

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19206085

研究課題名（和文）

物性の人工制御による高難度タンパク質の新規生産・解析手段の開発と応用

研究課題名（英文） Development of analytical and production method for problematic protein by artificial control of physical property of protein

研究代表者 山田 秀徳 (YAMADA HIDENORI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：80037613

研究代表者の専門分野：タンパク質工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオテクノロジー、生物・生体工学、蛋白質、化学修飾、結晶化、可溶化

1. 研究計画の概要

本研究ではタンパク質カチオン化技術を基本とした化学修飾法によるタンパク質の物性制御に関する独自技術を発展的に活用し、新たなタンパク質機能解析や人工タンパク質の生産技術に関する新たな研究用ツールの提供と、次世代のタンパク質医薬品の創製に資する基盤技術を確立する。さらにタンパク質の結晶中での分子配向性を人為的に制御する新規なタンパク質結晶工学技術等を基盤として、難結晶性タンパク質の結晶化と構造解析を可能とする課題にも取り組む。これらの技術を総合的に組み合わせ、従来技術では取り扱いが困難な高難度タンパク質を基礎研究から実用化分野にまで取り扱いを可能とするタンパク質工学の基盤技術を確立することを目的とする。

2. 研究の進捗状況

(1) タンパク質細胞内導入技術の改良と、機能解析・生産技術への応用

Native 構造のタンパク質を高効率に生細胞内に導入するための試薬として、GST 融合タンパク質の細胞内導入技術 (J.Biochem. (2008)144,447) の開発に成功した。本試薬は組換えタンパク質として汎用されている GST 融合タンパク質と混合するだけで培養細胞内へ高効率にタンパク質を送達することが可能で、タンパク質と細胞の機能解析ツールとして非常に有用である。本試薬と導入条件、添加剤などを検討した結果、繊維芽細胞ではほぼ 100%の高効率で GST 融合タン

パク質を細胞質内まで高効率に送達可能なプロトコルを完成した。一方、変性状態のタンパク質の細胞内導入に関しては、システイン残基にジスルフィド結合を介して正電荷を導入する可逆的変性カチオン化法により可溶化し、細胞内導入後に活性構造に自発的・シャペロン依存的に巻き戻す in cell folding 法は、従来法では困難であったタンパク質も利用ができる手法である。これまで、1ヶ所のシステイン残基に対し、3個の4級アンモニウム基を導入できる新規カチオン化試薬：TAP3S-Sulfonate の合成に成功（特願 2010-070804）し、高い溶解性と品質安定性を維持したサンプル調製が可能となり、本技術の汎用性の向上に向け、確実に技術水準が向上している。

(2) 結晶化タグを用いた結晶分子配向性制御

本研究の開始時には、難結晶性のタンパク質の分子表面の相互作用部位に 2-3 個の疎水性のロイシンを配置させた結晶化のパッキングサイト（結晶化タグ）のデザインには既に成功しており、新規のタグ配列の探索と本手法の有用性の検証を進めている。これまでのところ、3 個の親水性のアミノ酸を用いた結晶化タグでも、難結晶化タンパク質を結晶化させる例を発見し、結晶分子配向性制御の戦略の一般性を証明できた。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している

変性タンパク質の高度な可溶化技術、高効率

なタンパク質細胞内導入技術、タンパク質の結晶化における配向制御等、各要素技術の改善が大幅に進捗し、本技術を活用した応用研究が効率的に推進できる体制が整った。

4. 今後の研究の推進方策

タンパク質の溶解性や分子間会合を制御するための新規の化学修飾試薬や方法論を活用し、他の手法では生産が困難なタンパク質の調製や、難結晶性のタンパク質の結晶化への応用を試みる。同時に、これまでの研究で得られてきた要素技術を用いて、次世代の細胞再生医療や創薬に活用するための新規の用途開発を進め、本研究成果を早期に社会に還元するための研究を展開する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

① Murata H., Futami J., Kitazoe M., Kosaka M., Tada H., Seno M., Yamada H. Transient cell proliferation with polyethylenimine-cationized N-terminal domain of Simian Virus 40 large T-antigen. *J. Biosci. Bioeng.* 105, 34-38 (2008)
査読あり

② Hitoshi Murata, Junichiro Futami, Midori Kitazoe, Takayuki Yonehara, Hidetaka Nakanishi, Megumi Kosaka, Hiroko Tada, Masakiyo Sakaguchi, Yasuyuki Yagi, Masaharu Seno, Nam-ho Huh and Hidenori Yamada.
Intracellular delivery of glutathione S-transferase-fused proteins into mammalian cells by polyethylenimine-glutathione conjugates. *Journal of Biochemistry* (2008) 144(4):447-455
査読あり

③ Junichiro Futami and Hidenori Yamada. Design of cytotoxic ribonucleases by cationization to enhance intracellular protein delivery. *Cur. Pharm. Biotechnol.* (2008) 9, 180-184
査読あり

④ Midori Kitazoe, Junichiro Futami, Mitsuo Nishikawa, Hidenori Yamada and Yoshitake Maeda. Polyethylenimine-cationized β -catenin protein transduction activates the Wnt canonical signaling pathway more effectively than cationic lipid-based

transduction
Biotechnology Journal (2010) 5, 385-392
査読あり

[学会発表] (計3件)

① 土井慎一, 小坂恵, 二見淳一郎, 多田宏子, 玉田太郎*, 岡崎伸生*, 黒木良太*, 山田秀徳 (*原研) 結晶格子工学によるウシ RNase A の結晶空間群の変更
第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)
2008.12.12

② 二見淳一郎
タンパク質カチオン化技術の医用工学への応用
大阪大学蛋白質研究所セミナー: 蛋白質を創る、知る、使うー蛋白質科学と産業応用
2008.9.29

③ 穴井祐介, 矢木恵一郎, 二見淳一郎, 小坂恵, 多田宏子, 山田秀徳
変性タンパク質の可溶化と細胞内導入を目的とした新規 SH 基多価カチオン化試薬の合成と解析
第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)
2008.12.12

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)
名称: チオスルホナート化合物、タンパク質及び/又はペプチドの可逆的カチオン化剤並びに可溶化方法
発明者: 二見淳一郎、山田秀徳、久良木豪、矢木恵一郎
権利者: 岡山大学
種類: 特許
番号: 特願 2010-070804
出願年月日: 22年3月25日
国内外の別: 国内

[その他]