



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。



論文内容の要旨

氏 名 _____ 松本 拓也 _____

専 攻 _____ 応用化学専攻 _____

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

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

指導教員 _____ 近藤 昭彦 _____

(注) 2, 000 字～4, 000 字でまとめること。

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。ここで、タンパク質とタンパク質同士を連結する、あるいはタンパク質をガラスなどの基盤に固定化するための、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重要な要素の一つである。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。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。また、血糖値センサーの基本原理は、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などを電極上へ固定化することからなる。このように、タンパク質は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い。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。

一般的に、タンパク質は熱や有機溶媒などに弱く、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、常温下で特定の官能基と反応する架橋剤を用いる手法がほとんどである。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。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。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修飾法である酵素修飾法に着目した。

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。本論文では特に、Sortase A (SrtA) と呼ばれるペプチド転移酵素に着目した。SrtA はグラム陽性細菌に存在する酵素であり、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役割をもつ。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。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。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」が可能なのが酵素修飾法を用いる大きな利点として挙げられる。酵素修飾法では、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ている 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。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に応用し、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開発への応用展開を指向した。

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、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。

ここで、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がほとんどである。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、実際にそれらを検討した例あるいは手段自体がほとんどない。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展開を指向した研究を行った。

第 1 章において、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、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を行った。モデルとして固定化した酵素（グルコースオキシダーゼおよび西洋わさびペルオキシダーゼ）はそれぞれ、化学修飾法で固定化した場合と比較しても、高い酵素活性を維持していた。

第 2 章においては、SrtAsa を用いたタンパク質の配向固定化を行うことで、実際にタンパク質複合デバイスの性能向上を目指した。まず、セルロース分解酵素であるセルラーゼに着目し、これらを配向固定化することによる固定化酵素の性能の向上を目指した。エンドグルカナーゼ (EG) および β -グルコシダーゼ (BGL) を G tag を修飾した微粒子上に SrtAsa を用いて配向固定化したところ、化学修飾法を用いてアミノ基特異的に EG、BGL を固定化した微粒子と比較して、配向固定化を行った場合の方が高い酵素活性を維持していた。また、第 1 章において開発に成功した Streptavidin を足場と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した。本技術を用いて微粒子上に EG および BGL を同時固定化することで、連続的にセルロースを分解する酵素をそれぞれ近接させることができるため、EG および BGL を別々の微粒子に固定化した場合よりも、効率よくセルロースを分解することができた。

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。酸化還元酵素が固定化された電極で構成される酵素バイオ燃料電池は、固定化する酵素の組み合わせを変えることで、様々な有機物を燃料とすることができる新たなエネルギーデバイスとして注目を集めている。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（でんぷんを燃料として利用できる電極）および電極性能の向上（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。実用化を指向した場合、現状では、得られた電池性能が十分ではないことや、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。

SrtA を用いることで、タンパク質を部位特異的に固定化（配向固定化）する新たな方法の開発に成功した。また、実際に酵素を配向固定化することで、固定化酵素の性能を向上させることに成功し、酵素固定化電極の開発においても酵素の固定化配向の制御が性能を向上させるために有効な手段であることが示唆された。以上の結果から、本研究で開発したような SrtA を用いた配向固定化法は、今後、タンパク質複合デバイスの性能向上のための研究に大きく貢献できるものと期待できる。

