

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650048

研究課題名(和文)機能未知天然変性タンパク質の細胞医療への応用

研究課題名(英文)Medicinal application of intrinsically disordered proteins of unknown function

研究代表者

廣明 秀一 (HIROAKI, Hidekazu)

名古屋大学・創薬科学研究科・教授

研究者番号：10336589

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)：天然変性タンパク質(IDP)には、その共通の分子機能として、フライキャストメカニズムや「フォールディングに協調した標的結合」という機構が知られている。また植物のストレスタンパク質dehydrinのコア配列と絹由来sericinがIDPであること、酵素や細胞の凍結保護活性があることが報告されている。IDPの機能がその基本物性に由来し、配列や起源に依存しないならば、同様の機能性IDPがヒトゲノム内にもあるはずである。酵素の凍結保護活性を指標に、ヒト由来IDPの探索・最適化を行った。そのうちのひとつ、20アミノ酸のIDPペプチドはNHDF細胞の凍結保存において、有意な保護効果を示した。

研究成果の概要(英文)：Intrinsically disordered proteins (IDPs), polypeptides that lack a stable compact structure, are known to exert the two major molecular functions, “fly-casting mechanism” and “coupled folding and binding”. Plant stress-responsible protein dehydrins and silkworm sericins are the examples of IDPs. These exert cryoprotective activity against enzymes and cultivated cells, respectively. If IDP's molecular functions are originated from their physical properties, similar functions may also exist in human-genome derived IDPs. Based on the concept, we started to screen several human IDPs using cryoprotective activity against the model enzyme lactose dehydrogenase as an index. Finally, we succeeded in finding a 20 aa IDP peptide that showed cryoprotective activity against NHDF cell.

研究分野：物理系薬学

キーワード：凍結保護 バイオ医薬品添加剤 コールドチェーン 分子盾効果 天然変性タンパク質

1. 研究開始当初の背景

細胞(哺乳動物・植物)の凍結保存の際にその生存率を上げる保護剤(細胞凍結保護剤)として、家蚕(絹)由来のセリシンと植物由来ストレスタンパク質のデヒドリンがそれぞれ、知られている。このうち、我が国において、寺田(福井大)がセーレン(株)と産学共同研究を行い、細胞凍結ならびにタンパク質保存用の試薬として実用化されている。一方、デヒドリンについては、大豆や米糠由来の有用成分として門間(食総研)が報告している。米国ではデヒドリン遺伝子に関する特許が115件成立している(動物細胞保護剤としての応用はない)。

研究代表者は、新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」(H21~H25)の計画班に所属しており(申請時)、水溶液中で特定のコンパクトな立体構造を持たない天然変性タンパク質(IDP)の半網羅的物性解析を、構造生物学の観点から行っていた。その際、セリシン・デヒドリンのいずれもが①IDPであること、②試験管内で凍結により失活する乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)について凍結保護活性があること、に着想を得て、ヒトゲノム由来機能未知IDPについて同様の活性の有無を調査した。その結果、6種類(36~44アミノ酸)のIDPのうち5種類にLDH凍結保護活性を見出し、本研究を開始する直前(H25年1月)に特許を出願した。その過程で、セリシンについては酵素凍結保護剤としてよりもむしろ細胞保護剤として脚光を集めていることを知り、ヒト由来IDPの細胞保護活性の有無に興味を持った。

2. 研究の目的

本研究の直接の目的は、以下の3点である。

- 既に取得したヒトゲノム由来IDPならびに他のIDPについて、[配列と活性]の関連性の調査、いわゆる構造活性相関研究を行い、「最強の酵素凍結保護活性を有するヒトゲノム由来IDP」を取得・創出する。
- ヒトゲノム由来IDPについて哺乳動物細胞の凍結保存における保護効果があるかどうかを調べる。
- そののち、同様の構造活性相関研究を行い、「最強の酵素凍結保護活性を有するヒトゲノム由来IDP」を取得する。

上記の目的を達成するためには、IDPならびにIDPが含まれるタンパク質分子の相互作用について、幅広く知見を集めつつ、現時点での作業仮説を更に進化・深化させる必要がある。そこで、IDP試料の調整法や、IDPの物性を解析するための新規のNMR測定法などの開発も並行して行うこととした。更に、本研究の内容に、研究分担者・連携研究者以

