



Sortase Aを用いたタンパク質配向固定化技術の開発とその応用

松本, 拓也

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2013-09-25

(Date of Publication)

2014-09-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第5943号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005943>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



2013 年 7 月 博士論文

Sortase A を用いたタンパク質 配向固定化技術の開発とその応用

神戸大学 工学研究科 応用化学専攻
バイオ生産工学研究室 096T473T
松本 拓也 Takuya MATSUMOTO

【目 次】

序論

緒言4

研究の背景

タンパク質修飾技術の工学的位置づけ5-6

酵素を用いたタンパク質修飾技術6-8

部位特異的なタンパク質固定化技術8-9

本論文の概要10

参考文献11-13

第1章 Sortase Aを用いたタンパク質修飾技術の開発

[1-0] 緒言14

[1-1] Sortase Aの反応機構を利用したタンパク質修飾技術15-28

[1-2] Sortase Aを用いたStreptavidin複合体の調製29-39

[1-3] Sortase Aを用いたタンパク質の同時固定化技術の開発.....40-50

第2章 Sortase Aを用いたタンパク質修飾技術の応用

[2-0] 緒言51

[2-1] セルラーゼ配向固定化微粒子を用いたセルロースの効率的な分解52-63

[2-2] 配向同時固定化技術を用いた人工セルロソームの構築64-70

[2-3] でんぷんを燃料としたバイオ燃料電池71-79

[2-4] グルコースを多段階酸化するバイオアノードの構築80-89

付録90-93

総括

本論文のまとめおよび今後の展望94

論文一覧95

謝辞96

序論

緒言

アミノ酸が多数連なったポリペプチド；タンパク質は、酵素や抗体に代表されるようにそれ単体で優れた触媒機能や分子認識能をもつことから工業的に様々な局面において利用されている。例えば、アミラーゼやグルコースイソメラーゼなどの酵素は食品の加工に、プロテアーゼやセルラーゼは化粧品や洗剤に利用される。最近では、医薬品としての利用が期待されるモノクローナル抗体などタンパク質薬剤の研究も盛んに行われている。また、酵素や抗体などのタンパク質は、微粒子や電極に固定化することで、固定化酵素やバイオセンサーなどのタンパク質複合デバイスとしても、医療・環境に渡る多方面で利用されている。ここで、これらのタンパク質複合デバイスの性能をよくするためには、タンパク質分子が有効に機能する部位あるいは方向に固定化する技術が必要となる。一般的なタンパク質固定化法では、タンパク質と固定化担体の間にある静電的相互作用や分子間力を利用した手法（物理吸着法）やタンパク質分子内に存在する特定のアミノ酸残基を利用し、適当な架橋剤を用いて共有結合させる手法（化学修飾法）が知られている。物理吸着では、固定化担体とタンパク質の間をつなぐ結合力が強くないので固定化したタンパク質が脱着してしまう可能性があることから安定性が低いという点が、化学修飾については、タンパク質は同種のアミノ酸残基を多数有しているため部位特異的な固定化が難しく、固定化するタンパク質の機能を完全に保持することが極めて困難であるという点が問題である。このような問題点を解決することのできる汎用性の高いタンパク質固定化方法は、固定化酵素やバイオセンサーの機能を向上させるために必要不可欠であり、本分野に期待されるところは非常に大きい。実際に、これらを改善するようなタンパク質固定化技術に関して多数の報告例が存在し、現在も多様な研究が行われている。本研究においては、近年、注目を集めている酵素の基質特異性を利用した酵素修飾法に着目した。その中でも、筆者は本論文において、酵素Sortase Aを用いたタンパク質修飾法に着目した。Sortase Aの特殊なペプチド転移反応を利用することでタンパク質を部位特異的に修飾・固定化する技術の開発を試みた。更に、本技術を応用し、タンパク質の機能を損なわずに部位特異的に固定化することで、固定化酵素や酵素固定化電極などのタンパク質複合デバイスの性能向上を目指した。

研究の背景

タンパク質修飾技術の工学的位置づけ

タンパク質とタンパク質同士の連結¹や細胞内のタンパク質に蛍光分子を結合させることによる細胞の可視化²、あるいはタンパク質をガラスなどの基盤に固定化する³ための、タンパク質修飾技術はタンパク質を工学的に利用するために非常に重要な要素の一つである (Figure 1)。実際に、酵素や抗体などのタンパク質はそれ単体で優れた触媒機能や分子認識能を保持しているが、機能性分子を修飾したり、電極や微粒子上へ固定化したりすることによって、タンパク質複合体 (バイオコンジュゲート) として様々な局面で応用されている⁴。バイオコンジュゲートの利用例を具体的にあげると、サイトカインなどのタンパク質薬剤の安定性を向上させたい場合、サイトカインにポリエチレングリコールを修飾 (PEG化) する方法が知られている⁵。また、血糖値センサーの基本原理は、夾雑物質の多い血液からグルコースを選択的に検出することを可能にする認識素子としてグルコースオキシダーゼやグルコースデヒドロゲナーゼといった酸化酵素を電極上へ固定化することからなっている⁶。このように、タンパク質はそれ単体としてより寧ろ修飾を受けた状態であるバイオコンジュゲートとして用いられることが工学的分野では多く見受けられる。そのため、タンパク質修飾技術の開発は、タンパク質を工学的に利用する上で非常に重要である。

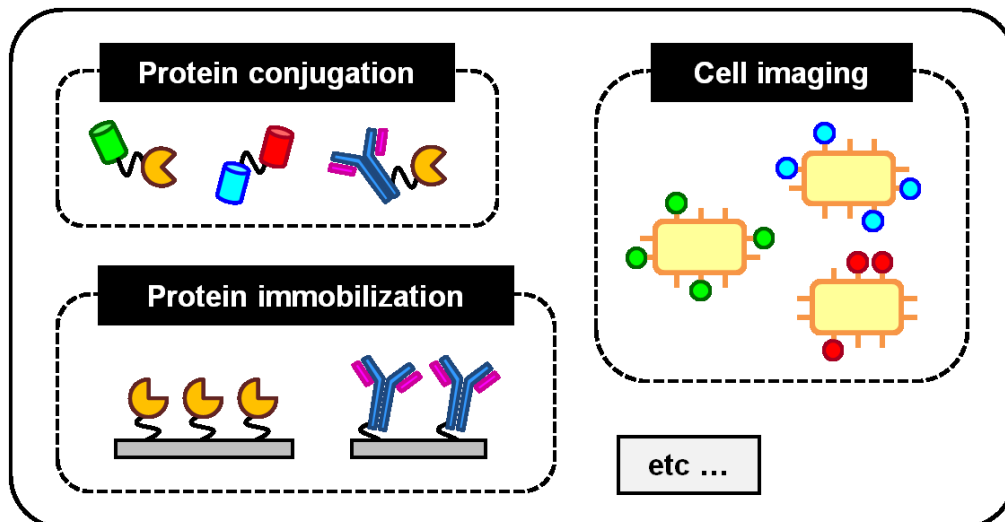


Figure 1. Schematic illustration of protein modification and bioconjugate synthesis

タンパク質の機能になるべく悪影響を与えずにタンパク質を修飾する手法が理想ではあるが、一般的に、タンパク質は熱や有機溶媒などの外的要因に弱く、水中での

反応が望ましいため、修飾を行うための反応条件が非常に制限されてしまう。そのため、最もよく用いられている化学修飾法においても、常温下でリジンやグルタミン酸など特定のアミノ酸残基の側鎖に存在するアミノ基やカルボキシル基などと反応するグルタルアルデヒド (GA) や N-Hydroxysuccinimide (NHS) などを用いた架橋反応を用いる手法がほとんどである⁷。架橋反応を用いる手法では、架橋を行うターゲット部位がタンパク質1分子内に多数存在することから、目的以外の副反応が生じる可能性があり、バイオコンジュゲートの性能に悪影響を与えてしまう恐れがある。最近では、このような問題を解決する手段として、特殊な官能基をタンパク質と修飾分子内にそれぞれ導入することで、タンパク質と修飾分子間で部位特異的に連結を行うことのできる、Staudinger 反応や、「Click Chemistry」と呼称される Huisgen 環化付加反応を利用した汎用性の高い化学修飾法も報告されている^{8,9}。物理吸着法では、基盤にアミノ基などを導入し、静電的相互作用によりタンパク質を吸着させる方法のほかに、タグとよばれる特殊なペプチドモチーフを利用した方法が知られている。ヒスチジンが6つ程度連なった His tag はニッケルやコバルトなどの金属イオンをキレートするため、この親和性を利用することでタンパク質の精製や固定化によく利用される¹⁰。ペプチドタグを用いた手法は、遺伝子工学技術の発展により、ペプチドタグをタンパク質内に導入することが容易になったため、バイオコンジュゲートの調製において、非常に有効な手段となっている。これらに対して、本研究においては、近年、注目を集めている酵素の基質特異性を利用したタンパク質修飾法である酵素修飾法に着目した。

酵素を用いたタンパク質修飾技術

一般的に、酵素は「基質特異性が非常に高く、副反応が起きにくい」、「常温常圧下で反応を触媒する」という二つの優れた特性を有している。酵素修飾法では、アシル転移酵素やトランスフェラーゼ、リガーゼなどの酵素の基質特異性を利用することで、タンパク質と修飾ターゲットを部位特異的に連結することが可能になる。

たとえば、トランスグルタミナーゼはタンパク質中のグルタミン酸残基 (アシル供与体) の γ -カルボキシルアミド基とリジン残基 (アシル受容体) の ϵ -アミノ基との間のアシル転移反応を触媒し、 ϵ -(γ -グルタミル)リジン結合を形成する反応を触媒する¹¹。この反応は、タンパク質内およびタンパク質間でも起こるため、タンパク質架橋剤として、粘弾性を高めるために蒲鉾の生産などに利用されている¹²。また、トランスグルタミナーゼはリジン以外の第一級アミンをアシル受容体とすることも可能なので、医用タンパク質の PEG 化に関する研究も盛んに行われている¹³。ここで、トランスグルタミナーゼはタンパク質中のすべてのグルタミン酸残基やリジン残基間での架橋を平等に促進するわけではなく、特定のアミノ酸配列から成るモチーフ内に存在するグルタミン酸残基やリジン残基をより認識しやすいことが最近の研究で明らかになった¹⁴。しかしながら、前述のようにトランスグ

ルタミナーゼは基質としてとりうるアシル供与体に対して、とりうるアシル受容体の基質特異性が広い(タンパク質のN末端など様々なアミノ基に架橋反応が起こる)ため、目的タンパク質や修飾ターゲットとなる分子の選択によっては副反応が生じる可能性がある。

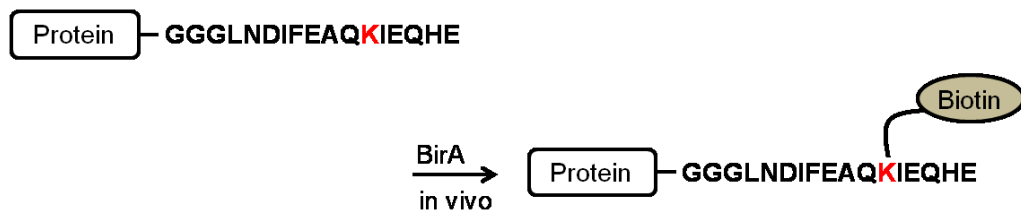
また、ビオチンリガーゼは生体内でタンパク質にビオチンを運搬し、タンパク質にビオチンを修飾する働きをもつ酵素である。大腸菌(*Escherichia coli*; *E. coli*)に由来するビオチンリガーゼ(BirA)は15アミノ酸からなるペプチドタグ(GGGLNDIFEAQKIEQHE; BAP tag)内のリジン残基の ϵ -アミノ基にビオチンを修飾する反応を触媒する(Figure 2A)¹⁵。ビオチンはストレプトアビジン(Stav)と非常に強固な親和性をもつため、あらかじめストレプトアビジンを固定化した担体に、BirAによってビオチン化された目的タンパク質を反応させることで、目的タンパク質を部位特異的に固定化することが可能になる。さらに、BirAはビオチン以外にも類似の構造をもつ誘導体を運搬することが可能であるため、ビオチン誘導体をデザインすることで、細胞の表層タンパク質をターゲットに蛍光分子を部位特異的に修飾し、細胞のイメージングに利用したというユニークな報告も行われている¹⁶。同様に、補酵素Aの誘導体を目的タンパク質に運搬するホスホパンテテインルトランスフェラーゼやアミノアシルtRNAを目的タンパク質に運搬するアミノアシルtRNAトランスフェラーゼといった酵素も、その基質特異性を巧みに利用することでタンパク質修飾に応用されている^{17,18}。

上記に例を挙げた酵素に対して、本論文ではSortase A(SrtA)と呼ばれるペプチド転移酵素に着目した。SrtAは元来グラム陽性細菌の表層膜に存在するタンパク質であり、C末端にSrtAの認識モチーフ(LPXTG; LP tag)をもつ分泌タンパク質をペプチドグリカン上に並べる(Sortする)役割をもつ酵素である。主に、病原性細菌の感染経路に関する酵素として研究¹⁹が行われていたが、2004年に、Maoらによって*Staphylococcus aureus*由来のSrtA(SrtAsa)を用いたタンパク質修飾法が初めて報告された²⁰。Figure 2Bに示すようにSrtAsaはカルシウムイオン存在下で、目的タンパク質AのC末端に存在するLP tagを認識し、TとGの間を切断する。その一方で、切断部を目的タンパク質BのN末端(オリゴグリシン配列から成る; G tag)に転移させる反応を触媒する。よって、C末端側にLP tagを付与したタンパク質(あるいはペプチド)に対して、N末端側にG tagを付与したタンパク質(あるいはペプチド)をSrtA存在下で混合することにより、2分子の部位特異的な連結が可能になる²¹。

単純な化学修飾法や物理吸着法では困難な「部位特異的な修飾」が可能な点が酵素修飾法を用いる大きな利点として挙げられる。酵素修飾法は、タンパク質を部位特異的に修飾することによって、タンパク質の機能を損なうことなく、固定化させたり、機能性分子を連結させたりすることが可能であり、バイオコンジュゲートの性能向上へ向けた非常に有効なツールになりうる。加えて、本論文において焦点を当てたSrtAは基質のとりうるタグ配列が僅か5アミノ酸からなる非常に短い配列であるので、連結したいタンパク質へのタグ配列の導入や認識ペプチドの合成が容易であるため、幅広いバイオコンジ

ュゲート開発に応用可能であるという利点がある。その一方で、逆に基質特異性が非常に高いことから、タグ配列の付与が難しいタンパク質（遺伝子組替え発現が難しい）を対象とした場合への応用が難しい点、また、現在、詳しくは調べられていないが反応効率が他の酵素に比べて低い点などが問題としてあげられる。本論文では、このようなSrtAの反応を利用したタンパク質修飾技術を応用し、特に、「タンパク質を部位特異的に固定化すること」に主題を置き、実際に、新たなタンパク質固定化法の開発と、それを用いたタンパク質複合デバイスの開発への応用を目指した研究を行った。

(A)



(B)

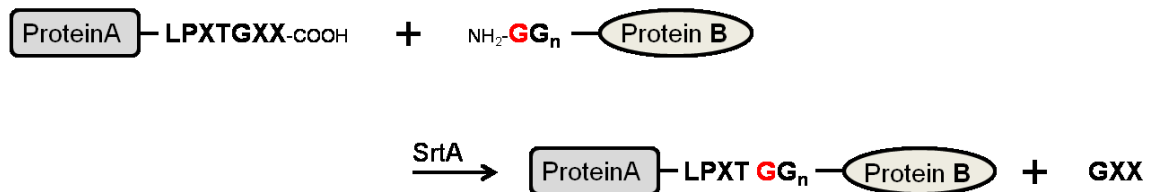


Figure 2. (A) Schematic illustration of site-specific biotinylation of protein using *E. coli* biotin ligase (BirA). (B) Schematic illustration of protein-protein ligation using Sortase A (SrtA)

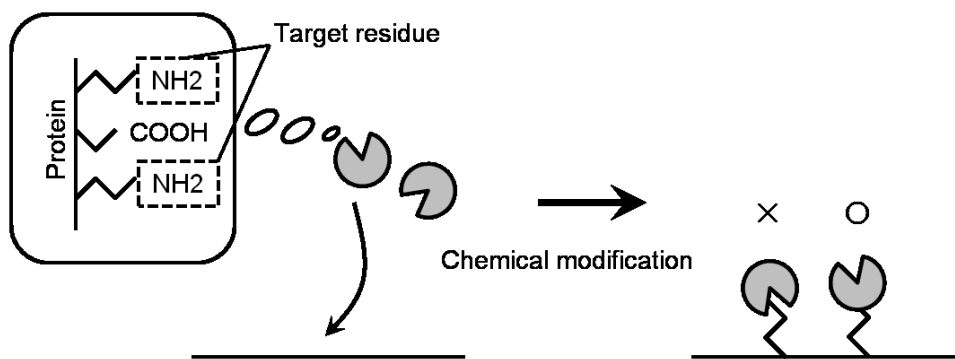
部位特異的なタンパク質固定化技術

固定化酵素や酵素固定化電極は、酵素が微粒子や電極に固定化されることによって作製される。これらの作製には化学修飾法や物理吸着法がよく用いられるが、前述のように担体への酵素の部位特異的な固定化が困難であるため、固定化した際に、酵素の機能が一部失われてしまうということがしばしば起こる。しかしながら、Figure 3に示すように、酵素を固定化するとき、酵素が機能を失わないような配向性を保ちながら固定化すること（配向固定化）が可能になれば、固定化酵素や酵素固定化電極の性能の向上が期待できると考えられる。

抗体などのタンパク質の配向固定化を行うことで、バイオセンサーやプロテインアレイなど医学的利用を指向したタンパク質複合デバイスの性能を向上させたという報

告例はいくつか存在するが²²⁻²⁴、本研究において着目しているような、固定化酵素やバイオ燃料電池といった「バイオマスからの有用物質やエネルギー生産」を指向した技術に配向固定化を適用したような例はほとんどない。一般的に、固定化酵素やバイオ燃料電池などの性能を向上させたい場合、酵素自体の活性を変異導入法などにより向上させたり、固定化担体を多孔質材料にするなどして、酵素の吸着量を向上させたりするアプローチがほとんどである^{25,26}。固定化酵素やバイオ燃料電池の性能向上には、固定化された酵素の配向性が影響するところも大きいと考えられているが²⁷、実際にそれらを検討した例はあまりない。そこで、本論文では、酵素修飾法、特に、SrtAを用いたタンパク質修飾法を駆使することで、タンパク質の配向固定化を可能にする技術の開発およびその応用を指向した研究を行い、実際に、固定化された酵素の配向性が及ぼす系への影響について検討を行った。

(A)



(B)

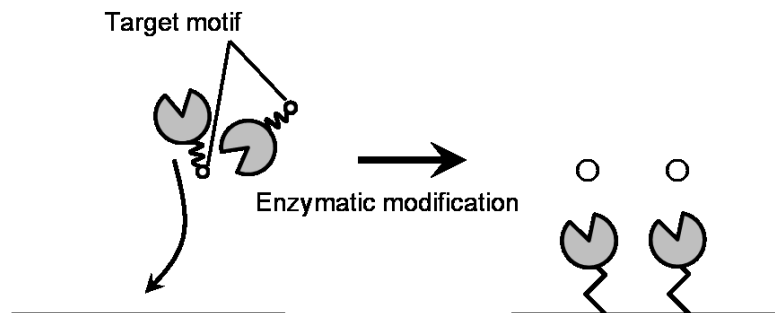


Figure 3. (A) Schematic illustration of immobilization of enzyme using residue-selective chemical modification. (B) Schematic illustration of immobilization of enzyme using motif-selective enzymatic modification.

本論文の概要

本論文では、SrtAという酵素に着目し、本酵素を用いた新しいタンパク質修飾技術の開発およびその具体的な応用展開を指向した研究を目的とした。タンパク質はそれ単体としてより寧ろ修飾を受けた状態であるバイオコンジュゲートとして用いられることが工学的分野では多く見受けら、タンパク質修飾技術の開発は、タンパク質を工学的に利用する上で非常に重要である。酵素SrtAを用いることで、2種類のペプチドタグ間(LP tag およびG tag)で部位特異的に連結反応を起こすことができる。本反応を利用することで、タンパク質を部位特異的に配向固定化する手法の開発を行い、また、セルラーゼ固定化酵素の開発やバイオ燃料電池分野への応用を目指した。

第1章

SrtAを用いたタンパク質修飾技術と、それを応用したタンパク質固定化技術の開発をおこなった。現在、*Staphylococcus aureus*由来のSrtA(SrtAsa)が最も盛んに研究されているが、SrtAは元来多様な微生物中にも存在することから、その中にSrtAsaの他にもタンパク質修飾に有効に利用できるものがあるのではないかと考え、それらを実際にスクリーニング・精製することで、タンパク質修飾に応用することに成功した。また、SrtAsaを用いて、ビオチンと非常に強固な結合能をもつStreptavidinとタンパク質との複合体を調製することで、Streptavidin-ビオチン結合を介して、タンパク質を部位特異的に配向固定化する手法の開発を行った。続いて、Streptavidinをタンパク質固定化の足場として捉えることで、ビオチン結合能、SrtA修飾を組み合わせたタンパク質の同時固定化技術の開発にも成功した。

第2章

[2-1]項では、セルロース分解酵素であるセルラーゼに着目し、これらを配向固定化することによる固定化酵素の性能の変化について検討を行った。また、[2-2]項において、[1-3]項において開発に成功したタンパク質同時固定化技術を利用して、人工セルロソームを構築するための条件検討を行った。[2-3]、[2-4]項においては、バイオ燃料電池とよばれるタンパク質複合デバイスに着目した。固定化する酵素の新しい組み合わせを提案することで、利用可能な燃料の多様化およびグルコース1分子あたりからとれる電流値の増加に成功した。しかしながら、多種類からなる酵素を同時に固定化するような電極では、それぞれの酵素の固定化配向が性能に非常に大きく影響することが示唆された。そのため、酵素をカーボンナノチューブ状に部位特異的に固定化するなどして、電極の性能をより向上させるためのアプローチが今後重要になると考えられる。

参考文献

1. Stephanopoulos, N., and Francis, M. B., Choosing an effective protein bioconjugation strategy., *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 876-884.
2. Hori, Y., and Kikuchi, K., Protein labeling with fluorogenic probes for no-wash live-cell imaging of proteins., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, in press, doi: 10.1016/j.cbpa.2013.05.015.
3. Ki, M. R., Yeo, K. B., Pack, S. P., Surface immobilization of protein via biosilification catalyzed by silicatein fused to glutathione S-transferase (GST)., *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **2013**, 36, 643-648.
4. Saito, G., Swanson, J. A., Lee, K. D., Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities., *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2003**, 55, 199-215.
5. Jevsevar, S., Kunstelj, M., Porekar, V. G., PEGylation of therapeutic proteins., *Biotechnol. J.* **2010**, 5, 113-128.
6. Bakker, E., Qin, Y., Electrochemical sensors. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3965-3984.
7. 左右田健次、中村聡、高木博史、林秀行、タンパク質—科学と工学、講談社サイエンスティフィク、**1999**(第一刷)
8. Wolfbeis, O. S., The Click Reaction in the Luminescent Probing of Metal Ions, and Its Implications on Biolabeling Techniques., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2980-2982.
9. Köhn, M., and Breinbauer, R., The Staudinger Ligation—A Gift to Chemical Biology., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3106-3116.
10. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G., Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation., *Nature.* **1975**, 258, 598-589.

11. Yokoyama, K., Nio, N., Kikuchi, Y., Properties and applications of microbial transglutaminase., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, 64, 447-454.
12. Motoki, M., Seguro, K., Transglutaminase and its use for food processing., *Trend. Food. Sci. Technol.* **1998**, 9, 204-210.
13. Sato, H., Yamamoto, K., Hayashi, E., Takahara, Y., Transglutaminase-Mediated Dual and Site-Specific Incorporation of Poly(ethylene glycol) Derivatives into a Chimeric Interleukin-2., *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 502-509.
14. Tanaka, T., Kamiya, N., Nagamune, T., Peptidyl Linkers for Protein Heterodimerization Catalyzed by Microbial Transglutaminase., *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 491-497.
15. Chapman-Smith, A., Cronan, J. E. Jr., The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity., *Trends Biochem Sci.* **1999**, 24, 359-363.
16. Chen, I., Howarth, M., Lin, W., Ting, A. Y., Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase., *Nat. Methods.* **2005**, 2, 99-104.
17. Yin, J., Liu, F., Li, X., Walsh, C. T., Labeling Proteins with Small Molecules by Site-Specific Posttranslational Modification., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7754-7755.
18. Watanabe, K., Toh, Y., Suto, K., Shimizu, Y., Oka, N., Wada, T., Tomita, K., Protein-based peptide-bond formation by aminoacyl-tRNA protein transferase., *Nature*, **2007**, 449, 867-871.
19. Clancy, K. W., Melvin, J. A., McCafferty, D. G., Sortase transpeptidases: insights into mechanism, substrate specificity, and inhibition., *Biopolymers.* **2010**, 94, 385-396.

