

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 12 日現在

機関番号：17401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659065
 研究課題名（和文） 特異的タンパク質間相互作用の自動的親和性亢進システム
 研究課題名（英文） Basic study for system of automatic affinity enhancement of specific protein-protein interaction
 研究代表者
 庄司 省三 (SHOJI SHOZO)
 熊本大学・生命科学研究部・名誉教授
 研究者番号：60040317

研究成果の概要（和文）：

注目するタンパク質の機能解明を行う際に、抗体等による特異的なタンパク質検出やドミナントネガティブ作用等によるタンパク質の特異的機能制御は、目的のタンパク質-タンパク質間の特異的な結合/相互作用により可能になる。本研究は、意図するタンパク質-タンパク質間結合の親和性を向上させることができるシステムを構築するための基礎研究を行うことを目的とした。このシステムを構築するために、ウイルスが有する易変異原性を利用することにした。計画通りの十分な成果を得るには至らなかったが、本研究を通して得られた経験を今後の研究に生かしていく。

研究成果の概要（英文）：

Specific protein-protein binding/interaction is very useful, by which specific detection of a protein by using an antibody, regulation of specific protein function by dominant negative effect of the mutated protein, and so on become available. The purpose of this study is to collect basic data and resources for establishment of the system, which can automatically enhance affinity of Intended specific protein-protein binding. It was planned to utilize a viral property of high mutagenicity for the system. Although we could not proceed enough as we had planned at the beginning of the study, we used many experiences obtained by this study for following future study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：微生物・感染症学

1. 研究開始当初の背景

受容体とタンパク質リガンドの結合、酵素によるタンパク質基質を認識、アクチンファイバーのようなポリマー化した細胞骨格タンパク質、DNA ポリメラーゼ複合体ホロ酵素、転写因子複合体、シグナル伝達、26S プロテアソームや核膜孔複合体のような超巨大タンパク質複合体、そして抗原抗体反応等、多くのタンパク質は特異的なタンパク質間結合/相互作用によりその機能を発現する。タンパク質の機能解析を進める上で、他のどのタンパク質といつどのようにして結合し機能するかという観点は必須である。抗体やドミナントネガティブ(DN)またはポジティブ(DP)に作用する変異体等はそのようなタンパク質機能解析に有用である。しかしながら、必ずしも高質の特異性の高い抗体、有効な DN 変異体や DP 変異体が作製できるわけではない。その原因として抗体の結合親和性が低いこと、DN/DP 変異体の標的タンパク質への親和性が野生型(WT)と同等以下であることが考えられる。DN/DP 変異体を高発現させると非特異的な作用が懸念されるので、WT よりも標的タンパク質へ高い親和性で結合する DN/DP 変異体であれば、低発現でも DN/DP 効果が期待できる。これらの例のように様々な局面で、注目するタンパク質間相互作用の親和性を意図的に増大させたいというニーズが存在する。

2. 研究の目的

エイズの原因ウイルスである human immunodeficiency virus (HIV)の形質の最大の特徴の一つが易変異原性である。その易変異原性は、感染個体内での免疫攻撃からの回避、そして抗 HIV 薬に対する耐性の獲得をもたらす、未だにエイズワクチン開発が成功しないこと、そして抗 HIV 薬が 30 種類以上存在し

ながらさらなる薬の開発が望まれていることの根本原因となっている。このような HIV の易変異原性によって、我々人類に苦難を強いられている。本研究では、上述した HIV のようなレトロウイルスが有する易変異原性をうまく活用することを試みることにした。つまりその易変異原性とウイルスが元来有する生存原理を利用し、注目する特異的なタンパク質間結合の親和性を増大させるためのシステムを構築するための基礎研究を行う。

3. 研究の方法

研究方法の計画の概略を以下に示す。

レトロウイルスとしてサルエイズウイルスである simian immunodeficiency virus (SIV)を利用することにした。ウイルス複製を簡便にモニタリングできる方法の構築のため、Vpr とレニラルシフェラーゼを融合した Rluc-Vpr 発現系を構築する。Rluc-Vpr はウイルス粒子に取り込まれるので産生されたウイルス粒子レベルを、レニラルシフェラーゼ活性を測定することで評価できる。

タンパク質間結合を介在させる SIV の複製に必須の段階として、ウイルス性転写因子 Tat による転写過程を利用する。はじめに、Tat-activation domain (AD) と linker を介して A タンパク質を連結した融合タンパク質と Tat-RNA binding domain (RBD) と linker を介して B タンパク質を連結した融合タンパク質を同時に発現させたとき Tat の転写活性が検出されることを確認する。その後、SIVmac239 発現プラスミドの Tat-AD コード DNA 領域の下流に A タンパク質コード DNA を挿入した DNA コンストラクトを作製し、これらから産生するウイルスである SIV/Tat-AD-A を、Tat レポーターDNA (LTR-luciferase) と Tat-RBD-B タンパク質発現 DNA を導入した感染標的細胞を用いて感染・複製させる。定期

的に SIV/Tat-AD-A ウイルスをストックし、ウイルス量をそろえて同時に感染標的細胞に感染させ Tat の転写活性を評価する。Tat の転写活性の増強を確認したら、SIV/Tat-AD-A ウイルスゲノム内の A タンパク質コード DNA の配列解析を行う。野生型 A-B 間と変異型 A-B の結合親和性を評価する。変異型 A タンパク質の配列を利用した DN 変異体の細胞内における効果を野生型由来配列の DN 変異体と比較する。以上のような計画を立て研究を進めることとした。

