

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

2段階ビオチン化反応を利用したタンパク質解析

### 2. 氏名

末田 慎二

### 3. 研究のねらい

ポストゲノム時代を迎えた昨今、生命現象の主要な担い手であるタンパク質を分析対象としたプロテオーム解析が精力的に展開されている。このようなプロテオーム解析に、積極的に活用されている技術にプロテインタグシステムがある。プロテインタグシステムは、分析対象の標的タンパクに対してペプチドやタンパクをタグとして導入して、そのタグの性質を利用して標的タンパクの分離・分析を行う技術である。本研究では特異な酵素反応を利用した新規なプロテインタグシステムの開発を目標に掲げた。本研究で利用した酵素反応はビオチン固定化反応で、ビオチン固定化酵素(BPL)がその基質タンパクであるビオチンカルボキシルキャリアープロテイン(BCCP)にビオチンを固定化する反応である。古細菌の *Sulfolobus tokodaii* 由来のビオチン化反応系では、酵素であるBPLが、反応生成物であるビオチン化されたBCCP(Holo BCCP)と極めて安定な複合体を形成するという特異な性質を有している。この *S. tokodaii* のBPL-Holo BCCP間の安定な複合体形成反応は、新規な高親和性のタンパク質間相互作用と見なすことができ、この性質を利用した新たなプロテインタグシステムの開発が可能ではないかと考えた。すなわち、BCCP部位をタグとして標的タンパクに導入し、BPLとの相互作用を利用して標的タンパクの分離・分析を行うものである。本研究では、このような特異なビオチン化反応を利用したプロテインタグシステムの開発について検討を行った。

### 4. 研究成果

#### 4-1 *S. tokodaii* ビオチン化系の反応特性に関する調査

*S. tokodaii* のビオチン化反応系を利用したタグシステムの開発にあたり、まずBPLとBCCP間の反応性及び結合性に関する詳細なデータを取得した。他の生物種の同酵素反応系に関する検討から、BCCPはN末端とC末端の2つのドメインから構成され、ビオチン化に必要なのはC末端側のドメインだけであることがわかっている。*S. tokodaii* 由来のBCCPは169残基から構成されるが、そのうち前半の100残基がN末端側のドメインであると推測された(図1)。そこでこのN末端側の100残基を欠損させたBCCP(BCCP  $\Delta$ 100)を作成し、BPLによるビオチン付加反応を行った。その結果、N末端から100残基欠損させてもビオチン付加反応が起こり、BPLの基質として機能し得ることが確認できた。

次に、BPLとBCCP間の結合親和性を表面プラズモン共鳴(SPR)法により定量的に評価した。その結果、BPLとHolo型のBCCP  $\Delta$ 100間の結合解離定数( $K_d$ 値)は1.2(nM)で、両タンパク間

