

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650051

研究課題名(和文) 二重特異性を有する分子認識機能性分子を利用した新規結晶化法の開発

研究課題名(英文) Production of bifunctional recognition biomolecules for a novel crystallization method

研究代表者

柴田 直樹 (Shibata, Naoki)

兵庫県立大学・生命理学研究科・准教授

研究者番号：30295753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はタンパク質の2箇所分子表面にランダム配列を導入することで、複数の面で特定のタンパク質分子と特異的相互作用することを可能することを目指した。ラン藻由来Np275-Np276など、天然に存在するタンパク質を改変することで他のタンパク質分子との相互作用を作り出した。全般的にディスプレイ法によるセレクションから回収したDNAを発現させると、可能性が極めて低く、この系で複合体を得ることは困難であった。そのため新たに大腸菌YncEやDIXを利用した系を構築した。YncEも可溶性が低いものしか得られなかったが、DIXでは可溶性が高く、野生型よりも強い相互作用を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：This research is aimed at creating non-natural interaction between proteins based on genetically modified natural proteins carrying random mutations. Initially we used artificial pentapeptide repeat proteins (PRP) for templates. However, RNA/DNA of PRP, recovered from displayed complex including template RNA/DNA and expressed protein, expresses almost insoluble proteins. Next we tried new templates, E. coli YncE and DIX. The former still yielded insoluble proteins but the latter produced relatively highly soluble ones. The selected DIX proteins after CIS-display generally showed higher affinity compared to the wild-type.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 X線構造解析 分子認識

1. 研究開始当初の背景

分子認識機能を有する機能性分子は生物学、化学、医学、薬学など幅広い分野において、物質・生体の識別、標的に利用されている。構造生物学、特に膜タンパク質の結晶構造解析では、主に抗体フラグメントによる親水性領域拡大による足場効果によって、結晶化促進を図る方法に利用されてきた。しかし、未だそれほど一般的な方法として利用されていない。これは、金銭的・時間的コストに見合うほどの効果が得られるかどうか確実ではないためであると想像する。足場分子が大きいほど、足場効果はより大きくなると期待できるが、抗体フラグメントを使う限り分子量に限りがある。もし、より大きな足場分子を利用出来れば大きなブレイクスルーに繋がる。

一方、Universität Zurich の Pluckthun らは人工アンキリンリピートタンパク質 DARPIn のライブラリから、ディスプレイ法によってターゲットに対して特異的に結合するものを選別する方法を開発し、ターゲットとの複合体の構造について報告している(図1)。DARPIn は抗体フラグメントより小さい分子だが、この研究成果の重要な点は、リピートモチーフタンパク質が安定で人工タンパク質のデザインに適していること、ターゲットに特異的に結合するものを創製できることを示したことにある。そこで、本研究代表者は抗体フラグメントより遥かに大きな足場を構築する方法を着想した。2つの分子を同時に結合できる二重特異性を持つ人工リピートタンパク質を創製し、一方に大きな足場分子、他方に標的分子を結合させる方法を考案した(図2)。人工リピートタンパク質はターゲット分子と足場分子を繋ぐ糊としての役割に特化させ、主に足場分子が足場領域拡大を受け持つ。

