

生体内タンパク質ライゲーションを用いた新規細胞表面ディスプレイ法の開発 —新しい手法によるタンパク質工学の進展—

概要

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻の植田充美教授（現在、産官学連携部教授）、青木航助教、梶原果穂（修士2年（研究当時））、小池直暉博士研究員は、細胞内進化と統合可能な新規酵母表面提示技術を開発し、短時間・低コストでナノボディ（VHH 抗体）などのタンパク質とその変異体を取得できる方法論の確立を試み成功しました。

近年、タンパク質の機能向上を加速する手段として、生物の体内で遺伝子を多様化する細胞内進化（in vivo evolution）が注目されています。細胞内進化では、変異導入酵素が目的の遺伝子に変異を蓄積することで、生物を培養するだけで目的配列が継続的に多様化され、従来の in vitro 法より短時間・低コストな手法になると期待されています。一方、細胞表面ディスプレイはフローサイトメーターを使用したスクリーニングが可能という点から、優れたライブラリープラットフォームです。中でも酵母は真核生物のシャペロンを使用したタンパク質フォールディングが可能であり、大腸菌などの原核生物を宿主とする場合と比較すると、より複雑なタンパク質の提示を行えるというメリットがあります。しかし、酵母表面ディスプレイにおいてはディスプレイするタンパク質と足場タンパク質を同一の遺伝子カセットでコードしており、足場タンパク質に変異が導入された場合はタンパク質のディスプレイが起こらなくなってしまうので、細胞内進化と組み合わせることが困難であるという問題点がありました。

そこで本研究では、酵母表面ディスプレイと細胞内進化を統合に向けて、SpyTag/SpyCatcher システムを用いた新規酵母表面ディスプレイ技術を開発しました。

本研究成果は 2021 年 5 月 26 日に国際学術雑誌 Scientific Reports に掲載されました。

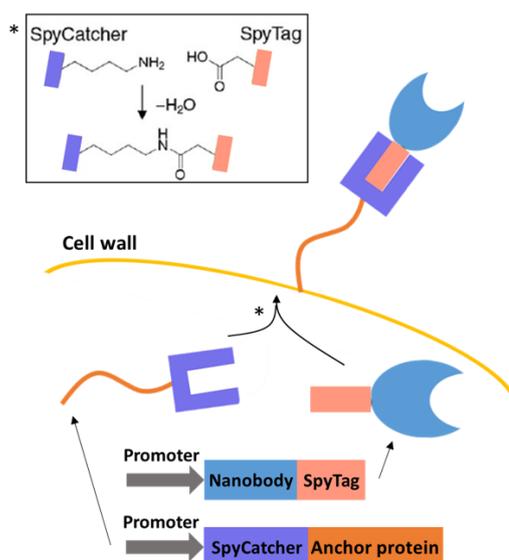


図 1: 本研究で発明した SpyTag/SpyCatcher 表面

背景

ナノボディとはラクダ科動物に由来するシングルドメイン抗体であり、通常の抗体の約十分の一の大きさで機能します。ファージディスプレイや酵母ディスプレイを用いて強力なナノボディを取得する方法が開発されてきましたが、変異を導入するプロセスと変異体を評価するプロセスが分断されており、ナノボディの取得には時間とコストがかかるという課題がありました。

近年、タンパク質の機能向上を加速する手段として、タンパク質の細胞表層ディスプレイ法と生物の細胞内で遺伝子を多様化する細胞内進化が着目されています。細胞内進化では、変異導入酵素が目的の遺伝子に変異を蓄積することで、生物を培養するだけで目的配列が継続的に多様化される。しかし、ディスプレイ技術との相性は良くありません。例えば、酵母ディスプレイでは、ナノボディを足場タンパク質との融合タンパク質として発現させて酵母細胞壁へ固定化する必要がありますが、足場タンパク質に変異が入ると提示自体が起こらなくなってしまいます。

そこで本研究では、短時間・低コストでナノボディを取得できる方法論の確立に向けて、細胞内進化と統合可能な新規酵母表層ディスプレイ技術を開発しました。

1. 研究手法・成果

翻訳後のタンパク質を結合させて酵母表層にディスプレイする方法の開発

不可逆的にイソペプチド結合を形成する SpyTag/ SpyCatcher システムを利用し、異なる遺伝子カセットから発現する足場タンパク質とナノボディを酵母内で結合させて酵母表層に提示する方法を開発しました（図1）。モデルとして、抗リゾチウムナノボディに SpyTag を付加し、足場タンパク質 649-stalk にエピトープタグと SpyCatcher を付加した酵母株を作製しました。エピトープタグに対する抗体と、標識リゾチウムを用いて染色した酵母をフローサイトメーターで分析しました。足場タンパク質を提示させるベクターとしてゲノムインテグレーション型のベクターを使用した場合に提示率は最高となり、約 93%の酵母がナノボディを提示しました（図2、図3）。本技術は、足場タンパク質とは異なる遺伝子カセットから発現させたナノボディを高い効率で細胞壁に固定化することができるため、細胞内進化でナノボディのみに変異を蓄積可能な新規プラットフォームになると期待されます。

