

CutA1を足場とした高度安定型 多価化分子認識素子の開発

岡山大学 学術研究院

環境生命自然科学学域（工）

助教 今中 洋行

2023年9月26日

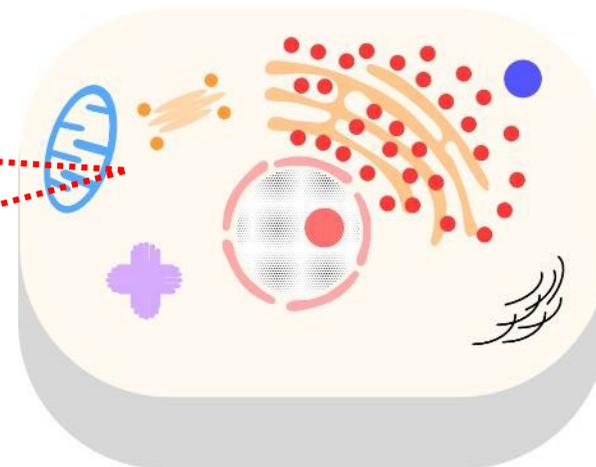
生体分子間相互作用

Biomolecular Interactions

(Nucleic acid · Peptide · Protein · Sugar chain · ·)

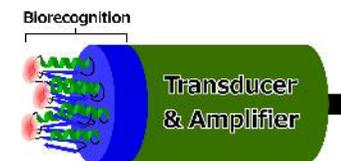
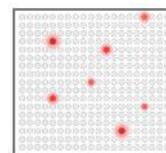
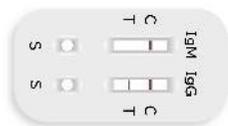
Highly Specific

- Transcriptional Regulation
- Metabolic Regulation
- Signal Transduction
- Immune Response



生命現象は厳密に制御されている

Detection & Use



Medical
Diagnosis

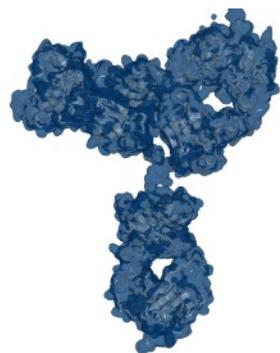
Biologics

Environmental
Analysis

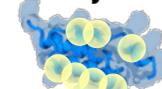
Biosensor

多様な分子を標的とした分子認識素子の創製が必要

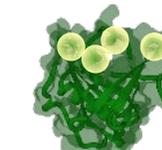
タンパク質性分子認識素子



Affibody^[3]



DARPin^[4]



Anticalin^[5]



FN3^[6]

	IgG 抗体	VHH 抗体	人工抗体様分子
分子量 (Da)	大きい(150k)	小さい(15k)	小さい(6~20k)
宿主	動物細胞	大腸菌, 酵母	大腸菌, 酵母
安定性	低	高	高
分子の改良	困難	容易	容易

高い安定性と特異性を有する分子認識素子が必要

[3] Wahlberg, E, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 3185-3190, (2003)

[4] Binz, H. K., *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 332, 489-503(2003)

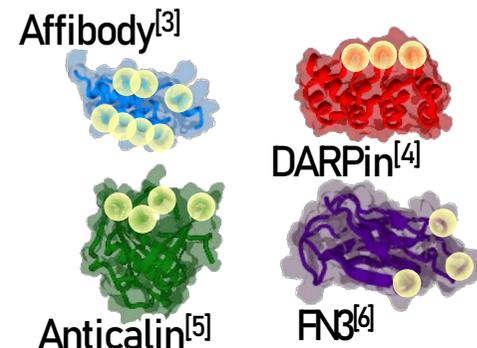
[5] Skerra, A., *et al.*, *FEBS J.*, 275, 2677-2683(2008)

[6] Parker, A., *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.*, 18, 435-444(2005)

タンパク質性分子認識素子

人工抗体様分子の安定性^[7,8]

足場	MW (kDa)	変性温度 (°C)	
		野生型	変異体
Affibody	6	78	42 - 71
DARPin	14-21	86	57 - 89
Anticalin	20	79	53 - 73
FN3	10	84	37 - 73



人工抗体様分子
小さい(6~20k)
大腸菌, 酵母
高
容易

高い安定性と特異性を有する分子認識素子が必要

➡ より安定かつコンパクトな足場分子の開発

[3] Wahlberg, E, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 3185-3190, (2003)

[4] Binz, H. K., *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 332, 489-503(2003)

[7] Vazquez-Lombardi, R., *et al.*, *Drug Discovery Today*, 20, 1271-1283(2015)

[5] Skerra, A., *et al.*, *FEBS J.*, 275, 2677-2683(2008)

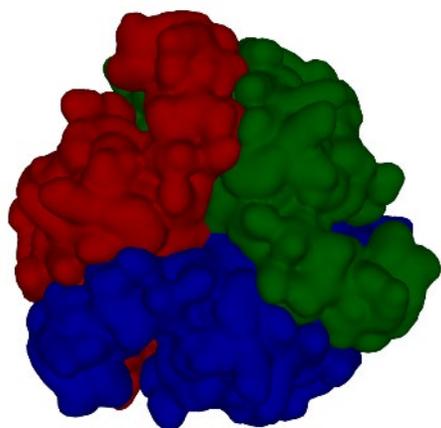
[6] Parker, A., *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.*, 18, 435-444(2005)

[8] Stimple, SD., *et al.*, *AIChE J.*, 66(3), e16814(2020)

