

132. 改変 streptavidin を用いたタンパク質活性制御系の開発

寺井 琢也

*東京大学 大学院薬学系研究科 薬学専攻

Key words : 進化分子工学, タンパク質工学, ケミカルバイオロジー, 相互作用解析

緒言

放線菌由来タンパク質である streptavidin は、ビタミンの一種である biotin と非常に強い親和性 ($K_d \approx 1 \text{ pM}$) を有することから生物学研究の様々な場面において研究ツールとして汎用されている。例えば Perez らは、細胞内に融合タンパク質として発現させた streptavidin に対してその結合ペプチド (SBP) [1](#)) と biotin とを競合的に結合させることで目的タンパク質の細胞内局在を速やかに制御する系の開発を報告している [2](#))。しかしこの実験系においては、biotin と streptavidin との結合が生理的条件下で事実上不可逆であるため局在変化は一度のみしか引き起こすことが出来なかった。一方我々は最近、化合物スクリーニングを行うことにより biotin とは異なる骨格を有する streptavidin リガンド (ALiS) の開発に成功した。ALiS は 100 nM オーダーの解離定数と素早い結合・解離速度 ($k_{\text{off}} > 0.1 \text{ s}^{-1}$) を有し、かつ適度な脂溶性を持つため細胞内外を自由に行き来できる。従って、細胞内に発現させた streptavidin と SBP との結合を ALiS の添加および洗浄により繰り返し制御することが可能であった [3](#))。

特定の化合物または光依存的にタンパク質の細胞内局在や相互作用を制御することで標的分子の活性をコントロールする direct protein control (DPC) 法は、生体分子が細胞内で動的に織り成すネットワークを理解し制御するための重要な研究手法として近年注目されている [4](#))。我々が開発した ALiS と streptavidin を用いるシステムは新たな DPC 法として有用と期待される。しかし、本システムを実用的なものとするにはいくつかの課題が残っている。まず、ALiS の水溶性は現状不十分であり細胞にロードするためには有機溶媒が必要である。二つ目は、細胞内に存在する biotin が streptavidin に対して ALiS より強く結合する可能性がある。更に天然の streptavidin は 4 量体であり分子量が大きいいため、融合タンパク質として発現させられるのは細胞の一部に留まる。そこで本研究では、進化工学的手法によって ALiS との親和性が向上した単量体 streptavidin タンパク質を得ること、ならびに ALiS の水溶性を改善することにより、優れた細胞内タンパク質局在制御システムを開発することを目的とした。

方法、結果および考察

1. 親水性が向上した ALiS 誘導体の開発

化合物ライブラリーからのスクリーニングにより得られた ALiS-1 は $\text{Log P} = 4.2$ と脂溶性が高く、細胞実験において作用させるには最低でも 0.2% 以上の有機溶媒 (DMSO など) を培地に添加する必要がある。そこで我々は、既に取得していた ALiS-1 と streptavidin との共結晶構造解析結果 (図 1a) を基にドッキングシミュレーションによる分子設計を行い、図 1b に示す新たな誘導体を設計・合成した。この際、イオン性置換基の導入により分子の水溶性を高くしすぎると細胞膜を通過しなくなる可能性が高いため、化合物の $\text{cLogP} = 1 \sim 2$ 程度の範囲を狙った。合成は図 1c のように行った。

合成した各化合物について streptavidin との親和性を評価した結果、スルホンアミド構造を有する ALiS-3 が $K_d = 5.6 \mu\text{M}$ かつ $40 \mu\text{M}$ の溶解性を示したため (注: ALiS-1 は同一条件下で $10 \mu\text{M}$ までしか溶けない) 有望と考えられた。その後の検討により本化合物は細胞においても機能することが分かっている [5](#))。更に、次項で必要となる固相担体への固定化のためスルホンアミドの先に PEG リンカーを介してカルボキシ基を導入した化合物も合成した。