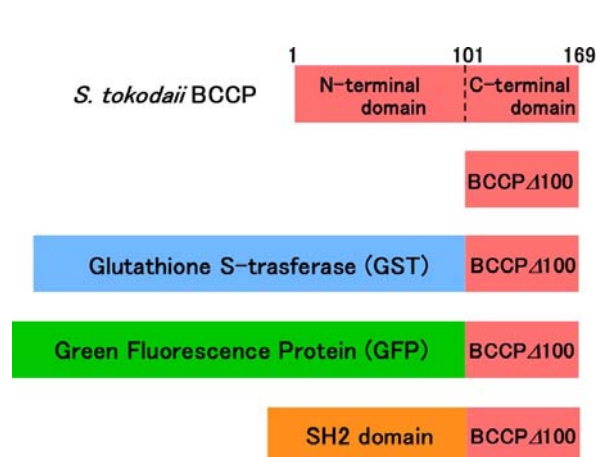


図1 *S. tokodaii* BCCP 及び融合タンパクのドメイン構造

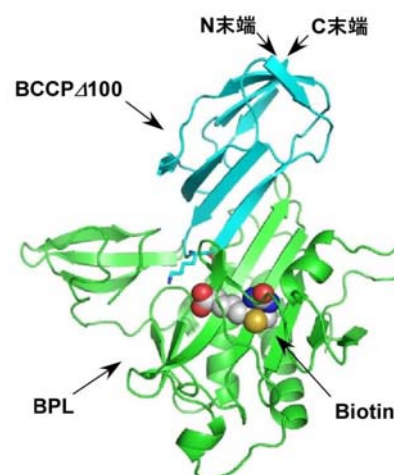


図2 *S. tokodaii* BPL と BCCP (C 末端ドメイン) 複合体のモデル構造

の結合親和性は極めて高いことが確認できた。一方でビオチンが付加していないApo型のBCCP  $\Delta 100$  に関する $K_d$ 値は  $3.3 (\mu M)$ であり、ビオチンが付加して初めて高い結合親和性が生じることがわかった。しかしながらApo型のBCCPに関してもマイクロモラーレベルの $K_d$ 値が得られたことから、Holo BCCPとBPL間の高い結合親和性が、ビオチンとBPL間の相互作用だけでなく、BCCPとBPLのアミノ酸残基間の相互作用にも基づいていることがわかった。したがって、本タグシステムは原理的に、既存のビオチン-アビジン間の結合を利用したシステムや、抗原-抗体反応を利用したシステムよりも結合特異性が高いと言える。

このBPLとBCCPの複合体をタグシステムとして活用するに当たり、その複合体の立体構造情報が利用できればより利便性が高まるものと考えられる。*S. tokodaii*のBPLとBCCPに関しては立体構造は解明されていないが、アミノ酸配列の相同性の高い、異なる生物種由来の同タンパクに関して、その複合体の立体構造が報告されている。したがって、その複合体の立体構造を鋳型にしてホモロジーモデルを構築した(図2)。得られた構造では、BCCPのC末側ドメインのN末端及びC末端は、ともにBPLとの会合部位の反対に位置しており、タグとして理想的な構造を有していることがわかる。つまり、BCCPのどちらの末端に標的タンパクを導入しても、タグを認識するBPLとの相互作用を回避できる構造となっている。またBCCPが剛直な構造をしており、タグを認識する物質と標的タンパクの間に一定の距離を保つことができる点も利点として考えられる。

#### 4-2 固相担体上でのBCCPタグを導入した標的タンパクの捕捉、並びに相互作用解析

標的タンパクとして Glutathione S-transferase (GST) を利用し、そのC末端にBCCP  $\Delta 100$ を導入した融合タンパク(GST-BCCP  $\Delta 100$ )を構築した(図1)。この融合タンパクが、SPR センサーチップ上に固定化したBPLによって、ビオチン化反応を介して捕捉できるかどうかについて検討を行った。その結果、融合タンパクの添加に伴い急激にレスポンスが増大し、試料の添加を終了してもレスポンスはほとんど低下しなかったことから、期待通りセンサーチップ上でビオチン化反応が起

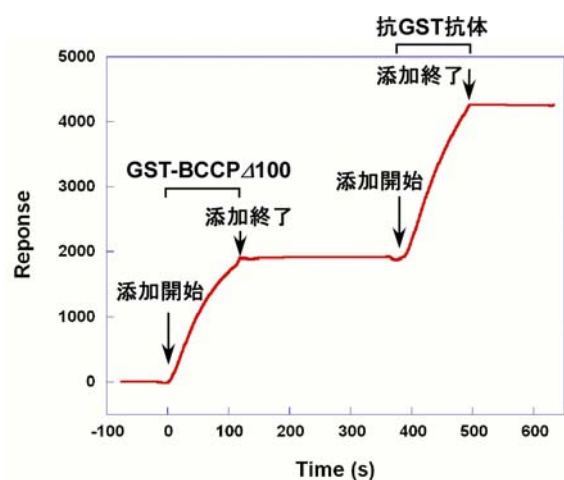


図3 SPR センサーチップ上での GST-BCCP Δ100 の捕捉、並びに抗 GST 抗体との相互作用

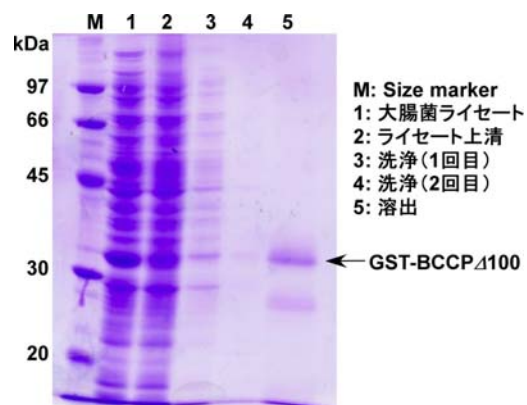


図4 BPL 固定化磁気ビーズを利用した、大腸菌ライセートからの GST-BCCP Δ100 の捕捉

こり、融合タンパクが捕捉できることがわかった(図3)。さらに、このビオチン化反応により固定化した GST が、他のタンパクに対する結合活性を維持しているかどうかについて検証するために、抗 GST 抗体を添加して相互作用解析を行った。その結果、図3に示すように、抗 GST 抗体の添加に伴いレスポンスが増大し、抗体の添加を終了してもレスポンスはほとんど低下しなかった。これより、ビオチン化反応によって固定化した GST は、抗体に対する結合活性を維持していることが確認できた。