20. Mao, H., Hart, S. A., Schink, A., Pollok, B. A., Sortase-mediated protein ligation: a new method for protein engineering., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2670-2671.
21. Tsukiji, S., and Nagamune, T., Sortase-Mediated Ligation: A Gift from Gram-Positive Bacteria to Protein Engineering., *ChemBioChem* **2009**, 10, 787-798.
22. de Juan-Franco, E., Caruz, A., Pedrajas, J. R., Lechuga, L. M., Site-directed antibody immobilization using a protein A-gold binding domain fusion protein for enhanced SPR immunosensing., *Analyst.* **2013**, 138, 2023-2031
23. Alves, N. J., Kiziltepe, T., Bilgicer, B., Oriented surface immobilization of antibodies at the conserved nucleotide binding site for enhanced antigen detection., *Langmuir* **2012**, 28, 9640-9648.
24. Alves, N. J., Mustafaoglu, N., Bilgicer, B., Oriented antibody immobilization by site-specific UV photocrosslinking of biotin at the conserved nucleotide binding site for enhanced antigen detection., *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 49C, 387-393.
25. Zebda, A., Gondran, C., Le Goff, A., Holzinger, M., Cinquin, P., Cosnier, S., Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes., *Nat. Commun.* **2011**, 2, 370.
26. Sugiyama, T., Goto, Y., Matsumoto, R., Sakai, H., Tokita, Y., Hatazawa, T., A mediator-adapted diaphorase variant for a glucose dehydrogenase-diaphorase biocatalytic system., *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 26, 452-457.
27. 辻村清也、加納健司、酵素バイオ電池の最近の展開、GS Yuasa Technical Report、2008年12月 第5巻 第2号

第1章 Sortase Aを用いたタンパク質修飾技術の開発

[1-0] 緒言

ペプチド転移酵素であるSortaseは元来グラム陽性細菌の細胞表層に存在し、様々な分泌タンパク質を区分けする働きをもつ酵素であるが、2004年にMaoらによって、タンパク質の修飾反応に初めて利用された。Ca²⁺存在下で、*Staphylococcus aureus*由来のSrtAsaはLP tagとG tagの連結反応を触媒することから、これらのタグ配列を目的タンパク質のC/N末端上に付与することにより、末端特異的に目的タンパク質同士をつなぎ合わせることが可能になる。本反応を用いることで、タンパク質と様々な機能性分子の複合体が調製されており、SrtAsaは酵素修飾法における新たなツールとして注目を集めている。

SrtAsaはLPXTGからなるLP tagを認識し、G tagあるいは第一級アミンと連結させる反応を触媒することが知られている。ここで、現在最も研究が盛んに行われているSrtAsaの他に、SrtAは多様なグラム陽性細菌に存在することから、LP tag以外の配列を認識しながら、タンパク質修飾に適用できるようなSrtAが存在するのではないかと考えた。SrtAsaとは違った配列を認識するSrtAを見つけることで、SrtAを用いた修飾法の汎用性の向上や、より高度なタンパク質修飾技術への応用が可能になる期待できる。そこで、[1-1]項では、様々な微生物に由来するSrtAについてスクリーニング・タンパク質精製を行うことで、実際に、得られたSrtAをタンパク質へのビオチンの修飾反応および微粒子状への固定化反応に用いることで、その有用性について検討を行った。

[1-2]項では、蛍光分子や酵素との複合体として診断薬や固定化試薬などに広く用いられるStreptavidin (Stav)に着目した。これらは前述の化学修飾法で調製されることが多く、Stavの利用範囲の制限に繋がっている。そこで、SrtAsaを利用してStreptavidin複合体を調製することが診断薬や固定化反応試薬の機能向上・利用範囲の拡大に繋がるという着想に至った。SrtAsaを利用して、C末端にLP tagを付与したStav (Stav-LP)を遺伝子組換え大腸菌を用いて作製し、モデル系としてN末端にGGGGG配列からなるG tagを付与した緑色蛍光タンパク質Gly5-GFP、N末端にGGG配列からなるG tagを付与したグルコース酸化酵素Gly3-GOxの連結を試みた。ビオチンと非常に強固な結合能をもつStavとタンパク質との複合体を調製することで、Stav-ビオチン結合を介して、タンパク質を部位特異的に配向固定化する手法の開発を行った。続いて、[1-3]項においては、Stavをタンパク質固定化の足場として捉えることで、ビオチン結合能、SrtA修飾を組み合わせたタンパク質の同時固定化技術の開発にも成功した。

[1-1] Sortase Aの反応機構を利用したタンパク質修飾技術

[1-1-1] 緒言

現在、SrtAを用いたタンパク質修飾技術においては、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) に由来するSrtAsaが最もよく用いられている¹。SrtAsaは目的タンパク質のC末端付近に存在するLPXTGからなるアミノ酸配列 (LP tag; Xは任意のアミノ酸) を認識・切断し、対象のタンパク質のN末端に存在するオリゴグリシン配列 (G tag; G=2~5) を連結する働きをもつ²。実際に、SrtAsaを用いて、タンパク質とペプチドやタンパク質の複合体だけでなく^{3,4}、タンパク質-機能性小分子⁵、タンパク質-DNA⁶、タンパク質-糖⁷などの様々なタンパク質複合体の調製が成功しており、また、同様にタンパク質の固定化反応にも利用されている⁸。

しかしながら、SrtAsaをタンパク質修飾に利用するにあたって、Ca²⁺存在化で反応が進行すること、酵素活性が十分に高くないこと⁹、LP tag以外の配列を連結することができず、基質特異性が高いことなどから¹⁰、その利用範囲が制限されてしまっている。これらの問題を解決するために、最近、SrtAsaに変異導入することで高活性化した事例¹¹やCa²⁺の存在に依存せずに連結反応を触媒できる *Streptococcus pyogenes* 由来の SrtA¹²などが報告されている。

本項では、SrtAを用いたタンパク質修飾技術の汎用性を向上させるために、現在ほとんど報告のないLP tag以外の配列を認識するSrtAの探索を行った。SrtAsaはLP tagを認識し、G tagあるいは第一級アミンと連結させる反応を触媒することが知られているが、SrtAは元来、様々なグラム陽性細菌の細胞表層上に存在し、細菌の凝集性や病原菌の感染経路に関連する酵素として研究されてきたことから、その認識配列も多様に存在することが分かっている¹³。LP tagとは異なる配列を認識し、かつSrtAsaのようにタンパク質修飾に利用できる新たなSrtAを発見することができれば、SrtAを用いたタンパク質修飾法の汎用性を向上させることに繋がり、より高度なタンパク質修飾法の開発が可能になるのではないかと考えた。

そこで、まず、最もよく用いられるSrtAsaを比較対照とし、乳酸菌やコリネ型細菌など本研究室で保持している幾つかの微生物に由来するSrtAがタンパク質修飾に適応可能であるか調査した。これらのSrtAを、遺伝子組換え大腸菌を用いて異種発現・精製を試み、得られたSrtAが実際にタンパク質修飾に利用可能であるかどうかを検討した。

[1-1-2] 実験操作

[1-1-2-1] 使用した菌体、ベクター構築

Escherichia coli Nova blueを遺伝子クローニング用の宿主として用いた。タンパク質発現の宿主としては、*E. coli* BL21(DE3)を用いた。すべてのDNAの増幅にはKOD plus (Takara)を用いたポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)法を適用した。増幅したDNA断片を適切な制限酵素で処理することによりベクターに導入した。本実験で作製したプラスミドおよび作製時に使用したプライマー配列、制限酵素、利用したベクターをTable 1に示した。緑色蛍光タンパク質の変異体については、クイックチェンジPCR法を適用することでプラスミドを構築した。同様に、作製したプラスミドおよびそれに関する情報はTable 1に示した。

Table 1

Protein	vector	restrict enzyme	F) primer	R) primer
SrtAsa	pBAD	-----	*previous study (14)	*
SrtAlp	pBAD	Kpn1/Sac1	5'-GGTACCGGATCCAACTTCTCAAAGGTCAAGTCACTTGAC-3'	5'-GCGAGCTCGAATTCTTAATATTTGTTATTAATAATGACTTGTAAGGCC-3'
SrtAll yhhA	pBAD	Kpn1/Sac1	5'-GCGGTACCGGATCCGGAAGTGCTAAAGTAAAGGAATTGCTTAGTC-3'	5'-GCGAGCTCGAATTCTACTTTTTGTCAATTATCCCTCCCCCTTTC-3'
SrtAll ylcC	pBAD	Kpn1/Sac1	5'-GCGGTACCGGATCCTTTAAATCTTGCTATACGCAAGATTTTTTTGTAAAAAC-3'	5'-GCGAGCTCGAATTCTAGAAAATTTTAATTTGATTATATTTGGTTTCAAATGC-3'
SrtAcg	pBAD	Kpn1/Sac1	5'-GCGGTACCGGATCCCAAAAGCTTGATGAAGACTGGAATGAAGC-3'	5'-GCGAGCTCGAATTCTTAGTTTTCTCCAAAGCTGCAGGGCGTTGCC-3'
Gly5-GFP	pBAD	-----	*previous study (14)	*
GFP-LA	pBAD	Quick change	5'-CGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGCTCTCTGGCGGCCACTGGTTGGATGGGTTCTAGGAGCTCAAGGGCGAGCTTGAAGG-3'	5'--CCTTCAAGCTCGCCCTTGAGCTCCTAGGAACCCATCCAACCA GTGGCCGCCAGAGAGCCCTTGACAGCTCGTCCATGCCG--3'
GFP-LK	pBAD	Quick change	5'-CGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGCTCTCTGCCTAAGACTGGCGACGACGGTTCTAGGAGCTCAAGGGCGAGCTTGAAGG-3'	5'-CCTTCAAGCTCGCCCTTGAGCTCCTAGGAACCGTCGTGCGCATCTTAGGCAGAGAGCCCTTGACAGCTCGTCCATGCCG-3'
GFP-LQ	pBAD	Quick change	5'-CGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGCTCTCTGCCTCAGACTTCGAGCAGGGTTCTAGGAGCTCAAGGGCGAGCTTGAAGG-3'	5'-CCTTCAAGCTCGCCCTTGAGCTCCTAGGAACCCTGCTCGGAAGTCTGAGGCAGAGAGCCCTTGACAGCTCGTCCATGCCG-3'
GFP-Qch1	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCTGCTCCGCAGTCTGAGGCAGAGAGCCCTTGAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGCCTCAGACTGCGGAGCAGGGTTCCTAGGAGCTC-3'
GFP-Qch2	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCTGCTCAGTAGTCTGAGGCAGAGAGCCCTTGAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGCCTCAGACTACTGAGCAGGGTTCCTAGGAGCTC-3'

GFP-Qch3	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCTGCTCCACAGTCTGAGGCAGAGAGC CCTTGAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGCCTCAGACTGTGGAGCAGGGTTCCTA GGAGCTC-3'
GFP-Qch4	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCTGCTCAGTCTGAGGCAGAGAGCCCTT GTAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGCCTCAGACTGAGCAGGGTTCCTAGGA GCTC-3'
GFP-Qch5	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCTGCTCCTGAGGCAGAGAGCCCTTGTA C-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGCCTCAGGAGCAGGGTTCCTAGGAGCT C-3'
GFP-Qch6	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCTGCTCACCAGTGGCCACAGAGAGC CCTTGAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGTGGGCACTGGTGAGCAGGGTTCCTA GGAGCTC-3'
GFP-Qch7	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCTGCTCGGAAGTGGCCACAGAGAGC CCTTGAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGTGGGCACTTCCGAGCAGGGTTCCTA GGAGCTC-3'
GFP-Qch8	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCTGCTCACCAGTGGCGTGACAGAGAGC CCTTGAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGCACGCCACTGGTGAGCAGGGTTCCTA GGAGCTC-3'
GFP-Qch9	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCTGCTCGGAAGTGGCGTGACAGAGAGC CCTTGAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGCACGCCACTTCCGAGCAGGGTTCCTA GGAGCTC-3'
GFP-Qch10	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCTGCTCCTTAGTCTGAGGCAGAGAGCC CTTGAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGCCTCAGACTAAGGAGCAGGGTTCCTA GGAGCTC-3'
GFP-Qch11	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCTGCTCCCTAGTCTGAGGCAGAGAGC CCTTGAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGCCTCAGACTAGGGAGCAGGGTTCCTA GGAGCTC-3'
GFP-Qch12	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCTGCTCGAAAGTCTGAGGCAGAGAGC CCTTGAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGCCTCAGACTTTCGAGCAGGGTTCCTA GGAGCTC-3'
GFP-Qch13	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCTGCTCCTTAGTCTGAGGCAGAGAGCC CTTGAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGCCTCAGACTAAGGAGCAGGGTTCCTA GGAGCTC-3']

GFP-Qch14	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCAACAGTCTGAGGCAGAGAGCCCTTGTAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGCCTCAGACTGGTGGTTCCTAGGAGCTC-3'
GFP-Qch15	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCCTGCTCGGAGGCCTGAGGCAGAGAGCCCTTGTAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGCCTCAGGCCTCCGAGCAGGGTTCCTAGGAGCTC-3'
GFP-Qch16	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCCTGCTCACCGGCCTGAGGCAGAGAGCCCTTGTAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGCCTCAGGCCGGTGAGCAGGGTTCCTAGGAGCTC-3'
GFP-Qch17	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCCTGCTCGGACCTCTGAGGCAGAGAGCCCTTGTAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGCCTCAGAGGTCCGAGCAGGGTTCCTAGGAGCTC-3'
GFP-Qch18	pBAD	Quick change	5'-GAGCTCCTAGGAACCCCTGCTCACCCCTCTGAGGCAGAGAGCCCTTGTAC-3'	5'-GTACAAGGGCTCTCTGCCTCAGAGGGGTGAGCAGGGTTCCTAGGAGCTC-3'
GFP-Qch19	pBAD	Quick change	5'-CTAGGAACCCATCCAACAGTCTCCGCCAGAGAGCCCTTGTACAGCTCG-3'	5'-CGAGCTGTACAAGGGCTCTCTGGCGGAGACTGGTTGGATGGTTCCTAG-3'

[1-1-2-2] コンピセントセルの調製

Nova Blue株およびBL21(DE3)株のコンピセントセルを以下の手法で調製した。Tf培地50 mLに大腸菌を1ループ接種し、37 °Cで一晩培養した。翌日、Tf 培地400 mLに培養液20 mLを加え、OD₆₀₀ = 0.5になるまで培養し、氷上で5 min冷却した。遠心分離操作(4000 × g, 15 min, 4 °C)を行い集菌した後、氷冷したTfb1 80 mLで菌体を懸濁し、氷上で5 min冷却した。再度、遠心分離操作(4000 × g, 15 min, 4 °C)を行い、集菌後、氷冷したTfb2 16 mLに懸濁し、氷上で15 min冷却した。得られた懸濁液を0.6 mLマイクロチューブに100 μLずつ分注した。尚得られたコンピセントセルは-80 °Cで保存した。

[1-1-2-3] ミニプレップ

制限酵素で処理したDNA 断片は2 × Ligation Mixあるいは5 × In-Fusion HD Enzyme Premixを用いてプラスミド化し、大腸菌(*E.coli* / Nova Blue)に形質転換した。形質転換したコロニーを5 mL LB+抗生物質(アンピシリンまたはカナマイシン)培地中に播種し、試験管で37°Cで一晩培養した後、遠心機で菌体を回収した。回収した菌体からFast Gene Plasmid Mini Kitを用いて、増殖させたプラスミドを回収した。得られたプラスミドの一部を制限酵素で処理した後、アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、プラスミド化の確認を行った。

[1-1-2-4] タンパク質発現・精製

得られたプラスミドはタンパク質発現の際に、BL21(DE3)株に形質転換し直した。形質転換したプレートからコロニーを5 mL LB+抗生物質(アンピシリンまたはカナマイシン)培地中に播種し、試験管で37°Cで一晩培養した。次に、培養液を250 mL LB+抗生物質(アンピシリンまたはカナマイシン)培地中に移し替え、OD₆₀₀ = 0.5~0.7になるまで37°Cで振とう培養した後に、誘導剤(イソプロピル-β -チオガラクトピラノシド(IPTGまたはアラビノース)を加え、タンパク質の発現を誘導した。さらに、培養温度を25°Cに下げ、18~24 h培養後に菌体を回収した。菌体を超音波で破碎した後に、菌体内上清画分を回収し、TALON® Metal Affinity Resinを用いて目的タンパク質を吸着させた。吸着したタンパク質をイミダゾールで溶出後、得られた画分をSDS-PAGE分析することによって、目的タンパク質の有無を判断した。また、タンパク質溶液中に含まれるイミダゾールはリン酸緩衝液中で透析することによって除去し、目的タンパク質を得た。尚、タンパク質の濃度はBCA法により決定した。

[1-1-2-5] SrtAを用いたタンパク質へのAmine-PEO₂-biotinの修飾反応

(+)-biotinyl-3,6-dioxaoctanediamine (50 μ M) およびtagged-GFP (適切なタグ配列を遺伝子工学的に付与したもの) (5 μ M) を 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) 中で混合し、SrtA (5 μ M) を加えることで修飾反応を開始した。37 $^{\circ}$ C で 24 時間反応後、SDS-PAGE サンプル緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 6 % 2-メルカプトエタノール) を加え、煮沸処理を行うことで反応を停止した。更に、サンプル溶液に対して、Streptavidin-Alkaline phosphatase 複合体を用いたウエスタンブロッティング操作を行うことにより修飾反応の結果を解析した。尚、メンブレンはPromega社のBCIP/NBT試薬を用いたファストプロトコルを用いて染色した。

[1-1-3] 実験結果および考察

[1-1-3-1] SrtAsaを用いた部位特異的なタンパク質の連結反応

ペプチド転移酵素 SrtA はタンパク質の C 末端近辺に存在する LP tag を認識し、G tag から成る目的タンパク質の N 末端上に連結する働きを触媒するタンパク質であるが、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) に由来する SrtAsa が最も盛んに研究されており、タンパク質修飾によく用いられている²。最近 10 年の間に、SrtAsa を用いることでタンパク質-タンパク質^{3,4}、タンパク質-脂質¹⁵、タンパク質-微粒子¹⁶、タンパク質-蛍光分子¹⁷ など様々なバイオコンジュゲートの作製に関する報告が行われている。そこでまず、本研究においても、SrtAsa を用いることでタンパク質が連結可能かどうか確認した。遺伝子組換え大腸菌を用いて SrtAsa、LP tag を C 末端に付与した緑色蛍光タンパク質 (GFP-LP)、G tag を N 末端に付与した GFP (G-GFP) をそれぞれ発現・精製し、SrtAsa を用いることで二種類の GFP を連結した。カルシウムイオン存在下、37 $^{\circ}$ C で一晩 3 種類のタンパク質を混合した後、SDS-PAGE により反応生成物を解析した結果、GFP 同士の連結を確認することができた (data not shown)。また、[1-2] 項でも述べるように、他のタンパク質間でも同様に連結を確認することができた。以上の結果から、本研究においても、SrtAsa を用いることで、タンパク質同士の部位特異的な連結が可能であるということが確認できた。

[1-1-3-2] SrtAsa を用いた部位特異的なタンパク質への修飾反応

SrtAsa は認識モチーフである LP tag に対して基質特異性は非常に高いが、ペプチド転移を行う先である G tag に対しては基質特異性が少し低い。基本的には、グリシ

ンが 2~5 つからなるオリゴグリシン配列を連結基質としてとるが、Huang らによる報告に見られるように、オリゴグリシン配列と比較して連結効率はやや低下してしまうものの、グリシンが 1~2 つからなる短いタグ配列やある種の第一級アミンも同様に基質とすることが可能である²。そこで、Figure 1A に示すようなビオチンの誘導体からなる第一級アミンも、基質として選択することが可能であるのではないかと考え、SrtAsa 存在下で GFP-LK に対して修飾する反応を解析した。前項で示したタンパク質の連結反応と同様に、37 °C で一晩反応させた後、ウエスタンブロッティングによって反応生成物を解析した。Figure 1C および D の結果から、SrtAsa 存在下でのみ GFP-Biotin の複合体とみられる目的位置にバンドが確認でき、連結反応が部位特異的に行われていることが確認できた。以上の結果より、SrtAsa を用いることで目的タンパク質 (GFP) に部位特異的にアミノ基をもつ小分子 (ビオチン誘導体) を修飾することが可能であると示唆された。

[1-1-3-3] 多様な SrtA を用いた部位特異的なタンパク質の連結反応

SrtAsa を用いることで、タンパク質同士の連結反応、タンパク質への小分子修飾を部位特異的に行うことが可能であることが示されたが、他にも SrtA は多様なグラム陽性細菌に存在し、その認識配列も多様に存在することが分かっている¹³。SrtAsa と異なる配列を認識し、かつタンパク質修飾に利用できる新たな SrtA を発見することは、SrtA を用いたタンパク質修飾法の汎用性を向上させることに繋がり、より高度なタンパク質修飾法の開発が可能になるのではないかと考えた。しかしながら、多様な微生物が SrtA を保持している中、SrtAsa 以外で、それらを発現・精製し、タンパク質修飾に応用したという例はほとんどない¹²。そこで、本項では数多く存在するグラム陽性菌の中で、SrtAsa と違った配列を認識し、かつタンパク質修飾にも利用できるような SrtA のスクリーニングを行った。

まず、遺伝子組換え大腸菌を用いることで、当研究室で保持している中で、数種類のグラム陽性細菌に由来する SrtA の発現を試みた。しかしながら、SrtA 全長を発現させようとした場合、遺伝子組換え大腸菌では発現することができなかった。ここで、SrtA は細菌の表層膜に存在するタンパク質であるため、膜に結合する疎水性の領域が N 末端付近に存在することが分かっている¹⁸。一般的に、膜タンパク質を大腸菌で発現することは、困難であり、現在最もよく用いられる SrtAsa においても、この膜結合ドメインを削除したものが広く利用されている¹⁹。そのため、大腸菌を用いた SrtA の組換え発現においても、膜結合ドメインを削除して発現の方が望ましいと考えられる。そこで、それぞれの SrtA に関して N 末端から 60 アミノ酸程度を削除することによって疎水性領域を取り除いて、再度発現を試みたところ、Figure 1B に示すように、4 種類の SrtA の発現に成功した。具体的には、*Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 (Accession: NP_784294 SrtAlp)、*Lactococcus lactis* IL1403 (NP_266915 SrtAll-yhhA, NP_267269

SrtAll-ylcC)、*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (NP_602126 SrtAcg) 由来の SrtA の発現に成功した。これらの SrtA はすべて、Sortase A というサブファミリーに分類され、C 末端付近に TLXTC からなる触媒ドメインを保持しており、基本的に LPXTG 配列を基質として認識・切断を行う。それらに加えて、SrtA 自体の構造の差異からそれぞれの SrtA は固有の認識配列をもつ。そこで、これらの SrtA がタンパク質同士の連結反応を触媒できる活性型で得られたかどうかを調べるため、GFP-LP と G-GFP 間に各 SrtA を作用させることで、複合体の形成の有無を分析した。[1-1-3-1]項の結果より SrtAsa がタンパク質同士を連結できるのに対して、得られたすべての SrtA を用いた場合において、複合体の形成を確認することができなかった (data not shown)。

[1-1-3-4] 多様な SrtA を用いた部位特異的なタンパク質への修飾反応

今回得られた SrtA はタンパク質同士の連結反応に対する触媒能 (GFP-LP と G-GFP の間での連結反応に関する) を保持していなかったが、続いてタンパク質への小分子修飾反応についても検討を行った。Figure 1A に示す第一級アミンを含むビオチンの誘導体を GFP-LK に修飾する反応に対して、各 SrtA をそれぞれ用いた。反応後のサンプルを Streptavidin-Alkaline phosphatase 複合体を用いてウエスタンブロッティング解析を行った結果を、Figure 1D に示した。lane 4 および lane 8 より、SrtAsa、SrtAlp が含まれるサンプルをロードした場合においてのみ、目的位置にバンドが検出されたことから、GFP-LK に対してビオチンを修飾することが可能であることが確認できた。同様の実験を GFP-LA に対しても行ったところ、Figure 1C の lane 4、lane 8 に見受けられるように、SrtAsa、SrtAlp が含まれるサンプルをロードした場合においてのみ、目的位置にバンドが検出されたことから、GFP-LA に対してもビオチンを修飾することが可能であることが確認できた。しかしながら、SrtAll-yhhA、SrtAll-ylcC、SrtAcg においては、GFP-LK、GFP-LA どちらに対してもビオチンの修飾が確認できなかったため、本実験では良好な結果の得られた SrtAlp について詳しく検討を行うこととした。

ここで、各々の SrtA に対して LPXTG 配列のほかに、基質として選択することのできる認識配列が Sortase data base (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/Sortase/>) に纏められており、その中でも、Table 2 に示すように SrtAlp の潜在認識配列である LQ tag を用いて同様のビオチン修飾反応を検討したところ非常に興味深い結果が得られた。Figure 1D に示すように GFP-LQ とビオチン誘導体に対して、SrtAsa および SrtAlp を作用させたところ、SrtAlp を用いた場合でのみビオチンの修飾反応が起こったことが確認できた。更に、Table 2 に示した GFP の変異体に関しても、それぞれビオチンの修飾反応について検討を行ったところ、SrtAsa の基質特異性が LXXXG 配列に制限されるのに対して¹⁰、SrtAlp では LPQTSEQ という配列を認識可能であることが示唆された。

[1-1-4] 結言

SrtAsaを用いることで、GFPにビオチンを部位特異的に修飾することに成功した。また、*Lactobacillus plantarum*に由来する新たなSrtAlpの発現に成功し、SrtAlpはSrtAsaと同様にタンパク質修飾に用いることが可能であると示唆された。また、SrtAlpはLPQTSEQという、一般的にタンパク質の修飾反応によく用いられるSrtAsaでは連結できない独特な配列を認識して、タンパク質修飾を行うことが可能であるという興味深い結果が得られた。今後、より詳細な触媒機能について解析していくことで、SrtAlpが新たなタンパク質修飾ツールになりうるということが期待できる。

Table 2. Modification of tagged EGFPs with amine-PEO₂-biotin .

