

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580148

研究課題名(和文) 分解耐性型細胞膜透過性タンパク質による細胞分化/寿命制御システムの開発

研究課題名(英文) Development of controlling system of cell differentiation/life by proteolysis resistant cell-permeable protein

研究代表者

舩廣 善和 (MASUHIRO, Yoshikazu)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：00336083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：分解耐性型細胞膜透過性分化制御因子(山中因子[Glis1, Sox2, Kof4, Oct4]、RAR、Foxp3、Sox17、HNF3)の発現系を構築した。これらの多くの因子は大腸菌内で良好な発現を示し、転写活性可能を保持していた。また、分解耐性モチーフスタビロンの融合位置がどの位置でも有効であることを見いだした。さらに、旧来のスタビロンモチーフとは異なり、生物界には不在の新たな配列の分解耐性モチーフを開発した。

研究成果の概要(英文)：I established the expression system of the proteolysis resistant cell-permeable differentiation control factor (Yamanaka Factor [Glis1, Sox2, Kof4, Oct4], RAR, Foxp3, Sox17, HNF3). These many factors showed good expression in Escherichia coli and maintained transcription activity. In addition, I found that a fusion position of the proteolysis-resistant motif stabilon was effective at all positions. Furthermore, unlike an old stabilon motif, I developed a proteolysis-resistant motif of the absent new sequence in the creatures.

研究分野：分子細胞生物学、応用生物科学

キーワード：分解耐性 スタビロン 膜透過性タンパク質 細胞分化制御 細胞機能調節

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、iPS 細胞の開発により、再生医療への期待が高まっている。しかし、これまでの iPS 誘導法は主にウイルスやプラスミドを用いて山中因子を誘導したものであり、これらを使用した場合、遺伝子変異によるがん化や病原性が危惧される。このような危惧は iPS 細胞から分化細胞を誘導する場合にも当てはまる。これに対し、細胞膜透過性タンパク質を用いた方法は遺伝的に安全であるため、いくつかの研究グループにより開発されつつある。しかし、これらの報告からは、膜透過性タンパク質の細胞内での早期な分解により、複数回のタンパク質投与や低頻度な誘導結果となることが示されており、実用化には問題がある。

(2) タンパク質分解に関しては、近年プロテアソームやプロテアーゼ、オートファジーによる分解などのメカニズム解明が進んできている。また、各々のタンパク質の分解機構の解明も進んできている。よって、その機構がわかっているタンパク質に関しては、分解促進領域 (Degron 等) もしくはアミノ酸 (ユビキチン化リジンや Phospho-degion のセリンやスレオニン等) の欠損や置換により細胞内での安定化を促進することが可能な場合もある。しかし、これは一部のタンパク質に限られ、分解メカニズムが不明なタンパク質では手段がない。そこで、タンパク質に共通の安定化モチーフが重要はないかと考えた。私は以前の研究から DP-1 Stabilon が DP-1 タンパク質の安定化に極めて重要なモチーフであることを発見し、さらに他のいくつかのタンパク質の N 末もしくは C 末に融合した場合も有効であることを見いだしていた。

2. 研究の目的

(1) 遺伝的に安全かつ簡易な細胞分化制御システムの構築を目的とした。少ない回数 of タンパク質添加で効率よく細胞の分化制御を行うためには、分解耐性型 (Stabilon 融合) 細胞膜透過性分化制御因子が重要ではないかと考え、山中因子 (Glis1, Sox2, Klf4, Oct4)、RAR α 、Foxp3、Sox17、HNF3 β に関して発現系を作製することとした。山中因子は iPS 細胞誘導用、RAR α は白血病改善用、Foxp3 は Treg (制御性 T 細胞; 免疫寛容を誘導しアレルギーを抑える) 誘導用、Sox17、HNF3 β は肝臓や膵臓誘導用である。iPS 細胞はほとんどの分化細胞に誘導可能な万能性細胞であることから、今後の応用性が高いと考え山中因子を標的因子とした。RAR α は APL という白血病の原因遺伝子の一つであり、これが PML と融合することによる機能低下が原因で白血球の分化が止まり発症すると考えられている。そこで、特に有望であると考えられる RAR α の機能を改善する目的でこれを選んだ。近年、食物アレルギーやハウスダスト、スギ花粉等に体するアレルギー

や喘息等の疾患患者が急速に増えている。これらの患者に特有な現象としては免疫応答に關与する Th2 細胞の働きが強く、高 IgE 産生となることである。これを抑制するように働く細胞が Treg 細胞である。また、Treg 細胞分化のマスター遺伝子が転写因子 Foxp3 であることが判明している。そこで Foxp3 も標的タンパク質とした。また、近年肝臓がんや肝硬変等で肝臓移植を希望する患者さんも多い。さらに、生活習慣病で糖尿病を患う方も多い。特に膵臓のインスリン産生を担う β 細胞がない、もしくは機能していない患者さんには再生医療が望まれる。肝臓と膵臓は内胚葉系の細胞であり、これらの iPS 細胞からの誘導には Sox17 や HNF3 β が重要である。そこで、これらも標的因子とした。

(2) これまで、DP-1 Stabilon を様々な因子の N 末や C 末に融合した場合有効であることが判明していたが、内部に導入した場合は不明であったことから、これを明らかにすることを目的とした。

