

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14737

研究課題名（和文）リビング重合性蛋白質素子の人工設計

研究課題名（英文）Artificial design of living polymerizing proteins

研究代表者

松長 遼（Matsunaga, Ryo）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・助教

研究者番号：70895466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ドメイン間相互作用およびイソペプチド結合形成による動的な構造変化を利用した反応末端の活性制御によるリビング重合性蛋白質の創製を目指して研究を行った。その結果、不活性な蛋白質ドメインに隣接するように別の蛋白質ドメインを結合させると、ドメイン間の相互作用により活性化が生じるような蛋白質を設計することに成功した。同様の性質を有する蛋白質ドメインをもつ1種類設計することで、リビング重合を達成することができる。また、迅速かつ高効率な蛋白質発現を可能とするプレビバチルス発現系の改良により、従来発現困難とされていた各種蛋白質の分泌発現に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

合成高分子化学の分野で明らかのように、分子量分布を狭く制御することは材料物性を制御するうえで重要課題の一つであり、蛋白質からなるポリマーにおいても分子量分布の精密制御が材料応用に向けた本質的課題である。したがって、本研究の発展により優れた物性を有する蛋白質材料の創製が可能になると考えられる。また、プレビバチルス発現系の改良により、分子設計と解析のサイクルを高速化し、迅速な蛋白質設計の改良が可能となった。

研究成果の概要（英文）：I conducted research to create living polymerizable proteins by controlling the activity of the reaction end using dynamic conformational changes due to domain-domain interactions and isopeptide bond formation. As a result, I succeeded in designing a protein that is activated by domain-domain interaction when another protein domain is bound adjacent to the inactive protein domain. Living polymerization can be achieved by designing another protein domain with similar properties. In addition, by improving the Brevibacillus expression system, which enables rapid and highly efficient protein expression, I have succeeded in secretory expression of various proteins that were previously considered difficult to express.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：蛋白質工学 イソペプチド結合 重合 プレビバチルス発現系

1. 研究開始当初の背景

蛋白質は生命活動の基礎となる多機能性分子である。生体反応を触媒する酵素や異物を認識して免疫反応を誘起する抗体、巧みな構造変化によって運動を生み出す収縮蛋白質など多種多様な役割を担った蛋白質が生体内で活躍している。したがって、生物を模倣して蛋白質を材料として利用すれば、蛋白質の有する特異な機能を応用した革新的材料を創製することが可能になると期待できる。

近年、蛋白質の有する自己組織化能や特異的分子認識能を利用して人工的に高次構造体を作製する試みが盛んになされている。このような方法のメリットは、特別な機器を必要とせず、均一で精緻な構造体を得られる点である。現在までにナノスケールからマクロスケールに至るまで蛋白質の高次構造体創製に関する多種多様な研究がなされている。このような背景のもと、我々はレンサ球菌の線毛構成蛋白質を改変して、酸化還元環境の変化に応じて反応制御可能な重合性蛋白質「Protein shackle」を設計し、以下のようなユニークな特徴を有することを示した (Matsunaga et al. *Nat. commun.* 2013)。

1. 反応制御が可能である。
2. 直径 2-3 nm の柔軟な線維状構造体を形成する。
3. 同構造体はモノマーに由来する 10 nm の周期構造を形成する。
4. 高い熱安定性と溶解性を有する。
5. 機能性蛋白質の融合が可能である。

Protein shackle は、レンサ球菌の線毛を構成する蛋白質 Spy0128 を基にして設計された。Spy0128 は N ドメイン(NTD)と C ドメイン(CTD)から構成され、各ドメインにはアミノ酸鎖間に形成されるイソペプチド結合が 1 つずつ存在する。イソペプチド結合はフォールディングの過程で自発的に形成され、構造の安定化に寄与する。イソペプチド結合は Lys-Asn 間で形成され、結合形成には触媒残基である Glu が必須である。

