

令和 2 年 4 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14067

研究課題名(和文) タンパク質ポリマーの新規構造制御技術の確立と高機能な細胞培養因子創製への展開

研究課題名(英文) Control of molecular structure of protein polymers and its application of creating novel cell growth factors

研究代表者

南畑 孝介 (Minamihata, Kosuke)

九州大学・工学研究院・特任助教

研究者番号：90648586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多数のタンパク質分子で構成されるタンパク質の高次複合体は、その構造を適切に制御することで最大限に機能を発揮できる。本研究ではシステインとチロシンを含む新たなペプチドタグを考案し、ジスルフィド結合で連結された直鎖状タンパク質ポリマーの調製を達成した。また、タンパク質の立体障害を利用した構造制御法の構築を行い、タンパク質のループドメインに導入されたチロシン残基を介してタンパク質を架橋することで、直鎖状のタンパク質ポリマーが得られることを示し、直鎖状に構造を制御することでタンパク質ポリマーの機能が向上することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多数のタンパク質分子を連結させて得られるタンパク質ポリマーは、多価効果や協同的な酵素反応を示すなど、優れた性質を持つ。タンパク質ポリマーの構造を制御することで、目的に応じた機能を最大限に発揮することが可能となる。本研究ではタンパク質ポリマーの構造を1次元に制御することを達成し、得られた直鎖状タンパク質ポリマーは、検出用プローブ分子として既存の3次元の枝分かれ構造をとったタンパク質ポリマーよりも高い性能を発揮した。目的に応じて最適な形状にタンパク質ポリマーの構造を制御することで、優れた機能をもったタンパク質ポリマー分子の創製につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Controlling the structure of protein complex consisted of multiple protein molecules is essential for maximizing the function of protein complex. In this research, we developed a new peptide tag containing cysteine and tyrosine residues and demonstrated linear protein polymerization through disulfide bonding formation. Furthermore, we demonstrated controlling the structure of protein polymers by using steric hindrance derived from protein structure and we achieved formation of linear protein polymers with higher functionality than the protein polymers with 3D dendritic structures.

研究分野：生体分子工学

キーワード：タンパク質ポリマー 構造制御技術 酵素反応 ジスルフィド結合 立体障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は単独でも優れた機能をもつ有用な生体分子である。しかし、自然界に目を向けると、代謝系の酵素群やセルロース分解を担うセルロソームなど、タンパク質は複合体を形成し、その機能を最大限に発揮していることに気付く。このようなタンパク質複合体を人工的に模倣、再現することが出来れば、タンパク質機能の増強、さらにはタンパク質を基材とした機能性バイオマテリアルの創製に繋がる。

天然のタンパク質複合体の再現、という課題への答えとして、申請者は多数のタンパク質を部位特異的に連結する“ポリマー化”を掲げ、タンパク質のポリマー化技術を開発してきた。具体的には、対象タンパク質に遺伝子工学的手法を用いてチロシンを含むペプチドタグ(Y-tag)を導入し、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)の酵素反応によって処理することで、Y-tag 内のチロシン残基を HRP が部位特異的に基質認識し、生じるチロシルラジカル同士のカップリング反応によってポリマー化するものである。これまでに最大 150 量体に達する高い重合度と、3 次元的な枝分かれ構造を有するハイパーブランチタンパク質ポリマー(HBPP)の調製に成功した。また、HBPP の足場材料としての利用検討を行い、多数のルシフェラーゼ(Luc)ならびにプロテイン G(pG)を集積させたバイオブローブを創製した。しかし、HBPP 内部に固定された Luc が十分に機能しないこと、また、1 つの HBPP が固相表面で占める面積が広く、pG あたりの Luc の結合量を定量的に向上できないため、バイオブローブとしての性能は Luc の導入量に比べて高くないことが問題であった。この結果より、タンパク質ポリマー全体での機能を最大化するには、ポリマーと対象分子(界面)間での最適な相互作用の仕方を考慮し、ポリマー構造を理想的な形状に制御する必要があると考えた。すなわち、作用する界面に応じた最適形状にポリマー構造を制御し、モノマーユニットの稼働率を上げれば、タンパク質ポリマーの更なる機能向上が期待できる。タンパク質そのものの“ポリマー化”という新たな観点からのアプローチにより、その機能をどこまで高めることが可能なのか?という命題に対する答えの探求は、タンパク質科学ならびに工学的観点からとても興味深い。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質ポリマーの構造を 1 次元に制御する手法の確立を目指す。具体的なポリマー構造の制御戦略は以下の 2 つである。

