



静岡県立大学
愛媛大学
科学技術振興機構 (JST)

タンパク質を効率的に修飾できる酵素「AcSE5」を開発

～次世代バイオ医薬品の開発、タンパク質・酵素の産業利用を加速～

＜発表のポイント＞

- 祖先配列再構成法を用いて、高機能なタンパク質連結酵素 (AcSE5; 祖先型ソルターゼ E) の開発に成功しました。
- AcSE5 は、高い連結活性に加え、様々な求核剤 (トリグリシン、アルキルアミン) を基質にできることが特徴です。
- AcSE5 を用いて、蛍光タンパク質を含む、機能的なタンパク質を、効率的に抗体に連結することに成功しました (修飾抗体)。
- AcSE5 を用いて、固定化担体に効率的に酵素を連結することに成功しました (固定化酵素)。固定化された酵素は、長期間高い活性を保持していることを確認しました。
- AcSE5 は、タンパク質や酵素に、様々なタンパク質、酵素、化合物を、穏やかな反応条件下で連結することができます。今後、次世代のバイオ医薬品 (抗体など)、タンパク質・酵素の産業利用の加速が期待できます。

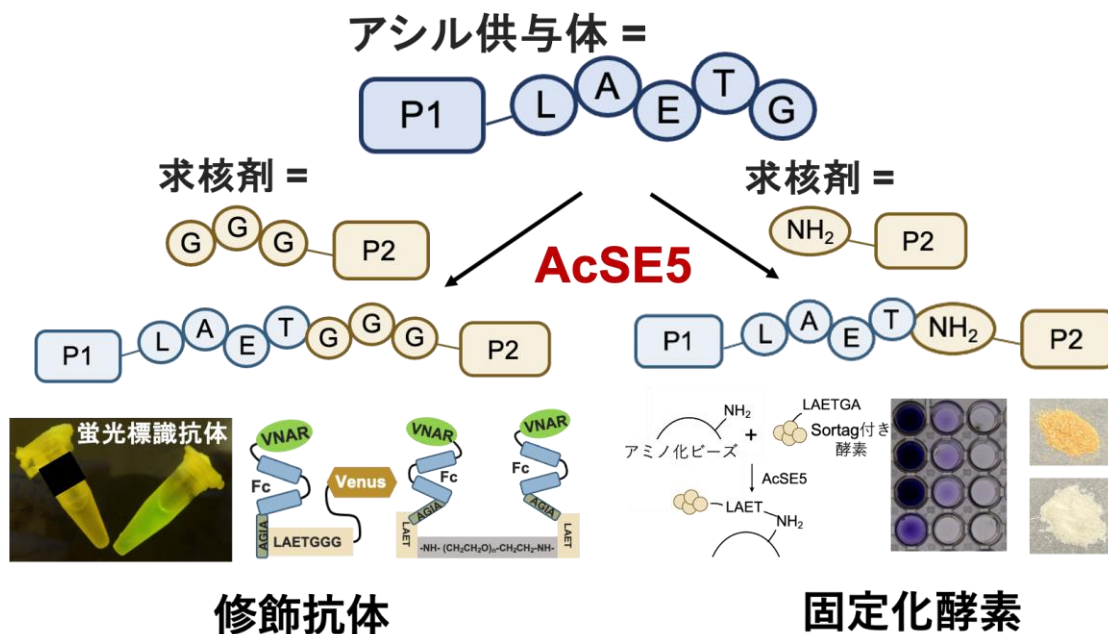


図 1. 高機能化祖先型ソルターゼ E (AcSE5) の概要。AcSE5 は、アシル供与体(タンパク質)に、様々な求核剤(タンパク質を含む多様な化合物)を連結できるのが特徴。図のように、抗体を蛍光タンパク質で修飾したり、酵素を固定化したりすることができる。

〈概要〉

生物を構成する分子の1つであるタンパク質は、生体内で多様な機能を発揮します。例えば抗体は、体内に侵入した病原性のウイルスや微生物などの抗原を認識し、免疫を誘導する引き金となります。また酵素は、生体内の代謝を担う重要な役割を果たしています。これらタンパク質を、医療や産業応用につなげるための研究が世界的に進められています。タンパク質の機能を改変することができれば、応用利用の幅が広がります。

