

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04581

研究課題名(和文) タンパク質を構成要素とする超分子型自己集合系の構築と高次機能の創出

研究課題名(英文) Design and validation of functional supramolecular protein assemblies

研究代表者

神谷 典穂 (Kamiya, Noriho)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：50302766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：生物を構成する様々な要素のうち、タンパク質は多彩な機能を担った分子ユニットとして捉えられる。生体系では、タンパク質が互いに相互作用しながら生命活動が営まれているが、その精緻な相互作用の過程を人工系で完全に模倣することは未だ容易ではない。そこで、我々がある程度制御可能なユニットを、タンパク質の特定部位に導入することで人為的にタンパク質の集合体を組み上げよつという発想に基づき、タンパク質を主要な成分とする多様なかたちと機能を有する超大型分子を設計した。特に生体内で架橋反応を触媒している酵素をうまく活用することで、様々な超分子型自己集合系の構築が可能なることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内では、タンパク質が1つの機能ユニットとして、会合や離散、分解を受けながら、生命活動が営まれている。例えばウイルスや、細菌から生えた繊毛や鞭毛は、精緻な相互作用に基づいて自己集合的に組み上がり、特定のかたちと機能を発揮する。本研究の成果により、タンパク質を寄せ集める過程を人工系で模倣することで、望みの機能を有する超大型タンパク質集合体(超分子型自己集合系)の設計に繋がることが期待される。例えば、薬を封入したナノサイズのタンパク質粒子は、医薬や農薬分野での利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Self-assembling nature of biomolecules has generated great attention of researchers in various fields. In the fields of biochemical and biomedical engineering, protein assemblies are considered a promising material for the creation of new platform for many applications, especially realizing cascading reactions and multivalency. The application of protein assemblies in the biological systems requires a careful selection of constituting materials and fabrication methods. Here enzymatic strategies to create new type of biomolecular assemblies have been explored. Various functional protein units were designed to different purposes, such as multi-assemblies of hemicellulase for saccharification of plant biomass and multi-conjugate of antibody-binding protein and enzyme for diagnosis. Finally, new peptidyl substrates were developed and validated to construct novel functional supramolecular protein assemblies.

研究分野：生体分子工学

キーワード：タンパク質集合体 生体触媒 翻訳後修飾 バイオコンジュゲート 自己集合 両親媒性 バイオインターフェイス 固相基質

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の自己集合により形成される超分子型高次構造体は、多量体型の酵素やウイルス、細胞表層に存在する繊毛や鞭毛、体組織中の構造タンパク質まで、生体内外で幅広く観察される。その構造形成の駆動力は、主として精緻に設計されたタンパク質界面における弱い分子間相互作用（非共有結合性相互作用）に基づいていることは驚きに値する。このような高度な機能を発現する高次タンパク質集合体を、天然と同様に分子界面における物理的相互作用の精密制御により得ることは未だ難易度が高く、タンパク質を基材として用いる生体分子工学分野における挑戦的課題として位置付けられている。

一方、タンパク質の特定部位に、特定分子と化学的・物理的に相互作用する点を導入することができれば、多様なタンパク質を、後付けで機能ユニットとして利用可能なことから、汎用的な技術への展開が期待できる。また、安価で入手可能な天然素材からなる自己集合系も、実用的な観点から注目を集めている。そこで本研究では、タンパク質を機能ユニットとする超分子型自己集合系の構築により創発する新たな機能性を追求した。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者が独自に有するタンパク質修飾技術に立脚し、(1)異種タンパク質ユニットからなる超分子型タンパク質複合体の設計のための基盤技術の確立、(2)非共有結合性相互作用に基づくタンパク質集合体の設計のための基盤技術の確立、(3)上記の基盤技術に基づくタンパク質を機能ユニットとする超分子型自己集合系の構築とその応用について検討した。

## 3. 研究の方法

### (3-1) 異種タンパク質ユニットからなる超分子型タンパク質複合体の設計

植物由来バイオマスを固相基質とする酵素群は、異種酵素分子間での協奏的作用により基質を分解することが知られている。そこで、天然のセルロース系バイオマス分解酵素システムを範とした固相基質の分解について検討した。その際、ペプチド-タンパク質間での選択的共有結合形成を促進する SpyCatcher-SpyTag システムを採用し、2種酵素のモル比を制御可能な新たな足場分子を設計した。さらに本系の発展型として、抗体結合ドメインと酵素の組み合わせからなる固相免疫測定系を構築し、本足場分子の汎用性を確認した。また、分岐型ビオチンをリンカーとする酵素集合系の構築において、キチンを基質とする酵素システムからなる人工キチナーゼ系の構築にも取り組んだ。足場分子の調製に際し、新たな架橋酵素としてラッカーゼの利用の可能性についても検証した。