① HRP と Y-tag が共触媒する S-S 結合形成反応を利用した 1 次元タンパク質ポリマー化

HRP はフェノール系小分子のラジカル化を触媒する酵素であり、フェノール系小分子と共触媒的に S-S 結合の形成を促進する。Y-tag に Cys を導入した CY-tag を新たに設計し、S-S 結合を介した 1 次元タンパク質ポリマー化技術を開発する。さらに細胞培養因子の機能化へ応用展開を目指す。

② タンパク質の立体障害に基づくタンパク質ポリマーの構造制御手法の確立

酸化還元剤の一種である HRP ならびに Laccase は、小分子フェノールの酸化反応を触媒する酵素であるため、その活性中心は小分子の基質認識に特化した小さい開口部をとっている。そのため Y-tag に立体障害を導入することで、架橋した Y-tag が再度基質として認識されることを防ぎ、分岐構造の形成を抑制できると考えた。具体的には、タンパク質のループドメイン中にチロシン残基を導入した Y-Loop を介したタンパク質ポリマーの調製技術の構築を目指す。

3. 研究の方法

3-1. S-S 結合を介した 1 次元タンパク質ポリマー化技術の構築

まず、緑色蛍光タンパク質(GFP)をモデルタンパク質として、GFP の C 末端に各種 CY-tag を導入した組換え体を調製し、S-S 結合形成を HRP の添加によって制御する方法論を確立する。それには CY-tag 配列の決定ならびに HRP 反応条件の最適化とともに、タンパク質精製時における還元剤濃度の最適化など、フリーの Cys 残基を有するタンパク質のハンドリング上の課題も含む。次に、SpyCatcher(SC)という単量体タンパク質の N/C 両末端に CY-tag を導入し(YC-SC-CY)、その 1 次元ポリマー化を検討する。SC は、SpyTag(ST)と呼ばれる 13 残基のペプチドと自発的に共有結合を形成するタンパク質であり、SC ポリマーは様々な ST 導入タンパク質に対する理想的な足場タンパク質となる。1 次元タンパク質ポリマーの調製を非還元 SDS-PAGE(ポリアクリルアミド電気泳動)解析から評価する。

3-2. タンパク質の立体障害を利用した直鎖状タンパク質ポリマーの調製

モデルタンパク質として大腸菌由来アルカリホスファターゼ(BAP)を選択し、BAPのループドメインに Tyr 残基を導入し、この Y-Loop を介したタンパク質ポリマーの調製を検討する(図 3-2-1)。Laccase によって Y-Loop を導入した BAP 組換え体を処理し、得られるタンパク質ポリマーの構造を SDS-PAGE 解析ならびに走査型プローブ顕微鏡観察によって評価する。

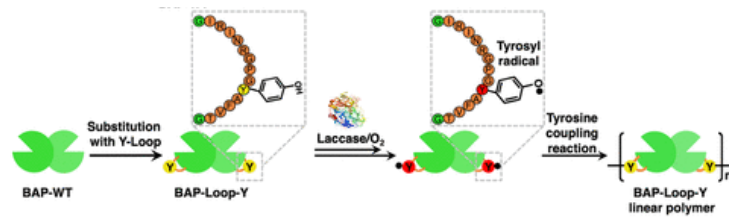


図3-2-1 1次元タンパク質ポリマーの調製方法

4. 研究成果

4-1. S-S結合を介した1次元タンパク質ポリマー化技術の構築結果

まず、新規のペプチドタグとして、隣接したシステインとチロシンを含むペプチドタグである CY-tag の設計を行った。CY-tag として GGGCY というペプチドタグを C 末端に導入した EGFP を調製し、HRP を添加することで CY-tag を介した架橋反応が起きるか否かを評価した(図 4-1-1)。その結果、既存のシステインを含まない Y-tag (EGFP-Y) では、HRP ならびに H₂O₂ を添加した条件、すなわち HRP 酵素反応が進行する条件でのみタンパク質の架橋物が得られた。ここで、EGFP ダイマー以外にもより高い架橋度の産物が確認され、Y-tag 内のチロシン残基を介して、分岐状の構造をとっていることが示された。一方、CY-tag を導入した EGFP-CY では、非還元 SDS-PAGE 解析において、HRP/H₂O₂、HRP のみ、ならびに H₂O₂ のみを添加した条件で

