

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870291

研究課題名(和文)非標準アミノ酸を利用した光開閉制御可能なバイオ・ナノカプセルの開発

研究課題名(英文)Photo-controllable encapsulation of protein using unnatural amino acid

研究代表者

大野 敏 (Ohno, Satoshi)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：10345796

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)：Aquifex aeolicus由来ルマジン合成酵素は自己集合して正20面体の中空状粒子を形成する。ネガティブチャージを導入したルマジン合成酵素変異体(AaLS_Neg)はDDSなどでの利用が期待されている。本研究では22, 40, 44, 57, 91位にそれぞれアジドチロシンを導入したAaLS_Neg変異体を調製した。22位にアジドチロシンを持つAaLS_Neg変異体は、UV照射によりアジドチロシンを介して分子間架橋した。続いて、このクロスリンク産物をゲル濾過により分離した。その結果、カプセル形成の増加が確認された。

研究成果の概要(英文)：Aquifex aeolicus lumazine synthase (AaLS) forms hollow-icosahedral capsule by self-assembling of 60 subunits. A negatively charged lumazine synthase mutant (AaLS_Neg) is expected as a bio-nanocapsule which can be used for a DDS. In this study, we prepared several AaLS_Neg mutants, each carrying an azido-tyrosine at predetermined positions 22, 40, 44, 57, 91, respectively. The synthesized AaLS_Neg mutant containing azido-tyrosine at position 22 was covalently crosslinked via azide group by UV irradiation. And then, this photo-crosslinked product was separated on a gel filtration column. As a result, we observed that the encapsulation efficiency of photo-crosslinked product was increased.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：タンパク質 非標準アミノ酸 ナノカプセル

1. 研究開始当初の背景

タンパク質で構成される中空状粒子であるバイオ・ナノカプセルは薬物(分子)送達システムでの利用が期待されている。

中空状粒子を形成するタンパク質のひとつに6,7-ジメチル-8-リピチルルマジン合成酵素があげられる。この酵素はルマジン合成酵素とも呼ばれ、リボフラビン生合成に関与する酵素である。2001年にLadensteinらは超好熱性真正細菌 *Aquifex aeolicus* 由来ルマジン合成酵素(AaLS)のX線結晶解析がなされ、60量体からなる正十二面体構造を有するカプセルを形成すると報告した(図1)[参考文献1]。

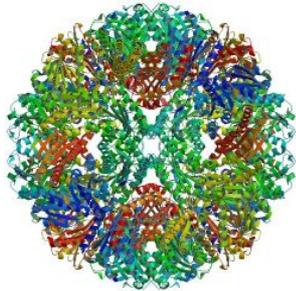


図1
AaLSの構造(PDB ID: 1HQK)

2006年には、Seebeckらにより、カプセルの内側に配置される83位アルギニン残基、86位トレオニン残基、120位トレオニン残基、123位グルタミン残基をグルタミン酸残基へと変異し、カプセルの内側をマイナスに帯電したAaLS変異体の作成が行われた。アルギニンを10個連ねたタグ(R_{10} タグ)を融合させることでプラスに帯電したタンパク質と内側をマイナスに帯電したAaLS変異体を共発現させることで、 R_{10} タグ融合タンパク質をカプセルへ内包できることが報告された[参考文献2]。

Wörsdörferらはこれを発展させ、2011年に細胞には毒となるHIVプロテアーゼに R_{10} タグを融合し、マイナスに帯電したAaLS変異体カプセル内に封入させることで、細胞に影響を与えずHIVプロテアーゼの発現ができることを報告した[参考文献3]。

またLilavivatらは、AaLSカプセルの内側に配置されるアミノ酸残基の幾つかをアルギニン残基へと変異し、カプセルの内側をプラスに帯電したAaLS変異体を作成した。この変異によりAaLSカプセル内に200~350塩基のRNA分子を封入できることを報告した[参考文献4]。