### (3-2) 非共有結合性相互作用に基づくタンパク質集合体の設計

水溶液中で反対の電荷を示す天然タンパク質と多糖を混合することで自発的に形成されるナノ粒子の簡便調製法を確立した。また、部分還元処理した天然タンパク質（牛血清アルブミン、BSA）と水溶性多糖からなるナノ粒子の調製法と、粒子内への薬物封入について検討した。

設計された合成リガンド分子の調製については、研究分担者の若林博士の協力の下、酵素触媒によるタンパク質集積化の足場となる自己集合型基質ペプチドを設計・合成した。最後に、長鎖アルキル部位を導入した機能性ユニットを合成し、これを目的タンパク質へ部位特異的に導入する技術の確立を試みた。

### (3-3) 超分子型タンパク質複合体の調製と応用

上記(3-1)について、糖質分解酵素からなる複合体では、異なる酵素ユニットとして、エンド型キシラナーゼと分岐鎖を切断するアラビノフラノシダーゼを選択し、人工ヘミセルロソームの調製を試みた。また、抗体と酵素を組み合わせた微量タンパク質検出系への適用を試みた。さらに、異種生体分子からなる複合体として、核酸と複数の蛍光タンパク質からなる分子によるガン細胞膜タンパク質の選択的検出を試みた。

上記(3-2)について、水難溶性抗ガン剤 Paclitaxel を封入した水溶性ナノ粒子を調製し、ガン細胞への薬物送達能を評価した。また、自己集合性人工基質ペプチドからなる足場の蛍光タンパク質による修飾あるいは直接修飾を介した超分子型タンパク質集合系の構築を試みた。この過程で、新たな架橋化酵素変異体の取得についても並行して検討を実施した。

## 4. 研究成果

### (4-1) 異種タンパク質ユニットからなる超分子型タンパク質複合体の設計

ヘミセルロースを基質とする酵素分解系の構築に取り組んだ。エンド型キシラナーゼと分岐鎖を切断するアラビノフラノシダーゼそれぞれに

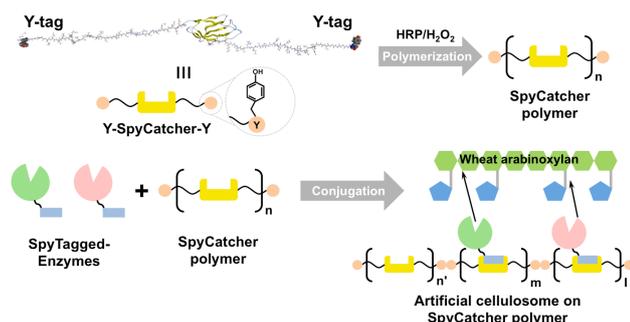


図1 SpyCatcher-SpyTagシステムと酵素触媒を介した捕捉タンパク質からなる足場形成を組み合わせた定量的異種酵素提示系の構築

SpyTag を導入した組換え酵素を調製し、酵素反応により SpyCatcher 分子を多量化した足場分子と混合することで、各酵素が混合比率に応じて高分子量足場分子上に機能を保ったまま提示されることを確認した (図 1)。さらに、抗体結合性タンパク質 protein G と酵素ルシフェラーゼそれぞれに SpyTag を導入し、その組成比に応じてシグナルが生じる固相免疫測定系の構築に成功した。このことから、本系は多様な組換えタンパク質に適用可能な超分子型タンパク質複合体の調製法となり得ることを確認した。

この過程において、タンパク質を超分子化する新たな生体触媒の探索と、タンパク質ユニットの拡張を実施した。前者について、ラッカーゼによる組換えタンパク質の部位特異的多量体化と異種タンパク質集合体の調製に成功した。また、研究協力者の日下部教授の協力の下、大腸菌では発現が困難な西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP) の蚕による発現と、HRP 多量体形成のためのタグの導入、当該タグを介したラッカーゼ触媒による HRP と protein G を構成ユニットとする複合タンパク質ポリマーの調製に成功した (図 2)。

