

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20760541

研究課題名 (和文)

細胞の品質管理機構に着目したバイオ医薬品の生産性向上に関する研究

研究課題名 (英文)

Basic research for improvement of productivity of bio-medicines based on cell quality control system

研究代表者

東 恒仁 (HIGASHI TSUNEHITO)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90453018

研究成果の概要 (和文)：

小胞体内腔のタンパク質の動態を解析するために、全反射顕微鏡を用いた一分子観察の系を確立した。一分子解析は得られるデータが膨大なものとなるが、それらを解析するために画像解析の手法を導入した。またこれまで当研究室で行われてきた解像度を時空間方向に一桁程度高めることで、細胞質で最も速い単純拡散する分子の解析を可能とした。そして確立した手法を用いて、分泌タンパク質の挙動に影響を与える因子の一つとして温度ストレスを見出した。

研究成果の概要 (英文)：

We established the method for mobility analyses of cargo proteins in endoplasmic reticulum by total internal reflection fluorescence microscopy. To deal with the large amount of data, we proposed the method using image analyses. Using improved resolution in time and space, we are now able to analyze simple diffusion of cytoplasmic proteins. Finally, we identified temperature stress as one of the factors affected on cargo protein mobility by established methods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：動物細胞工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：動物細胞工学、小胞体、品質管理、全反射顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

2004年の欧米におけるバイオ医薬品の市場規模は既に300億ドルに達し、今後10年間で700億ドルを超えると予想されている(Nat Biotechnol, 2006)。バイオ医薬品の生

産には大腸菌・酵母・哺乳類培養細胞などが用いられているが、一般に哺乳類培養細胞は翻訳後修飾能に優れ、バイオ医薬品の生産宿主として幅広く用いられるようになった反面、比増殖速度が低いこと、また培地をはじ

めとする培養にかかる費用が高いことが問題とされてきた。これまでバイオ医薬品の生産性向上のために培養方法の改良・遺伝子増幅を用いた単位細胞あたりの生産性の向上などが試みられ、一定の成果を上げてきた。しかしながら医薬品の開発コストの増大・品質のバリデーションへの要求の高まりを勘案すると更なる生産性の向上が望まれる。バイオ医薬品を含む分泌蛋白質は粗面小胞体上のリボソームで合成された後、小胞体内腔に挿入されてフォールディング・糖鎖付加などの修飾を受ける。そして遷移領域を介してゴルジ体に移行し、更なる成熟化を受けてから細胞膜に輸送されて細胞外に分泌される。この過程において正確にフォールディングされなかったタンパク質は小胞体における品質管理機構の働きによってフォールディング完了まで小胞体内腔に繋留されるか、細胞質に運ばれた後プロテアソーム経路により分解される。これはタンパク質の分泌過程において小胞体での成熟化ステップが律速段階になりやすいことを示唆している。バイオ医薬品の生産プロセスにおいても遺伝子増幅等の手法で発現量を高く保つと宿主細胞のタンパク質品質管理機構の破綻を引き起こし結果的に単位細胞あたりの生産性の低下に繋がる可能性がある。しかしながら小胞体の品質管理機構に着目したバイオ医薬品の生産に関する研究は、これまでほとんどなされてこなかった。これは、小胞体内腔におけるタンパク質の成熟状態の評価が困難であったためである。特に遺伝学的解析手法および生化学的解析手法を用いる場合、それらの時間分解能では小胞体内腔の分子の状態、また小胞体-ゴルジ体間輸送をリアルタイムに解析することは事実上不可能である。またこれらの解析方法では分子の平均的な挙動の解析のみが可能であり、多様な状態の集団が存在する、成熟化過程の分泌タンパク質の解析には適さないものと考えられている。これまで分泌タンパク質は小胞体内腔においては単純拡散で移動しているものと考えられてきた。しかしながら、正常にフォールディングされた分泌タンパク質のみが優先的に遷移領域 (ER exit site, ERES) を介してゴルジ体に移行されること、またその移行がタンパク質の翻訳後極めて速やかに行なわれること (アルブミンの場合はリボソームでの合成後 20 分程度で細胞外に分泌される) を考慮すると、小胞体内腔において分泌タンパク質は何らかの制御を受けながら移動しているのではないかと考えられる。実際、近年小胞体内腔にはカーゴタンパク質の遷移領域への移動に関わる流れ (flow) が存在するのではないかとこの考えも提唱されている (Ann Rev Cell Dev Biol, 2004)。現在の

ところ、これらの仮説を明確に証明した報告は存在しないが、これは主にこれまで行なわれてきた遺伝学的・生化学的手法を中心とする解析方法の限界が主な原因であるものと思われる。

そのため、申請者は上で述べたような特長を有する顕微鏡を用いた細胞生物学的解析手法を導入することを考えた。可視化を用いた解析手法としては蛍光消光回復法 (Fluorescence Recovery After Photobleaching) や蛍光相関分光法 (Fluorescent Correlation Spectroscopy) が存在し、共に小胞体内腔におけるカーゴタンパク質の挙動の解析に用いられてきた実績がある (JCB, 2008)。これらの手法は優れた時間分解能を有するものの、解析対象の分子を集団として解析するため、個々の分泌タンパク質の動態を解析することは困難である。そこで一分子解析が可能な全反射顕微鏡を用いることとした。