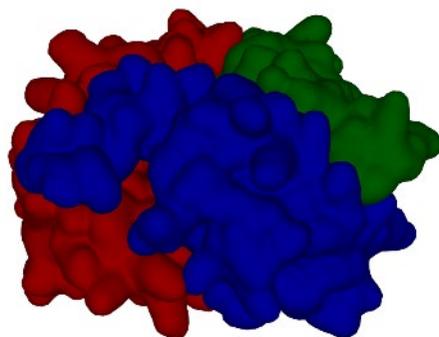
従来技術とその問題点

- 生体分子認識素子としては
IgG抗体の活用が多いが、調製が困難で、
コスト面でも問題が生じることが多い。
- VHH抗体や人工抗体様分子も
広く開発が進められてきているが、
分子認識素子開発における変異導入の際、
構造安定性の低下が避けられない。

タンパク質性足場分子としてのCutA1^[9]



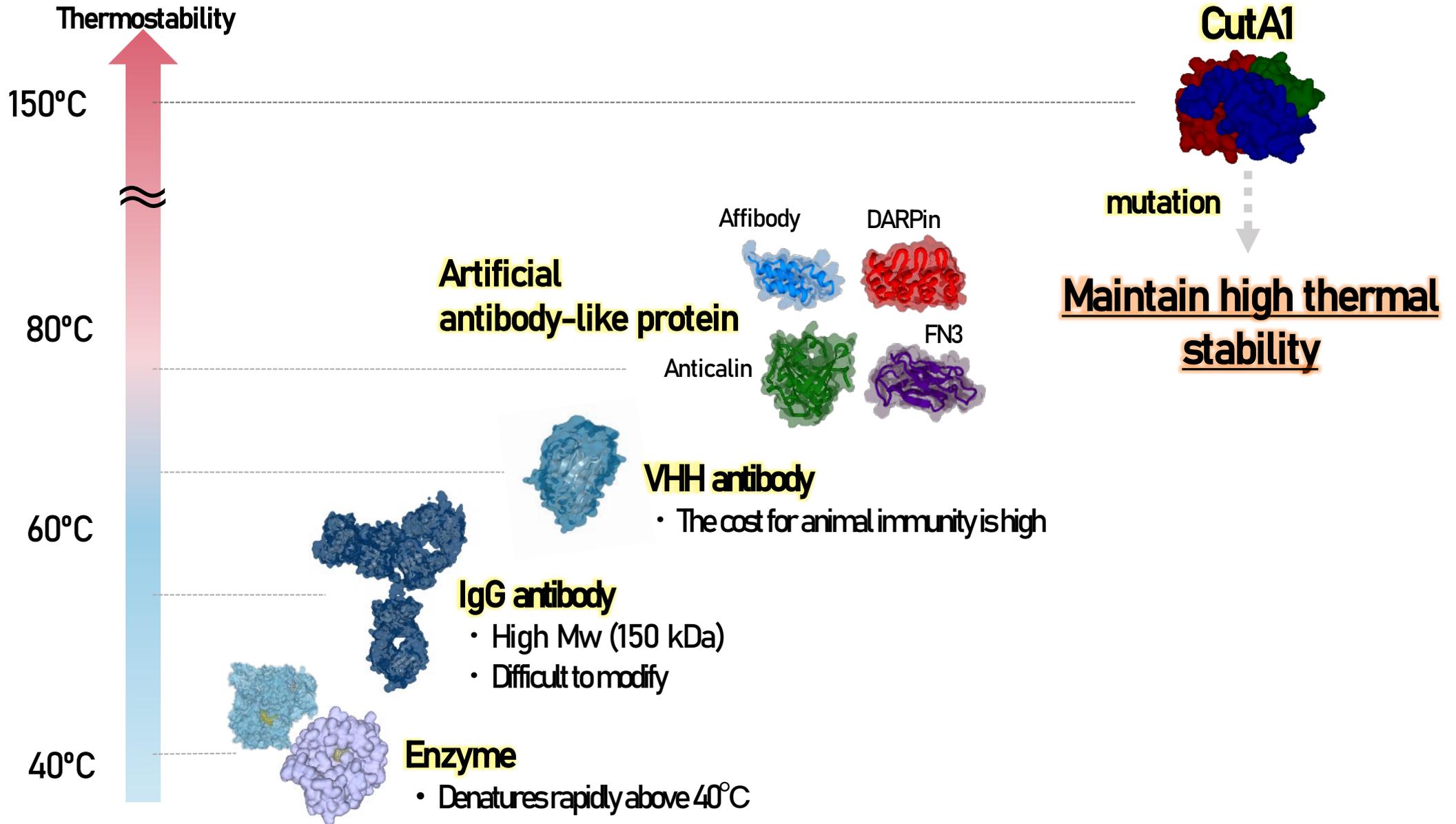
Top view



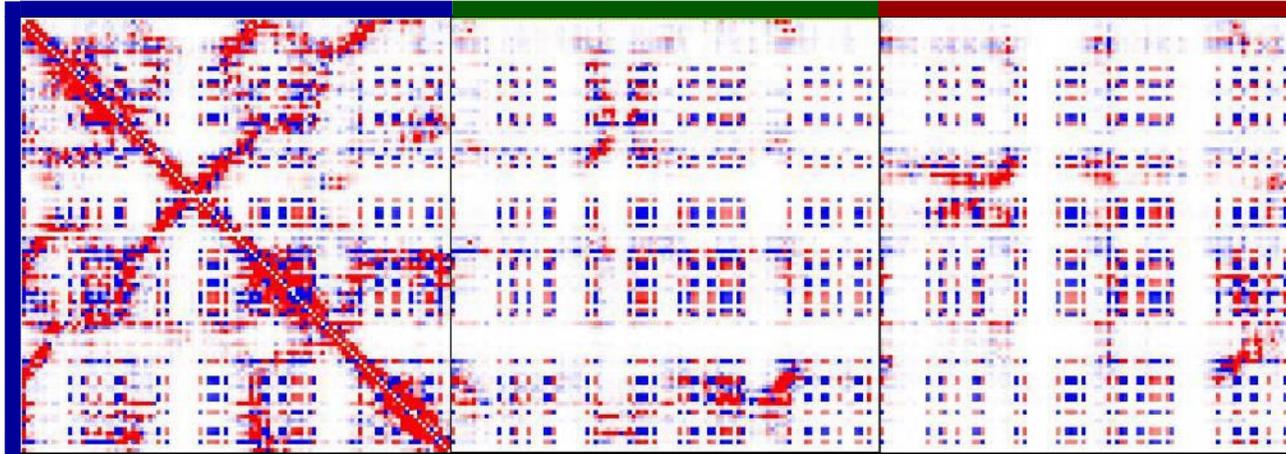
Side view

- From hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*
- Homotrimeric (102 aa x 3)
- High thermal stability ($T_m = 150$ °C)
- Capable of (poly)peptide-conjugation or insertion

