

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660295

研究課題名(和文)ドメインエンジニアリングを活用した動物細胞での革新的タンパク質生産法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel protein production system in mammalian cells.

## 研究代表者

増田 誠司(Masuda, Seiji)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：20260614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：動物細胞を用いて生産したタンパク質は、医薬品や研究用試薬として製薬業界やバイオ産業界において大きな需要を持つ。しかし動物細胞での生産性は低く、画期的な生産法の開発が期待されている。筆者は、動物細胞におけるタンパク質生産の律速段階がmRNAの核から細胞質への輸送(核外輸送)段階であることを発見した。そこでmRNAの核外輸送受容体の構造を改変してより機能の高い輸送受容体を創成することを目的とした。作製した変異体は、野生型よりもタンパク質生産性が向上した。

研究成果の概要(英文)：The proteins for the clinical use are produced in mammalian cells because they needs post translational modification such as glycosylation, formation of adequate disulfide-bond, acylation and phosphorylation for their activity in human body. The protein production in mammalian cells, however, takes much cost than that in bacteria. The author found that the mRNA export process becomes the limited step than transcription or translation process. In the present study, mRNA export receptor is created to establish a novel protein production system in mammalian cells by modifying the sequence of mRNA export receptor. The mutant receptor produce more reporter protein than the wild type export receptor.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：mRNA タンパク質 輸送受容体

## 1. 研究開始当初の背景

医薬品や一部の研究用試薬に用いられるタンパク質は、生体内での活性の発現に翻訳後修飾を必要とするので、多くは動物細胞で生産される。しかしその生産コストは高く、産業界から安価な生産法の開発が期待されている。

筆者は、この課題解決のために低酸素に応答するエンハンサーを用いてタンパク質を生産する発現系を開発した。その後、核内での mRNA のプロセシングの制御に関する基礎研究を遂行した。この研究過程で、動物細胞におけるタンパク質生産の律速段階が、mRNA の核から細胞質への輸送過程にあることを明らかにした。さらに第 1 世代の標的 mRNA 専用輸送体を創成した。これにより動物細胞における mRNA の核から細胞質への輸送を効率化することで、従来法の 5 倍の効率でタンパク質を生産させることに成功した。

## 2. 研究の目的

本研究は、ドメインエンジニアリング技術を活用することで、mRNA 輸送経路の強化において真に必要な領域を抽出し、標的タンパク質をコードする mRNA のみを特異的に細胞質へと輸送する第 2 世代 mRNA 輸送体 (人工新機能タンパク質) を創成する。これにより従来法に比べて~10 倍、申請者が直近に開発した方法に比べて 2 倍の生産性を持つ革新的な動物細胞生産系を開発する。

## 3. 研究の方法

標的 mRNA の細胞質への輸送を特異的に促進する第 2 世代 mRNA 輸送体を新規に創成し、タンパク質の生産に供するため、様々な部位の欠失を行った。

CHO 細胞と HEK293 細胞で、タンパク質の生産性の関係を精査し、最適な組み合わせを明らかにする。Firefly Luciferase は市販キットにより定量した。

## 4. 研究成果

### (1) Tap 変異体の局在観察

Firefly Luciferase-MS2 と野生型の輸送受

容体の共発現により、Firefly Luciferase の発現量は増加した。そこで Tap に変異を加えることにより、更なる Luciferase の発現量の増加が期待できる。

ドメインエンジニアリングとは目的の機能を持つドメインを取り出し、連結、集積することにより、天然にはない、新しい機能的なタンパク質の分子設計を目的とした手法である。今回、Tap ドメインの輸送機能に着目し、Tap の輸送機能を抑制する領域を取り除くことによって、これまでにない高品質な輸送機能を持つ Tap を作ることを試みた。

Tap の変異体 を作製するにあたって、以下の項目に重点を置いた。「p15 との結合」「NPC との結合」「核内輸送タンパク質との結合領域」「RRM、LRR ドメイン」「RBD-NTF2L 結合部位」「NLS 領域」である。

