

受容体解析に向けたバイオナノ磁性粒子上へのタンパク質ディスプレイ

吉野知子,* 松永 是

Protein Display onto Nano-sized Bacterial Magnetic Particles for Receptor Analysis

Tomoko YOSHINO* and Tadashi MATSUNAGA

Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology,
2-24-16, Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

(Received June 17, 2009)

Magnetic particles offer vast potential in ushering new techniques, especially in biomedical applications, as they can be easily manipulated by magnetic force. Magnetotactic bacteria synthesize nano-sized biomagnetites, otherwise known as bacterial magnetic particles (BacMPs) that are individually enveloped by a lipid bilayer membrane. BacMPs are ultrafine magnetite crystals (50–100 nm diameters) with uniform morphology produced by *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. Based on our elucidations on the molecular mechanism of BacMP formation in *M. magneticum* AMB-1, functional nanomaterials have been designed. Through genetic engineering, functional proteins such as enzymes, antibodies, and receptors were successfully displayed onto BacMPs. Here, display techniques of functional proteins onto nano-sized BacMPs and its applications to ligand binding assays were described. Dopamine receptor, which is a member of G protein-coupled receptors, was successfully displayed onto BacMPs. This system makes possible the convenient acquisition of the native conformation of membrane proteins without the need for detergent solubilization, purification and reconstitution after cell disruption. Furthermore, estrogen receptor, which is one of nuclear receptors, was also displayed onto BacMPs. The assay using BacMPs displaying estrogen receptor could discriminate full agonists, partial agonists, or antagonists. The elucidation of the mechanism of BacMP synthesis has provided a roadmap for the design of novel nano-biomaterials that would play a useful role in multidisciplinary fields.

Key words—magnetic particle; magnetotactic bacteria; receptor; display

1. はじめに

ヒトゲノム計画の目覚ましい進展により、創薬研究はゲノム研究を基盤としたゲノム創薬へと変貌しつつある。膨大なゲノム情報の中から、疾病に関連するタンパク質をコードする遺伝子を選択し、遺伝子組換え技術を用いて、そのタンパク質を生産することにより、様々な解析が行えるようになった。特に、受容体は、物質の認識やシグナル伝達などの場として生命現象を司る重要な役割を果たしており、創薬分野において注目を集めている。そのため、大学・製薬企業等を始め、世界中の研究機関において受容体の解析が進められ、医薬品開発の基礎的研究として位置づけられている。

大腸菌を用いた組換えタンパク質生産技術が、1970年代後半に開発されて以来、ウイルス、大腸菌、酵母、及び動物細胞が宿主細胞として用いられている。これらの宿主細胞を用いた技術は、効率的な培養方法、発現制御システム、タンパク質精製方法など、様々な技術的確立を経て、現在の主流となっている。「受容体—リガンド」の解析においては、受容体を組換えタンパク質として発現させることが前提となるが、多くの受容体が膜タンパク質であるため、その性質は多様であり発現の効率も各タンパク質の性質に依存している。そのため、受容体の種類やその後の用途に合わせて受容体発現用の宿主細胞や精製方法、また受容体の固相化が検討されている。

本稿で紹介するタンパク質生産技術は、磁性粒子上にタンパク質を提示（ディスプレイ）することができる微生物、磁性細菌を宿主細胞として用いる。磁性粒子上へタンパク質をディスプレイさせる

東京農工大学大学院工学府生命工学専攻 (〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16)

*e-mail: y-tomoko@cc.tuat.ac.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウム S05 で発表したものを中心に記述したものである。

ことにより、目的タンパク質の精製が簡便となり、磁性粒子自体をタンパク質解析用の固相担体として用いることができるため、応用範囲が極めて広い。本稿では、われわれが独自に開発してきたバイオナノ磁性粒子上へのタンパク質ディスプレイ技術、及び受容体解析への応用に関して紹介する。

