

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640088

研究課題名(和文) study of low-immunogenic monomeric streptavidin

研究課題名(英文) study of low-immunogenic monomeric streptavidin

研究代表者

土居 洋文(Doi, Hirofumi)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任教授

研究者番号：80403335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：低免疫原性ストレプトアビジンLISA314をベースにモノマー化を試みた。変更箇所はLISA314のテトラマー界面、ダイマー界面における疎水性のアミノ酸をThrもしくはSerの水溶性のアミノ酸に置換した。また、120TrpをGlyに置換した。これらの変異を導入した遺伝子(Hisタグ付き)を人工的に合成し、大腸菌で発現精製してLISA314モノマーを獲得した。ビオチンとの結合力をピアコアを用いて測定したところ、結合力が無くなっていた。この原因を探るために、モノマー状態での分子動力学計算を行った。塩橋を形成している2アミノ酸間の相互作用が、ビオチン結合に重要であるとの結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Based on the low immunogenicity streptavidin LISA314 we tried to make a monomer of LISA314. Hydrophobic amino acids in the tetramer interfaces, or in the dimer interfaces were replaced by Thr or Ser soluble amino acids. Also, 120Trp was replaced to Gly. Genes introducing these mutations (with His tag) was artificially synthesized, and then LISA314 monomers were expressed in E. coli and purified. The binding affinity of the monomer with biotin was measured using a Biacore system, but binding affinity was lost.

In order to explore the cause, we carried out molecular dynamics simulations in the monomer state. The simulation suggested that the interaction between two amino acids that form a salt bridge is important for biotin binding.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：テトラマー モノマー 巻き戻し ビオチン結合 分子動力学 シミュレーション 塩橋

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ストレプトアビジン (以下、SA) は、通常温度ではテトラマー (四量体) として存在し、4 分子のビオチンと強固に結合 (解離定数10-15) する。

(2) SAの医療分野への応用は、一本鎖抗体 scFv とSA を融合させたscFv-SA タンパク質にビオチン化された放射性化合物を用いることにより、癌のプレターゲットング-radio-immunotherapy (RIT) 用として実用化研究が国内外で進められている。

(3) しかし、SA がテトラマー形成することから、融合タンパク質scFv-SA もテトラマーであり、分子としては大きいため、固形性癌組織への浸潤性は低くなると考えられ、scFv-SA の低分子化 (モノマー化) が求められている。

2. 研究の目的

(1) SAを人体に適用するには「免疫原性」が問題となり、申請者らはすでに低免疫原性SAを計算機設計し大腸菌で発現精製および巻き戻し法によりLISA314を獲得している。さらにサルに免疫し低免疫原性であることも確認済みである。

(2) LISA314の立体構造 (図1) から、テトラマー形成に重要な二つのループ、およびサブユニット間のベータシート界面のアミノ酸を改変し、改変SAを大腸菌発現精製・巻き戻し、モノマー型低免疫原性SAを獲得する。

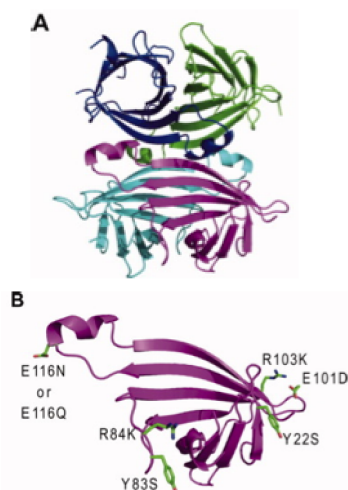


図1 : A、LISA314テトラマー分子の立体構造 B、野生型SAから低免疫原性に改変する際に、アミノ酸置換を行ったアミノ酸とその変異先のアミノ酸を示す。

3. 研究の方法

(1) 既に得られているLISA314の立体構造では、二つのループLoop4,5およびLoop7,8は、テトラマーのA、B、C、Dの4つのサブユニッ

ト間で、A-G70 からB-T114 への水素結合、A-W120 のD-G48 への水分子を介した水素結合、A-W120 のD-ビオチンへの被覆など、テトラマー形成に重要な役割を果たしている。そこで、これらループを介したサブユニット間の相互作用を破壊し、かつループ構造を形成しつつモノマー化したときに免疫原性も低いアミノ酸に置き換えた (図2)。

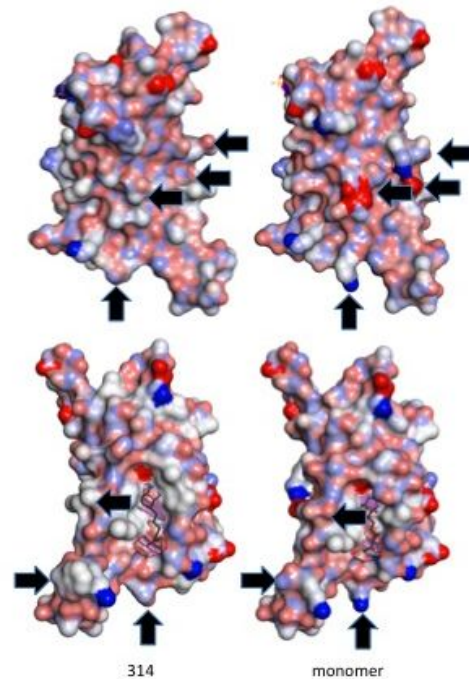


図2 : LISA314 (左) の22カ所のアミノ酸を置換するモデリングを行い、モノマー (右) を設計した。いくつかのアミノ酸置換を黒矢印で示した。

(2) さらに、アクセルリス社のDiscovery Studioソフトウェアを使って、テトラマー、ダイマーでのインターフェース部分での疎水性アミノ酸を親水性アミノ酸に置換して、モノマー化のモデリングを行った (図2)。アミノ酸置換の数は、合計22である。