まず、異なる領域を持つ 9 つの Tap 変異体を HeLa 細胞に transfection し、発現させた。その細胞を免疫染色し、蛍光顕微鏡で Tap 変異体の細胞内での局在を観察した。Tap 野生型は核、NPC 付近に主に局在しているといわれている。作製した 9 つの変異体の局在が Tap 野生型の局在と変化がみられるのかをみるために免疫染色を行った。その結果、すべての変異体は野生型と同じく核内に局在した。

### (2) HeLa 細胞、HEK293 細胞、Flp-In<sup>TM</sup>CHO 細胞における Tap 変異体発現による Luciferase 活性の変化

作製した Tap 変異体とタンパク質発現量の関係性を調べるために Luciferase assay を行った。タンパク質の生産は HeLa 細胞、HEK293 細胞、Flp-In<sup>TM</sup>CHO 細胞のすべての細胞で有効であることがわかった。そこで、このシステムを利用し、Tap 変異体がどのように Luciferase 活性に変化を及ぼすかを検証した。なお、transfection 効率は pHRL-TK による Luciferase 活性で normalize した。

その結果、いくつかの変異体は野生型よりも高い Firefly Luciferase 活性を得ることができた。活性の高い変異体では Tap 野生型の約 1.5 倍の活性を示した。ただ目標としていた野生型の 2 倍の活性までには至ら

なかった。

このことからTapの機能ドメインを調節することで野生型よりもさらに高い活性を持つmRNA輸送体を作製できることが明らかとなった。今後は、より活性の高い変異体を作製することが必要である。また、リアルタイム RT-PCRにより核内外でのmRNA量を比較し、この効果がmRNA輸送の促進である事を示すことが必要である。

## 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 6 件)

- (1) Okamura, M, Inose, H. and Masuda, S. RNA export pathways in eukaryotes. **Genes**, **6**, 125-149, 2015 doi: 10.3390/genes6010124.
- (2) Inose, H., Mukai, K., Ito, M. and Masuda, S. Gene Regulation through mRNA Expression. **Adv. Biol. Chem.**, **5**, 45-57, 2015 doi: 10.4236/abc.2015.52005
- (3) Yasuda, Y., Fujita, M., Koike, E., Obata, K., Shiota, M., Kotani, Y., Musha, T., Tsuji-Kawahara, S., Satou, T., Masuda, S., Okano, J., Yamasaki, H., Okumoto, K., Uesugi, T., Nakao, S., Hoshiai, H. and Mandai, M., Erythropoietin receptor antagonist suppressed ectopic hemoglobin synthesis in xenografts of HeLa cells to promote their destruction. **PLoS ONE**, **10**, e0122458, 2015 doi: 10.1371/journal.pone.0122458
- (4) Akef, A., Zhang, H., Masuda, S. and Palazzo, AF. Trafficking of mRNAs containing ALREX-promoting elements through nuclear speckles. **Nucleus**, **4**, 326-40, 2013 doi:10.4161/nucl.26052.
- (5) Fujimoto, S., Isumura, N., Tsuji, T., Anan, Y., Tsuji, N., Ogra, Y., Kimura, T., Miyamae, Y., Masuda, S., Nagao, M. and Kambe T. Cooperative functions of ZnT1, metallothionein and ZnT4 in the cytoplasm

are required for full activation of TNAP in the early secretory pathway. **PLoS ONE**, **8**, e77445, 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0077445.

- (6) Ohtera, A., Miyamae, Y., Nakai, N., Kawachi, A., Kawada, K., Han, J., Isoda, H., Neffati, M., Akita, T., Maejima, K., Masuda, S., Kambe, T., Mori, N., Irie, K. and Nagao, M. Identification of 6-octadecynoic acid from a methanol extract of *Marrubium vulgare* L. as a peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonist. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **440**, 204-209, 2013 doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.003.