2. 微生物が合成するナノ磁性粒子

磁性粒子は、DNA、タンパク質等の生体分子、又はウイルスや細胞等の回収・検出を始めとし、薬物を患部に輸送するドラッグデリバリーシステムやがんの温熱治療などに幅広く用いられている。磁性粒子の最大の利点は、磁石により磁気分離・誘導できることであり、さらにそれらの操作を比較的簡便に自動化できる点である。計測や分離等の手法ではB/F分離（Bound/Free separation）操作が可能な常磁性の磁性粒子が多く用いられている。これは、磁気回収時のみ磁化し、それ以外では磁化しないため、粒子同士の凝集はみられないことから、反応場として適しているためである。1 μm 以下の常磁性の磁性粒子では、磁気回収、B/F分離が困難であるため、1 μm 前後の粒子が実用化されている。一方、マグネタイト（ Fe_3O_4 ）などのフェリ磁性である磁性粒子は、水溶液中において磁氣的に凝集してしまうが、1 μm 以下の粒子を用いた場合でも磁気回収が可能である。したがって、サブミクロンの磁性粒子を利用する際には、常磁性かつ磁氣的な回収が容易な粒子の利用が望まれる。

菌体内にマグネタイトを合成する微生物、磁性細菌は大きさ・結晶構造の揃った磁性粒子（バイオナノ磁性粒子、Fig. 1）を生合成することが知られる。このユニークな細菌内で起こる磁性粒子合成メカニズムに関する研究が、一昨年、Nature と Science にほぼ同時に報告され、多くの研究者の注目を集めている。Magnetospirillum magneticum AMB-1 株においては、着磁方向の揃った単磁区構造を有するフェリ磁性の磁性粒子を合成する。この磁性粒子は、それぞれがホスファチジルエタノールアミンを中心とした脂質二重膜で覆われていることより、フェリ磁性の人工磁性粒子とは異なった挙動を示す。このような脂質二重膜に覆われた粒子は分散性がよく、また回収率も高いため、様々な検出への応用が可能となる。また磁性粒子を覆う脂質二重膜中にはいくつかの膜タンパク質が存在しており（Fig. 1）、こ

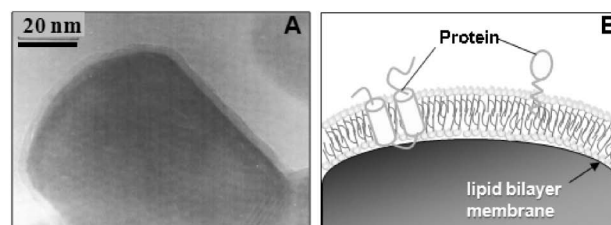


Fig. 1. Transmission Electron Microscopic (TEM) Imaging (A) and Schematic Diagram (B) of a Bacterial Magnetic Particle (BacMP)

れらは細胞質や細胞膜にはみられないバイオナノ磁性粒子特有のタンパク質であることより、マグネタイトの生成に深く関与していることが示唆されている。筆者らは、バイオナノ磁性粒子生成メカニズムの解明に向けて、全ゲノム解析¹⁾、DNAチップによるトランスクリプトーム解析²⁾、LC-MS/MSなどを取り入れたプロテオーム解析³⁾を推進してきた。これらの解析結果から、生成メカニズムの全貌が明らかにされるとともに、ここで得られた基礎的知見に基づいて磁性粒子上へのタンパク質ディスプレイ技術が開発され、応用技術へと発展してきた。次項目ではその要素技術に関して紹介する。

3. タンパク質ディスプレイの要素技術

筆者らは微生物が合成する磁性粒子に着目し、全く新しい手法を用いて機能を付加したバイオナノ磁性粒子の創製に着手している。その手法として、バイオナノ磁性粒子膜上に元来存在するタンパク質を足場（アンカー）として利用し、遺伝子融合技術により酵素・抗体・受容体をディスプレイする技術が開発されている。本技術は融合タンパク質の自由な設計が可能であり、活性部位を維持した状態で粒子上へタンパク質をディスプレイすることが可能である。これまでに、ルシフェラーゼ⁴⁾、ピルビン酸リン酸ジキナーゼ⁵⁾等の酵素を始め、抗体結合タンパク質であるプロテイン A^{6,7)}、プロテイン G⁸⁾、核内受容体の1つであるエストロゲン受容体^{9,10)}、また膜貫通タンパク質であるドーパミン受容体¹¹⁾のディスプレイに成功している。

