

インテイン連鎖反応の開発と医療分野への応用

群馬大学大学院理工学府分子科学部門

高橋 剛

1. はじめに

COVID-19 などの新種のウイルスや O157 大腸菌などに代表される病原性微生物を簡便かつ高感度に検査する方法の開発が強く望まれている。遺伝子本体の DNA を指数関数的に増幅するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法は、極微量のウイルスや病原性微生物でも検出可能であり、感度に優れている。しかし、すでに感染能を失ったウイルスから漏出した遺伝子も増幅されるため、偽陽性が多くなる欠点をもつ。抗原-抗体反応を利用した抗原検査では、ウイルスや病原性微生物由来のタンパク質に結合する抗体を用いて、イムノクロマト法などで検出する。ウイルス表面のスパイクタンパク質や、病原性微生物の細胞表面に存在するタンパク質に結合する抗体を用いることで、感染能を保持している可能性の高いウイルスや微生物だけを検出できる。しかし、ウイルスや微生物の絶対量が少ない場合、抗体で捕捉できる抗原が少なくなり、感度の高い方法を用いても検出が困難となる。

一方、申請者はこれまでに、タンパク質スプライシング活性をもつインテインに関する研究を行っている¹⁻⁴⁾。インテインは、2つのポリペプチド鎖（エクステイン）を連結させる活性をもち、連結してできる生成物を工夫することで、様々な応用が期待できる。特に分割型のインテインを用いたタンパク質トランススプライシング（PTS）を利用することで、完全に別のポリペプチド断片間で反応させることができる。これまでに当研究室では、PTS 生成物としてプロテアーゼや、ルシフェラーゼなどの酵素が生成する系の開発に成功している³⁾。本研究では、複数の分割インテインを組み合わせたインテイン連鎖反応（ICR）を構築し、感染能を保持するウイルスや病原性微生物を検出する方法の開発を目的

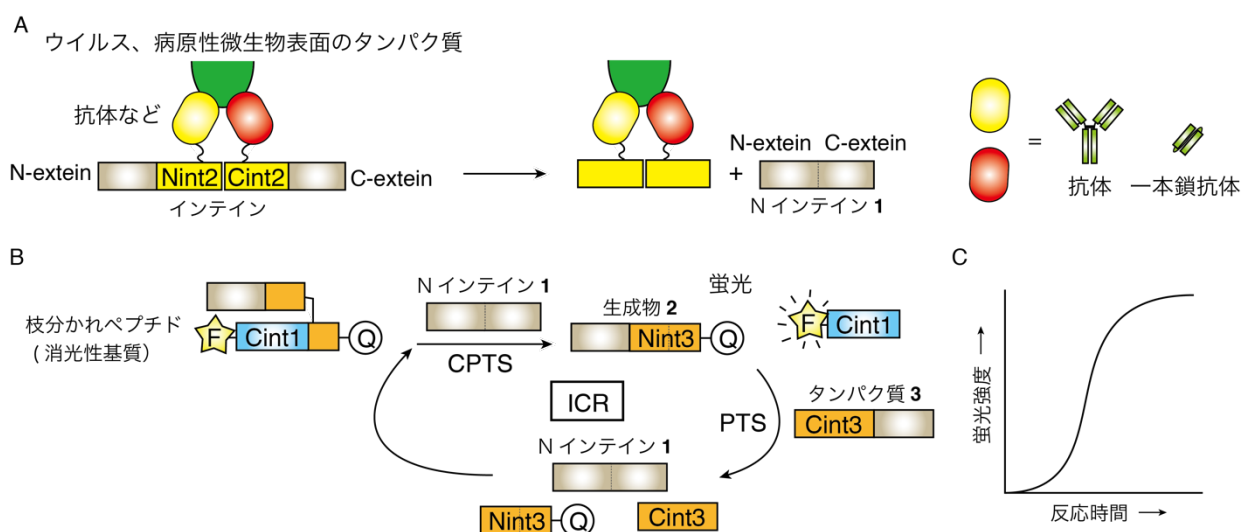


図 1. A ウイルスや病原性微生物表面タンパク質抗原の認識に基づく PTS 反応による N インテイン 1 の生成. B 枝分かれペプチドと N インテイン 1 の CPTS と、生成物 2 とタンパク質 3 による PTS による N インテイン 1 の指数関数的増幅反応 (ICR). C 反応時間に対する蛍光強度の変化をあらわした模式図.

