

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21760638

研究課題名（和文） タンパク質の安定性向上技術の開発とバイオ燃料生産への応用

研究課題名（英文） Improvement of protein stability for production of biofuels

研究代表者 田中 勉（TAMAKA TSUTOMU）

神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点研究部・助教

研究者番号：90436551

研究成果の概要（和文）：

本研究では、酵素を用いた蛋白質の安定性向上技術の開発を行った。本研究ではタンパク質連結酵素 Sortase に注目し、この酵素を用いて目的タンパク質の N 末端と C 末端を連結することで、タンパク質を安定化させる技術の開発を試みた。EGFP をモデルタンパク質として用いて両末端を連結させ、熱安定性を向上させる事ができた。さらに、効率的な連結のためには、両末端におけるリンカー配列が重要であることも示された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to establish enzyme-mediated protein stabilization and its application inside living cells. We have focused on Sortase, a transpeptidase. Sortase recognizes LPXTG amino acid sequences and cleaves between T and G, and then ligated with N-terminal polyglycine sequences. Our strategy is that the substrate sequences, i.e., LPXTG and GGG sequences, are introduced both N- and C-terminus of the target protein. Then Sortase allows to conjugate its N- and C-terminus and produces the circular protein. EGFP were chosen as model proteins and these substrate tags appended EGFP was successfully conjugated by Sortase and circular EGFP was obtained. Then the thermal stability of these circular proteins was significantly improved, suggesting our strategy is very useful for protein stabilization. The optimal linker design between N-terminal and C-terminal is one of the issue for expanding versatility of this method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：タンパク質工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：タンパク質・酵素・熱安定性

1. 研究開始当初の背景

温和な条件下で効率よく目的の反応を触媒

できる酵素や、あるいは抗体に代表される分子認識能力など、タンパク質は非常に優れた機能を持っている。これらは酵素を用いた基

幹化合物、高付加価値の機能性物質などの有用物質生産技術や、医療現場における疾病の診断から抗体医薬など、社会にとって必要不可欠なものである。しかしながら、天然には私たちの望み通りの機能・性質を持ったタンパク質が存在するとは限らない。そこで天然のタンパク質を改変して目的の機能・性質を持った新しいタンパク質を作り出そうという試みが行われてきた。例えば遺伝子工学を用いたアミノ酸変異導入、非天然分子導入による機能の付与などにより作られた新規機能性タンパク質は、有用物質生産から医療分野にわたり幅広く応用されている。

しかしながら、タンパク質の機能改変に対するアプローチはいくつも開発されているが、タンパク質の安定性を向上させるアプローチはほとんど例がない。多くの酵素はその反応温度が高いほど反応が効率よく進むが、その一方で酵素が失活するという問題点がある。例えば、バイオマスからの有用物質生産に必須な糖化工程（分解）では、バイオマス分解酵素の至適温度（50℃～70℃）で糖化を行ったのでは酵素の失活が早く、膨大なコストがかかるという問題点がある。更に、脂質等有機溶媒中で酵素反応を行う必要がある場合、酵素の失活はやはり大きな問題である。例えば、環境に優しいクリーンな燃料であるバイオディーゼルは植物油とメタノールからリパーゼを用いて生産されが、メタノールなどの有機溶媒により反応中にリパーゼが失活するという大きな問題点を抱えている。また、医療現場においても体内に投与されたタンパク質製剤は血中などのプロテアーゼにより分解されてしまうという問題が有る。

そこで本研究では、タンパク質の熱安定性、有機溶媒耐性、プロテアーゼ耐性を向上させるための新しいタンパク質改変技術を開発し、タンパク質安定化のための指針を提供することを目的とする。戦略としてタンパク質は通常アミノ酸が連なった線状のポリペプチドであるが、その N 末端と C 末端をタンパク質連結酵素（ペプチド転移酵素）で連結し、環状化タンパク質にすることで安定性を大幅に向上させるというアプローチを用いる（図 1）。具体的には Sortase と呼ばれるタンパク質連結酵素を用いる。この酵素は LPXTG 配列の C 末端と GG 配列の N 末端を連結する反応を触媒する。環状化させたい目的タンパク質の N 末端に GG 配列、C 末端に LPXTG 配列を付与するだけで、Sortase を添加するとそのタンパク質の N 末端と C 末端が連結され、タンパク質を環状化することができる。

