

2段階ビオチン化反応を利用したタンパク質解析

末田 慎二

九州工業大学大学院情報工学研究院

1.研究のねらい

ポストゲノム時代を迎えた昨今、生命現象の主要な担い手であるタンパク質を分析対象としたプロテオーム解析が精力的に展開されている。このようなプロテオーム解析に、積極的に活用されている技術にプロテインタグシステムがある。プロテインタグシステムは、分析対象の標的タンパクに対してペプチドやタンパクをタグとして導入して、そのタグの性質を利用して標的タンパクの分離・分析を行う技術である。このようなタグシステムはその有用性からこれまでに様々な手法が提案され、実際に多くのタンパク質の分離・分析手段として活用されている。しかしながら、タンパク質の性状は極めて多様であるため、タグシステムとしても、性質や特徴の異なる様々な手法が提案されるべきであると考えられる。

最近、私はある特異なビオチン固定化酵素反応系を発見し、この酵素反応系を利用するとこれまでのものとは特性の異なる新たなプロテインタグシステムが開発できるのではないかと考えた。この酵素反応では、ビオチン固定化酵素 (BPL) がその基質タンパクであるビオチンカルボキシルキャリアープロテイン (BCCP) にビオチンを特異的に固定化する反応を触媒する。このビオチン化反応系は、これまでに様々な生物種から BPL や BCCP が単離され研究されてきており、その結果、生物種が異なってもすべて交差反応性を示し、皆同様な性質を有することがわかっている。しかし、古細菌の *Sulfolobus tokodaii* 由来のビオチン化反応系は、大腸菌由来のそれとまったく交差反応性を有していないことがわかった。さらに、この *S. tokodaii* 由来のビオチン化反応系では、酵素である BPL が、反応生成物であるビオチン化された BCCP (Holo BCCP) と極めて安定な複合体を形成することが判明した。通常のビオチン化反応では BCCP にビオチンが付加された後、反応生成物である Holo BCCP はすみやかに BPL から解離するのであるが、この古細菌由来のビオチン化反応では、Holo BCCP と BPL が極めて安定な複合体を形成するため、室温付近では反応が事実上、1 サイクル目で止まってしまう (図 1)。このような、酵素がその反応生成物と安定な複合体を形成するという性質は他に例を見ない極めて特異な現象である。この *S. tokodaii* の BPL-Holo BCCP 間の安定な会合は、新規な高親和性のタンパク質間相互作用と見なすことができ、この性質を利用した新たなプロテインタグシステムの開発が可能ではないかと考えた。具体的には、BCCP 部位をタグとして標的タンパクに導入し、固相担体に固定化した BPL を使ってビオチン化反応を行うことにより、標的タンパクの特異的な捕捉が可能であると考えられる。また、蛍光標識化した BPL を利用してビオチン化反応を行うことにより、BCCP タグを導入した標的タンパクの蛍光標識化も可能であると考えられる。本研究では、このような特異なビオチン化反応を利用したプロテインタグシステムの開発について検討を行った。

2.研究成果

2.1. *S. tokodaii* ビオチン化系の反応特性に関する調査

S. tokodaii のビオチン化反応系を利用したタグシステムの開発にあたり、まず BPL と BCCP 間の反応性及び結合性に関する詳細なデータを取得した。他の生物種に関する検討から、BCCP は N 末端と C 末端の 2 つのドメインから構成され、ビオチン化に必要なのは C 末端側のドメインだけであることがわかっている。*S. tokodaii* 由来の BCCP は 169 残基から構成されるが、そのうち前半の 100 残基が N 末端側のドメインであると推測された (図 2)。そこでこの N 末端側の 100 残基を欠損させた BCCP (BCCP Δ 100) を作成し、BPL によるビオチン付加反応を行った。その結果、N 末端から 100 残基欠損させてもビオチン付加反応が起こり、BPL の基質として機能し得ることが確認できた。したがって、タグとしてはこの N 末端ドメインを欠損させた BCCP Δ 100 が有望であると考えられた。

