネットワークによって支えられている事実は不変である。つまり、オミックス解析により得られる膨大な情報の理解は、バイオ分子間相互作用の検出・評価によって本質的かつ相互にサポートされうるといえる。そして、バイオ分子間相互作用を *in vivo* あるいは *in vitro* で精度よく再現する技術は、食品分析、環境分析、生体材料、バイオセンシング、創薬や医療診断など多彩な用途への適用が可能な基盤であることから、さらなる開発・改良を含め、新たなブレークスルーが求められている。

2. 研究の目的

バイオ分子間相互作用検出の基盤技術であるバイオ分子の固体表面上への固定化に関し、ナノ界面におけるリガンドバイオ分子の機能・配向の精密制御を評価すべく、様々な合理的分子デザインを施す。そして固定化基材に対応した表面親和性タグペプチドの探索・利用や、クッション性足場タンパク質の分子挿入許容性に関する調査を進める。すなわち、固体表面親和性ペプチドおよびスパーサーとして構造が極めて安定なクッション性足場タンパク質 (CutA1) を相乗的に利用したリガンドバイオ分子の高度機能的固定化法を検証し (図1参照)、これを用いた簡便、迅速かつ高感度なバイオ分子間相互作用検出システムの確立を目指す。

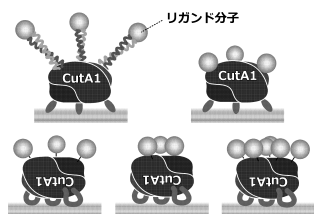


図1 CutA1 を基盤とした分子デザインの概要

3. 研究の方法

リガンドバイオ分子を異なる固体表面へ部位特異的固定化すべく各種固体表面親和性ペプチドをタグとして利用した (金表面親和性ペプチド: Au-tag, 金ナノ粒子親和性ペプチド: AuNP-tag)。クッションタンパク質CutA1を足場分子として用い、標的リガンドバイオ

分子を高密度で、相互作用における立体障害を限りなく低減させつつ固定化し、アナライトとの相互作用を感度よく検出するシステムの開発を進めた。このとき固定化特性、構造安定性などの解析を通じて分子レベルから合理的にクッションタンパク質をデザインし、評価した。

(1) QCMによる金表面上におけるバイオ分子間相互作用検出

リガンドバイオ分子をペプチド (His-tag, StrepTagII (STII))、固定化モデル表面を金とした。そして、水晶振動子マイクロバランス法 (QCM) により、様々なデザインを施したクッション性足場タンパク質CutA1の固定化特性ならびに分子間相互作用検出を評価した。発現・精製後、各濃度に調整したリガンドタンパク質100 μ Lをセンサーチップに3回供し、固定化させた。その後、表面のブロッキングのために1 mg/mL BSAを100 μ L添加した。最後に、抗His-tag抗体あるいはStreptavidin (SA)をアナライトとして添加し、固定化リガンド分子と相互作用させた。リガンドタンパク質及びアナライトタンパク質添加後の振動数変化から固定化量と相互作用量を評価した。測定は25°C、流速50 μ L/min、ランニングバッファーとして1×PBS (pH 7.4)を用いた。

(2) ペプチドアレイを用いた金ナノ粒子表面親和性ペプチド (AuNP-tag) の取得

T7 ファージライブラリーより取得した金表面親和性ペプチド群を基に、変異体を含めた計 649 種類の配列をデザインし、ペプチド固相合成法によりニトロセルロース膜状にスポット合成した。合成したペプチドアレイについて、直径 2 mm にパンチアウトし、96 穴マイクロプレートのウェルにペプチドディスクとして固定化して用いた。洗浄 ブロッキング 洗浄後、金ナノ粒子懸濁液を添加し、30°C、2 hr 静置した。上清の 780 nm と 530 nm の吸光度比を分散・凝集の指標とした (Aggregation index = Abs.780/Abs.530)。一方、ペプチドディスクに吸着した金を定量するために、王水を用いて金を溶解し、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)を用いて金ナノ粒子の定量を行なった。

