

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13313

研究課題名(和文)新規多次元淘汰法によるタンパク質連結構造体形成を可能にするペプチドリガーゼの創製

研究課題名(英文)Creation of peptide ligase that enables protein-linked structure formation by novel function screening method

研究代表者

一木 隆範 (Ichiki, Takanori)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授

研究者番号：20277362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生化学反応を担う様々なタンパク質を人工的に設計、配置し、生化学反応ネットワークを再構築する技術が期待されている。本研究では、タンパク質やペプチドの分子間連結、固相上への集積化を可能とするペプチドリガーゼを創製する手法を提案し、必要な基盤技術の開発と検証を行った。グラム陽性菌由来のタンパク質転移酵素であるSortaseを用いて無細胞合成タンパク質を固相上に固定化する技術を研究し、無細胞翻訳系とSortase反応系を共存させる際の課題を明らかにし、解決策を議論した。これらの知見は、マイクロアレイ化技術と組み合わせることによりSortase変異体のスクリーニング法開発に資すると期待される。

研究成果の概要(英文)：It is expected to develop a technique for artificially designing and arranging various proteins responsible for biochemical reactions and reconstructing the biochemical reaction network. In this study, we propose a method to create peptide ligase that enables intermolecular coupling of proteins and peptides, and accumulation on solid phase, and developed and verified necessary basic technologies. We developed a technique to immobilize the cell-free synthesized protein on the solid phase using sortase, a protein transferase derived from gram-positive bacteria. Then we experimentally clarified the problems which become prominent in the coexistence of cell-free translation and sortase reaction system, and discussed their solutions. These results are expected to contribute to the future development of screening technology for sortase variants by combining with microarray chip technology.

研究分野：ナノバイオテクノロジー

キーワード：ペプチドリガーゼ タンパク質アレイ 酵素改変 Sortase

1. 研究開始当初の背景

生化学反応を担う様々なタンパク質を人工的に設計、配置し、生体内で起こっているような高効率・高収率な生化学反応ネットワークを再構築する技術が期待されている。

現在、生体物質の検出や精製、バイオセンサーや酵素燃料電池の作製を目的として、タンパク質の固相上への固定化が行われている。タンパク質を固相上に固定化するには、疎水性相互作用や静電相互作用を利用した非特異的な固相吸着の他、タンパク質に付加したペプチドタグや酵素タグを介して固定化する手法がある。タグを利用した固定化方法は、タグ融合タンパク質を選択的に固定化できる為、同一固相上への複数種タンパク質の固定化に向いているが、複数種のタンパク質を精緻に配置し、集積化するにはタグの種類が不足している。

グラム陽性菌由来のタンパク質転移酵素である sortase は、あるペプチド配列同士を選択的に連結することから、任意のタンパク質同士の連結や、タンパク質を固相に固定化する為のツールとして用いられている。現在、連結できるペプチド配列は一組しかないが、認識基質配列の異なる sortase 変異体を複数種開発できれば、複数タンパク質の連結制御や基板上への集積化などの高度なタンパク質配置操作が可能になると考えられる。

研究代表者は、タンパク質の機能改変を可能とするタンパク質変異体マイクロアレイ技術を開発している。本技術は 100 万種以上のタンパク質変異体をチップ上で無細胞合成することによりマイクロアレイ化する技術であり、アレイ化されたタンパク質変異体ライブラリーの定量機能評価に基づいたスクリーニングを可能とする。本マイクロアレイ技術を利用することで、認識基質配列の異なる sortase 変異体の開発が可能になると考えた。

2. 研究の目的

無細胞翻訳系を利用したタンパク質変異体マイクロアレイ技術による、認識基質配列の異なる sortase 変異体スクリーニング法を提案する。マイクロアレイ基板上に任意のペプチド配列を固定化しておき、その基板上で sortase 変異体を無細胞合成することで、基板上に固定化されたペプチド配列を認識し、自らを連結する機能を有する sortase 変異体をスクリーニングする。その後、基板上に固定化された sortase 変異体から、非特異的な基質配列認識能を持つものを排除する二次スクリーニングを行う。2 段階のスクリーニング操作 (多次元淘汰) を行うことで、あるペプチド配列を特異的に認識する sortase 変異体を開発する手法を提案する。

