

研究報告書

「ペプチド系分子ツールを基盤とするたんぱく質光操作・光観察技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年11月～2020年3月

研究者: 川上 隆史

1. 研究のねらい

現在、光を利用した生体機能メカニズム解明の研究は、蛍光タンパク質(GFP など)、光受容タンパク質(ロドプシンなど)、光増感タンパク質(Killer Red など)、光依存的二量体化タンパク質(CRY2-CIB、PhyB-PIF など)、光スイッチング蛍光タンパク質(PA-GFP など)、分割型蛍光タンパク質(split GFP など)の、数十 kDa、100 残基以上のアミノ酸からなる巨大なタンパク質プローブを中心に用いて行われている。しかし本アプローチには、数十 kDa もの巨大なタンパク質プローブを融合することによって、標的タンパク質の不適切な局在を引き起こしたり、他の生体分子との相互作用を阻害したりするなどの影響が懸念されるという問題点が存在する。また、遺伝子(DNA)レベルにおける光操作によって、野生型(タグ無し)タンパク質の発現を光制御する手法等も存在するが、遺伝子レベルでの光制御では、転写・翻訳・フォールディング・翻訳後修飾などの時間的経過(空間的拡散)を経てしまうため、光制御の利点の一つである時間的・空間的制御を数分数秒レベル以下・一細胞内オルガネラレベル以下ではできなくなってしまうという問題点が存在する。そこで本研究では、研究者の専門とする分子進化学(バイオテクノロジー)と有機合成化学(ケミストリー)を融合することによって、タンパク質系分子プローブを中心として行われている光操作・光観察研究を、約1 kDa、10 残基程度のペプチド系分子プローブで実現することを目指す。より具体的には、光観察・光操作が可能な合成小分子に特異的に結合する10 アミノ酸程度のペプチドタグを遺伝子操作でターゲットタンパク質に組み込み、非常に小さい分子を利用して生体分子を観察・操作する技術を開発することを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

大腸菌由来の再構成型の無細胞転写・翻訳系(PURE system)を用いた分子進化学的スクリーニングによって、10 種類の合成小分子に結合する新規人工ペプチドタグ(ペプチド系分子ツール)の探索を行った。配列解析の結果、3 種類の合成小分子について、結合する新規人工ペプチドタグを複数種類同定することに成功した。また、同定したペプチドタグを融合したポリペプチドを合成小分子と反応させ、MALDI-TOF 質量分析による解析を行った結果、部位特異的に合成小分子がペプチドタグに標識されていることも判明した。

小分子蛍光プローブを修飾させた3 種類の合成小分子について、無細胞転写・翻訳系(PURE system)内で、ペプチドタグ融合モデルタンパク質(DHFR)と反応させ、SDS-PAGEによる解析を行った。In-gel 蛍光イメージング解析の結果、3 種類全ての合成小分子に結合するペプチドタグについて、標的モデルタンパク質への蛍光ラベリングを確認することに成功した。また、ペプチドタグ融合タンパク質の蛍光ラベリングは、N 末端融合とC 末端融合どちらにも利用可能であり、様々な種類のタンパク質に適用できること、かつ、様々な種類の小

分子蛍光プローブ (coumarin、fluorescein、tetramethylrhodamine、silicon rhodamine、Alexa Fluor、Janelia Fluor など) においても可能であることが分かった。

さらに、ペプチドタグ融合モデルタンパク質 (核局在 GFP) を発現させた培養動物細胞を用い、ラベリング特異性の最も高かったペプチドタグ / 合成小分子ペアについて、蛍光顕微鏡観察による蛍光イメージング解析を行った。その結果、生細胞内の標的タンパク質の蛍光ラベリングを達成し、タンパク質の光観察技術への応用を実証することに成功した。

また、ペプチドタグ融合モデルタンパク質 (ルシフェラーゼ) を培養動物細胞に発現させ、小分子光増感剤で修飾された合成小分子を用いて、光照射によるルシフェラーゼ活性の変化を解析した。その結果、生細胞内の標的タンパク質を光照射によって不活性化することに成功し、タンパク質の光操作技術への応用を実証した。