(3) 金ナノ粒子とクッションタンパク質を用いたバイオ分子間相互作用の比色検出

リガンドバイオ分子固定化の際の分散・凝集特性を指標に金ナノ粒子へのワンステップ修飾を試みた。表面親和性ペプチドタグとしてAuNP-tag、バイオ分子間相互作用モデルとしてSTII-ST (StrepTactin)、STII-SA間相互作用を採用した。そして、CutA1を足場とした各種リガンドバイオ分子を用い、ワンステップ修飾、イオン強度、ゼータ電位および金ナノ粒

子凝集特性に応じた分子間相互作用の比色検出を行った。

(4) 表面親和性ペプチド連結クッションタンパク質 CutA1 への VHH 抗体の連結・挿入ならびにバイオ分子間相互作用検出システムの検証

クッション性足場タンパク質 CutA1 へのリガンド分子挿入・連結に関し、分子デザインの可能性を検証すべく、配列許容性の検討を行った。連結・挿入分子として、分子認識素子としても有用な VHH 抗体（抗 GFP）を用いた。ペプチド連結・挿入の場合と同様のフォーマットで VHH 抗体が配向するようにそれぞれデザインし、宿主大腸菌を用いて発現させ、精製した。調製したリガンド分子の構造安定性を評価するとともに、QCM により固定化特性ならびに GFP をアナライトとした相互作用検出特性について詳細に調べた。

4. 研究成果

(1) QCMによる金表面上におけるバイオ分子間相互作用検出

固体表面親和性ペプチドおよび構造が安定なクッションタンパク質である CutA1 を足場兼スペーサーとして利用する標的バイオ分子の高度機能的固定化法の確立を図った。まず、超好熱菌由来の三量体タンパク質である CutA1 のクッションタンパク質としての適用を、固体表面との相互作用による変性リスクが大きい金表面上で調査すべく、Au-tag を介したリガンドバイオ分子の部位特異的固定化を図り、QCM を用いた相互作用測定を試みた。多様な分子デザインを施し、発現させた各種デザイナーキメラタンパク質を精製した。まず、His-tag をリガンドとし、固定化配向制御性を評価するため、His-tag 提示面と同じあるいは反対面への負の荷電性を有する 6 残基のアスパラギン酸 (D6) 提示の有無が Au-tag を介した部位特異的固定化効率に及ぼす影響を調査した。その結果、D6 ペプチドの連結あるいは挿入により、その反対面に提示した Au-tag を介したリガンドバイオ分子の固定化配向制御能が向上し、抗 His 抗体との相互作用がより厳密に制御されることがわかった。つまり、クッションタンパク質の荷電特性を変化させ、金表面との静電的相互作用を制御することがさらなる固定化配向制御効率向上の鍵であることが示唆された。

また、金表面上でペプチド - タンパク質間相互作用のモデルとして弱い相互作用 ($K_d = 72 \mu\text{M}$) である STII-SA 間相互作用を解析する

ため、CutA1 を基盤として様々なデザインした各種リガンド分子の固定化を行った。QCM センサーチップ表面への各種リガンド分子の固定化による振動数変化とリガンド分子の分子量より見かけの固定化密度を算出したところ、全て同程度の密度で固定化され、単層吸着を考えた場合、ほぼ最密充填状態であることが示唆された。その後、アナライト分子である SA を添加した。その結果、直接 STII を CutA1 内に束縛した場合と比べ、フレキシブルリンカー、EK-coil をスペーサーとして挿入することで相互作用量が向上した。したがって、相互作用における立体障害の緩和が、検出感度向上に効果的であることがわかった。一方、N 末端あるいは C 末端にそれぞれ STII を遊離状態で連結した場合、相互作用直後にアナライトの解離が見られたが、STII を両末端に連結することで結合後の SA の解離が、大幅に抑制され、相互作用検出量が顕著に向上した。このことから、リガンドの高密度化によりアナライト 1 分子あたりの相互作用サイト数が増え、多点で相互作用することにより結合力が向上したことが示唆された (図 2)。つまり、CutA1 へのリガンド分子の挿入あるいは連結後においても構造安定性が維持されることが、スペーサー等を利用したリガンド分子の提示様式により、固定化後の相互作用検出感度が影響されることがわかった。