このようにAaLS変異体は分子を内包できるカプセルとして、様々なアプリケーションでの利用が期待される。

[参考文献1] Z. Xiaofeng et al.,
J. Mol. Biol. 306, 1099-1114 (2001)

[参考文献2] F. Seebeck et al.,
J. Am. Chem. Soc. 128, 4516-4517 (2006)

[参考文献3] B. Wörsdörfer et al.,
Science 331, 589-592 (2011)

[参考文献4] S. Lilavivat et al.,
J. Am. Chem. Soc. 134, 13152-13155 (2012)

2. 研究の目的

バイオ・ナノカプセルの利用を考えた場合、タンパク質の内包をコントロールできるようなカプセルの開発は重要な課題である。

本研究では、光や周囲の環境により封入などをコントロールできるように、通常タンパク質の材料として用いられない非標準アミノ酸に着目した。現在までにたんぱく質への部位特異的導入が可能となっているアジドチロシンはアジド基選択的修飾反応の他に、UVの照射によって特異的に活性をもち、隣接分子と共有結合するという性質をもつことが報告されている。例えば、AaLS変異体にアジドチロシンが導入できれば、UV照射に伴う光クロスリンク反応により、アジドチロシンが接着剤のような役割を果たすことで強固なカプセルを形成できると考えられる。このほかに光異性化する非標準アミノ酸であるアゾベンジルフェニルアラニンなどをAaLS変異体へ導入できれば、光照射によりカプセル状態をコントロールできるようになると考えられる。

またアジドチロシンの光クロスリンク反応による分子間架橋を、システインのジスルフィド結合に置き換えたAaLS変異体を作製できれば、周囲の環境により封入などをコントロールできるようになると考えられる。

そこで本研究では、非標準アミノ酸や特定部位にシステインを導入したAaLS変異体の作製により、 R_{10} タグ融合タンパク質の内包をコントロールできるようなバイオ・ナノカプセルの開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ルマジン合成酵素変異体発現系および内包タンパク質との共発現系の構築

前述参考文献1および2を参考に、精製を容易にするためのヒスチジン・タグ配列を融合し発現できるようにカプセルの内側をマイナスに帯電したAaLS変異体(AaLS_Neg変異体)遺伝子配列を設計した。発現ベクターを作製後、大腸菌にてAaLS_Neg変異体を発現し、金属アフィニティカラムにより精製した。得られたAaLS_Neg変異体は透過型電子顕微鏡によりカプセル形成を確認した。

これと並行し、薬剤耐性マーカーの異なるベクターに蛍光タンパク質遺伝子を導入し、共発現系を構築した。この際、精製を容易にするためのヒスチジン・タグ配列を除き、蛍光タンパク質の C 末端側にアルギニンを 10 個連ねたタグ(R₁₀ タグ)を融合させるように遺伝子配列を設計した。

(2) 非標準アミノ酸を導入したルマジン合成酵素変異体の発現と解析

AaLS の結晶構造解析結果を参考に、五量体形成に関与すると思われる 57 位トリプトファン(Trp,W) , 91 位チロシン(Tyr,Y)とカプセル形成に関与すると思われる 22 位フェニルアラニン(Phe,F) , 40 位アルギニン(Arg,R) , 44 位アルギニン(Arg,R) , 137 位トリプトファン(Trp,W)のアミノ酸残基へ非標準アミノ酸を導入することとした。非標準アミノ酸の導入にはアンバーコドンを利用することから、AaLS_Neg 変異体遺伝子の各部位のコドン部位を部位特異的突然変異法でアンバーコドンに変異させた。

アジドチロシンの導入には、研究者代表者らが構築したアンバーコドン特異的サブプレッサー tRNA とアジドチロシン用アミノアシル tRNA 合成酵素を用いた、アンバーコドン特異的アジドチロシン導入発現系を用いた。金属アフィニティカラムにより精製した後、得られた AaLS_Neg 変異体に UV を照射し、光クロスリンク反応が起きているかを SDS-PAGE により分離し確認した。

