

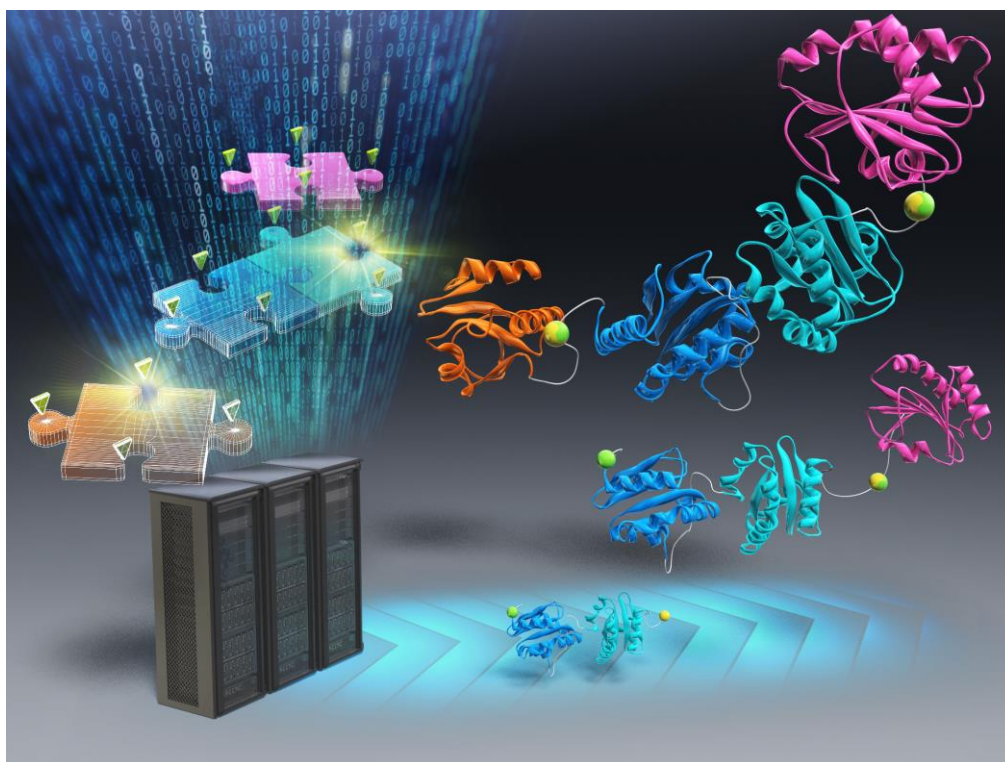
タンパク質の高効率・多段階連結反応を実現 —実験と計算の協働による新たなタンパク質標識戦略—

概要

京都大学複合原子力科学研究所 奥田綾 助教、清水将裕 研究員、井上倫太郎 准教授、裏出令子 特任教授、杉山正明 教授らの研究グループは、実験と計算の協働による酵素を用いた多段階のタンパク質連結反応手法の開発に成功しました。

多くのタンパク質は、複数の部位（ドメイン）が連結した構造を持っており、ドメイン同士の配置や運動によって機能を発揮します。このドメイン配置や運動を測定するために注目ドメインに標識を施した試料が必要となります。そこで、本研究では個別に調製したドメインを連結することでドメイン標識試料を作り出す技術の開発に取り組みました。その結果、これまで連結不可能であったタイプのタンパク質において、高効率反応位置を複数候補から見つけ出すことで、酵素を用いた三つのドメインの連結反応に世界で初めて成功しました。さらに、実験結果を基に分子動力学計算を用いた候補位置の連結効率を示す指標の確立も行いました。今後は、この指標による高効率の連結位置の予測が可能となり、実験上の労力の大幅な軽減が期待されます。本技術は、構造解析のみならずドメイン連結を用いた新たなタンパク質工学の発展にも貢献できます。