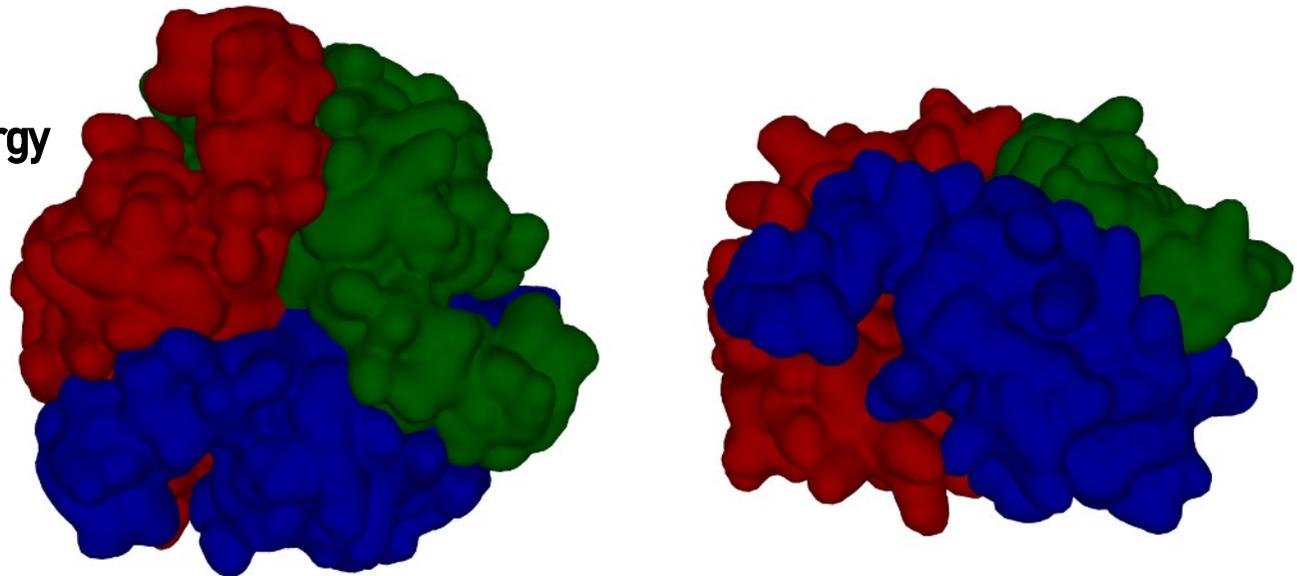
熱安定性



どこに生体分子を挿入・置換するのか

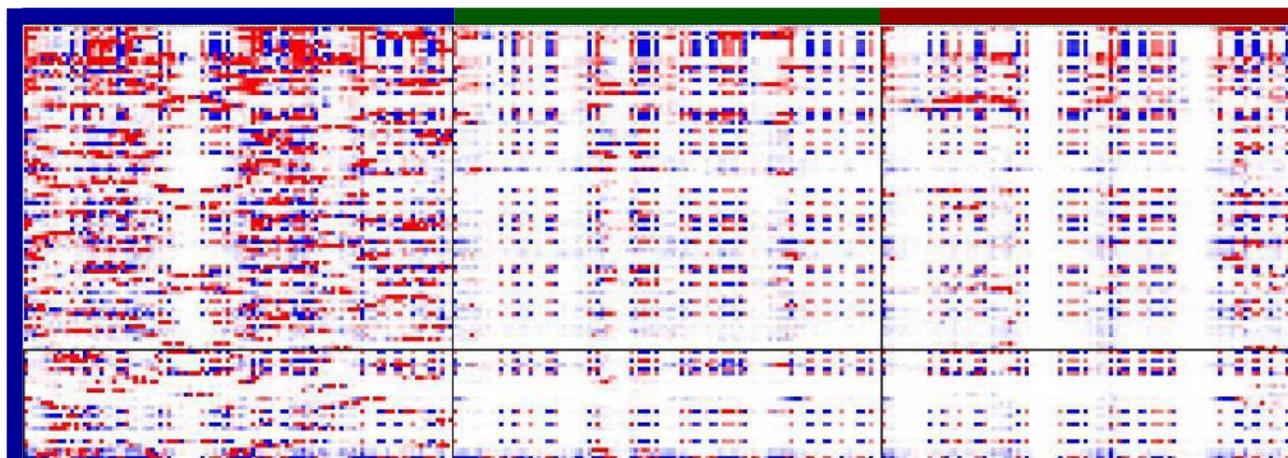


1. Mapping of each side chain-residue interaction energy



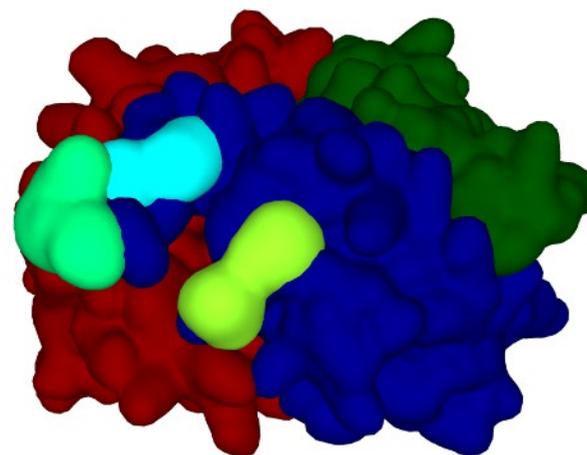
PfCut structure was obtained by AlphaFold2