本手法を実行するためには、① sortase の

合成と、②合成された sortase による基板上固定化ペプチドへの連結反応という 2 つの反応を無細胞翻訳系中で連続して行う必要がある。Sortase の無細胞合成、および sortase によるタンパク質の固相化に関する先行研究は個別に為されているが、両者を組み合わせた研究はまだ為されていない。そこで、本研究では無細胞翻訳系中で無細胞合成タンパク質を sortase 反応によって固相上に固定化する技術の構築を目指した。

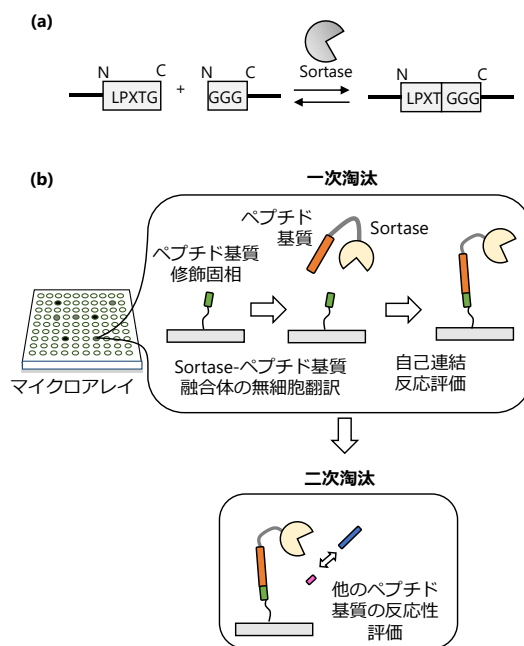


図 1. 多次元淘汰法. (a) sortase によるペプチド連結反応. (b) sortase の基質認識配列を改変する多次元淘汰法

3. 研究の方法

Sortase の基質であるオリゴグリシンを修飾したガラス基板を作製し固相担体として用いる。Sortase の基質であるペプチド配列 LPETG に蛍光標識したものを、sortase 反応によってオリゴグリシン修飾基板に固定化することにより、タンパク質固定化用固相担体としての機能を評価する。

Sortase および蛍光標識オリゴグリシンを含有する無細胞翻訳系において、LPETG ペプチド融合緑色蛍光タンパク質 (GFP) を無細胞翻訳する。無細胞合成された GFP と蛍光標識オリゴグリシンの連結効率を指標に、無細胞翻訳反応と sortase 反応のカップリングについて評価する。

最後に、オリゴグリシン修飾固相存在下で sortase 融合タンパク質を無細胞合成する。無細胞合成されたタンパク質の固相上への固定化を指標に、無細胞合成 sortase の固相上固定化の可能性について評価する。

4. 研究成果

本研究を通して、無細胞翻訳系と sortase 反応系を共存させる際の課題を明らかにし、解決策を議論した。以下に、その成果を述べる。

(1) ペンタグリシンペプチド基板の作製

アミノプロピルトリエトキシシランでガラス基板表面をアミノ化し、アミノ基末端を Fmoc 基で保護したペンタグリシンペプチドのカルボキシル基末端とペプチド結合させた。最後に Fmoc 基を脱保護することにより、ガラス基板上にペンタグリシンを修飾した固相担体を作製した (図 2a)。

蛍光標識 ALPETG ペプチドを sortase とともにペンタグリシン修飾基板に滴下し反応させたところ、蛍光標識ペプチドの固定化が確認され (図 2b)、sortase 反応によるタンパク質固定化用固相を作製することが出来た。

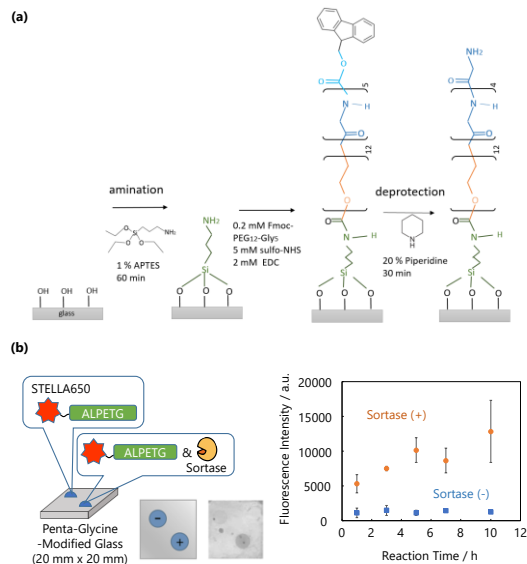


図 2. ペンタグリシンペプチド基板. (a) ペプチド修飾方法. (b) ペプチドの基板上固定化. Sortase 存在下でのみ蛍光標識ペプチドがペンタグリシン修飾基板に固定化された。