Lane number	Tag name	Tag sequence	SrtLp modification	SrtA modification	Potential enzyme
1	QcH1	LPQTAEQ	conjugated	not conjugated	variant
2	QcH2	LPQTTEQ	not conjugated	not conjugated	variant
3	QcH3	LPQTV EQ	not conjugated	not conjugated	variant
4	QcH4	LPQTEQ	not conjugated	not conjugated	variant
5	QcH5	LPQEQ	not conjugated	not conjugated	variant
6	QcH6	LWATGEQ	not conjugated	not conjugated	variant
7	QcH7	LWATSEQ	not conjugated	not conjugated	variant
8	QcH8	LHATGEQ	not conjugated	not conjugated	variant
9	QcH9	LHATSEQ	not conjugated	not conjugated	variant
10	QcH10	LPQTKEQ	conjugated	not conjugated	variant
11	QcH11	LPQTREQ	conjugated	not conjugated	variant
12	QcH12	LPQTFEQ	conjugated	not conjugated	variant
13	QcH13	LPQTS	conjugated	not conjugated	variant
14	QcH14	LPQTG	conjugated	conjugated	variant
15	QcH15	LPQASEQ	conjugated	not conjugated	variant
16	QcH16	LPQAGEQ	conjugated	conjugated	variant
17	QcH17	LPQRSEQ	not conjugated	not conjugated	variant
18	QcH18	LPQRGEQ	not conjugated	not conjugated	variant
19	QcH19	LAETG	conjugated	conjugated	variant
20	LA	LAATGWM	conjugated	conjugated	SrtCg
21	LK	LPKTGDD	conjugated	conjugated	SrtLI
22	LQ	LPQTSEQ	conjugated	not conjugated	SrtLp

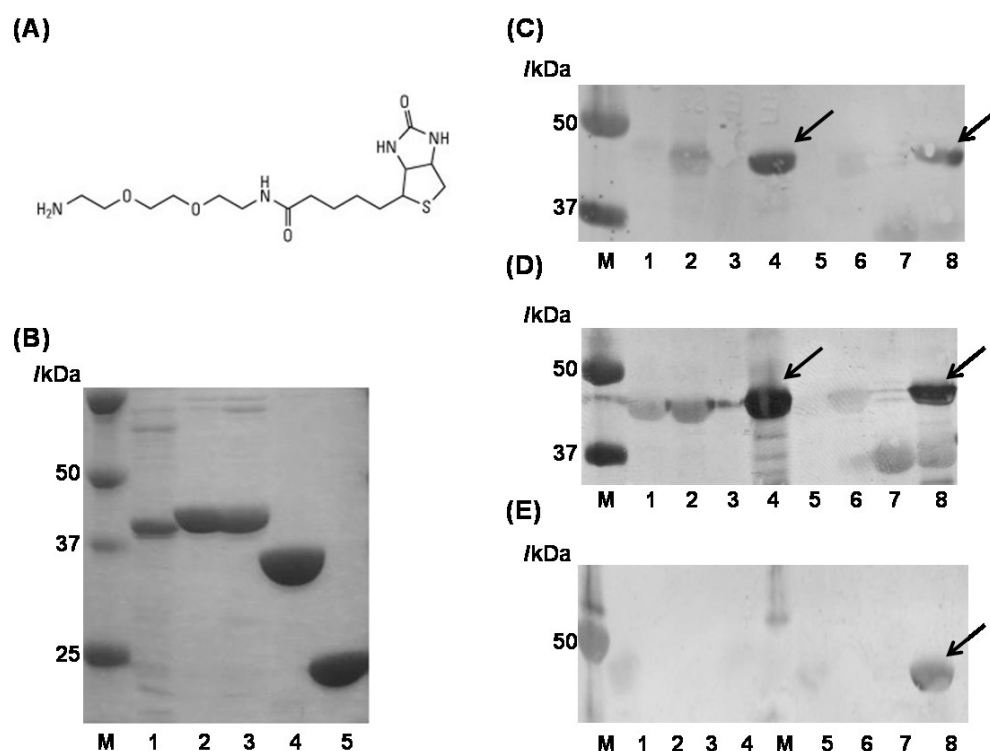


Figure 1 (A) (+)-Biotinyl-3,6-dioxaoctanediamine. (B) SDS-PAGE analysis of thioredoxin-sortase fusion proteins after His-tag purification. (Lane 1: SrtLI-yhhA; land 2: SrtLI-ylcC; land 3: SrtCg; lane 4: SrtLp; lane 5: SrtA; M: molecular weight markers). (C) Western blot analysis of the products of the site-specific reaction between EGFP-LA and amine-PEO2-biotin after sortase treatment (The arrows show confirmed protein modification. Lane 1: EGFP-LA; lane 2: EGFP-LA and amine-PEO2-biotin; lane 3: amine-PEO2-biotin and SrtA; lane 4: EGFP-LA, amine-PEO2-biotin and SrtA; lane 5: EGFP-LA; lane 6: EGFP-LA, amine-PEO2-biotin; lane 7: amine-PEO2-biotin and SrtLp; lane 8: EGFP-LA, amine-PEO2-biotin and SrtLp; M: molecular weight markers). (D) Western blot analysis of the products of the site-specific reaction between EGFP-LK and amine-PEO2-biotin after sortase treatment (The arrows show confirmed protein modification. Lane 1: EGFP-LK; lane 2: EGFP-LK and amine-PEO2-biotin; lane 3: amine-PEO2-biotin and SrtA; lane 4: EGFP-LK, amine-PEO2-biotin and SrtA; lane 5: EGFP-LK; lane 6: EGFP-LK, amine-PEO2-biotin; lane 7: amine-PEO2-biotin and SrtLp; lane 8: EGFP-LK, amine-PEO2-biotin and SrtLp; M: molecular weight markers). (E) Western blot analysis of the products of the site-specific reaction between EGFP-LQ and amine-PEO2-biotin after sortase treatment (The arrows show confirmed protein modification. Lane 1: EGFP-LQ; lane 2: EGFP-LQ and amine-PEO2-biotin; lane 3: amine-PEO2-biotin and SrtA; lane 4: EGFP-LQ, amine-PEO2-biotin and SrtA; lane 5: EGFP-LQ; lane 6: EGFP-LQ, amine-PEO2-biotin; lane 7: amine-PEO2-biotin and SrtLp; lane 8: EGFP-LQ, amine-PEO2-biotin and SrtLp; M: molecular weight markers). Three independent experiments were carried out.

[1-1-5] 参考文献

1. Proft, T., Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilisation., *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32*, 1-10.
2. Huang, X., Aulabaugh, A., Ding, W., Kapoor, B., Alksne, L., Tabei, K., Ellestad, G., Kinetic mechanism of *Staphylococcus aureus* sortase SrtA., *Biochemistry* **2003**, *42*, 11307-11315.
3. Popp, M. W., Karssemeijer, R. A., Ploegh, H. L., Chemoenzymatic site-specific labeling of influenza glycoproteins as a tool to observe virus budding in real time., *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002604.
4. Yamamura, Y., Hirakawa, H., Yamaguchi, S., Nagamune, T., Enhancement of sortase A-mediated protein ligation by inducing a β -hairpin structure around the ligation site., *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4742-4744.
5. Popp, M. W., Antos, J. M., Grotenbreg, G. M., Spooner, E., Ploegh, H. L., Sortagging: a versatile method for protein labeling., *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 707-708.
6. Pritz, S., Wolf, Y., Kraetke, O., Klose, J., Bienert, M., Beyermann, M., Synthesis of biologically active peptide nucleic acid-peptide conjugates by sortase-mediated ligation., *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3909-3012.
7. Samantaray, S., Marathe, U., Dasgupta, S., Nandicoori, V. K., Roy, R. P., Peptide-sugar ligation catalyzed by transpeptidase sortase: a facile approach to neoglycoconjugate synthesis., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2132-2133.
8. Chan, L., Cross, H. F., She, J. K., Cavalli, G., Martins, H. F., Neylon, C., Covalent attachment of proteins to solid supports and surfaces via Sortase-mediated ligation., *PLoS One* **2007**, *2*, e1164.
9. Levary, D. A., Parthasarathy, R., Boder, E. T., Ackerman, M. E., Protein-protein fusion catalyzed by sortase A., *PLoS One* **2011**, *6*, e18342.

10. Kruger, R. G., Otvos, B., Frankel, B. A., Bentley, M., Dostal, P., McCafferty, D. G., Analysis of the substrate specificity of the *Staphylococcus aureus* sortase transpeptidase SrtA., *Biochemistry* **2004**, 43, 1541-1551.
11. Chen, I., Dorr, B. M., Liu, D. R., A general strategy for the evolution of bond-forming enzymes using yeast display., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2011**, 108, 11399-11404.
12. Popp, M. W., Dougan, S. K., Chuang, T. Y., Spooner, E., Ploegh, H. L., Sortase-catalyzed transformations that improve the properties of cytokines., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2011**, 108, 3169-3174.
13. Mandlik, A., Swierczynski, A., Das, A., Ton-That, H., Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development., *Trends. Microbiol.* **2008**, 16, 33-40.
14. Tanaka, T., Yamamoto, T., Tsukiji, S., Nagamune, T., Site-specific protein modification on living cells catalyzed by Sortase., *ChemBiochem.* **2008**, 9, 802-807.
15. Antos, J. M., Miller, G. M., Grotenbreg, G. M., Ploegh, H. L., Lipid modification of proteins through sortase-catalyzed transpeptidation., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 16338-16343.
16. Parthasarathy, R., Subramanian, S., Boder, E. T., Sortase A as a novel molecular "stapler" for sequence-specific protein conjugation., *Bioconjug. Chem.* **2007**, 18, 469-476.
17. Antos, J. M., Chew, G. L., Guimaraes, C. P., Yoder, N. C., Grotenbreg, G. M., Popp, M. W., Ploegh, H. L., Site-specific N- and C-terminal labeling of a single polypeptide using sortases of different specificity., *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 10800-10801.
18. Schneewind, O., Missiakas, D. M., Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2012**, 367, 1123-1139.

19. Ton-That, H., Liu, G., Mazmanian, S. K., Faull, K. F., Schneewind, O., Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1999**, 96, 12424-12429.

[1-2] Sortase Aを用いたStreptavidin複合体の調製

[1-2-1] 緒言

放線菌 *Streptomyces avidinii* が生産する Streptavidin (Stav) は四量体からなるタンパク質であり、ビオチンと非常に強固な親和性をもつ¹⁻³。この特異な結合能を利用することで、Stavは他のタンパク質や小分子とのバイオコンジュゲートとして、タンパク質の固定化⁴や標識⁵など様々な形で利用されている⁶⁻⁸。

ここで、遺伝子組換え Stav の生産は主に遺伝子組換え大腸菌を用いて行われており、*S. avidinii* からの直接生産系については確立していない。しかしながら、大腸菌を用いた発現を行う場合、不溶性の凝集体を形成してしまうため、適切な活性型に巻き戻すための、リフォールディング操作が必要になる⁹。希釈法や透析法などを用いたリフォールディング操作に関する報告が行われているが^{10,11}、Stav をバイオコンジュゲートとして用いる場合には、Stav と他のタンパク質の融合タンパク質を発現する必要があるが、そのような複雑な Stav に関しては一般的に利用できるような汎用性の高いリフォールディング技術は確立されていない。そのため、Stav を利用したバイオコンジュゲートは一般的に、前述の化学修飾法を用いて、調製されている。例えば、Stav と Alkaline phosphatase (or horseradish peroxidase; HRP) の複合体はターゲット分子の検出や定量によく利用されている¹²。化学修飾法は簡便な手法で複合体を調製でき、幅広く利用されているが、前述のように、複合体の機能の低下や副産物の生成といった問題が生じる可能性がある。

そこで、本項では、本論文において着目している SrtAsa を用いたバイオコンジュゲート調製法を利用することで Stav 複合体の調製を試みた。SrtAsa を利用することで、Stav あるいは修飾するタンパク質の機能を損なうことなく、連結することが可能になり、より優れた Stav 複合体の調製が可能になるのではないかと考え、実験・考察を行った。具体的には、C 末端に LP tag を付与した Stav に対して、SrtAsa を用いて、モデル系として、Gly5-GFP および G tag を付与した Glucose oxidase (Gly3-GOx) の連結を試みた。調製した複合体に関して、ビオチン提示プレートを用いることで、複合体の機能について検討した。化学修飾法を用いて、Stav-GOx 複合体を調製した場合とその機能を比較して、本研究において調製した Stav-GOx の有用性について調査した。

[1-2-2] 実験操作

[1-2-2-1] 使用した菌体、ベクター構築

Escherichia coli Nova blueを遺伝子クローニング用の宿主として用いた。Stav-LPおよびGly5-GFPの発現の宿主としては、*E. coli* BL21(DE3)を用いた。すべてのDNAの増幅にはEX Taq(Takara)を用いたポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)法を適用した。増幅したDNA断片を適切な制限酵素で処理することによりベクターに導入した。本実験で作製したプラスミドおよび作製時に使用したプライマー配列、制限酵素、利用したベクターをTable 1に示した。作製したプラスミドおよびそれに関する情報はTable 1に示した。[1-1-2-2]項と同様にコンピセントセルを調製した。また、[1-1-2-3]項と同様にミニプレップ操作を行うことで、作製したプラスミドを精製した。

Table 1

Protein	vector	restrict enzyme	F) primer	R) primer
SrtA _{sa}	pBAD	-----	*previous study [1-2]項	*
Gly5-GFP	pBAD	-----	*previous study [1-2]項	*
Stav-LPET G	pCold1	Kpn1/EcoR 1	5'-GGGGTACCCTCGAGGCCGAGGCCGGCATCACCGGCACCTG G-3'	5'-GGAATTCGGATCCCGCTAGCCACCAGTTTCCGGCAGAGAGC CACCGGAGGCGGCGGACGGCTTCACCTTGGTGAAGGT-3'
Gly3-GOx	pISI-EGF P(13)	Spe1/Not1	5'-GCCTCGAGAAAAGAGGCGGTGGACACCACCACCACCAC AGCAATGGCATTGAAGCCAGCCTCCTGACTGATCCC-and-GCAT AGCGGCCGCTCACTGCATGGAAGCATAATCTTCCAA-3'	5'-GCATACTAGTAAAAGAGGCGGTGGACACCACCACCACCACCA C-and-GCATAGCGGCCGCTCACTGCATGGAAGCATAATCTTCCA A-3'

[1-2-2-2] Stav-LPETGの発現・精製

得られたプラスミドはタンパク質発現の際に、BL21(DE3)株に形質転換し直した。形質転換したプレートからコロニーを5 mL LB+抗生物質(アンピシリン)培地中に播種し、試験管で37°Cで一晩培養した。次に、培養液を250 mL LB+抗生物質(アンピシリン)培地中に移し替え、OD₆₀₀ = 0.5~0.7になるまで37°Cで振とう培養した後に、誘導剤(イソプロピル-β -チオガラクトピラノシド(IPTG))を加え、タンパク質の発現を誘導した。さらに、培養温度を15°Cまで下げ、18~24 h培養後に菌体を回収した。菌体を超音波で破碎した後に、菌体内上清画分を回収し、TALON® Metal Affinity Resinを用いて目的タンパク質を吸着させた。吸着したタンパク質をイミダゾールで溶出後、得られた画分をSDS-PAGE分析することによって、目的タンパク質の有無を判断した。また、タンパク質溶液中に含まれるイミダゾールはリン酸緩衝液中で透析することによって除去し、目的タンパク質を得た。尚、タンパク質の濃度はBCA法により決定した。

[1-2-2-3] 遺伝子組換え麹菌を用いたGly3-GOxの発現・精製

Aspergillus oryzae niaD⁻ mutant (strain IF4)をGly3-GOx発現のホスト株に選択した。CD-NO₃プレート培地を選択培地に用いた。*A. oryzae*の形質転換はAdachiらの論文を参考に行った¹³。得られた形質転換体を250 mL DPY培地に播種し、30 °Cで約一週間程度培養した。培養上清をMira cloth (Millipore / Darmstadt, Germany)で菌体から分離し、TALON® Metal Affinity Resinを用いて目的タンパク質を回収した。得られたタンパク質の濃度は同様に、BCA法を用いて測定した。

[1-2-2-4] SrtAを用いたGly3-GOx(or Gly5-GFP)とStav-LPの連結反応

Gly3-GOx(or Gly5-GFP) (20 μM)およびStav-LP (5 μM)を20 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0, 0.5 mM, 塩化カルシウムを含む)中で混合し、SrtAsa (10 μM)を加えることで修飾反応を開始した。37 °Cで24時間反応後、SDS-PAGEサンプル緩衝液(50 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 6 % 2-メルカプトエタノール)を加え、反応を停止した。更に、このサンプル溶液に煮沸処理を行ったものを行わないものについて SDS-PAGE解析を行い、修飾反応の結果について検討を行った。

[1-2-2-5] Stav-GOx複合体の機能解析

2種類のStav-GOx複合体を化学修飾法で調製し、SrtAを用いて調製したStav-GOx複合体とその機能を比較した。Gly3-GOx(20 μM)およびStav-LP(5 μM)を

20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中で混合し、グルタルアルデヒド (終濃度が 0.05 % になるように) を加えて連結反応を開始した。一方で、Gly3-GOx (20 μ M) および Stav-LP (5 μ M) を 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中で混合し、0.2 M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) と 0.05 M N-hydroxysuccinimide (NHS) を加えて連結反応を開始した。得られた複合体はそれぞれ、96 well ビオチン被覆プレート (Pierce) に反応させ、4 $^{\circ}$ C で 30 min 放置した。それぞれの well を PBS で数回洗浄した後、ELISA POD substrate TMB Kit (ナカライテスク) を用いて、GOx 活性を測定した。また、プレートに固定化した複合体の総量を以下のように分析した。同様に、各複合体を well に固定化した後、0.1 μ g anti-streptavidin mouse monoclonal antibody を加え、室温で一時間放置した。PBS で未結合のタンパク質を洗い落した後、0.1 μ g HRP conjugated anti-mouse antibody を加え、室温で一時間放置した後、同様に未結合のタンパク質を PBS で洗い落した。ELISA POD substrate TMB Kit を用いて、HRP 活性を測定し、固定されたタンパク質の総量を比較した。

[1-2-3] 実験結果および考察

[1-2-3-1] 遺伝子組換え大腸菌を用いた Tagged Streptavidin の可溶化発現

SrtAsa を用いた バイオコンジュゲート調製法を適用するにあたって、LP tag を C 末端に付与した Stav (Stav-LP) を発現・精製する必要がある。自然界では、Stav は放線菌 *S. avidinii* によって分泌生産されているが、*S. avidinii* における遺伝子組換え系は現在確立されておらず、本項のようにタグ配列を付与した Stav を生産するにあたっては遺伝子組換え大腸菌を用いることが多い。しかしながら、遺伝子組換え大腸菌を用いた発現系では、Stav は不活型の不溶性凝集体を形成してしまい、適切な構造に巻き戻すためのリフォールディング処理が必要になる。そこで、本研究においても、まず T7 プロモータを有するタンパク質発現系を用いて、Stav-LP の発現を試みたところ、不溶性画分に多量の不活型の Stav-LP の発現を確認することができた。Sano らの報告⁹を参考に、不溶性凝集体のリフォールディング操作を行ったが、Stav-LP のリフォールディングにおける最適な条件を見出すことができなかった。

そこで、本研究では、このような不溶性凝集体の可溶化発現に実績のあるコールドショック発現系を導入した。pCold vector を用いることで、大腸菌を低温域 (およそ 15~20 $^{\circ}$ C) で培養中に目的タンパク質のみを発現することができ、不溶性凝集体を形成する主な原因であるタンパク質間の相互作用に起因するミスフォールディングを軽減することが期待できる¹⁴。実際に、pCold vector を導入することで Stav-LP を発現し、可溶性画分に含まれる Stav-LP を TALON® Metal Affinity Resin を用いて吸着させた。イミダゾールによって溶出した Stav-LP を熱処理したもの (四量体を解離) としていないもの (四量体)

に分けて、SDS-PAGEを行ったものをFigure 1A,Bに示す。Figure 1Aより、熱処理を伴わないSDS-PAGEを行ったところ、Stav-LPの分子量に相当する60 kDa近辺に単一のバンドが見られた。熱処理を伴うSDS-PAGEの場合、Stav-LPの単量体の分子量に相当する16 kDa近辺に単一のバンドが検出された。

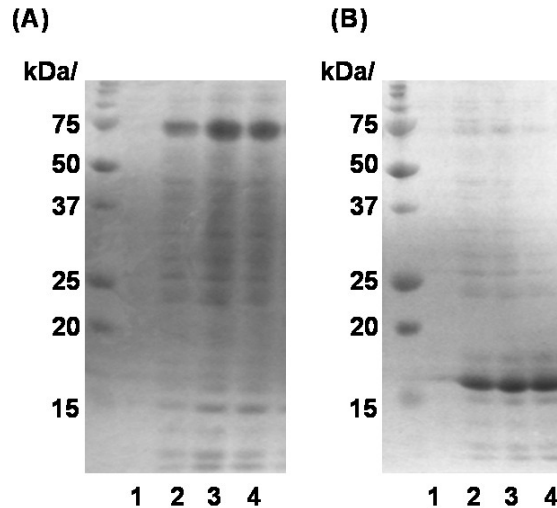


Figure 1. SDS-PAGE analysis of LPETG-tagged streptavidin after imidazole elution from His-tag affinity resin.

(A) Without boiling of samples, (B) with boiling of samples.

以上の結果より、pCold vectorを利用することで、Stav-LPの可溶化発現に成功したことが示された。また、BCA法により得られたタンパク質の濃度を測定したところ、生産量はおよそ培地1 LあたりStav-LP 10 mgの生産を確認できた。

[1-2-3-2] SrtAsaを用いたStreptavidin-タンパク質複合体の調製

ペンタグリシン配列を付与した緑色蛍光タンパク質(Gly5-GFP)およびトリグリシン配列を付与したグルコースオキシダーゼ(Gly3-GOx)をモデルとして連結反応について検討した。Figure 2AにGly5-GFPとStav-LPの間でのSrtAsaを用いた連結反応について、SDS-PAGEを行った結果を示す。Lane 7に着目すると、Gly5-GFP、Stav-LP、SrtAsaすべてが含まれるときにのみ、43 kDa近辺に新たなバンドが検出されている。これは、Stav-LP(16 kDa)とGly5-GFP(27 kDa)の複合体のバンドの大きさに相当し、LP tagを含まないStavを用いて同様の実験を行った場合には、このバンドは検出されなかったことから、SrtAsaによってStav-LPとGly5-GFPが部位特異的に連結されたことが確認できた。同様の実験を、Gly3-GOxを用いて行った結果を、Figure 2Bに示す。Lane 7に着目すると、SrtAsa存在化でのみ120 kDa近辺にGly3-GOx(80 kDa)とStav-LP(16 kDa)の複合体のバンドの大きさに相当する新たなバンドが検出されていることが分かる。以上の結果より、2種類のStav-タンパク質複合体を調製することに成功したことが確認

できた。以降の実験においては、実際に、調製したStav-GOxを用いて、その複合体としての機能を、化学修飾法によって調製したStav-GOxと比較・検討した。

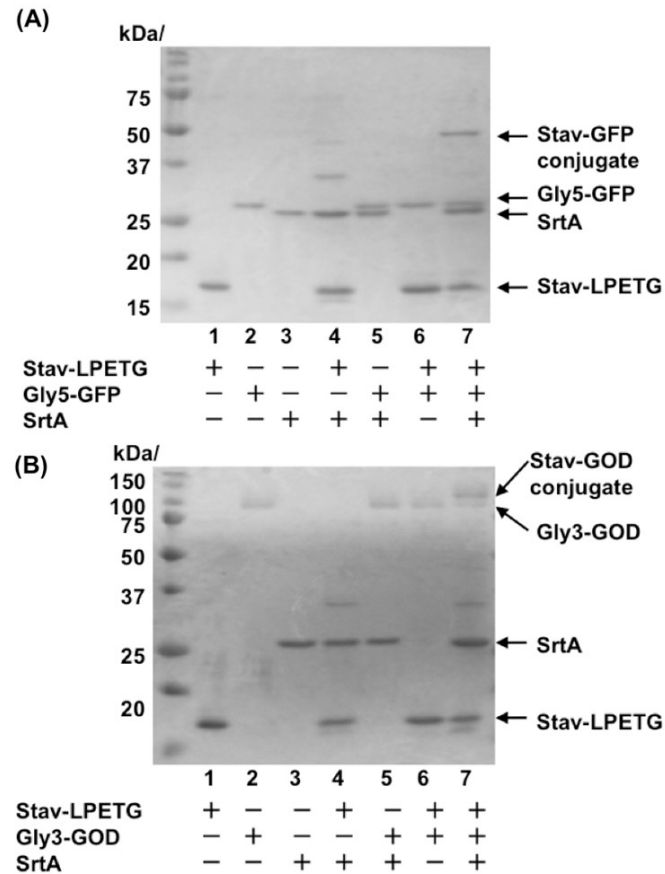


Figure 2. SDS-PAGE analysis of the site-specific reaction products after sortase A treatment. Each samples were boiled before SDS-PAGE analysis (A) Lane 1, Stav-LPETG; lane 2, Gly5-GFP; lane 3, sortase A; lane 4, Stav-LPETG and Gly5-GFP; lane 5, Stav-LPETG and sortase A; lane 6, Gly5-GFP and sortase A; lane 7, Gly5-GFP and Stav-LPETG and sortase A. (B) Lane 1, Stav-LPETG; lane 2, Gly3-GOD; lane 3, sortase A; lane 4, Stav-LPETG and Gly3-GOD; lane 5, Stav-LPETG and sortase A; lane 6, Gly3-GOD and sortase A; lane 7, Gly3-GOD and Stav-LPETG and sortase A

[1-2-3-3] Streptavidin-GOx複合体の機能評価

SrtAsaを用いたStav-GOx複合体の調製過程において、タンパク質の機能が損なわれていないかどうかを、SrtAsaによる連結反応前後でのGOx活性を測定することで検討した。GOxのみ、および反応の前後でその比活性にほとんど差が見られないことが確認できた。このことから、SrtAsaによる末端特異的な連結反応では、GOxの活性にほとんど影響を与えないということが示唆された。

Stavはビオチンと非常に強固な親和性を持つため、Stav-GOx複合体をビオチン提示プレート上に反応させることで、GOxを間接的にプレート上に固定化することが可

能になる。すなわち、Figure 3に示した模式図のように、SrtAsaを用いてStav-GOx複合体を調製することで、GOxをN末端特異的に配向を制御して固定化することが可能になる。ビオチン提示プレート上にSrtAsaによって調製した複合体を結合させた後、GOx活性を測定した結果をFigure 4Aに示す。複合体が形成されていると考えられるColumn 7でのみGOxの活性が見られたことから、本技術により調製した複合体はStav、GOx両方の機能を維持していたことが確認できた。

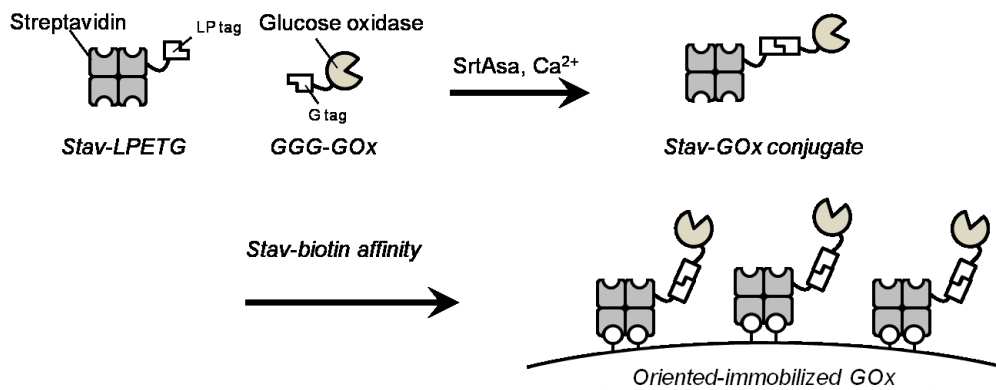


Figure 3. Schematic illustration of site-specific Stav-GOx conjugation using SrtAsa and oriented-immobilization of GOx using Stav-biotin affinity.