機能改変を達成する上で、タンパク質を修飾することは有効なアプローチの1つです。ターゲットのタンパク質に、その他の機能性分子を連結することで、多様な機能をタンパク質に付与することができます。タンパク質を修飾する様々な方法がありますが、酵素を用いた方法は、タンパク質の特定の部位に修飾することができ、また穏やかな条件で反応を行えることが特徴です。目的タンパク質の変性などを抑えつつ、様々な化学修飾を加えることが期待できます。

静岡県立大学の中野 祥吾准教授、伊藤 創平准教授、千菅 太一助教、宮田 梓氏（博士前期課程2年）、神戸 彬光氏（研究当時：博士前期課程2年）および愛媛大学の竹田 浩之准教授らの研究チームは、独自のアミノ酸配列データマイニング法^{注1}と祖先配列再構成法^{注2}を融合した手法を用いて、タンパク質連結酵素である祖先型ソルターゼ E (AcSE5) の開発に成功しました。本酵素を用いて蛍光標識抗体をはじめとする修飾抗体や、固定化酵素の作成に成功しました。本酵素は従来の酵素よりも様々な求核剤を基質にできるという特徴を有しており、抗体修飾などに用いられる一部アルキルアミンを直接、アシル供与体と連結できることを実験的に確かめています。

今回の成果を用いて、様々なタンパク質と化合物を連結した修飾タンパク質を合成することが可能となり、次世代抗体や酵素材料の開発を加速できることが期待されます。本成果は2024年2月20日に米国の科学雑誌「*ACS Catalysis*」に掲載されました。また本成果の一部について特許出願を完了しています（特願2023-066172）。

〈研究の背景と経緯〉

抗体や酵素などのタンパク質は生物を構成する生体分子の1つであり、多様な機能を発揮します。抗体は、体内に侵入した病原性のウイルスや微生物などの抗原を認識し、免疫を誘導する引き金となります。また酵素は、生体内における化合物の分解・合成に関わる代謝において中心的な役割を果たします。これらタンパク質を医療や産業応用につなげるための研究が世界的に進められています。例えば抗体と薬物を連結させた抗体薬物複合体は次世代医薬品として期待されています。また樹脂に酵素を保持させた固定化酵素は、生体触媒を利用したフロー合成系を確立する上で必要になります。

このようにタンパク質を応用利用するには、その機能を用途に応じて改変する必要があります。これは研究対象とするタンパク質を他の機能性分子で修飾し、多様な機能を付与した修飾タンパク質を調製することで解決が可能です。修飾タンパク質を作る方法は複数存在しますが、中でもタンパク質連結酵素を用いた方法は、穏やかな反応条件下にて部位特異的にタンパク質を修飾することができます。目的タンパク質の機能を保持しつつ、様々な化学修飾を加えることが期待されています。

＜研究の内容＞

これまでに数多くのタンパク質連結酵素が開発されていますが、本研究ではソルターゼという酵素に注目しました。ソルターゼは主にグラム陽性菌で発見されており、その細胞外ドメインは、識別シグナル配列を C 末端に有するタンパク質 (図 1 の P1) をアシル供与体として認識してチオアシル中間体を作ります。そしてトリグリシン配列を N 末端に有するタンパク質 (図 1 の P2) を求核剤として連結反応を進行させ、修飾タンパク質を合成します。これまでに高活性化ソルターゼ A (eSrtA) が開発され、修飾タンパク質の調製に利用されてきました。一方で eSrtA は連結反応にカルシウムを必要とすること、識別シグナル配列が LPXT (X は任意のアミノ酸。L, P, T はアミノ酸一文字表記) に限定されることが課題となっています。その他の識別シグナル配列を認識できるソルターゼも複数報告されていますが、活性が低いことが課題として挙げられています。

