

令和 4 年 5 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02833

研究課題名(和文) 第三世界におけるバイオ製剤の常温輸送・保存を志向したタンパク質三次元修飾法の開発

研究課題名(英文) Development of three-dimensional protein modification method towards ambient temperature transportation and storage of biologics

研究代表者

藤田 大士 (FUJITA, DAISHI)

京都大学・高等研究院・准教授

研究者番号：20713564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の近傍空間を化学構造体により取り囲む、すなわち空間的な修飾を施すアプローチにより、内部に包接したタンパク質を安定化。通常では変性してしまう条件下でも、安定した保存を可能とする方法論開発を行った。モデルタンパク質としてクチナーゼ様タンパク質を用いその安定化効果を検討したところ、熱、変性剤、有機溶剤に対して著しい安定化が得られた。特に有機溶剤に対しては1000倍を超える安定化効果が得られた。また部分的に変性してしまったタンパク質も、凝集等が生じることもなく、有機溶剤濃度を低下させれば再びフォールディングが生じた。すなわち同手法により、新しいタンパク質の安定化法の概念提唱に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質や核酸といった生体分子は、科学者の研究対象に留まらず、近年はワクチンや医薬品の新しいモダリティとして大きく存在感を増している。しかしCOVID-19に対するmRNAワクチンでも話題になった通り、生物製剤の輸送や保管には、管理された低温環境(コールドチェーン)が不可欠であり、特に発展途上国ではその普及が困難である。本研究は、新概念の生体分子安定化法の実現に成功し、上記課題の解決に新しい方法論を提唱するものである。

研究成果の概要(英文)：The approach of surrounding the protein vicinity with a chemical structure, i.e., spatial modification, stabilizes the encapsulated protein. We herein developed a methodology that enables stable storage of proteins even under conditions that would normally lead to protein denaturation. Using a cutinase-like protein as a model protein, we investigated the stabilization effect and found that the protein was remarkably stabilized against heat, denaturants, and organic solvents. In particular, the stabilization effect of the protein in organic solvents was more than 1000-fold. Even partially denatured proteins did not aggregate, and refolding occurred when the concentration of organic solvents was lowered. We have successfully proposed the concept of a new protein stabilization methodology.

研究分野：超分子化学

キーワード：自己集合分子

1. 研究開始当初の背景

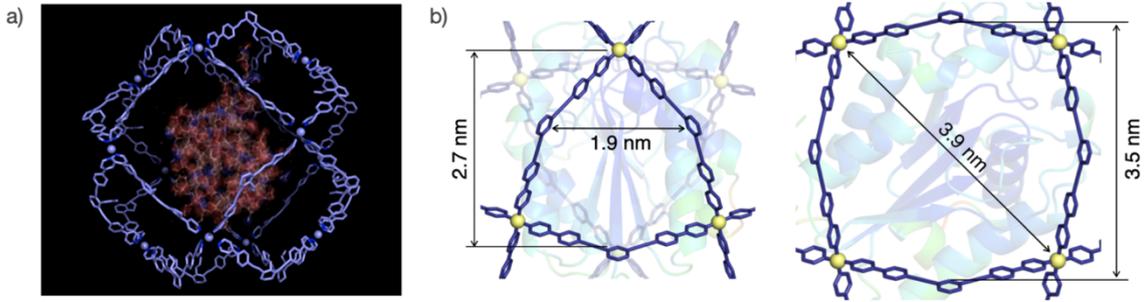
タンパク質や核酸に代表される生体分子は、他の化学的手法では代替できない多種多様な機能と価値を有している。ワクチンや医薬品としての価値は勿論、まだ実現例が限られているだけで、医薬品以外の産業的価値も高いと期待される。しかし、これら生体分子は、本来の活動環境より逸脱した外部環境下では、本来の活性を失ってしまうなど、安定性に著しい問題が生じてしまう。この課題を、工学的な技術力で乗り越える方法論を、本研究を通じて示す事を目指した。特に、既に顕在化しているバイオ医薬品の輸送・保管問題に代表される、タンパク質の安定性問題をベンチマークに、新しいタンパク質修飾法を開発する事を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、例えば超好熱菌などの極限環境微生物由来のタンパク質、あるいは遺伝子配列の変異等の既存手法に依らない方法で、タンパク質の劇的 (10^3 倍以上) な安定性向上を目指す。より具体的には、「点と点の結合」ではなく、「空間を取り囲む」アプローチが、より大きな潜在価値を持つことを具体的なデモンストレーションを通じて世に示したい。生命科学を対象とする超分子化学は未だ開拓されていないものの、むしろ本質的に相性の良い応用先であると考えている。個別トピックの枠を超えた「生命科学×超分子化学」の概念の有用性を示す事も、本研究の広義のミッションである。