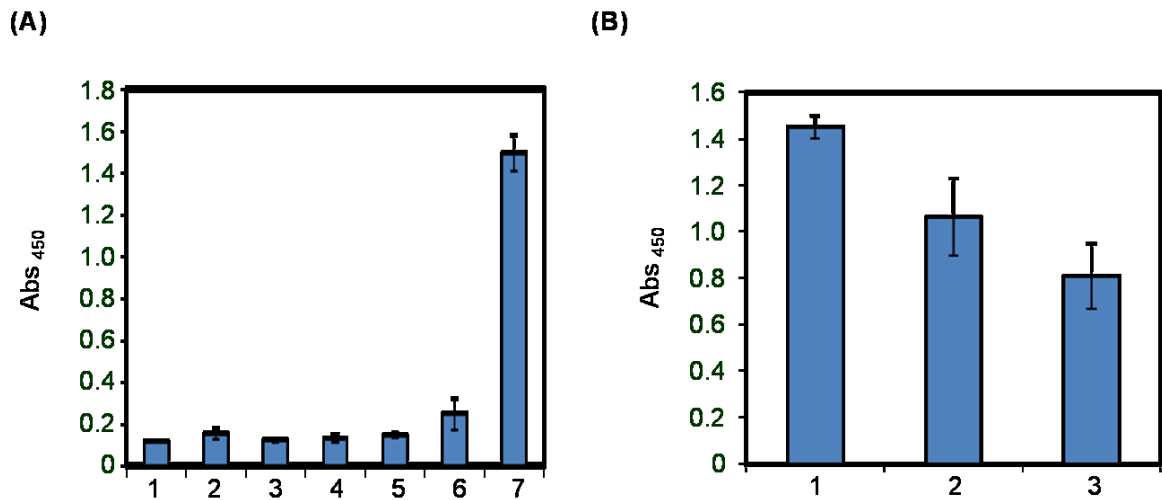


Figure 4. (A) Evaluation of biotin binding and GOx activity after SrtAsa treatment. Column1, Stav-LP; Column 2, Gly3-GOx; Column 3, SrtAsa; Column 4, Stav-LP and SrtAsa; Column 5, Gly3-GOx and SrtAsa; Column 6, Stav-LP and Gly3-GOx; Column 7, Gly3-GOx and Stav-LP and SrtAsa. (B) GOx activity of the Stav-GOx conjugate after binding to a biotin-coated plate. Left column; Stav-GOx conjugate prepared by SrtAsa reaction. Middle column; Stav-GOx conjugate prepared by glutaraldehyde. Right column; Stav-GOx conjugate prepared by EDC/NHS reaction.

更に、化学修飾法によって調製した Stav-GOx 複合体との機能比較を行った結果を Figure 4B に示した。化学修飾法としては、タンパク質間の側差のアミノ基同士で架橋反応を引き起こすグルタルアルデヒド、アミノ基およびカルボキシル基間での架橋反応を引き起こす EDC/NHS を用いて複合体を調製した。得られた複合体は、ビオチン提示プレート上に固定化し、未結合のタンパク質を洗落した後、GOx の活性を測定することで、複合体の機能を比較した。Figure 4B より、化学修飾法で調製した複合体のどちらの場合においても、SrtAsa で調製した複合体に対して、GOx の比活性が低く検出された。また、複数サンプルにおける実験結果の間で、SrtAsa で調製したものに対して、化学修飾法で調製した複合体において誤差範囲が大きく検出された。このことから、通常の化学修飾法では部位特異的な連結反応が困難であり官能基選択的なランダム架橋が形成されるため、結果として複合体の機能低下を引き起こしているのではないかと示唆された。

[1-2-4] 結言

コールドショック発現系を用いることで、リフォールディング操作なしでの組換え Stav の可溶化発現に成功した。また、SrtAsa を用いることで Stav に部位特異的に GFP および GOx を連結させることに成功した。更に、Stav が有しているビオチンとの特異な結合能を利用することで、Stav-ビオチン結合を介して GOx の配向固定化に成功した。また、化学修飾法で調製した複合体と比較して、SrtAsa を用いて調製した複合体は機能を高く保持することができた。本研究の結果から、本項で開発した技術がタンパク質固定化法の発展に寄与するものと期待できる。

[1-2-5] 参考文献

1. Green, N. M., Avidin and streptavidin., *Methods Enzymol.* **1990**, 184, 51-67.
2. Grubmüller, H., Heymann, B., Tavan, P., Ligand binding: molecular mechanics calculation of the streptavidin-biotin rupture force., *Science* **1996**, 271, 997-999.
3. Weber, P. C., Ohlendorf, D. H., Wendoloski, J. J., Salemme, F. R., Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin., *Science* **1989**, 243, 85-88.
4. Kim, D. M., Umetsu, M., Takai, K., Matsuyama, T., Ishida, N., Takahashi, H., Asano, R., Kumagai, I., Enhancement of cellulolytic enzyme activity by clustering cellulose binding domains on nanoscaffolds., *Small* **2011**, 7, 656-664.

5. Zeng, Y., Ramya, T. N., Dirksen, A., Dawson, P. E., Paulson, J. C., High-efficiency labeling of sialylated glycoproteins on living cells., *Nat. Methods* **2009**, 6, 207-209.
6. Ding, Z., Fong, R. B., Long, C. J., Stayton, P. S., Hoffman, A. S., Size-dependent control of the binding of biotinylated proteins to streptavidin using a polymer shield., *Nature* **2001**, 411, 59-62.
7. Choi, J., Wang, N. S., Reipa, V., Conjugation of the photoluminescent silicon nanoparticles to streptavidin., *Bioconjug. Chem.* **2008**, 19, 680-685.
8. Colonne, M., Chen, Y., Wu, K., Freiberg, S., Giasson, S., Zhu, X. X., Binding of streptavidin with biotinylated thermosensitive nanospheres based on poly(N,N-diethylacrylamide-co-2-hydroxyethyl methacrylate)., *Bioconjug. Chem.* **2007**, 18, 999-1003.
9. Sano, T., Cantor, C. R., Expression of a cloned streptavidin gene in *Escherichia coli*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1990**, 87, 142-146.
10. Umetsu, M., Tsumoto, K., Hara, M., Ashish, K., Goda, S., Adschiri, T., Kumagai, I., How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. Spectroscopic evidence for highly efficient refolding of a single-chain Fv fragment., *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 8979-8987.
11. Petrov, S., Nacheva, G., Ivanov, I., Purification and refolding of recombinant human interferon-gamma in urea-ammonium chloride solution., *Protein Expr. Purif.* **2010**, 73, 70-73.
12. Bayer, E. A., Ben-Hur, H., Wilchek, M., A sensitive enzyme assay for biotin, avidin, and streptavidin., *Anal. Biochem.* **1986**, 154, 367-370.
13. Adachi, T., Ito, J., Kawata, K., Kaya, M., Ishida, H., Sahara, H., Hata, Y., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A., Construction of an *Aspergillus oryzae* cell-surface display system using a putative GPI-anchored protein., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 81, 711-719.

14. Qing, G., Ma, L. C., Khorchid, A., Swapna, G. V., Mal, T. K., Takayama, M. M., Xia, B., Phadtare, S., Ke, H., Acton, T., Montelione, G. T., Ikura, M., Inouye, M., Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*, *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 877-882.

[1-3] Sortase Aを用いたタンパク質の同時固定化技術の開発

[1-3-1] 緒言

[1-2] 項において、SrtAsaを用いることで、Stav-LPとGly5-GFPあるいはGly3-GOxを連結することに成功し、本技術を用いることで、Gly3-GOxをビオチン提示プレート上に配向固定化することが可能になった。この手法を用いることで、酵素やタンパク質の機能を高い状態で保持したまま固定化することが可能になるため、バイオセンサー¹や固定化酵素²などタンパク質複合デバイスの機能向上に寄与できると考えられるが、今後、より複雑なシステムを有するタンパク質複合デバイスを開発する上では、複数種のタンパク質の配向や固定化量を同時にデザインする高度な固定化技術が必要になると予想される。しかしながら、そのような固定化法の開発に関する報告は皆無である。

そこで、本項では、タンパク質の配向を単に制御するだけでなく、複数種のタンパク質を同時に制御する手法の開発を目指した。ここで、これまでの研究に用いたStavはビオチンとの強固な結合部位を4つ保持するホモ四量体のタンパク質であることが知られており、対称性構造を有するその性質から、実質2つのビオチン標識分子を面対称に結合することができる³。このことから、Stavはしばしばその両面にビオチン標識分子との結合を介させることでサンドイッチ法などに用いられてきた⁴。この性質と、[1-2]項で開発に成功したStav-LPとSrtAsaを用いたStavの修飾技術とを一体化することで、2種の結合様式を利用したタンパク質の配向同時固定化が可能になると考えられる。

具体的には、Stav-LPをタンパク質固定化の足場とすることで、SrtAsaを用いた連結反応でG tagを付与した目的タンパク質を、ビオチン結合能を利用してビオチンを修飾したタンパク質をそれぞれ固定化することが可能になる。本研究では、モデルとして、まず、2種類の蛍光分子の同時固定化を行った。ビオチン提示微粒子上にStav-LPを固定化し、続いてSrtAsaの働きにより、G tagを付与した赤色蛍光タンパク質(Gly5-RFP)を固定化した。次に、ビオチン粒子と結合している側とは逆のビオチン結合部位を利用して、Biotin-Fruorescein(Biotin-FITC)を固定化した。同様の固定化法を駆使して、グルコースの検出反応にも応用される⁵、GOx、HRPの2種類の酵素を微粒子上に同時に固定化した。SrtAsaを用いた連結反応ではなく、化学修飾法でGOxを固定化した場合と比較して、調製した微粒子の機能を評価し、本固定化法についてその有用性を検討した。

[1-3-2] 実験操作

[1-3-2-1] 使用した菌体、ベクター構築

Escherichia coli Nova blueを遺伝子クローニング用の宿主として用いた。Stav-LPおよびGly5-RFPの発現の宿主としては、*E. coli* BL21(DE3)を用いた。すべてのDNAの増幅にはKOD FX DNA polymerase (Takara)を用いたポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)法を適用した。増幅したDNA断片を適切な制限酵素で処理することによりベクターに導入した。本実験で作製したプラスミドおよび作製時に使用したプライマー配列、制限酵素、利用したベクターをTable 1に示した。作製したプラスミドおよびそれに関する情報はTable 1に示した。[1-1-2-2]項と同様にコンピセントセルを調製した。また、[1-1-2-3]項と同様にミニプレップ操作を行うことで、作製したプラスミドを精製した。

Table 1

Protein	vector	restrict enzyme	F) primer	R) primer
SrtAsa	pBAD	-----	*previous study [1-1]項	*
Stav-LPETG	pCold1	-----	*previous study [1-2]項	*
Gly3-GOx	PISI-EGFP	-----	*previous study [1-2]項	*
Gly5-RFP	pET-32b(+)	Kpn1/Sac1	5'-CGGGGTACCATTGAGGGTCGCGGCGGTGGAGGTGGTA GCGATTACAAGGATGACGACGATAAGAGCGACAACACCG AGGACGTCATCAAGGAGTTC-3'	5'-GAGTCCTAGCTAGCATAATCTGGAACATCATATGGATAGCTG GAGCCGGAGTGGCGGGCCTCGGCGTGCTC-3'

[1-3-2-2] タンパク質の発現・精製

Stav-LPETGおよびGly3-GOxは[1-2-2]項に記した手法と同様に発現・精製を行った。Gly5-RFPの発現に関して、得られたプラスミドはタンパク質発現の際に、BL21(DE3)株に形質転換し直した。形質転換したプレートからコロニーを5 mL LB+抗生物質(アンピシリン)培地中に播種し、試験管で37°Cで一晩培養した。次に、培養液を250 mL LB+抗生物質(アンピシリン)培地中に移し替え、 $OD_{600} = 0.5 \sim 0.7$ になるまで37°Cで振とう培養した後に、誘導剤(イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド(IPTG))を加え、タンパク質の発現を誘導した。さらに、培養温度を25°Cまで下げ、18~24 h培養後に菌体を回収した。菌体を超音波で破碎した後に、菌体内上清画分を回収し、TALON® Metal Affinity Resinを用いて目的タンパク質を吸着させた。吸着したタンパク質をイミダゾールで溶出後、得られた画分をSDS-PAGE分析することによって、目的タンパク質の有無を判断した。また、タンパク質溶液中に含まれるイミダゾールはリン酸緩衝液中で透析することによって除去し、目的タンパク質を得た。尚、タンパク質の濃度はBCA法により決定した。

[1-3-2-3] StavとSrtAsaを用いたタンパク質同時固定化微粒子の調製

固定化担体として、ビオチン修飾微粒子(0.5 % w/v、3.3 μ m、Spherotech inc.)を選択した。本微粒子は1 mgに対して最大でおよそ2.50 μ gのAvidin-FITCが結合可能である⁶。ビオチン修飾ポリスチレン粒子(500 μ g)とStav(or Stav-LP)(5.5 μ M)を室温で30 minマイクロチューブミキサーを用いて混合した。PBSで数回粒子を洗浄した後、蒸留水(20 μ l)に懸濁した。得られたStav修飾微粒子とGly5-RFP(0.65 μ M)との連結反応は20 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5, 0.5 mM 塩化カルシウムを含む)中でSrtAsa (2.1 μ M)を加えて開始した。37 °Cで2時間反応後、遠心分離操作を行うことにより、粒子を回収し、PBSで数回粒子を洗浄した後、蒸留水(20 μ L)に再懸濁した。Biotin-FITC(55 μ M)と得られた粒子を室温で30 minマイクロミキサーチューブを用いて混合した。遠心分離操作を行うことにより、粒子を回収し、PBSで数回粒子を洗浄した後、PBS(20 μ L)に再懸濁した。得られた粒子を蛍光顕微鏡で観察し、固定化反応について検討した。同様に、Gly3-GOx(0.65 μ M)、Biotin-HRP(5.5 μ M)をビオチン修飾ポリスチレン粒子(500 μ g)に固定化し、酵素同時固定化微粒子を調整した。

[1-3-2-4] 化学修飾法を用いたタンパク質同時固定化微粒子の調製

ビオチン修飾ポリスチレン粒子(500 μ g)とStav(or Stav-LP)(5.5 μ M)を室温で30 minマイクロチューブミキサーを用いて混合した。PBSで数回粒子を洗浄した後、蒸留

水 (20 μ l) に懸濁した。得られたStav修飾微粒子とGly3-GOx (0.65 μ M) との架橋反応は 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中でEDC (0.2 M) とNHS (0.05 M) を加えて開始した。室温で2時間反応後、遠心分離操作を行うことにより、粒子を回収し、PBSで数回粒子を洗浄した後、蒸留水 (20 μ l) に再懸濁した。Biotin-HRP (5.5 μ M) と得られた粒子を室温で30 minマイクロミキサーチューブを用いて混合した。遠心分離操作を行うことにより、粒子を回収し、PBSで数回粒子を洗浄した後、PBS (20 μ L) に再懸濁した。

[1-3-2-5] 酵素同時固定化微粒子におけるGOx活性の評価

グルコース溶液 (50 mM, 100 μ L) を調整した微粒子とマイクロミキサーチューブで1 min混合した後、遠心分離操作を行い、微粒子を取り除いた。得られた上清に含まれるグルコース濃度を高速液体クロマトグラフィー (Shim-pack SPR-Pbカラム、島津、京都) で分析した。また、グルコースはRID-10A refractive index detectorで検出した⁷。

[1-3-2-6] 酵素同時固定化微粒子におけるHRP活性の評価

ELISA TMB溶液 (100 μ l, 過酸化水素0.002 vol %含む) を調整した微粒子とマイクロミキサーチューブで1 min混合した後、遠心分離操作を行い、微粒子を取り除いた。得られた上清に反応停止液を加え、マイクロプレートリーダーで450 nmの吸光度を測定した。

[1-3-2-7] 酵素同時固定化微粒子の機能解析

グルコース溶液 (適当な濃度, 100 μ L) とELISA TMB溶液 (100 μ L) を調整した微粒子とマイクロミキサーチューブで1 min混合した後、遠心分離操作を行い、微粒子を取り除いた。上清に反応停止液を加え、450 nmの吸光度を測定した。

[1-3-3] 実験結果および考察

[1-3-3-1] 微粒子上への蛍光タンパク質の同時固定化

Figure 1に示すように、ポリスチレンビーズ上に2種類の蛍光分子を固定化することで、本固定化法を実践した。まず、ビオチンで標識したポリスチレンビーズにStav-LPを固定化した。その後、SrtAsaを用いた反応によって、Gly5-RFPをStav-LPに連結した。ここで、Stavは四量体からなるタンパク質であり、ビオチン結合部位が単量体につき1つ存在し、Figure 1に示すように、それぞれの側面に2つずつビオチン結合部位を持つ⁸。そのため、しばしばタンパク質や小分子固定化におけるスペーサーとして用いられる⁴。この特性を活かして、ポリスチレンビーズとの結合部位とは逆の、余剰のビオチン結合部位をターゲットにBiotin-FITCを結合させた。蛍光顕微鏡での観察結果より(Figure 2A)、本手法により得られた微粒子は赤(RFP)、緑(FITC)両方の蛍光が観測された。また、LP tagを付与していないStavについても同様に実験を行ったところ、緑(FITC)の蛍光のみしか観測することができなかった(Figure 2B)。更に、微粒子とBiotin-FITCを混合しただけでは、何れの蛍光も観測することができなかった(Figure 2C)。以上の結果より、Stavをタンパク質固定化の足場として捉えることで、SrtAsaによる修飾反応・ビオチン結合能を利用し、微粒子上に2種類の蛍光分子を固定化することに成功したことが確認できた。次項では、本技術を用いることでGOxおよびHRPの2種類の酵素を同時に固定化し、その機能について解析することで本技術の汎用性を示した。

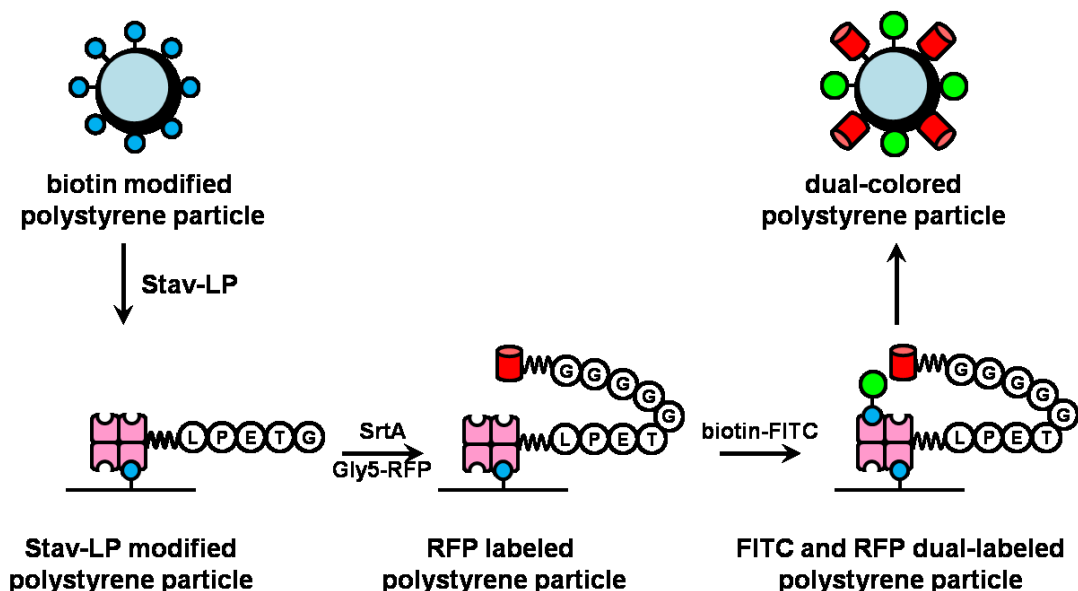


Figure 1. Schematic illustration of SrtAsa-catalyzed site-specific coimmobilization of fluorescent molecules on microparticles using Stav-LP.

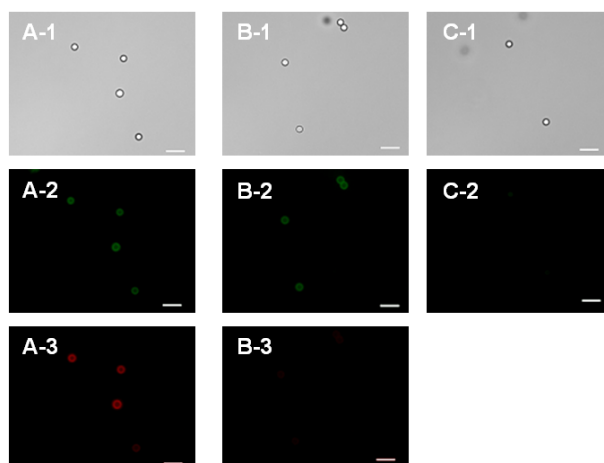


Figure 2. Fluorescence imaging of RFP and FITC coimmobilized microparticles. Panels A-1, A-2, and A3 show reaction of particles with Gly5-RFP, biotin-FITC, and SrtAsa and Stav-LP. Panels B-1, B-2 and B-3 show reaction of particles with Gly5-RFP, biotin-FITC, and SrtA and Stav without the LP tag. Panel C-1 and C-2 show reaction of particles with biotin-FITC (scale bars 10 μ m).

[1-3-3-2] 微粒子上への酵素の同時固定化

より複雑なシステムを有するタンパク質複合ナノデバイスを開発する上では、複数種の酵素の配向を制御するような高度な固定化技術が必要になる。ここでは、GOx、HRPの2種類の酵素を微粒子上に同時に固定化することで、その機能について検討した。GOxはグルコースを酸化し、グルコン酸と過酸化水素を生成する⁹。また、HRPは過酸化水素存在化で、TMBなどの基質を還元する働きを触媒する¹⁰。本実験では、前項の手法と同様に、Stavを足場として、Gly3-GOxおよびBiotin-HRPを同時固定化したビーズ、およびGly3-GOxをEDC/NHSを用いた化学修飾法で固定化した後に、Biotin-HRPを固定化したビーズについて、GOx、HRPの活性をそれぞれ評価した。Figure 3AにはGOx活性、BにはHRP活性を示した。それぞれの酵素活性において、SrtAを用いて調製したビーズの方が化学修飾法で調製したビーズと比較して高い活性を示した。さらに、DyLight 350 maleimide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)で標識したGly3-GOxを用いて、同様にSrtAsaおよび化学修飾法を用いて、微粒子上に固定化反応を行い、GOxの固定化量について検討した。SrtAsaを用いて同時固定化を行った場合、化学修飾法を用いた場合と比較して、GOx活性が高く検出されたにもかかわらず、GOxの固定化度合 (DyLight 350の蛍光)はSrtAsaを用いた場合の方が低い値を示した(化学修飾法を用いて調製した場合に対しておよそ40 %程度)。このことから、化学修飾法に伴うランダム固定が酵素活性に影響を与えてしまったということが見受けられ、本同時固定化法における有用性が示唆された。

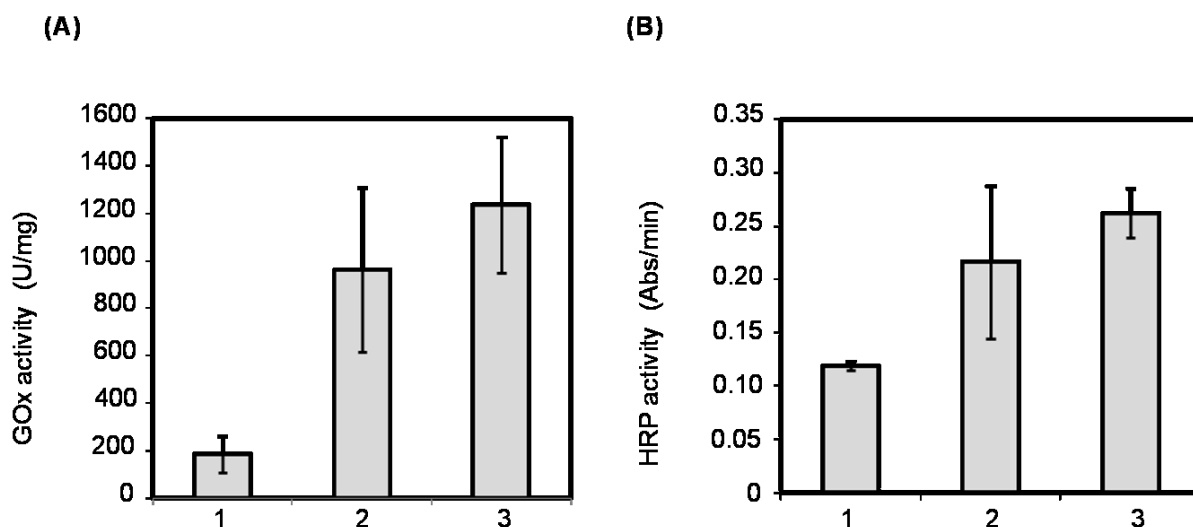


Figure 3. (A) GOx activity of microparticles prepared using only modified Stav (column 1), chemical modification (column 2), or SrtAsa (column 3). (B) HRP activity of microparticles prepared using only modified Stav (column 1), chemical modification (column 2), or SrtAsa (column 3).