Howarth らは、CTD の分子内イソペプチド結合を形成する、Asn を含む C 末端の ストランド (Isopeptag) と Lys を含む残りの部分で Spy0128 を 2 つに分割し、それぞれを別々に発現・精製して in vitro で混合すると、野生型の構造を再生するようにして自発的に 2 分子間で共有結合を形成することを明らかにした。また、NTD のイソペプチド結合についても同様のことが可能であることが示された。

両端に Isopeptag システムの反応対を有するような改変蛋白質を設計することができれば、重合能を人工的に創出できると予想される。そこで、我々は Spy0128 の C 末端のペプチド配列 (Isopeptag、以降 CP とよぶ) を N 末端に移動し、生じた CTD の反応サイトにジスルフィド結合で固定される蓋を導入した蛋白質 Protein shackle を開発した (図 1)。溶媒を還元環境にすることでジスルフィド結合による蓋の固定が外れ、Protein shackle の重合が開始される。

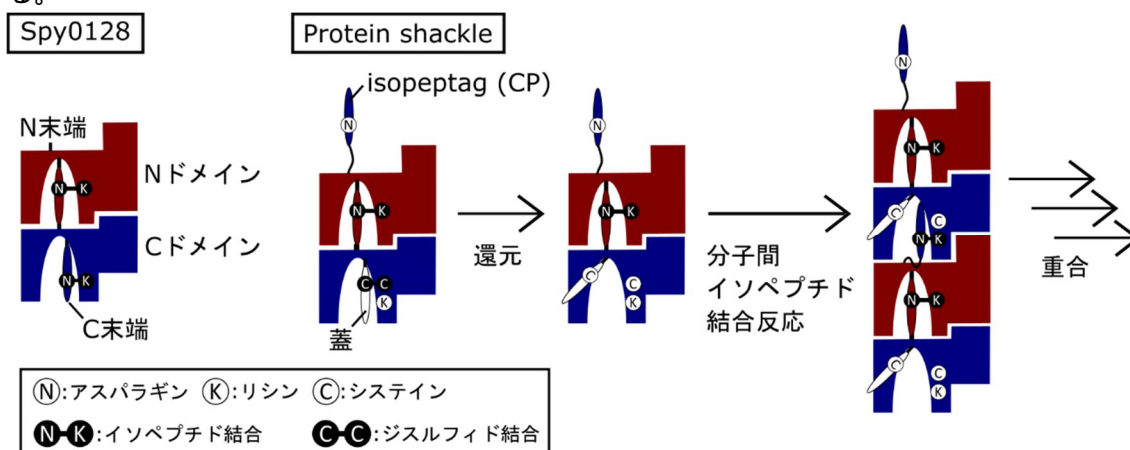


図 1. Protein shackle の設計および反応スキーム

Protein shackle は溶媒環境により重合反応制御が可能であるという画期的な蛋白質素子であるが、ポリマーの両末端が常に活性を有するため、合成高分子化学における「重縮合」のように、反応が進行するに従い分子量分布が大きく広がってしまうという本質的な欠点がある。

合成高分子化学の分野で明らかのように、分子量分布を狭く制御することは材料物性を制御するうえで最重要の課題であり、蛋白質からなるポリマーにおいても分子量分布の精密制御が材料応用に向けた本質的な課題であると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、リビング重合性蛋白質素子を設計することで、狭い分子量分布の蛋白質ポリマーを創製し、その物性を明らかにすることである。蛋白質からなる精緻な集合体の構築は、世界中で広く研究されてきた。特に近年、計算化学の発展により、コンピュータで蛋白質の構造や相互作用を設計することで、自在に人工蛋白質の集合体を創製することが可能になってきている。しかしながら、一次元構造体、すなわち線維については、単純な配列構造であるがゆえに、静的な相互作用の設計のみでは長さ（重合度、分子量）の分布を制御することは困難である。

そこで本研究においては、ドメイン間相互作用およびイソペプチド結合形成による動的な構造変化を利用した反応末端の活性制御を目指した。蛋白質のダイナミクスは構造生物学において精力的に研究されているが、これを人工設計に応用する研究はほとんどなく、このような蛋白質の設計に成功すれば今後の人工蛋白質設計における一つの指針を提示できると考えた。