また、BPL 固定化磁気ビーズを利用した大腸菌ライセートからの GST 融合タンパクの捕捉についても検討した。その結果、大腸菌ライセート中には様々な生体成分が含まれるにもかかわらず、ビオチン化反応を介して特異的に GST タンパクを捕捉できることがわかった(図4)。また同様に緑色蛍光タンパク(GFP)と BCCP の融合タンパクに関しても(図1)、大腸菌ライセートからの特異的な捕捉に成功した。

#### 4-3 マイクロプレート上でのBCCPタグを導入した標的タンパクの蛍光検出

標的タンパクとして同じく GST を利用し、グルタチオンプレート上に固定化した GST の蛍光検出を行った。この目的のためにまず BPL の蛍光色素による標識化を行った。BPL には活性サイトから離れた部位に3つほどシステイン残基が存在しているため、これらのシステイン残基を有機蛍光色素(Cy3、Cy5 等)のマレイミド体を利用して修飾した。得られた蛍光標識化された BPL はビオチン付加活性を維持していることが確認できたため、プレート上に固定化した GST-BCCP Δ100 の蛍光検出を試みた。その結果、プレート上に添加した GST タンパクの量が増大するにつれて蛍光強度も増大していくことがわかった(図5)。一方で、BCCP タグを有していない GST ではこのような蛍光強度の増大は見られなかったため、GST タンパクをビオチン化反応を介して特異的に蛍光検

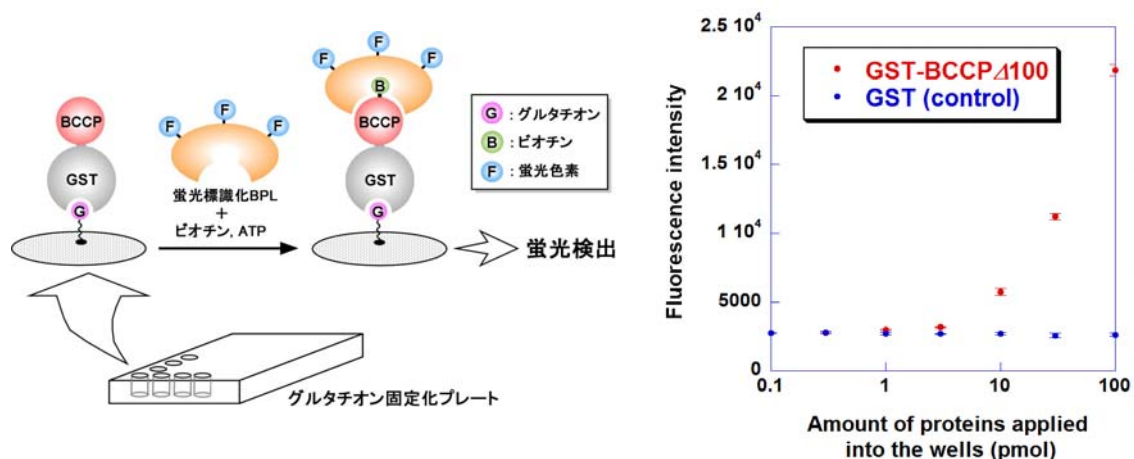


図5 蛍光標識化 BPL を利用したマイクロプレート上での GST タンパクの蛍光検出

出ることがわかった。また Src homology-2 (SH2) domain と BCCP の融合タンパクを構築し(図 1)、その融合タンパクとリン酸化ペプチドの相互作用を、蛍光標識化した BPL との反応を利用して、マイクロプレート上で蛍光検出することにも成功した。

## 5. 自己評価

本研究では特異なビオチン固定化反応を利用した新規なプロテインタグシステムの開発を目標に掲げ、以下の項目に関して検討を行った。詳細は下記に示したが、概ね当初の目標を達成できたものと考えている。

1. *S. tokodaii* ビオチン化系の反応特性に関する調査
2. ビオチン化反応を利用した標的タンパクの捕捉、並びに相互作用解析
3. ビオチン化反応を利用した標的タンパクの蛍光検出

1に関しては、酵素 BPL と基質タンパク BCCP との相互作用をはじめとして、酵素の反応特性に関する詳細なデータを所得することができた。これにより本酵素反応系がタグシステムとして十分活用できるだけでなく、既存のシステムよりも有利な特性を有していることも確認できた。