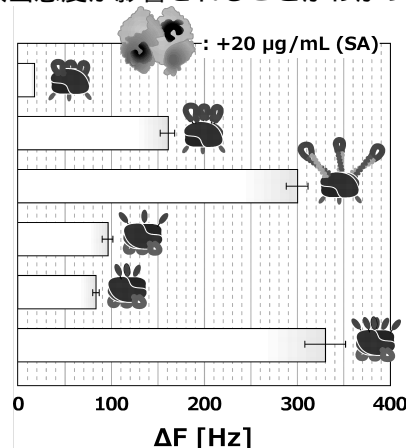


図2 CutA1を用いて固定化した各種STIIとSA間のQCMによる相互作用検出

(2) ペプチドアレイを用いた金ナノ粒子 (AuNP) 表面親和性ペプチドの取得

独自に取得した金親和性ペプチドを含む検討用の任意ペプチドアレイを用いてペプチドアレイ - 金ナノ粒子懸濁液を接触させた際、バルク中において金ナノ粒子の凝集が確認された。そこで、溶液と接触させた後の上清を採取し、Fourier 変換赤外分光分析、ESI-MS 測定により解析した結果、セルロース膜 (ペプチドディスク) 上からのペプチド

の溶出が確認できた。すなわちバルク溶液中の金ナノ粒子の凝集が溶出したペプチドに起因することが分かった。そこで、ペプチドアレイを利用し、金ナノ粒子に対する親和性だけでなく、溶出ペプチドによる凝集特性についても包括的に評価することとした。改めて設計した、数種類の金表面親和性ペプチドの置換変異体などを含む、計 649 種類のペプチドアレイを用い、それぞれのペプチドの金ナノ粒子に対する親和性(ICP-MS)及び凝集特性(Aggregation index = Abs.780/Abs.530)の評価を進めた。その結果、ほとんどのペプチドについて、金ナノ粒子への親和性が高いほど凝集性も高い傾向がみられた。配列との相関をみたところ、金ナノ粒子の分散・凝集が各ペプチドとの静電的相互作用におよそ支配されていると考えられた。しかし、相互作用に寄与するであろう残基の置換変異ペプチドの中から、その傾向に沿わず、金ナノ粒子に対する高い親和性と粒子分散安定性を兼ね備えたペプチドを新規に得ることができた(図3)。そこで、これを金ナノ粒子親和性ペプチド AuNP-tag とした。一方、従来、共有結合による強い結合が報告されているシステインについては、1~6 残基の連続的な配列のいずれについても金ナノ粒子への結合がほとんど見られず、短時間での共有結合形成が見込めないことが示唆された。

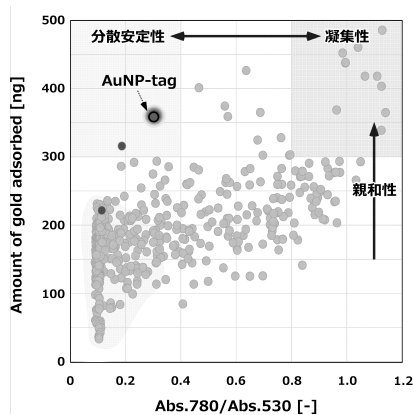


図3 ペプチドアレイを用いた AuNP-tag のスクリーニング

(3) 金ナノ粒子とクッションタンパク質を用いたバイオフィン相互作用の比色検出

金ナノ粒子親和性ペプチド AuNP-tag を用い、クッションタンパク質を介したリガンドペプチド STII の固定化が可能であるか検討した。まず、金ナノ粒子と各種 AuNP-tag 連結 CutA1 タンパク質を混合し、インキュベーション後、終濃度 1% の NaCl 水溶液を添加し、凝集が生じないことを確認した。これにより、ワンステップでリガンド分子(STII)