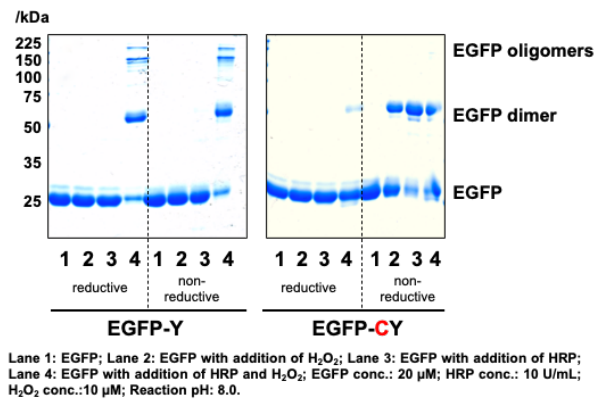


図4-1-1 CY-tagを介したタンパク質の架橋反応の実証

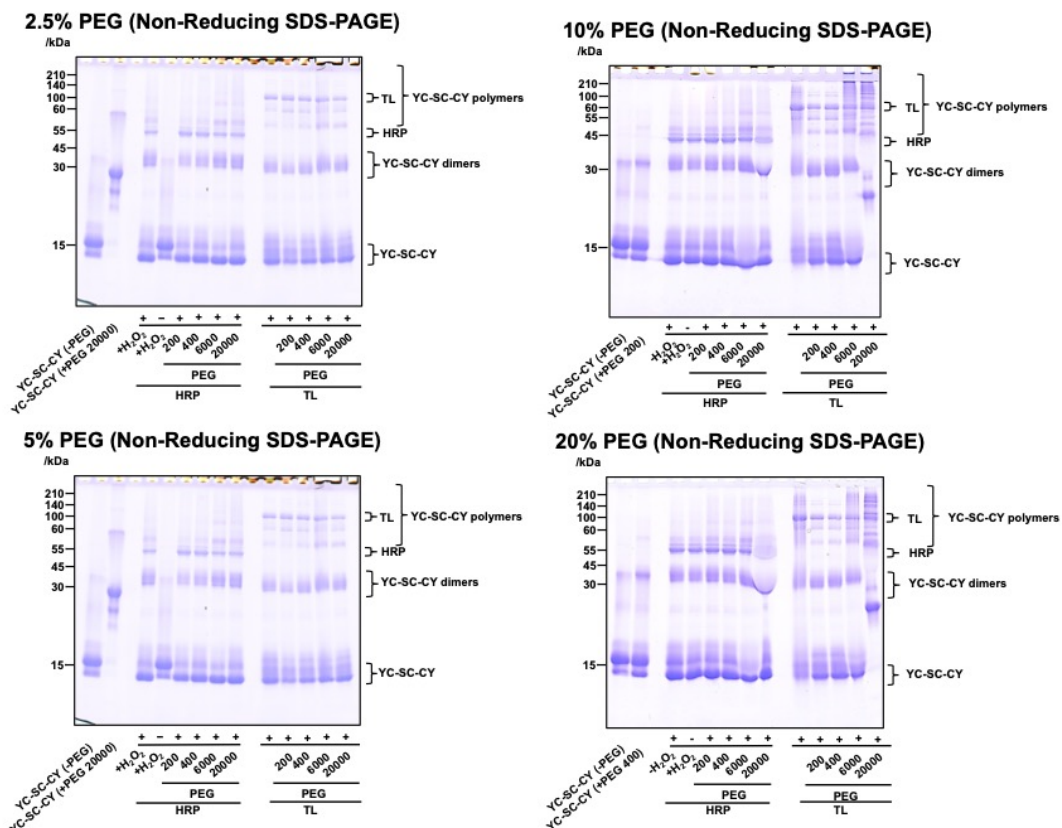


図4-1-2 排除体積効果を利用したS-S結合を介した直鎖状タンパク質ポリマーの調製

ダイマーの形成を確認した。CY-tag の反応においては、チオール基の自発的な酸化反応によって発生する微量の H₂O₂ が HRP を活性化させることで、反応が進行する。そのため、HRP のみを添加した条件でも架橋が進行したものと考えられる。HRP/H₂O₂ の両方を添加した条件では、HRP 酵素反応が速やかに CY-tag の酸化反応が進行すると考えられる。そのため、一部の CY-tag 内のチロシン残基が架橋し、還元条件下の SDS-PAGE でもダイマーの形成が確認された。しかしながら、EGFP-Y の結果と比較すると、チロシン残基を介した架橋物の生成量は極めて少なく、これはすなわち、HRP 酵素反応によって生じたチロシルラジカルが高効率にシステイン残基内のチオール基にラジカルを転移させていることを示している。この結果より、CY-tag はチロシン残基からシステイン残基へのラジカル転移反応を介して、HRP 酵素反応によって速やかに酸化され、S-S 結合を形成するペプチドタグであることが示された。

