

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05889

研究課題名（和文）細胞表面工学を用いたアレルゲンコンポーネントに対する抗体の簡便な選別法の確立

研究課題名（英文）Development of a simple selection method for interacting molecules using cell surface display.

研究代表者

大野 敏 (Ohno, Satoshi)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号：10345796

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ブレヴィバチルス菌の細胞表面に機能性分子を提示する技術の構築を検討した。様々なソーティングシグナルモチーフ配列を持つ基質ペプチドを用い、Sortaseのトランスペプチターゼ活性を測定するとともに、ブレヴィバチルス菌細胞表面へのタンパク質提示を試みた。タンパク質に融合したHiBiTを利用して表面への提示を評価したところ、標的とするタンパク質を提示できること、相互作用するブレヴィバチルス菌を分別・分取できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ブレヴィバチルス菌の細胞表面に機能性分子を提示できることを示した。期間内に、アレルギーコンポーネントと相互作用する分子の取得までには至らなかったが、その基礎が構築できたことから、今後、食品検査等への応用が期待できる。また、選別された分子の調製において、ブレヴィバチルス菌は培養が容易なグラム陽性菌で、エンドトキシン活性を持たず、糖鎖などの翻訳後修飾もないことから、安全、安価で簡便に、高品質な分子の提供が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the transpeptidase activity of Sortase for protein display to the cell surface layer of *Brevibacillus* sp. First, we measured the transpeptidase activity of Sortase using substrate peptides with various sorting signal motif sequences, and then we attempted to display a protein fused with HiBiT peptide to the cell surface layer. The amount of HiBiT peptide display on the cell surface was measured using LgBiT, and the signal intensity was stronger when the P22 secretory signal sequence was used. This result suggests that the target protein is displayed on the cell surface. Therefore, we mixed the fluorescent protein fusion LgBiT with cells and attempted to separate them by flow cytometry. Fluorescent protein-bound cells were detected, suggesting that it is possible to sort cells displaying the protein using interacting molecules.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：細胞表面工学

1. 研究開始当初の背景

現在日本では、約2人に1人が何らかのアレルギー疾患に罹患していると言われている。アレルギー疾患のひとつである食物アレルギーは、食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象と定義されている。

患者が持つ抗体 (IgE) が関与する場合は、食物に含まれるタンパク質が発症に関与する。特に IgE が認識するタンパク質はアレルゲンコンポーネントとよばれ、臨床症状と関連するものも報告されている。近年、このコンポーネントを利用した血中抗原特異的 IgE 検査も進められており、精度の高いアレルギー検査系の開発が進められている。

一方で、アレルギー症状を誘発するアレルゲンコンポーネントが特定できれば、食事に対する指導が可能となる。例えば、鶏卵アレルギーにおいて、オボアルブミンやオボムコイドはアレルゲンコンポーネントである。このうちオボアルブミンは加熱により抗原性が低下することが知られており、オボアルブミンが発症に関与する場合は、加熱した鶏卵であればアレルギーを引き起こす可能性は低いと考えられている。また、特定のアレルゲンコンポーネントが除去されていることがあらかじめ判別された食材であれば、栄養面に配慮した豊かな食生活を送ることが可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、食品に含まれるアレルゲンコンポーネントを安価で、簡便に検出するシステムの構築を目指し、アレルゲンコンポーネントなど特定のタンパク質と相互作用する分子 (抗体) の新たな捕獲・選別系の構築を行うことを計画した。

相互作用分子の捕獲・選別系として、タンパク質の分泌能力に長け、培養が容易なブレヴィバチルス菌に着目した。さらにこの菌は、グラム陽性菌であることからエンドトキシン活性を持たず、大腸菌のようなエンドトキシンを除くための煩雑な工程などを省くことが可能となる。また GILSP (優良工業製造規範) にも掲載されており、利用における安全性の観点からも優れている。そこで、このブレヴィバチルス菌の細胞表面にタンパク質を提示させる技術 (表層工学) を適用し、ブレヴィバチルス菌の細胞表面に機能性分子を提示し、相互作用分子の捕獲等を行うための新しいツール開発を目的とした。