2に関しては、BCCP 部位を導入した標的タンパクを構築し、その標的タンパクをビオチン化反応を介して特異的に捕捉することに成功した。この系では BPL は、固相担体上に固定化されているが、均一溶液中と同様に迅速に反応が起こり、融合タンパクを捕捉することがわかった。また、SPR センサーチップ上にビオチン化反応を介して固定化した GST タンパクは、抗 GST 抗体に対する結合活性を維持しており、本タグシステムはタンパク質間相互作用解析にも有効であることを示すことができた。一方で、本タグシステムでは BPL-BCCP 間の結合親和性が高すぎるため、穏和な条件下では標的タンパクを溶出させることができない。そこで BPL あるいは BCCP の特定の残基に変異を導入することにより、結合親和性を適度に下げた系の構築が必要であると考えられる。

3に関しては、蛍光標識化した BPL を利用してビオチン化反応を行うことにより、BCCP 部位を導入した標的タンパクの蛍光検出に成功した。本系を構築するに当たり、まず BPL を蛍光色素で化学修飾する必要があったが、活性部位とは離れた箇所が存在するシステイン残基を修飾することにより、酵素活性を損なうことなく化学修飾することができた。本系は導入する蛍光色素の種類や導入率を改善することにより、蛍光検出感度をさらに向上させることが可能であると考えられる。

## 6. 研究総括の見解

本研究はプロテオーム解析に有用な新規のプロテインタグシステムの開発研究である。本研究者は偶然に古細菌由来のビオチン反応系では固定化酵素 BPL がビオチン化された BCCP タンパク質と極めて高い親和性を見いだしている。そこで、これを利用して、ビオチン化 BCCP タンパク質をタグとして標的タンパク質の捕捉、蛍光検出することを目的としている。目的はほぼ達成できたと高く評価できる。

BPL と BCCP ならびにビオチン化 BCCP との特異的相互作用の詳細な解析を行い、BPL とビオチン間のみならず BCCP 間とも特異的相互作用を持っていることを示したことは興味深い。BCCP の構造特異性(剛直性など)からタグタンパク質として優れていることも明らかにしている。標的タンパク質の例としてグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)をとりあげ、磁気ビーズ上で大腸菌ライセートからその特異的捕捉にも成功している。BPL に蛍光標識を施してマイクロプレート上での蛍光検出にも成功している。

他の生物学的に重要な標的タンパク質や動物細胞系の検討が期待される。また、他のタグシステムに対する優位性を定量的に比較して提示してほしかった。質の高い国際誌への更なる発表を期待している。

## 7. 主な論文等

### (A) さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

#### (1) 論文(原著論文)発表

##### 論文(国際)

・Yan-Qiu Li, Shinji Sueda, Hiroki Kondo, Yutaka Kawarabayasi, “A unique biotin carboxyl carrier protein in archaeon *Sulfolobus tokodaii*”, *FEBS Letters*, 580, 1536–1540 (2006)

・Shinji Sueda, Yan-Qiu Li, Hiroki Kondo, Yutaka Kawarabayasi, “Substrate specificity of archaeon *Sulfolobus tokodaii* biotin protein ligase”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344, 155–159 (2006)

#### (2) 特許出願

・発 明 者: 末田慎二、田中一史、近藤寛樹

発明の名称: タンパク等の分離・検出法

出 願 人:国立大学法人九州工業大学

出 願 日:平成 19 年 3 月 28 日

出願番号:特願 2007-085384

(3)学会発表

口頭発表(国際)

・Shinji Sueda, Yan-Qiu Li, and Hiroki Kondo, “A unique biotinylating system in archaeon *Sulfolobus tokodaii*”, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006

・Hiroki Kondo, Yan-Qiu Li, and Shinji Sueda, “Unusually high stability of an enzyme-product complex in the *Sulfolobus tokodaii* biotinylation system”, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006

・Shinji Sueda, Hitoshi Tanaka, Masanori Yamagishi, Hiroki Kondo, “Development of a new tagging system for immobilization and detection of proteins”, The first Japan-Korea joint symposium on bio-microsensing technology, 2008

(5)招待講演

招待講演(国際)

・Shinji SUEDA, “Development of a novel protein tagging system using a unique biotinylation reaction”, KETI-RCBT 1st Workshop on Biosensing technology: Integration between dry and wet technology aiming for future biosensor, 2009

招待講演(国内)

・末田 慎二, “古細菌のユニークなビオチン化反応系とその応用”, 第 32 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2008

(B)その他の主な成果      なし