

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25289297

研究課題名(和文) 機能性タンパク質の1次元アセンブリによる高次機能創発

研究課題名(英文) Design of highly functional protein assemblies in one-dimensional manner

研究代表者

神谷 典穂 (Kamiya, Noriho)

九州大学・工学(系)研究科(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)：生物を構成する主要な分子であるタンパク質は、現在、ナノサイズの機能素子として幅広く活用されている。一方、生体内では、異なる複数のタンパク質成分が、化学的・物理的相互作用を介して、高次の機能を発現している例が多く見られる。本研究では、天然に見られる高次複合タンパク質を手本として、遺伝子組換え技術により得られる多様なタンパク質を、次元を意識して集積化するという発想の下、高次の機能を発現するバイオハイブリッド材料の設計を試みた。具体的には、タンパク質と合成高分子あるいは核酸からなる1次元状ハイブリッド分子や、機能性タンパク質がネットワーク中に組み込まれたハイドロゲルを得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Proteins are widely employed as functional nano-sized units in a range of applications. Self-assembly processes found in biological systems often contribute well-organized, higher-order protein structures with unique functions. To mimic natural biomolecular assembly system, artificial bioconjugates have been designed and validated. In this study, we developed artificial multi-protein complexes by assembling functional biomolecular units including proteins and DNA in different manner. For example, we succeeded in enzymatic conjugation of multiple proteins on a DNA aptamer in a tail-specific manner. Furthermore, biohybrid hydrogels are also obtained by designing new synthetic polymers with specific crosslinking points recognized by enzymes. Finally, applications of potent new biohybrid materials were studied. The results obtained indicated the potential of several strategies for assembling functional proteins, in particular, those based on a variety of functional/template molecules.

研究分野：生体分子工学

キーワード：蛋白質 酵素 バイオハイブリッド ナノバイオ 翻訳後修飾 アプタマー 核酸 自己集合

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、ナノ・バイオテクノロジー分野において重要な機能性分子素子である。現在、遺伝子工学技術の発展とゲノム情報の蓄積により、多様なタンパク質を手に取り、分子のかたちや機能の改変が可能となった。また、材料科学の進展と相まって、合成分子やナノ材料との複合化による高機能化も盛んに進められている。即ち、新技術と新材料の統合により、目的とする機能を有する新たなハイブリッド型タンパク質材料の創出が広範に試みられている。

一方、天然には多様な高次複合タンパク質集合体が存在する。本研究では、それらの集合原理を手本として、遺伝子組換え技術により得られる分子設計されたタンパク質ユニットを、次元を意識して集積化(アセンブリ)するという発想の下、高次の機能を発現する複合材料の設計を志向した。まず、タンパク質と合成高分子あるいは核酸からなる1次元状バイオハイブリッド分子の創製を試みた。さらに、タンパク質が3次元ネットワーク中に組み込まれた機能性ハイドロゲルの設計へと研究を展開した。最後に、タンパク質ユニットのさらなる高機能化のため、真核生物による組換えタンパク質発現系として蚕生産系の可能性を検証した。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質を分子レベルで効果的に配置・集積することで得られる新たな機能の発現を目標とした。具体的には、翻訳後修飾酵素による部位特異的・共有結合的なタンパク質架橋反応を活用し、(1) 架橋点となる基質ペプチドが適切に導入・提示された高分子型人工足場分子の合成、(2) 足場分子上への集積化による機能性タンパク質の1次元アセンブリ、(3) 人工高分子基質の設計に基づく3次元ネットワークへのタンパク質の組込み、について基礎検討を実施した。

3. 研究の方法

(1) 架橋点導入高分子型人工足場分子の合成
研究分担者の若林博士の協力の下、酵素触媒による集積化の架橋点となる基質ペプチドが適切に提示された高分子型人工足場分子を設計・合成した。

(2) 足場分子上への機能性タンパク質の集積
モデルタンパク質として蛍光タンパク質や抗体結合タンパク質を選択し、これに酵素基質ペプチドを導入した融合タンパク質を設計、大腸菌を宿主として組換え発現した。得られた融合タンパク質を合成高分子上に、効率良く部位特異的且つ共有結合的に集積するための基礎条件を網羅的に評価した。さらに、抗原検出系への展開と感度向上を志向し、蚕を宿主とした組換え酸化還元酵素の発現を検討した。

(3) 核酸末端へのタンパク質集積法の開発

人工基質ペプチドの設計に基づく足場分子に依存しない1次元タンパク質アセンブリに資する新たな手法の確立に向け、オリゴ核酸の末端に部位特異的に目的タンパク質を複数ラベルする技術の開発を検討した。