外の研究者とのIDPに関する共同研究からの最新の情報・知見も、適宜フィードバックし、研究推進に役立てることとした。

3. 研究の方法

・ヒトゲノムからのIDP様配列の取得、予測法：連携研究者である清水佳奈博士(産総研・CBRC)の開発した天然変性領域予測プログラムPoodleを使用し、30アミノ酸以上50アミノ酸以下の領域を選択した。

・IDP試料(ペプチド)の調製法：IDP試料は大腸菌で組換えタンパク質として生産させ、融合発現のタグを遊離させた後、HPLCで精製した。これまでに試したヒト由来IDPペプチドの平均的な収量は、大腸菌培養1Lあたり2mgである。その際、大腸菌の内在性プロテアーゼによる目的IDP試料の分解が、最大の問題点となる。そこで、IDP試料の調製に特化した発現系であるブタコレラウイルス由来N末端オートプロテアーゼNPROの融合発現ベクターを作成し、本実験に適した形態に、条件を最適化した。

・IDPの(酵素)凍結保護活性の測定法：Lin, C., and Thomashow, MF.: (BBRC, 183, 1992, 1103-8)に準じて、市販の乳酸脱水素酵素LDHが液体窒素と4℃水浴で凍結→融解のサイクルを5回繰り返すと残存活性が5%以下になる現象を利用して、そこに添加した物質(IDP)による凍結保護活性を評価した。LDH活性はNADPHの吸光度変化を利用して定量した。IDPの配列の最適化は、後述する細胞への凍結保護活性の評価のために、新規のIDPを更にヒトゲノムから探索するのではなく、既存のIDPのアミノ酸長を短くすることにより、最適化を行うことにした。

・更に、モデル酵素以外の酵素・タンパク質に対する凍結保護活性を評価しなければ、多種類の酵素が含有されている細胞の凍結保護には至らない、と考えた。そこで、*S. japonicum* グルタチオンS転移酵素、ならびに緑色蛍光タンパク質に対して、大腸菌組換えにより試料を得て、それらが効率的に活性を消失する凍結・再融解条件を設定した。その条件を用いて、IDPの凍結保護活性を評価した。

・IDPの細胞凍結保護活性の測定法：まず扱いやすい培養細胞(Hela, Cos7, NIH3T3)について、IDP添加細胞保護溶液・無添加保護溶液・DMSO等対照実験)を用意し、凍結処理時間(15秒、60秒)を変えて凍結し、二週間保存したのちの細胞生存率を評価した。更に、凍結保存が困難な細胞として、ヒト正常皮膚繊維芽細胞(NHDF)を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) IDP 試料の大腸菌による組換え発現生産法の最適化

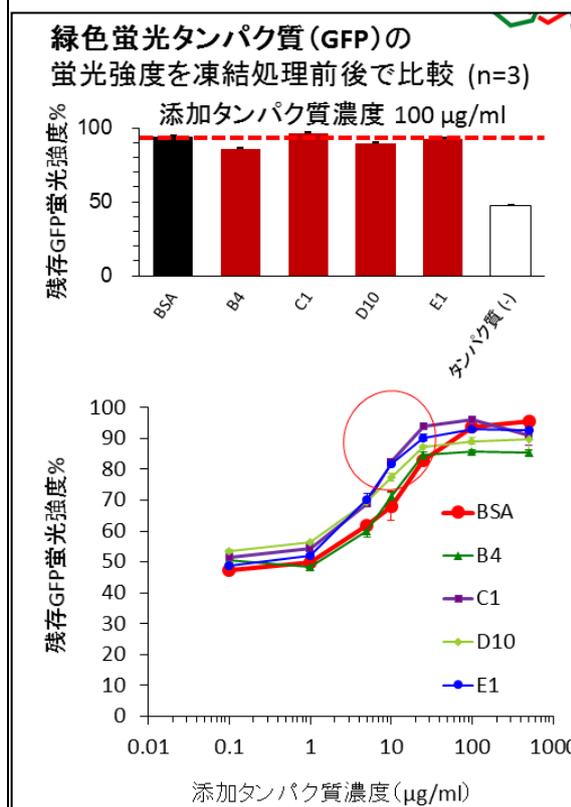
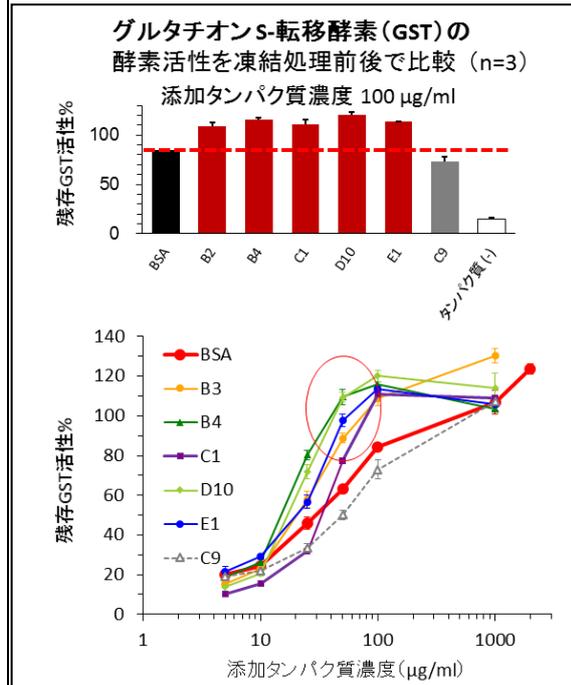
いくつかの予備実験の結果より、IDP の大腸菌発現系による試料調製は、大腸菌の内在性の分解により困難を極めた。そこで、大腸菌内の分解を低減する方法として、ウィーン大学の Auer らが開発したブタコレラウイルス由来 N 末端オートプロテアーゼ NPR0 に着目し、それを用いて、IDP 試料が生産できるかどうかを調べた。その結果、高度好熱菌由来 Hef タンパク質の 160 残基におよぶ IDP 領域をはじめとして、多くの IDP を再現性良く、同じプロトコルで生産できることがわかった (論文 5)。Auer らの方法では、希釈により NPR0 部分を巻き戻す必要があったが、その際、溶液の体積が増えるため、長時間の濃縮過程が必要となり、その間の試料の劣化・分解が懸念された。そこで、少量の体積での巻き戻し操作で、IDP からのタグプロテアーゼの除去が可能な透析法を採用し、その条件を確立した (論文 4)。