3. 研究の方法

Spy0128 を基にして各種反応性蛋白質を設計した。設計した各蛋白質のリコンビナント発現用プラスミドを構築し、大腸菌発現系もしくはプレバチルス発現系で発現を行い、精製した。設計した各蛋白質の反応性は SDS-PAGE もしくは Mass photometry で解析した。

4. 研究成果

前述のように、Spy0128 は NTD と CTD、2つのドメインから構成される蛋白質である。NTD から C 末端側の ストランド（以降 NP とよぶ）を除去した蛋白質を NTDA、CTD から CP を除去した CTD を CTDA とよぶ。Spy0128 を NTD-CTD と表記することになると、CP と NTD-CTDA は自発的にイソペプチド結合を形成することが明らかにされている。一方で、N 末端の ストランドを欠損した NTD-CTDA は CP と反応しないことが事前検討でわかっており、ドメイン間の相互作用が反応性を制御していると推測される。すなわち、CTDA の活性は隣接する NTD に依存しており、NP を CTD の N 末端に融合し(NP-CTDA)、NTDA を NP と反応させることにより CTDA の活性を ON にすることが可能ではないかと考えた。これは NTDA の活性に対しても同じことがいえる。したがって、NP-CTDA、CP-NTDA に対して適切な開始剤を与えることで、イソペプチド結合の形成を通じた一方向的なフォールディングを促し、結果としてリビング重合が可能となるのではないかと考えた。

はじめに、NP-CTDA、CP-NTDA をそれぞれ発現精製し、混合させたところ、意外なことに開始剤なしでも互いに反応し、重合性を示すことが分かった。単独での重合性はないことから、交互共重合体の形成が示唆された。この結果から、少なくとも NP-CTDA の CTDA と、CP-NTDA の NTDA どちらか一方は、予想外にもはじめから活性を有していることが明らかになった。そこで、NTDA と CTDA の活性確認のため、NTDA と NP-CTDA、CTDA と CP-NTDA の反応性を確認した。その結果、前者のペアは反応するが、後者のペアは反応しないことが示された。