4. 研究成果

(1) 架橋点導入人工足場分子の合成と評価

酵素トランスグルタミナーゼ基質が修飾されたモノマーユニットの合成に成功し、これが組み込まれた合成高分子足場を得ることができた。さらに、合成高分子を足場として、複数の機能性タンパク質が部位特異的に修飾された1次元状タンパク質集合体の調製に成功した(図1)。

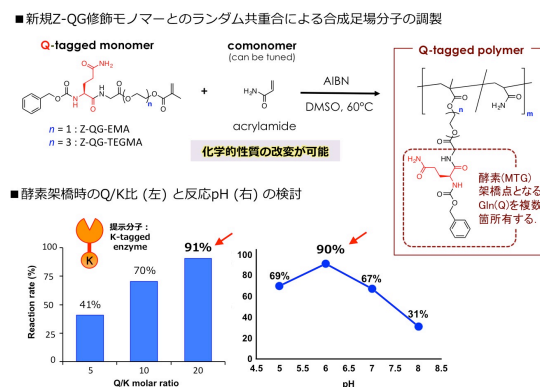


図1 新規合成足場分子の設計と機能化

酵素ペルオキシダーゼ(HRP)触媒によるフェノールのカップリング反応を応用した新たなタンパク質架橋化方法を活用するべく、両末端にフェノール基を導入した合成ポリマーユニットを調製した。本合成ユニットを基質としたHRP触媒を介して、1次元状集合体の調製を試みたところ、予想に反してハイドロゲルの形成が確認された(図2)。そこで、チロシン含有タンパク質との共架橋化を試みたところ、当該タンパク質が機能を保持した形で3次元ネットワーク中に捕捉されることを確認した。さらに、細胞接着能を有する機能性タンパク質を導入することで、動物細胞の生理活性を維持した状態でのゲル内への包括、2次元シート状細胞組織構造体の調製に成功した。

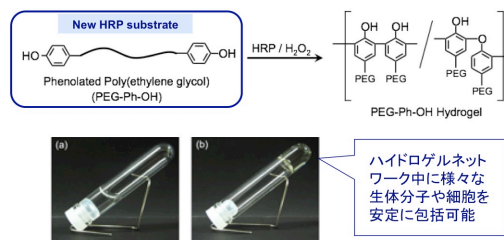


図2 新規 HRP 合成高分子基質の設計とハイドロゲル化剤としての利用

(2) 機能性タンパク質の足場分子状への集積化とタンパク質ユニットの高機能化

まず、合成高分子足場上への効率的な集積化の鍵となる基礎因子を明らかにした(図1)。次に、分子サイズの異なる一連の組換えタンパク質を準備し、これらを合成高分子上に部位特異的かつ共有結合的に集積化した異種酵素複合系の構築を試みた。その結果、ラベル化条件の最適化により、異なるタンパク質が示す個々の機能性に基づく多機能性を発揮するタンパク質ハイブリッド材料の調製に成功した。さらに、研究分担者である若林博士が有する自己集合性ペプチドとの複合化により、新たな概念での機能性タンパク質の集積化の可能性を見出した。

一方、タンパク質ユニットの高機能化を志向し、九州大学農学部との共同研究により、蚕発現系を用いて活性型酵素ユニットを得ることに成功した(図3)。さらに、上述と同様の設計を通して合成足場分子とハイブリッド化することで、抗原検出が可能なバイオ素子として利用できることを確認した。

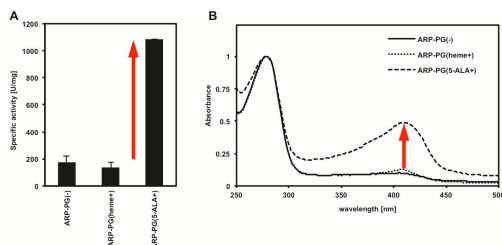


図3 蚕発現系を利用した診断用組換え酵素発現系の構築(A)と発現条件の最適化(B)

(3) 核酸末端へのタンパク質1次元集積法の確立とタンパク質抗原検出系への展開

機能性核酸としてアプタマーを選択し、その末端に複数の酵素が1次元集積化された新しいかたちの酵素-核酸ハイブリッドの調製を試みた。その結果、1分子のアプタマーに100分子以上の足場となる核酸ユニットを連結可能なこと、導入された核酸ユニットを反応点として、複数の機能性タンパク質を末端選択的に導入することに成功した(図4)。