どこに生体分子を挿入・置換するのか



-13.818	PRO 9
-12.829	THR 10
-6.899	GLU 12
-24.291	ALA 14
-23.715	LYS 16
-16.679	ALA 20
-20.155	ALA 28
-18.63	ALA 30
14.321	LEU 32
-23.252	GLU 34
-14.972	GLN 42
0	GLY 43
-22.939	LYS 44
-24.593	GLU 46
10.739	ASP 48
0	GLY 52
18.145	VAL 53
71.23	LYS 56
-5.928	PRO 74
-17.757	THR 76
-14.671	ALA 79
-14.887	ASN 84
-23.704	VAL 88
-13.381	GLU 90
-8.508	SER 102
11.433	THR 103

2. Ranking of residues by total interaction energy
3. Picking up lower 25% residues
4. Exclusion of residues located
 - at the terminal and vicinity
 - in secondary structure
 - inside the molecule



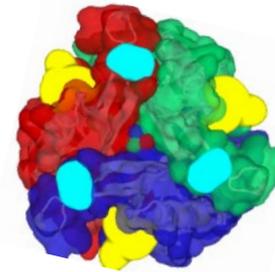
PfCut structure was obtained by AlphaFold2

異なる荷電性・長さを有する ペプチドの挿入

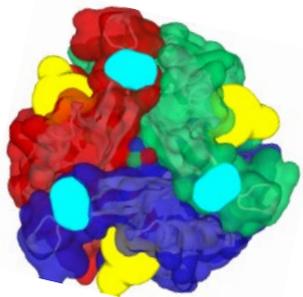
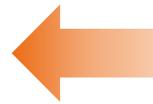
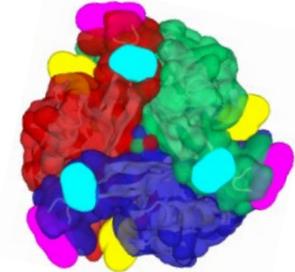
X2/X4 + FL (total 8aa)

G2	GSGGSG	E2	GSEESG
G4	GSGGGGSG	E4	GSEEEESG

2 sites insertion

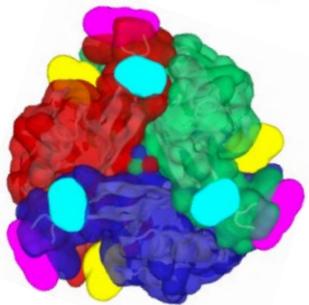


3 sites insertion



Cut_G4_G4_PS

Cut_E4_E4_PS



Cut_G2_G2_G4_PS

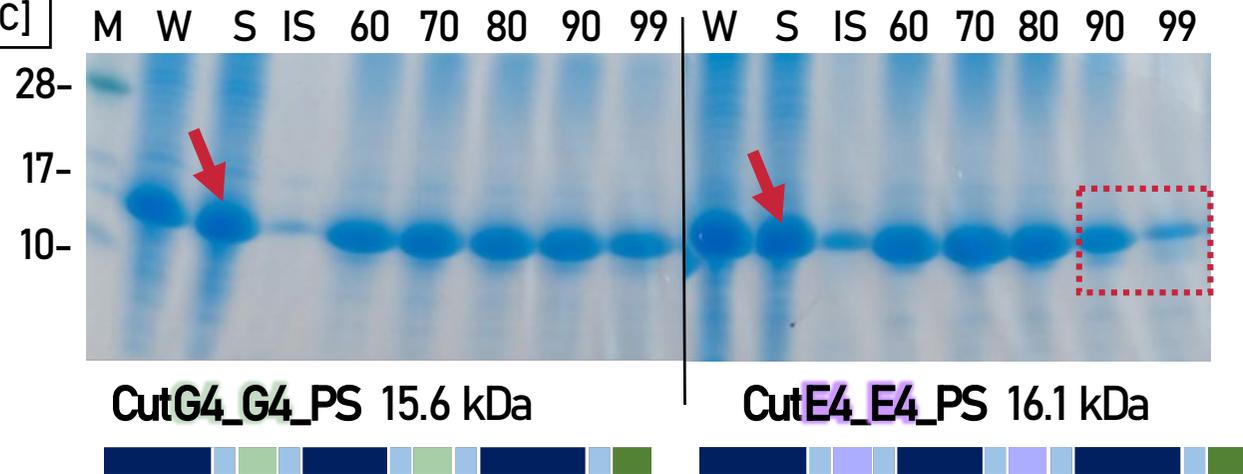
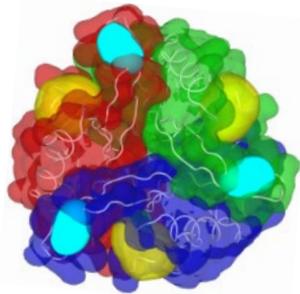
Cut_E2_E2_E4_PS