[学会発表] (計 15 件)

- (1) Mukai K. and Masuda S. Involvement of nuclear factor CHERP in alternative splicing. The 13th international student seminar, 2015年3月3日、紫蘭会館、京都
- (2) Fujita K. Ito M. and Masuda S. The identification of regions regulates different complex formations of UAP56 and URH49, which are essential for mRNA export. The 13th International Student Seminar 2015 年3月3日、紫蘭会館、京都
- (3) 藤田賢一、伊藤慶紗、増田誠司、The identification of regions regulates different complex formations of UAP56 and URH49, which are essential for mRNA export. KANSAI JSBBA 1<sup>st</sup> Student Forum、2015年1月31日、洛友会館、京都
- (4) Fujita K. Ito M. and Masuda S. The identification of regions regulates different complex formations of UAP56 and URH49, which are essential for mRNA export. Joint Australia and Japan RNA Meeting、2014年11月4日シドニー、オーストラリア
- (5) 向井琴美、南裕基、永尾雅哉、神戸大朋、宮前友策、増田誠司、核内因子CHERPの機能解析、2014年度日本農芸化学会 関西支部大会、2014年9月20日、奈良先端科学技術大学院大学、奈良

- (6) 志岐拓哉、岡村真純、増田誠司、mRNA輸送にはDBP5の核側からの核膜孔配位が必要だ、第16回日本RNA学会年会、2014年7月23日-24日、ウイנק愛知、名古屋
- (7) 藤田賢一、伊藤慶紗、増田誠司、進化的観点からUAP56とURH49の複合体形成と選択的mRNA輸送能の分岐点を探る、第16回日本RNA学会年会、平成26年7月23-24日ウイנק愛知、名古屋
- (8) 猪瀬春子、松村嘉員、宮前友策、神戸大朋、永尾雅哉、増田誠司、動物培養細胞での組換え蛋白質高生産に向けたmRNAの効率的核外輸送機構の開発、農芸化学会関西支部大会第484回、2014年5月24日、京都府立大学、京都
- (9) 藤田賢一、伊藤慶紗、宮前友策、神戸大朋、永尾雅哉、増田誠司、mRNA核外輸送因子UAP56ならびにURH49の複合体形成の違いを制御する蛋白質領域の同定、日本農芸化学会関西支部第484回、2014年5月24日、京都府立大学、京都
- (10) 増田誠司、動物細胞の核外輸送過程を利用したタンパク質生産法、日本農芸化学会 2014年3月28日-30日、明治大学、東京
- (11) 増田誠司、mRNA成熟阻害活性を指標とする抗ガン化合物の探索と産業利用、日本農芸化学会 2014年3月28日-30日、明治大学、東京
- (12) Fujita K. Minami Y. and Masuda S. The identification of regions regulates different complex formations of UAP56 and URH49, which are essential for mRNA export. The 12<sup>th</sup> International Student Seminar、2014年2月17日、紫蘭会館、京都
- (13) 岡村真純、志岐拓哉、増田誠司、胎性致死の遺伝病LCCS1にて同定されたGLE1の変異Fin<sub>Major</sub>はmRNAの核外輸送効率を低下させる、日本分子生物学会第36回年会、2013年12月3日-6日、神戸ポートアイランド、神戸
- (14) Okamura M. Shiki T. and Masuda S. The GLE1 mutation identified in LCCS1 affects nuclear mRNA export、RiboClub annual meeting 2013, 2013年9月23日-25日Hotel Cheribourg, ケベック、カナダ
- (15) 藤田賢一、南裕基、増田誠司、mRNA核外輸送因子UAP56ならびにURH49における複合体形成差異を決定する領域の同定、第15回日本RNA学会年会、2013年7月24日、ひめぎんホール、愛媛

[図書] (計 1 件)

- (1) 岡村真純、平山瑞季、猪瀬春子、増田誠司 効率的な mRNA 核外輸送系を用いたタンパク質生産法 「動物細胞の培養を成功させる条件設定集」技術情報協会編、pp447-450, 2014 総ページ: 584

[その他]

ホームページ

<http://www.bunshioutou.lif.kyoto-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

増田 誠司 (MASUDA SEIJI)

京都大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：20260614