[1-3-3-2] 酵素同時固定化微粒子を用いたグルコースの検出反応

今回モデルとして選択したGOx、HRPはFigure 4に模式図を示すように、二段階の連続した反応から、溶液中のグルコースを検出するような反応にしばしば用いられる⁵。そこで、微粒子を用いたグルコースの検出反応についても検討を行った。Figure 4にそれぞれの粒子を用いて、溶液中のグルコースの検出反応をについて検討を行った結果を示す。酵素固定化微粒子を調製する際、何れかの要素を欠損させた場合に得られた粒子(Column 1-4)ではグルコースを検出することができなかったが、Column 6ではグルコースの検出シグナルが観測できたことから、本技術によって、2種類の酵素が部位特異的かつ同時に固定化されていることが示唆された。更に、化学修飾法を用いて調製した酵素同時固定化微粒子と比較した場合、3倍近い検出シグナルが観測されたことから、本技術が酵素の機能を高い状態で維持しつつ固定化することが可能であることが伺える。

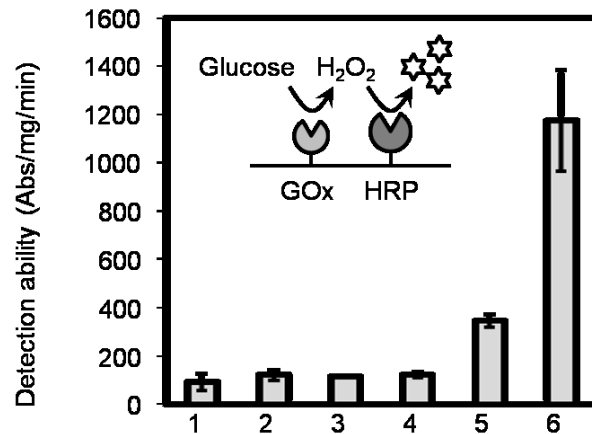


Figure 4. Demonstration of site-specific co-immobilization of GOx and HRP. Successful co-immobilization was demonstrated by detection of glucose (Vertical scale = detectable signal (absorbance at 450 nm) / microparticle amount (mg) / reaction time (min)). Column 1 = blank particles, containing only Stav-LP. Column 2 = particles containing only Gly3-GOx, Stav-LP and SrtAsa. Column 3 = particles containing Gly3-GOx, biotin-HRP and Stav-LP. Column 4 = particles containing Gly3-GOx, biotin-HRP, Stav without LP tag, and SrtAsa. Column 5 = particles containing Gly3-GOx, biotin-HRP, Stav-LP, prepared using chemical modification with EDC and NHS. Column 6 = particles containing Gly3-GOx, biotin-HRP, Stav-LP and SrtAsa.

次に、微粒子の検出感度および繰り返し利用性について検討を行った。化学修飾法ではほとんどシグナルが検出されなかったのに対して、本技術を用いて調製した微粒子は10 mMのグルコース溶液に対してもシグナルを検出することができた (Figure 5A)。また、繰り返し利用性について検討を行った結果をFigure 5Bに示した。最初の3回の利用で検出感度が大きく低下してしまったが、本技術を用いて調製した微粒子は、化学修飾法を用いて調製したものと比較しても高い検出感度で、概ね10回程度利用することができた。

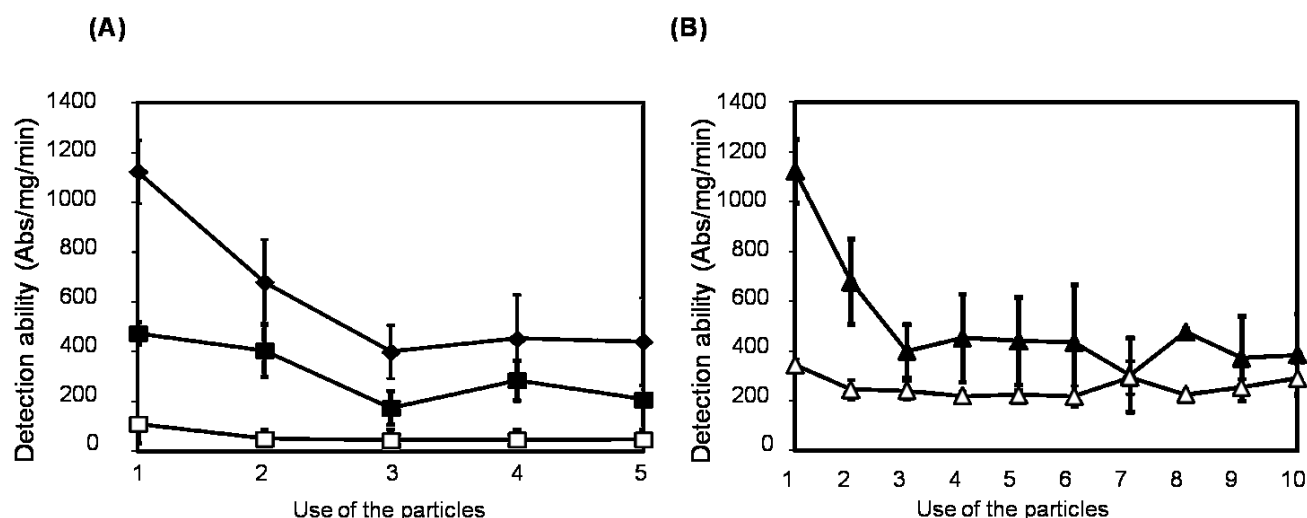


Figure 5. (A) Demonstration of microparticle sensitivity for glucose. Microparticles were reacted with 0 mM glucose (open squares), 10 mM glucose (closed squares), and 50 mM glucose (closed diamonds). (B) Demonstration of microparticle reusability. Microparticles prepared using chemical modification (open triangles) or SrtA modification (closed triangles).

[1-3-4] 結言

Stav を足場として捉えることで、二種類のタンパク質を同時かつ部位特異的に固定化することのできる技術の開発に成功した。まず、RFP および FITC の 2 種類の蛍光分子を微粒子上に固定化することに成功した。更に、GOx および HRP の 2 種類の酵素も同様に固定化することに成功した。SrtAsa を用いたタンパク質修飾技術に基づく本固定化法は、化学修飾法と比較して、酵素の機能を高い状態で維持したまま固定化することが可能であった。更に、実際に調製した微粒子を用いて、溶液中のグルコースの検出反応に利用したところ、同様に、化学修飾法で調製した微粒子と比較して、優れたグルコース検出機能を保持していた。本技術のさらなる応用が、今後より複雑な酵素や抗体を用いたセンサー、機能性微粒子などの発展に寄与するものと期待できる。

[1-3-5] 参考文献

1. D'Souza SF., Immobilization and stabilization of biomaterials for biosensor applications., *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2001**, 96, 225-238.
2. Liese, A., Hilterhaus, L., Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications., *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6236-6249.

3. Hyre, D. E., Le Trong, I., Merritt, E. A., Eccleston, J. F., Green, N. M., Stenkamp, R. E., Stayton, P. S., Cooperative hydrogen bond interactions in the streptavidin-biotin system., *Protein. Sci.* **2006**, 15, 459-467.
4. Vork, M. M., Glatz, J. F., Surtel, D. A., Knubben, H. J., Van der Vusse, G. J., A sandwich enzyme linked immuno-sorbent assay for the determination of rat heart fatty acid-binding protein using the streptavidin-biotin system. Application to tissue and effluent samples from normoxic rat heart perfusion., *Biochim. Biophys. Acta.* **1991**, 1075, 199-205.
5. Okuda, J., Miwa, I., Maeda, K., Tokui, K., Rapid and sensitive, colorimetric determination of the anomers of D-glucose with D-glucose oxidase, peroxidase, and mutarotase., *Carbohydr. Res.* **1977**, 58, 267-270.
6. http://www.sphero-tech.com/coa_pol_par.htm.
7. Yamakawa, S., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A., Repeated batch fermentation from raw starch using a maltose transporter and amylase expressing diploid yeast strain., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 87, 109-115.
8. Green, N. M., Avidin and Streptavidin., *Methods. Enzymol.*, **1990**, 184, 51-67.
9. Leskovic, V., Trivić, S., Wohlfahrt, G., Kandrak, J., Pericin, D., Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors., *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2005**, 37, 731-750.
10. Ryan, O., Smyth, M. R., Fágáin, C. O., Horseradish peroxidase: the analyst's friend., *Essays Biochem.* **1994**, 28, 129-146.

第2章 SortaseA を用いたタンパク質修飾技術の応用

[2-0] 緒言

第1章では、SortaseAを用いることでタンパク質を配向固定化する技術の開発に成功した。固定化されるタンパク質の配向性を整えることで、タンパク質の機能を保持したまま固定化することができ、タンパク質複合デバイスとして組み立てた場合の性能向上が期待できる。本章では、固定化酵素やバイオ燃料電池といった、本研究室で主題としているところの、「バイオマスからの有用物質やエネルギー生産」を指向したタンパク質複合デバイスに着目した。これらの固定化酵素やバイオ燃料電池の性能向上には、固定化された酵素の配向性が影響するところが大きいと考えられているが、一般的に、固定化酵素やバイオ燃料電池などの性能を向上させたい場合、酵素自体の活性を向上させたり、酵素の吸着量を向上させたりするアプローチを用いることがほとんどである。

そこで、まず、セルロース分解酵素であるセルラーゼに着目し、これらを実際に、SortaseAを用いた配向固定化技術を駆使することにより固定化し、固定化酵素としての性能について検討を行った。[2-1]項において、エンドグルカナーゼ、ベータグルコシダーゼといったセルラーゼを個々に固定化した場合に、酵素の配向性の与える影響について検討した。また、エンドグルカナーゼやベータグルコシダーゼといったセルラーゼは互いが近傍に集積することで、セルロースの分解活性が向上することが知られていることから、Stavを足場としたタンパク質同時固定化法を適用することで、各セルラーゼを個別に固定化した場合よりも固定化酵素としての性能向上が期待できると考えた。そこで、[2-2]項において、[1-3]項において開発に成功したタンパク質同時固定化技術を利用して、人工セルロソームを構築するための検討を行った。

[2-3]、[2-4]項においては、バイオ燃料電池とよばれるタンパク質複合デバイスに着目した。まず、固定化する酵素の新しい組み合わせを提案することで、利用可能な燃料の多様化およびグルコース1分子あたりからとれる電流値の増加を目指した。具体的には、[2-3]項において、デンプンをグルコースに分解する糖化酵素であるアミラーゼおよびグルコース酸化酵素を同時に電極上に固定化することで、デンプンを直接酸化することのできる電極を開発した。また、[2-4]項において、グルコース脱水素酵素およびグルコン酸脱水素酵素を同時に電極に固定化することで、グルコースの2段階酸化が可能な電極を開発した。しかしながら、多種類の酵素を同時に固定化するようなこれらの電極では、それぞれの酵素の固定化配向が性能に非常に大きく影響すると考えら、本論文において着目しているSortaseAを用いることで、電極上に酵素を配向固定化するための手法が有効であるかについても考察した。

[2-1] セルラーゼ配向固定化微粒子を用いたセルロースの効率的な分解

[2-1-1] 緒言

セルロースは、地球上に最も多く存在するバイオマス資源の一つであり、グルコースが直鎖状につながった多糖で、植物によって二酸化炭素と水から光合成によって作り出されるので再生可能な生物資源として注目されている¹⁻³。セルロースを分解して得られるグルコースは、微生物を用いたバイオプロセスにより、液体燃料やプラスチック原料に変換することが可能であるので^{1,2}、セルロースをいかに低エネルギーかつ低コストでグルコースにまで分解(糖化)できるかが、セルロースを有効利用するための重要な要素となる。その中でも、セルラーゼと呼ばれる酵素を用いた糖化プロセスは、有効な手段の一つである。セルロースは大きく分けると、基質特異性の異なる3種類のセルラーゼによってグルコースまで分解される。エンドグルカナーゼ(EG)はセルロースの主に非晶領域をランダムに切断する。セロビオハイドロラーゼ(CBH)はセルロースの還元末端、非還元末端からセロビオースを遊離し、 β グルコシダーゼ(BGL)はセロビオースあるいはセロオリゴ糖をグルコースまで分解する反応を触媒する⁶⁻⁸。ここで、セルラーゼなどの酵素は熱やpHなどの外的要因に弱く、安定性が低いため、安定性や再利用性を向上させる必要がある。そこで、酵素をポリスチレンやシリカなどの微粒子に固定化した固定化酵素は、酵素自体の安定性を向上させ、また、酵素の再利用が可能という点から非常に有効な戦略の一つである⁹。

本項では、SrtAを用いた酵素固定化方法を用いることで、セルラーゼを配向固定化した微粒子を調製した。SrtAsaを用いた手法を応用し、EG(またはBGL)の固定化配向を制御することで、通常の化学修飾法で固定化セルラーゼを調製する場合よりも、優れた糖化能力を保持した固定化セルラーゼの調製を試みた。トリグリシンを修飾したポリスチレン微粒子およびシリカ微粒子に対して、SrtAsaを利用して、LP tagをC末端に付与した *Thermobifida fusca*由来のEG(EG-LP)およびBGL(BGL-LP)を配向固定化した。化学修飾法によりEG-LP(BGL-LP)を微粒子上に固定化した場合に対して、それぞれのセルラーゼ活性を測定することで、配向固定化の有用性について考察した。

[2-1-2] 実験操作

[2-1-2-1] 使用した菌体、ベクター構築

Escherichia coli Nova blueを遺伝子クローニング用の宿主として用いた。タンパク質発現の宿主としては、*E. coli* BL21(DE3)を用いた。すべてのDNAの増幅にはKOD plus(Takara)を用いたポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)法を適用した。増幅したDNA断片を適切な制限酵素で処理することによりベクターに導入した。本実験で作製したプラスミドおよび作製時に使用したプライマー配列、制限酵素、利用したベクターをTable 1に示した。作製したプラスミドおよびそれに関する情報はTable 1に示した。

[2-1-2-2] タンパク質の発現・精製

EG-LPおよびBGL-LPの発現に関して、得られたプラスミドはタンパク質発現の際に、BL21(DE3)株に形質転換し直した。形質転換したプレートからコロニーを5 mL LB+抗生物質(アンピシリン)培地中に播種し、試験管で37°Cで一晩培養した。次に、培養液を250 mL LB+抗生物質(アンピシリン)培地中に移し替え、OD₆₀₀ = 0.5~0.7になるまで37°Cで振とう培養した後に、誘導剤(イソプロピル-β -チオガラクトピラノシド(IPTG))を加え、タンパク質の発現を誘導した。さらに、培養温度を15°Cまで下げ、18~24 h培養後に菌体を回収した。菌体を超音波で破碎した後に、菌体内上清画分を回収し、TALON® Metal Affinity Resinを用いて目的タンパク質を吸着させた。吸着したタンパク質をイミダゾールで溶出後、得られた画分をSDS-PAGE分析することによって、目的タンパク質の有無を判断した。また、タンパク質溶液中に含まれるイミダゾールはリン酸緩衝液中で透析することによって除去し、目的タンパク質を得た。尚、タンパク質の濃度はBCA法により決定した。

Table 1

Protein	vector	restrict enzyme	F) primer	R) primer
SrtAsa	pBAD	-----	*previous study [1-1]項	*
EG-LP	pCold2	Nde1/Hind3	5'-CATCATCATCATATGGATTCTCCGTTCTAC-3'	5'-CAGGTCGACAAGCTTTCAGCCACCAGTTTCCGGCAGGCTGGC GGCGCAGGt-3'
BGL-LP	pCold2	Sac1/EcoR1	5'-CGAGCTCGTGACCTCGCAATCGACGACT-3'	5'-CCGGAATTCCTAGCCACCAGTTTCCGGCAGTTCCTGTCCGAA -3'

[2-1-2-2] トリグリシン修飾微粒子の調整

1.5 mlマイクロチューブにFmoc-GGG 3 mgを量りとり、500 μ LのDMFへ溶解させた。EDC(0.0384 g)とNHS(0.0123 g)を加え、マイクロチューブミキサーを用いて室温にて20 min反応させた。1.5 mlマイクロチューブにNH₂ポリスチレン粒子(またはシリカ粒子)を5 mg量りとり、遠心分離操作を行い、上清を廃棄した。0.1 M MES buffer中に懸濁し、ビーズを数回洗浄した後、0.1M MES buffer 500 μ L中に再懸濁し、ビーズを分散させた。Fmoc-GGGを溶解したDMFとビーズ分散液を、マイクロチューブミキサーを用いて、室温でおよそ2時間混合した。得られた微粒子は0.1 M MES buffer中に懸濁し、ビーズを数回洗浄した後、0.1M MES buffer 500 μ L中に再懸濁し、ビーズを分散させた。粒子へのFmoc基の導入はカイザー試薬を用いて確認した。次に、Fmoc基を導入した粒子に50 % piperidine(in water, 1 mL) を添加し、マイクロチューブミキサーを使用し、室温にて2~10時間反応させた。蒸留水で粒子を数回洗浄した後、200 μ Lの蒸留水に分散させ、4 °Cで保存した。Fmoc基の切断はカイザー試薬を用いて確認した。

[2-1-2-3] SrtAを用いたトリグリシン修飾微粒子への酵素固定化

酵素溶液(EG-LP or BGL-LP 100 μ g)、トリグリシン修飾微粒子(1 mg)、SrtA(20 μ g)を20 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5, 0.5 mM塩化カルシウムを含む)中で混合することにより連結反応を開始した。室温で一晩反応させた後、未結合の酵素を取り除くため、Tween 20 bufferを用いて粒子を数回洗浄した後、タンパク質保存buffer 100 μ L中に懸濁し、4 °Cで保存した。

[2-1-2-4] 化学修飾法を用いたカルボキシル基修飾微粒子への酵素固定化

1.5 mlマイクロチューブへカルボキシル基修飾微粒子を1 mg量り取り、0.1 M MES buffer 500 μ Lに懸濁し、粒子を分散させた。分散液にEDC(0.0384 g)およびNHS(0.0123 g)を加え、マイクロチューブミキサーを用いて室温で2時間程度混合した。蒸留水で粒子を洗浄後、タンパク質保存buffer 50 μ L中に粒子を懸濁し、続いて酵素溶液(EG-LP or BGL-LP 100 μ g)を添加した。マイクロチューブミキサーを用いて室温で2時間混合した後、未結合の酵素を取り除くため、Tween 20 bufferを用いて粒子を数回洗浄した後、タンパク質保存 buffer 100 μ L中に懸濁し、4 °Cで保存した。

[2-1-2-5] BGL活性の測定

下記組成で反応液を調整し、37 °Cで1時間マイクロチューブミキサーを用いて

反応させた。遠心分離操作を行い、上清を回収した。反応停止液(3 M炭酸ナトリウム溶液500 μ l)を加え、反応を終了した。吸光光度計を用いて、400 nmの吸光度を測定した。

[反応液組成]

BGL固定化粒子	425 μ l
1 M酢酸ナトリウム(pH 5)	25 μ l
10 mM pNPG溶液	50 μ l

[2-1-2-6] EG活性の測定

下記組成で反応液を調整し、37 $^{\circ}$ Cで24時間マイクロチューブミキサーを用いて反応させた。遠心分離操作を行い、上清を回収した。上清150 μ LとDNS試薬100 μ Lを混合し、100 $^{\circ}$ Cで5 minインキュベートした。反応液を氷上で冷却した後、吸光光度計を用いて、540 nmの吸光度を測定した。

[反応液組成]

EG固定化粒子	300 μ l
1 M リン酸buffer(pH 7)	50 μ l
10 g L ⁻¹ カルボキシメチルセルロース溶液	650 μ l

[2-1-3] 実験結果および考察

[2-1-3-1] Sortase Aを用いたセルラーゼ配向固定化微粒子の調製

シリカ粒子などにセルラーゼを固定化した固定化セルラーゼに関する研究は多数報告されているが¹⁰、そのほとんどが化学修飾法や多孔質粒子への物理吸着により調製されたものであり、本論文の主題である配向固定化を適用した例はほとんどない。そこで、本項ではまず、SrtAsaを用いてセルラーゼを配向固定化することで固定化酵素の性能が向上するかどうかを検討した。SrtAsaを用いた固定化手法を適用するにあたって、LP tagをC末端に導入した変異型セルラーゼの調製が必要になる。そこで、固定化するセルラーゼとして、遺伝子組換え大腸菌を用いて活性状態での可溶化発現が可能である*Thermobifida fusca* YX由来のエンドグルカナーゼ(EG-LP)およびベータグルコシダーゼ(BGL-LP)を選択した¹¹。また、ポリスチレンおよびシリカ粒子を固定化担体として選択した。Figure 1に示すように、Fmoc法を利用してトリグリシンを修飾した微粒子を調製した後、SrtAsaを用いてEG-LPおよびBGL-LPを固定化した(SrtAsa修飾)。また、比較対象として、NHS修飾微粒子を用いてEG-LPおよびBGL-LPを固定化したものについても検討を行った(化学修飾)。

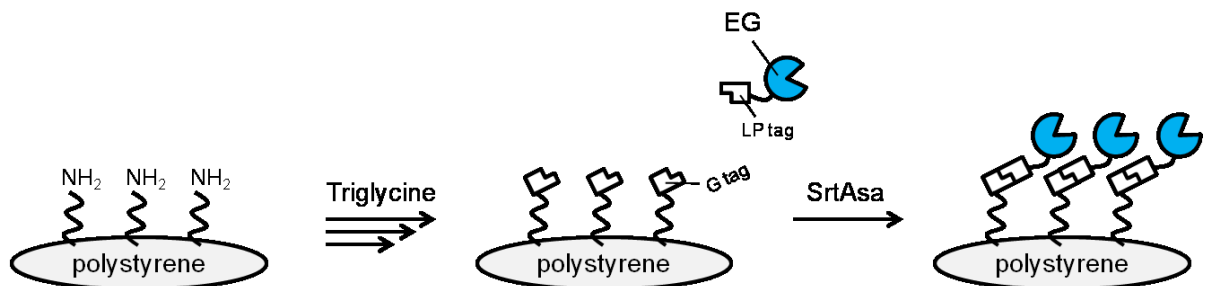


Figure 1. Schematic illustration of site-specific immobilization of EG-LP on polystyrene particles

実際に、固定化反応を行う際、初期の反応仕込み酵素量を統一することで、SrtAsa修飾・化学修飾で固定化できる酵素量をそれぞれ検討した。Figure 2にその結果を示す。Figure 2Aよりポリスチレン微粒子シリカ微粒子を固定化担体として用いた場合のどちらでも、化学修飾法・SrtAsa修飾法といった固定化手法によって、BGL-LPが固定化される量に大きく差は見られなかった。しかしながら、Figure 2Bの結果に着目すると、EG-LPについてはSrtAsa修飾と比較して化学修飾を用いた場合の方が、固定化量が大きくなった。SrtAsa修飾がC末端特異的にEG-LPを単一の配向で固定化するのに対して、化学修飾ではEG-LPの側鎖に存在するアミノ基のうちのいくつかが固定化反応に寄与していると考えられ、固定化配向は統一されていない。今回のように、EG-LPを固定化する

場合は、C末端特異的に単一配向で固定化するよりも、アミノ基特異的にランダム配向で固定化した場合の方が、空間的優位が生じたことが原因の一つだと考えられる。また、シリカ微粒子を用いた場合に (Figure 2 blue column)、SrtAsaを作用させていない場合においてもBGL-LPやEG-LPの固定化がみられるのは、本実験で用いたシリカ微粒子が孔質を伴うものであることに起因していると考えられる。

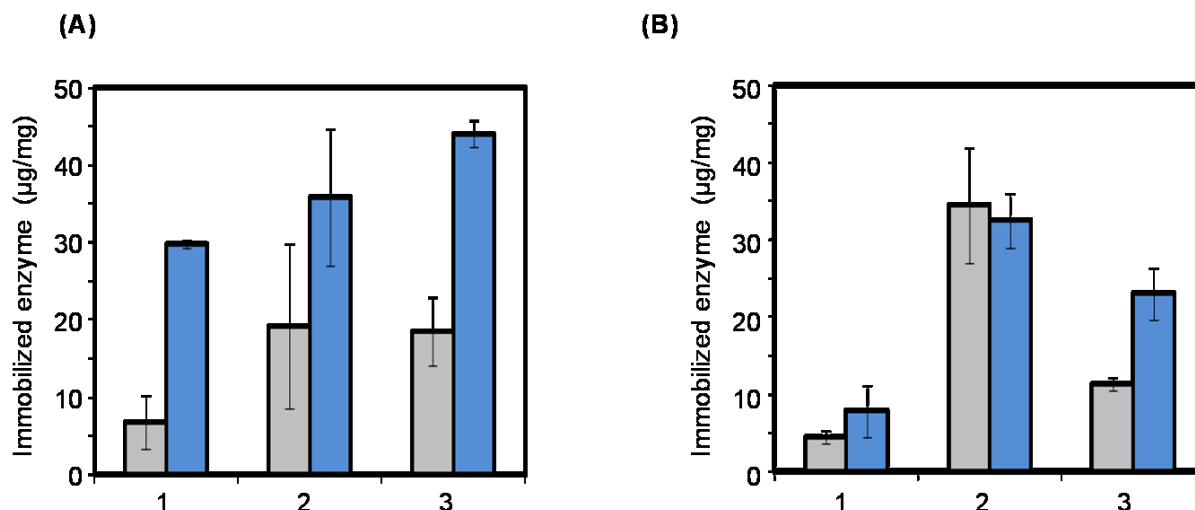


Figure 2. The amount of immobilized (A) BGL-LP and (B) EG-LP per 1 mg of particles. Column 1 = immobilized cellulase prepared without SrtAsa; Column 2 = immobilized cellulase prepared by chemical modification; Column 3 = immobilized cellulase prepared by SrtAsa modification. (Gray column show immobilized cellulase on polystyrene particles, blue column show immobilized cellulase on silica porous particles.)