Figure 2 に機能性バイオナノ磁性粒子の作製法を示す。アンカー遺伝子に目的のタンパク質をコードする遺伝子を融合し、この融合遺伝子を含むプラスミドを磁性細菌に導入する。得られた磁性細菌の形質転換体を培養した後、集菌・細胞破碎を行う。そ

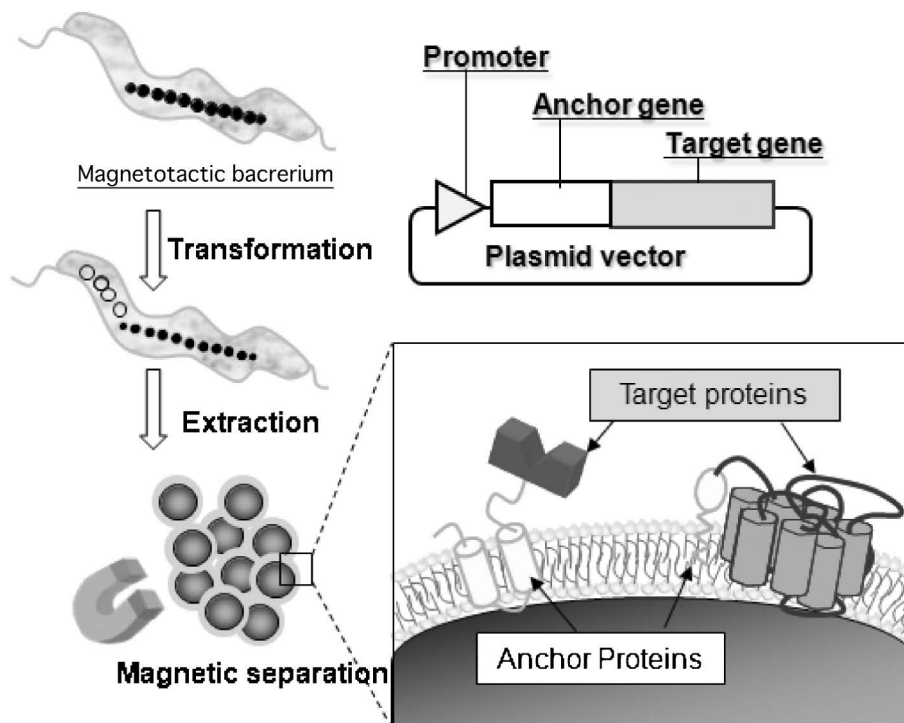


Fig. 2. Schematic Diagram for Preparation of BacMPs Displaying Functional Proteins

の後は破砕物を含む容器に磁石を設置し、未破砕物の除去・洗浄を行う。上記操作により、様々な機能性のタンパク質を同一の手法で磁性粒子上にディスプレイすることが可能である。筆者らは、バイオナノ磁性粒子の大量調製を目的に、高密度培養法を確立し、実用化を視野に入れた研究を進めている。¹²⁾ バイオナノ磁性粒子を各種アプリケーションに利用するためには、サイズ、形状や磁気特性を追求するだけでなく、分子レベルでの粒子表面設計が重要であるため、磁性細菌を利用したディスプレイ技術は大変有効である。さらに、バイオナノ磁性粒子上への機能性タンパク質のディスプレイ効率やタンパク質量の増大を目的として、発現量を調節するプロモーター因子、及び磁性粒子上への局在化を促進するアンカー分子の検討が行われている。以下には、バイオナノ磁性粒子上へのディスプレイにおいて要素技術となる高発現プロモーターとアンカーの探索について紹介する。

3-1. 高発現プロモーター 磁性細菌内における高発現プロモーターを用いることで、粒子膜上への融合タンパク質のディスプレイ量の増大が期待できる。そこで、磁性細菌内で発現量の多いタンパク質をコードする遺伝子配列の上流に高発現プロモ-