を固定化できることがわかった。各タンパク質でワンステップ修飾した金ナノ粒子懸濁液にアナライト分子 SA を添加した結果、アナライト濃度に依存した金ナノ粒子の凝集が確認された(図4)。つまり、金ナノ粒子に提示されたリガンドペプチド STII と SA との相互作用により粒子同士が架橋され、凝集したと考えられた。また、金ナノ粒子を懸濁する PBS バッファーの希釈倍率を変え、塩濃度を変化させたところ、塩濃度の増加により検出感度が向上した。このとき、リガンド修飾金ナノ粒子のゼータ電位は、1.5 mM, 78.5 mM, 393 mM の塩濃度でそれぞれ -25.0 mV, -14.2 mV, -7.48 mV であった。つまり、拡散電気二重層の圧縮によって、金ナノ粒子がより凝集しやすい状態となり、粒子同士の静電反発の緩和によって粒子間距離が縮まり、相互作用による架橋が生じやすくなり、その結果相互作用検出の感度が向上したと考えられた。

また、この凝集反応が特異的であることを確認するためのコントロールとして、リガンドペプチドを挿入していない AuNP-tag 連結 CutA1 をリガンドバイオフィンとして固定化する、あるいはあらかじめビオチンで相互作用部位をブロックした SA をアナライトとして用いる、それぞれの場合で相互作用検出を試みた。その結果、いずれについても金ナノ粒子の凝集は見られなかったことから、STII 挿入 CutA1 を固定化して検出された金ナノ粒子の凝集が特異的な分子間相互作用によるものであることがわかった。

さらに、ペプチド STII-AuNP-tag を修飾した金ナノ粒子を用いた相互作用検出系と比べ、CutA1 を用いた場合の方が、リガンドバイオフィン固定化後において、高塩濃度でも粒子が安定に分散を維持できた。これは静電反発に加え、CutA1 の高高さによる立体反発が生じたためと考えられた。塩への耐性が高く、多様なサンプルの比色検出への応用に期待できたことから、CutA1 を用いるメリットが示された。

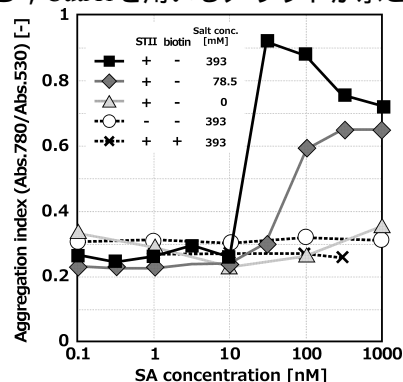


図4 CutA1を用いて金ナノ粒子上に固定化したSTIIとSA間の相互作用検出

(4) 表面親和性ペプチド連結クッションタンパク質 CutA1 への VHH 抗体の連結・挿入ならびにバイオ分子間相互作用検出システムの検証

安定な構造を有するクッション性足場タンパク質 CutA1 へのタンパク質(VHH 抗体)の連結・挿入を検討した結果, CutA1 の N 末端あるいは C 末端に加え, 分子内への挿入も可能であることがわかった。そこで, これらを精製し, 金表面上に固定化したところ, 一分子あたりの推定占有面積が小さいほどより高密度に固定化されることがわかった。また, クッションタンパク質を用いない場合, 物理吸着と比べ, Au-tag を連結することにより VHH 抗体の固定化密度が高かったことから, Au-tag を介した固定化配向制御が示唆された。続いて, 各種リガンド分子の固定化後, アナライト(GFP)を添加し相互作用検出を行った(図5)。その結果, VHH 抗体の物理吸着では GFP との相互作用はほとんど検出されなかったが, Au-tag の連結(VHH-Au)により相互作用検出量は向上した。さらに, CutA1 をクッション性足場タンパク質として用いた場合, CutA1 内への VHH の挿入あるいは C 末端への連結で非常に高い相互作用検出量を得た。ところが, EK-coil をさらに挿入する, または, N 末端に VHH 抗体を連結すると相互作用検出量が大きく減少したことから, 発現した VHH 抗体の折り畳み不全による分子認識能の低下が示唆された。これは熱安定性の評価によっても支持された。一方, VHH 抗体の CutA1 内への挿入によりタンパク質の熱安定性が顕著に向上した。したがって, この分子デザインは, 挿入リガンド分子の機能低下を抑制するとともに, 固体基材表面との直接的な相互作用を CutA1 により緩和できると考えられた。そして, ペプチドからタンパク質まで幅広いリガンドバイオ分子を挿入できる極めて有用なサイトであることがわかった。