(2) Sortase による無細胞翻訳タンパク質とペプチドの連結

コントロール実験として、小麦胚芽由来無細胞翻訳系を用いて LPETG ペプチド融合 GFP を合成した後、テトラメチルローダミン (TMR) 標識ペンタグリシンペプチドおよび sortase と混合することで、無細胞翻訳 GFP とペンタグリシンペプチドの連結反応を確認した。SDS-PAGE で反応を追跡したところ、GFP のバンドが反応時間依存的にシフトしたことから、無細胞合成 LPETG 融合 GFP とペンタグリシンが sortase によって連結で

きることが確認された (図 3)。

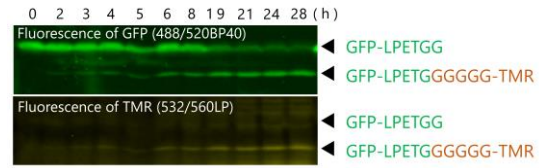


図 3. Sortase による無細胞合成 LPETG 融合 GFP と TMR 標識ペンタグリシンペプチドの連結. 上段: GFP 蛍光検出. 下段: TMR 蛍光検出. 反応時間依存的に GFP のバンドがシフトダウンし、TMR 蛍光を示すことがわかる。

(3) 小麦胚芽由来無細胞翻訳系と sortase 反応の共存

無細胞翻訳反応と sortase 反応のカップリングを検証した。Sortase と TMR 標識ペンタグリシンペプチド存在下で、LPETG 融合 GFP を小麦胚芽由来無細胞翻訳系を用いて合成した。その結果、GFP 合成量が通常の無細胞翻訳反応の 100 分の 1 であった。GFP 合成量を減少させる因子を調べたところ、sortase 溶液中のカルシウムイオンが原因であった。小麦胚芽由来無細胞翻訳系は、その調製過程において、小麦内在性 mRNA を分解するためにマイクロコッカスヌクレアーゼ (MNase) を添加している。MNase の活性はカルシウム要求性であり、カルシウムイオンをキレートする EGTA を添加することで MNase 活性を抑制している。しかしながら、sortase を添加したことによりカルシウムイオン濃度が上昇し、MNase によって GFP の mRNA が分解され、GFP 合成量が低下したものと考えられる。一方、本研究で用いている黄色ブドウ球菌由来の sortase はカルシウム要求性であり、カルシウム非存在下ではペプチド連結効率は著しく低下する (図 4)。以上の結果より、sortase 反応と小麦胚芽由来無細胞翻訳系のカップリングは困難であることが判明した。なお、活性にカルシウムを要求しない連鎖球菌や炭疽菌由来の sortase、もしくは人工的にカルシウム非依存型に改変された sortase が知られており、それらを使用することで本課題は解決できる可能性がある。

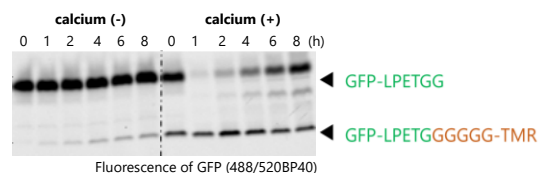


図 4. Sortase による無細胞合成 LPETG 融合 GFP と TMR 標識ペンタグリシンペプチドの連結反応でのカルシウム要求性. カルシウム非存在下(左)ではペプチド連結反応によるバンドシフトが抑制された。

(4) 再構成型無細胞翻訳系と sortase 反応の共存

MNase が添加されていない再構成型無細胞翻訳系を用いて、無細胞翻訳反応と sortase 反応のカップリングを試行した。多次元淘汰法を行うためには sortase 自体を無細胞合成し固相固定する必要があるが、固相固定の判別を容易にするため、sortase 融合キナーゼを無細胞翻訳し、合成された sortase によってキナーゼが固相固定される実験系を採用した (図 5a)。ビオチン標識ペンタグリシンペプチドを固定化したストレプトアビジン修飾磁気ビーズ存在下で、再構成型無細胞翻訳系を用いて sortase 融合キナーゼを無細胞合成した。翻訳反応後に磁気ビーズを回収し、キナーゼ反応測定液に懸濁すると、キナーゼ活性が確認され、磁気ビーズ上にキナーゼが固定化されていることが確認された (図 5b)。この結果より、再構成型無細胞翻訳系において、無細胞合成されたタンパク質が、同じく無細胞合成された sortase によって、固相担体上に固定化されることが確認された。なお、本実験のキナーゼ遺伝子の位置に sortase 遺伝子を配置することによって固相上への sortase の自己固定が可能であると考えられる。