ーターが存在することを想定し、以下の実験に取り組んだ。野生株から得られた磁性細菌細胞膜画分のタンパク質を2次元電気泳動により分離し、タンパク質量の多いスポット ($n=6$, Fig. 3) に関して、アミノ酸配列同定、ORFの決定、ORF上流領域(プロモーター予想配列)のゲノムDNAからの抽出を行った。各プロモーター予想配列をレポーター分子であるルシフェラーゼ遺伝子上流に導入し、磁性細菌内におけるプロモーター活性を評価した。その結果、*Pmms16*, *Pmsp1*, *Pmsp3* において、従来用いられていたプロモーター *PmagA* の100倍以上の高い活性が示された (Table 1)。また、*msp3* のプロモーターを使用し、発現強度を変えることで、磁性粒子膜上への融合タンパク質量の増大に成功した。¹³⁾

3-2. アンカー分子 新規アンカー分子の探索として、磁性粒子上に特異的に発現し、かつ粒子表面に強固に結合しているタンパク質¹⁴⁾に着目し、アンカー分子としての機能を評価した。マグネタイトに強固に結合する13 kDaのタンパク質、*Mms13*は2次構造予測により膜2回貫通型タンパク質であることが予想された。これまで用いられてきたアンカーである *MagA* (膜12回貫通型)、*Mms16* (脂

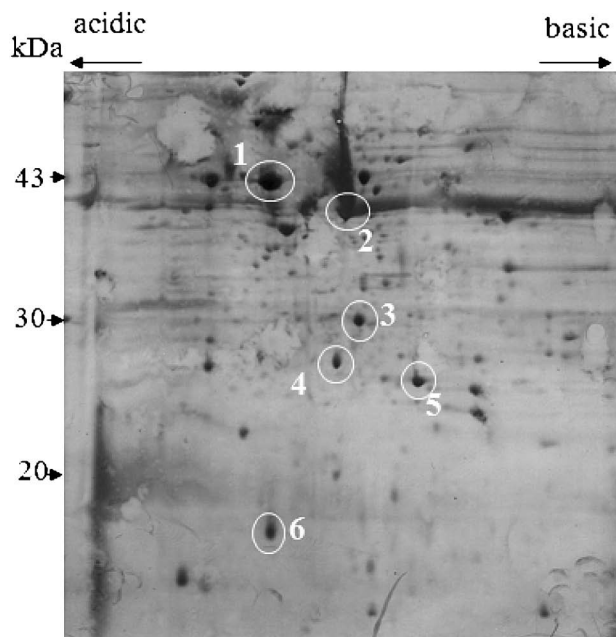


Fig. 3. 2-D-gel Electrophoresis of Cell Membrane Protein Fractions of AMB-1
Circles indicate spots of identified proteins.

Table 1. Luciferase Expression in AMB-1 Transformants Regulated by Each Promoter Sequence

Plasmids	Luminescence intensity (kcount/second/ 8×10^7 cells)
pUMGLC- <i>PmagA</i>	37
pUMGLC- <i>Pmms16</i>	3399
pUMGLC- <i>Pmms24</i>	423
pUMGLC- <i>Pmsp1</i>	7164
pUMGLC- <i>Pmsp2</i>	117
pUMGLC- <i>Pmsp3</i>	14691
pUMG (negative control)	0

質修飾型) の C 末端にルシフェラーゼを融合し、粒子上へのルシフェラーゼディスプレイ量を比較した。その結果、Mms13 をアンカーとすることで、Mms16 の 400 倍、MagA の 1000 倍のルシフェラーゼ活性が示された。この結果は、磁性細菌内で合成された粒子上に Mms13 が多量に局在し、かつ粒子表面に強固に結合していることに起因すると考えられた。

Mms13 をアンカー分子とし、様々な機能性タンパク質のディスプレイに成功している^{4,5,8,10,15)} 実際に抗体の Fc 部位との結合性を示すプロテイン A を Mms13 と遺伝子融合し、ディスプレイを試みた。蛍光標識抗体により粒子上へのプロテイン A

