

平成23年5月13日現在

機関番号：15301
 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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、タンパク質の化学修飾技術と難結晶性タンパク質の結晶化促進技術の改善を進め、既存の手法では取り扱いが困難なタンパク質を自由自在に取り扱うための技術開発に取り組んだ。新規な化学修飾試薬やタンパク質の調製方法等を最適化した結果、転写因子タンパク質の細胞内導入技術の改善、がん細胞由来総タンパク質の可溶化と強力な結晶化タグの開発に成功し、タンパク質の構造・機能解析と医用応用に活用できる有用な技術開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed development of handling technology especially for problematic protein using chemical conjugation techniques and protein crystallization methodology. Novel chemical modification reagent and optimization of protein preparation techniques provided improved transduction of transcription factor protein into cells, and solubilization of total cellular protein from cancer cells. Together with a newly developed protein crystallization tag sequence, these technologies will give a useful methodology for structure and functional analysis of proteins and their medical applications.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2008年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2009年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2010年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
年度			
総計	31,400,000	9,420,000	40,820,000

研究分野：生物機能・バイオプロセス

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. 研究開始当初の背景

遺伝子配列の解読技術や微量タンパク質の検出・解析技術が飛躍的に向上し、分子レベルでの生命現象の理解や各種の疾患に対する治療指針が考察できる時代となってきた。この生命現象の実行部隊はタンパク質であり、各々のタンパク質の構造・機能解析や、その機能を活用した創薬は、バイオテクノロジー分野の重要課題である。ところが多種多様な生理機能を発現できるタンパク質は、その物性も千差万別であり、必ずしも取り扱いが容易でないタンパク質も多く存在する。このような課題を解決するツールとして、我々は本研究開始時に①タンパク質の化学修飾技術を駆使して細胞内にタンパク質を導入する技術、②変性状態のタンパク質を可溶化する技術、③難結晶性タンパク質を結晶化させるための方法論を保持していた。本研究ではこれらの技術の改良・応用を進めることとした。

2. 研究の目的

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、新規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の確立を目標とした。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ととした。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した。

3. 研究の方法

本研究開発は高難度タンパク質をはじめ、多種多様なタンパク質の取り扱いを改善するための技術開発が目標であるが、具体的に

は以下の3テーマについて中心的に取り組んできた。

(1) in cell フォルディング法の確立と人工タンパク質生産技術への応用

タンパク質の Cys 残基に対し、可逆的な SS 結合を介して正電荷を付与する可逆的変性カチン化技術は、変性タンパク質の可溶化技術となるほか、培養細胞に添加すると細胞表面への吸着を介した経路で細胞内へ取り込まれ、還元的な細胞質まで移行したタンパク質は、自発的またはシャペロン依存的に活性構造に巻き戻る(in cell フォルディング法)。この手法の改善を、カチオン化試薬とサンプルの調製方法の最適化、細胞内導入手順・添加剤・培養方法の最適化を進めた。

(2) 細胞内タンパク質の工学的利用に向けた溶解性に関する研究

可逆的変性カチン化法を駆使することで、動物細胞の細胞内の総タンパク質を変性状態で可溶化するための手法を開発し、がんワクチンへの応用やタンパク質の機能解析ツールとしての新規用途開発を進めた。

(3) 新規結晶化タグの開発と結晶分子配向性制御

タンパク質分子表面の2次構造形成領域に弱い分子間相互作用領域をデザインし、結晶化タグとして結晶化制御への有効性の検証を進めた。

4. 研究成果

(1) in cell フォルディング法の確立と人工タンパク質生産技術への応用

カチオン化タンパク質の細胞内導入技術において、細胞内への導入経路を詳細に解析した結果、複数の経路が存在することが示唆されたが、主な経路はエンドサイトーシス様の経路で取り込まれ、顆粒内で滞留していることが判明した。この主経路から、より効率的

に細胞質中へと移行させる手法を探索したところ、両親媒性ペプチドを添加剤として併用する手法が特に優れることが判明した (Cur. Pharm. Biotechnol. (2008))。本手法は導入するタンパク質と細胞の種類によって、各々最適化をする必要があるが、最適化条件では市販のリポフェクション試薬を用いたプラスミドDNAの導入効率を大幅に上回る成功例も得られている。特に、細胞の機能制御において重要な転写因子タンパク質は不安定な物性で、大腸菌で生産した転写因子は不溶性のインクルージョンボディを形成する例がほとんどである。この転写因子タンパク質も可逆的変性カチオン化法を用いて、可溶化と高純度精製が可能であるが、本研究で最適化を進めた結果、転写因子タンパク質を安定な凍結乾燥品として保存可能なこと、この粉末を再溶解し、生細胞内へ高効率に導入することが可能な技術開発にも成功し、取り扱いの自由度を非常に高めることができた。また、*in cell*フォルディング法に用いる宿主細胞として、浮遊培養系のHek293細胞が非常に優れることが判明し、*in cell*フォルディング法による人工タンパク質の生産等に実用レベルで活用できる可能性が見出された。