4. 研究成果

(1) 合計22個のアミノ酸置換を施した改変 LISA314 (C 末に Hisx6 タグ付き) の人工遺伝子を合成し、これを大腸菌発現した (図3)。テトラマー形成する LISA314 は大腸菌で不溶化発現するが、改変 LISA314 は不溶化せず可溶性画分で獲得できた (図4)。さらに、大腸菌由来のビオチンが改変 LISA314 に結合している可能性があるため、巻き戻し法によりビオチンを除去して、改変 LISA314 を Hisx6 タグ精製した。

(2) 得られた改変 LISA314 のビオチン結合を、ピアコアを使って測定したところ、ビオチン結合を確認できなかった。

モノマー型低免疫原性SAの発現ベクター図

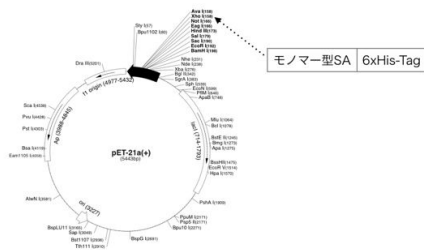


図3：モノマーの発現ベクターの図

モノマー型低免疫原性SAの発現

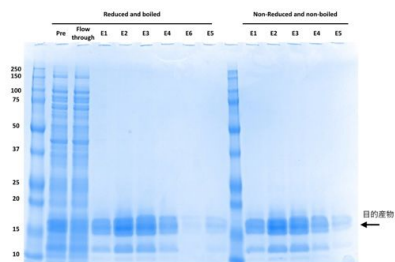


図4：大腸菌発現されたモノマーの電気泳動図

(3) そこで改めて改変 LISA314 のモノマーとしての分子構造を分子動学的にシミュレーションした。計算結果から、モノマーではビオチン結合部位に LISA314 と比較して歪みが生じており、ビオチン結合能がなくなった原因であると示唆された(図5)。一方、テトラマーの LISA314 では結晶構造には無かった塩橋が2カ所で形成された。この塩橋を形成するアミノ酸がモノマーSA のビオチン結合に重要であることが示唆された。

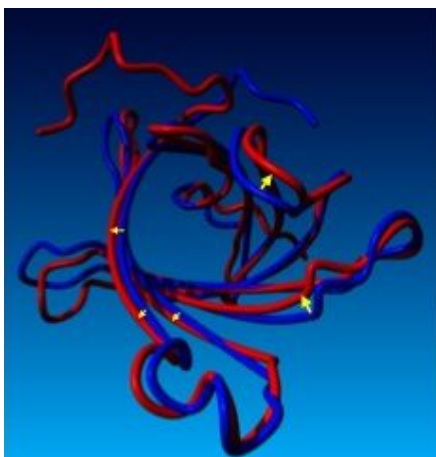


図5：分子動力学シミュレーション後のモノマー構造(赤)とと LISA314 の立体構造(青)の比較

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)

以下に、研究代表者、研究分担者が期間中に発表した low immunogenic streptavidin-biotin に関する論文リストを上げる。

[雑誌論文](計 4件)

Kawato T, Mizohata E, Meshizuka T, Doi H, Kawamura T, Matsumura H, Yumura K, Tsumoto K, Kodama T, Inoue T, Sugiyama A.

Crystal structure of streptavidin mutant with low immunogenicity.

J. Biosci Bioeng. 2015 Jun; 119(6): 642-7. Doi: 10.1016/j.jbiosc. 2014. 10. 025.

Kawato T, Mizohata E, Shimizu Y, Meshizuka T, Yamamoto T, Takasu N, Matsuoka M, Matsumura H, Kodama T, Kanai M, Doi H, Inoue T, Sugiyama A. Structure-based design and synthesis of a bivalent iminobiotin analog showing strong affinity toward a low immunogenic streptavidin mutant.

Biosci Biotechnol Biochem. 2015; 79(4):640-2. Doi: 10. 1080/ 09168451. 2014.991692.

Kawato T, Mizohata E, Shimizu Y, Meshizuka T, Yamamoto T, Takasu N, Matsuoka M, Matsumura H, Kodama T, Kanai M, Doi H, Inoue T, Sugiyama A. Structure-based design of a streptavidin mutant specific for an artificial biotin analogue.

J Biochem. 2015 Jun; 157(6): 467-75. Doi: 10.1093/jb/mvv004.

Yamamoto T, Aoki K, Sugiyama A, Doi H, Kodama T, Shimizu Y, Kanai M.

Design and synthesis of biotin analogues reversibly binding with streptavidin.

Chem Asian J. 2015 Apr; 10(4) 1071-8. Doi: 10.1002/asia.201500120.

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/research/people/staff-doi_hirofumi_ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土居 洋文 (DOI, Hirofumi)

東京大学・先端科学技術研究センター・特
任教授

研究者番号：80403335

(2) 研究分担者

杉山 暁 (SUGIYAMA, Akira)

東京大学・アイソトープ総合センター・助
教

研究者番号：40562715