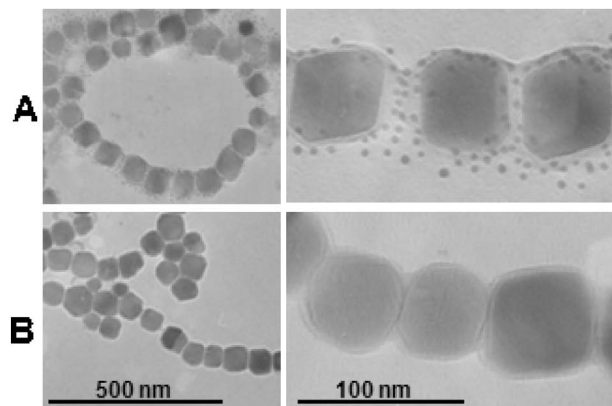


Fig. 4. TEMs of BacMPs Displaying Mms13-Protein A Introduced to Rabbit IgG after Addition of Gold Nanoparticle (5 nm)-labeled Anti-rabbit IgG Antibodies (A) or Anti-human IgG Antibodies (B)

発現の分布を観察したところ、ほぼ 100% の粒子に蛍光が観察され、磁性細菌内での粒子合成過程において、Mms13-プロテイン A 融合タンパク質がほとんどすべての粒子上にディスプレイされていることが示された。さらに金ナノ粒子 (5 nm) 標識の抗体により、1 粒子上あたりのプロテイン A の分子数は、約 20 個であった (Fig. 4)。上記のようにアンカー分子との融合による機能性分子の導入は磁性細菌が合成する磁性粒子を用いることで可能となる。

4. バイオナノ磁性粒子上への受容体ディスプレイ

薬物が作用する標的として、受容体、酵素、輸送タンパク質、核酸などが挙げられるが、多くの薬理学的応答は受容体を介して調節されるため、受容体は創薬分野において非常に重要なタンパク質群である。受容体をアミノ酸配列に基づいて分類することにより、少数のサブファミリーが存在することが示されている。筆者らは、その中でも、G タンパク共役型受容体、及び遺伝子の転写を制御する細胞核内の受容体に着目して研究を進めている。以下では、G タンパク共役型受容体であるドーパミン受容体、核内受容体としてエストロゲン受容体のバイオナノ磁性粒子上へのディスプレイに関する研究を示す。

4-1. ドーパミン受容体 医薬品開発の中で大きなシェアを占める G タンパク共役型受容体 (GPCR) は、細胞内シグナル伝達の制御、細胞の内外環境との相互作用の調節など、生命現象の

キーとなる役割を担っている。このため、疾病との因果関係も強く、GPCR をターゲットとした医薬品開発が盛んに行われている。GPCR は、膜に7回貫通したヘリックスドメインを持ち、細胞外側にリガンド結合部位、細胞内側にGタンパク質が結合する部位を有するため、その発現・精製方法には煩雑な操作が必要である。筆者らは、磁性細菌が合成する脂質二重膜で覆われた磁性粒子が、膜貫通タンパク質の局在場所として利用できることを提唱している。著者らはGPCRの1つであるドーパミン受容体(D1R)を用いて、磁性粒子上へのアセンブリを試みた。¹¹⁾ 自由度の高い脂質修飾型のタンパク質であるMms16をアンカー分子として用い、GPCRのフォールディングを助長する設計を行った。GPCRのモデルとしてD1Rを用い、D1R遺伝子とMms16遺伝子との融合遺伝子を磁性細菌に導入した。得られた形質転換体を培養・集菌・細胞破碎後、磁気分離操作によりD1Rをアセンブリした磁性粒子を得た。この粒子上のD1Rの解離定数は9.75 nMと算出され、ナノオーダーの結合能を保持していることが明らかとなった。さらにリガンドスクリーニング技術の開発を目的とし、蛍光標識アンタゴニスト(SCH23390)を用いた競合結合実験を行った。蛍光標識SCH23390存在下で非標識のドーパミンと競合反応を行ったところ、ドーパミンの濃度の上昇に伴い蛍光の減少が観察され、ドーパミンの定量が可能であった(Fig. 5)。磁性細菌から得られる磁性粒子上への膜受容体ディスプレイ技術は、簡便なGPCRの調整を可能とし、膜タンパク質の煩雑な調整法を解決できる有効な手段を提供できると考えられる。しかしながら、多くの膜タンパク質において、形質転換効率の低下や膜タンパク質の発現による細胞増殖の阻害といった細胞への影響も示されている。これは磁性細菌に限らず、様々な宿主細胞でも同様である。現在、筆者らは、磁性細菌のゲノミクス、プロテオミクス等で得られた知見を基に、効率的な膜タンパク質の発現技術の開発に取り組んでいる。