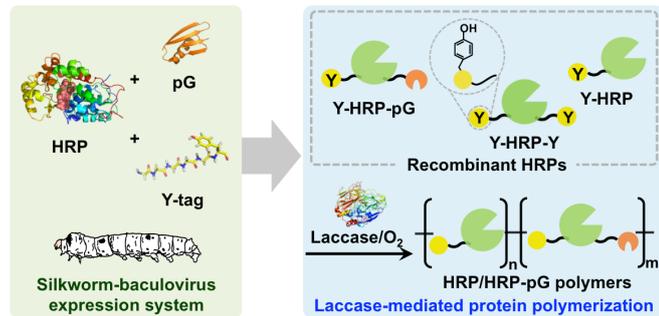


図 2 ラッカーゼ触媒による組換えタンパク質の部位特異的多量体化法の開発と蚕発現系を組み合わせた機能的タンパク質ユニットの多様化

(4-2) 生体系へのナノ粒子の利用においては、その安全性や生分解性を慎重に考慮する必要がある。また、安価で入手可能な素材から、簡便にナノ粒子を調製する手法の確立も、産業応用を志向した際には重要な観点となる。このような観点から、甲殻類を原材料として大量に得られる多糖であるキチン・キトサンと、入手が容易な乳タンパク質カゼインとの複合化によるナノ粒子の調製を検討した。その結果、調製時の水溶液の pH や、それぞれの構成要素の濃度を変化させ、得られるナノ粒子のサイズや表面電荷を詳細に検討し、静電的相互作用に基づくポリイオン複合体の形成が駆動力となり、粒径が 250~300 nm 程度のナノ粒子が形成されることを確認した。また、BSA と水溶性キトサンを構成要素とするナノ粒子の調製においては、適当な還元剤で処理し部分変性させた BSA とグリコールキトサンの水溶液を混合し、空気酸化を経て、ジスルフィド結合の再形成により安定化されたナノ粒子が得られることを明らかにした。さらに、このナノ粒子に抗ガン剤 Paclitaxel を封入し、同成分を主成分とする市販の抗ガン剤と同等以上の抗ガン活性を示すことを、培養細胞を用いた生理活性評価により明らかにした (図 3)。

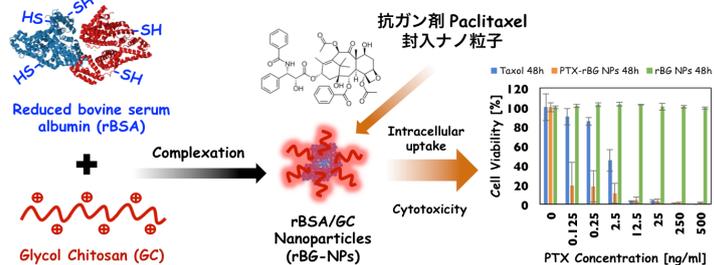


図 3 天然タンパク質と多糖を組み合わせた自己集合型ナノ粒子形成と抗ガン剤送達への応用

(4-3) 分担研究者の若林博士との協働の下、自己集合性ペプチドからなる自己集合型足場に対して、酵素を用いてタンパク質を後付け修飾することを試みた。その結果、酵素の基質となるペプチドに自己集合性を付与し、これが形成する超分子集合体の表面を蛍光タンパク質で修飾することに成功した (図 4)。これに加えて、核酸アプタマーを認識部位とする複数の蛍光タンパク質と核酸からなるプローブ分子の調製とこれを用いたガン細胞選択的な蛍光検出、一般的に困難とされる脂質修飾タンパク質の簡便調製法の確立といった特徴的な成果を創出することができた。さらに、基礎研究の過程において、架橋化触媒として用いた微生物由来トランスグルタミナーゼの改変を進め、既往の報告とは異なる機構で基質を認識・架橋する新規変異体の獲得に成功した。

以上のように、タンパク質を機能ユニットとする超分子型自己集合系の構築とその応用について多角的に検討を実施し、新たな学術的知見 (原著論文 1 3 報) を得ると共に、社会的価値を包含する成果 (特許出願 2 件) の取得を達成した。