とした(図 1)。そのために、ウイルスや微生物表面の抗原タンパク質を認識して PTS 反応がおこり、N インテイン **1** が生成する反応系 (図 1A) を構築する必要がある。また、N インテイン **1** が触媒的 PTS (CPTS) と、その生成物である生成物 **2** とタンパク質 **3** による PTS 反応により、N インテイン **1** が連続的に増幅する反応系 (ICR; 図 1B) を構築する必要がある。ここでは、本研究の鍵となる、ICR の構築についての研究を行った。ICR 反応を簡便に検出するための基質として、蛍光消光基 (quencher; Q) と蛍光基 (F) の分子内蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) で消光していた状態から、ICR による反応で FRET が解消される枝分かれペプチドを設計し、一連の反応を、蛍光強度の増大を指標として検出する系の構築を試みた。

2. 研究内容

I. ICR 反応に用いるペプチドおよびタンパク質の分子設計

最初に、枝分かれ構造をもつペプチド (枝分かれペプチド **1**)、N インテイン **1**、生成物 **2**、タンパク質 **3** の設計を行った。これらの分子の特徴は、枝分かれペプチド **1** を基質とした CPTS 反応により、生成物 **2** が生成し、この生成物 **2** と反応するタンパク質 **3** を用いた PTS により、N インテイン **1** が生成する (図 1B)。ここで最も重要なポイントは、2 段階目の PTS で用いるタンパク質 **3** が枝分かれペプチドと直接反応しないように工夫することである。また、インテインと隣接するエクステインのアミノ酸配列が PTS 反応の効率に大きく影響するため、CPTS および PTS 反応の反応点近傍のアミノ酸配列を吟味する必要がある。これらを踏まえ、枝分かれペプチド **1** (図 2)、生成物 **2**、タンパク質 **3**、N インテイン **1** をそれぞれ設計した。触媒的に機能する N インテイン **1** には、当研究室で開発した *Npu* DnaE 変異体 304-2(1-123)を用いた³⁾。2 段階目の PTS 反応には、Mootz、Liu らの開発した *Ssp* DnaB 変異体 M86 を用いた⁵⁾。枝分かれペプチド **1** の分岐点には、天然型のチオエステルではなく、セリンまたはトレオリン側鎖を介したエステル構造を使うことで、dithiothreitol (DTT) やグルタチオンなどの還元剤存在下での分解を抑制できるようにした。反応の進行を蛍光検出するために、枝分かれペプチド **1** の C インテインの N 末端に蛍光色素 Fluorescein (Flu) を配置し、ペプチド C 末端には、Lys 側鎖を介して蛍光消光基 Dabcyl (Dab) を配置した。CPTS 反応の進行により、Flu と Dab が別の分子となり、Flu の蛍光強度が増加すると考えた。

II. 枝分かれペプチド **1** の合成

設計した枝分かれペプチド **1** は、Fmoc 固相合成法により合成した (図 3)。樹脂は、H-Rink ChemMatrix resin (Sigma-Aldrich)を用いた。枝分かれ部位には、セリンの主鎖のアミノ基を Alloc 基で保護し、側鎖に Fmoc-Asp(OtBu)-OH をエステル結合で導入したアミノ酸 Alloc-Ser[Fmoc-Asp(OtBu)]-OH を別途合成し、これを樹脂上でカップリングした。側鎖側のアミノ酸を伸張し、N 末端の Cys アミノ基を Boc 基で保護した。主鎖 N 末端の

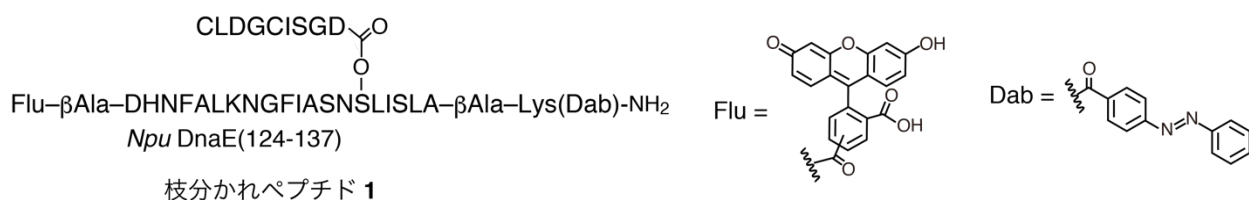


図 2. 設計した枝分かれペプチド **1** のアミノ酸配列.