(2) 詳細

研究テーマ A「無細胞転写・翻訳系 (PURE system) を用いた分子進化工学的スクリーニング法による新規小分子結合ペプチドタグの探索」

大腸菌由来の再構成型の無細胞転写・翻訳系 (PURE system) を用いた分子進化工学的スクリーニングによって、複数の合成小分子に結合する新規人工ペプチドタグ (ペプチド系分子ツール) の探索を行った (図 1)。合成小分子を担体に固定化し、調製した数兆種類の cDNA 連結型ペプチドタグのコンビナトリアルライブラリーを用いてブルダウンを行い、定量 PCR 法でスクリーニングをモニタリングしながら、PCR 増幅を行った。DNA シーケンスによる配列解析の結果、3 種類の合成小分子について、結合する新規人工ペプチドタグを複数種類同定することに成功した。担体から切り離された合成小分子と cDNA から切り離されたペプチドタグの反応産物を MALDI-TOF 質量分析することにより、合成小分子が人工ペプチドタグに共有結合していることも確認された。また、同定したペプチドタグを融合したポリペプチドを合成小分子と反応させ、MALDI-TOF 質量分析による解析を行った結果、部位特異的に合成小分子がペプチドタグに標識されていることも判明した。

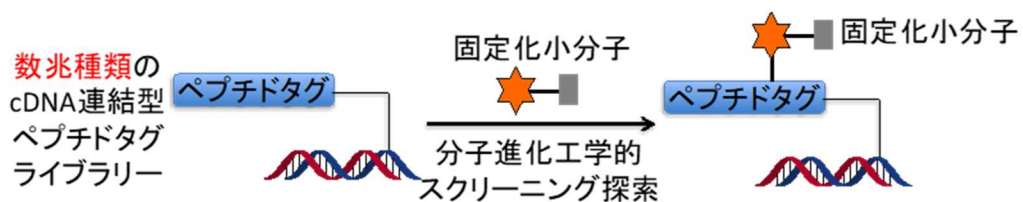


図 1. 無細胞転写・翻訳系 (PURE system) を用いた分子進化工学的スクリーニングによる合成小分子に結合する新規人工ペプチドタグの探索

研究テーマ B「小分子結合ペプチドタグのタンパク質光観察技術への応用」

小分子蛍光プローブを修飾させた 3 種類の合成小分子について、無細胞転写・翻訳系 (PURE system) 内で、ペプチドタグ融合モデルタンパク質 (DHFR) と反応させ、SDS-PAGE による解析を行った。In-gel 蛍光イメージング解析の結果、3 種類全ての合成小分子に結合するペプチドタグについて、標的モデルタンパク質への蛍光ラベリングを確認することに成功した。また、ペプチドタグ融合タンパク質の蛍光ラベリングは、N 末端融合と C 末端融合どち

らにも利用可能であり、様々な種類のタンパク質に適用できること、かつ、様々な種類の小分子蛍光プローブ(coumarin、fluorescein、tetramethylrhodamine、silicon rhodamine、Alexa Fluor、Janelia Fluor など)においても可能であることが分かった。

さらに、ペプチドタグ融合モデルタンパク質(核局在 GFP)を発現させた培養動物細胞を用い、ラベリング特異性の最も高かったペプチドタグ/合成小分子ペアについて、蛍光顕微鏡観察による蛍光イメージング解析を行った。その結果、生細胞内の標的タンパク質の蛍光ラベリングを達成し、タンパク質の光観察技術への応用を実証することに成功した(図 2)。



図 2. 生きた動物細胞内のペプチドタグ融合タンパク質に対する小分子蛍光プローブ修飾合成小分子によるラベリングと蛍光イメージング解析への応用

研究テーマ C「小分子結合ペプチドタグのタンパク質光操作技術への応用」

ペプチドタグ融合モデルタンパク質(ルシフェラーゼ)を培養動物細胞に発現させ、小分子光増感剤で修飾された合成小分子を用いて、光照射によるルシフェラーゼ活性の変化を解析した。その結果、生細胞内の標的タンパク質を光照射によって不活性化することに成功し、タンパク質の光操作技術への応用を実証した。

3. 今後の展開

本研究により、培養細胞におけるペプチドタグ融合タンパク質の小分子による蛍光イメージング解析や光照射分子不活性化法への応用は達成できたが、生物個体中のタンパク質の蛍光イメージング解析や光照射分子不活性化法への応用は実現できていない。そのため、今後更なるペプチドタグ探索系の改良を施すことによって、生物個体中のタンパク質の光観察や光操作を実現したいと考えている。そのためには、スクリーニングシステムを更に高速化するための改良や、培養細胞を用いたスクリーニングシステムの開発、より高性能のペプチドタグ同定につながるような合成小分子の設計などを今後も継続して進める必要があると考える。これにより、生物個体中のタンパク質の光観察や光操作が可能になれば、生命機能メカニズム解明の研究分野において非常に大きなインパクトをもたらすことができると考えられる。