4-2. エストロゲン受容体 核内受容体は、脂溶性の生理活性物質をリガンドとするリガンド誘導性転写制御因子である。リガンドと結合し複合体形成した核内受容体は核内に移行し、標的遺伝子のプロモーター領域にある応答配列(Hormone re-

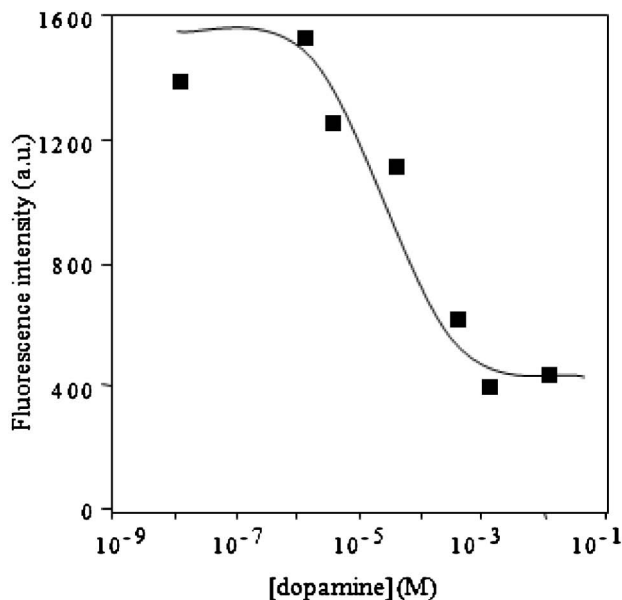


Fig. 5. Fluorescence Competition Binding Analysis of Dopamine to Dopamine Receptors (D1R) on BacMP Surfaces. BacMPs displaying D1R were incubated with BODIPY labeled SCH23390.

sponse element; HRE) と特異的に結合することで標的遺伝子の発現を制御する。核内受容体を介した遺伝子発現調節は、個体発生や器官形成、標的器官の機能維持など高次の生命現象を制御していると考えられる。近年、核内受容体とがん、糖尿病、高脂血症、動脈硬化といった生活習慣病との関連性が指摘されている。これらの受容体に対してリガンド作用を持つ物質は、上記疾病の原因因子となる一方で、その治療薬としても利用することができる。また、近年、核内受容体の1つであるエストロゲン受容体(ER)の転写制御に関しての解明が進み、細胞種の違いにより応答する標的遺伝子が異なることが報告されている。^{16,17)} これは、細胞内の転写調節因子機構によるものと考えられているが、いまだ詳しいメカニズムは解明されていない。子宮、卵巣、胸腺などのエストロゲン標的細胞においても、各細胞内では異なる転写調節因子であるコアクチベーターが発現していることが分かっており、このようなコアクチベーター発現の違いががん等の治療効果に大きな影響を与えていることが分かってきた。乳がんの抑制剤として用いられる Tamoxifen は、子宮内の細胞内ではアゴニストとして働き、子宮内膜がんを促進することが報告されている。¹⁸⁾ このことから、コアクチベーターの違いによる ER 応答遺伝

子の異なる転写調節が予測される。これらの ER が関与する標的遺伝子の転写制御を解明することにより、目的のエストロゲン標的細胞のみに作用する腫瘍抑制剤の作製が可能であると考えられる。