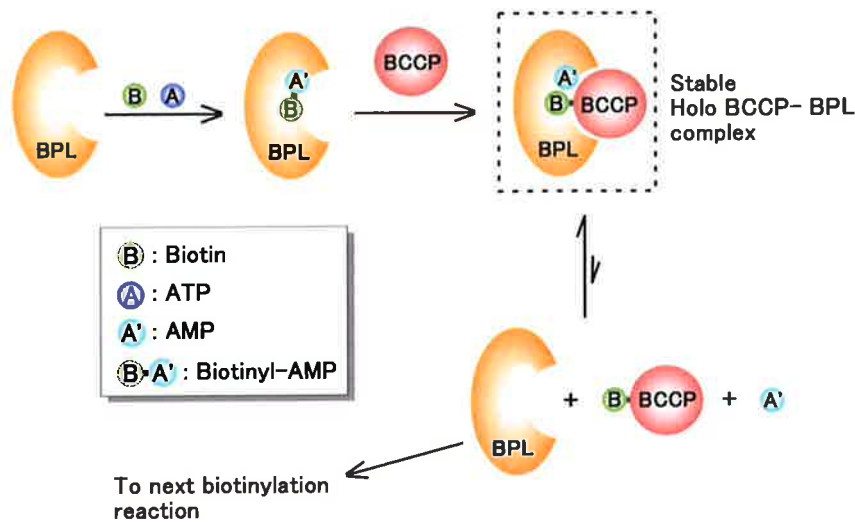


図1 *S. tokodaii* ビオチン化反応の模式図

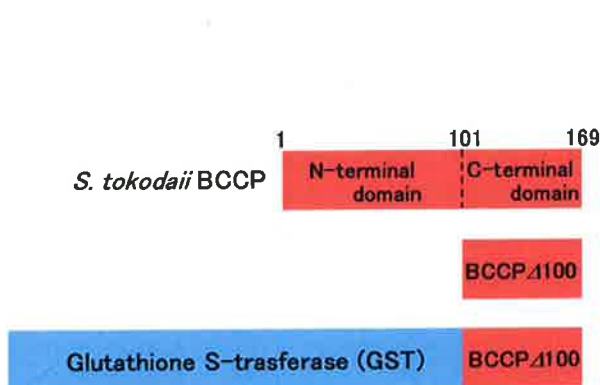


図2 BCCP 及び融合タンパクのドメイン構造

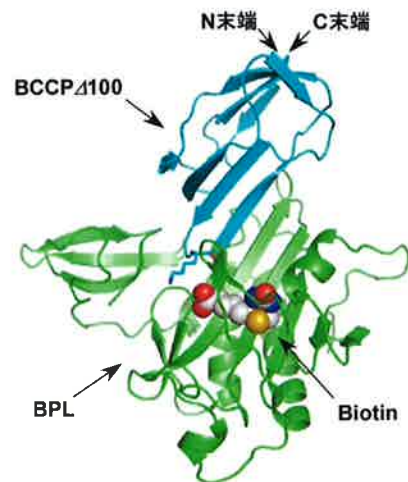


図3 *S. tokodaii* BPL と BCCP の複合体のモデル構造

次に、BPL と BCCP 間の結合親和性がタグシステムとして活用するのに十分な結合親和性を有しているかどうかを確認するために、両タンパク間の相互作用を表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により定量的に評価した。その結果、BPL と Holo 型の BCCPΔ100 間の結合解離定数 (K_d 値) は 1.4 (nM) で、両タンパク間の結合親和性は極めて高いことが確認できた。一方でビオチンが付加していない Apo 型の BCCPΔ100 に関する K_d 値は 3.2 (μ M) であり、ビオチンが付加して初めて高い結合親和性が生じることがわかった。しかしながら Apo 型の BCCP に関してもマイクロモラーレベルの K_d 値が得られていることから、Holo BCCP と BPL 間の高い結合親和性が、BCCP と BPL のアミノ酸残基間の相互作用と、ビオチンと BPL アミノ酸残基間の協同的な結合に基づいていることがわかる。したがって、本タグシステムは原理的に、既存のビオチン-アビジン間の結合を利用したシステムや、抗原-抗体反応を利用したシステムよりも結合特異性が高いと言える。

この BPL と BCCP の複合体をタグシステムとして活用するに当たり、その複合体の立体構造情報が利用できればより利便性が高まるものと考えられる。*S. tokodaii* の BPL と BCCP に関しては立体構造は解明されていないが、アミノ酸配列の相同性の高い、異なる生物種由来の同タンパクに関して、その複合体の立体構造が報告されている。したがって、その複合体の立体構造を鋳型にしてホモロジーモデルを構築した (図3)。得られた構造では、BCCP の C 末端ドメインの両末端は、ともに BPL との会合部位の反対に位置しており、タグとして理想的な構造を有していることが確認できた。