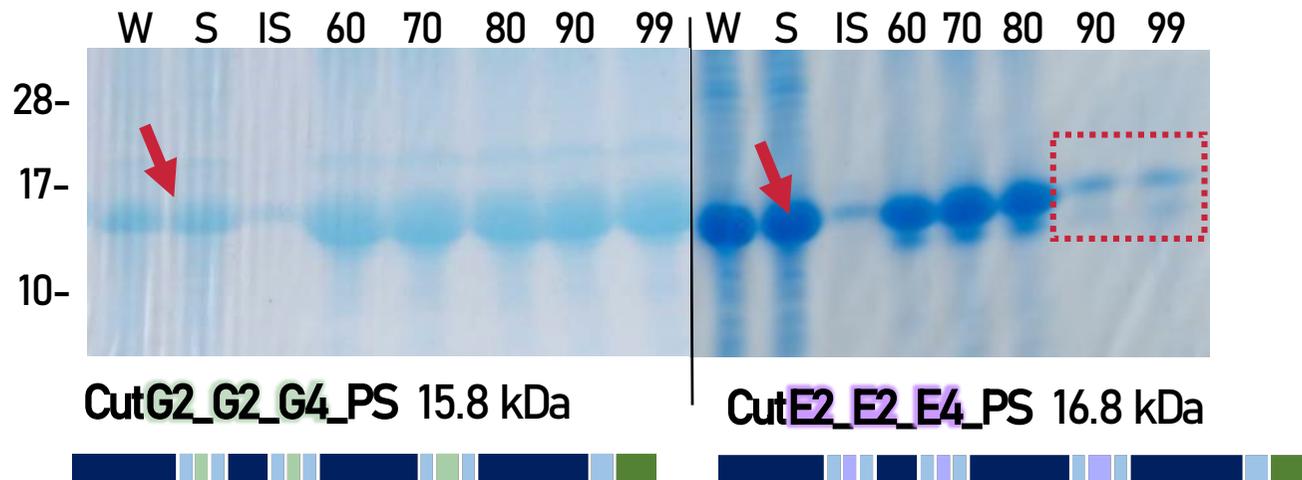
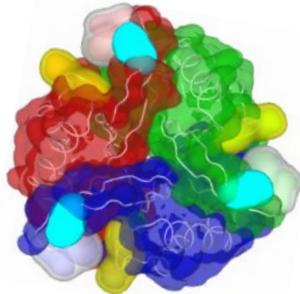
発現タンパク質の可溶化率と熱安定性

60~99: Temp. of Heat Treatment [°C]

2 sites Insertion



3 sites Insertion



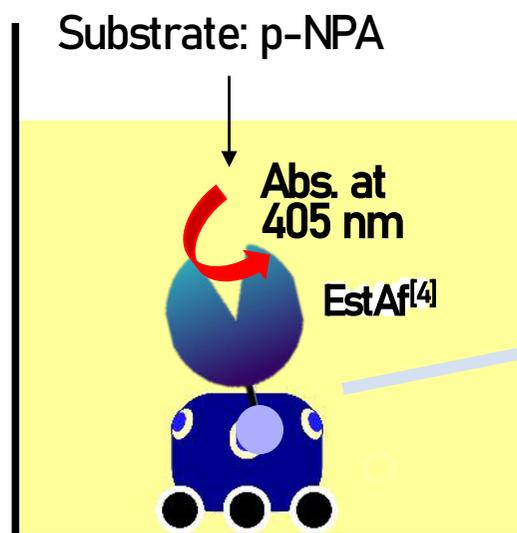
M: マーカー W: 全菌体画分 S: 可溶性画分 IS: 不溶性画分 60~99: 熱処理温度 [°C]

新技術の特徴・従来技術との比較

- CutA1の改良設計により、
複数箇所への生体分子の同時挿入・置換後
においても安定な基盤足場分子を開発した。
→ **多価化分子認識素子**としての利用
- 本技術の適用により、分子の構造安定性が高
レベルで担保されるため、調製コストが大幅
に削減されることが期待される。

