

人工基質による翻訳後修飾を介した新たなタンパク質機能の開拓

九州大学 未来化学創造センター バイオテクノロジー部門

九州大学大学院 工学研究院 応用化学部門 神谷 典穂

【略歴】

1994年3月 九州大学工学部 合成化学科卒業

1996年4月 日本学術振興会 特別研究員

1998年2月 九州大学大学院 博士後期課程修了 博士(工学)

1998年4月 東京大学大学院 工学研究科 化学生命工学専攻 助手

2001年10月 MIT 化学科 (Klibanov group) 客員研究員 (日本学術振興会 海外特別研究員)

2002年10月 九州大学大学院 工学研究院 応用化学部門 助教授

2010年12月 九州大学未来化学創造センター バイオテクノロジー部門 教授

2018年6月 KAICO 株式会社 アドバイザー

架橋酵素を利用した生体分子工学

生体内で生合成された新生タンパク質の多くは、翻訳後修飾過程を通して多彩な機能を獲得する。タンパク質の構造・機能の多様性を高めるこの生物の基本戦略を、適切に設計された人工基質を用いて試験管内で再現することができれば、新規人工タンパク質の分子設計に繋がる。このような発想の下、水中で化学結合形成を触媒する (1) 微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) と (2) 西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) に着目した。MTG はグルタミン (Gln) 残基とリジン (Lys) 残基の側鎖間架橋反応を、HRP はフェノール誘導体のラジカル形成を介した重合反応を触媒する。MTG の利用においては、生体由来分子 (ペプチド・タンパク質、核酸、脂質) を基材とし、当該酵素の基質特異性に合った Gln 残基あるいは Lys 残基が導入された多様な人工基質を設計した。これらを適切に組み合わせ、部位特異的・共有結的に架橋することで、同種あるいは異種生体分子からなる多機能性バイオコンジュゲートを調製した。HRP の利用においては、フェノール部位が導入された合成高分子の設計を端緒に、これらをチロシン (Tyr) 残基が導入された組換えタンパク質と組み合わせることで、タンパク質の機能部位が導入されたハイドロゲルを設計することが出来た。この基礎研究の過程で、外部からの H_2O_2 の添加を必要としないハイドロゲル化法を偶然見出し、生合成反応や細胞の生育の場そのものを酵素触媒的に構築することを検討している。本発表では、これらの研究成果を報告させて頂きたい。

MTG を用いた多機能性バイオコンジュゲートの設計

核酸と酵素からなるヘテロコンジュゲートは、異なる機能性を具備したユニークな分子である。その簡便な調製法の確立を目標として、MTG の Gln 基質が導入された人工ヌクレオチドを設計し、DNA や RNA 上に耐熱性アルカリホスファターゼ(検出用酵素)がマルチラベルされた新規ハイブリッド分子を得た。また、これを用いた遺伝子検出システム^[1]の構築に成功し、産学連携研究開発を通して、本システムは幸運にも実用化に至った。本技術は、膜タンパク質結合性 DNA アプタマーに複数の蛍光タンパク質が部位特異的に連結されたガン細胞検出分子プローブ^[2]等、新しいタイプのヘテロコンジュゲート分子の調製に繋がった。さらに、MTG が認識可能な人工四つ又ビオチン化試薬を設計し、アビジン-ビオチン相互作用を利用した1次元状酵素アセンブリの創製に成功した^[3]。上記の研究を通して、水溶性の人工基質(基質修飾ヌクレオチドや人工ペプチド基質)を分子設計することで多様なバイオコンジュゲートを得ることができた一方、脂溶性の人工基質は、合成は可能であっても、酵素反応場への提供が困難という本質的な問題があった。この課題の解決に向け、最近、脂溶性基質を両親媒化するという発想に基づき、多様な脂質化基質を水に可溶化することに成功した。その結果、MTG の基質となる Gln 残基がペ