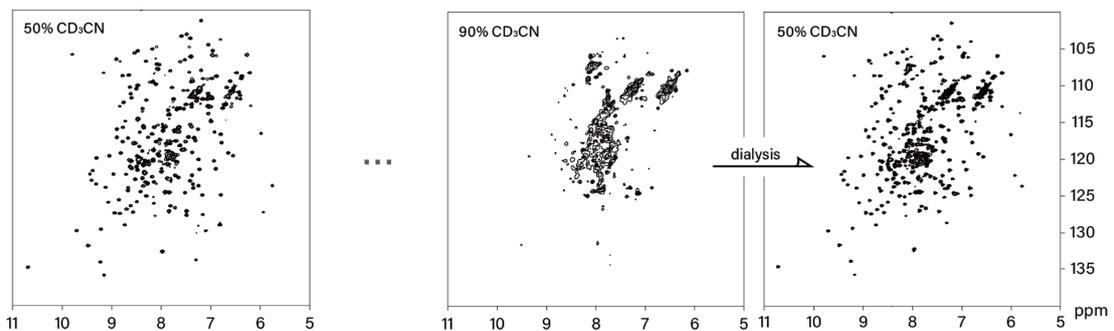
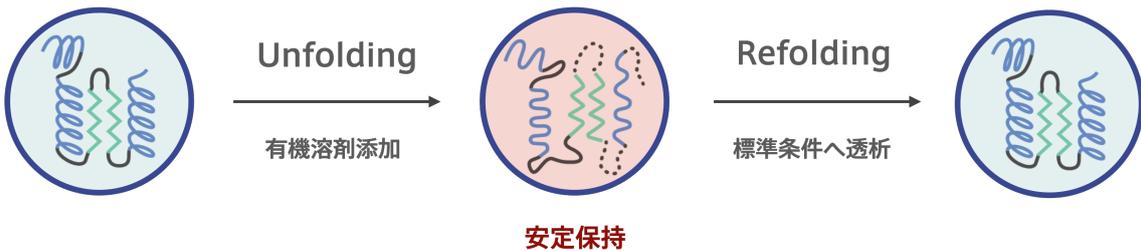
3. 研究の方法

本研究においては、タンパク質の近傍空間を化学構造体により取り囲む、すなわち空間的な修飾を施すアプローチにより、非失活 (Non-degradable) 化酵素を実現する事を目的とする。元型となるコンセプトは、申請者が博士論文研究として取り組んだ研究である (D. Fujita *et al.* *Nature Commun.* **2012**, *3*, 1093.)。当時はこれをタンパク質の「カプセル化」と呼称したものの、実は「均一系」であり「連続相」である点において、例えばベシクル等を用いた通常のカプセル化とは一線を画している。すなわち、次のような特徴を有する。①有機分子として巨大ではあるものの、溶液中ではあくまで分子として振る舞い、系は均一である。②分子骨格はほとんどが開口部 (>3 nm) であるため、溶媒や溶質は相として連続的につながっており、分子は自由に行き来が可能である。③しかし開口部がタンパク質直径よりも小さいため、タンパク質分子のみは空間的に拘束・遮蔽されている。



4. 研究成果

包接するモデルタンパク質として、プラスチック分解酵素の一つであるクチナーゼ様酵素 (206 a.a., 21 kDa) を選択し、各種条件下での酵素活性評価を行った。その結果、第一にケージ化酵素も未修飾酵素とまったく同等の活性を有している事が示された。すなわちケージ化によるダメージ、運動の制限などはなく、また基質分子もケージの内外を拡散の制限なく行き来できていることを示している。またケージ化酵素は、例えば水:アセトニトリル=10:90 といった高有機溶媒濃度領域においても凝集、沈殿が生じない。(酵素活性の半減期は、未修飾酵素が約2時間であるのに対し、ケージ化酵素は7ヶ月に伸びた。) 熱や変性剤についても、著しい安定化効果がみられた。またその安定化メカニズムも明らかにすることに成功した。高有機溶媒濃度領域 (水:アセトニトリル=10:90) で室温長時間静置した場合、酵素の反応プロファイルがシグモイド状に変化する事がわかった。詳細なフィッティング解析の結果、これは酵素リフォールディング過程が観測されている事がわかった。すなわち、隔離空間は分子シャペロンの様に働き、リフォールディングを促進していることがわかった。同位体標識したケージ化酵素の核磁気共鳴分光分析によっても、このメカニズムが裏付けられた。



¹H-¹⁵N HSQC NMR (500 MHz, 300 K, D₂O/CD₃CN = 1:1)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujita Daishi, Suzuki Ryoto, Fujii Yuya, Yamada Mayu, Nakama Takahiro, Matsugami Akimasa, Hayashi Fumiaki, Weng Jing-Ke, Yagi-Utsumi Maho, Fujita Makoto	4. 巻 7
2. 論文標題 Protein stabilization and refolding in a gigantic self-assembled cage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem	6. 最初と最後の頁 2672 ~ 2683
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chempr.2021.08.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Daishi Fujita
2. 発表標題 Protein stabilization and refolding in a chaperonin-inspired synthetic cage
3. 学会等名 Academia Sinica / iCeMS Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田大士
2. 発表標題 精密単分子包接による酵素の強靱化
3. 学会等名 第9回 「生態適合化学の進歩」インタラクティブフォーラム(招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田大士
2. 発表標題 合成ケージ中に閉じ込めた酵素の安定化とリフォールディング
3. 学会等名 2021年度中国四国地区高分子講演会 GSC セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田大士
2. 発表標題 分子ケージ化による強靱化酵素(Chem-Bio Hybrid)の合成
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会 中長期テーマシンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	ホワイトヘッド研究所		