本成果は、2022年11月8日にドイツの国際学術誌「Angewandte Chemie International Edition」にオンライン掲載されました。



1. 背景

生命の構成因子であるタンパク質は、小さなレベルから順に見ると、数十の原子からなるアミノ酸、数十～数百のアミノ酸が一塊のブロックを構成したドメイン [注 1]、そして複数のドメインが連なった構造全体といった多数の階層から出来ています。そして、各階層には分子運動が存在し、それらの連携によりタンパク質の生理的機能が発揮されます。このタンパク質の「生理機能発揮」 = 「分子マシンの動作」原理を理解するには、各階層の運動を解明する必要がありますが、階層の中でもドメインの動きは、現在の構造解析手法を駆使しても観測することが非常に困難です。したがって、このドメイン観測問題が克服できれば、タンパク質が機能を発揮するメカニズムの理解が大きく進展すると期待されています。

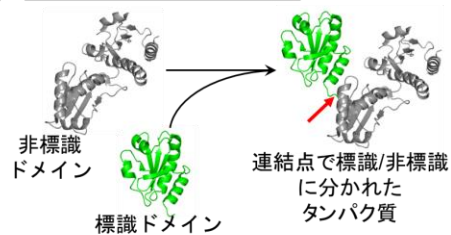
タンパク質のドメインの配置や運動の解析のためには、注目するドメインに標識を施しその運動を観測することが有効です。このドメイン標識をしたタンパク質の作製には、まず標識されたドメインと非標識のドメインを別々に作製し、その後それらを連結する「タンパク質ライゲーション」 [注 2]の技術が必須です。更に、多段階でのライゲーション反応が可能になれば、任意に標識を施したタンパク質も作製でき (図 1)、複雑なドメイン運動までも観測が可能になります。したがって、「多段階ライゲーション」が実現できれば、中性子散乱測定、核磁気共鳴、蛍光共鳴エネルギー移動といった同位体標識が有効な様々な計測技術を用いて、タンパク質の機能発現メカニズムの解明が進むと期待されています。

しかし、タンパク質ライゲーションでは、2つのタンパク質を繋ぎ合わせる = 「1 段階ライゲーション」の例は多数報告されていますが、3つ以上のタンパク質を繋ぎ合わせる = 「多段階ライゲーション」の現実的な成功例はほとんど報告されていません。これは、多段階ライゲーションで十分な最終産物を得るためには全段階で反応効率が十分に高い必要がありますが、このことが非常に困難であるからです。加えて、ライゲーション反応に伴い、本来の構造と機能を失わないことも必須です。したがって、多段階のタンパク質ライゲーションには、機能維持の条件を満たしつつ、全ての反応を効率良く行う技術開発が重要です。本研究では、実験と計算の協働により、汎用的かつ実用的なタンパク質ライゲーションの手法の確立に取り組みました。

2. 研究手法・成果

我々は、4つのドメインが連なった構造を持つ ER-60[注 3]というタンパク質を例に多段階ライゲーションの研究に着手しました。まず、上述の条件を考慮して本来のタンパク質の構造を壊すこと(変性)を必要とせずライゲーションを実現するため、*Oldenlandia affinis* asparaginyl endopeptidase (*OaAEP*)というタンパク質に着目しました。*OaAEP* はアカネ科植物が持つ酵素であり、ペプチド結合[注 4]でタンパク質を繋ぎ合わせる

(a) 1段階ライゲーション反応



(b) 多段階ライゲーション反応

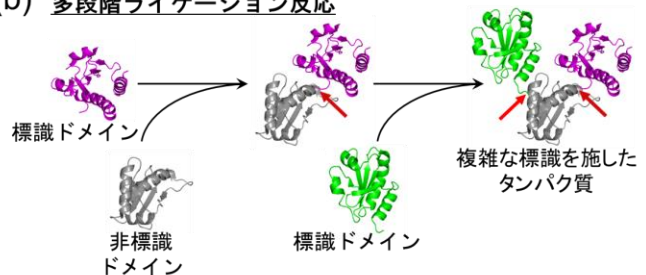


図 1. ライゲーション反応により作製可能な標識タンパク質の模式図。(a) 1 段階ライゲーション反応では連結点を境に一方が標識あり・他方が標識なしのタンパク質しか作製できませんが、(b) 2 段階以上のライゲーション反応では複雑な標識を施したタンパク質の作製が可能です。ただし、標識のパターンに応じた多段階のライゲーション反応が必須です。