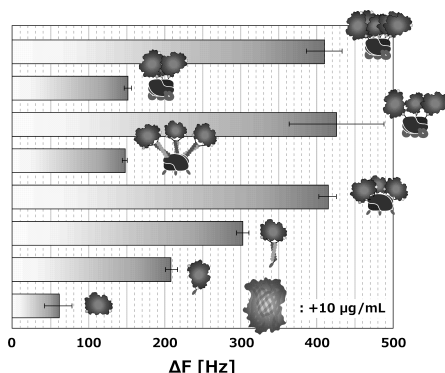


図5 QCMによる各種VHH抗体-GFP間相互作用検出

以上の結果より, 固体表面親和性ペプチドタグとクッション性足場タンパク質CutA1を用い, 合理的な分子デザインを通じて, 様々な固体表面上においてバイオ分子間相互作用を精度よく再現し, 検出の高感度化が可能であることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

H. Imanaka, D. Yamadzumi, K. Yanagita, N. Ishida, K. Nakanishi and K. Imamura, The use of a proteinaceous "cushion" with a polystyrene-binding peptide tag to control the orientation and function of a target peptide adsorbed to a hydrophilic polystyrene surface.

Biotechnol. Progress, 32(2), 527-534, 2016

〔学会発表〕(計22件)

H. Imanaka, K. Date, H. Matoba, N. Ishida and K. Imamura, Design of Functional Molecular Recognition Element by Utilizing Structurally Robust Protein Scaffold, Young Asian Biological Engineers' Community 2017, 2017年10月19日, 西安市, 中華人民共和国

今中 洋行, 伊達 弘輝, 石田 尚之, 今村 維克, CutA1 を足場とした機能性分子認識素子の開発, 化学工学会第49回秋季大会, 2017年9月22日, 名古屋・名古屋大学

伊達 弘輝, 石田 尚之, 今村 維克, 清瀬 紀彦, 宮崎 誠生, 今中 洋行, CutA1 をリガンド足場として利用した生体分子間相互作用高感度検出のための分子デザイン, 第69回日本生物工学会大会, 2017年9月13日, 東京・早稲田大学

今中 洋行, 伊達 弘輝, 沖 拓哉, 石田 尚之, 今村 維克, 超好熱菌由来タンパク質 CutA1 を足場とした機能性分子認識素子のデザイン, 第17回日本蛋白質科学会年会, 2017年6月21日, 仙台

今中 洋行, 伊達 弘輝, 石田 尚之, 今村 維克, CutA1 を用いた分子デザインによりタンパク質間相互作用検出を高感度化する方法, 日本農芸化学会2017年度大会, 2017年3月19日, 京都・京都女子大学

今中 洋行, 伊達 弘輝, 的場 晴香, 沖 拓哉, 石田 尚之, 今村 維克, 弱い生体分子間相互作用を CutA1 の分子デザインを通じて感度よく検出する, 化学工学会第82年会, 2017年3月8日, 東京・芝浦工業大学

H. Imanaka, Utilization of Hyperstable CutA1 as a Scaffold for Multiple Ligand Display in Biomolecular Recognition System, 2nd Korea-Japan smart biodesign workshop, 2017年2月4日, 仙台