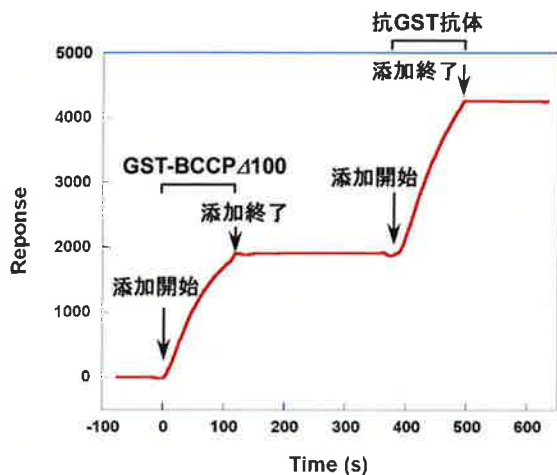


図4 SPR センサーチップ上への GST-BCCP Δ 100 の捕捉、並びに抗 GST 抗体との相互作用

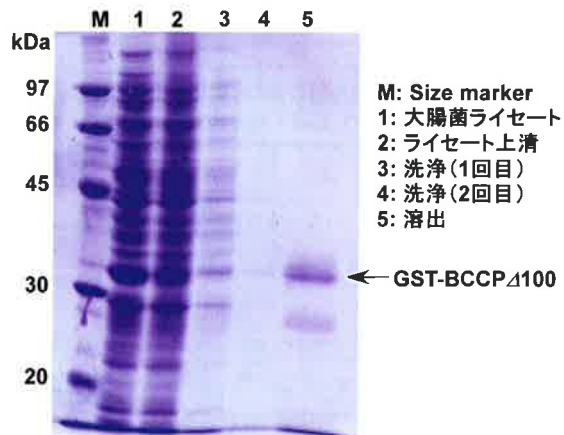


図5 BPL 固定化磁気ビーズを利用した、大腸菌ライセートからの GST-BCCP Δ 100 の捕捉

2.2. 固相担体上での BCCP タグを導入した標的タンパクの捕捉、並びに相互作用解析

BCCP タグを導入した標的タンパクの固相担体上への捕捉、並びに相互作用解析に成功した。ここでは、標的タンパクとして Glutathione S-transferase (GST) を利用し、その C 末端に BCCP Δ 100 を導入した融合タンパク (GST-BCCP Δ 100) を構築した (図2)。この融合タンパクが、SPR センサーチップ上に固定化した BPL によって、ビオチン化反応を介して捕捉できるかどうかについて調査した。その結果、融合タンパクの添加に伴い急激にレスポンスが増大し、試料の添加を終了してもレスポンスはほとんど低下しなかったことから、期待通りセンサーチップ上でビオチン化反応が起こり、融合タンパクが捕捉できることがわかった (図4)。さらに、このビオチン化反応により固定化した GST が、他のタンパクに対する結合活性を維持しているかどうかについて検証するために、抗 GST 抗体を添加して相互作用解析を行った。その結果、図4に示すように、抗 GST 抗体の添加に伴いレスポンスが増大し、抗体の添加を終了してもレスポンスはほとんど低下しなかったことから、ビオチン化反応によって固定化した GST は、抗体に対する結合活性を維持していることが確認できた。

また、BPL 固定化した磁気ビーズを利用した大腸菌ライセートからの GST 融合タンパクの捕捉についても検討した。その結果、大腸菌ライセート中には様々な生体成分が含まれるにもかかわらず、ビオチン化反応を介して特異的に GST タンパクを捕捉できることがわかった (図5)。

2.3. マイクロプレート上での BCCP タグを導入した標的タンパクの蛍光検出

マイクロプレート上に固定化した BCCP タグを導入した標的タンパクの蛍光検出に成功した。ここでは、標的タンパクとして同じく GST を利用し、グルタチオンプレート上に固定化した GST の蛍光検出を行った。この目的のために BPL の蛍光色素による標識化を行った。BPL には活性サイトから離れた部位に3つほどシステイン残基が存在しているため、これらのシステイン残基を有機蛍光色素 (Cy3, Cy5 等) のマレイミド体を利用して修飾した。得られた蛍光標識化された BPL はビオチン付加活性を維持していることが確認できたので、プレート上に固定化した GST-BCCP Δ 100 の蛍光検出を試みた。その結果、プレート上に固定化した GST タンパクに量が増大するにつれて蛍光強度も増大していくことがわかった (図6)。一方で、BCCP タグを有していない GST ではこのような蛍光強度の増大は見られなかったため、GST タンパクをビオチン化反応を介して特異的に蛍光検出できることがわかった。さらに、有機蛍光色素の代わりに、蛍光性テルビウム錯体を利用して BPL を標識化し、同様に GST の蛍光検出を行ったところ、少なくとも 100 fmol 以下の GST タンパクを検出できることがわかった。