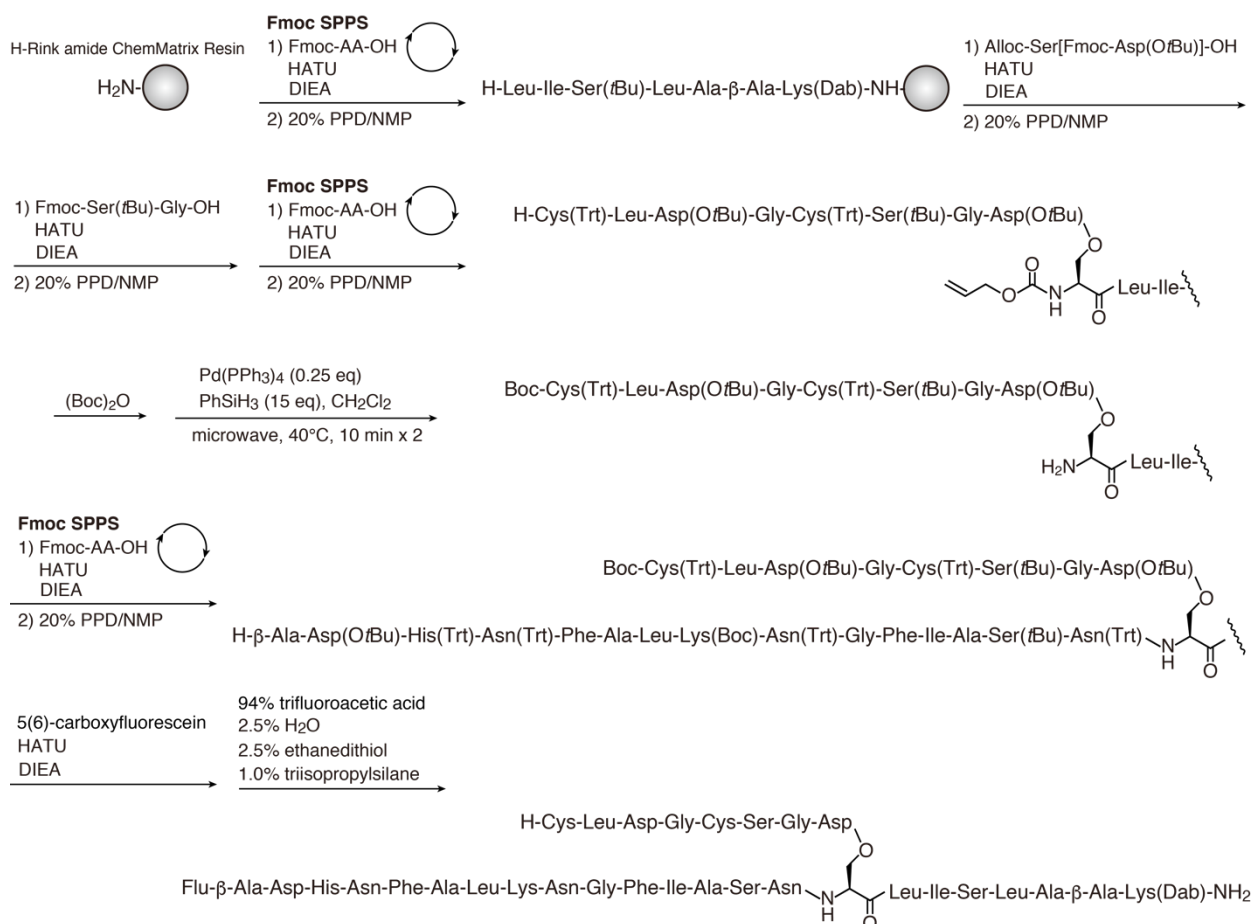


図 3. 枝分かれペプチド **1** の合成スキーム.