近年発見されたソルターゼ E (SrtE) は、連結反応にカルシウムを要求しません。そのため、カルシウム濃度の低い環境下、例えば細胞内でのタンパク質修飾が可能です。また、LPXT に加えて LAXT 配列を識別シグナル配列として認識するなど修飾タンパク質の合成に際して有用な機能を持っています。本研究チームは報告された SrtE の細胞外ドメインのアミノ酸配列を元に、独自開発したアミノ酸配列データマイニング法と祖先配列再構成法を組み合わせることで、祖先型ソルターゼ E (AcSE5) の開発に成功しました (図 2A)。AcSE5 は鑄型 SrtE と比べて、30 分あたりの連結効率が 30%程度向上し (図 2B)、かつ酵素効率 (k_{cat}/K_m 値) が 1.7 倍向上するなど、その機能改善が確認されました。また AcSE5 は従来報告されていたトリグリシンを N 末端に有する化合物に加え、一部のアルキルアミンを求核剤として利用できることを確かめています。

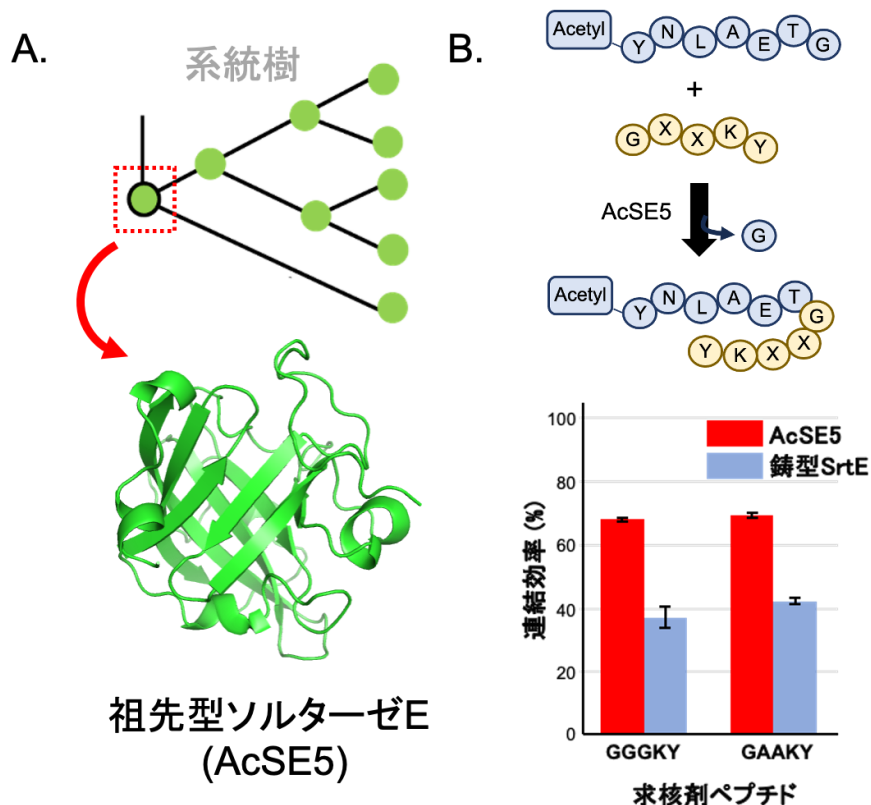


図 2. 祖先型ソルターゼ E (AcSE5) のモデル構造 (A)。構造は AlphaFold2 で予測した。AcSE5 と鑄型 SrtE の連結効率の比較 (B)。反応時間は 30 分で行った。

上述した AcSE5 の特性を活かすため 2 つの実験を実施しました。第一に修飾抗体の作成に取り組みました。C 末端に識別シグナル配列を付与したサメ由来シングルドメイン抗体 (VNAR)^{注3)} をアシル供与体とし、N 末端にトリグリシン配列を有する黄色蛍光タンパク質 (Venus) を求核剤として混合、AcSE5 と反応させることで蛍光標識 VNAR を作成できました (図 3A)。また求核剤をポリ (エチレングリコール) ジアミンに変更することで、求核剤の両末端に VNAR が結合した連結抗体の作成に成功しています (図 3A)。第二の応用例として、固定化酵素の作成に取り組みました。識別シグナル配列を C 末端に付与した祖先型 L-アミノ酸酸化酵素 (HTAncLAAO2)^{注4)} とアミノ化ビーズ、AcSE5 を混合して固定化酵素を作成、その酵素活性を評価しました。結果、HTAncLAAO2 がビーズに固定化されていることを確認できました (図 3B)。取得した固定化 HTAncLAAO2 を用いて、図 3B に示した反応スキームを用いて D-アミノ酸誘導体の光学分割を実施しました。結果、計 3 つの D-フェニルアラニン (D-Phe) 誘導体を高い光学純度 (>99% ee) かつ単離収率で取得することに成功しました (図 3B)。固定化酵素は少なくとも 10 回の再利用では活性が減少しないことを確認しています。