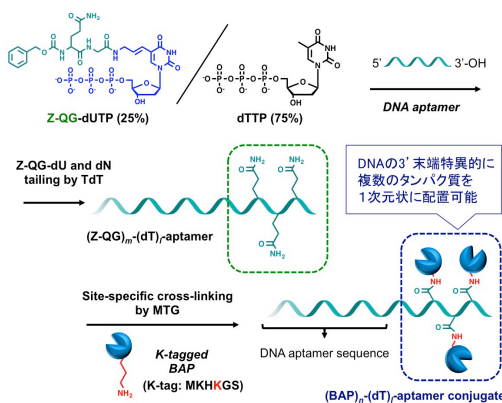


図4 核酸末端への機能性タンパク質1次元集積化法の確立と機能評価

さらに、当該技術の応用例として、セルロース結合性アプタマーとセルラーゼ触媒ドメインの1:1等量複合体を効率良く調製可能な条件を確立し、新たな人工セルラーゼの創出に向けた概念実証を達成した。

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 9 件)

①Mari Takahara, Kounosuke Hayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, 'Enzymatic conjugation of multiple proteins on a DNA aptamer in a tail-specific manner', *Biotechnol. J.*, accepted. DOI: 10.1002/biot.201500560.

② Kousuke Moriyama, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, 'Enzyme-mediated preparation of hydrogels composed of poly(ethylene glycol) and gelatin as cell culture platforms', *RSC Adv.*, 5, 3070-3073 (2015).

③ Kousuke Moriyama, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, 'Characterization of enzymatically gellable, phenolated linear poly(ethylene glycol) with different molecular weights for encapsulating living cells', *Biochem. Eng. J.*, 93, 25-30 (2015)

④林 浩之輔, 友添祐介, 永井賢治, 平石佳之, 神谷典穂, 'プレビバチルス発現系によるペルオキシダーゼ融合タンパク質試薬の調製', 化学工学論文集, 41, 157-161 (2015)

⑤Kosuke Minamihata, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, 'Site-specific conjugation of an antibody-binding protein catalyzed by horseradish peroxidase creates a multivalent protein conjugate with high affinity to IgG', *Biotechnol. J.*, 10, 222-226 (2015)

⑥Kounosuke Hayashi, Jae Man Lee, Yusuke Tomozoe, Takahiro Kusakabe, Noriho Kamiya, 'Heme precursor injection is effective for *Arthromyces ramosus* peroxidase fusion protein production by a silkworm expression system' *J. Biosci. Bioeng.*, 120, 384-386 (2015)

⑦Kosuke Moriyama, Kosuke Minamihata, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, 'Enzymatic preparation of a redox-responsive hydrogel for encapsulating and releasing living cells', *Chem. Commun.*, 50, 5895-5898 (2014)

⑧Kousuke Moriyama, Kosuke Minamihata, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, 'Enzymatic preparation of streptavidin-immobilized hydrogel using a phenolated linear poly(ethylene glycol)', *Biochem. Eng. J.*, 76,

37-42 (2013)

⑨Mari Takahara, Konosuke Hayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, 'Tailing DNA aptamers with functional proteins by two-step enzymatic reaction', *J. Biosci. Bioeng.*, 116, 660-665 (2013)

[学会発表] (計 51 件)

(1) Takafumi Saeki, Kensuke Yahiro, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, Enzymatic assembly of proteins onto synthetic polymer scaffold, The 28th International Symposium on Chemical Engineering, 2015 年 12 月 5 日, Jeju, Korea

(2) Takuji Kawanami, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, Enzymatic Strategy for Lipidization of Functional Proteins, The 28th International Symposium on Chemical Engineering, 2015 年 12 月 5 日, Jeju, Korea

(3) Noriho Kamiya, Yutaro Mori, Hiroki Kawashima, Tsutomu Tanaka, Hikaru Nakazawa, Mitsuo Umetsu, One-dimensional assembly of functional proteins by avidin-biotin interaction, Asian Congress on Biotechnology (ACB) 2015, 2015 年 11 月 16 日, Kuala Lumpur, Malaysia

(4) 佐伯貴史、八尋謙介、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂, 酵素触媒を利用した合成ポリマー上への異種タンパク質の集積化, 第 67 回日本生物工学会大会, 2015 年 10 月 27 日、鹿児島

(5) 高原 茉莉、森 祐太郎、Budinova Geisa A.L.G.、中澤 光、梅津 光央、神谷 典穂, セルロース結合性 DNA アプタマーを利用した新規人工セルラーゼの創製, 第 67 回日本生物工学会大会, 2015 年 10 月 27 日、鹿児島