ことができます。まず、ライゲーションのためにはドメイン構造を壊すことの無いように、ライゲーション位置[注5]をER-60のドメイン間の境界領域に設計する必要があります。ただし、多段階ライゲーションの成功のためには、各ライゲーション段階での反応効率が十分に高い必要がありますが、どの位置でも高効率でライゲーションできる保障はありません。そこで、ライゲーション位置に応じた反応効率を調べるために、ER-60の2つのドメイン境界領域に複数のライゲーション位置を設計し(図2)、OaAEPを用いて一段階のライゲーション実験を行いました。その結果、反応効率はライゲーション位置によって大きく異なっていることが明らかとなり、ライゲーション位置の選択が非常に重要であることが明確に示されました。

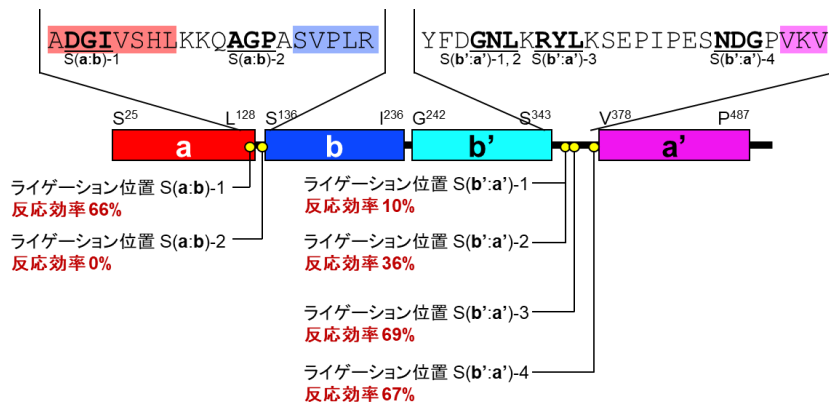


図2. ER-60のドメイン構造とライゲーション位置の模式図。ER-60はa, b, b', a'ドメインが繋がった構造を持っています。ライゲーション位置はaドメインとbドメインの間に2つ、b'ドメインとa'ドメインの間に4つ設計しました。

では、このライゲーション位置の違いによる反応効率の違いはどこから来るのでしょうか？私たちは「OaAEPが認識する配列がドメインの内部に埋もれている場合にはOaAEPがアクセスできずライゲーション反応は起こりにくくなる」と推測しました。そこで生体分子の振る舞いを計算シミュレーションにより追跡する分子動力学計算[注6]を実施し、それに基づいて認識配列の埋もれ具合を数値化する＝「埋もれ具合指標」を求める手法を考案しました。パラメータの検討の結果、考案した「埋もれ具合指標」で、実験が示したライゲーション効率をうまく説明することに成功しました。この「埋もれ具合指標」には実験結果を説明すること以上の意義があると考えています。例えば、実験を行う際に、複数のライゲーション位置を検討せずに、反応効率の低い”ハズレ”のライゲーション位置を選択してしまった場合、反応産物を十分に得ることができず、他の効率の高いライゲーション位置を探し直す必要があります。一方で、最初から実験により多数のライゲーション位置を検討することは非常に時間と労力を必要とします。しかし、考案した「埋もれ具合指標」に基づいてライゲーション位置ごとの反応効率を事前に予測すれば、最初から高効率の”アタリ”の位置を選択する可能性が高まり、ライゲーションタンパク質を作製する際の時間と労力を大幅に削減することが可能となります。実際、別のタンパク質(Protein Disulfide Isomerase)についてもこの指標を用いて高効率ライゲーションに成功し、「埋もれ具合指標」は「ライゲーション効率指標」として機能することを実証しました。