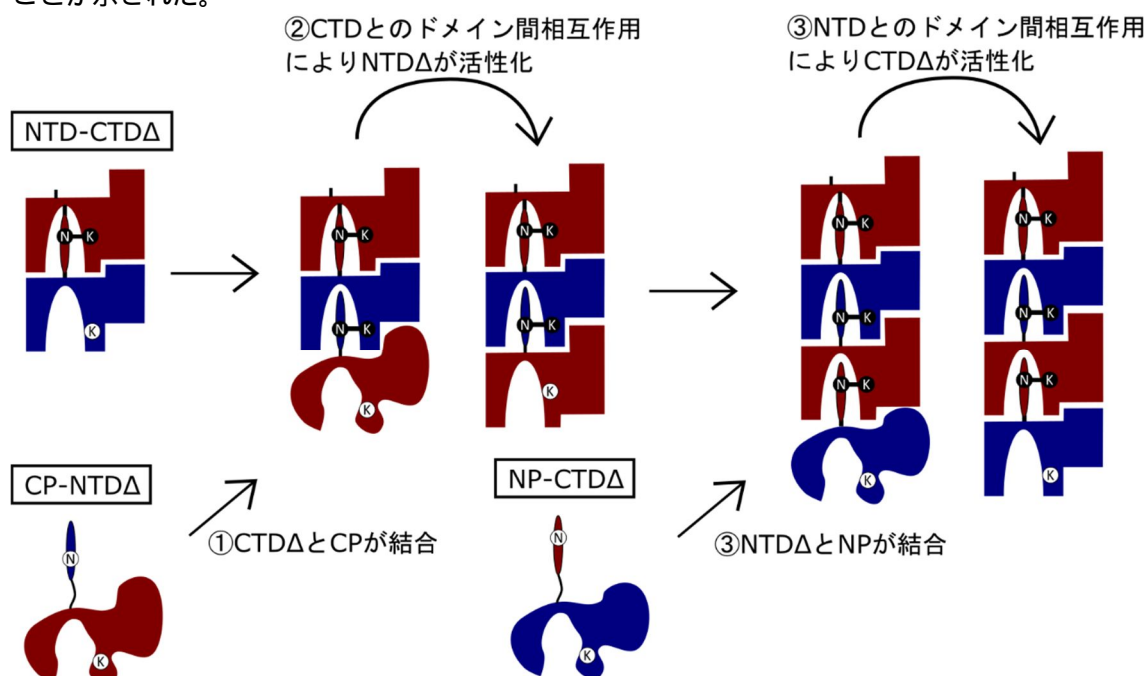


図 2. 本研究で実現するリビング重合の反応スキーム

以上の結果より、NP-CTDAはNPとNTDAの結合により、CPとの結合活性がONになることを示唆しており、目的であった、「ドメイン間相互作用およびイソペプチド結合形成による動的な構造変化を利用した反応末端の活性制御」が達成された。今後、CP-NTDAに対しても変異導入等の手段で同様の性質を与えることで、リビング重合を実現することができる（図2）。

分子設計と並行して、迅速かつ高効率な蛋白質発現を可能とするプレバチルス発現系の改良に取り組んだ。96ウェルプレートの培養容器としての利用と、培地へのアルギニン塩酸塩とプロリンの添加により、従来微生物では可溶性発現が困難とされていた新型コロナウイルススパイク蛋白質の受容体結合ドメイン(RBD)など各種蛋白質の分泌発現に成功した。上記で設計した重合性蛋白質の発現には当初は大腸菌発現系を用いていたが、プレバチルス発現系を用いて大量に取得できるようになり、迅速な分子設計と解析が可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Matsunaga Ryo, Tsumoto Kouhei	4. 巻 194
2. 論文標題 Addition of arginine hydrochloride and proline to the culture medium enhances recombinant protein expression in <i>Brevibacillus choshinensis</i> : The case of RBD of SARS-CoV-2 spike protein and its antibody	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 106075 ~ 106075
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pep.2022.106075	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徳永 悠希、松長 遼、長門石 暁、津本 浩平
2. 発表標題 pH応答的に結合様態を変化させる化膿レンサ球菌由来の接着蛋白質の機能解明
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田 佳生、黒田 大祐、佐々木 慈英、中木戸 誠、松長 遼、橋口 隆生、津本 浩平
2. 発表標題 In silico design of cross-reactive antibodies binding to SARS-CoV and SARS-CoV-2 spike RBDs
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲垣 万優子、松長 遼、奥村 繁、丸山 俊昭、Entzminger K、津本 浩平
2. 発表標題 ハイスループットな抗体変異体スクリーニング系の構築
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 松長遼, 津本浩平	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 6
3. 書名 タンパク質工学から創薬へ スマートドラッグの実現に向けて, 医学のあゆみ278巻6号 構造生命科学による創薬への挑戦	

1. 著者名 中木戸誠, 松長遼, 津本浩平	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 7
3. 書名 第 編 総論 第1章 バイオテクノロジーが実現する超高感度・迅速バイオセンシング・デバイス, AI・ナノ・量子による超高感度・迅速バイオセンシング 超早期パンデミック検査・超早期診断・POCTから健康長寿社会へ	

1. 著者名 松長遼, 津本浩平	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 9
3. 書名 第2編 医用工学の基盤技術 6 抗体工学, 医用工学ハンドブック	

1. 著者名 津本 浩平、石井 明子、内山 進、本田 真也	4. 発行年 2022年
2. 出版社 じほう	5. 総ページ数 180
3. 書名 - 1 バイオ医薬品とは, - 2 タンパク質科学の基礎と取扱い, - 7 タンパク質の分子間相互作用, - 1 バイオ医薬品の開発から製造までの課題, 品質評価のカギをにぎる バイオ医薬品の分析法	

〔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
---------	---------