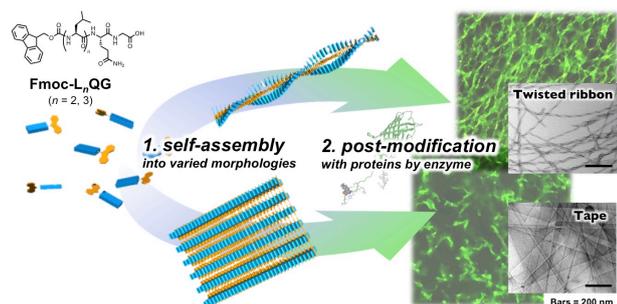


図 4 酵素基質への自己集合能の付与による異なる形状からなる足場の構築と酵素的架橋反応を用いたペプチド足場上への生体高分子の集積化

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- 1) R. Wakabayashi, A. Suehiro, M. Goto, N. Kamiya 'Designer aromatic peptide amphiphiles for self-assembly and enzymatic display of proteins with morphology control.' *Chem. Commun.*, 55, 640-643 (2019).  
DOI: 10.1039/c8cc08163h
- 2) Dani Permana, K. Minamihata, T. Tatsuke, J.M. Lee, T. Kusakabe, M. Goto, N. Kamiya 'Polymerization of horseradish peroxidase by the laccase-catalyzed tyrosine-coupling reaction.' *Biotechnol. J.*, 1800531 (2019)  
DOI: 10.1002/biot.201800531
- 3) MA Razi, R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya 'Self-assembled reduced albumin and glycol chitosan nanoparticles for paclitaxel delivery.' *Langmuir*, 35, 2610-2618 (2019).  
DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02809
- 4) Patmawati, K. Minamihata, T. Tatsuke, J.M. Lee, T. Kusakabe, N. Kamiya, 'Functional horseradish peroxidase-streptavidin chimeric proteins prepared using a silkworm-baculovirus expression system for diagnostic purpose.', *J. Biotechnol.*, 297, 28-31 (2019).  
DOI: 10.1016/j.jbiotec.2019.03.007
- 5) M. Takahara, R. Wakabayashi, N. Fujimoto, K. Minamihata, M. Goto, N. Kamiya, 'Enzymatic cell-surface decoration with proteins using amphiphilic lipid-fused peptide substrates.' *Chem. Eur. J.*, 25, 7315-7321 (2019). (Inside Cover)  
DOI: 10.1002/chem.201900370.
- 6) Dani Permana, K. Minamihata, M. Goto, N. Kamiya 'Laccase-catalyzed site-specific cross-linking of tyrosine-tagged proteins.' *J. Biosci. Bioeng.*, 126, 559-566 (2018).  
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.05.013
- 7) MA Razi, R. Wakabayashi, Y. Tahara, M. Goto, N. Kamiya\* 'Genipin-stabilized caseinate-chitosan nanoparticles for enhanced stability and anti-cancer activity of curcumin.' *Colloid. Surf. B: Biointerface*, 164, 308-315 (2018).  
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.01.041
- 8) Patma, K. Minamihata, T. Tatsuke, J. M. Lee, T. Kusakabe, N. Kamiya 'Expression and Activation of Horseradish Peroxidase-Protein A/G Fusion Protein in Silkworm Larvae for Diagnostic Purposes.' *Biotechnol. J.*, 13, 1700624 (1 of 9) (2018)  
DOI: 10.1002/biot.201700624
- 9) L. Jia, K. Minamihata, H. Ichinose, K. Tsumoto, N. Kamiya 'Polymeric SpyCatcher Scaffold Enables Bioconjugation in a Ratio-Controllable Manner.' *Biotechnol. J.*, 12, 1700195 (1 of 8) (2017)  
DOI: 10.1002/biot.201700195
- 10) M. Takahara, R. Wakabayashi, K. Minamihata, M. Goto, N. Kamiya 'Primary Amine-Clustered DNA Aptamer for DNA-Protein Conjugation Catalyzed by Microbial Transglutaminase.' *Bioconjugate Chem.*, 28(12), 2954-2961 (2017)  
DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00594
- 11) R. Wakabayashi, K. Yahiro, K. Hayashi, M. Goto, N. Kamiya 'Protein-grafted polymers prepared through a site-specific conjugation by microbial transglutaminase for an immunosorbent assay.' *Biomacromolecules*, 18, 422-430 (2017).  
DOI: 10.1021/acs.biomac.6b01538
- 12) L. Jia, G.A.L. Goncalves, Y. Takasugi, S. Noda, T. Tanaka, H. Ichinose, N. Kamiya 'Synergistic degradation of arabinoxylan by free and immobilized xylanases and arabinofuranosidase.' *Biochem. Eng. J.*, 114, 268-275 (2016)  
DOI: 10.1016/j.bej.2016.07.013
- 13) M. Takahara, B. Geisa, H. Nakazawa, Y. Mori, M. Umetsu, N. Kamiya 'A salt-switchable artificial cellulase regulated by a DNA aptamer.' *Biomacromolecules*, 17, 3356-3362 (2016)  
DOI: 10.1021/acs.biomac.6b01141