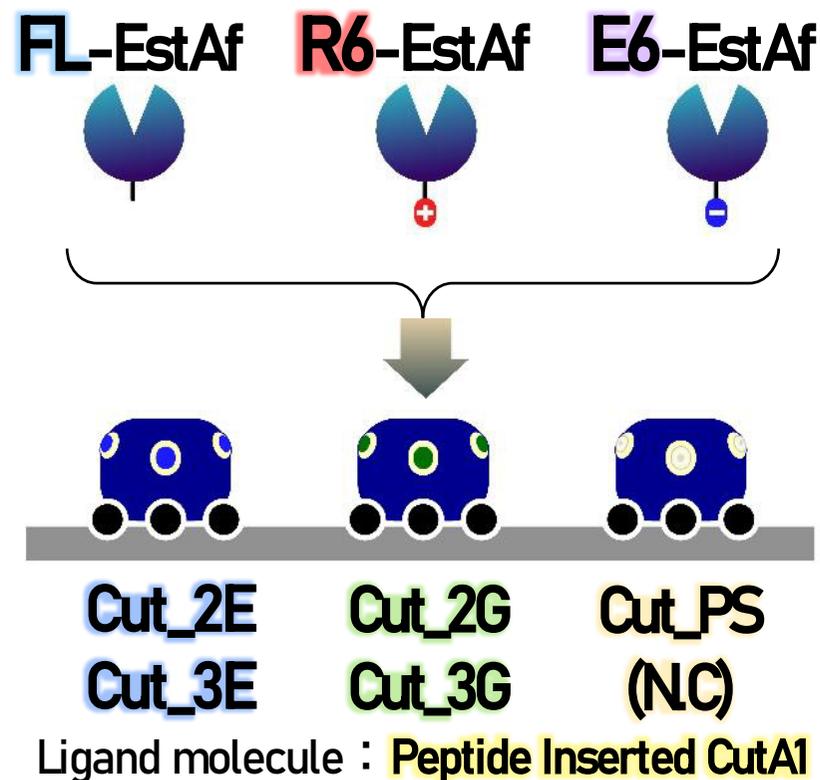
ELA(Enzyme-linked assay)による分子間相互作用検出

On hydrophilic PS microwell

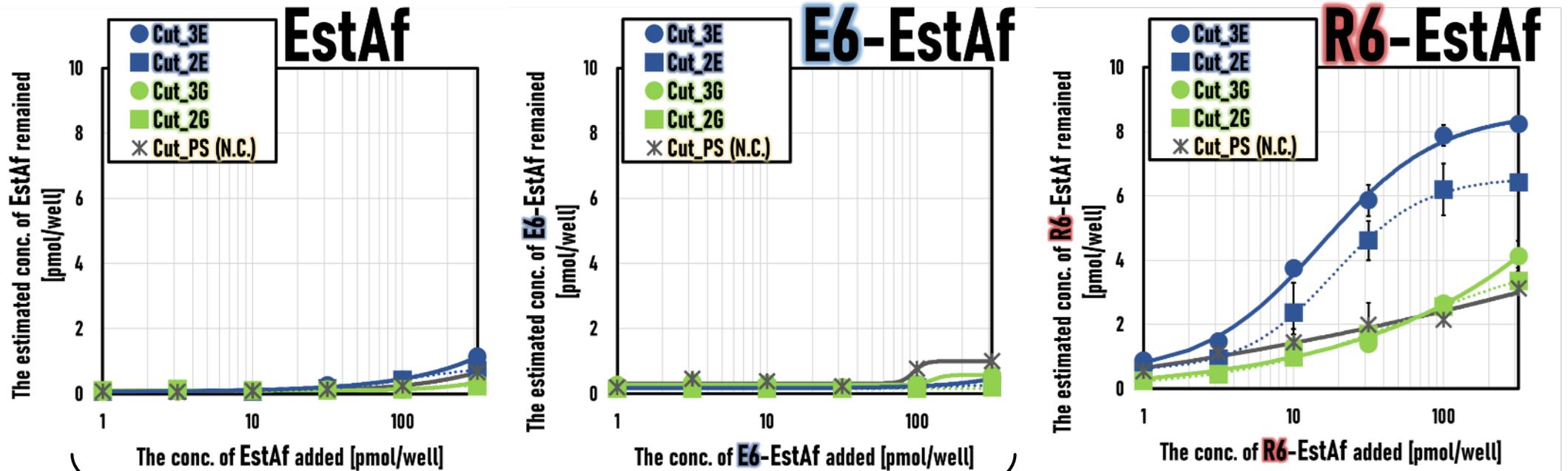


Protein Immobilization
(Conc.: 100 pmol/well)

Analyte Molecule : Peptide conjugated EstAf



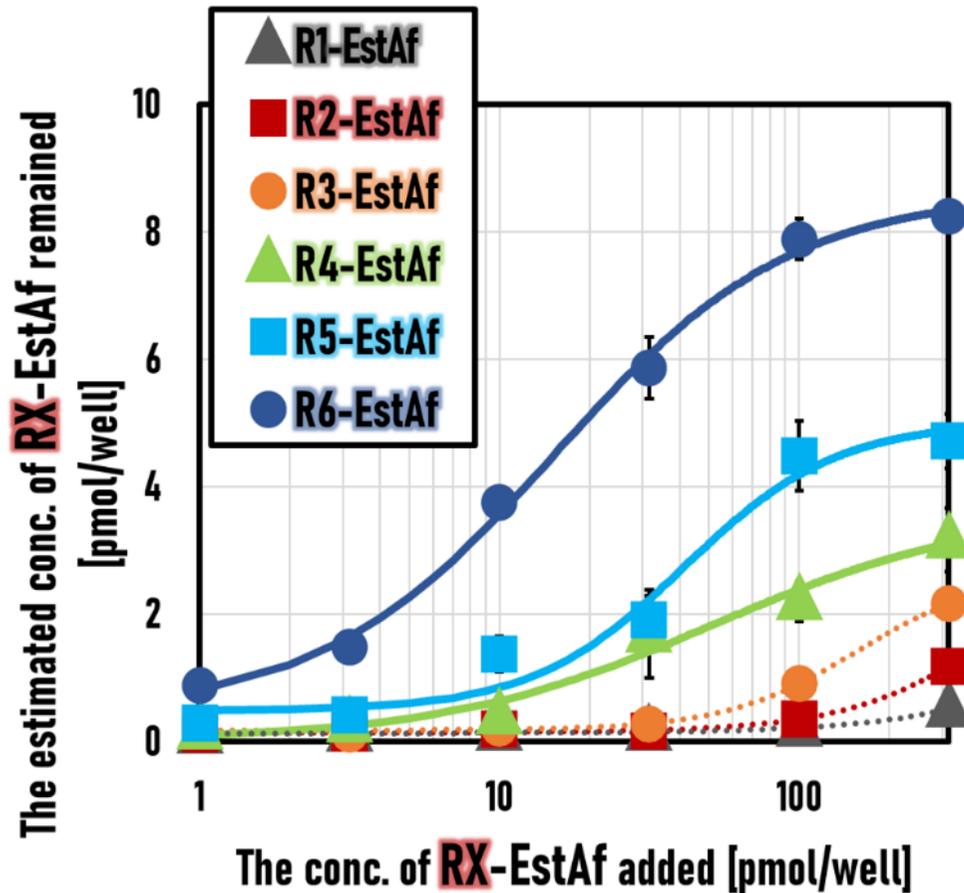
部位特異的な相互作用を再現



EstAfによるCutA1への
非特異的な相互作用は生じない

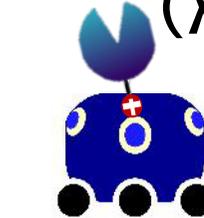
ペプチド挿入/置換部位における
部位特異的な相互作用を検出

低分子化合物の捕捉も可能



RX-EstAf

(X:1-6): 1から6残基のアルギニンを連結



Cut_3E8

$K_d(\text{app})^*$ [nM]