[2-1-3-2] セルラーゼ配向固定化粒子の機能評価

それぞれ調製した微粒子の酵素活性について、微粒子を回収・洗浄することで繰り返し利用性について評価した。ベータグルコシダーゼはセロビオースやセロトリオースなどのセロオリゴ糖を加水分解する酵素であり、基質として4-ニトロフェニルβ-D-ガラクトピラノシド (pNPG) を用いることで、加水分解されたp-ニトロフェノールの吸収から酵素活性を評価することができる。pNPGを基質に、調製した微粒子と37 °Cでマイクロチューブミキサーを用いて1 h反応させた結果をFigure 3に示した。ポリスチレンを担体として用いた場合 (Figure 3A)、化学修飾で調製した微粒子ではほとんどBGL活性がみられなかった。SrtAsa修飾で調製した微粒子では高いBGL活性がみられた点、Figure 2Aの結果から固定化されているBGL-LPの量はほとんど同じであるという点からポリスチレン粒子にBGL-LPを固定化する際はその配向が非常に重要であると考えられる。また、シリカを担体とした場合は、SrtAsa修飾で調製した微粒子が最も高い活性を示したものの、ポリスチレンを担体として用いた場合ほど、化学修飾で調製した微粒子とは大きな差はみら

れなかった。この原因としては、シリカ粒子が孔質を伴うため、孔質内に物理吸着しているBGL-LPが寄与するBGL活性の影響が大きく、粒子表面へ修飾したBGL-LPの影響が少ないことなどが原因と考えられる。

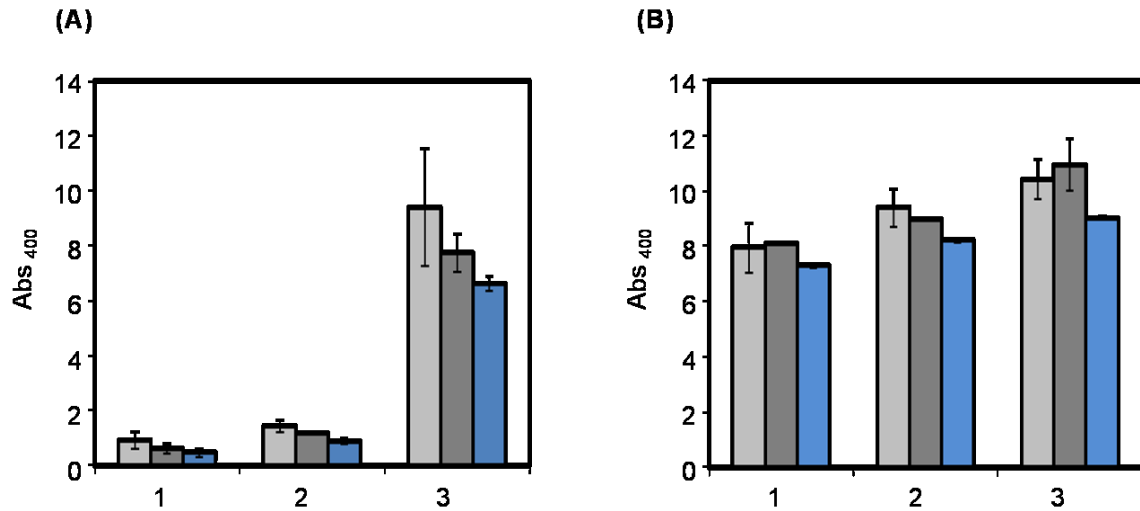


Figure 3. (A) Beta-glucosidase activity of BGL-LP immobilized polystyrene particles. (B) Beta-glucosidase activity of BGL-LP immobilized silica porous particles. Column 1 = immobilized cellulase prepared without SrtAsa; Column 2 = immobilized cellulase prepared by chemical modification; Column 3 = immobilized cellulase prepared by SrtAsa modification. (Gray column = first time, dark gray column = second time, blue column = third time)

EG-LP固定化微粒子についても同様に検討を行った。エンドグルカナーゼはセルロースに対して、結晶部分の低い領域をランダムに切断していく反応を触媒する酵素であり、エンドグルカナーゼの活性評価を行う際は、モデル基質として可溶性のセルロースであるカルボキシメチルセルロース(CMC)がしばしば用いられる。3,5-ジニトロサリチル酸を用いた手法(DNS法)を利用して¹²、エンドグルカナーゼによるCMC分解の際に生じる還元糖の総量を定量することで、各々の微粒子のCMCase活性を評価した(Figure 4)。ポリスチレンを担体として用いると(Figure 4A)、BGL-LPを固定化した場合と同様に、SrtAsa修飾により調製した微粒子が最も高いCMCase活性を示した。固定化量の影響を考慮すると、化学修飾により調製した微粒子の方がより多くのEG-LPが固定化されているにもかかわらず、SrtAsa修飾により調製した微粒子の方が、化学修飾により調製した微粒子より高いCMCase活性を示した。シリカ粒子を用いた場合においても(Figure 4B)同様に、化学修飾により調製した微粒子の方がより多くのEG-LPが固定化されているにもかかわらず、SrtAsa修飾により調製した微粒子の方が、化学修飾により調製した微粒子より高いCMCase活性を示したことから、EG-LPを固定化する場合においても、その固

固定化配向が酵素活性に非常に大きく寄与していることが示唆された。酵素の配向制御が、固定化セルラーゼの性能向上につながることを示されたので、実際に、SrtAsa修飾を用いて調製したセルラーゼ固定化微粒子を用いて、結晶性のセルロースの分解について、検討を行った。

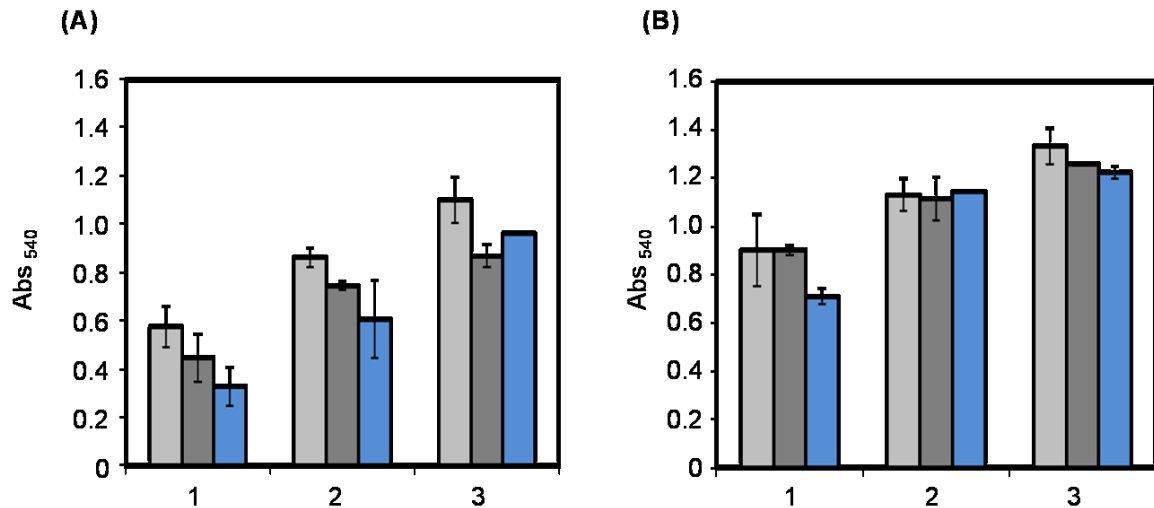


Figure 4. (A) CMCase activity of EG-LP immobilized polystyrene particles. (B) CMCase activity of EG-LP immobilized silica porous particles. Column 1 = immobilized cellulase prepared without SrtAsa; Column 2 = immobilized cellulase prepared by chemical modification; Column 3 = immobilized cellulase prepared by SrtAsa modification. (Gray column = first time, dark gray column = second time, blue column = third time)

[2-1-3-3] セルラーゼ配向固定化粒子を用いた結晶セルロースの分解

それぞれ調製した微粒子を用いて、結晶セルロースの分解について検討を行った。セルロースはエンドグルカナーゼによってセロオリゴ糖へ、生じたセロオリゴ糖はベータグルコシダーゼによってグルコースまで分解されるので、本項では、BGL-LP固定化微粒子、EGL-LP固定化微粒子をそれぞれ1:1の割合で用い、結晶セルロース(Avicel)を分解した。分解により生じたグルコース濃度を、グルコース濃度測定キットを用いて測定した。Figure 5に示した結果から、非固定化セルラーゼに比べて、固定化セルラーゼを用いたどの場合においても、グルコース生産量が高いことが確認できた。その中でも、やはり化学修飾で調製した微粒子と比較すると、SrtA修飾で調製した微粒子の方が効率よくAvicelを分解していることが分かる。また、機能評価の結果からも予測できたように、ポリスチレン微粒子を用いた場合よりも、シリカ微粒子を用いた場合の方が効率よくAvicelを分解することができた。

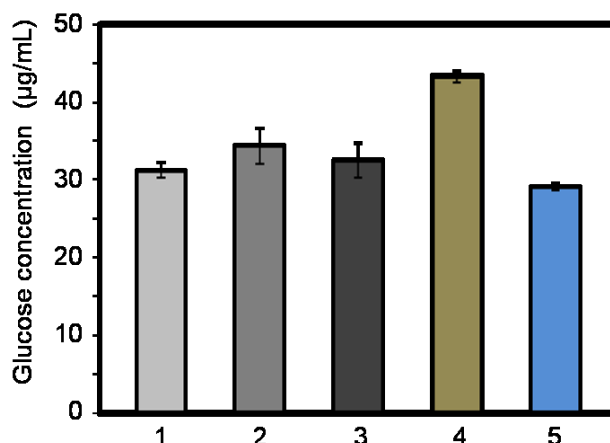


Figure 5. Enzymatic Degradation of Avicel using EG-LP immobilized polystyrene particles and BGL-LP immobilized polystyrene particles prepared by chemical modification (column1), using EG-LP immobilized polystyrene particles and BGL-LP immobilized particles polystyrene prepared by SrtAsa modification (column2), using EG-LP immobilized silica porous particles and BGL-LP immobilized silica porous particles prepared by chemical modification (column3), using EG-LP immobilized silica porous particles and BGL-LP immobilized silica porous particles prepared by SrtAsa modification (column 4), using free cellulase (column 5).

[2-1-4] 結言

SrtAsaを用いた酵素固定化法により、BGL-LPおよびEG-LPの配向を制御して、ポリスチレンまたはシリカ微粒子上に固定化することに成功した。本固定化法の適用により、化学修飾法を適用した場合に比べて、固定化セルラーゼにおけるベータグルコシダーゼ活性、CMCase活性を高い状態で維持できることが示された。また、結晶セルロースの分解においても、固定化配向の制御が分解効率の促進につながることを示唆された。

しかしながら、本項ではFigure 1の模式図に示すように、SrtAsaを用いたC末端特異的なセルラーゼの固定化にのみ焦点を当てており、固定化配向のパターンや固定化担体における固定化酵素の密度などによる影響に関する知見は得られていない。化学修飾法を適用した場合による配向ランダムな固定化法と比較すると、C末端特異的な固定化を可能にする本技術の有利性は示されたが、セルラーゼ活性や実際のセルラーゼ分解能に関して、劇的な向上は確認できなかった。更に、効率的にセルロースを分解できるような固定化セルラーゼの開発を行うためには、固定化酵素量の向上と酵素の配向制御の両立など、多角的な方面からの検討が必要になると考える。

[2-1-5] 参考文献

1. Demura, T., Ye, Z. H., Regulation of plant biomass production., *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2010**, 13, 299-304.
2. Olson, D. G., McBride, J. E., Shaw, A. J., Lynd, L. R., Recent progress in consolidated bioprocessing., *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, 23, 396-405.
3. 林野庁HP林業白書: <http://www.rinya.maff.go.jp/j/kikaku/hakusyo/>
4. Bokinsky, G., Peralta-Yahya, P. P., George, A., Holmes, B. M., Steen, E. J., Dietrich, J., Lee, T. S., Tullman-Ercek, D., Voigt, C. A., Simmons, B. A., Keasling, J. D., Synthesis of three advanced biofuels from ionic liquid-pretreated switchgrass using engineered *Escherichia coli*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2011**, 108, 19949-19954.
5. Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Sonomoto, K., Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits., *J. Biotechnol.* **2010**, 156, 286-301.
6. Dashtban, M., Maki, M., Leung, K. T., Mao, C., Qin, W., Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison., *Crit. Rev. Biotechnol.* 2010, 30, 302-309.
7. Bubner, P., Plank, H., Nidetzky, B., Visualizing cellulase activity., *Biotechnol. Bioeng.* 2013, 110, 1529-1549.
8. <http://www.bio.mie-u.ac.jp/~karita/sub3.html>
9. Chang, R. H., Jang, J., Wu, K. C., Cellulase immobilized mesoporous silica nanocatalysts for efficient cellulose-to-glucose conversion., *Green Chem.* **2011**, 13, 2844-2850.
10. Lupoi, J. S., Smith, E. A., Evaluation of nanoparticle-immobilized cellulase for improved ethanol yield in simultaneous saccharification and fermentation reactions., *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, 108, 2835-2843.

11. Yan, P., Su, L., Chen, J., Wu, J., Heterologous expression and biochemical characterization of an endo- β -1,4-glucanase from *Thermobifida fusca*., *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2013**, 60, 348-355.
12. Miller, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar., *Anal. Chem.* **1959**, 31, 426-428.

[2-2] 配向同時固定化技術を用いた人工セルロソームの構築

[2-2-1] 緒言

EGやCBH、BGLといったセルラーゼは、土壤中に広く分布しているセルロースの分解能力の高い一部の嫌気性細菌の細胞表層上でセルロソームと呼ばれる巨大酵素群を形成することで、セルロースを効率よく分解することが知られている¹(Figure 1)。このセルラーゼ複合体は非常に効率よくセルロースを分解することができるため、現在、様々な方法から、人工セルロソームや人工酵素複合体の開発が試みられている²。このことはEGやBGLといった複数種のセルラーゼ同士が互いに近傍に存在し、協奏効果を発揮することに起因すると考えられている³。

[2-1]項において、セルラーゼの安定性を向上させるため微粒子に固定化した際、本研究で着目している配向固定化を適用することで、通常の化学修飾法と比較して、EG、BGL固定化した場合それぞれの活性を高い状態で維持したまま固定化できることが示唆された。しかしながら、実際に、セルロースの分解反応について検討を行ったところ、配向固定化した固定化セルラーゼと、ランダムな配向で固定化した固定化セルラーゼ両者の間で、セルロースの分解能力において大きな差は見られなかった。そのため、より効率的にセルロースを分解できるような固定化酵素を開発する場合、酵素の固定化配向以外の要因についても検討する必要があると示唆された。

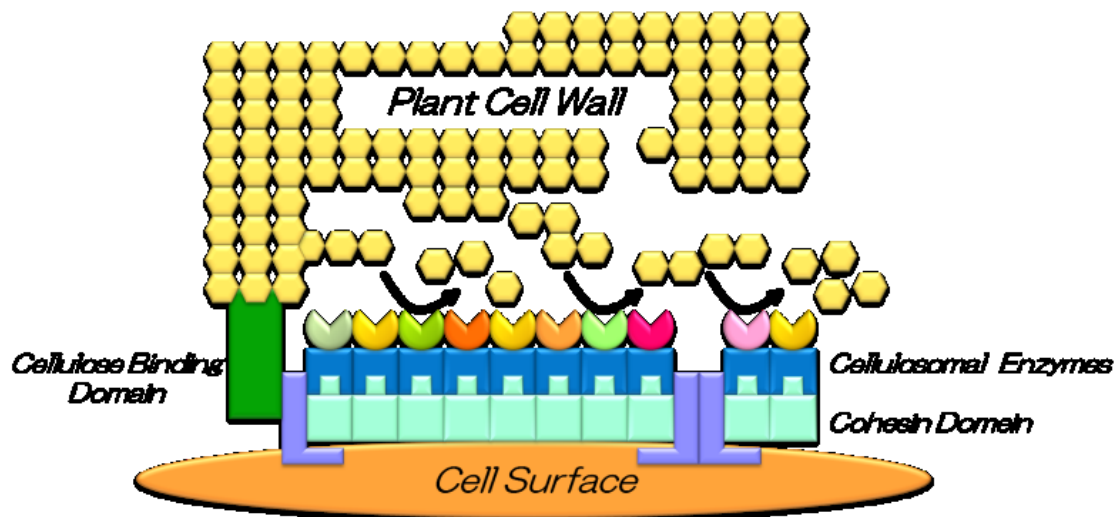


Figure 1. Schematic illustration of Cellulosome displayed on microbial cell surface

そこで、本項では、[1-3]項において開発した2種類の酵素を同時に配向固定化できる手法を応用することで、微粒子上に人工セルロソームを形成し、セルラーゼの近接

効果と配向固定化を同時に実践することで、より効率的にセルロースを分解できるような固定化酵素の開発を目指した。具体的には、Stav-LPをセルロソーム形成の足場とし、SrtAsaを用いた反応により、まずN末端にG tagを付与した*T. fusca*由来のEG (Gly5-EG)を固定化した。続いて、BirAによりN末端を特異的にビオチン化した*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*に由来するBGL (Biotin-BGL)を固定化し、2種類のセルラーゼを近傍に固定化した微粒子を調製した。本微粒子を用いることで、CMCを基質とした場合に、遊離するグルコース濃度から、セルロース分解能力について検討を行った。

[2-2-2] 実験操作

[2-2-2-1] 使用した菌体、ベクター構築

Escherichia coli Nova blueを遺伝子クローニング用の宿主として用いた。タンパク質発現の宿主としては、*E. coli* BL21(DE3)を用いた。すべてのDNAの増幅にはKOD plus (Takara)を用いたポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)法を適用した。増幅したDNA断片を適切な制限酵素で処理することによりベクターに導入した。本実験で作製したプラスミドおよび作製時に使用したプライマー配列、制限酵素、利用したベクターをTable 1に示した。作製したプラスミドおよびそれに関する情報はTable 1に示した。

[2-2-2-2] タンパク質の発現・精製

Stav-LPETG および SrtAsa は [1-2-2] 項で発現・精製したものをを用いた。Gly5-EGおよびBiotin-BGLの発現に関して、得られたプラスミドはタンパク質発現の際に、BL21(DE3)株に形質転換し直した。形質転換したプレートからコロニーを5 mL LB+抗生物質(アンピシリン)培地中に播種し、試験管で37°Cで一晩培養した。次に、培養液を250 mL LB+抗生物質(アンピシリン)培地中に移し替え、OD₆₀₀ = 0.5~0.7になるまで37°Cで振とう培養した後に、誘導剤(イソプロピル-β -チオガラクトピラノシド(IPTG))を加え、タンパク質の発現を誘導した。さらに、培養温度を25°Cまで下げ、18~24 h培養後に菌体を回収した。菌体を超音波で破碎した後に、菌体内上清画分を回収し、TALON® Metal Affinity Resinを用いて目的タンパク質を吸着させた。吸着したタンパク質をイミダゾールで溶出後、得られた画分をSDS-PAGE分析することによって、目的タンパク質の有無を判断した。また、タンパク質溶液中に含まれるイミダゾールはリン酸緩衝液中で透析することによって除去し、目的タンパク質を得た。尚、タンパク質の濃度はBCA法により決定した。

Table 1

Protein	vector	restrict enzyme	F) primer	R) primer
SrtAsa	pBAD	-----	*previous study [1-1]項	*
Stav-LP	pCold1	-----	*previous study [1-2]項	
Gly5-EG	pET-22b(+)	Nde1/Not1	5'-GGAGATATACATATGGGCGGGGCGGGGAGATTCTCCGT TCTACGTCAAC-3'	5'-GTGCTCGAGTGCGGCCGCGCTGGCGGCGCAGGTAAGGGT-3'
Biotin-BGL	pET-22b(+)	Nde1/Not1	5'-GGAGATATACATATGGGTGGCGGTCTGAACGACATCTTCGA GGCTCAGAAAATC-3' and 5'-TTCGAGGCTCAGAAAATCGAATGGCACGAAAGCGAGTCCAC CTACCCGTCcgctc-3'	5'-GTGCTCGAGTGCGGCCGCGCTTCGCGAGCTTGGCGTACTC-3'

[2-2-2-3] EG、BGL同時固定化微粒子の作製

1.5 μm ビオチン修飾磁性シリカ微粒子を固定化担体として選択した (Product code: 39-26-153、Micromod Partikeltechnologie GmbH, Germany)。まず、微粒子1 mgに対して、200 μg のStav-LPを微粒子上に固定化した。PBSで微粒子を数回洗浄し、未結合のStav-LPを取り除いた後、Gly5-1074 (441 μg) を、Biotin-BGL (585 μg) を [1-3-2-3]項と同様の手法で固定化した。得られた微粒子はPBSで数回洗浄し、未結合の酵素を取り除いた。

[2-2-2-4] EG、BGL同時固定化微粒子を用いたCMCの分解反応

[2-2-2-2]項で調製した微粒子を用いて、CMCの分解反応を行った。[2-1-2-6]項と同様の条件で、CMCを分解した後、グルコース測定キット (和光純薬工業) を用いて、遊離したグルコース濃度を測定した。

[2-2-3] 実験結果および考察

[2-2-3-1] 酵素同時固定化法を用いた人工セルロソーム

セルロソームは複数種のセルラーゼにより形成される酵素群のことで、異なる種類のセルラーゼが集積することによって、セルロースを効率よく分解することが知られている¹⁻³。そこで、[1-3]項において開発した2種類の酵素を同時に固定化できる手法を応用することで、微粒子上にBGLおよびEGを固定化した人工セルロソームを構築することで、BGLやEGを別々に固定した場合よりも、セルロースの分解効率を向上させることができるのではないかと考え、その機能について検討を行った。その戦略をFigure 2に示す。Stav-LPをセルロソームの足場として捉えることで、ビオチンを標識したBGL (Biotin-BGL)、G tagを付与したEG (Gly5-EG) を同時に固定化し、セルロース分解能をもつ機能性微粒子の調製を目指した。

固定化するセルラーゼとしては、前項と同様に *T. fusca* 由来のEGおよび *Bifidobacterium longum subsp. infantis* (ATCC 15697) 由来のベータグルコシダーゼ (Blon0625) を選択した。ここで、大腸菌由来のビオチンリガーゼ (BirA) を用いることで、Blon0625をビオチン化した (Biotin-BGL)。Figure 2に示すように、BirAの認識タグ (BAP tag) を遺伝子工学的に導入することで、大腸菌を用いてタンパク質を発現する際に、in vivoでBAP tag内に存在するリジン残基の側鎖に部位特異的にビオチンを導入することができる。

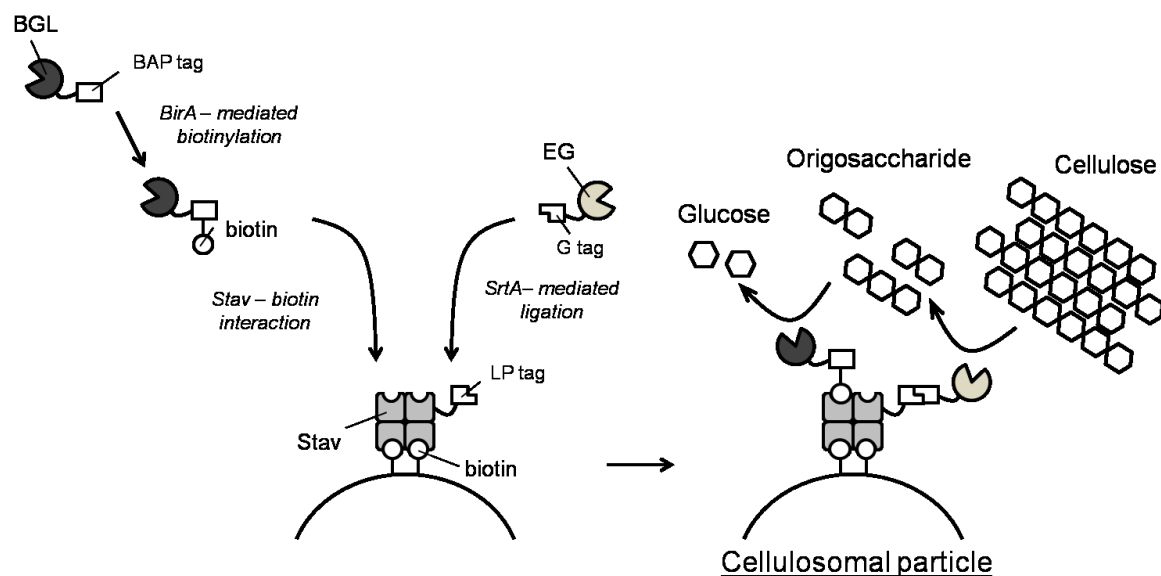


Figure 2. Schematic illustration of strategy for a fabrication of cellulosomal particle

[2-2-3-2] 人工セルロソームを用いたセルロースの分解

CMCを基質に、それぞれのセルラーゼ固定化微粒子を用いて分解試験を行った結果を下に示した。Figure 3より、上記手法により二種類のセルラーゼEG、BGLを微粒子上に別々に固定化したものを混合して用いた場合に対して（Column 2）、同時固定化した場合（Column 3）の方が、CMCをより効率よく分解していた。このことから、異なる種類のセルラーゼを近傍に集めることで、セルロースの分解効率が向上することが示唆された。

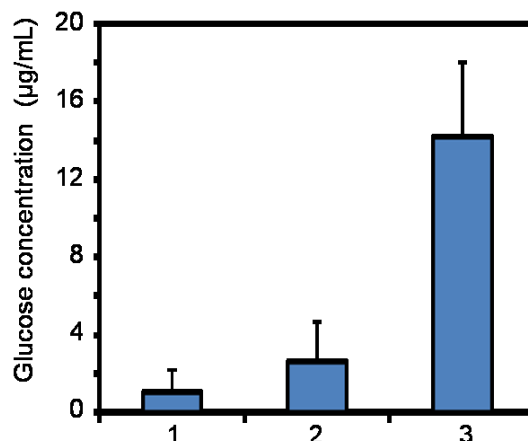


Figure 3. Enzymatic Degradation of CMC using cellulase immobilized magnetic silica particles; Stav-LP only immobilized particles (column1), the mixture of G5-EG immobilize particles and BAP-BGL immobilized particles (column2), G5-EG and BAP-BGL co-immobilized particles (column3).

[2-2-4] 結言

第1章において開発した酵素を同時に配向固定化することで、異なるセルラーゼEGおよびBGLを別々に固定化した場合よりも、効率よくセルロース分解することのできる固定化酵素の調製に成功した。本項の結果より、今後、微粒子サイズや固定化酵素量について検討することにより、天然のセルロソームを模倣した優れたセルロース分解能を持つ固定化セルラーゼとしての応用が期待できる。

[2-2-5] 参考文献

1. Doi, R. H., Tamaru, Y., The *Clostridium cellulovorans* cellulosome: an enzyme complex with plant cell wall degrading activity., *Chem. Rec.* **2001**, 1, 24-32.
2. Doi, R. H., Kosugi, A., Murashima, K., Tamaru, Y., Han, S. O., Cellulosomes from mesophilic bacteria., *J. Bacteriol.* **2003**, 185, 5907-5914.
3. Tamaru, Y., Karita, S., Ibrahim, A., Chan, H., Doi, R. H., A large gene cluster for the *Clostridium cellulovorans* cellulosome., *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 5906-5910.
4. Mori, Y., Ozasa, S., Kitaoka, M., Noda, S., Tanaka, T., Ichinose, H., Kamiya, N., Aligning an endoglucanase Cel5A from *Thermobifida fusca* on a DNA scaffold:

potent design of an artificial cellulosome., *Chem. Commun.* **2013**, 49, 6971-6973.

5. Caspi, J., Barak, Y., Haimovitz, R., Gilary, H., Irwin, D. C., Lamed, R., Wilson, D. B., Bayer, E. A., *Thermobifida fusca* exoglucanase Cel6B is incompatible with the cellulosomal mode in contrast to endoglucanase Cel6A., *Syst. Synth. Biol.* **2010**, 4, 193-201.