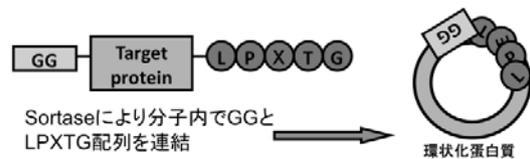


図: Sortaseを用いた蛋白質の環状化戦略

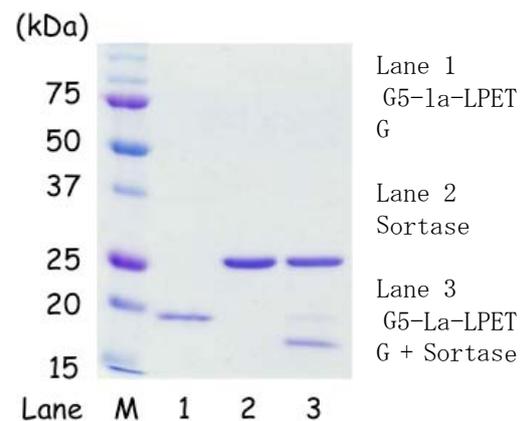
3. 研究の方法

モデルタンパク質として EGFP 及び mRFP を使い、それぞれのタンパク質の N 末端に Sortase の基質となる GGGGG 配列、及び C 末端には LPETG 配列を付加した G5-GFP-LPETG を作成した。この改変タンパク質は大腸菌発現系を用いて発現・精製した。また、Sortase も同様に大腸菌発現系を用いて発現・精製した。環状化反応はこれらタンパク質と Sortase を混合して 37℃、24 時間インキュベートすることで行った。得られた産物は SDS-PAGE で分析を行った。

更に、抗 EGFR 抗体 (1a)、及びセルラーゼの 1 種である β グルコシダーゼ (BGL) も上記と同様に Sortase の基質配列を付加して大腸菌発現系を用いて発現精製した。これらも同様に Sortase を用いて環状化反応を行い、生成物を SDS-PAGE で分析した。

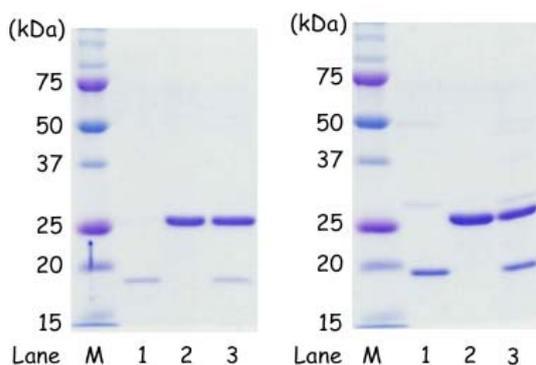
4. 研究成果

EGFP 及び mRFP に Sortase の基質配列を付加して発現させた G5-GFP-LPETG と G5-mRFP-LPETG に Sortase を加えると、バンドが低分子量側にシフトし、環状化が進行している事が確認された。同様に、抗 EGFR 抗体を用いて行った結果を下に示す。



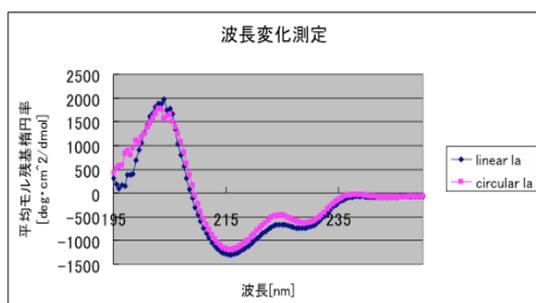
Sortase と G5-1a-LPETg を混合したときのみ、G5-La-LPETG のバンドが低分子量側にシフトした。更に、G5 のみ、及び LPETG のみを付加した 1a を用いた場合にはバンドの移動は観察されなかった。以上より、酵素 Sortase を