このシステムを使用することで、ランダム化配列を有する多様なナノボディを提示できることを確認しました。（図4）

次に、本手法を用いてディスプレイを行う際に、別の酵母に由来するナノボディの提示（クロストーク）が起こりうるかもしれない危惧がありました。そこで、ディスプレイするナノボディと足場タンパク質に付加したエピトープタグがそれぞれ異なる 2 種類の酵母株を共培養後、HA 抗体と蛍光標識リゾチウムで染色して顕微鏡観察を行いました。その結果、HA 抗体によって染色される酵母は、別の酵母株に由来する抗リゾチウムナノボディを提示しませんでした。この 2 種類の酵母株を混ぜて培養した場合に細胞間クロストークは発生せず、1 つの細胞は 1 種類のナノボディのみを提示したことから、イソペプチド結合形成は全て 1 つの細胞内で起こることを証明しました（図5）。つまり、SpyTag / SpyCatcher の結合形成は細胞内で起こり、クロストークは起こらないことが示されました。

さらに、本手法がライブラリーのスクリーニングに使用できることを確かめるため、フローサイトメーターを用いて目的細胞の濃縮を試みた。リゾチウムに結合しないナノボディを提示する酵母に抗リゾチウムナノボディ提示酵母を 0.1%混ぜたサンプルを蛍光標識リゾチウムと混合し、蛍光陽性細胞をソーティングしました。回復培養後に再度標識リゾチウムと混合して分析すると、蛍光陽性細胞が約 94%まで濃縮されていることが確認できました (図 6)。これらの結果から、開発した SpyTag / SpyCatcher を介した表層ディスプレイ法は優れたスクリーニングプラットフォームであると考えられた。

2. 結論

本研究では細胞内進化と酵母細胞表層工学を統合するために、異なる遺伝子カセットから発現したタンパク質を酵母内で結合させて酵母表層に提示する技術を構築した。本手法をナノボディに適用したところ高いディスプレイ率で任意のナノボディをディスプレイでき、フローサイトメーターによってターゲットへの結合力が高いナノボディを濃縮することができる。この技術と細胞内進化を組み合わせることで、短時間・低コストでナノボディの機能向上を行うライブラリー構築が可能になると期待できる。

3. 波及効果、今後の予定

本手法は *in vivo evolution* によるライブラリー作製において優れたプラットフォームになり、新興感染症を始めとして、昨今のコロナウイルスなどに対する即効性中和抗体の創出などにも貢献できると期待できる。

4. 研究プロジェクトについて

JST-CREST (grant number JPMJCR16G2) および JST-COI-NEXT (grant number JPMJPF2008)の支援により推進された。

<研究者からのコメント>

本研究では細胞内進化と酵母細胞表層工学 (ディスプレイ) を統合するために、異なる遺伝子カセットから発現したタンパク質を酵母内で結合させて酵母表層にディスプレイする技術を構築した。本手法は細胞内進化と組み合わせることで、タンパク質エンジニアリングの強力なスクリーニングプラットフォームになると期待できる。

<論文タイトルと著者>

論文名: Development of a yeast cell surface display method using the SpyTag/SpyCatcher system