なお、今回の凍結保護剤開発目的ではないが、ヒトゲノム由来 IDP として重要な研究対象として、アミロイドβペプチドの試料調製法の最適化も行った。アミロイドβペプチドの場合も、上記同様に、内在性プロテアーゼによる分解を避けるための封入体への発現と、巻き戻し過程を含む発現・精製のプロトコルが最善の結果を与えた。この成果は、共同研究者によりさらに発展し、アミロイドβペプチドの標的分子の同定に、間接的に貢献した (論文 2)。ただし、アミロイドβペプチドの試料調製時には、単に発現・精製するだけではなく、半ば凝集しつつある試料の単量体化のプロセスも重要であった。我々はその際の濃度を薄い状態にたもつことが重要であることを明らかにした (論文 1)。

(2) LDH 以外の酵素・タンパク質を用いたハイスループットかつ安価な凍結保護活性を有する IDP の評価法

IDP の細胞に対する凍結保護活性を評価する前に、LDH 以外の酵素の有無を確認する必要があるが、こうした研究に適しているモデル酵素として系が確立しているものが少ない。そこで、我々は、組換え発現の融合タンパク質タグであるがゆえに、実験室で容易に入手可能かつ取り扱いが容易なタンパク質である、グルタチオン S 転移酵素 (GST) と、緑色蛍光タンパク質 (GFP) について、検討した。GST については LDH と同様の条件、GFP については倍の 10 回の繰り返し凍結融解で、再現性よい検出可能な活性・蛍光の低下を認めた。さらに、GST については CDNB アッセイ、GFP についてはタンパク質の蛍光強度で、それらの活性を容易に評価できる。両者のアッセイは蛍光プレートリーダーで実施できるため、ハイスループット系に適することが明らかになった。

かになった。



(3) 細胞に対するヒト由来 IDP の凍結保護活性の予備試験と試料条件の設定

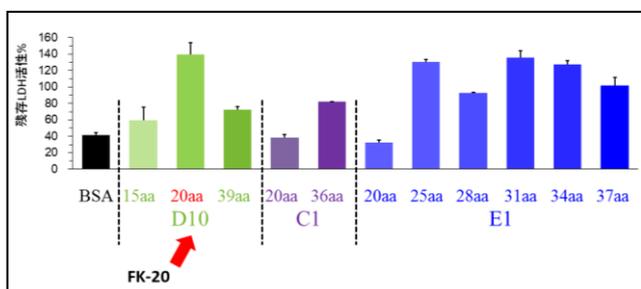
当初、ヒトゲノム由来 5 種類の IDP の細胞に対する効果を網羅的に調べる予定であった。しかし、IDP 試料を 0.1%、培地 2ml であれば毎回 2mg 調製するには、大腸菌発現系の生産性は心もとないものであったためいくつか