我々は、最終目的であるER-60の3つのドメインの2段階ライゲーションに、この指標により設定した効率の良いライゲーション位置を用いて成功しました(図3)。このように酵素を用いて変性を伴わずに多段階のドメインライゲーションを成功させた例は、世界的に類を見ないものです。

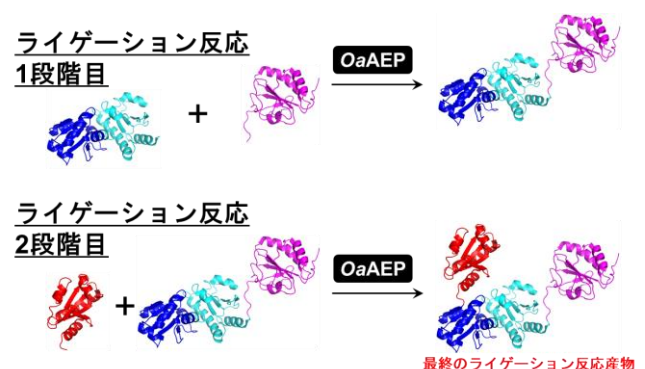


図3. ER-60の3つのドメインの2段階ライゲーション反応の模式図。

3. 波及効果、今後の予定

本研究で確立したライゲーション効率指標を用いることで、少ない時間と労力で高効率のライゲーション位置を選定することが可能です。したがって、ライゲーション技術により、容易に特定のドメインが安定同位体標識や蛍光標識されたタンパク質を作製することが可能となり、様々なタンパク質の構造解析手法への展開と応用が期待できます。さらに、標識だけでなく、様々な理由でタンパク質の全体を作製出来ないものを部分ごとに別々に調製し、ライゲーション反応により連結して全体を作製することも可能であり、タンパク質工学の分野での応用も期待できます。

一方、タンパク質によっては適切なライゲーション位置を設計しなければ反応産物が本来の生理機能を発現しない場合があるなどのタンパク質固有の難しさがあります。今後は、この指標を用いてどのようなタンパク質のドメインでも自由自在にライゲーションできるよう、計算予測に組み込む条件を増やし精密化することで、指標の精度向上と改善を進める予定です。