(6) 神谷典穂, 産業応用を志向したバイオ材料設計における生体触媒の活用, 第 67 回日本生物工学会大会シンポジウム「スマートプロテインデザイン:産業化にむけた蛋白質工学」, 2015 年 10 月 27 日、鹿児島

(7) Rie Wakabayashi, K. Yahiro, T. Saeki, M. Goto, Noriho Kamiya, Transglutaminase-mediated fabrication of multi-protein-labeled polyacrylamide for molecular biosensing, YABEC 2015 (Young Asian Biochemical Engineers' Community), 2015 年 10 月 15 日, South Korea

(8) 高原茉莉、森祐太郎、Budinova Geisa A.L.G.、中澤光、梅津光央、神谷典穂, 人工糖結合モジュールを志向したセルロース結合性 DNA アプタマーの開発, 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム 2015 年 9 月 10 日, 熊本大学

(9) 川嶋宏希、森裕太郎、田中勉、中澤光、梅津光央、神谷典穂, タンパク質-リガンド相互作用を介した一次元セルラーゼ集合体の構築と触媒特性, 化学工学会第 47 回秋季大会, 2015 年 9 月 10 日, 北海道大学

(10) Noriho Kamiya, Design of biomolecular assemblies by enzymatic protein manipulation, NANO KOREA 2015, 2015 年 7 月 3 日, Coex, Seoul, Korea

(11) Noriho Kamiya, Lili Jia, Geisa A. L. Gonçalves, Hirofumi Ichinose, and Tsutomu Tanaka, Molecular design of biocatalytic assemblies for sustainable biotechnological applications, ARS 2015, 2015 年 5 月 29 日, Campus Universitas Indonesia, Depok, Indonesia

(12) 高原茉莉、林浩之輔、後藤雅宏、神谷典穂, 酵素-DNA アプタマー複合体の高効率調製を志向した酵素反応系の構築, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年 3 月 27 日, 日本大学

(13) 森山幸祐、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂, 酵素触媒反応によるチオール基修飾高分子のゲル化とその機能化, 化学工学会第 80 回年会, 2015 年 3 月 21 日, 芝浦工業大学

(14) 森山幸祐、内藤翔乃、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂, 酸化還元応答型ハイドロゲルの酵素触媒的調製法と細胞培養基材への応用, シンポジウム 細胞アッセイ技術の現状と将来, 2015 年 1 月 13 日, 東京大学

(15) Mari Takahara, K. Hayashi, M. Goto, Noriho Kamiya, Substrate-dependent tailing of DNA aptamers with multiple functional proteins, The 27th International Symposium on Chemical Engineering, 2014 年 12 月 6 日, Kuala Lumpur, Malaysia

(16) 森山幸祐、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂, ペルオキシダーゼ触媒反応を利用した酸化還元応答型ハイドロゲルの作製, 第 36 回バイオマテリアル学会大会, 2014 年 11 月 17 日, 東京

(17) 高原茉莉、林浩之輔、後藤雅宏、神谷典穂, 核酸アプタマー末端への酵素標識効率の向上とその応用, 化学工学会 第 46 回秋季大会, 2014 年 9 月 17 日, 九州大学

(18) 八尋謙介、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂, 酵素触媒を利用した高分子足場上へのタンパク質集積の効率化, 第 8 回バイオ関連化学シンポジウム 2014, 2014 年 9 月 11 日, 岡山大学

(19) 高原茉莉、林浩之輔、後藤雅宏、神谷典穂, 一本鎖 DNA 末端への効率的な酵素標識に向けた基礎検討, 第 66 回日本生物工学会, 2014 年 9 月 10 日, 札幌

(20) Noriho Kamiya, Enzyme as a catalytic tool for designing new bioconjugates, 2014 BEST Conference, 2014 年 6 月 28 日, Taichung, Taiwan

(21) 森山幸祐、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂, 酵素触媒を活用した簡便・迅速なハイドロゲル調製法の開発と細胞包括への応用, 第 21 回 HAB 研究機構学術年会, 2014 年 5 月 16 日, 昭和大学

(22) 高原茉莉、林浩之輔、後藤雅宏、神谷典穂, 酵素反応を介した部位特異的な (酵素)n-DNA アプタマー複合化手法の開発, 酵素工学研究会第 71 回講演会, 2014 年 4 月 26 日, 九州大学

(23) Noriho Kamiya, Protein assembly design by enzymatic conjugation and scaffolding, 化学工学会第 79 年会「国際シンポジウム 医療分野におけるマイクロ/ナノテクノロジー」, 2014 年 3 月 19 日, 岐阜大学