3. 研究の方法

ブレヴィバチルス菌の細胞表面に機能性分子を提示する方法として、Sortase に着目した。Sortase はグラム陽性菌が持つトランスペプチダーゼの1種で、細胞表層へのタンパク質の局在

に関与する。右図に示すように、ソーティングシグナルモチーフ (Leu-Pro-X-Thr-Gly モチーフ: X は任意のアミノ酸を表す) の Thr 残基と Gly 残基間を切断し、Thr のカルボキシル基と細胞壁ペプチドグリカンの側鎖に存在する Gly₅ 末端の

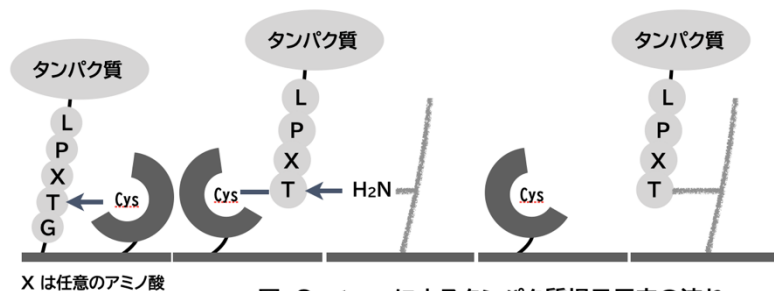


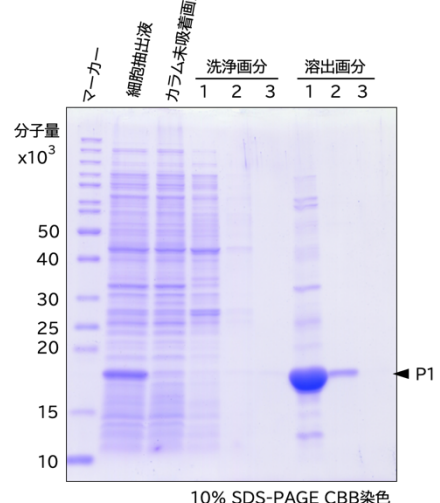
図 Sortaseによるタンパク質提示反応の流れ

アミノ基とのアミド結合形成を触媒する。本研究ではこの反応の流れを利用し、一本鎖抗体 VHH をブレヴィバチルス菌の細胞表層へ提示し、提示した抗体の抗原等を用いて、選別することとし、下記内容について検討した。

- (1) ブレヴィバチルス菌由来 Sortase の調製と機能解析
- (2) ブレヴィバチルス菌細胞表層へのタンパク質提示とフローサイトメーターによる解析

4. 研究成果

B. choshinensis ゲノム DNA データを基に、全長の Sortase と細胞膜への局在に関与する N 末側領域を欠失させた変異体 2 種 (Sortase Δ_{1-24} , Sortase Δ_{1-39}) を作製した。C 末端に融合したヒスチジンタグを利用し Sortase Δ_{1-24} 精製を精製した際の各フラクションを電気泳動した結果を右図に示す。



同様にして各タンパク質を精製し、各タンパク質 1 μ g を電気泳動した結果を、右図左に示した。またこれら各種 Sortase を用い、C 末端に LPQTG の配列を有する一次基質と混合し、加水分解産物の産生状況を電気泳動により分析した結果を右図右に示した。

反応におけるアシル酵素中間体の検出を検討するために、還元剤を含まない SDS sample buffer にて処理したサンプルを準備し、これを図中

「48 h」の表記としている。電気泳動の結果より、48 時間の反応後において Sortase Δ_{1-24} 、Sortase Δ_{1-39} を使用したサンプルでは一次基質が殆ど消費され、全長の Sortase のみ一次基質が残存していた。このことから N 末端領域は細胞膜上に存在する時には反応の妨げにはならないが、Sortase 単独で存在している場合は Sortase と一次基質の接触を妨げている可能性が示唆された。