筆者らは、ER、リガンド、コアクチベーターの複合体形成を *in vitro* で再現することにより、ER のアゴニスト活性を示す化学物質評価法の開発を行っている (Fig. 6)。Mms13 をアンカータンパク質として用い、ER のリガンド結合部位である ERLBD を磁性粒子上にディスプレイした。さらに大腸菌 BL21 を用いて steroid receptor coactivator-1 の NRBOX 部位と GFP を融合した融合タンパク質 GFP-coactivator を作製した。次に Estradiol (E2)、及び GFP-coactivator を、ERLBD をディスプレイした磁性粒子と反応させ、GFP 由来の蛍光強度を測定した。その結果、E2 依存的に GFP-coactivator が結合していることが示された。そこで、ER に対する強アゴニスト (E2, estriol)、弱アゴニスト (Octylphenol)、アンタゴニスト (ICI 182780) に対して同様の評価を行ったところ、強アゴニストにおいては E2 と同様の蛍光強度を示したが、弱アゴニストでは E2 に対して 40% の蛍光強度の増加があり、アンタゴニストでは蛍光強度の増加はみられなかった (Fig. 7)。このことから、磁性粒子上において、複合体を形成することで受容体に対する親和性の違いを識別可能な化学物質評価法の構築が示された。またバイオナノ磁性粒子を用いて反応から測

定過程までの自動化に成功していることから^{19,20} ハイスループットな受容体解析が行えると考えられる。

5. おわりに

本総説では、磁性細菌を宿主細胞とした磁性粒子上へのタンパク質ディスプレイ技術に関して紹介した。磁性細菌を対象とした基礎研究においては、近年、研究グループが増加し、磁性粒子合成メカニズムの解明につながる研究がさかんに行われている。一方、磁性細菌をタンパク質発現用の宿主細胞

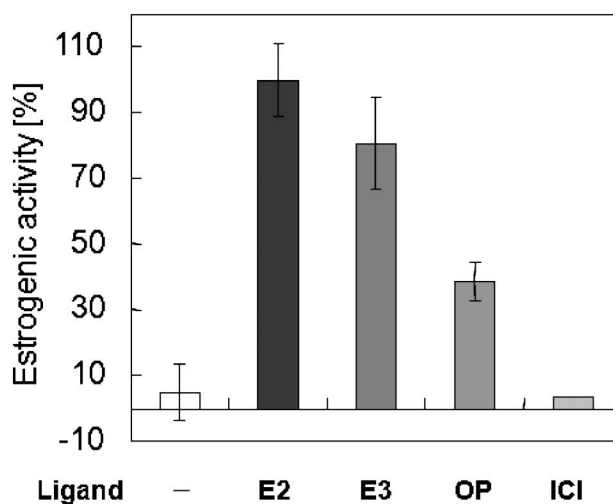


Fig. 7. Binding Assay of GFP-coactivator and Each Ligand to ERLBD-BacMPs

Ligand concentration: 10^{-6} M, E2: Estradiol, E3: Estriol, OP: Octylphenol, ICI: ICI 182780.