[2-3] でんぷんを燃料としたバイオ燃料電池

[2-3-1] 緒言

本項では、第1章で開発したような酵素の配向固定化技術の応用展開を指向して、酵素バイオ燃料電池というタンパク質複合デバイスに着目した。酵素バイオ燃料電池では、Figure 1に示すように、アノード上に固定化された酵素がグルコースなどの有機物を酸化し、カソード上に固定化された酵素が酸素を水に還元する¹⁻³。このような酵素バイオ燃料電池の開発においては、酵素をいかに高活性状態で電極に固定化できるかが非常に重要となり、それが電池性能に直結するため⁴、本論文で開発した技術の応用先として優れた実証例になりうると考えた。また、酵素バイオ燃料電池では、様々な酸化還元酵素を触媒に用いることができることから、多様な燃料(バイオマス)を利用できるという利点がある。

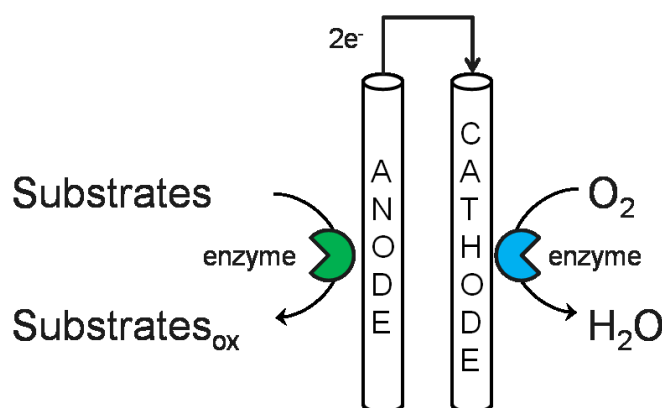


Figure 20. Schematic illustration of Enzymatic Biofuel cells

しかしながら、現在報告されているバイオ燃料電池のほとんどは、グルコースのような単糖を燃料としたものがほとんどで⁵⁻⁸、でんぷんやセルロースなど多糖を燃料とした例はほとんどない。そこで、本項では、まずでんぷんを直接燃料とすることが可能な電極の開発を目指した。でんぷんを糖化するアミラーゼ(α アミラーゼ; AmyAおよびグルコアミラーゼ; GluR)と、グルコースを酸化するGOxを電極上に同時に固定化することで、電極上ででんぷんがグルコースまで糖化(液化)される反応と、グルコースから電子が奪われる反応が連続的に起こり、でんぷんを電極上で直接燃料とすることが可能になると考えられる。また、本項においては、炭素粉末⁹と酵素液を混合したものを電極として用いたため(炭素粉末への物理吸着)、酵素の固定化配向については特に考慮していない。

[2-3-2] 実験操作

[2-3-2-1] 使用した菌体、ベクター構築

Escherichia coli Nova blueを遺伝子クローニング用の宿主として用いた。タンパク質発現の宿主としては、*E. coli* BL21(DE3)を用いた。すべてのDNAの増幅にはKOD plus(Takara)を用いたポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)法を適用した。増幅したDNA断片を適切な制限酵素で処理することによりベクターに導入した。本実験で作製したプラスミドおよび作製時に使用したプライマー配列、制限酵素、利用したベクターをTable 1に示した。

[2-3-2-2] タンパク質の発現・精製

AmyAの発現に関して、得られたプラスミドはタンパク質発現の際に、BL21(DE3)株に形質転換し直した。形質転換したプレートからコロニーを5 mL LB+抗生物質(アンピシリン)培地中に播種し、試験管で37°Cで一晩培養した。次に、培養液を250 mL LB+抗生物質(アンピシリン)培地中に移し替え、 $OD_{600} = 0.5 \sim 0.7$ になるまで37°Cで振とう培養した後に、誘導剤(イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド(IPTG))を加え、タンパク質の発現を誘導した。さらに、培養温度を25°Cまで下げ、18~24 h培養後に菌体を回収した。菌体を超音波で破碎した後に、菌体内上清画分を回収し、TALON® Metal Affinity Resinを用いて目的タンパク質を吸着させた。吸着したタンパク質をイミダゾールで溶出後、得られた画分をSDS-PAGE分析することによって、目的タンパク質の有無を判断した。また、タンパク質溶液中に含まれるイミダゾールはリン酸緩衝液中で透析することによって除去し、目的タンパク質を得た。尚、タンパク質の濃度はBCA法により決定した。

Table 1

Protein	vector	restrict enzyme	F) primer	R) primer
AmyA	pET-32b(+)	Kpn1/EcoR1	5`-GGGGTACCGGATCCGATATCGATGAACAAGTGTC-3`	5'-CCCAAGCTTGAATTCTTATTTTAGCCCATCTTTATTAT-3'

[2-3-2-3] 酵素修飾カーボンペーストアノードの作製

*Aspergillus niger*由来のGOx (Nacarai tesuqueから購入した)、*Rhizopus oryzae*由来のGluR (TOYOBO Co., Ltd.,から購入した)、*Streptococcus vobis*由来のAmyA ([2-3-2-2]項に記載した方法で組換え発現・精製した)をそれぞれ固定化した。まず、テトラシアフルバレン(TTF)をメタノールに飽和溶解させた。TTF飽和溶液30 μL とカーボンペースト60 mgを混合し、作用電極の空孔に詰め込んだ。コピー用紙を用いて電極表面を研磨した後、各酵素溶液を適量(75.8 μg GOx 245 U mg^{-1} 、18.2 μg GluR 37 U mg^{-1} 、15 μg AmyA 70000 U mg^{-1})、電極表面に滴下し、自然乾燥させた。電極表面で1 %ポリアリルアミン(PAA)溶液10 μL と0.5 %グルタルアルデヒド溶液1 μL を滴下、混合した。

[2-3-2-4] 酵素修飾カーボンペーストカソードの作製

2, 2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンツチアゾリンスルホン酸(6)] (ABTS)をメタノールに飽和溶解させた。ABTS飽和溶液(30 μL)とカーボンペースト60 mgを混合し、作用電極の空孔に詰め込んだ。コピー用紙を用いて電極表面を研磨した後、ビリルビンオキシダーゼ(*Myrothecium verrucaria*由来、Sigma-Aldrich Corp.,から購入した)溶液を適量(45 μg 、5.6 U mg^{-1})、電極表面に滴下し、自然乾燥させた。電極表面で1 % PAA溶液10 μL と0.5 %グルタルアルデヒド溶液1 μL を滴下、混合した。

[2-3-2-5] 電気化学的測定

電気化学的な測定はすべて、Model 2323 Bi-Potentiostat (BAS Inc.)を用いた。銀/塩化銀電極を参照電極に、白金ワイヤーをカウンター電極、調製したバイオアノードおよびバイオカソードを作用電極とした三電極法を用いた。グルコースやでんぷんなどの基質に対する電極応答はサイクリックボルタンメトリーを用いて解析した。また、組み立てたバイオ燃料電池においては、開回路電圧測定からおよその起電力を決定し、リニアスイープボルタンメトリーを用いて電池性能を評価した。尚、すべての電極反応において、20~25 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0~8.0 の条件の下分析を行った。

[2-3-3] 実験結果および考察

[2-3-3-1] デンプン直接酸化型電極の開発

本項では穀物系バイオマスの主要な構成成分であるでんぷんを燃料とする電極の開発を目指した。グルコース燃料電池では、GOxなどのグルコース酸化酵素が触媒として用いられるが、GOxはでんぷんを直接酸化することはできないので、でんぷんをグルコースまで分解する必要がある。でんぷんは糖化酵素である α -アミラーゼ(AmyA)とグルコアミラーゼ(GluR)の協奏作用により、グルコースまで分解することができる¹⁰。そこで、本研究ではGOxに加えてこれらの糖化酵素(AmyAおよびGluR)を電極上に同時に固定化した電極の開発を提案した。このことで、糖化と酸化の二つの機能を電極表面で同時に扱うことが可能になれば、でんぷんを燃料として電気エネルギーを取り出すことができ、バイオ燃料電池の燃料として用いることが可能なバイオマスの多様化という点で、新たなバイオ燃料電池開発の発展に寄与することができると考えた。

酵素バイオ燃料電池における酵素固定化電極は、直接電子移動型(DET型)とメディエータ型(MET型)に分類することができるが¹¹、今回の実験では、低分子酸化還元物質を電子運搬メディエータとして介在させたMET型を用いて電極の開発を行った。実際に、電子メディエータとしてテトラチアフルバレン(TTF)を含有するカーボンペースト(CP)に3種類の酵素(GOx, AmyA, GluR)を練り込むことで、Figure 2に示すようなバイオアノードを構築した。電極付近に近づいたでんぷん(基質)はまず、2種類のアミラーゼによってグルコースまで分解され、一方で分解されたグルコースからGOxが電子を奪い取り、その電子をTTFが電極に運搬するという一連の流れが電極上で連続的に起こると予想できる。

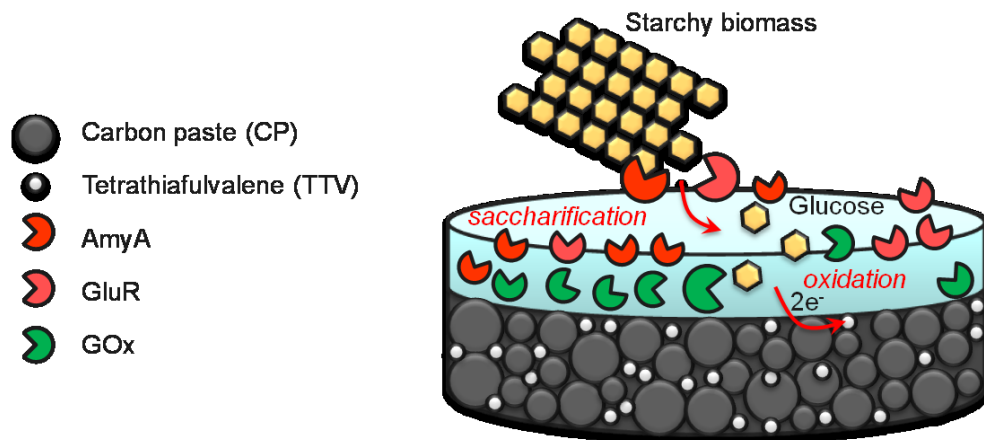


Figure 2. Direct production of electrical current from starchy biomass using a GOx/AmyA/GluR-multi-immobilized bioanode

でんぷん基質のモデルとして、白米(キヌヒカリ)を微粒子状に粉碎した粉末を選
 択した。この白米をリン酸緩衝液中によく懸濁し、上記手法で作製した3種類の酵素を同
 時に固定化したバイオアノード(GOx/AmyA/GluR/CPE)を作用電極に、三電極法を用い
 たサイクリックボルタンメトリーを行い、電極の性能について評価した。また、GOxのみを
 固定化したバイオアノード(GOx/CPE)についても同様に性能を評価した。Figure 3Aより
 GOx/AmyA/GluR/CPEを用いた場合、グルコース・白米のどちらを基質として用いた場
 合にも触媒電流を観測することができたが、Figure 3Bの結果よりGOx/CPEを用いた場
 合では、白米を基質とした場合に触媒電流は観測されなかった。これらの結果から、でん
 ぷんの直接酸化にはGOxだけでなくAmyAおよびGluRの固定化が必要であることが確
 認できた。ここで、グルコースを基質とした場合に対して、白米を基質とした場合に得られ
 る触媒電流がおおよそ70 %程度に低下してしまっているが、用いた白米の成分の内でんぷ
 んとして燃料に利用できる割合はおおよそ80 % (残りはタンパク質、脂質等)であることを加
 味すると、GOx/AmyA/GluR/CPEはでんぷんの糖化と酸化を効率よく連続的に行ってい
 ると考えられる。

また、興味深いことに、GOx/CPEを作用電極に、白米懸濁溶液中にAmyAおよ
 びGluRを加えた場合では、触媒電流をほとんど観測することができなかった。このことは、
 本実験において、GOx、AmyA、GluRを電極表面に同時に固定化したことが、でんぷん
 を直接利用できる電極の開発に効果的であると示唆された。

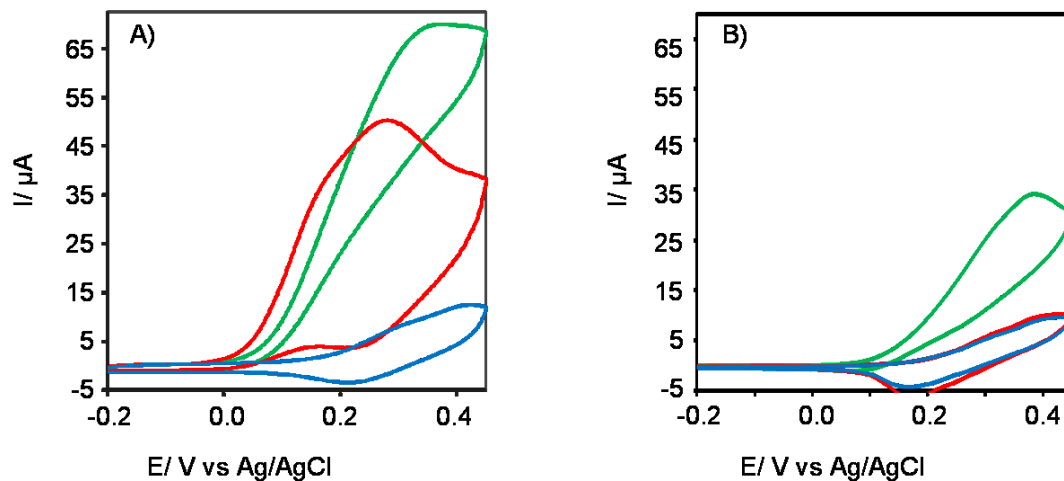


Figure 3. Cyclic voltammograms of the GOx/AmyA/GluR/CPE (A) or GOx/CPE (B) in 0.1 M, pH 7.2 phosphate buffer (blue line) containing 50 mM glucose (green line) or raw starch (weight equivalent to 50 mM glucose: red line). Data were collected at 10 mV s⁻¹

[2-3-3-2] デンプンを直接燃料とする電池の開発

GOx/AmyA/GluR/CPEをバイオアノードに、ビリルビンオキシダーゼ(BOx)と電子メディエータとしてABTSをCPに練り込んだ電極(BOx/CPE)をバイオカソードとすることで、Figure 4に示すような燃料電池を組み立てた。その性能をリニアスイープボルタンメトリーによって評価した。燃料には、白米粉末をリン酸緩衝溶液中にグルコース濃度に換算して50 mMになるように懸濁したものをを用いた。Figure 5に得られたI-VおよびP-Vカーブを示す。Figure 5より、開回路電圧は0.522 V、短絡電流密度が 0.469 mA cm^{-2} 、最大電力密度は $99.0 \text{ } \mu\text{W cm}^{-1}$ であった。本実験で作製したバイオ燃料電池は電極上で糖化と酸化を同時に行うものであるが、同程度の被表面積をもつ電極を用いた過去のいくつかの報告例とほぼ同程度の電池性能を保持していた^{12,13}。

[2-3-4] 結言

でんぷんで作動する新しい酵素バイオ燃料電池の開発に成功した。AmyA、GluR、GOxの3種類の酵素が同時に固定化されたバイオアノードを用いることで、でんぷんを直接利用することが可能になった。白米を燃料とした電池を組み立てたところ、起電力が0.522 V、最大電力密度が $99.0 \text{ } \mu\text{W cm}^{-2}$ であった。本研究の結果は、酵素バイオ燃料電池にの燃料として用いることが可能なバイオマスの多様化という点で、新たなバイオ燃料電池開発の発展に寄与することができると期待できる。

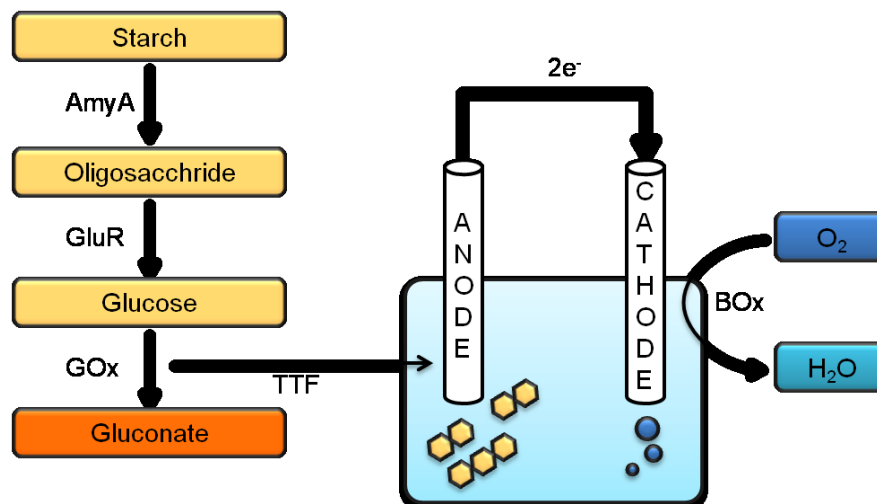


Figure 4. The assembly of a membrane-less white rice/ O_2 biofuel cell.

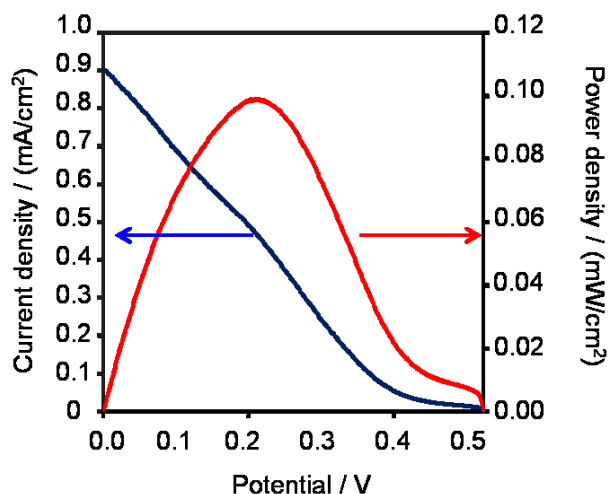


Figure 5. The power density curve of the white rice/ O_2 biofuel cell obtained by LSV in 0.1 M, pH 7.2 phosphate buffer containing 50 mM white rice (weight equivalent to 50 mM glucose). Data were collected at 10 mV s^{-1} .

[2-3-5] 参考文献

1. Willner, I., Yan, Y. M., Willner, B., Tel-Vered, R., Integrated Enzyme-Based Biofuel Cells—A Review., *Fuel Cells* **2009**, 1, 7-24.
2. Barton, S. C., Gallaway, J., Atanassov, P., Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices., *Chem. Rev.* **2004**, 104, 4867-4886.
3. Arechederra, R. L., Treu, B. L., Minteer, S. D., Development of glycerol/ O_2 biofuel cell., *J. Pow. Sou.* **2007**, 173, 156-161.
4. 加納健司、バイオ電池の最新動向、シーエムシー出版
5. Sakai, H., Nakagawa, T., Tokita, Y., Hatazawa, T., Ikeda, T., Tsujimura S., Kano, K., A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions., *Energy Environ. Sci.* **2009**, 2, 133-138.
6. Wang, J. Y., Nien, P. C., Chen, C. H., Chen, L. C., Ho, K. C., A glucose bio-battery prototype based on a GDH/poly(methylene blue) bioanode and a graphite cathode with an iodide/tri-iodide redox couple., *Bioresour. Technol.* **2012**, 116, 502-506.

7. Tan, Y., Deng, W., Ge, B., Xie, Q., Huang, J., Yao, S., Biofuel cell and phenolic biosensor based on acid-resistant laccase-glutaraldehyde functionalized chitosan-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite film., *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24, 2225-2231.
8. Ammam, M., Fransaer, J., Glucose/O₂ biofuel cell based on enzymes, redox mediators, and multiple-walled carbon nanotubes deposited by AC-electrophoresis then stabilized by electropolymerized polypyrrole., *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, 109, 1601-1609.
9. Wang, J., Musameh, M., Mo, J. W., Acid stability of carbon paste enzyme electrodes., *Anal. Chem.* **2006**, 78, 7044-7047.
10. Yamada, R., Yamakawa, S., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A., Direct and efficient ethanol production from high-yielding rice using a *Saccharomyces cerevisiae* strain that express amylases., *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, 48, 393-396.
11. 辻村清也、加納健司、酵素バイオ電池の最近の展開、総説、GS Yuasa Technical Report、2008年12月、第5巻、第2号.
12. Wang, X., Falk, M., Ortiz, R., Matsumura, H., Bobacka, J., Ludwig, R., Bergelin, M., Gorton, L., Shleev, S., Mediatorless sugar/oxygen enzymatic fuel cells based on gold nanoparticle-modified electrodes., *Biosens. Bioelectron.* **2012**, 31, 219-225.
13. Zhu, Z., Wang, Y., Minteer, S. D., Zhang, Y. P., Maltodextrin-powered enzymatic fuel cell through a non-natural enzymatic pathway., *J. Pow. Sou.* **2011**, 196, 7505-7509.

[2-4] グルコースを多段階酸化するバイオアノードの構築

[2-4-1] 緒言

グルコースを燃料とした酵素バイオ燃料電池では、GOxのほかにグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)も同様にアノード触媒として利用される¹。GOxに対して、GDHは溶液中の溶存酸素に触媒機能が影響されないことから、近年、新たなアノード触媒として注目を集めている²。いくつかの種類のGDHが酵素バイオ燃料電池の開発に利用されているが³⁻⁷、その中でも、本項では、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD^+)を補酵素にとるGDHに着目した。

ここで、GOxやグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)といった酵素を用いたグルコース燃料電池では、グルコース1分子から2つの電子しか取り出すことができずクーロン効率が低いという問題がある。そこで、本項では、グルコースが酸化されたグルコン酸に着目した。グルコン酸を更に酸化する酵素であるグルコン酸デヒドロゲナーゼを同時に固定化することによって、グルコースの2段階酸化を可能にする電極の開発を行った。グルコース1分子から4つの電子を取り出すことのできる電極を開発することで、グルコース燃料電池の性能向上を試みた。また、本項においても、炭素電極上に酵素をキャストイングするという方法(炭素電極上への物理吸着)をとっており、こちらの実験でも酵素の固定化配向については考慮していない。

[2-4-2] 実験操作

[2-4-2-1] 使用した菌体、ベクター構築

Escherichia coli Nova blueを遺伝子クローニング用の宿主として用いた。タンパク質発現の宿主としては、*E. coli* BL21(DE3)を用いた。すべてのDNAの増幅にはKOD FX DNA polymerase(Takara)を用いたポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)法を適用した。増幅したDNA断片を適切な制限酵素で処理することによりベクターに導入した。本実験で作製したプラスミドおよび作製時に使用したプライマー配列、制限酵素、利用したベクターをTable 1に示した。

[2-4-2-2] タンパク質の発現・精製

Ga5DHの発現に関して、得られたプラスミドはタンパク質発現の際に、BL21(DE3)株に形質転換し直した。形質転換したプレートからコロニーを5 mL LB+抗生物質(アンピシリン)培地中に播種し、試験管で37°Cで一晩培養した。次に、培養液を

250 mL LB+抗生物質(アンピシリン)培地中に移し替え、 $OD_{600} = 0.5\sim0.7$ になるまで 37°C で振とう培養した後に、誘導剤(イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド(IPTG))を加え、タンパク質の発現を誘導した。さらに、培養温度を 15°C まで下げ、18~24 h培養後に菌体を回収した。菌体を超音波で破碎した後に、菌体内上清画分を回収し、TALON® Metal Affinity Resinを用いて目的タンパク質を吸着させた。吸着したタンパク質をイミダゾールで溶出後、得られた画分をSDS-PAGE分析することによって、目的タンパク質の有無を判断した。また、タンパク質溶液中に含まれるイミダゾールはリン酸緩衝液中で透析することによって除去し、目的タンパク質を得た。尚、タンパク質の濃度はBCA法により決定した。

Table 1

Protein	vector	restrict enzyme	F) primer	R) primer
Ga5DH	pCold1	Kpn1/Hind3	5'-CATATGGG- TACCATGGAAAATATGTTTTCGTT-3'	5'-CTCGAGAAGCTTTCATTAAGGTTGTTTTCCAATAT-3'

[2-4-2-3] 酵素修飾グラッシーカーボンアノードの作製

Liuらの論文を参考にフェロセン修飾カーボンナノチューブ (SWCNTs-Fc) を調製した²。調製したSWCNTs-Fc (5 mg mL⁻¹ 10 µL) を、アルミナ粉末を用いてよく研磨したグラッシーカーボン (GC) 電極上に滴下し、およそ30 min自然乾燥させた。各酵素溶液を適量 (Table 2)、電極表面に滴下し、自然乾燥させた。電極表面で1 % PAA溶液10 µLと0.5 %グルタルアルデヒド溶液1 µLを滴下、混合した。

Table 2

	DI	GDH	Ga5DH
GDH/DI	100 µg	100 µg	-
Ga5DH/DI	100 µg	-	100 µg
GDH/Ga5DH/DI-1	100 µg	100 µg	100 µg
GDH/Ga5DH/DI-2	100 µg	100 µg	200 µg
GDH/Ga5DH/DI-3	100 µg	100 µg	400 µg

[2-4-2-4] 酵素修飾グラッシーカーボンカソードの作製

SWCNTs (10 mg mL⁻¹ 5 µL) およびABTS飽和溶液 (30 µL) を、アルミナ粉末を用いてよく研磨したGC電極上に滴下し、およそ30 min自然乾燥させた。ビリルビンオキシダーゼ溶液を適量 (100 µg)、電極表面に滴下し、自然乾燥させた。電極表面で1 % PAA溶液 10 µLと0.5 %グルタルアルデヒド溶液1 µLを滴下、混合した。

[2-4-2-5] 電気化学的測定

電気化学的な測定はすべて、[2-3-2-4]項と同様に行った。

[2-4-3] 実験結果および考察

[2-4-3-1] NAD^+ 依存型酵素を用いたバイオアノードの構築

[2-3]項では、GOxを用いたバイオアノード開発について記述したが、GDHについても、グルコース燃料電池のアノード酵素としてよく利用されている¹。ピロロキノリンキノン(PQQ)やフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD^+)を補酵素にとる3種類のGDHが存在し、GOxと比べて様々な分子を電子供与体としてとることが出来る点や副反応で過酸化水素を生じないという利点がある。近年、補酵素内在型(FAD、PQQ依存)のGDHが安定性の面で優れているため、注目を集めているが³⁻⁷、これらのGDHのほとんどは、グルコース1分子あたり2つの電子しか取り出すことができず、十分にグルコースを燃料として利用できていない。