著者: Kaho Kajiwara, Wataru Aoki, Naoki Koike, Mitsuyoshi Ueda

掲載誌: Scientific Reports DOI : 10.1038/s41598-021-90593-w



青木航助教、梶原果穂、小池直暉

<参考図表>

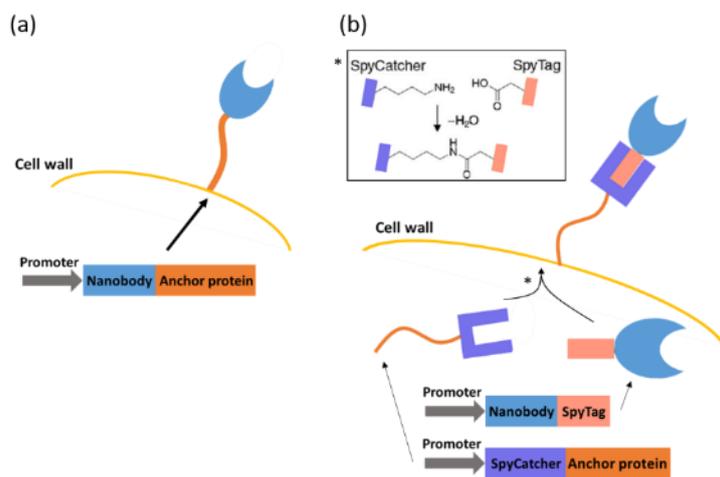


図1. (a) 従来の酵母表層ディスプレイシステム
(b) 本研究で発明したSpyTag/SpyCatcher表層ディスプレイシステム

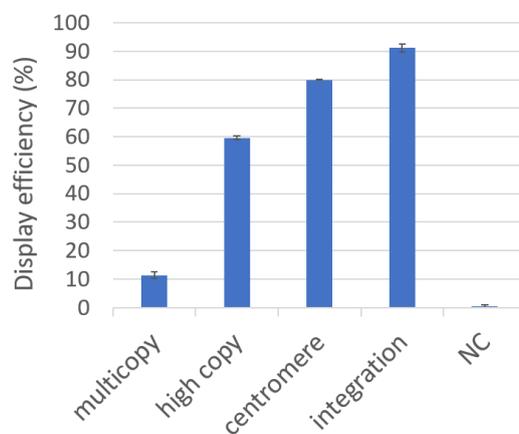


図2. ベクター条件の最適化