Sortase の反応には、システイン残基とヒスチジン残基が関与するとされ、ブレビバチルス菌由来 Sortase においては 155 残基目 Cys と 94 残基目 His がこれにあると推定された。そこで Sortase Δ_{1-39} C155A、Sortase Δ_{1-39} H94A を調製し、同様に加水分解反応が確認されるか調査した。その結果を右図に示す。24 時間経過時点で一次基質の減少、アシル酵素中間体の形成や加水分解物が観察できたのは Sortase Δ_{1-39} のみであり、各変異体は一次基質の減少やアシル酵素中間体の形成が観察できなかった。この結果より、ブレビバチルス菌由来 Sortase においても C155、H94 は共に反応に必須の残基であることが確認できた。

次に、Sortase Δ_{1-39} を使用し、どのようなシグナル配列が基質となりやすいか検討した。その結果を右図に示す。これまでは、ゲノム情報から推定した LPQTG の配列を用いていたが、用いた配列全てにおいて、程度の差はあるが基質となりうるということが確認できた。その中でも LPNTG の配列は、6 時間経過した時点でアシル酵素中間体とアシル酵素中間体加水分解物が他の一次基質よりも明瞭に存在しており、24 時間経過時では一次基質がほぼ残っていないため、この 4 種類の一次基質においては LPNTG の配列が最も Sortase との反応性が高いと判断した。

続いて、質量分析を用いたトランスペプチダーゼ活性の評価法の構築を行った。Sortase Δ_{1-39} をソーティングシグナルモチーフのみからなる基質 (Abz-LPETGK(-Dnp)NH₂) と Gly₃ ペプチドと混合し、保温した。この反応では右図に示すように、転移産物など Sortase による反応産物が得られ、これら各産物を LC-MS にて分析した。その結果を次頁上部図に示す。Sortase を加えない場合は一次基質に相当する質量のみが検出され、これをコントロールとした。Sortase を加えた反応産物の場合、転移産物である Abz-LPET-Gly₃ に由来する質量や切断産物に由来する質量が検出されたことから、トランスペプチダーゼ活性を有していることが確認できた。一方で加水分解物や反応前の一次基質に相当する質量も検出されており、ソーティングシグナルモチーフのみからなる基質の配列の違いによるトランスペプチダーゼ活性へ

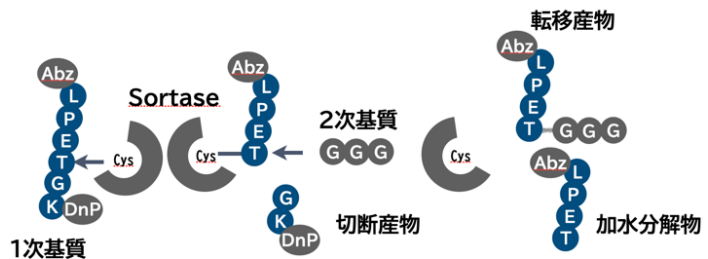
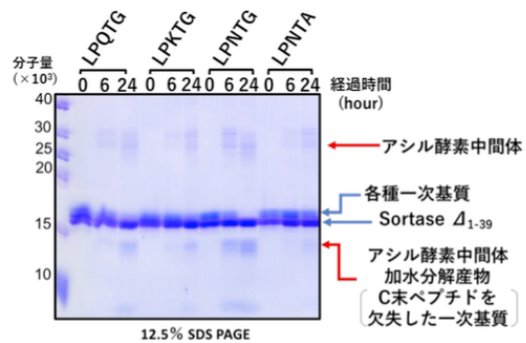
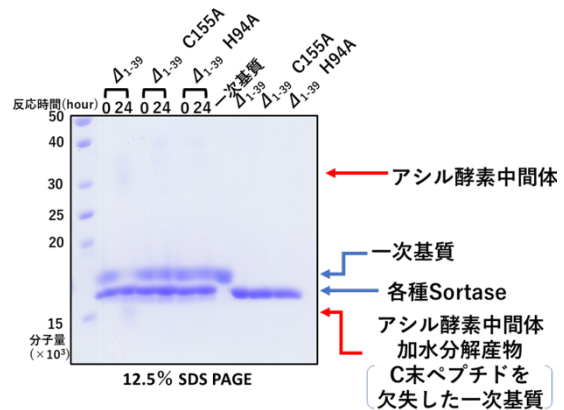
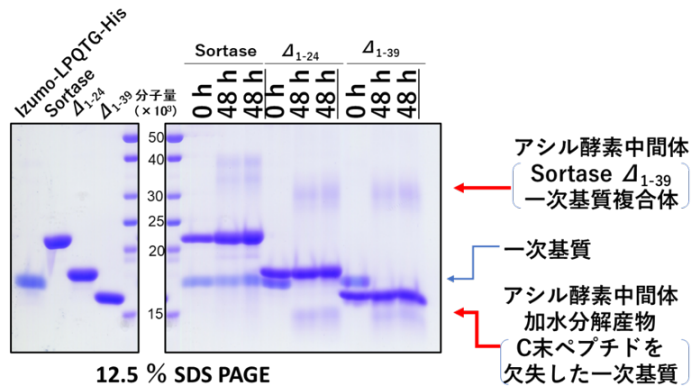