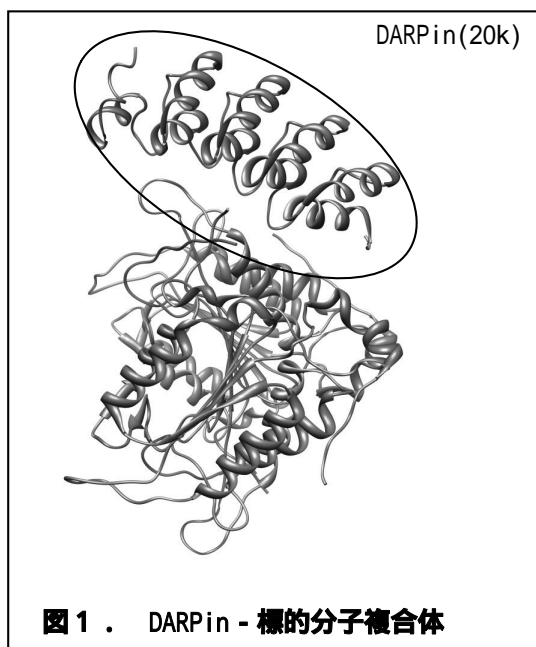
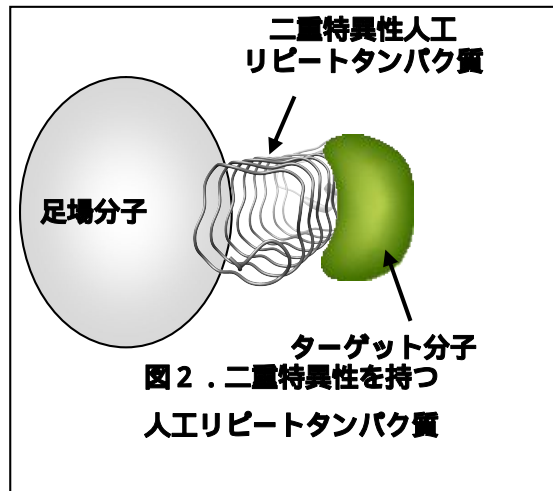


図1. DARPIn - 標的分子複合体



2. 研究の目的

以下の4点について研究目的を設定した。

1. 新規分子認識機能性分子の創製
2. 1の分子認識機能を多重特異性にまで拡張
3. 相互作用の特異性と親和性の評価
4. 標的分子複合体の結晶化と構造解析

従来、足場分子を利用した結晶化には足場分子の選択には厳しい制限があった。しかし、本課題では原理的にはその制限をほぼ完全に取り払うことが出来る。これによって、立体構造解明が待ち望まれてきた、極めて重要だが結晶化が非常に困難だったターゲットについても、結晶化への道筋が拓け、インパクトの極めて大きい研究成果に結びつくことが期待できる。

抗体フラグメントや DARPIn のような、従来の分子認識機能性分子ではターゲットは1種類であるためターゲットとの関係は1対1となる。本申請課題のように、複数種のターゲットを同時に認識可能という新機能を付加すれば、1対2あるいはそれ以上の関係を構築出来るため、その応用範囲が大きく広がる。そのような多重特異性認識分子を用いれば、通常は相互作用しない分子同士を接着させることが可能となる。

一般的に、天然に存在するリピートタンパク質はタンパク質間相互作用する機能があるものが多い。本研究代表者は、 $\alpha$ -ヘリックス構造を持つペントペプチドリピータンパク質 (PRP) が擬似的な対称性を有することから表裏2つの面を同時に分子認識に利用出来る可能性に着目した。本研究では天然の PRP を基にデザインした人工 PRP を基に、分子認識に利用する面についてランダムに変異を導入し、ディスプレイ法によってリガンドを認識する塩基配列を選別することで分子認識機能性 PRP を創製する。PRP は表裏2面を利用できるので、通常は結合しない分子同士に対して PRP を介して接着させることが可能になる。

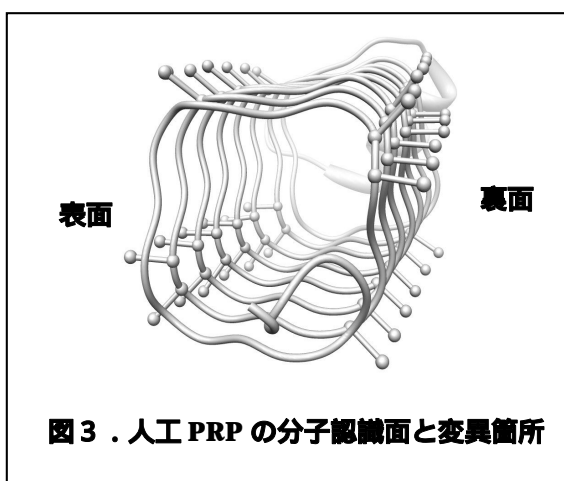
### 3. 研究の方法

#### (1) 人工 PRP の設計

人工 PRP の設計は以下のようにしてなされた。PRP はモチーフ A(D/N)LXX の繰り返しにより四角柱状の  $\alpha$ -ヘリックスを構築する。本研究では *Nostoc punctiforme* 由来 Np275-Np276 (PDB ID: 2J8K) をベースにして人工 PRP をデザインした (図3)。基本単位のモチーフは次の通りになるように設計した。ただし "P" は Penta peptide モチーフを表す。