アゾベンジルフェニルアラニンの導入においては、前述のアジドチロシン導入発現系を基礎とし、アンバーコドン特異的サブプレッサー tRNA にアミノ酸を結合させるアミノアシル tRNA 合成酵素のアミノ酸基質特異性をアゾベンジルフェニルアラニンに改変することとした。

酵素の基質特異性の改変は 2 通りの方法で行った。1 つ目は Bose らにより報告された、アゾベンジルフェニルアラニンを基質とできる *Methanocaldococcus jannashii* 由来のチロシル tRNA 合成酵素 (YRS) 変異体の配列を参考に、変異を導入した[参考文献 5]。具体的にはアジドチロシンの導入には *Methanosarcina acetivorans* (Mac) 由来の YRS 変異体を利用しており、Mac 由来 YRS 遺伝子内 33、62、66、112、113、162、166、および 167 番目のコドンそれぞれグリシン、アラニン、グルタミン酸、アラニン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、およびグリシンに変異させ、アジドチロシンの導入と同様に発現系を構築した。2 つ目は Mac 由来 YRS 遺伝子内のアミノ酸認識部と推測される 33、71、113、162 および 163 番目のコドンランダムにし、アゾベンジルフェニルアラニンを基質とする酵素の選別を行った。アゾベン

ジルフェニルアラニンの導入確認は、分析方法を確立してあるカルモジュリンタンパク質を用いた。

(3) ルマジン合成酵素システイン導入変異体の発現と解析

アジドチロシン導入 AaLS_Neg 変異体の光クロスリンク反応結果を参考に、分子間ジスルフィド結合を形成するように AaLS_Neg 変異体にシステイン変異を導入した。分子間ジスルフィド結合の形成は SDS-PAGE により分離し確認するとともに、透過型電子顕微鏡によりカプセル形成を確認した。また、蛍光タンパク質および核酸分解酵素との共発現系を構築し、タンパク質の内包を試みた。

[参考文献 5] M. Bose et al.,
J. Am. Chem. Soc. 128, 388-389 (2006)

4. 研究成果

(1) ルマジン合成酵素変異体発現系および内包タンパク質との共発現系の構築

大腸菌にて AaLS_Neg 変異体を発現し、金属アフィニティカラムにより精製した際の各画分を SDS-PAGE により分離後、CBB 染色した結果を、図 2 に示す。

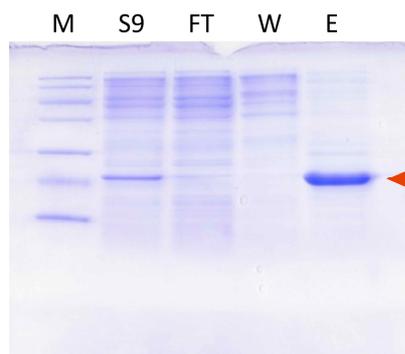


図 2 AaLS_Neg 変異体 発現・精製の結果
(M): 分子量マーカー (下側から 14.4kDa, 18.4kDa, 25kDa を示す)

(S9): 破碎後可溶性画分

(FT): カラム素通り画分

(W): カラム洗浄画分

(E): カラム溶出画分

分子量マーカーとの比較から、カラム溶出画分で AaLS_Neg 変異体と同程度の分子量の位置にタンパク質バンド(赤矢印)が確認できたことから、目的タンパク質の発現が確認できた。得られた AaLS_Neg 変異体を透過型電子顕微鏡で観察したところ、直径 15nm 程度の粒子と考えられる像を得ることができ、カプセルの形成が示唆された。

(2) 非標準アミノ酸を導入したルマジン合成酵素変異体の発現と解析

大腸菌にて 22 位フェニルアラニン残基をアジドチロシンに変異した AaLS_Neg 変異体を発現し、金属アフィニティカラムにより精製した際の各画分を SDS-PAGE により分離後、CBB 染色した結果を、図 3 に示す。