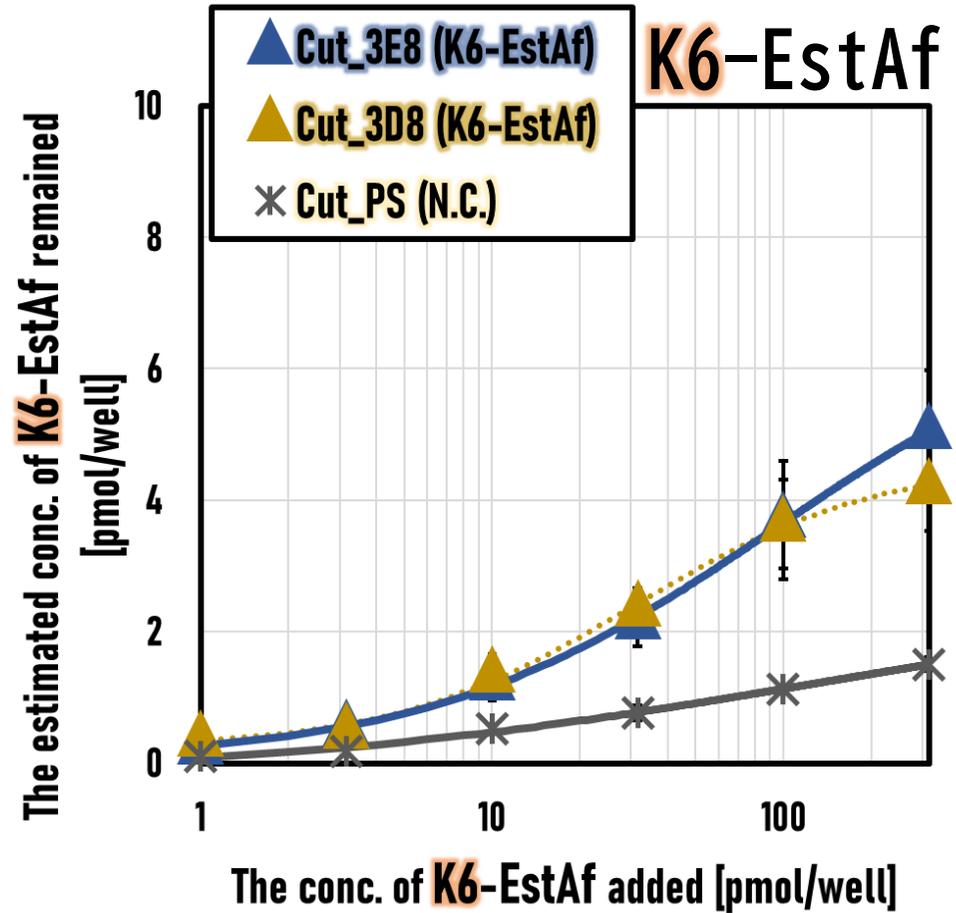
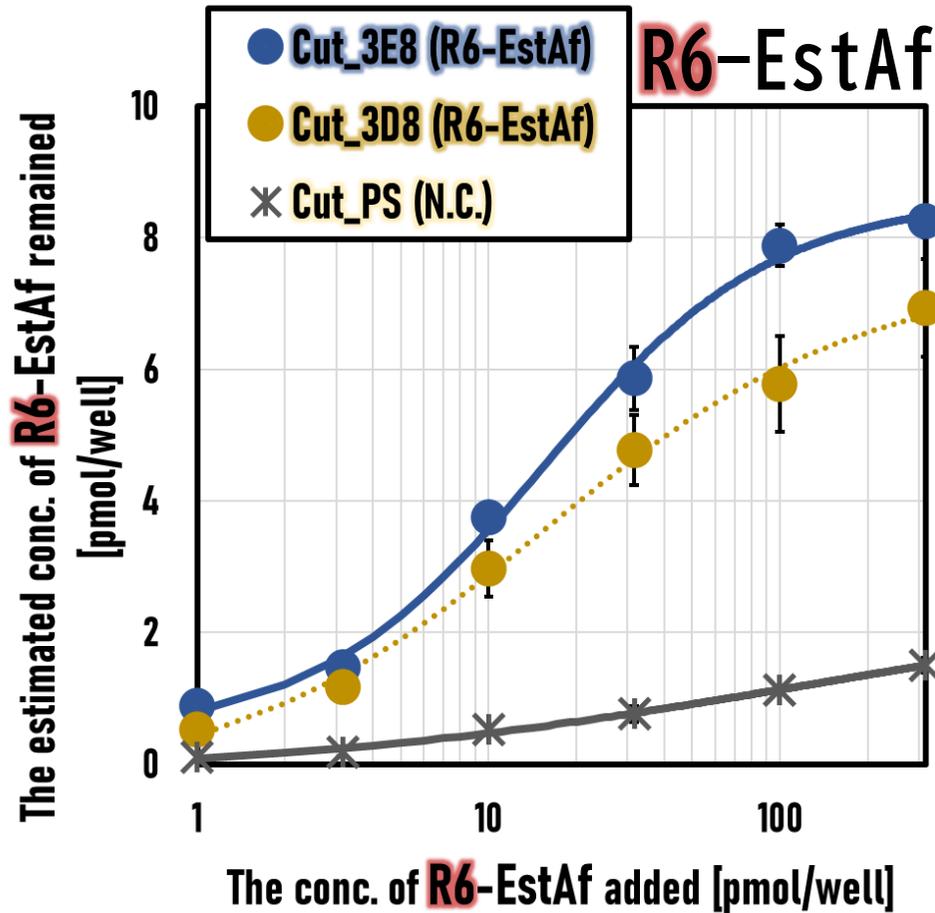
R4-Est 515.6