用いてタンパク質を環状化させることに成功した。



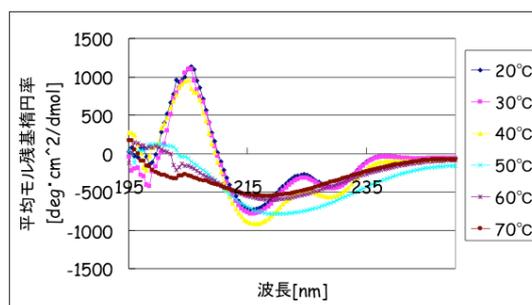
Lane 1: la, Lane 2 Sortase Lane 3
la + Sortase 左: G5-la, 右: la-LPETG

続いて、上記で環状化したタンパク質の性質を、CD スペクトルを用いて解析した。その結果を下に示す。N 末端と C 末端を連結しても、連結前とスペクトルの変化が見られず、連結反応はタンパク質の構造に与える影響が少ない可能性が示された。すなわち、本技術はタンパク質の構造をわずかに変化させるだけで、その機能に与える影響が少ないことが示唆される。



続いて、このタンパク質に段階的に熱を加え、熱安定性を評価した。熱を加えるごとにスペクトルの変化が観察され、とくに 40 °C から 50 °C の間で変性していることが確認された。通常の抗体と環状化の抗体では大幅な熱安定性の向上見られなかった。今後、より詳細な検討を進めていく予定である。

また、同様に β グルコシダーゼでも検討を行った。BGL においては、G5 配列及び LPETG 配列を付加しただけでは環状化反応は進行しなかった。そこで、両方の配列とタンパク質の間に数アミノ酸からなるリンカー配列を挿入した BGL を調製した。リンカー配列を挿入する事で、環状化反応の反応率を大幅に向上させることに成功した。今後、これらのタンパク質の安定性について評価していく予定である。



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 2 件)

① Matsumoto, T., Sawamoto, S., Sakamoto, T., Tanaka, T., Fukuda, H., Kondo, A.
Site-specific tetrameric streptavidin-protein conjugation using sortase A. *Journal of Biotechnology*, 2011, 151(1-2), 37-42.

② Sakamoto, T., Sawamoto, S., Tanaka, T., Fukuda, H., Kondo, A.
Enzyme-mediated site-specific antibody-protein modification using a ZZ domain as a linker. *Bioconjugate Chemistry*, 2010, 2227-2233.

[学会発表] (計 5 件)

① 松本拓也・田中勉・近藤昭彦
Sortase を用いた streptavidin の新規修飾技術の開発
生物工学会 6 2 回大会
2010. 10. 27-29
宮崎シーガイアワールドコンベンションセンターサミット

② 坂本 崇幸、田中 勉、近藤 昭彦
酵素を用いた抗体結合ドメインー機能性タンパク質調製法の最適化
化学工学会 第 75 年会
2010. 3. 20
鹿児島大学

③ Tsutomu Tanaka, Takayuki Sakamoto, Kanako Wakamura, Ryosuke Takase, Takuya Matsumoto, Shiori Sawamoto, Akihiko Kondo
Sortase-mediated Site-specific protein conjugation
Enzyme Engineering XX
2009.9.24-28
Groningen, the Netherlands

④ Takayuki Sakamoto, Tsutomu Tanaka, Akihiko Kondo

Enzyme-mediated Antibody-Protein conjugation
APBioChEC 2009
2009.11.24-28
神戸国際会議場

⑤Tsutomu Tanaka, Takayuki Sakamoto, Kanako
Wakamura, Ryosuke Takase, Takuya Matsumoto,
Shiori Sawamoto, Akihiko Kondo
Enzyme-mediated Site-specific protein
modification
APBioChEC 2009
2009.11.24-28
神戸国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 勉 (TANAKA TSUTOMU)
神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点
研究部・助教
研究者番号：90436551

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者