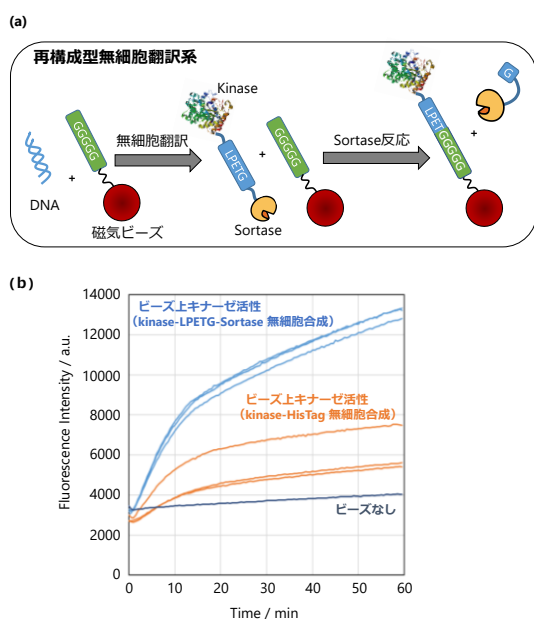


図 5. 再構成型無細胞翻訳系による無細胞合成 sortase 融合タンパク質の固相上固定化. (a) 実験スキーム. (b) ビーズ上に固定化されたキナーゼ活性の蛍光プレートリーダーによる測定結果. Sortase および LPETG ペプチド融合キナーゼは陰性対照として用いたヒスタグ融合キナーゼと比較して有意にビーズ上に固定化されていることがわかる。

本研究を通して、無細胞翻訳系中で無細胞合成タンパク質を sortase 反応によって固相上に固定化する技術の課題を明らかにし、解決策を議論した。本研究で得られた知見は、

マイクロアレイ技術と組み合わせることにより sortase 変異体のスクリーニング法開発に資すると期待される。

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 4 件)

- ① Shingo Ueno, Takanori Ichiki, "Phototriggered control of enzyme reactions toward high-throughput screening on a microwell array chip", *Journal of Photopolymer Science and Technology* **30**, 657-660 (2017) (査読有) DOI : 10.2494/photopolymer.30.657
- ② Shingo Ueno, Tatsunori Hirai, Shusuke Sato, Manish Biyani, Hiromi Kuramochi, Ryo Iizuka, Takanori Akagi, Takashi Funatsu, and Takanori Ichiki, "In situ synthesis and immobilization of enzyme molecules on microreactor array chips", *Journal of Photopolymer Science and Technology* **28**, 719-726 (2015) (査読有) DOI:10.2494/photopolymer.28.719
- ③ 上野 真吾, ビヤニマニッシュ、佐藤 秀介、ラジ・クマールスバシニ、倉持 宏実、赤木 貴則、一木 隆範, "高集積マイクロアレイ研究開発の現状と動向", *分析化学* **64**, 421-429 (2015) (査読有) DOI: 10.2116/bunsekikagaku.64.421
- ④ Manish Biyani, Takanori Ichiki, "Microintaglio printing for soft lithography-based in situ microarrays", *Microarrays* **4**, 311-323 (2015) (査読有) DOI:10.3390/microarrays4030311

[学会発表] (計 29 件)

- ① 上野真吾、一木隆範, "高集積マイクロウェルアレイシステムによるネオバイオ分子創出", 日本農芸化学会 2018 年度大会, 名城大学 (愛知県名古屋市), 2018 年 3 月 18 日 (招待講演)
- ② Shingo Ueno, Takanori Ichiki, "Spatiotemporal phototriggered control of biochemical reactions for on-chip ultrahigh-throughput screening of enzyme activities", The 21th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Savannah International Trade & Convention Center (Savannah, Georgia, USA), 2017 年 10 月 22-26 日 (ポスター発表) (国際学会)
- ③ Ryo Wakai, Shingo Ueno, Takanori Ichiki, "In situ covalent immobilization of protein on a chip by sortase-mediated peptide ligation", The 21th