続いて、この CY-tag を N 末端と C 末端に導入した SpyCatcher(YC-SC-CY)を調製し、直鎖状ポリマーの調製を検討した。架橋用酵素として、HRP ならびに *Trametes sp.* 由来 Laccase(TL)を用いて検討を行った。その結果、通常の条件では分子内の S-S 結合形成反応が優先されてしまい、SC のポリマーを得ることが出来ず、最大でもダイマー程度の重合度の架橋生成物となった。そのため、SC 分子間での架橋効率を向上させるために、排除体積効果の利用を検討した。具体的には、ポリエチレングリコール (PEG) 鎖を含む溶液中での架橋反応の検討を行った。

その結果、PEG の濃度を 10%以上入れた条件において、顕著な高分子量体の生成が確認された(図 4-1-2)。PEG の分子量を 200~20000 で変化させた場合、より高分子量な PEG を用いた条件で重合度の上昇が見られた。この結果は、添加した PEG の排除体積効果によって、YC-SC-CY の溶液中での見かけの濃度が上がり、すなわち分子間の距離が近くなることで、より分子間での架橋反応が起きやすくなったと考察される。一方で、モノマーに相当する位置にも大量のバンドが残存しており、これらは分子内で S-S 結合を形成し、環化した SC だと考えられる。CY-tag にプロリンリンカーなどの剛直な物を用いることで、環化反応を抑制できると考えられ、さらなる重合度の向上が期待できる。

4-2. タンパク質の立体障害を利用した直鎖状タンパク質ポリマーの調製検討結果

まず、BAP の各種組換体を調製した(図 4-2-1)。コントロールとして既存の Y-tag 配列を C 末端に含む BAP-Y ならびに抗体結合タンパク質ドメイン(pG₂pA)を含む BAP-pG₂pA-Y を調製した。各 BAP 組換体の酵素活性を測定した結果、BAP-pG₂pA-Y のみ比活性の低下が見られ、pG₂pA ドメインの融合によって BAP の立体構造の一部が変化していることが示唆された。BAP-Loop-Y では比活性の低下は見られず、Y-Loop の導入による BAP 構造の変化は無いことが示唆された。

続いて、調製した各 BAP 組換体を *Trametes sp.* 由来 Laccase(TL)酵素反応によって処理を施し、ポリマー化するかどうかを評価した。BAP は非共有結合を介してダイマーを形成しているため、その構造を保持したまま解析するために、Native-PAGE によって解析を行った(図 4-2-2)。その結果、Y-tag あるいは Y-Loop を導入した BAP 組換体において、TL を添加した条件において高分子量の架橋生成物を確認し、TL の酵素反応によって BAP 組換体のポリマー化を達成した。得られた BAP ポリマーの酵素活性を評価したところ、ポリマー化前よりも向上していた。活性が向上した理由は明らかになっていないが、ポリマー化反応は BAP の機能に悪影響が無いことを確認できた。