**P-P-P-P-P** (太文字が分子認識面に利用するモチーフ, 下線は裏面)

この基本単位を繰り返すことで分子認識面を拡大し、ライブラリの多様性を増大させる。N 末端と C 末端領域は Np275-Np276 の配列を用いて、それぞれ基本単位の前後に導入している。



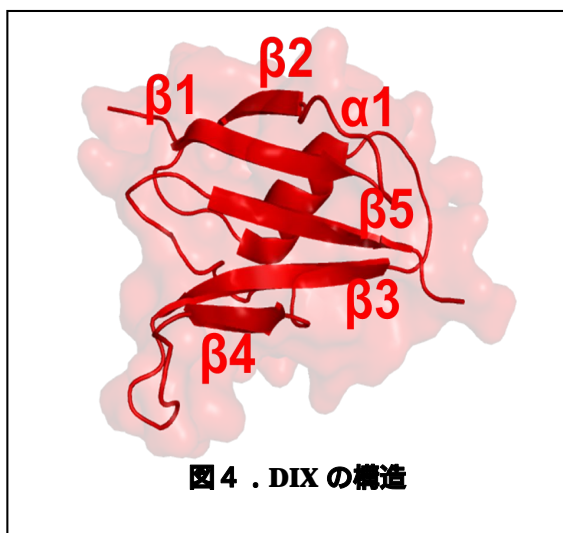
(2) 分子ディスプレイ法によるセレクション  
ライブラリの中から足場分子あるいは標的分子を認識するものをリボソームディスプレイ法によってセレクションした。PRP の表面または裏面にランダム配列を導入したライブラリ DNA から *in vitro* translation によって mRNA を合成した。足場分子は分子量が大きく、モノマーで存在するものが望ましい。この条件を満たすものとして、Phosphoribosylaminoimidazole synthetase (PFS, アミノ酸残基数約 1300, PDB ID: 1T3T) 及び MalQ (4-alpha-glucanotransferase, アミノ酸残基数約 700, PDB ID: 4S3R) を用いた。各々と結合する PRP を選別するために、ビオチン化した足場分子あるいは標的分子をストレプトアビジン磁気ビーズで回収した。回収した複合体から mRNA を抽出し、逆転写後に PCR によって cDNA を増幅させた。PCR 産物は再びリボソームディスプレイ法によるセレクションにかけた。この操作を 3 回繰り返す。最終的な PCR 産物を大腸菌発現ベクターに挿入し、大腸菌に導入した。得られたコロニーを小スケールで培養・発現誘導を行い、発現したタンパク質と足場分子あるいは標的分子との相互作用

用をプルダウン法によって確認した。

(3) CIS ディスプレイ法によるセレクション  
CIS ディスプレイ法は RNA を直接取り扱う必要が無く、DNA を直接反応系にインプット出来るため、RNase 混入による mRNA の分解のリスクが大きな問題にならない点で有利である (Odegrip *et al.* *PNAS*, **101**, 2806-2810 (2004))。基本的な実験操作はリボソームディスプレイ法とほぼ同じであるが、*in vitro* translation と逆転写反応が不要となるので、より迅速に実験を行うことができた。この系では PRP の C 末端側にイニシエータータンパク質 RepA を融合させる。RepA はそれ自身の合成に使われた DNA そのものに結合するので、PRP-RepA 融合タンパク質と DNA 複合体は 1 対 1 の対応となる。回収後の DNA は次のセレクションのステップに利用した。この操作を 3 回繰り返す。最終的な PCR 産物を用いて大腸菌で発現させた。以下、リボソームディスプレイ法によるセレクションと同様の方法で相互作用を確認した。