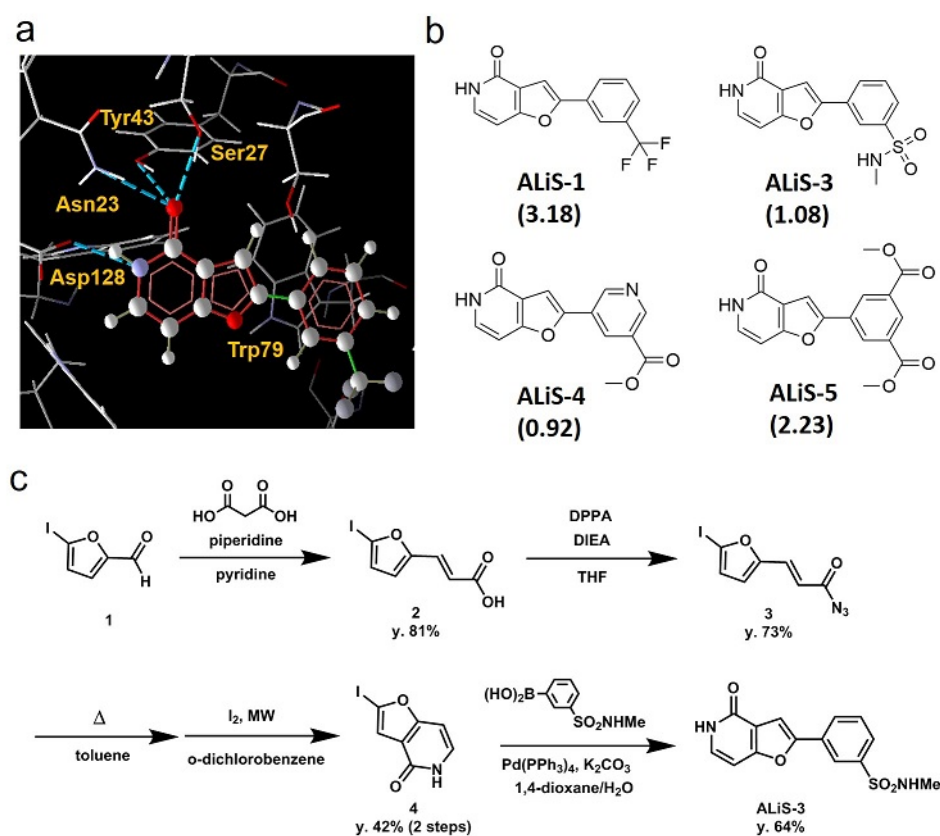


図1. 新規 ALiS 誘導体の設計と合成

a) ALiS-1 と streptavidin の相互作用 (PDB: 4Y59)。b) ALiS 誘導体の構造。3-5 は本研究で新たに開発したもの。括弧内は cLogP 値。c) ALiS-3 の合成スキーム。

2. 単量体 streptavidin 変異ライブラリーのセレクション

Streptavidin の改変についてはこれまでに多くの研究がなされており、例えば Park らは rhizavidin との fusion タンパク質を人工的に設計することで単量体 streptavidin (mSA) の開発を報告している⁶⁾。そこで本研究では彼らの知見を基に、進化工学的手法により mSA を更に改変することで ALiS との親和性の向上を目指した。具体的には error-prone PCR によって mSA をコードする DNA にランダム変異を導入することで、平均 4 アミノ酸程度の変異を有すると期待される約 10^{13} 種類の DNA ライブラリーを構築した。これを無細胞系で転写・翻訳し、共同研究者である根本らにより開発された cDNA display 法^{7,8)}による DNA・ポリペプチド対応付け技術を使ってセレクションを実施した(図 2a)。従来、cDNA display 分子の回収時には biotin・streptavidin 相互作用を利用したアフィニティー精製が行われてきたが、本研究の場合には翻訳産物である mSA が biotin に親和性を有するため oligo dT₂₅ ビーズを利用した方法へと変更した。結合標的としては、前述の ALiS-3 誘導体をレジンまたは磁気ビーズに固定化したものを利用した。また担体への非特異吸着による false positive を防ぐため、誘導体を固定化していない担体を陰性対照として用いた。担体からの溶出は ALiS を用いた競合により実施し、溶出した分子を次のサイクルに回した。代表的な泳動結果を図 2b に示す。セレクションは結合担体・洗浄条件を変えて 6 サイクル実施した。