図 トランスペプチダーゼ活性評価における産物

の影響を検討することとした。Sortase は系統的に6種のクラスに分類され、ブレヴィバチルス菌由来 Sortase はクラス D とされる。クラス D はソーティングシグナルモチーフの配列として LPNTA が報告されているが、この配列の場合、一次基質に相当する質量ピークの減少は他の配列の場合に比べ小さく、トランスペプチターゼの反応が進行していないように判断できた(データ未掲載)。

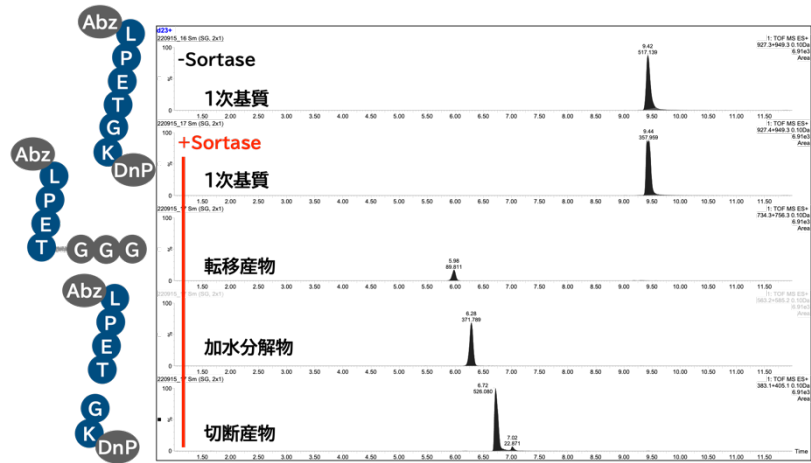
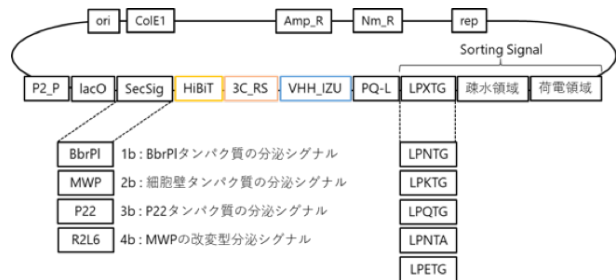
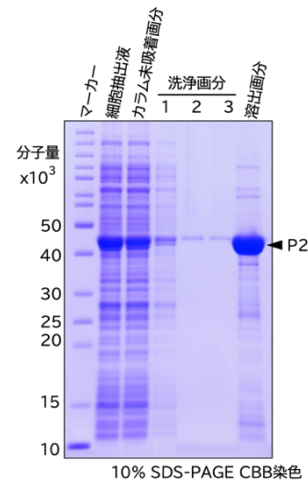