#### (4) 他のタンパク質を用いた系の確立

人工遺伝子ライブラリからディスプレイ法によって回収した PRP 遺伝子は大腸菌での発現量が極めて少ないことが明らかとなった。これはディスプレイ法を適用する前の、元のライブラリをクローニングして得られた大腸菌を用いた予備実験とは異なる結果であった。なぜディスプレイ法から回収した PRP 遺伝子では発現量が極端に低下するのか、その理由は明らかではない。この想定外の問題に対して対処するため、別の系を確立することにした。一つはプロペラフォールドを有する YncE、もう一つはユビキチンフォールドを持つ DIX (図4) である。これらについては CIS ディスプレイ法によるセレクションを行った。



#### 4. 研究成果

##### (1) 人工 PRP

合成 DNA をプライマーとして PCR 法による人工 PRP のライブラリ作成, T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* translation, リボソームディスプレイ, 逆転写反応による cDNA の合成の一連の実験操作は全て問題なく行うことが出来た. CIS ディスプレイ法の場合も同様に大きな問題は発生しなかった.

回収した cDNA を PCR 法によって増幅し, pColD1 ベクターに挿入した. これを大腸菌 BL21Gold (DE3) に導入し, 得られたコロニーを 48 個または 96 個を小スケールで培養し, タンパク質を発現させた. 回収した大腸菌を破砕し, PRP を磁気ビーズに結合させた. 磁気ビーズと, あらかじめ精製しておいた PFS とを混合し, 1 時間インキュベートした後, 余分な PFS を除いた. プルダウン法による複合体の確認は SDS-PAGE によって行ったが, PRP の発現量が極めて少なかったため, 複合体の形成の確認は困難であった.

一方, YncE を用いた系でもディスプレイ法によるセレクション前の段階では可溶性画分が十分に得られるクローンが多数存在していたが, セレクション後の cDNA からはプルダウン法による複合体の確認が可能な量の可溶性画分を生成するクローンは得られなかった. 恐らく, タンパク質は発現しているが, 疎水性が高いため沈殿画分に存在していたものと思われる. また, この傾向は PRP の場合よりも強かった.

DIX を用いた系では, DIX の  $\beta 2$  ストランドを含む表面 ( $\beta 2$  面) と  $\beta 4$  ストランドを含む面 ( $\beta 4$  面) の 2 箇所についてランダム配列を導入したが (図 4), 前者についてセレクション後も大腸菌で可溶性画分が十分に得られることが分かった. 現状では野生型 DIX に対して少なくとも 10 倍高い親和性を有する DIX 変異体を CIS ディスプレイ法によるセレクションを利用して得ることが出来た. 一方, 後者では可溶性画分はほとんど得られなかった. 回収した cDNA の塩基配列を調べた結果,  $\beta 2$  面の変異導入箇所では親水性またはイオン性のアミノ酸残基を多く含んでいたのに対し,  $\beta 4$  面では疎水性残基の割合が非常に高かった.  $\beta 4$  面にランダム配列を導入したライブラリからは可溶性画分がほとんど得られなかったのは, 野生型に比べ, この面の疎水性が高くなったために凝集が起こりやすくなった可能性が高いと考えられる. このことは PRP や YncE でも同じ理由によって可溶性画分が得られにくかったことを示していると考えられる. 分子表面の疎水性が高くなると疎水相互作用が強く働き, 分子間相互作用は強くなるが, それによってタンパク質の可溶性が低くなるため, 回収した cDNA から疎水性が高い分子が得られやすく, 逆に可溶性のタンパク質が得られにくくなる傾向があるものと推察される.

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

山西勲平・矢野晶子・柴田直樹・寺脇慎一・樋口芳樹, ホモ相互作用を強化した Wnt/ - カテニンシグナル因子 Dishevelled-DIX ドメイン, 日本結晶学会平成 28 年度年会および会員総会, 平成 28 年 11 月 17 日 - 11 月 18 日, 茨城県立県民文化センター (茨城県水戸市)

〔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:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biophysics1/index-j.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

柴田 直樹 (SHIBATA, Naoki)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授

研究者番号: 30295753