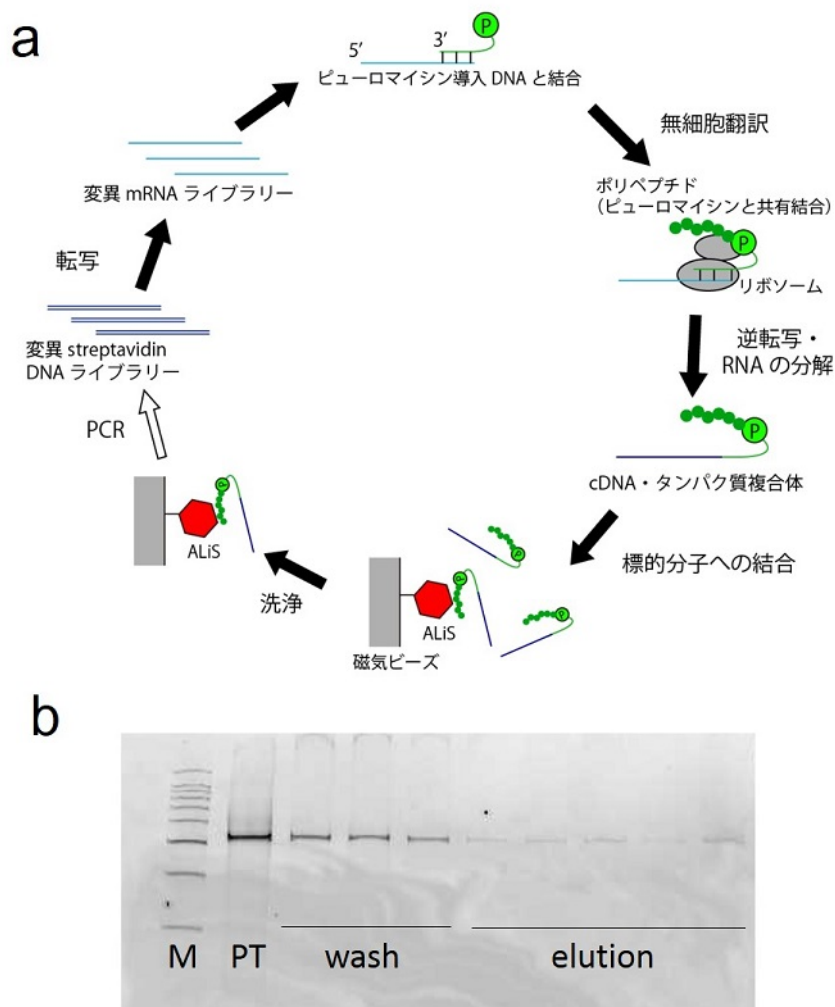


図2. 進化分子工学による streptavidin 変異体のセレクション
 a) 淘汰実験のスキーム。b) セレクション後の各分画について PCR の後、電気泳動した結果 (代表例)。M: 分子量マーカー。PT: 素通り画分。

3. 次世代シーケンサーによる網羅的配列解析

セレクション後の DNA を回収し、大腸菌にクローニングして配列を確認したが、重複する配列は見られなかった。そこで次世代シーケンサーによる網羅的解析を試みた。Illumina 社の MiSeq を利用し、初期ライブラリーとセレクション後のライブラリーをそれぞれ約 10 万配列読んだが、ライブラリー全体としては期待していた配列の収束は確認されなかった。しかし、個別に変異箇所を見るとセレクション後のサンプルにおいて出現頻度が増えているアミノ酸は存在しているようだった (図3)。現在はこれらの箇所に変異を入れた変異体について ALiS との結合能を確認している。