Alloc 基をパラジウム触媒を用いて除去し、残りのアミノ酸および fluorescein を導入した。トリフルオロ酢酸を用いて脱樹脂・脱保護し、得られた粗ペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) にて精製した。合成したペプチドは、液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS) の ESI-MS により同定した。

生成物 2 ペプチドは Fmoc 固相法で合成し、RP-HPLC にて精製、ESI-MS で同定した。タンパク質 **3**、N インテイン **1** は、大腸菌で発現させた。対応する遺伝子をコードするプラスミドを作製し、大腸菌を形質転換した。大腸菌を培養し、isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) により、タンパク質発現を誘導した。得られた菌体を破碎後、Ni-NTA カラムで精製した。目的タンパク質の同定は、SDS-PAGE にて行った。

II. 蛍光測定によるタンパク質スプライシング反応の検討

枝分かれペプチド **1** と N インテイン **1** を用い、タンパク質スプライシングの進行について、fluorescein 基由来の蛍光スペクトル測定により評価した。枝分かれペプチド **1** (20 μ M) と N インテイン **1** (10 μ M) で混合し、25°C で反応を行った。励起波長 488 nm、蛍光波長 510 nm で経時的に蛍光スペクトルを測定し、生成物である Cint1 の増加を見積もった。90 時間反応を行うことで、蛍光強度が約 7 倍増加した。このことから、タンパク質スプライシングが進行していくことが確認された。しかし、反応速度が非常に遅いことや、N インテイン **1** の濃度が低いと反応速度が顕著に遅くなることが分かった。

次に、枝分かれペプチド **1** とタンパク質 **3** 存在下で、生成物 **2** の有無による、ICR の進行について検討した。生成物 **2** 非存在下に対し、生成物 **2** 存在下において、蛍光強度の増加量が若干増大した。この結果から、ICR がわずかながら進行していることが確認された。しかし、反応速度が非常に遅く、また、生成物 **2** 非存在下においても蛍光強度の増加がみられたことから、非特異的な PTS 反応の進行が示唆された。

3. まとめ

本研究では、ウイルスや、病原性微生物を高感度に検出するためのインテイン連鎖反応 (ICR) の開発に取り組んだ。ICR で必要となる枝分かれペプチドを Fmoc 固相法により合成した。また、生成物 **2**、N インテイン **1**、タンパク質 **3** を作製し、ICR 反応について検討した。得られた結果から、全体的に反応速度が非常に遅く、蛍光検出に数日間の反応が必要であった。この理由として、枝分かれペプチドのつなぎ目に位置するアミノ酸が PTS に適していなかったことが考えられる。今後の改善点として、枝分かれペプチド **1**、タンパク質 **3**、N インテイン **1** のアミノ酸配列の再検討が必要であり、反応速度に優れたインテインの利用や、部位特異的変異導入による高活性インテインの作製などに取り組み、短時間で反応が進行する ICR の開発に取り組むたいと考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人 天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- 1) Takahashi, T.; Saito A. Interaction-dependent native chemical ligation and protein trans-splicing (IDNCL-PTS) for detection and visualization of ligand-protein interactions. *ChemistrySelect*, **1**, 1768-1772 (2016)
- 2) Takahashi, T. Generation of active protease depending on peptide-protein interactions using native chemical ligation and protein trans-splicing. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **92**, 1767-1772 (2019)
- 3) Kawase, M.; Fujioka, M.; Takahashi, T. Activation of protease and luciferase using engineered *Nostoc punctiforme* PCC73102 DnaE intein with altered split position. *ChemBioChem*, **2**, 577-584 (2021)

- 4) Hagiwara, H.; Fujii, E.; Iwabuchi, T.; Takahashi, T. Development of a β -lactamase activity assay for detecting ligand-protein interactions using an engineered split intein and β -lactamase. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **97**, uoae019 (2024)
- 5) Appleby-Tagoe, J. H.; Thiel, I. V.; Wang, Y.; Wang, Y.; Mootz, H. D.; Liu, X.-Q. Highly efficient and more general *cis*- and *trans*-splicing inteins through sequential directed evolution. *J. Biol. Chem.*, **286**, 34440-34447 (2011)