4. 研究成果

本研究を遂行する上で必要となる各種タンパク質発現ベクターの構築を試みた。

SIV 由来 Vpr とレニラルシフェラーゼを融合させて発現する系を構築した。SIV 由来 Vpr とレニラルシフェラーゼ融合タンパク質 Rluc-Vpr は非常に高いタンパク質発現を示した。ウイルスゲノム由来の内在性の Vpr が存在すると Rluc-Vpr がウイルス粒子内に取り込まれる効率が低下すると予想されたので、ウイルスゲノム内の Vpr 遺伝子を欠損させた DNA を構築した。Vpr 遺伝子を含むウイルスゲノムと Vpr 遺伝子を欠損させたウイルスゲノムを比較した場合、期待した通り、Vpr 遺伝子を欠損させたウイルスゲノムを用いた場合が効率的に Rluc-Vpr を取り込んでいることが示され、Rluc 活性によりウイルス産生をモニタリングできることが明らかになった。Vpr はウイルス粒子に取り込まれず、細胞から分泌される場合があることが知られている。実際、Rluc-Vpr を細胞に発現させると、ウイルス産生系で無いにもかかわらず、培養上清中の Rluc 活性を検出した。これはウイルス産生系よりも低いレベルであった。この活性はバックグラウンドレベルとして見なせるものであるが、このレベルをより低

下させることがウイルス産生量をモニタリングするには必要とされ、今後の改善点である。

Tat-AD-A および Tat-RBD-B の発現系の構築と LTR-luciferase を含む Tat レポーターの構築は成功に至らなかった。野生型タンパク質に異なるタンパク質を融合させて発現させると、期待と異なり発現が安定しない場合が生じる。また、結合すると想定してデザインし作成したタンパク質発現系において、注目するタンパク質-タンパク質結合が必要とされるレベルで起こらないことも生じる。このようにゼロから一つの実験系を構築する際には、様々な想定していない結果を呈してしまう。このような場合、より幅広い条件からスタートし、得られた結果からより最適な条件を見つけていく必要性が生じる。本研究の目的を達成するためには、本研究期間を通して得られた経験を踏まえて、今後、必要な実験をひとつひとつ段階的に進めていくことが重要である。

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 1 件)

1. Induction of extremely low protein expression level by fusion of C-terminal region of Nef.

Takamune N, Irisaka Y, Yamamoto M, Harada K, Shoji S, and Misumi S.

Biotechnology and Applied Biochemistry 59, 245-253 (2012) 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

1. 山本 充奈美、原田 圭輔、高宗 暢暁、杉本 幸彦、庄司 省三、三隅 将吾

HIV-1 アクセサリータンパク質 Nef の発現増強機構に関する解析

日本ウイルス学会学術集会

2012. 11. 13. 大阪国際会議場 (大阪)

2. 山本 充奈美、原田 圭輔、高宗 暢暁、杉本 幸彦、庄司 省三、三隅 将吾

HIV-1 アクセサリータンパク質 Nef の発現増強機構

第 11 回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム

2012. 9. 15. 九州大学 (福岡)

3. 太田光、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司 省三、三隅将吾. HIV 複製に必須の宿主因子 NMT に関する研究. 平成 24 年度 日本生化学会支部例会 2012. 5. 26. 福岡大学 (福岡)

4. 山本充奈美、原田圭輔、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司 省三、三隅将吾

HIV-1 アクセサリータンパク質 Nef の発現特性

平成 23 年度日本薬学会九州支部大会

2011. 12. 10. 福岡大学 (福岡)

5. 高宗 暢暁, 黒江 徹也, 棚田 訓彰, 杉本 幸彦, 庄司 省三, 三隅 将吾

N-myristoyltransferase 触媒領域欠損変異体による HIV 産生の抑制

Suppression of human immunodeficiency virus type-1 production by coexpression of catalytic-region-deleted

N-myristoyltransferase mutants

生化学 vol.83, No.8, p.215, 2011

2011. 9. 24. 京都国際会議場 (京都)

6. 三隅 将吾, 井上 睦美, 堂地 赳生, 岸本 直樹, 高宗 暢暁, 杉本 幸彦, 庄司 省

三

宿主因子による HIV-1 脱殻過程の制御

Regulation of HIV-1 Uncoating Process By Host Factor

生化学 vol. 83, No.8, p143, 2011

2011. 9. 22. 京都国際会議場 (京都)

7. 三隅将吾、井上睦美、堂地赳生、岸本直樹、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司 省三

HIV-1 脱殻プロセスに関する研究

平成 23 年度 日本生化学会九州支部例会

2011. 5. 21. 久留米大学 (福岡)

8. 高宗暢暁、原田圭輔、山本充奈美、杉本幸彦、庄司 省三、三隅将吾

HIV-1 Nef の低発現性の特徴とその機能との関連.

平成 23 年度 日本生化学会九州支部例会

2011. 5. 21. 久留米大学 (福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄司 省三 (SHOJI SHOZO)

熊本大学・生命科学研究部・名誉教授

研究者番号 : 60040317