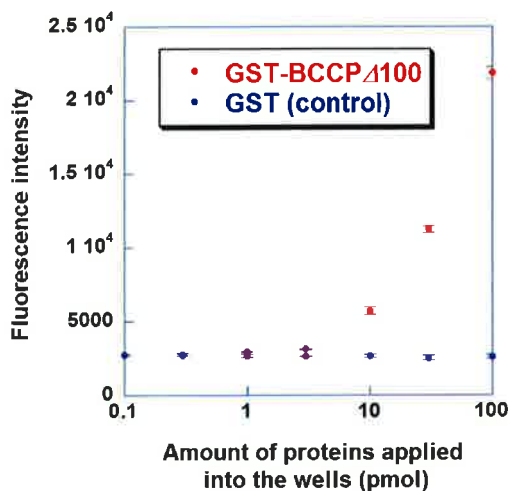


図6 蛍光標識化BPLを利用したマイクロプレート上でのGSTタンパクの蛍光検出

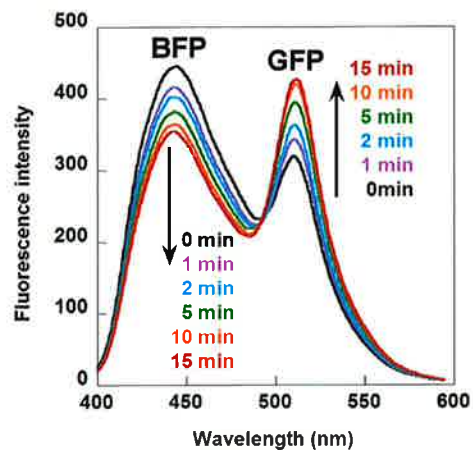


図7 蛍光共鳴エネルギー移動を利用したBPLとBCCP間の反応解析(ビオチン添加後の蛍光スペクトルの経時変化)

2.4. 蛍光共鳴エネルギー移動を利用したBPLとBCCP間の反応解析

BPLとBCCPに関してそれぞれ発光波長の異なる蛍光タンパクとの融合体を構築し、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用したBPLとBCCP間の反応解析に成功した。ここではBPLとBCCPのN末端側にそれぞれGFPとBFPを導入し、ビオチン化反応に基づく両タンパクの会合をFRETを利用してモニターした(図7)。解析の結果、ビオチン化反応の速度定数は、25℃と37℃でそれぞれ $1.92 \times 10^6 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ 、 $3.37 \times 10^5 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ であることがわかった。また、このビオチン化反応は、(1)ATPとビオチンからビオチニル-AMPが生じる反応と、(2)ビオチニル-AMPからBCCPへビオチンが転移する反応の2段階の部分反応から成っているが、後半の部分反応のみをモニターすると、25℃と37℃でほとんど違いが見られなくなり、室温付近でも速やかに反応が進行することが確認できた。一方で、このFRETを利用した実験系は、この複合体形成反応がビオチン及びATPの添加に伴い起こることから、これら生体物質の検出系へ応用することも可能であると考えられる。

3. 主な発表

論文

- ・ Yan-Qiu Li, Shinji Sueda, Hiroki Kondo, Yutaka Kawarabayasi, A unique biotin carboxyl carrier protein in archaeon *Sulfolobus tokodaii*, *FEBS Letters*, **580**, 1536-1540 (2006)
- ・ Shinji Sueda, Yan-Qiu Li, Hiroki Kondo, Yutaka Kawarabayasi, Substrate specificity of archaeon *Sulfolobus tokodaii* biotin protein ligase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **344**, 155-159 (2006)

招待講演

- ・ 末田慎二、古細菌のユニークなビオチン化反応系とその応用、第32回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2008年9月13日

4. 特許

- ・ 末田慎二、田中一史、近藤寛樹、タンパク等の分離・検出方法、特願2007-085384、出願人：国立大学法人九州工業大学