- International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Savannah International Trade & Convention Center (Savannah, Georgia, USA), 2017年10月22-26日(ポスター発表)(国際学会)
- ④ Shingo Ueno, Shusuke Sato, Takanori Ichiki, “Photo-assisted control of the initiation of enzyme reaction”, 34rd International Conference of Photopolymer Science and Technology, 幕張メッセ国際展示場(千葉県千葉市), 2017年6月26-29日(口頭発表)(国際学会)
- ⑤ 若井涼, 上野真吾, 白形優依, 一木隆範, “ペプチド連結酵素による共有結合を利用したタンパク質その場固定化技術の開発”, 第65回応用物理学会春季学術講演会, 早稲田大学(東京都), 2018年3月17-20日(口頭発表)
- ⑥ 上野真吾, 佐藤秀介, 塩谷美夏, 飯塚怜, ジェーンアンキタ, 若井涼, 白形優依, 船津高志, 一木隆範, “人工生体分子創製を目的とした高集積マイクロウェルアレイシステム”, 理研/iCONM/物材機構 医工学ネットワーク, ナノ医療イノベーションセンター(神奈川県川崎市), 2017年12月12日(ポスター発表)
- ⑦ 上野真吾, 佐藤秀介, 若井涼, 塩谷美夏, 一木隆範, “マイクロアレイでの分子セレクション技術の開発”, 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市), 2017年12月6日(ポスター発表)
- ⑧ Shusuke Sato, Ankita Jain, Hiromi Kuramochi, Shingo Ueno, Takanori Akagi, Takanori Ichiki, “Fundamental study for quantitative screening of mutant proteins on a glass-made microwell array chip”, 第27回日本MRS年次大会, 横浜産業貿易センタービル(神奈川県横浜市), 2017年12月5-7日(ポスター発表)
- ⑨ Ankita Jain, Shingo Ueno, Shusuke Sato, Takanori Ichiki, “Development of quantitative aptamer screening using a microarray chip”, 第27回日本MRS年次大会, 横浜産業貿易センタービル(神奈川県横浜市), 2017年12月5-7日(ポスター発表)
- ⑩ Ryo Wakai, Shingo Ueno, Takanori Ichiki, “In situ covalent immobilization of peptide on glass substrate using transpeptidase sortase”, 第27回日本MRS年次大会, 横浜産業貿易センタービル(神奈川県横浜市), 2017年12月5-7日(ポスター発表)
- ⑪ Yui Shirakata, Shingo Ueno, Takanori Ichiki, “Effects of surface modification of reactor materials on cell-free synthesis”, 第27回日本MRS年次大会, 横浜産業貿易センタービル(神奈川県横浜市), 2017年12月5-7日(ポスター発表)
- ⑫ 若井涼, 一木隆範, “ペプチド連結酵素 sortaseによるタンパク質の基板上固定化技術”, 第17回生命科学シンポジウム, 東京大学(東京都), 2017年4月15日(ポスター発表)
- ⑬ Shusuke Sato, Manish Biyani, Shingo Ueno, Ankita Jain, Subhashini Raj Kumal, Hiromi Kuramochi, Takanori Akagi, Takanori Ichiki, “Large-scale high-density microarray technology for screening of highly diverse protein mutant library”, The 11th Annual IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, ホテル大観荘(宮城県松島市), 2017年4月17-20日(口頭発表)(国際学会)
- ⑭ Ankita Jain, Shingo Ueno, Shusuke Sato, Takanori Ichiki, “Development of high-density microarray technology for DNA aptamer screening using self-assembled beads”, 33rd International Conference of Photopolymer Science and Technology, 幕張メッセ(千葉県千葉市), 2016年6月22-24日(口頭発表)(国際学会)
- ⑮ 一木隆範, “医療・創薬応用を目指したバイオデバイス技術”, 新化学技術推進協会電子情報技術部会 マイクロナノシステムと材料・加工分科会 講演会, 公益財団法人 新化学技術推進協会(東京都), 2016年6月15日(招待講演)
- ⑯ 上野真吾, 佐藤秀介, 一木隆範, “酵素活性のハイスループットスクリーニングのためのマイクロウェルアレイテクノロジー”, 第26回日本MRS年次大会, 横浜産業貿易センタービル(神奈川県横浜市), 2016年12月20日(ポスター発表)
- ⑰ 佐藤秀介, ジェーンアンキタ, 倉持宏美, 上野真吾, 赤木貴則, 一木隆範, “PDMSチップ上で変異体タンパク質の熱安定性を評価する基礎研究”, 第26回日本MRS年次大会, 横浜産業貿易センタービル(神奈川県横浜市), 2016年12月20日(ポスター発表)
- ⑱ 若井涼, 上野真吾, 一木隆範, “共有結合によるタンパク質のその場合成・固定化法の開発”, 第26回日本MRS年次大会, 横浜産業貿易センタービル(神奈川県横浜市), 2016年12月20日(ポスター発表)
- ⑲ 上野真吾, 佐藤秀介, 倉持宏美, ジェーンアンキタ, 若井涼, 白形優依, 赤木貴則, 一木隆範, “人工分子進化を目的としたマイクロアレイシステムの開発”, 電気学会ケミカルセンサ/バイオ・マイクロシステム合同研究, 東京大学(東京都), 2016年