に絞り条件検討を開始した。初めに培養の容易な細胞種である、HeLa、Cos9、NIH3T3 細胞を用いて、IDP について調査する予定であった。しかし、コントロールとなる保存出来の一つである、IDP を含まない凍結保存液（生理食塩水・リン酸緩衝液）でも、実用に十分な細胞の生存率であり、IDP 添加の有意差は出なかった。

更に、再現性を確認するうち、大腸菌で調製した IDP では細胞毒性を有することがあり、大腸菌の菌体由来の LPS などが原因であることが考えられたが、実験室レベルでのそれらの除去はコストがかかることがわかった。

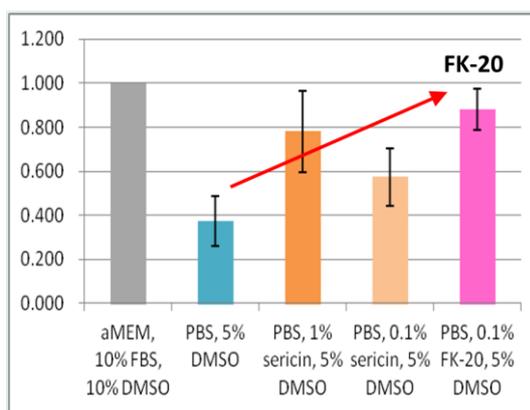
(4) より短い凍結保護活性を有するペプチド FK20 の取得

前述の結果を受けて、細胞実験を再現性よく実施するためには、IDP 試料は合成ペプチドを用いることとした。そのために、ペプチド合成のコストが安い、より短い IDP の凍結保護を検討することとした。三種の IDP (D10/C1/F1) を系統的に短くしていった結果、25 アミノ酸より短くすると凍結保護活性の落ちるものがあることがわかった。E1、C1 では、ペプチドを 20 アミノ酸まで短くすることができなかったが、D10 では 20 アミノ酸でも十分な凍結保護活性が得られた。このペプチドを FK20 と名付けた。



(5) NHDF 細胞に対する FK20 の凍結保護効果

合成ペプチド FK20 の利用により、細胞の凍結保存実験の再現性がよくなることが期待された。医療用の細胞培養などに含まれないことが推奨されている仔牛血清 (FBS) を含有しない培地での凍結保存が困難な細胞として、NHDF (正常ヒト皮膚繊維芽細胞) が知られている。そこで、この細胞を用いて、リン酸緩衝生理食塩水をベースに、FK20 の効果を見た。その結果、5%DMSO 存在下、0.1%の FK20 の添加で、ほぼ 100%の細胞凍結保存が達成された。これは、ヒトゲノム由来天然変性ペプチドに、細胞保護効果があることを乱した世界で最初の例である。一方、同様に細胞や人体に対して毒性が一部指摘されている DMSO については、DMSO を完全に不含とすることはできなかった。



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 6 件)

(1) Shigemitsu, Y., Iwaya, N., Goda, N., Matsuzaki, M., Abe., Y., Narita, A., Tenno, T. Hoshi, M., and Hiroaki, H.* 2016, Nuclear magnetic resonance evidence for the dimer formation of beta amyloid peptide 1-42 in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol Analytical Biochemistry, 498:59-67. DOI: 10.1016/j.ab.2015.12.021 [査読有]

(2) Ohnishi, T., Yanazawa, M., Kitamura, Y., Sasahara, T., Nishiyama, T., Komura, H., Hiroaki, H., Fukazawa, Y., Kii, I., Kakita, A., Takeuchi, A., Ito, A., Takeda, H., Hirao, H., Inoue, M., Muramatsu, S., Matsui, K., Tada, M., Sato, M., Goda, N., Takino, N., Sakai, S., Arai, Y., Umetsu, Y., Takahashi, H., Hagiwara, M., Sawasaki, T., Iwasaki, G., Nakamura, Y., Nabeshima, Y., Teplow, T. B., and Hoshi, M.* 2015, Na,K-ATPase α 3 Is a Death Target of Alzheimer Patient Amyloid- β Assembly. 2015, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 112(32):E4465-E4474. DOI: 10.1073/pnas.1421182112 [査読有]