タンパク質安定化機能を有するタグとして DP-1 Stabilon の実用化を目指す場合、DP-1 の配列のままではその抗体は DP-1 抗体となり、内因性の DP-1 を検出してしまうため都合が悪い。そこで、タンパク質安定化機能は保持 (もしくはより向上) するが、抗体の認識レベルで DP-1 Stabilon とは異なる配列 (生物界には存在しない) にした新たな Stabilon モチーフを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌発現系を用い、分解耐性型 (Stabilon 融合) 細胞膜透過性 (MTM タグ融合) 分化制御因子 (山中因子 [Glis1, Sox2, Klf4, Oct4]、RAR α 、Foxp3、Sox17、HNF3 β) の発現システムを構築した。IPTG 誘導後、封入体として発現したタンパク質をバッファで洗浄、グアニジン塩酸で溶解しその変性条件下で Ni レジンにより精製した。最終的に透析によりリフォールディングさせ巻き戻しを行った。可溶性となったタンパク質の転写活性化能をルシフェラーゼアッセイにて確認した。

(2) いくつかの転写因子 (RAR α 、Foxp3、DP-1、Sox2 等) の分子中央付近に DP-1 Stabilon を配置させた変異体を作製し、N 末や C 末に融合した場合と細胞内 (HEK293T 細胞) での発現量にどの程度差があるのかをウエスタンブロット解析にて確認する。

DP-1 Stabilon の配列を入れ替え、生物界にはない配列を作出した。そのいくつかを、これまで DP-1 Stabilon が有効であった因子に融合し、これまでの DP-1 Stabilon よりも効果が高い (安定化がみられる) 新規 Stabilon の検索を行う。

4. 研究成果

(1)大腸菌発現系(BL21[DE3], pET system 使用)において発現させた Glis1 に関しては 37 °C での発現では極めて多く分解がみられた。そこで、誘導温度を 20-25 °C にしたところやや分解は低減した。その他の因子に関してはおおむね良好な発現がみられた。Foxp3 に関しては、発現は良好であるものの、透析によるリフォールディング時の再凝集が激しく、可溶性タンパク質の取得はわずかであった。この可溶性 Foxp3 を培養細胞に入れ、ルシフェラーゼアッセイにて転写活性を測定したところ、転写活性は保持していた。しかし、現在の産生量では in vivo の実験において Treg 細胞の誘導を行うことは難しいと判断した。

その他のタンパク質は透析によるリフォールディングで可溶性のタンパク質が取得できた。いずれも転写活性を測定したところ、活性を保持していた。

山中因子に関しては、これらを用い正常ヒト皮膚線維芽細胞から iPS の誘導を試みたところ、iPS 様のコロニーが観察できた。詳細な性状解析と発生頻度に関しては現在検討中である。

(2)DP-1 Stabilon を RAR α および Sox2 の分子中央に融合した結果、これらの分子は安定化した。よって、Stabilon の融合位置は N,C 末でなくとも有望であることが示唆された。

新規な Stabilon 開発に関しては、10 程度の候補モチーフを RAR α および Sox2 に融合し、その安定化度を調べた。その結果、3 種に関しては DP-1 Stabilon よりも強いタンパク質安定化活性を有しており、有望なモチーフの検索に成功した。これらに関しては特許出願を行った。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

発表者；峰岸紋子、相原絵理、細野崇、舩廣善和、花澤重正、関泰一郎

発表表題；Stabilon 融合タンパク質を用いた iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法の確立

学会等名；日本農芸化学会 2015 年度岡山大会

発表年月日；2015 年 3 月 27 日

発表場所；岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

発表者；宮本梓、関泰一郎、舩廣善和
発表表題；細胞膜透過性ヒト SOCS2 は成長ホルモンのシグナル伝達を抑制する

学会等名；第 37 回日本分子生物学会

発表年月日；2014 年 11 月 26 日

発表場所；パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

発表者；中野利沙、櫻井涉、大穂満隆、松本翔太、宮本梓、舩廣善和、花澤重正

発表表題；TIPE 2 は TAK1 を介する H.pylori CagA シグナルを負に制御する

学会等名；第 37 回日本分子生物学会

発表年月日；2014 年 11 月 26 日

発表場所；パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

発表者；大野芳典、安永晋一郎、竹立恭子、山藤幹茂子、舩廣善和、花澤重正、大坪素秋、瀧原義宏

発表表題；膜貫通性リコンビナント Geminin タンパク質は、造血幹細胞の自己複製と細胞分化を制御する新たなストラテジーを提供するだろう

学会等名；第 37 回日本分子生物学会

発表年月日；2014 年 11 月 25 日

発表場所；パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称；タンパク質の安定的発現や分解耐性を可能にするスタビロンタグの開発

発明者；舩廣善和

権利者；日本大学

種類；特許

番号；特願 2015-095480

出願年月日；平成 27 年 5 月 8 日

国内外の別；国内外

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

日本大学、研究者情報システム

<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/70/0006909/profile.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

舩廣 善和(MASUHIRO, Yoshikazu)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：00336083

(2)研究分担者

関 泰一郎(SEKI, Taiichirou)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：20187834

花澤 重正(HANAZAWA, Shigemasa)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60060258

(3)連携研究者 ()

研究者番号：