- 12月21日(口頭発表)
- ⑳ 一木隆範, “がんを見つける未来の血液診断装置—予防医療を目指して”, Tonomachi Café, ナノ医療イノベーションセンター(神奈川県川崎市), 2017年1月27日(口頭発表)
- ㉑ 一木隆範, “微細加工による医療・創薬のためのバイオデバイス開発”, 日本学術振興会将来加工技術136委員会, 川崎生命科学・環境研究センター(神奈川県川崎市), 2017年2月3日(招待講演)
- ㉒ 白形優衣、竹原宏明、上野真吾、一木隆範, “集積回路上へのエラストマー製マイクロウェルアレイ形成に関する基礎検討”, 第64回応用物理学会春季学術講演会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2017年3月14-17日(口頭発表)
- ㉓ 若井涼、上野真吾、一木隆範, “ペプチド連結酵素を用いたタンパク質のその場合合成・固定化技術”, 第64回応用物理学会春季学術講演会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2017年3月14-17日(口頭発表)
- ㉔ Shingo Ueno, Shusuke Sato, Ankita Jain, Subhashini Raj Kumal, Hiromi Kuramochi, Takanori Akagi, Takanori Ichiki, “Development of functional biomolecules by artificial selection using cell-free system and microarray technology”, 10th Annual symposium on nanobiotechnology, The California NanoSystems Institute, University of California (Los Angeles, USA), 2016年2月4-5日(口頭発表, ポスター発表)(国際学会)
- ㉕ Shusuke Sato, Ankita Jain, Subhasini Raji Kumal, Hiromi Kuramochi, Shingo Ueno, Takanori Akagi, Takanori Ichiki, “Artificial Darwinian selection technology using microarray technique based on microfabrication”, 10th Annual symposium on nanobiotechnology, The California NanoSystems Institute, University of California (Los Angeles, USA), 2016年2月4日(ポスター発表)(国際学会)
- ㉖ Ankita Jain, Shusuke Sato, Shingo Ueno, Takanori Ichiki, “High-density self-assembled bead microarray technology for high-throughput aptamer screening”, The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Hwabaek International Convention Center, (Gyeongju, Korea), 2015年10月25-29日(ポスター発表)(国際学会)
- ㉗ 若井涼、上野真吾、一木隆範, “共有結合による基板上へのタンパク質の自発的固定化技術の開発”, 第63回応用物理学

会春季学術講演会, 東京工業大学(東京都), 2016年3月21日(口頭発表)

- ㉘ Ankita Jain, Shingo Ueno, Shusuke Sato, Takanori Ichiki, “Microarray technology for quantitative aptamer screening”, 第25回日本MRS年次大会, 波止場会館(神奈川県横浜市), 2015年12月10日(口頭発表)
- ㉙ Ankita Jain, Shusuke Sato, Shingo Ueno, Takanori Ichiki, “High-density self-assembled beads microarray technology for high-throughput aptamer screening”, 第38回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市), 2015年12月4日(ポスター発表)

[図書](計1件)

- ① 上野真吾、一木隆範, “バイオチップの基礎と応用—原理から最新の研究・開発動向まで—” 伊藤嘉浩 監修(担当:分担執筆、範囲:無細胞タンパク質合成系を利用したタンパク質マイクロアレイ), 株式会社シーエムシー出版(2015年10月15日発刊 ISBN: 978-4-7813-1079-4)

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

一木 隆範 (ICHIKI, Takanori)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号: 20277362

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

上野 真吾 (UENO, Shingo)
川崎市産業振興財団・ナノ医療イノベーションセンター・副主幹研究員
研究者番号: 30594650

(4)研究協力者