[学会発表] (計 37 件)

1. 神谷典穂, 固相基質界面で機能する酵素複合材料の設計, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016 年 6 月 8 日, 福岡国際会議場
2. 川嶋宏希, 森裕太郎, 田中勉, 中澤光, 梅津光央, 神谷典穂, 一次元タンパク質集合系の構築と人工セルロソームへの応用, 2016 年度生物工学会若手研究者の集い (若手会) 夏のセミナー, 2016 年 7 月 17 日, ホテルコンチネンタル府中

3. 川嶋宏希、森 裕太郎、田中勉、中澤光、梅津光央、神谷典穂, 自己集合型セルラーゼ複合体における協奏効果の発現, 化学工学会第 48 回秋季大会, 2016 年 9 月 7 日, 徳島大学
4. 神谷典穂、森 裕太郎、川嶋宏希、南畑孝介、田中勉、中澤光、梅津光央, 自己集合型酵素複合体の設計と固相基質に対する触媒特性, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016 年 9 月 8 日, 石川県立音楽堂
5. 若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂, 酵素的架橋反応を用いたペプチド足場上への生体高分子の集積化, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016 年 9 月 8 日, 石川県立音楽堂
6. Lili Jia, Kosuke Minamihata, Hirofumi Ichinose, Noriho Kamiya, Functionalization of magnetic nanoparticles with protein polymer, 22<sup>nd</sup> Young Asian Biochemical Engineers' Community 2016 (YABEC 2016), Phoenix Seagaia Resort, Miyazaki, Japan, 2016.10.28
7. Noriho Kamiya, Kosuke Minamihata, Enzymatic Conjugation Strategy for the Design of Artificial Biomolecular Assemblies, 2016 AIChE Annual Meeting, San Francisco (USA), AIChE-SCEJ Joint Session: Bioseparations and Bionanotechnology, 2016.11.14
8. Noriho Kamiya, Mari Takahara, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, Design of novel biocatalysts by enzymatic biomolecular conjugation, The 9<sup>th</sup> AFOB Regional Symposium (ARS 2017), De La Salle University, Manila, Phillipines, 2017.2.10
9. 神谷 典穂, 生体触媒を活用した新奇ナノハイブリッド分子の設計, nano tech 2017, 2017 年 2 月 16 日, 東京ビッグサイト
10. 高原 茉莉、南畑 孝介、若林 里衣、後藤 雅宏、神谷 典穂, 酵素法によるアミノ化 DNA のタンパク質標識と細胞染色への応用, 化学工学会第 82 年会, 2017 年 3 月 7 日, 芝浦工業大学
11. 松崎 隆、林 浩之輔、南畑孝介、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂, 微生物由来トランスグルタミナーゼ前駆体の新規活性化法の開発, 化学工学会第 82 年会, 2017 年 3 月 7 日, 芝浦工業大学
12. 高原 茉莉、若林 里衣、後藤 雅宏、神谷 典穂, 細胞染色を指向した新規 DNA-タンパク質複合法の開発, 日本化学会第 97 春期年会, 2017 年 3 月 19 日, 慶応義塾大学
13. 若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂, 酵素反応性ペプチドを用いたタンパク質の集積化, 第 66 回高分子学会年次大会, 2017 年 5 月 30 日, 幕張メッセ
14. Noriho Kamiya, Enzyme-mediated Design of Functional Bioconjugates and Biomaterials, 2017 BEST Conference, Yunlin, Taiwan, 2017.6.24
15. M. A. Razi, R. Wakabayashi, Y. Tahara, M. Goto, N. Kamiya, Nanoassemblies from casein and chitosan for delivery of curcumin, Biomaterial International 2017, 2017 年 8 月 22 日, 福岡国際会議場
16. 松崎 隆、林 浩之輔、南畑 孝介、若林 里衣、後藤 雅宏、神谷 典穂, 活性型微生物由来トランスグルタミナーゼ前駆体の設計と機能評価, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム, 2017 年 9 月 7 日, 東京大学
17. 神谷 典穂, 松崎 隆, 林 浩之輔, 南畑 孝介, 微生物由来トランスグルタミナーゼの再設計: 前駆体のタンパク質工学, 酵素工学研究会第 7 8 回講演会, 2017 年 10 月 6 日, 秋田カレッジプラザ
18. T. Matsuzaki, K. Minamihata, K. Hayashi, N. Kamiya, Design of active microbial transglutaminase zymogen by pro-peptide engineering, The 30th International Symposium on Chemical Engineering, KAIST, Daejeon, Korea, 2017.12.2
19. 高原茉莉、南畑孝介、若林里衣、後藤雅宏、日下部宜宏、李 在萬、神谷典穂, 抗体定常領域との部位特異的複合化による DNA アプタマーの高機能化, 化学工学会第 83 回年会, 2018 年 3 月 14 日, 関西大学
20. 高原茉莉、南畑孝介、若林里衣、後藤雅宏、日下部宜宏、李 在萬、神谷典穂, 抗体定常領域との複合化を介した高機能化核酸アプタマーの設計, 日本化学会第 98 春季年会 2018, 2018 年 3 月 21 日, 日本大学理工学部船橋キャンパス
21. Noriho Kamiya, Takashi Matsuzaki, Kosuke Minamihata et al., Engineered active zymogen of microbial transglutaminase, The 15th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, Kyoto University, 2018/7/2.
22. R. Sato, K. Minamihata, M. Goto, N. Kamiya, Design of a PolyTag that affords polymerization of functional proteins, The 15th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, Kyoto University, 2018/7/2.
23. 神谷典穂, 松崎 隆, 林浩之輔, 南畑孝介, 架橋触媒機能を有する微生物由来トランスグルタミナーゼ前駆体の設計, 日本生物工学会 2018 年度大会, 2018 年 9 月 7 日, 関西大学
24. 神谷典穂, 高機能性タンパク質生産における蚕利用の可能性, 平成 30 年度 先端膜工学研究推進機構秋季講演会(膜工学サロン), 2018 年 9 月 28 日, 神戸大学
25. Rie Wakabayashi, Hiroki Obayashi, Noriho Kamiya, Masahiro Goto, Complementary interaction with peptide amphiphiles guided the intracellular delivery of small molecular drugs, The 24th Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC2018), Taipei, 2018/11/17.