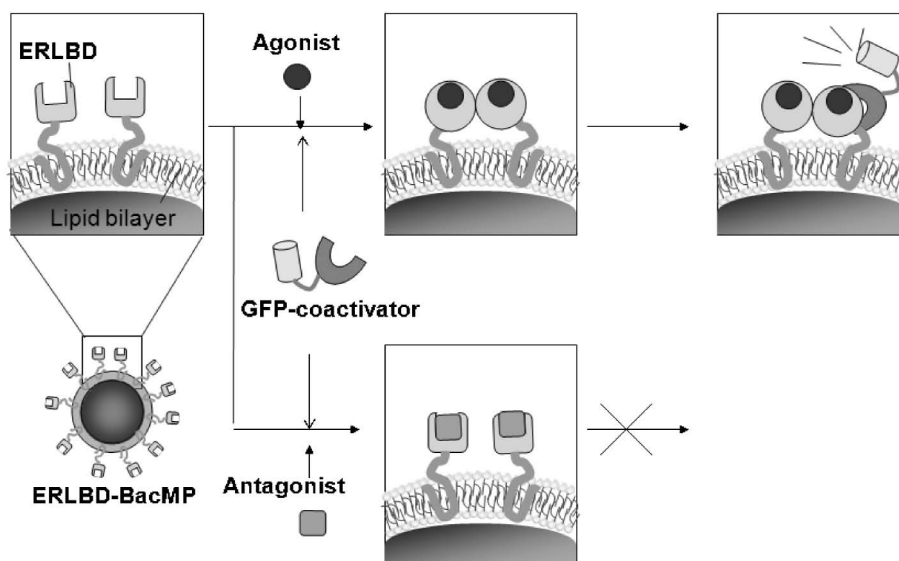


Fig. 6. Schematic Diagram of the GFP-coactivator Recruitment Assay

胞として用いる研究に関しては、筆者らが展開してきた研究であり、基盤技術の整備を独自に行ってきた。本手法は、目的の遺伝子さえ手に入れば、同一の手法で磁性粒子上にタンパク質をディスプレイすることができ、細胞破碎後、磁気分離操作のみで精製が完了する非常に優れた研究技術と言える。今後は、複雑な構造を持つタンパク質を効率よくディスプレイする技術の確立が課題である。

磁性細菌を用いることで、分子生物学的手法による機能性バイオナノ磁性粒子の創製が可能であり、その応用範囲は医療分野に留まらず、食品、さらに環境分野まで多岐にわたる。遺伝子やタンパク質を始め、分子レベルで解析された情報を基にナノマテリアルを創製し、工学的に応用することが、今後ますます重要になっていくと考えられる。

REFERENCES

- 1) Matsunaga T., Okamura Y., Fukuda Y., Wahyudi A., Murase Y., Takeyama T., *DNA Res.*, **12**, 157-166 (2005).
- 2) Suzuki T., Okamura Y., Calugay R. J., Takeyama H., Matsunaga T., *J. Bacteriol.*, **188**, 2275-2279 (2006).
- 3) Tanaka T., Okamura Y., Arakaki A., Tanaka T., Takeyama H., Matsunaga T., *Proteomics*, **6**, 5234-5247 (2006).
- 4) Yoshino T., Matsunaga T., *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 465-471 (2006).
- 5) Yoshino T., Nishimura T., Mori T., Suzuki S., Kambara H., Takeyama H., Matsunaga T., *Biotechnol. Bioeng.*, **103**, 130-137 (2009).
- 6) Kuhara M., Takeyama H., Tanaka T., Matsunaga T., *Anal. Chem.*, **76**, 6207-6213 (2004).
- 7) Yoshino T., Hirabe H., Takahashi M., Kuhara M., Takeyama H., Matsunaga T., *Biotechnol. Bioeng.*, **101**, 470-477 (2008).
- 8) Takahashi M., Yoshino T., Takeyama H., Matsunaga T., *Biotechnol. Prog.*, **25**, 219-226 (2009).
- 9) Yoshino T., Kato F., Takeyama H., Nakai M., Yakabe Y., Matsunaga T., *Anal. Chim. Acta*, **532**, 101 (2005).
- 10) Yoshino T., Kaji C., Nakai M., Saito F., Takeyama H., Matsunaga T., *Anal. Chim. Acta*, **626**, 71-77 (2008).
- 11) Yoshino T., Takahashi M., Takeyama H., Okamura Y., Kato F., Matsunaga T., *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 2880-2885 (2004).
- 12) Yang C. D., Takeyama H., Matsunaga T., *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 213-216 (2001).
- 13) Yoshino T., Matsunaga T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1678-1681 (2005).
- 14) Arakaki A., Webb J., Matsunaga T., *J. Biol. Chem.*, **278**, 8745-8750 (2003).
- 15) Maeda Y., Yoshino T., Takahashi M., Ginya H., Aasahina J., Tajima H., Matsunaga T., *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 5139-5145 (2008).
- 16) Laganier J., Deblois G., Lefebvre C., Bataille A. R., Robert F., Giguere V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 11651-11656 (2005).
- 17) Zhang H., Yi X., Sun X., Yin N., Shi B., Wu H., Wang D., Wu G., Shang Y., *Genes Dev.*, **18**, 1753-1765 (2004).
- 18) Jordan V. C., Gapstur S., Morrow M., *J. Natl. Cancer Inst.*, **93**, 1449-1457 (2001).
- 19) Matsunaga T., Maruyama K., Takeyama H., Katoh T., *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 2315-2321 (2007).
- 20) Matsunaga T., Maeda Y., Yoshino T., Takeyama H., Takahashi M., Ginya H., Aasahina J., Tajima H., *Anal. Chim. Acta*, **597**, 331-339 (2007).