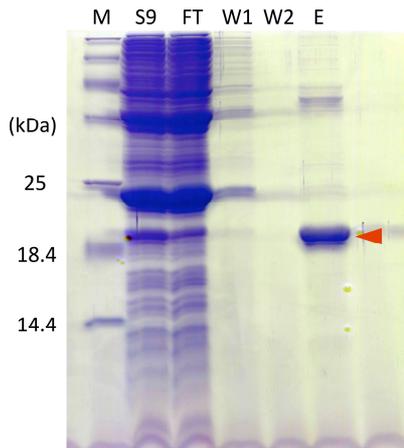


図 3 22 位フェニルアラニン残基をアジドチロシンに変異した AaLS_Neg 変異体の発現・精製の結果

(M): 分子量マーカー
(S9): 破碎後可溶性画分
(FT): カラム素通り画分
(W1, W2): カラム洗浄画分
(E): カラム溶出画分

分子量マーカーとの比較から、カラム溶出画分で AaLS_Neg 変異体と同程度の分子量の位置にタンパク質バンド(赤矢印)が確認できたことから、目的タンパク質の発現が確認できた。続いて得られた AaLS_Neg 変異体に UV 照射し光クロスリンク反応後 SDS-PAGE により分離後、CBB 染色した結果を、図 4 に示す。

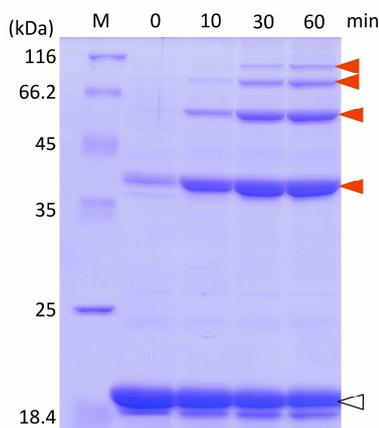


図 4 各 UV 照射時間でのクロスリンク結果

(M): 分子量マーカー
数字: UV 照射時間

分子量マーカーとの比較から、白抜き矢印が単量体と考えられ、赤矢印の下側から二量体、三量体、四量体と多量体の形成が確認でき、UV 照射により分子間架橋が形成されたと考えられた。また、質量分析によりクロスリンク部位を推定した。

このクロスリンク産物がカプセルを形成しているかをゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより分析した。カプセルはポイドボリュームで最初に溶出してくると考えられ、UV 照射前と照射後でポイドボリュームに検出されるタンパク質量が異なり、照射後の方が多かった。このことはクロスリンク反応によりカプセル状態が多く保持されたと考えられた。

(3) ルマジン合成酵素システイン導入変異体の発現と解析

アジドチロシンを導入した AaLS_Neg 変異体が UV 照射により多量体を形成したことから、この分子間架橋をジスルフィド結合に置き換えることを検討した。質量分析により推定されたクロスリンク部位と X 線結晶構造解析の結果を参考に、システインを導入した AaLS_Neg 変異体 (AaLS_Neg/SS 変異体) を設計し、これを発現させた。その金属アフィニティカラムにより精製した際の各画分を SDS-PAGE により分離後、CBB 染色した結果を、図 5 に示す。

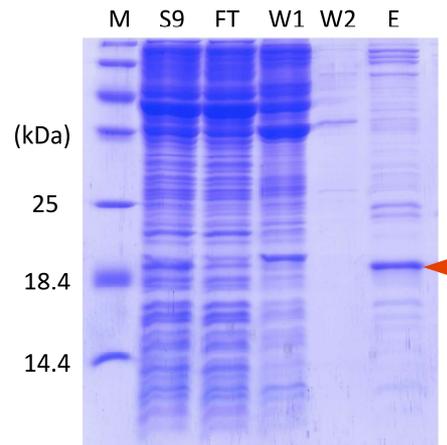


図 5 システインを導入した AaLS_Neg 変異体 (AaLS_Neg/SS 変異体) の発現・精製結果

(M): 分子量マーカー
(S9): 破碎後可溶性画分
(FT): カラム素通り画分
(W1, W2): カラム洗浄画分
(E): カラム溶出画分

分子量マーカーとの比較から、カラム溶出画分で AaLS_Neg/SS 変異体と同程度の分子量の位置にタンパク質バンド(赤矢印)が確認できたことから、目的タンパク質の発現が確認できた。