(24) Noriho Kamiya, Assembling enzymes on a DNA scaffold for Biotechnological Applications', Asian Congress on Biotechnology (ACB-2013), 2013 年 12 月 17 日, Dehli, India

(25) 森山幸祐、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂, ゲル化剤の分子量による酵素架橋ハイドロゲルの物性制御, 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会, 2013 年 11 月 26 日, 東京

(26) 神谷典穂, 機能性タンパク質の部位特異的アセンブリ技術の開発と応用, INCHEM TOKYO 2013 産学官マッチングフォーラム, 2013 年 10 月 30 日, 東京

(27) 神谷典穂, 酵素基質の分子設計に基づくタンパク質の翻訳後修飾技術の開発と応用, 第 1 回バイオ関連化学シンポ若手フォーラム, 2013 年 9 月 26 日, 名古屋

(28) Noriho Kamiya, Substrate engineering for enzymatic site-specific and covalent modification of functional proteins, Enzyme Engineering XXII, 2013 年 9 月 24 日, 富山

(29) 神谷典穂, 機能性タンパク質の部位特異的アセンブリ技術の開発と応用, 化学工学会第 45 回秋季大会シンポジウム「バイオ関連最先端・次世代研究によるグリーンイノベーション」, 2013 年 9 月 16 日, 岡山大学

(30) 森山幸祐、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂, 酵素架橋性ポリエチレングリコールを基材とするハイドロゲルの諸特性評価, 化学工学会第 45 回秋季大会, 2013 年 9 月 17 日, 岡山大学

(31) 八尋謙介、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂, タンパク質-ポリマーハイブリッドの新規調製法と高感度抗原検出への応用, 第 62 回高分子討論会, 2013 年 9 月 13 日, 金沢大学

(32) Noriho Kamiya, Protein supramolecular complex formation by site-specific protein interactions and scaffolding, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, 2013 年 9 月 2 日, 名古屋

(33) Noriho Kamiya, Manipulating biomolecules through enzymatic post-translational protein modification, KMB's 40th Anniversary, 2013 Int. Symp. & Annual Meeting, 2013 年 7 月 4 日, Pyeongchang, South Korea

ほか 18 件

〔図書〕 (計 2 件)

① Noriho Kamiya, Yutaro Mori, 'Substrate engineering of microbial transglutaminase for site-specific protein modification and bioconjugation', Transglutaminases -Multiple Functional Modifiers and Targets for New Drug Discovery-, Editors: Kiyotaka Hitomi, L. Fesus, S. Kojima, Springer, Chapter 17, 373-383 (2015)

② Katsuyuki Miyawaki, Sumihare Noji, Noriho Kamiya, 'Transglutaminase-Mediated In Situ Hybridization (TransISH) for mRNA Detection in Mammalian Tissues', In Situ Hybridization Methods (Neuromethods, vol. 99), Editor: Giselbert Hauptmann, Springer Protocols, Humana Press, Chapter 29, 549-558 (2015)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

①名称: カイコによるホロタンパク質の生産方法

発明者: 神谷典穂、林 浩之輔、日下部宜宏、李在萬

権利者: 国立大学法人 九州大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-31204

出願年月日: 平成 28 年 2 月 22 日

国内外の別: 国内

②名称: タンパク質-ポリマ複合体、TGase 基質含有ポリマ、TGase 基質含有モノマ、タンパク質-ポリマ複合体の製造方法およびタンパク質の検出方法

発明者: 神谷典穂、若林里衣、林 浩之輔

権利者: 国立大学法人 九州大学、日立アロカメディカル株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2013-136878

出願年月日: 平成 25 年 6 月 28 日

国内外の別: 国内

③名称：タンパク質-核酸複合体の製造方法
および標的物の検出方法
発明者：神谷典穂、林 浩之輔、永井賢治
権利者：国立大学法人 九州大学、日立アロカ
メディカル株式会社
種類：特許
番号：PCT/JP2013/067018
出願年月日：平成 25 年 6 月 14 日
国内外の別：国外

○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](http://www.chem.kyushu-u.ac.jp/~kamiya/CFC-BT/Welcome.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 典穂 (KAMIYA, Noriho)
九州大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：50302766

(2) 研究分担者

若林 里衣 (WAKABAYASHI, Rie)
九州大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号：60595148

(3) 連携研究者

人見 清隆 (HITOMI, Kiyotaka)
名古屋大学・創薬科学研究科・教授
研究者番号：00202276