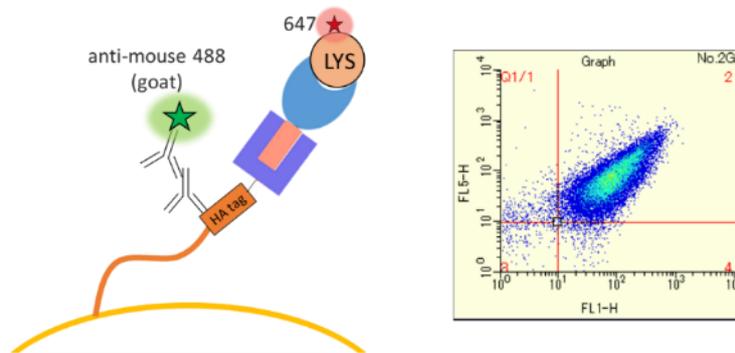


図3. 発明概念の実証

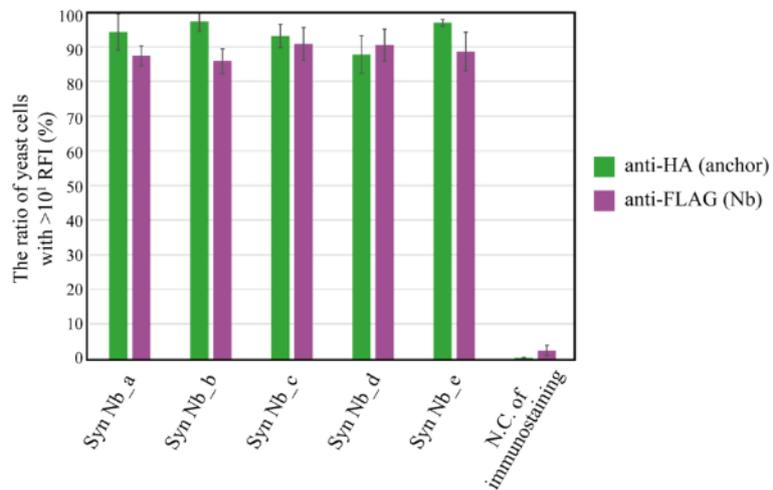


図4. SpyTag/SpyCatcher表層ディスプレイを用いた合成ライブラリー由来ナノボディのディスプレイ

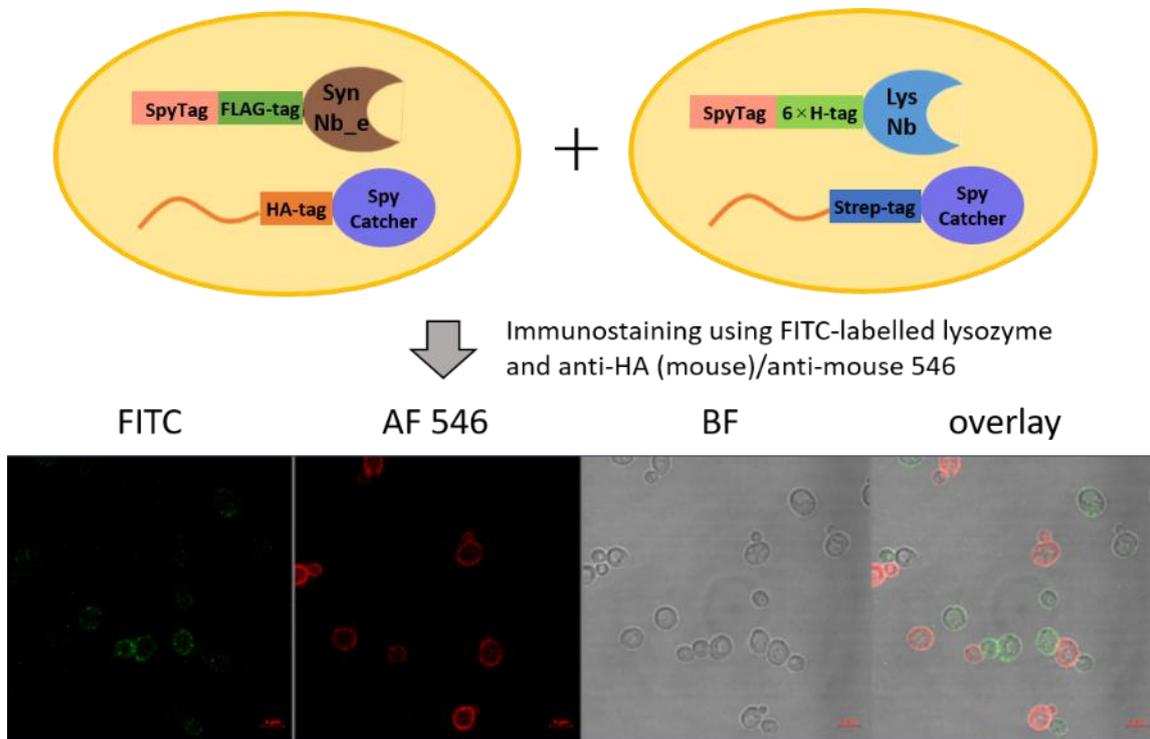


図5. SpyTag/SpyCatcher間の結合は全て一つの細胞内で起こることの実証

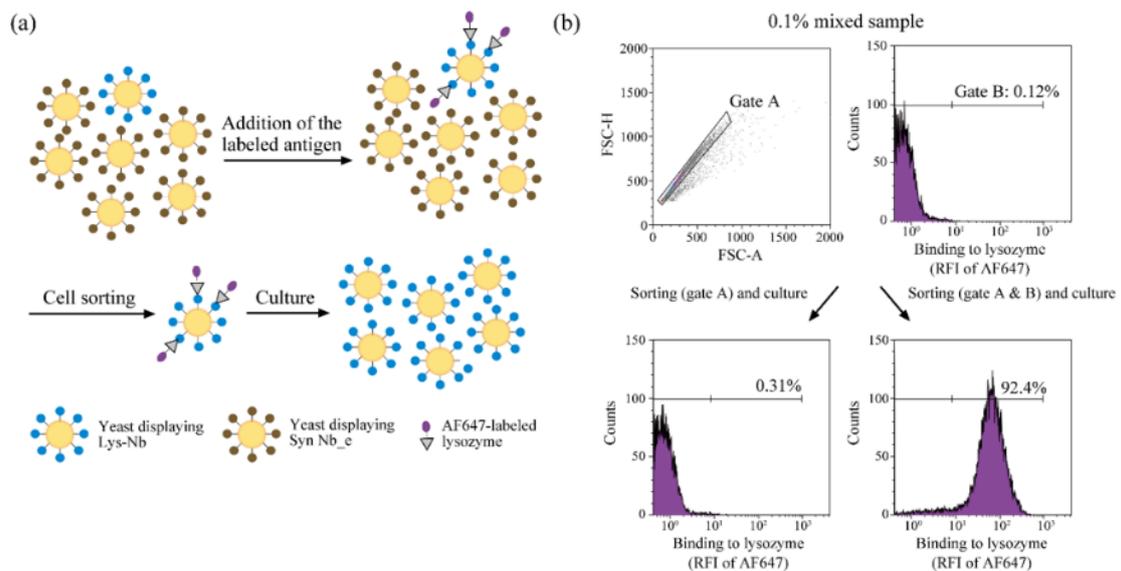


図6. 0.1%混合サンプルからのエンリッチメント