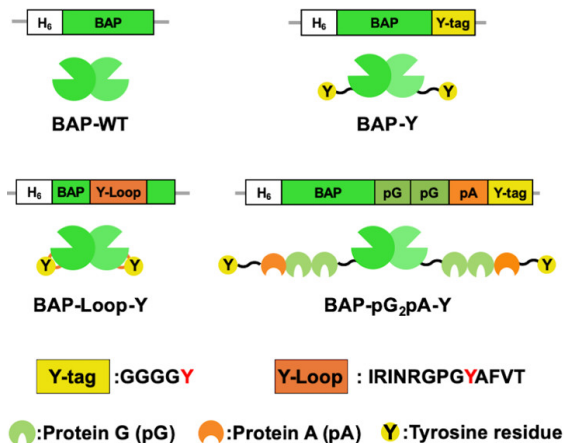


図4-2-1 各種BAP組換体のコンストラクト

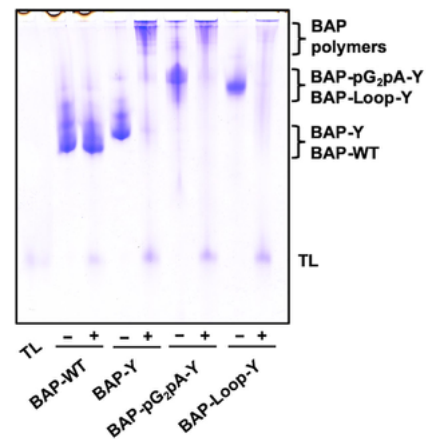


図4-2-2 各種BAP組換体のポリマー化

続いて、得られた BAP ポリマーの分子構造を SPM によって解析した。まず、TL 処理前のサンプルの SPM 観察において、いずれ BAP 組換体も数 nm サイズの球状のタンパク質として観察された(図 4-2-3 左)。TL 処理後の BAP-Y ならびに BAP-pG₂pA-Y において、イレギュラーな構造の直径数百 nm の構造体として観察された(図 4-2-3 右)。末端に導入した Y-tag を介したポリマー化では、架橋生成物であるジチロシンが、再度 TL に基質認識され架橋反応を起こすことで、分岐状の構造がポリマー内に発生する。そのため、ポリマー全体の構造としては、分岐構造を多く含むハイパーランチポリマー状の構造となり、SPM においてイレギュラーな構造体として観察されたものと考えられる。その一方で、BAP-Loop-Y ポリマーにおいては、直線上の構造物が観察され、狙い通り直鎖状のタンパク質ポリマーが生成していることが示された。Y-Loop 内のチロシン残基同士が架橋した場合、架橋生成物であるジチロシンは 2 つのループの先端に位置することとなり、BAP から大きな立体障害を受ける。そのため TL が Y-Loop 内のジチロシンを基質認識することができず、分岐状の構造を取ることなく、直線状に BAP が並んだポリマーが生成したと考えられる。

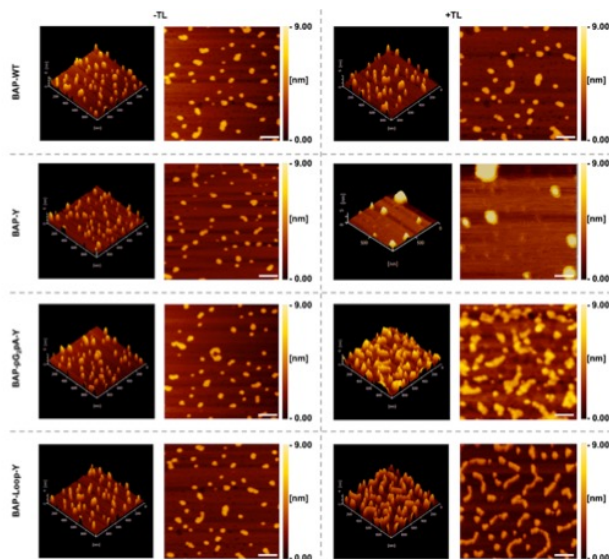


図4-2-3 各種BAP組換体のポリマー化前後でのSPM測定結果

さらに、Y-tag を C 末端にのみ導入した pG₂pA(以下 pG₂pA-Y)を調製し、BAP-Loop-Y との共架橋物を調製した。分子内に 1 つのみ Y-tag を持つ pG₂pA-Y は、ポリマーの末端分子として機能することから、BAP ポリマーの末端に pG₂pA-Y を持った構造になると考えられ、これは検出用のプローブ分子として理想的な構造である。タンパク質ポリマーの構造を制御することで、ポリマー全体としての機能の充進が起きるかどうかを評価するために、BAP ポリマーの Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)プローブとしての機能を評価した(図 4-2-4)。既存の Y-tag を介してポリマー化させた BAP ポリマーでは、pG₂pA-Y に対する BAP の比率を増やすと、75:1 の比率でシグナルが飽和し、100:1 の比率で調製した BAP ポリマーではシグナル強度が低下した。これは、高度に分岐した構造の BAP ポリマー内に、pG₂pA-Y ドメインが包埋されたことで、固相表面の抗体分子への結合効率が落ちたためと考えられる。また、固相表面で BAP ポリマーが広い面積を専有することで、固相表面でのトータルでの BAP 固定化量が向上しなかったことも原因として考えられる。一方、BAP-Loop-Y を用いて調製した BAP ポリマーでは、BAP の比率を 100:1 まで上げて、さらにシグナルが向上することが明らかとなった。これは BAP ポリマーの末端に pG₂pA-Y ドメインが存在することで、ポリマー内の BAP の数が増えても、結合を阻害されなかったためと考えられる。また、固相表面との結合点がポリマー末端に限定されることから、固相表面上でのポリマーのパッキング効率が向上したことも原因として考えられる。