H. Imanaka, K. Date, H. Matoba, and K. Imamura, Influence of Orientation and Spatial Arrangement of Ligand Biomolecules on Functionality after Immobilization on Solid Materials, Global Research Efforts on Energy and Nanomaterials (GREEN

2016), 2016年12月23日, 台北, 台湾

今中洋行, 伊達弘輝, 的場晴香, 石田尚之, 今村維克, クッションタンパク質の分子デザインによるバイオ分子間相互作用の高感度化, 真空・表面科学合同講演会: 第36回表面科学学術講演会・第57回真空, 2016年11月29日, 名古屋

H. Imanaka, K. Date, H. Matoba, N. Ishida and K. Imamura, Investigations of Biomolecular Interaction Detection System utilizing Proteinaceous Cushion, Young Asian Biological Engineers' Community 2016, 2016年10月, 宮崎

H. Imanaka, K. Date, H. Matoba, N. Ishida and K. Imamura, Investigations of Biomolecular Interaction Detection System utilizing Proteinaceous Cushion, Young Asian Biological Engineers' Community 2016, 2016年10月, 宮崎

伊達弘輝, 石田尚之, 今村維克, 今中洋行, CutA1及びVHH抗体を利用した高感度バイオセンシングシステムのデザイン, 第68回日本生物工学会大会, 2016年9月30日, 富山

H. Imanaka, K. Date, Y. Inaba, N. Ishida and K. Imamura, Molecular Design of Hyperthermostable Proteinaceous Cushion for Sensitive Biomolecular Interaction Detection System, 11th International Congress on Extremophiles, 2016年9月, 京都

伊達弘輝, 稲葉優樹, 石田尚之, 今村維克, 今中洋行, リガンドおよびドメインの挿入がクッションタンパク質CutA1の構造安定性と相互作用検出感度に及ぼす影響, 化学工学会第48回秋季大会, 2016年9月7日, 徳島

今中洋行, 伊達弘輝, 的場晴香, 石田尚之, 今村維克, 固体表面上に生体分子を機能的に固定化し, 感度よく相互作用をみる方法, 粉体工学会第52回夏期シンポジウム, 2016年8月9日, 神戸

H. Imanaka, K. Date, Y. Maehara, N. Ishida and K. Imamura, Molecular Design of Proteinaceous Cushion for Sensitive Biomolecular Interaction Detection System, 17th European Congress on Biotechnology, 2016年6月, クラクフ(ポーランド)

今中洋行, 伊達弘輝, 前原康秀, 稲葉優樹, 石田尚之, 今村維克, CutA1を基盤としたリガンドデザインによるバイオ分子間相互作用検出の高感度化, 化学工学会第81年会, 2016年03月14日, 大阪

H. Imanaka, T. Kunikata, M. Ishimaru, R. Matsushita, N. Ishida, and K. Imamura, Design of Sensitive Biomolecular Interaction Detection System on Solid Surfaces, Asian Congress on Biotechnology (ACB2015) (国際学会), 2015年11月18日, Kuala Lumpur, Malaysia

今中洋行, 重森陽士郎, 本多裕之, 金ナノ粒子の機能化に資するアンカーペプチドの探索, 第67回日本生物工学会(招待講演), 2015年10月27日, 鹿児島

H. Imanaka, Design of sensitive peptide-protein interaction detection system on solid surfaces, 30th Anniversary Meeting and International Symposium of KSBB(国際学会), 2015年10月14日, Incheon, Korea

② 今中洋行, 稲葉優樹, 松下瑠奈, 重森陽士郎, 石田尚之, 今村維克, 超好熱菌由来CutA1を基盤としたリガンドデザインと分子間相互作用検出, 第15回日本蛋白質科学会, 2015年06月25日, 徳島

〔図書〕(計1件)

今中洋行, クッションタンパク質を用いたリガンド分子固定化法の開発と利用, シーエムシー出版, 細胞・生体分子の固定化と機能発現(黒田章夫監修), 2018年, 294(47-57)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今中洋行(IMANAKA HIROYUKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号: 10379711