図 質量分析によるトランスペプチターゼ活性評価例

次に、ブレヴィバチルス菌細胞表面へのタンパク質提示とフローサイトメーターによる解析のために、右図に示すようなベクターを作製した。このベクターは N 末端側から、分泌シグナル配列、検出用 HiBiT 配列、切断用プロテアーゼ認識配列、IZUMO タンパク質に対する一本鎖抗体 (VHH_IZU)、プロリンとグルタミンから構成されるリンカー (PQ リンカー)、ソーティングシグナルの順番で配置し、IZUMO タンパク質に対する一本鎖抗体を細胞表面へ提示させるように設計した。まず、ソーティングシグナルモチーフの配列を LPNTG とし、分泌シグナル配列として、現在までに報告されている4種類の配列をそれぞれ組み込んだベクターを作製した。これらベクターを用いて形質転換体を得た後、回収した菌体表面にタンパク質が提示されているかを、HiBiT を利用し、LgBiT との混合により再構成されるルシフェラーゼ活性により評価した。その結果、P22 タンパク質の分泌シグナル配列 (3b) を用いた時に最も活性が高くなり、今後ソーティングシグナルモチーフの配列の違いによる影響を検討する。



HiBiT を利用した発光検出により、細胞表面に目的タンパク質が提示できていることが示唆されたことから、次に HiBiT と LgBiT との相互作用を LgBiT に融合した蛍光タンパク質により検出し、HiBiT と LgBiT とが相互作用している菌体を分別できるか検討した。蛍光タンパク質 mClover を融合した LgBiT を調製した結果を、右図に示す。回収したタンパク質溶液は緑色蛍光が確認でき、計算分子量相当のバンドが確認できた。回収した蛍光タンパク融合 LgBiT を、HiBiT-VHH を提示した菌体、もしくは HiBiT-VHH が提示されていない菌体と混合し、フローサイトメーターにて解析を行った。蛍光特性に基づく細胞集団の状況を下図に示す。赤色の分布を比較すると、下図左の HiBiT-VHH を提示した菌体の方が強度は高く、この強度の差を利用して、分別・分取が可能であると示唆された。



これらのことから、ブレヴィバチルス菌表面に、標的とするタンパク質を提示できること、蛍光タンパク質を融合したタンパク質を用い、このタンパク質と相互作用するブレヴィバチルス菌を分別・分取できる可能性が示唆された。

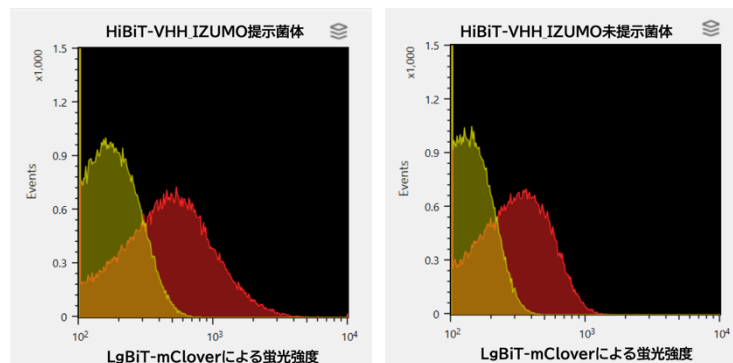


図 VHH-IZUMO提示菌体(左)もしくはVHH-IZUMO未提示菌体(右)と蛍光タンパク質融合LgBiT混合液のフローサイトメータによる解析結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大口真由、大野敏、遠藤睦巳、尾木野弘実、横川隆志
2. 発表標題 グラム陽性菌由来Sortaseの産生と機能解析
3. 学会等名 第1回東海地区創薬デザイン研究会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------