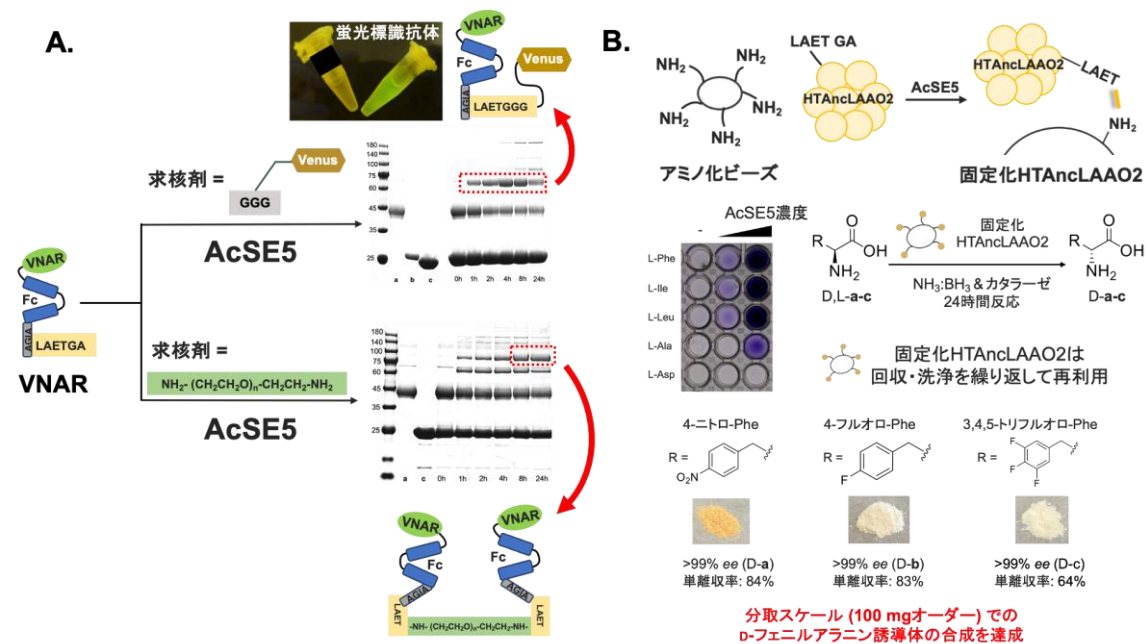


図 3. AcSE5 を利用した修飾抗体の作成 (A)。 C 末端に識別シグナル配列 (LAETGA) を付与した VNAR をアシル供与体として利用し、AcSE5 による連結反応を実施した。求核剤として緑色蛍光タンパク質 (GGG-Venus) およびポリ (エチレングリコール) ジアミンを利用した反応条件下で、修飾抗体を合成できていることを SDS-PAGE および質量分析により確認した。**AcSE5 を用いた固定化酵素の調製 (B)。** C 末端に識別シグナル配列を付与した HTAncLAAO2 を調製し、これをアミノ化ビーズおよび AcSE5 と混合して固定化 HTAncLAAO2 を作成した。固定化 HTAncLAAO2 の活性を確認することができたため、これを用いた D-アミノ酸誘導体の光学分割を、分取スケールにて実施した。結果、計 3 つの D-Phe 誘導体について、高い光学純度 (>99% ee) かつ単離収率 (>64%) で取得することに成功した。固定化 HTAncLAAO2 は反応後に回収・洗浄を行うことで繰り返し利用でき、耐久性の高さを証明することができた。

<今後の展開>

AcSE5 は eSrtA と異なる識別シグナル配列を認識し、カルシウム非依存的に連結反応を進行させることができます。また AcSE5 はトリグリシンを N 末端に持つ化合物に加え、一部のアルキルアミンを求核剤として利用できます。本酵素の幅広い基質特異性と反応性の高さを活かすことで、修飾抗体や固定化酵素など、多様な修飾タンパク質を合成できることが期待されます。