プチドタグとして導入された目的タンパク質と、K 残基を含むペプチド配列の N 末端に脂質が導入された人工脂質化ペプチドを組み合わせることで、人工脂質化タンパク質を効率よく得ることができるようになった。緑色蛍光タンパク質 GFP への長鎖脂肪酸の導入をモデルとした基礎検討では、脂肪酸部位のアルキル鎖長に応じた生細胞膜上へのアンカリング能力の向上が観察された^[4]。また、MTG の基質となる両親媒性ペプチドの自己集合能を微調整すると、リボンやテープといった特徴的なナノ集合体が形成され、これらの分子集合体の上に MTG 反応を介してタンパク質を提示可能なことも明らかとなった^[5]。

HRP を用いた機能性ハイドロゲルの設計と応用

高分子の架橋や小分子の自己組織化に基づき形成されるハイドロゲルは、組織工学や医療分野などバイオ分野で広く活用されている。近年、HRP を用いた高分子鎖間の架橋形成により、生理条件下でハイドロゲルを形成する手法が提案されているが、ペルオキシダーゼ触媒反応には、細胞毒性を示す過酸化水素(H₂O₂)が基質として必須という根本的に解決すべき課題が存在する。上記の背景の下、生物機能への影響を最小化する HRP ゲル化法の開発を目指し、両末端にフェノール基を導入したポリエチレングリコール(PEG)誘導体を合成し、細胞培養担体として利用する研究に着手した。その基礎研究の過程で、末端にチオール基を有する四つ又 PEG を利用すると、外部からの過酸化水素の添加なしにハイドロゲル形成が促進されるという興味深い現象を見出した^[6]。この新たな知見に基づき、酵素触媒的ハイドロゲル化を通して、2次元状に細胞が伸展・集積化した板状細胞集塊(細胞シート)や、3次元状に細胞が集積化した球状細胞集塊(スフェロイド)の調製が可能なことを示し、バイオマテリアル分野への HRP 触媒の利用に新たな選択肢を提示した。最近、疎水性固体微粒子の表面付着により安定化され、気相中で自立する液滴：リキッドマーブル(LM)に着目し、LM 中での HRP 触媒ハイドロゲル化と無細胞タンパク質合成を並行可能なことが明らかとなり^[7]、この微小球状ハイドロゲルの利用価値を模索している。

謝辞

本研究成果は、これまでに研究を通して出会った産官学に所属する全ての方々のご指導・ご援助と、共に汗を流した学生諸氏の助力があつてこそのものであります。この場を借りて心より感謝を申し上げます。

参考文献

1. M. Kitaoka, K. Nakano, S. Noji, M. Goto, N. Kamiya et al., 'Transglutaminase-mediated in situ hybridization (TransISH) system: A new methodology for simplified mRNA detection.', *Anal. Chem.*, 84, 5885-5891 (2012)
2. M. Takahara, M. Goto, N. Kamiya et al., 'Primary amine-clustered DNA aptamer for DNA-protein conjugation catalyzed by microbial transglutaminase.', *Bioconjugate Chem.*, 28, 2954-2961 (2017)
3. Y. Mori, H. Nakazawa, M. Umetsu, N. Kamiya et al., 'One-dimensional assembly of functional proteins: toward the design of an artificial cellulosome.', *Mol. Sys. Des. Eng.*, 1, 66-73 (2016)
4. M. Takahara, M. Goto, N. Kamiya et al., 'Design of lipid-protein conjugates using amphiphilic peptide substrates of microbial transglutaminase.', *ACS Appl. Bio Mater.*, 1, 1823-1829 (2018)
5. R. Wakabayashi, A. Suehiro, M. Goto, N. Kamiya, 'Designer aromatic peptide amphiphiles for self-assembly and enzymatic display of proteins with morphology control.', *Chem. Commun.*, 55, 640-643 (2019)
6. K. Moriyama, M. Goto, N. Kamiya et al., 'Enzymatic preparation of a redox-responsive hydrogel for encapsulating and releasing living cells.', *Chem. Commun.*, 50, 5895-5898 (2014)
7. N. Kamiya, Y. Ohama, K. Minamihata, R. Wakabayashi, M. Goto, 'Liquid marbles as an easy-to-handle compartment for cell-free synthesis and *in situ* immobilization of recombinant proteins', *Biotechnol. J.*, 1800085 (2018)