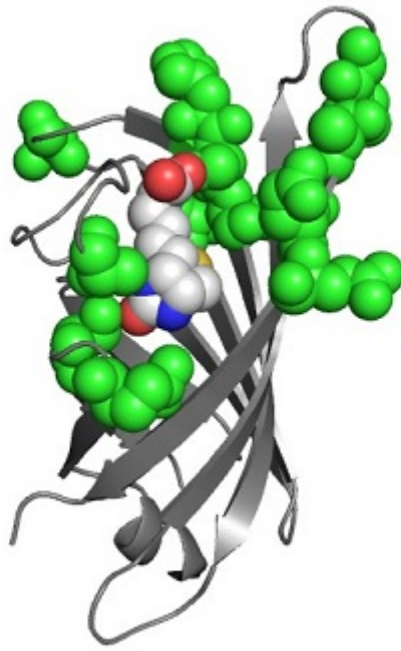


図 3. 解析結果の概要

セレクション後に変異頻度が高かったアミノ酸（緑）を mSA-biotin 複合体の立体構造（PDB: 4JNJ、biotin は CPK モデルで表示）に重ね合わせた。

共同研究者

本研究の共同研究者は埼玉大学大学院理工学研究科の根本直人教授ならびに東京大学大学院薬学系研究科の橋椋修士である。本研究を行うに当たりお世話になった埼玉大学大学院理工学研究科の新井秀直博士、東京大学大学院薬学系研究科の浦野泰照教授、大阪大学大学院理学系研究科の杉山成特任准教授、フランス Curie 研究所の Franck Perez 博士ならびに Gaelle Boncompain 博士に深く感謝します。また次世代シーケンス解析に当たっては鹿児島大学大学院理工学研究科の伊東祐二教授ならびに加藤由貴子研究員に大変お世話になりました。最後に、本研究をご支援頂いた上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Wilson DS, Keefe AD, Szostak JW. The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(7):3750-5. doi: 10.1073/pnas.061028198. PMID: 11274392.
- 2) Boncompain G, Divoux S, Gareil N, de Forges H, Lescure A, Latreche L, Mercanti V, Jollivet F, Raposo G, Perez F. Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nat Methods*. 2012;9(5):493-8. doi: 10.1038/nmeth.1928. PMID: 22406856.
- 3) Terai T, Kohno M, Boncompain G, Sugiyama S, Saito N, Fujikake R, Ueno T, Komatsu T, Hanaoka K, Okabe T, Urano Y, Perez F, Nagano T. Artificial Ligands of Streptavidin (ALiS): Discovery, Characterization, and Application for Reversible Control of Intracellular Protein Transport. *J Am Chem Soc*. 2015;137(33):10464-7. doi: 10.1021/jacs.5b05672. PMID: 26261872.
- 4) Baker M. Direct protein control. *Nat Methods*. 2012;9(5):443-7. doi:10.1038/nmeth.1979.
- 5) Tachibana R, Terai T, Boncompain G, Sugiyama S, Saito N, Perez F, Urano Y. Improving the Solubility of Artificial Ligands of Streptavidin to Enable More Practical Reversible Switching of Protein Localization in Cells. *ChemBioChem*. 2017;18(4):358-362. doi: 10.1002/cbic.201600640. PMID: 27905160.
- 6) Lim KH, Huang H, Pralle A, Park S. Stable, high-affinity streptavidin monomer for protein labeling and monovalent biotin detection. *Biotechnol Bioeng*. 2013;110(1):57-67. doi: 10.1002/bit.24605. PMID: 22806584.
- 7) Yamaguchi J, Naimuddin M, Biyani M, Sasaki T, Machida M, Kubo T, Funatsu T, Husimi Y, Nemoto N. cDNA display: a novel screening method for functional disulfide-rich peptides by solid-phase synthesis and

stabilization of mRNA-protein fusions. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(16):e108. doi: 10.1093/nar/gkp514. PMID: 19528071.

- 8) Mochizuki Y, Suzuki T, Fujimoto K, Nemoto N. A versatile puromycin-linker using *cnvK* for high-throughput in vitro selection by cDNA display. *J Biotechnol.* 2015;212:174-80. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.08.020. PMID: 26321074.