R5-Est 414.9

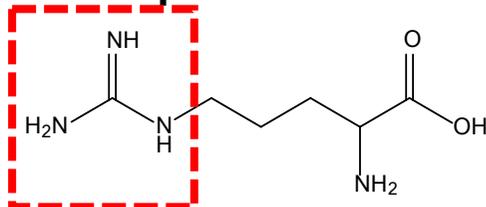
R6-Est 154.1

*4パラメーターロジスティック回帰分析により見かけの解離定数 $K_d(\text{app})$ を算出

類似の特性をもつペプチドとの相互作用の相違

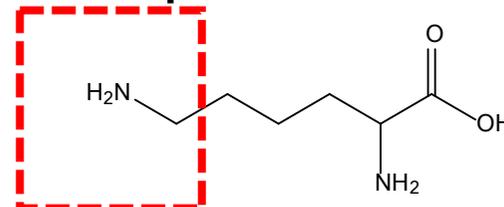


Side chain tip sites



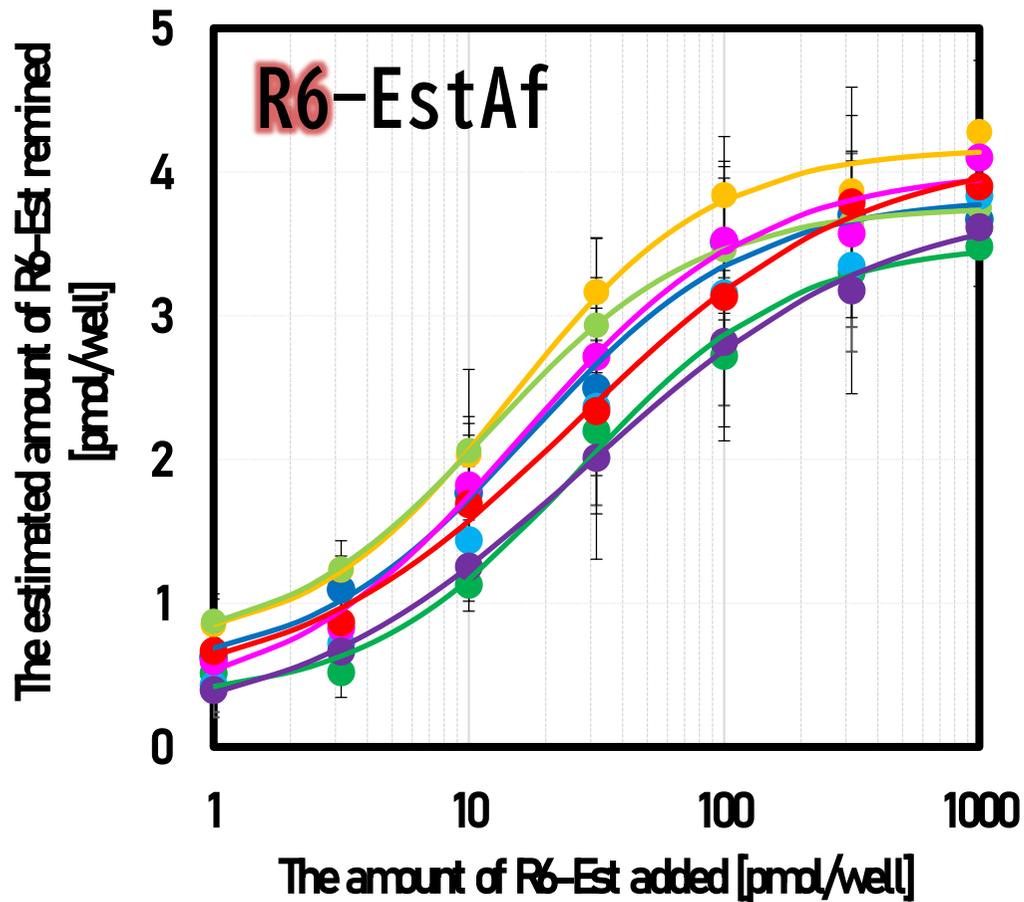
Peptide frame

Side chain tip sites



Peptide frame

側鎖配置の差異が相互作用検出感度に影響



全て可溶化発現
+耐熱性あり(99°C以上)

- Out_41-43GE2_48GE2_75-77GE3_PS
- Out_41-43EG2_48GE2_75-77GE3_PS
- Out_41-43GE2_48EG2_75-77GE3_PS
- Out_41-43GE2_48GE2_75-77EG3_PS
- Out_41-43EG2_48EG2_75-77GE3_PS
- Out_41-43GE2_48EG2_75-77EG3_PS
- Out_41-43EG2_48GE2_75-77EG3_PS
- Out_41-43EG2_48EG2_75-77EG3_PS

想定される用途

- 環境分野におけるバイオセンサーの開発
(環境リスク因子測定)
- 食品分析における測定キットや
高感度バイオセンサーの開発
- 体外診断用医薬品の開発

標的分子に応じた多様な分子設計が可能

実用化に向けた課題

- 凍結乾燥等による長期保存条件の確立
- 分子認識素子取得のためのライブラリー調製
(CutA1表層提示系の確立)
- 挿入分子サイズの限界が不明

企業への期待

- 診断・分析キット開発の基盤技術を有する企業との共同研究を希望
- 微細加工技術を有する企業とのバイオセンサー開発に向けた共同研究を希望
- 具体的な標的分子シーズ・ニーズの提示
- 低分子化合物から細胞まで幅広い標的物質の捕捉を可能とする独自ライブラリー開発のサポート

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 高度に安定でフレキシブルな
タンパク質性分子認識素子
- 出願番号 : 特願2023-139127
- 出願人 : 岡山大学
- 発明者 : 今中洋行、今村維克

お問い合わせ先

岡山大学

研究推進機構 知的財産本部

T E L : 086-251-8417

e-mail : chizai@okayama-u.ac.jp

URL : <https://www.orzd.okayama-u.ac.jp/>