ここで、グルコースは様々な生物の体内で代謝され、最終的に二酸化炭素まで分解される。この中の一つの経路に着目すると NAD^+ に依存する酵素が多く用いられている。実際に、 NAD^+ 依存型のGDHによってグルコースがグルコン酸に酸化された後、生じたグルコン酸は NAD^+ 依存型のグルコン酸デヒドロゲナーゼ(Ga5DH)によって5-ケトグルコン酸に酸化される経路が存在する⁸。本項では、このグルコース代謝経路に着目した。GDHによってグルコースを酸化し、グルコースが酸化されたグルコン酸に対して、これを酸化する酵素であるGa5DHを同時に固定化することによって、グルコースの2段階酸化を可能にする電極の開発を行った。即ち、グルコース1分子から4つの電子を取り出すことのできる電極を開発することで、グルコース燃料電池の性能向上を試みた。

NAD^+ 依存型酸化酵素を用いたバイオアノードを作製するにあたって、Figure 1に示すような系を設計した。 NAD^+ 依存型酸化酵素(GDH、Ga5DH)から取り出された2つの電子は NAD^+ に受け渡され、 NADH となる。続いて、ジアフォラーゼ(DI)とフェロセン修飾カーボンナノチューブ(CNTs-Fc)によって、 NADH から2つの電子が電極に運搬される。本項では、まず、GDHおよびDIを同時にグラッシーカーボン(GC)電極に固定化したバイオアノード(GDH/DI/GCE)、Ga5DHおよびDIを同時にGC電極に固定化したバイオアノード(Ga5DH/DI/GCE)がそれぞれ作動するかどうかをサイクリックボルタメトリーにより評価した。Figure 2AよりGDH/DI/GCEを用いた場合、グルコースを基質とした触媒電流を観測することができた。また、Figure 2Bの結果よりGa5DH/DI/GCEを用いた場合では、グルコン酸を基質とした触媒電流が観測された。これらの結果から、GDH・Ga5DHはそれぞれ、アノード触媒として、Figure 1に示されるような系の中で機能していることが確認できた。

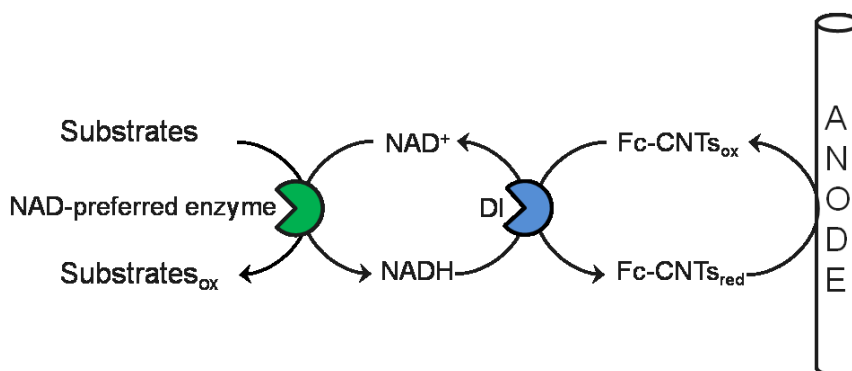


Figure 1. Schematic illustration of Bioanode based on NAD-preferred enzyme and Diaphorase system

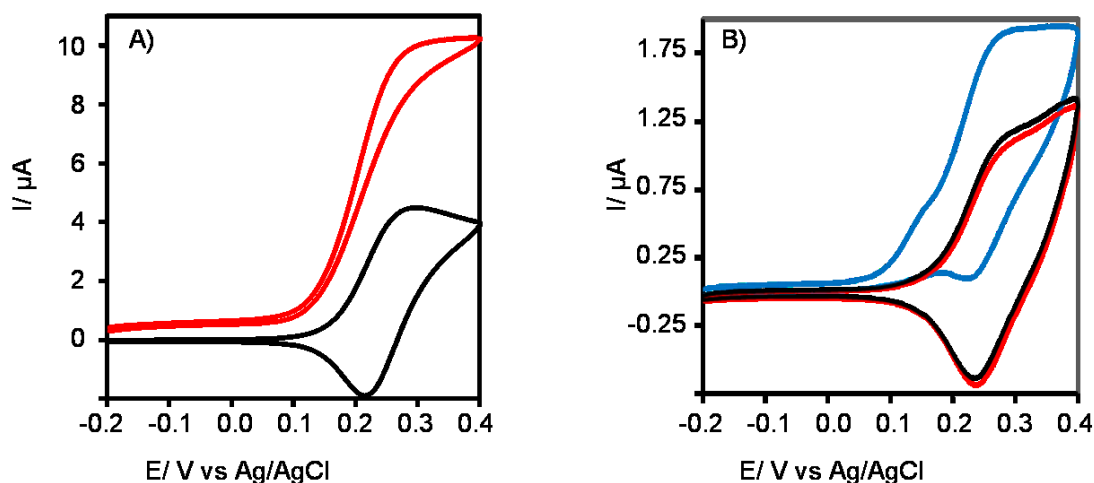


Figure 2. Cyclic voltammograms of the GDH/DI//GCE (A) or Ga5DH/DI/GCE (B) in 0.1 M, pH 7.2 phosphate buffer (black line) containing 50 mM glucose (red line) or 50 mM gluconic acid (blue line). Data were collected at 10 mV s^{-1}

[2-4-3-2] グルコースを多段階酸化可能なバイオアノードの開発

グルコースをGDHによって酸化し、グルコースが酸化されたグルコン酸に対してGa5DHを同時に固定化することによって、グルコースの2段階酸化を可能にする電極の開発を行った。グルコース1分子あたりから計4つの電子を取り出すことができると考えられ、電極応答の向上が期待できる。

実際に、GDH/DI/GCEと比較して、GDH:Ga5DH=1:1の割合で酵素を同時固定化した電極(GDH/Ga5DH/DI/GCE1)を用いた場合、グルコースを基質として得られる触媒電流が上昇した(Figure 3A)。GDH/Ga5DH/DI/GCE1ではGDH:Ga5DH=1:1の割合で酵素が固定化されているが、Figure 2の結果にみられるように、GDH/DI/GCEを用い

て得られる触媒電流と比較して、Ga5DH/DI/GCEを用いた場合に得られる触媒電流が10分の1程度であることから、GDHによって酸化されたグルコン酸をGa5DHが十分に酸化できていないのではないかと考えられる。そこで、Ga5DHの固定化量を増加させることで、グルコースを基質として得られる触媒電流の変化について検討を行い、電極に固定化する、GDH : Ga5DH の最適な割合を決定した。GDH:Ga5DH=1:2 (GDH/Ga5DH/DI/GCE2)、GDH:Ga5DH=1:4 (GDH/Ga5DH/DI/GCE3) の割合でそれぞれ酵素を固定化した電極を用いて、グルコースを基質としてサイクリックボルタンメトリーにより、得られる触媒電流について検討したところ、GDH/Ga5DH/DI/GCE2を用いた場合において最も高い触媒電流が得られることを確認した。よって、本実験ではGDH/Ga5DH/DI/GCE2を最適なアノード条件として決定した。

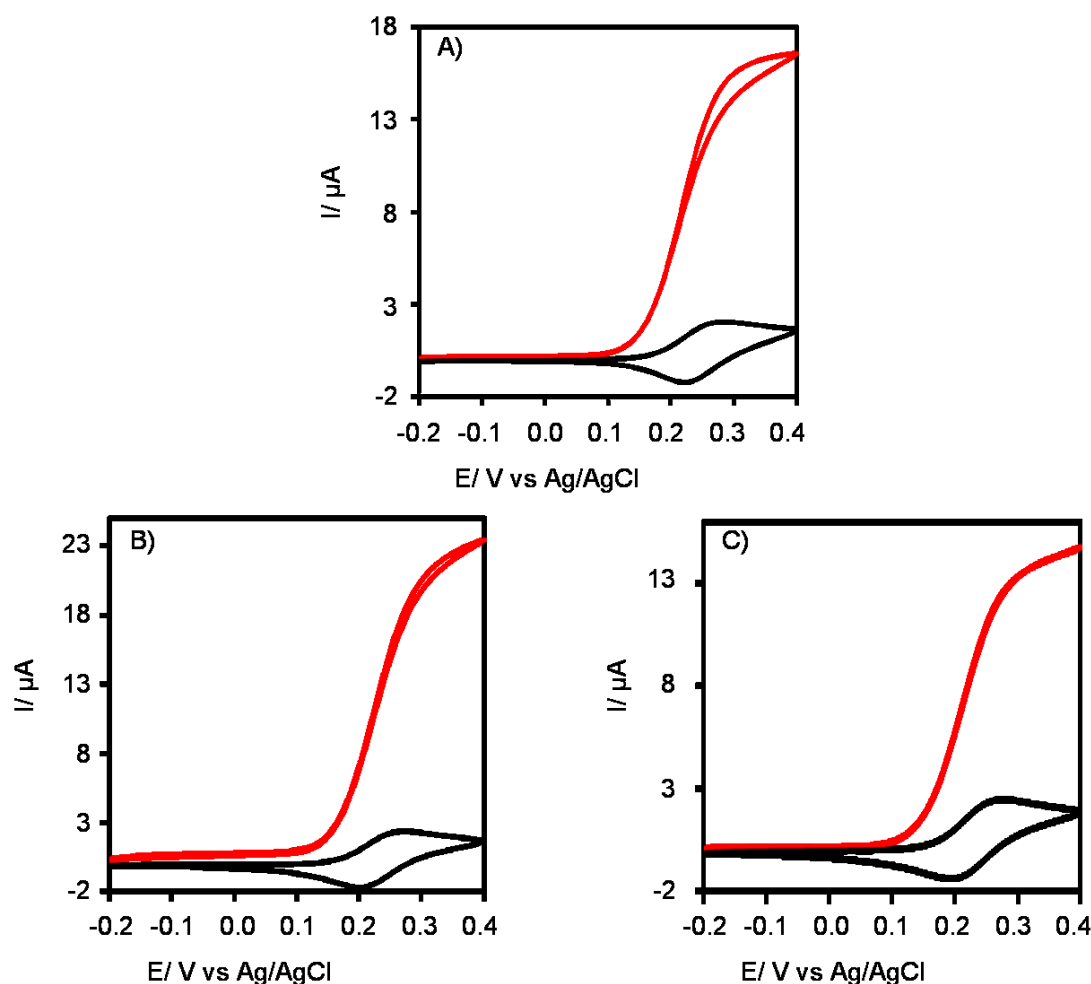


Figure 3. Cyclic voltammograms of the GDH/Ga5DH/DI/GCE1 (A), GDH/Ga5DH/DI/GCE2 (B), GDH/Ga5DH/DI/GCE3 in 0.1 M, pH 7.2 phosphate buffer (black line) containing 50 mM glucose (red line). Data were collected at 10 mV s^{-1}

GDH/Ga5DH/DI/GCE2をアノードとして、カソードにはBOxとABTSおよびCNTsを固定化した電極を用いて、Figure 4に示すような酵素バイオ燃料電池を組み立てた。比較対象として、GDH/DI/GCEをアノードとして用いたものも同様に酵素バイオ燃料電池を組み立て、グルコースを燃料として、その性能をリニアスイープボルタンメトリーによって評価した。Figure 5に得られたI-VおよびP-Vカーブを示す。GDH/Ga5DH/DI/GCE2をアノードとして用いた場合ほぼ二倍の最大電力密度 $16.0 \mu\text{W cm}^{-1}$ が得られた。

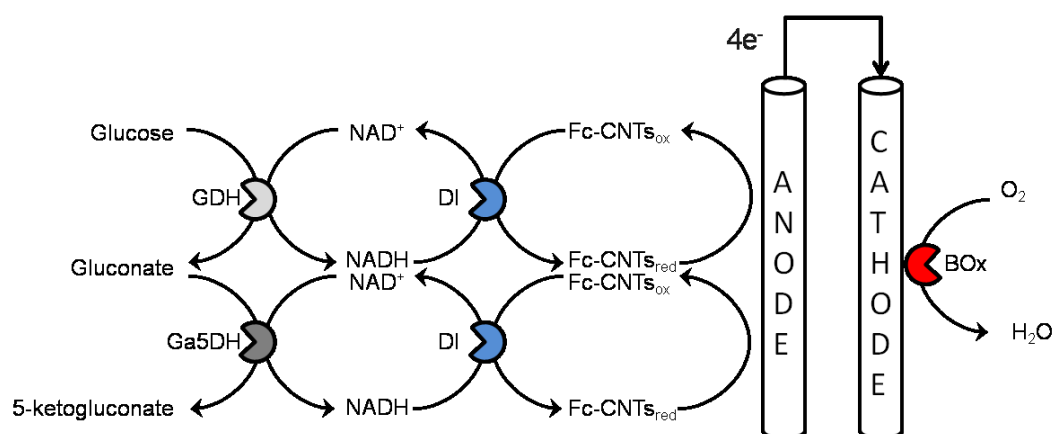


Figure 4. Schematic illustration of Enzymatic Biofuel cells

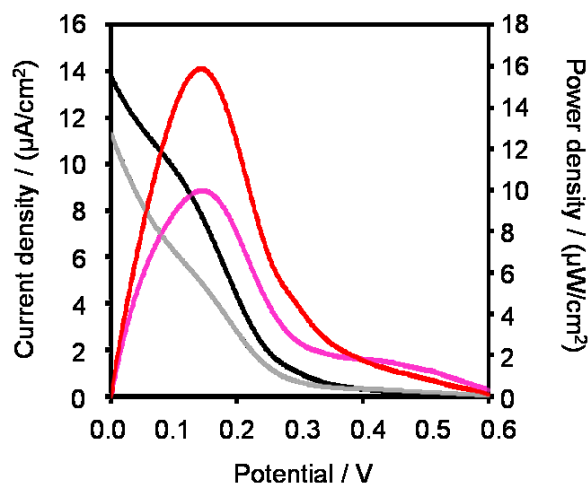


Figure 5. The power density curve of the glucose/ O_2 biofuel cell obtained by LSV in 0.1 M, pH 7.2 phosphate buffer containing 100 mM glucose using GDH/Ga5DH/DI/GCE2 as a bioanode (red and blue line), GDH/DI/GCE as a bioanode (pink and gray line), Data were collected at 10 mV s^{-1} .

[2-4-4] 結言

NAD⁺依存型酸化酵素であるGDH、Ga5DHを電極上に同時に固定化することでグルコース1分子から4つの電子を取り出すことのできる新規バイオアノードの開発に成功した。GDH:Ga5DH=1:2の割合で酵素を固定化した電極を、本実験における最適条件とし、BOxを固定化したバイオカソードとともに、電池を組み立てた結果、GDHのみしか固定化していない電極(グルコース1分子から2つの電子しか取り出すことができない)をアノードとして組み立て場合に得られる最大電力よりも2倍近く大きい値が得られた。

グルコースを2段階酸化するというアプローチを実践することで、酵素バイオ燃料電池として組み立てた際に性能の向上につながることを示唆された。しかしながら、用いたGa5DHの酵素活性や安定性が低いことから、電極がすぐに失活してしまった。今後、変異導入法によるGa5DHの酵素活性の向上や、耐熱菌由来の酵素など安定性の優れた代替酵素をスクリーニングするなどして、酵素活性・安定性を向上させることができれば、より電池としての性能を向上させることができると考えられる。

また、[2-3]項、[2-4]項どちらの場合においても、作製した酵素バイオ燃料電池において、得られた電力量が十分ではないことから、多種類の酵素を同時に固定化するようなこれらの電極では、それぞれの酵素の固定化配向が電極性能に非常に大きく影響すると思われる。そのため、SrtAを用いることで、電極上に酵素を配向固定化するための手法に関する開発・研究が今後重要になると考えられる。

[2-4-5] 参考文献

1. Chen, C., Wang, L., Tan, Y., Qin, C., Xie, F., Fu, Y., Xie, Q., Chen, J., Yao, S., High-performance amperometric biosensors and biofuel cell based on chitosan-strengthened cast thin films of chemically synthesized catecholamine polymers with glucose oxidase effectively entrapped., *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 26, 2311-2316.
2. Yehezkeli, O., Tel-Vered, R., Raichlin, S., Willner, I., Nano-engineered flavin-dependent glucose dehydrogenase/gold nanoparticle-modified electrodes for glucose sensing and biofuel cell applications., *ACS Nano.* **2011**, 5, 2385-2391.
3. Sakai, H., Nakagawa, T., Tokita, Y., Hatazawa, T., Ikeda, T., Tsujimura S., Kano, K., A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions., *Energy Environ. Sci.* **2009**, 2, 133-138.

4. Wang, J. Y., Nien, P. C., Chen, C. H., Chen, L. C., Ho, K. C., A glucose bio-battery prototype based on a GDH/poly(methylene blue) bioanode and a graphite cathode with an iodide/tri-iodide redox couple., *Bioresour. Technol.* **2012**, 116, 502-506.
5. Zayats, M., Katz, E., Baron, R., Willner, I., Reconstitution of apo-glucose dehydrogenase on pyrroloquinoline quinone-functionalized au nanoparticles yields an electrically contacted biocatalyst., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12400-12406.
6. Zhu, Z., Wang, Y., Minteer, S. D., Zhang, Y. P., Maltodextrin-powered enzymatic fuel cell through a non-natural enzymatic pathway., *J. Pow. Sou.* 2011, 196, 7505-7509.
7. Zhu, Z., Sun, F., Zhang, X., Zhang, Y. H., Deep oxidation of glucose in enzymatic fuel cells through a synthetic enzymatic pathway containing a cascade of two thermostable dehydrogenases., *Biosens. Bioelectron.* 2012, 36, 110-115.
8. Adachi, O., Moonmangmee, D., Toyama, H., Yamada, M., Shinagawa, E., Matsushita, K., New developments in oxidative fermentation., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 60, 643-653.

付録

培地および溶液

使用した培地および溶液の組成は Table 1 に示した。

Table 1

プレート作製時は、以下の組成に2%のAgar を加えた。

LB 培地 (1 L)

トリプトン	10 g
乾燥酵母エキス	5 g
塩化ナトリウム	5 g
アンピシリン (100 mg/mL)	1 mL
またはカナマイシン(20 mg/mL)	2.5 mL

Tf 培地 (1 L, pH 7.2)

トリプトン	20 g
乾燥酵母エキス	5 g
硫酸マグネシウム	5 g

Tfb1 培地 (0.5 L, pH 5.8, フィルター滅菌)

酢酸カリウム	1.47 g
塩化ルビジウム	6.05 g
塩化カルシウム	0.47 g
塩化マンガン	4.95 g
グリセロール	75 mL

Tfb2 培地 (0.5 L, pH 6.5, フィルター滅菌)

MOPS	1.05 g
塩化カルシウム	5.51 g
塩化ルビジウム	0.60 g
グリセロール	75 mL

PDA 培地 (1 L)

Potato Dextrose Agar	20 g
----------------------	------

DPY 培地 (1 L)

グルコース	30 g
塩化カリウム	2 g
リン酸二水素カリウム	1 g
硫酸マグネシウム7水和物	0.5 g
ペプトン	10 g
乾燥酵母エキス	5 g

1.2 M ソルビトール下層培地 (1 L)

グルコース	20 g
10×Cz-Dox	100 mL
ソルビトール	218.6 g
精製 Agar	15 g (Top agarとして用いる場合は7 g)

CDNO₃ 培地 (1 L)

グルコース	20 g
10×Cz-Dox	100 mL
塩化ナトリウム	10 g
精製 Agar	15 g
100 × 微量元素	100 µl (フィルター滅菌)

10 × Cz-Dox (pH 5.5)

硝酸ナトリウム	20 g
リン酸二水素カリウム	10 g
塩化カリウム	5 g
硫酸マグネシウム7水和物	5 g

Solution C (1 L)

アクリルアミド	290 g
メチレンビスアクリルアミド	10 g

4 × Separation Buffer (1 L, pH 8.8)

10% SDS	40 mL
トリスヒドロキシアミノメタン	181.72 g

SDS-PAGE ゲル（一枚あたり）

[15 % 分離用ゲル]

Solution C	3.0 mL
4 × Separation Buffer	1.5 mL
蒸留水	1.5 mL
10 % APS	100 μ L
TEMED	10 μ L

[濃縮用ゲル]

Solution C	450 μ L
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	375 μ L
10 % SDS	30 μ L
蒸留水	2.145 mL
10 % APS	30 μ L
TEMED	3 μ L

TALON Buffer(1 L, pH 7.0~8.0)

リン酸二水素ナトリウム・二水和物	7.8 g
塩化ナトリウム	8.8 g

透析 Buffer(5 L, pH 7.5~8.0)

リン酸二水素ナトリウム・無水和物	11.98 g
塩化ナトリウム	43 g

10 × PBS Buffer(1 L)

塩化ナトリウム	80 g
塩化カリウム	2 g
リン酸水素二ナトリウム・十二水和物	29 g
リン酸二水素カリウム	2 g

Tween 20 buffer (100 mL)

MOPS	1.046 g
塩化ナトリウム	0.8766 g
Tween 20	0.1 %

タンパク質保存 buffer (100 mL, pH 7.9)

MOPS	0.209 g
塩化カリウム	0.373 g
EDTA	0.0292 g
グルセロール	10 %

総括

本論文のまとめおよび今後の展望

本論文においては、Sortase A (SrtA)を用いたタンパク質修飾技術に着目し、それを用いたタンパク質の固定化方法の開発とその応用を目指し、研究を進めた。一般的に、タンパク質は、微粒子や電極に固定化されたような修飾を受けた状態であるバイオコンジュゲートとして用いられることが多いが、従来の化学修飾法や物理吸着を用いた修飾法では、タンパク質に部位特異的に修飾を加えることができず、タンパク質の機能が損なわれてしまうような副反応が生じてしまう可能性があった。そこで、本研究では、近年注目を集めている酵素を用いたタンパク質修飾法、その中でもSrtAを用いた技術に着目した。SrtAを用いることでLP tagおよびG tagの間で部位特異的に連結反応を起こすことができ、本反応を利用することで、タンパク質の機能を損なうことなく、修飾を加えることができるのではないかと考えた。*Staphylococcus aureus*由来のSrtA (SrtAsa)が最も盛んに研究されているが、多様な微生物中にも存在するSrtAの中から、SrtAsaの他にもタンパク質修飾に有効に利用できるものがあるのではないかと考え、実際にスクリーニングを行うことで、タンパク質修飾に応用可能な新規SrtAを発見した。また、SrtAsaを用いて、ビオチンと非常に強固な結合能をもつStreptavidin (Stav)とタンパク質との複合体を調製することで、Stav-ビオチン結合を介してタンパク質を部位特異的に配向固定化する手法の開発に成功した。続いて、Stavをタンパク質固定化の足場として捉えることで、ビオチン結合能、SrtA修飾を組み合わせたタンパク質の同時固定化技術の開発にも成功した。

また、本研究では、固定化酵素や酵素固定化電極といった「バイオマスからの有用物質やエネルギー生産」を指向した技術に応用できるようなタンパク質修飾技術の開発に焦点を当てた。本研究では、セルロース分解酵素であるセルラーゼに着目し、SrtAを用いてこれらを配向固定化することで固定化酵素としての性能を向上させることに成功した。また、第1章において開発に成功したタンパク質の同時固定化技術を利用して、人工セルロソームを構築し、より高効率でセルロースを分解することのできる固定化酵素の開発研究に成功した。更に、応用例の一つとして、バイオ燃料電池とよばれるタンパク質複合デバイスにも着目した。固定化する酵素の新しい組み合わせを提案することで、利用可能な燃料の多様化およびグルコース1分子あたりからとれる電流値の増加に成功した。しかしながら、得られた電池性能が十分ではないことから、多種類からなる酵素を同時に固定化するような電極では、それぞれの酵素の固定化配向が性能に非常に大きく影響することが示唆された。そのため、今後、本研究において開発した配向固定化法を駆使することで、電極自体の性能向上を目指したアプローチの開発が今後重要になると考えられる。

論文一覧

序章

- ◇ Matsumoto, T., Tanaka, T., Kondo, A., Enzyme-mediated methodologies for protein modification and bioconjugate synthesis., *Biotechnol. J.* **2012**, 7, 1137-1146. (Review)

第1章

- ◇ Matsumoto, T., Takase, R., Tanaka, T., Fukuda, H., Kondo, A., Site-specific protein labeling with amine-containing molecules using *Lactobacillus plantarum* sortase., *Biotechnol. J.* **2012**, 7, 642-648.
- ◇ Matsumoto, T., Sawamoto, S., Sakamoto, T., Tanaka, T., Fukuda, H., Kondo, A., Site-specific tetrameric streptavidin-protein conjugation using sortase A., *J. Biotechnol.* **2011**, 152, 37-42.
- ◇ Matsumoto, T., Tanaka, T., Kondo, A., Sortase A-catalyzed site-specific coimmobilization on microparticles via streptavidin., *Langmuir* **2012**, 28, 3553-3557.

第2章

- ◇ Matsumoto, T., Hata, Y., Tanaka, T., Kondo, A., Oriented-immobilized cellulase on microparticles using sortase A-mediated technique for efficient degradation of cellulose., *under preparation*.
- ◇ Yamamoto, K., Matsumoto, T., Shimada, S., Tanaka, T., Kondo, A., Starchy biomass-powered enzymatic biofuel cell based on amylases and glucose oxidase multi-immobilized bioanode., *N. Biotechnol.* **2013**, 30, 531-535.
- ◇ Matsumoto, T., Shimada, S., Yamamoto, K., Tanaka, T., Kondo, A., Two-Stage Oxidation of Glucose by an enzymatic bioanode, *revised*.

謝辞

本研究を遂行し博士論文としてまとめるにあたり、指導教員の本学工学研究科近藤昭彦教授には 5 年半という長きにわたりご指導を賜りました。研究に対する姿勢や考え方に関して、熱意をもってご教授して頂きました。深く感謝の念を申し上げます。

本研究の論文審査において、同研究科西野孝教授、山地秀樹教授、田中勉准教授には御親切なるご教授、御助言を賜りました。謹んで謝意を表します。

研究室において、実験に関する細かいご指導、研究の方向性に関する議論、論文の書き方など私が本論文をまとめるにあたり懇切丁寧にご教授して頂きました田中勉准教授に心から御礼申し上げます。

また、実験を行うにあたり、数々の御指導・ご協力を頂きました同研究室の山田亮祐助教(現 大阪府立大学工学研究科助教)、野田修平博士(現 理化学研究所環境科学研究センター特別研究員)、澤本詩織氏、山本一寛氏、嶋田翔太氏、秦悠斗氏、平林郁人氏をはじめとする同研究室の皆さま方には心より感謝申し上げます。

最後に、研究を遂行するにおいて、私の研究生活を陰ながら暖かく支えてくれた家族に感謝致します。

松本 拓也