得られた AaLS_Neg/SS 変異体にジスルフィド結合が形成されているかを DTT 処理後電気泳動することにより確認した。その結果を図 6 に示す。

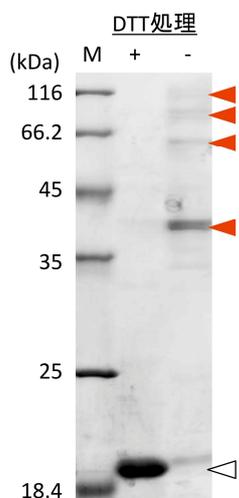


図 6 DTT 処理によるジスルフィド結合形成の確認

(M): 分子量マーカー
+: DTT 処理あり
-: DTT 処理なし

分子量マーカーとの比較から、白抜き矢印が単量体と考えられ、DTT 処理ありでは、ジスルフィド結合が切断されたものと考えられた。一方、DTT 処理なしでは白抜き矢印位置にはタンパク質バンドがほとんど確認されず、赤矢印の下側から二量体、三量体、四量体と多量体の形成が確認でき、ジスルフィド結合による分子間架橋が形成されていると示唆された。

この AaLS_Neg/SS 変異体と R₁₀ タグ融合蛍光タンパク質 (tdTomato- R₁₀) を共発現し、金属アフィニティカラムにより精製した際の各画分の様子を図 7 (上)、各画分を SDS-PAGE により分離後、CBB 染色した結果を図 7 (下) に示す。

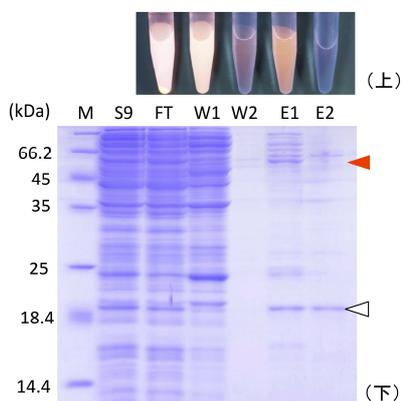


図 7 蛍光タンパク質との共発現・精製結果 (上) は各画分の蛍光検出結果、(下) は電気泳動後、CBB 染色の結果を示す。

(M): 分子量マーカー
(S9): 破碎後可溶性画分
(FT): カラム素通り画分
(W1, W2): カラム洗浄画分
(E1, E2): カラム溶出画分

蛍光検出の結果 (図 7 上) から、カラム溶出画分に蛍光タンパク質 (tdTomato) 由来の蛍光が観察された。合わせて、図 7 下の分子量マーカーとの比較から、白抜き矢印が AaLS_Neg/SS 変異体、赤矢印部分バンドが tdTomato- R₁₀ と考えられた。金属アフィニティカラムではヒスチジンタグを融合した AaLS_Neg/SS 変異体のみが結合し、ヒスチジンタグを持たない tdTomato は結合しないはずであるが、カラム溶出画分において tdTomato 由来の蛍光が観察されたということは、tdTomato が融合した R₁₀ タグを介して AaLS_Neg/SS 変異体と相互作用 (もしくはカプセルに内包) したことを示唆している。

これら結果から、ルマジン合成酵素から構成されるカプセルに非標準アミノ酸やシステイン変異を導入することで、光や周囲の環境によりタンパク質の内包をコントロールできる可能性が開けた。今後は、内包するタンパク質の選択とともに、標的へ分子送達する仕組みを追加し、新規な分子送達システムの開発が期待される。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 敏 (OHNO, Satoshi)
岐阜大学・工学部・助教
研究者番号: 10345796