

2023 年度年次報告書

原子・分子の自在配列と特性・機能

2021 年度採択研究代表者

真壁 幸樹

山形大学 大学院理工学研究科

教授

分岐を持った蛋白質ユニット自在配列の実現

研究成果の概要

本年度は昨年度に引き続き、小型抗体の分岐複合体 **Dendrobody** を作り出すための各パーツについての連結反応を進めた。また、分岐ユニットの免疫原性低下を目指した分子の再設計を領域内連携として静岡県立大学の中野先生と進めた。また、**SpyCatcher/SpyTag** の条件依存的な連結を目指した保護されたアミノ酸を持つ **SpyTag** の合成を昨年度に引き続き進めた。

Dendrobody の作製では分岐構造を **one-pot** で合成できる構成の実現を目指した。各ユニットの生合成・精製に成功し、**one-pot** での連結反応が進行できることを確認した。また、バイオレイヤー干渉法によって標的への結合活性を確認した。現在、生化学的な評価に向けた調製を進めている。

免疫原性低下を目指した分岐ユニットの再設計では中野先生がインシリコ進化させた配列を生合成し、外部委託で抗原性を評価した。結果、抗原性の低減が確認できたため、**Dendrobody** への組み込みを進めている。

SpyCatcher/SpyTag の条件依存的な連結を実現するための、アルコキシ化した **SpyTag** ペプチドの構築では、副反応物として異性体の生成が起こった。そこで、異性化反応の同定を進め、イソアスパラギン酸の生成がおきていることを決定した。それに基づいて配列を再設計し、副反応が起こらない改変 **SpyTag** を作製できた。これらの結果を論文として投稿した。

【代表的な原著論文情報】

- 1) Mikoto Kiya, Shota Shiga, Peiwei Ding, Shohei Koide, and Koki Makabe, “ β -Strand-mediated domain-swapping in the absence of hydrophobic core repacking”, *Journal of Molecular Biology*, 436(2), 168405 (2024).
- 2) Masaki Takahashi, Shigekazu Yano, Yui Horaguchi, Yuitsu Otsuka, Wasana Suyotha, Koki Makabe, Hiroyuki Konno and Susumu Kokeguchi, “ α -1,3-Glucanase from the gram-negative bacterium *Flavobacterium* sp. EK-14 hydrolyzes fungal cell wall α -1,3-glucan”, *Scientific Reports*, 13, 21420 (2023).
- 3) Koki Makabe, Naoki Ishida, Nanako Kanazaki, Yoshihito Shiono, and Takuya Koseki, “*Aspergillus oryzae* α -L-rhamnosidase: crystal structure and insight into the substrate specificity”, *Proteins*, 92(2), 236-245 (2024).
- 4) Risa Yamada, Ishin Nakahara, Izumi Kumagai, Ryutaro Asano, Takeshi Nakanishi, and Koki Makabe, “Construction of IgG–Fab² bispecific antibody via intein-mediated protein trans-splicing reaction”, *Scientific Reports*, 13, 15961 (2023).