(3) Goda, N., Shimizu, K., Kuwahara, Y., Tenno, T., Noguchi, T., Ikegami, T., Ota, M., and Hiroaki, H.*, A Method for Systematic Assessment of Intrinsically Disordered Protein Regions by NMR. 2015, Int J Mol Sci, 16 (7):15743-15760. DOI: 10.3390/ijms160715743 [査読有]

(4) Goda, N., Matsuo, N., Tenno, T., Ishino, S., Ishino, Y., Fukuchi, S., Ota, M., and Hiroaki, H.*. 2015, An optimized Npro-based method for the expression and purification of intrinsically disordered

proteins for an NMR study. Intrinsically Disordered Proteins, 3(1):1-6. DOI: 10.1080/21690707.2015.1011004 [査読有]

(5) Ishino, S., Yamagami, T., Kitamura, M., Kodera, N., Mori, T., Sugiyama, S., Ando, T., Goda, N., Tenno, T., Hiroaki, H., and Ishino, Y*. 2014., Multiple interactions of the intrinsically disordered region between the helicase and nuclease domains of the archaeal Hef protein. J. Biol. Chem., 289(31): 21627-21639. doi: 10.1074/jbc.M114.554998 [査読有]

(6) 再生医療 (日本再生医療学会雑誌) 2015, 14(3), 52-53、用語解説 「天然変性蛋白質」 (2015)、廣明秀一* [査読無]

[学会発表] (計 10 件)

(1) 松尾直紀、合田名都子、清水佳奈、福地佐斗志、太田元規、廣明秀一、天然変性タンパク質に広く認められた凍結保護作用の評価, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014/6/26

(2) 松尾直紀、合田名都子、清水佳奈、福地佐斗志、太田元規、廣明秀一、天然変性タンパク質がもつ凍結保護作用の発見, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014/11/27

(3) 廣明秀一、医療応用を志向したタンパク質の凍結・凍結乾燥保護剤, 新技術説明会-中部地区医療・バイオ系シーズ発表会 2014, 2014/12/10

(4) 松尾直紀、合田名都子、清水佳奈、福地佐斗志、太田元規、廣明秀一、天然変性タンパク質に見出されたタンパク質に対する凍結保護活性の研究, 2014 年度生物物理学会中部支部講演会, 2015/3/10

(5) 松尾直紀、合田名都子、清水佳奈、福地佐斗志、太田元規、廣明秀一、ヒトゲノム配列に含まれる天然変性タンパク質の医療応用, 第 135 回日本薬学会年会, 2015/3/26

(6) 重光佳基、岩谷奈央子、合田名都子、松崎瑞希、天野剛志、成田哲博、星美奈子、廣明秀一、 β アミロイド (1-42) ペプチドは HFIP 中で二量体を形成する, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015/6/24

(7) 重光佳基、岩谷奈央子、天野剛志、合田名都子、松崎瑞希、成田哲博、星美奈子、廣明秀一、HFIP 中におけるアミロイド β (1-42) ペプチドの二量体形成, 第 13 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム, 2015/8/21

(8) 廣明秀一、Cryoprotective Activity in Human Genome-derived Intrinsically Disordered Proteins and Their Pharmaceutical Applications, 2015 The 5th NU-TECH ROUND TABLE, 2015/11/4

(9) 廣明秀一、医療応用を志向したタンパク質・細胞の凍結保護剤, 第 2 回メディカルメッセ (【同時開催】中部地区 医療・バイオ系シーズ発表会), 2016/2/3

(10) 重光佳基、岩谷奈央子、天野剛志、合田名都子、松崎瑞希、成田哲博、星美奈子、廣明秀一、HFIP 中における β アミロイド (1-42) ペプチドの二量体形成, 2015 年度生物物理学会中部支部講演会, 2016/2/29

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 「タンパク質凍結保存用保護剤」
発明者: 廣明秀一、天野名都子、松尾直紀、太田元規、福地佐斗志、岩村佳奈
権利者: 名古屋大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2015/050131
出願年月日: 2015/1/6
国内外の別: 国際出願

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

(1) 天然変性タンパク質の NMR 解析と医療応用
<http://presat-vector.org/hiroaki-lab/?p=116>

(2) 【特許出願情報】「タンパク質凍結保護剤」に関する特許出願
<http://presat-vector.org/hiroaki-lab/?p=1048>

(3) 新規のバイオ医薬品の保存用安定化剤
<http://www.engg.nagoya-u.ac.jp/techno/techno2015/booth/no23.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣明 秀一 (HIROAKI HIDEKAZU)

名古屋大学大学院創薬科学研究科・教授

研究者番号: 10336589