(2) 細胞内タンパク質の工学的利用に向けた溶解性に関する研究

動物細胞の細胞内の総タンパク質を変性状態で可溶化するための手法開発に取り組み、新規に開発したカチオン化試薬：TAP3S-Sulfonate (特願2010-070804) を活用することで、生理食塩水中に定量的に総タンパク質を溶解できることを見出した。この可溶化された総タンパク質は*in cell*フォルディング法で再活性化することも可能で、本手法は細胞機能の制御法の1つとして活用が期待できる。

(3) 新規結晶化タグの開発と結晶分子配

向性制御

難結晶性タンパク質の分子表面の2次構造形成領域に新規な結晶化タグを創製することに取り組んだ。種々の検討の結果、結晶化に成功したタグを見出したが、構造解析の結果、想定通りのパッキングはしていないものも含まれた。様々なタグ配列のスクリーニングの結果、難結晶性タンパク質のパッキング部位の創製には、 α ヘリックス上にロイシンを適切に配置する疎水相互作用面の設計 (Protein Sci.(2007)) が最も有利な手法であると結論した。

5. 主な発表論文等

(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6件)

①二見淳一郎

タンパク質カチオン化技術の工学的応用
ケミカルエンジニアリング vol.55, no.3,
pp.55-59. (2010)
査読なし

②Midori Kitazoe, Junichiro Futami, Mitsuo Nishikawa, Hidenori Yamada and Yoshitake Maeda.

Polyethylenimine-cationized-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

③Junichiro 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

④Hitoshi 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

⑤Murata 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

⑥Yamada H., Tamada T., Kosaka M., Miyata K., Fujiki S., Tano M., Moriya M., Yamanishi M., Honjo E., Tada H., Ino T., Yamaguchi H., Futami J., Seno M., Nomoto T., Hirata T., Yoshimura M., Kuroki R. 'Crystal lattice engineering,' an approach to engineer protein crystal contacts by creating intermolecular symmetry: crystallization and structure determination of a mutant human RNase 1 with a hydrophobic interface of leucines. *Protein Sci.* 16, 1389-1397 (2007) 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

①藤原健剛, 矢木恵一郎, 二見淳一郎, 山田秀徳
タンパク質可逆的修飾試薬を活用したがん免疫への応用
第 33 回日本分子生物学会年会
2010. 12. 7

②二見淳一郎, 矢木恵一郎, 藤原健剛, 山田秀徳
変性タンパク質の可溶化技術と工学的応用
第 9 回日本蛋白質科学会年会
2010. 6. 18

③二見淳一郎, 藤原健剛, 矢木恵一郎, 村田等, 山田秀徳
タンパク質カチオン化技術を活用した細胞機能制御
第 83 回日本組織培養学会
2010. 5. 20

④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

⑤二見淳一郎・
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

⑥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

⑦二見淳一郎, 浅間孝志, 北添翠, 村田等, 小坂恵, 多田宏子, 妹尾昌治, 山田秀徳 人工転写因子を用いたタンパク質細胞内導入効率の定量化
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)
2007. 12. 12

⑧二見翠, 二見淳一郎, 渡邊泰宜, 村田等, 多田宏子, 妹尾昌治, 山田秀徳 カチオン化アビジンによるビオチン化タンパク質細胞内導入における導入効率の解析と評価
2007 年日本化学会西日本大会
2007. 11. 11

⑨村田等, 二見淳一郎, 北添翠, 小坂恵, 多田宏子, 甲斐敬, 妹尾昌治, 山田秀徳 ポリエチレンイミン (PEI) グルタチオンキャリアーを用いた GST-融合タンパク質の細胞導入
第 59 回日本生物工学会大会
2007. 9. 26

[図書] (計 1 件)

二見淳一郎
酵素利用技術体系: 3-1 表面修飾による酵素機能の向上 (NTS 社)
2010. 4. 16 発行

[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
出願番号: PCT/JP2011/057238
国際出願日: 2011 年 3 月 24 日

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

二見 淳一郎 (FUTAMI JYUNICHIROU)
岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号：00420498

妹尾 昌治 (SENOO MASAHARU)
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号：90243493

多田 宏子 (TADA HIROKO)
岡山大学・自然生命科学研究支援センター・准教授

研究者番号：60271061

小坂 恵 (KOSAKA MEGUMI)
岡山大学・自然生命科学研究支援センター・助手

研究者番号：00170233

(3) 連携研究者

なし