

3S-Ea03 産業応用を志向したバイオ材料設計における生体触媒の活用○神谷 典穂^{1,2}⁽¹⁾九大院・工, ⁽²⁾九大・未来化セ)

nori_kamiya@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

天然タンパク質を高機能化する手段の一つとして、外来の機能性分子との複合化が挙げられる。複合化の過程においては、部位特異性、定量性、迅速性が求められるが、酵素反応を利用したタンパク質修飾法は、これらの課題を解決可能な手段と位置付けられる。特に、水系において生体分子同士の架橋化あるいは合成分子との連結を触媒する酵素反応は、タンパク質を構成要素とする人工ハイブリッド分子や、新たな機能性を有するバイオ材料の設計において、ユニーク且つ有用な選択肢を与え得る。そのような観点から、我々はタンパク質や合成高分子を基質として認識する酵素反応に着目して研究を進めており、本発表では2種類の酵素の活用例について紹介する。

・微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) を用いた高次タンパク質構造体の形成¹⁾

ピオチン-アビジン相互作用は、天然のリガンド-レセプターの組み合わせとして幅広く利用されており、アビジンが4量体構造を有することから、ピオチン化タンパク質と1:4の複合体の形成が可能である。我々は、Streptavidin (SA) のピオチン結合部位の高次構造を考慮し、目的タンパク質とSAが通常とは異なる量論比で複合化可能な系の構築を目標とした。具体的には、分岐型の新規ピオチン化試薬をMTGの基質として設計し、これを目的タンパク質にMTG反応を介して部位特異的に導入した。得られたピオチン化タンパク質をSAと混合することで、目的タンパク質が1次元状に配列したタンパク質構造体を得ることに成功した。

・西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) を用いた細胞培養ハイドロゲル基材の調製²⁾

高分子ハイドロゲルは、組織工学や細胞アッセイといった医療分野で、細胞適合性が高く、機能化が容易な基材として利用されている。HRPが触媒するフェノール性基質間のラジカルカップリング反応は、穏和な条件下でのハイドロゲル形成に利用できるが、活性化種の生成に過酸化水素を必要とするため、その利用範囲が制限されていた。我々は、HRPとチオール基を有するポリエチレングリコールの混合水溶液に、小分子フェノール基質を添加することで、系外からの過酸化水素の添加を必要とせず、生細胞を安定に包括可能で、且つ還元剤添加により容易に崩壊するジスルフィド架橋型ハイドロゲル調製法を確立した。さらに、チオール基を導入したゼラチンをハイドロゲルのネットワークに組み込み、細胞接着性を付与することで、シート状の細胞構造体の形成と回収が可能な足場材料として利用できることを明らかにした。

1) Mori et al., *Org. Biomol. Chem.*, 2013, 11, 914-922; *ChemComm.*, 49, 2013, 6971-6973.

2) Moriyama et al., *ChemComm.*, 50, 2014, 5895-5898; *RSC Adv.*, 5, 2015, 3070-3073.

Potential use of biocatalysis for fabrication of practical biomaterials○Noriho Kamiya^{1,2}⁽¹⁾Fac. Eng., Kyushu Univ., ⁽²⁾CFC, Kyushu Univ.)**Key words** enzyme, protein, hydrogel, biomolecular engineering**3S-Ea04 ドメインライブラリーの発想による高機能タンパク質スクリーニング: 抗体と酵素を例に**

○梅津 光央

(東北大院・工)

mitsuo@prn.che.tohoku.ac.jp

遺伝子の暗号に従ってできる直接の分子はタンパク質であり、そのタンパク質が機能を持ち様々な生命活動を支えている。現在では、年間1万件程度の新しいタンパク質の機能や構造が報告されており、他の有機・無機材料と比較すると構造安定性は劣るものの、機能の多様性と特異性の面では他素材を凌駕したライブラリーを持つ分子である。我々は、タンパク質が階層的構造であり、機能を発現させる主な構造単位がドメイン(モジュール)であることに着目し、ドメインを「単位」とした機能ドメイン群からライブラリーの発想と積木細工的にタンパク質を設計する手法を組み合わせることで新たな機能素子を創り上げる研究を行ってきた。その中で、今回は、腫瘍がんを標的としたがん治療抗体の開発と非食物系バイオマスを基質とした糖化酵素の高機能化について紹介する。

分子標的薬として提案されている抗体の1つとして、微生物で発現可能な低分子量な組換え抗体がある。通常の抗体は分子量が15万程度のIgG型構造を持つが、最も小さい低分子抗体は、抗体の可変領域断片のみで設計され、Tリンパ球とがん細胞を架橋する二重特異性低分子抗体は、腫瘍がんを標的とした治療薬として開発が行われている。しかし、この二重特異性抗体の腫瘍傷害性は、構成される抗体の特性(標的, エピトープ)やドメインの組み合わせ構造によって大きく変化するが、その規則は分かっていない。そこで我々は、既存の抗体群からTリンパ球上の活性化シグナル伝達蛋白質に特異的な抗体と上皮増殖因子受容体(EGFR)群を選抜し、それらの可変領域断片を構成要素として設計される100種を超える二重特異性抗体群を迅速に調製・薬効評価を行うスクリーニング系を開発することで、高活性な二重特異性抗体を同定すると共に高活性ルールが抽出できることを示してきた。

糖化酵素に関しては、セルロソームに着目してきた。糖化酵素セルラーゼの一部では、より効率的にセルロース分解を行うために、セルロース表面に吸着できる結合ドメインを持つ巨大な骨格蛋白質に機能の異なった複数の触媒ドメインが蛋白質間相互作用で結合してセルロソームと呼ばれる巨大複合体を形成しているものがある。そこで我々は、巨大蛋白質の模倣構造としたナノ粒子の表面に、分割調製した触媒ドメインとセルロース結合ドメインを生体外で再編成させることによって、人工的なセルロソーム(ハイブリッドナノセルロソーム)を作製することを行ってきた。このハイブリッドナノセルロソームの構造フォーマットの利点は、触媒ドメイン、結合ドメイン、骨格要素の生体外での混合比率を変化させるだけで、簡便に様々な人工セルロソームを作製できることにある。我々は、CAZy, PDB, Pfamなどの蛋白質データベース上のセルラーゼ情報を「ライブラリー」として捉え、有望なセルラーゼ群の触媒ドメインと結合ドメインをライブラリーとして各々調製し、それらを様々な比率でクラスター化させ活性を網羅的に評価することによって、これまで報告がされている中で、固相基質に対して最も高い還元糖生産能力を持つエンドグルカナーゼを創り出すことに成功した。

組換え蛋白質技術は、変異導入やドメインスワッピングを可能にした一方、それらが持つ非天然性が構造の不安定化や発現量の低下を招き、実験室レベルの研究で終わってしまう例も多い。本研究はドメインスワッピングから生み出された組換え蛋白質群のスクリーニング法でもあり、社会実装へ耐える構造体の同定にも利用できることを期待している。

Domain swapping evolves to domain library for generating highly functional proteins

○Mitsuo Umetsu

(Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words protein engineering, antibody, cellulase