これらの結果より、タンパク質ポリマーの構造制御が、最終的なタンパク質ポリマーの機能にまで影響を与えることが明らかとなり、構造制御の重要性を示すことができた。本研究で得られたタンパク質ポリマーの構造制御技術を用いることで、更に高機能なタンパク質ポリマー分子の創製が可能になると考えられ、タンパク質科学ならびに工学的観点から今後の応用展開が期待される。

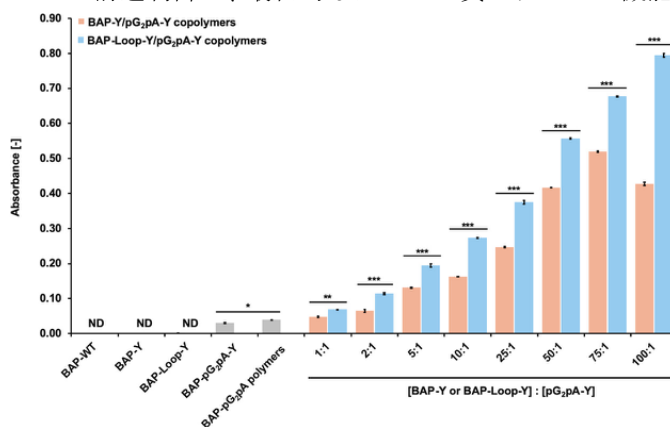


図4-2-4 直鎖状BAPポリマーのELISAプローブとしての機能評価結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Dani Permana, Kosuke Minamihata, Ryo Sato, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya	4. 巻 5
2. 論文標題 Linear Polymerization of Protein by Sterically Controlled Enzymatic Cross-Linking with a Tyrosine-Containing Peptide Loop	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS omega	6. 最初と最後の頁 5160 - 5169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kosuke Minamihata, Keisuke Tsukamoto, Motoyasu. Adachi, Rumi Shimizu, Masahiro Mishina, Ryota Kuroki, Teruyuki Nagamune	4. 巻 56
2. 論文標題 Genetically fused charged peptides induce rapid crystallization of proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 3891-3894
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1039/C9CC09529B	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dani Permana, Kosuke Minamihata, Tsuneyuki Tatsuke, Jae M. Lee, Takahiro Kusakabe, Masahiro Goto, and Noriho Kamiya	4. 巻 14
2. 論文標題 Polymerization of Horseradish Peroxidase by a Laccase Catalyzed Tyrosine Coupling Reaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 1800531
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/biot.201800531	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 R. Sato, K. Minamihata, M. Goto, N. Kamiya
2. 発表標題 Single peptide-tag specific assembly of functional proteins by enzymatic crosslinking reaction
3. 学会等名 The 32nd International symposium on Chemical Engineering（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 D. Permana, K. Minamihata, R. Sato, R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya
2. 発表標題 Formation of Linear Protein Polymer by Controlling Enzymatic Cross-linking Reaction with a Tyrosine-containing Loop Peptide.
3. 学会等名 the 12th Asian Federation of Biotechnology (AFOB) Regional Symposium 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 峻, 南畑 孝介, 後藤 雅宏, 神谷 典穂
2. 発表標題 タンパク質の片末端集合化を可能にするPolyTagの機能性評価
3. 学会等名 2019年度生物工学若手研究者の集い
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 峻, 南畑 孝介, 後藤 雅宏, 神谷 典穂
2. 発表標題 酵素触媒によるペプチドタグ特異的な異種タンパク質の集合化
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 峻, 南畑 孝介, 後藤 雅宏, 神谷 典穂
2. 発表標題 組成制御が可能な異種タンパク質集合体調整法の開発
3. 学会等名 酵素工学研究会 第82回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 峻, 南畑 孝介, 後藤 雅宏, 神谷 典穂
2. 発表標題 分子クラウディング環境下における酵素触媒を介したタンパク質集合化挙動
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤峻, 南畑孝介, 後藤雅宏, 神谷典穂
2. 発表標題 酵素触媒によるペプチドタグを起点としたタンパク質ポリマー形成
3. 学会等名 化学工学会第84年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	神谷 典穂 (Kamiya Noriho)		
研究協力者	Permana Dani (Permana Dani)		
研究協力者	後藤 雅宏 (Goto Masahiro)		