また、本研究ではタンパク質の部位特異的に小分子プローブをラベリングすることにも成功している。開発したペプチドタグの標的合成小分子の一つは極めて安価かつプローブ誘導体合成が容易なものであるため、蛍光タンパク質プローブでは困難な長時間の 1 分子蛍光イメージングにも応用できる合成蛍光プローブ(量子ドットなど)でラベルされたタンパク質の調製なども可能である。また、蛍光イメージングのみならず、光増感剤を用いて標的タンパク質と相互作用するタンパク質の機能阻害を光操作することや、光架橋剤を用いて光照射で相互作用タンパク質を同定することなどにも応用可能であり、*in vitro*での光操作を用いたタンパク質機能解析の

ための基盤技術としても非常に有用であると考え。

4. 自己評価

本研究においては、テーマ A「無細胞転写・翻訳系 (PURE system) を用いた分子進化工学的スクリーニング法による新規小分子結合ペプチドタグの探索」、テーマ B「小分子結合ペプチドタグのタンパク質光観察技術への応用」、テーマ C「小分子結合ペプチドタグのタンパク質光操作技術への応用」の 3 つを目的として、研究を推進した。

テーマ A については、新規人工ペプチドタグ同定のための 10 種類の合成小分子に対する分子進化工学的スクリーニングを展開し、その内 3 種類の合成小分子について、完全新規の結合ペプチドタグを開発することに成功した。残りの合成小分子についても、更に改良したスクリーニング法を用いることによって、新規の結合ペプチドタグの同定が期待でき、目標は十分に達成できたと考えられる。

テーマ B についても、生細胞内のペプチドタグ融合タンパク質の小分子蛍光プローブ修飾合成小分子によるラベリングと蛍光イメージング解析という光観察技術への応用を実証できたため、目標を達成したと考えられる。蛍光イメージングは、超解像蛍光イメージングなどのより高度な解析が注目されており、タンパク質プローブよりサイズの小さな小分子修飾ペプチドタグを利用することによって、解像度向上にも貢献することが期待できる。

テーマ C についても、生細胞内のペプチドタグ融合タンパク質の小分子光増感剤修飾合成小分子によるラベリングと光照射分子不活性化法という光操作技術への応用を実証できたため、目標を達成したと考えられる。タンパク質プローブよりサイズの小さな小分子修飾ペプチドタグを利用することによって、光増感剤を標的タンパク質により近接させることができるため、効率的な光照射によるタンパク質不活性化の実現を期待できる。

本研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果としては、光を利用した生体機能メカニズム解明の研究分野への貢献に加えて、ペプチドタグを介した抗体薬物複合体 (ADC) の調製・開発など、医療・創薬への波及効果を通じた社会への貢献も期待することができる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文 (原著論文) 発表

なし

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 川上隆史、分子進化工学的スクリーニング法を用いた機能性タンパク質のペプチドへの小型化、新学術領域研究「化学コミュニケーションのフロンティア」第 4 回若手シンポジウム、2019 (招待講演)
2. 川上隆史、ケミカルバイオロジーを基盤とする機能性ペプチドの創製、Kofu Stem Cell Conference、2018 (招待講演)
3. 川上隆史、DIVERSE スクリーニングシステムの開発とバイオイメーキングへの応用、日本

- 化学会第 97 春季年会コラボレーション企画 AMED・MFSP シンポジウム、2017(招待講演)
4. 川上隆史、DIVERSE システムを用いた蛋白質ラベリング用ペプチドタグ創製とバイオイメージングへの応用、第 7 回「産と学をつなぐ SENRI の会」、2017(招待講演)
 5. 山本美月、川上隆史、2 種類の人工塩基を有する DNA アプタマー、News & Hot Paper Digest、2018、実験医学 2018 年 1 月号、pp62-63
 6. 山本美月、鈴木宏輝、岩淵智宏、清水優、川上隆史、細胞膜透過性ペプチド創製を指向した PURE システムと mRNA ディスプレイ法による大環状 N アルキルペプチドの超高速スクリーニング、2017、ペプチド医薬品開発のためのスクリーニング・安定化・製剤化技術 第 9 章 -第 4 節、pp332-342