26. 駒田拓也、高原茉莉、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂、酵素法による脂質修飾タンパク質の調製とその特性の評価、第21回化学工学会学生発表会(京都大会)(優秀発表賞)、2019年3月2日、京都大学

ほか11件.

〔図書〕(計 1 件)

・高原茉莉、神谷典穂、'細胞・生体分子の固定化と機能発現' 第5章 セルロース結合性アプタマーを用いた人工セルラーゼの設計、(株)シーエムシー出版、ISBN 978-4-7813-1326-9

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 4 件)

名称：脂質化タンパク質の製造方法、及び脂質化タンパク質

発明者：神谷典穂、高原茉莉、南畑孝介、若林里衣

権利者：国立大学法人 九州大学

種類：特許

番号：PCT/JP2019/003695

出願年：2019年2月1日

国内外の別： 国外

番号：特願 2018-051367

出願年：2018年3月19日

国内外の別： 国内

名称：トランスグルタミナーゼ活性を有する組換えタンパク質

発明者：神谷典穂、松崎隆、林 浩之輔、南畑孝介

権利者：国立大学法人 九州大学

種類：特許

番号：PCT/JP2017/024881

出願年：2017年6月30日

国内外の別： 国外

番号：特願 2016-131883

出願年：2016年7月1日

国内外の別： 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.kyushu-u.ac.jp/~kamiya/CFC-BT/Welcome.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：若林 里衣

ローマ字氏名：WAKABAYASHI, Rie

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学院工学研究院

職名：助教

研究者番号 (8桁)：60595148

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：日下部 宜宏

ローマ字氏名：KUSAKABE, Takahiro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。