<用語解説>

注1) アミノ酸配列データマイニング法: 研究対象となるタンパク質のホモログ配列を、ある基準に沿って分類することで、新しい機能を有するタンパク質を得るための方法。配列相同性ネットワークによる分類や、モチーフ配列による分類が今日、広く用いられている。

注2) 祖先配列再構成法: 類縁タンパク質の複数のアミノ酸配列データの多重配列データと系統樹データを入力値とし、系統樹上の各節に位置する祖先配列を推定・復元する手法。復元した祖先配列は高い熱安定性や広い基質選択性を示すなど、酵素応用を目指す上で有利な機能を獲得することがある。

注3) サメ由来シングルドメイン抗体 (VNAR): サメの特殊抗体の抗原結合部位を切り出して作製する最小の小型抗体。他の抗体とは異なる抗原結合様式や、高い安定性、改変のしやすさなどから、治療薬や診断薬、センサーなどへの応用が期待されている。

注4) L-アミノ酸酸化酵素 (HTAncLAAO2): 広く L-アミノ酸を基質とし、その α -アミノ基を酸化してイミノ酸を生成する反応を触媒する FAD 依存型酸化酵素の 1 つ。特異性の高い L-アミノ酸酸化酵素はアミノ酸定量用酵素として、選択性の広い L-アミノ酸酸化酵素は D-アミノ酸誘導体などの物質生産への応用が期待されている。本研究では、極めて高い耐熱性を有する後者の酵素を HTAncLAAO2 として定義した。

<論文情報>

(雑誌) *ACS Catalysis*

(題目) Design of Ancestral Sortase E that is Applicable in Protein Biomaterial Synthesis

(著者) Azusa Miyata¹, Taichi Chisuga¹, Akira Kambe¹, Ryo Miyata, Yui Kawamura, Hiroyuki Takeda*, Sohei Ito* and Shogo Nakano*

(DOI) 10.1021/acscatal.4c00487

(URL) <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acscatal.4c00487>

(備考) 1: 共同筆頭著者, *: 責任著者

<特許情報>

(出願番号) 特願 2023-066172

(出願日) 2023 年 4 月 14 日

(発明の名称) ペプチドライゲーション活性を有するポリペプチド及びその利用

(発明者) 竹田 浩之, 中野 祥吾, 伊藤 創平, 宮田 梓

<研究助成>

この研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発 (課題番号 21ae0121018)、科学技術振興機構 (JST) さきがけ (課題番号 JPMJPR20AB) および日本学術振興会 (JSPS) 科研費 基盤研究 C (課題番号 21K05395, 23K04510) の支援により実施されました。

<お問い合わせ先>

<研究に関すること>

中野 祥吾 (ナカノ ショウゴ)

静岡県立大学 食品栄養科学部 准教授

〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 52-1

Tel: 054-264-5582

E-mail: snakano(ここに@を入れる)u-shizuoka-ken.ac.jp

伊藤 創平 (イトウ ソウヘイ)

静岡県立大学 食品栄養科学部 准教授

〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 52-1

Tel: 054-264-5576

E-mail: itosohei(ここに@を入れる)u-shizuoka-ken.ac.jp

竹田 浩之 (タケダ ヒロユキ)

愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 准教授

〒790-8577 愛媛県松山市文京町 3

Tel: 089-927-8285

E-mail: takeda.hiroyuki.mk(ここに@を入れる)ehime-u.ac.jp

<JST の事業に関すること>

安藤 裕輔 (アンドウ ユウスケ)

科学技術振興機構 戦略研究推進部 グリーンイノベーショングループ

〒102-0076 東京都千代田区五番町 7 K's 五番町

Tel: 03-3512-3526 Fax: 03-3222-2066

E-mail: presto(ここに@を入れる)jst.go.jp

<報道担当>

科学技術振興機構 広報課

〒102-8666 東京都千代田区四番町 5 番地 3

Tel: 03-5214-8404 Fax: 03-5214-8432

E-mail: jstkoho(ここに@を入れる)jst.go.jp