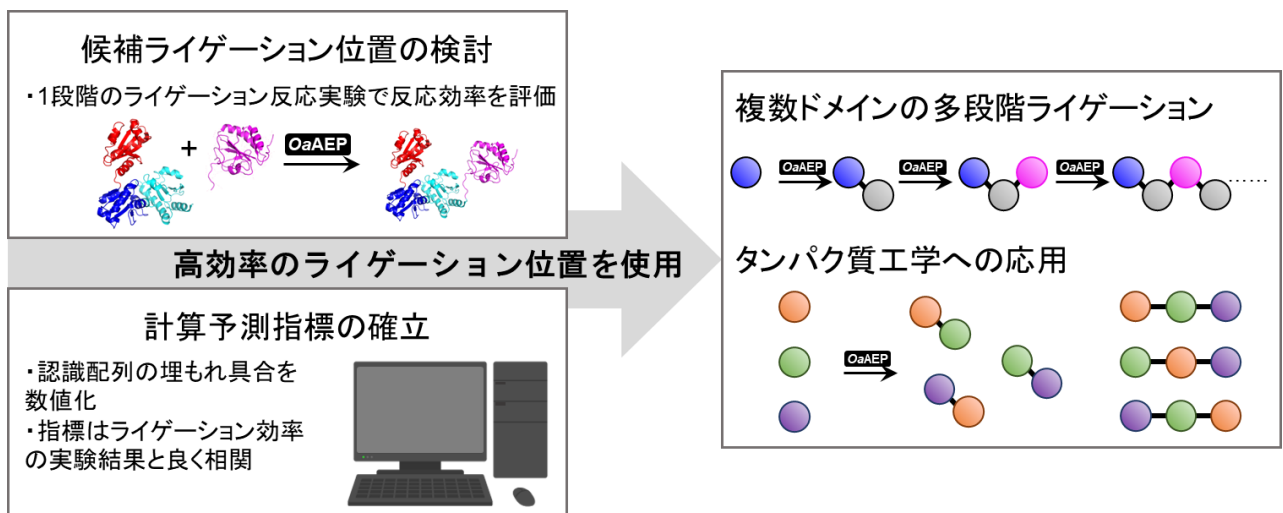


図 4. 本研究の概要と今後の展開。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、京都大学研究連携基盤次世代研究者支援、京都大学複合原子力科学研究所所内助成金、日本科学協会 笹川科学研究助成、日本学術振興会科学研究費補助金 研究活動スタート支援 (JP20K22629)、基盤研究 S (JP18H05229)、基盤研究 A (JP18H03681)、同基金 基盤研究 C (JP20K06579)、国際共同研究強化 B (JP19KK0071)、文部科学省 新学術領域研究 (JP18H05534)、日本医療研究開発機構 (AMED) 生命科学・創薬研究支援基盤事業 (BINDS)「生命科学と創薬研究に向けた相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化」の支援を受けて行われました。

<用語解説>

[注1] ドメイン：タンパク質の特定の機能や立体構造を持つひとかたまりの単位のことです。一つのドメインはおおよそ数十から数百アミノ酸残基がペプチド結合により繋がってできています。多くのタンパク質は複数のドメインが連なったマルチドメインタンパク質として存在しています。

[注2] タンパク質ライゲーション：タンパク質同士をペプチド結合もしくはその他の共有結合で人工的に繋ぎ合わせることを示します。本研究ではペプチド結合反応を進行させる酵素を用いてタンパク質のライゲーションを行いました。

[注 3] ER-60：ジスルフィド結合形成を伴うタンパク質の立体構造形成を担う酵素です。a, b, b', a'の4つのドメインから構成され、特に両端の a, a'ドメインに基質タンパク質のジスルフィド結合の形成と組み換え反応を行うアミノ酸残基が存在します。

[注 4] ペプチド結合：アミノ酸のアミノ基(-NH₂)と別のアミノ酸のカルボキシ基(-COOH)が水分子1つ取れて繋がった結合。タンパク質を構成するアミノ酸はペプチド結合により繋がっています。

[注 5] ライゲーション位置：ライゲーション反応を行うアミノ酸配列の位置のことを示します。本研究では酵素 OaAEP はタンパク質の C 末端のアスパラギン-グリシン-ロイシン (N-G-L)という3つのアミノ酸配列を認識し、G-L 配列を切断した後、N 末端のグリシン-ロイシン (G-L)配列とそれらを繋ぎ合わせます。

[注 6] 分子動力学法：古典力学に基づき、分子の運動を計算機上で再現するシミュレーション技法。

<研究者のコメント>

本研究は生化学と計算科学、それぞれ異なる目線でタンパク質を研究する複数の研究者が密に連携することで初めて達成されました。タンパク質のライゲーション技術は様々な展開が期待できる技術ですので、多分野の皆様からの面白いアイデアを募集しております。(奥田綾)

タンパク質断片を自在に連結できれば今までになかった新たな酵素を発明できるかもしれない、という一攫千金を夢見つつ、更に理論予測の精度を向上させる所存でございます。(清水将裕)

実験と計算のマリアージュにより新しい可能性のある世界を開拓できたことに幸せを感じています。(杉山正明)

<論文タイトルと著者>

タイトル：Efficient Multiple Domain Ligation for Proteins using Asparaginyl Endopeptidase by Selection of Appropriate Ligation Sites Based on Steric Hindrance (立体障害を考慮した連結サイト選択による酵素を用いたタンパク質における効率的なマルチドメインライゲーション)

著者：奥田綾[‡], 清水将裕[‡], 井上倫太郎, 裏出令子* 杉山正明*

京大複合研 (‡ These authors contributed equally, * Corresponding authors)

掲載誌：Angewandte Chemie International Edition

DOI：10.1002/anie.202214412, 10.1002/ange.202214412