近年、顕微鏡技術の発達が目覚しく、特に全反射顕微鏡を用いると細胞内の分子を一分子レベル、かつミリ秒単位の時間分解能をもって解析することが可能になりつつある。全反射顕微鏡を用いた解析の特長は、その高い時間分解能にあるだけでなく、個々の分子の挙動を別個に解析できる点にもある。従って成熟化過程の小胞体内腔における分泌タンパク質の拡散の異常性を的確に捉え、解析することができるかと期待される。

全反射顕微鏡はカバーガラス表面近傍に発生するごく微弱なエバネッセント光を利用して蛍光分子を励起する。そのためカバーガラス近傍の分子しか観察できず、細胞表面の分子以外には適用が困難であるとされてきた。しかし小胞体は細胞質全体に分布していることから、細胞膜近傍の小胞体内腔であれば全反射顕微鏡で観察可能ではないかと考え、研究の前段階として予備実験を試みた。カーゴタンパク質のモデルとして汎用される水泡性口内炎ウイルス糖タンパク質 (VSVG) を緑色蛍光タンパク質 (GFP) と融合させ、COS7 細胞で発現させて全反射顕微鏡で観察したところ、小胞体内腔に一分子の輝点が観察されたことから、全反射顕微鏡を用いた小胞体内腔の分泌タンパク質の解析が可能であることが強く示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、まず小胞体内腔における一分子解析技術の確率を行うこと、続いてバイオ医薬品の生産において重要な位置づけを占める哺乳類培養細胞の小胞体内腔における品質管理機構の理解を一分子解析を通じて深めることで、将来的にバイオ医薬品の効率的な生産に繋がるものと考えられる小胞体における品質管理に寄与する因子の探索手法を

提案することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 一分子観察

No. 0 ガラスボトムディッシュに播種した細胞をニコン社製全反射顕微鏡で観察した。宿主細胞としては核/細胞質比が小さく、小胞体の観察を行ないやすい COS7 細胞を選択した。

モデル分子として、温度感受性変異体が報告されている水泡性口内炎ウイルス糖タンパク質 (VSVG)、小胞体内腔に繫留される変異体の存在する antitrypsin、および黄色蛍光タンパク質 (YFP) に小胞体局在シグナルとアルギニン結合型糖鎖を付加した YE(gly)₂ を用いた。

なお細胞への遺伝子導入方法としては、全反射顕微鏡での一分子解析を行なうにあたってはバックグラウンドを可能な限り低減する必要があることから、遺伝子発現を可能な限り低く抑えることが必要となる。そこで通常用いられる遺伝子導入方法ではなくビーズローディング法 (Nagaya et al., JCB, 2008) を用いた。そして導入数時間後に観察および解析を開始した。

上記の手法で観察した COS7 細胞における VSBG-GFP の図を示す。(下図上。緑が最初の 0-15 ミリ秒、赤が次の 15-30 ミリ秒)。続いて連続して撮像した 1000 枚の画像を重ね合わせた図を示す (下図下)。典型的な小胞体の構造である網目状構造が確認された。

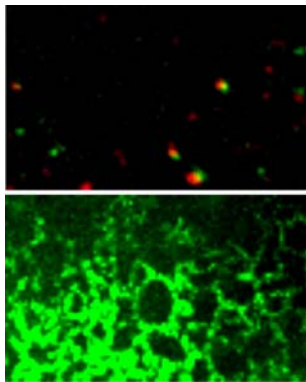


Fig. 1 小胞体内腔における一分子観察

(2) カーゴタンパク質の動態解析

本研究では、分子の拡散状態を解析するにあたって Jump distance analysis の適用を試みた。

時間 t における分子の原点からの距離を r とした場合、Fick の第二法則

$$dp(r, t)/dt = D\{d^2p(r, t)/dr^2\}$$

より、分子の存在位置の確率分布 $P(r, t)$ は以下のように求められる (Jump distance analysis)。

$$p(r, t) = (r/2Dt) \exp(-r^2/4Dt)$$

なお分子の拡散係数 D は、Einstein-Stokes の式より、以下のように表される。

$$D = kT/6\pi\eta R$$

D : 拡散係数

k : ボルツマン定数

T : 絶対温度

η : 粘性

R : 分子半径

4. 研究成果

(1) 小胞体内腔におけるカーゴタンパク質の拡散解析

小胞体内腔において、大部分のカーゴタンパク質は拡散により移動しているものと考えられる。しかし当初実施した 15 ミリ秒の時間分解能における一分子解析では、検出される輝点の動きは単純拡散に従わないことが判明した。解析の結果、15 ミリ秒レベルの時間分解能で観察される輝点は、糖鎖を介して小胞体の膜に短時間結合したカーゴタンパク質の動きを捉えていることが示唆された。そこで顕微鏡観察システムの改善により、解析の時空間分解能をこれまでの約 20 倍程度にまで向上させた。その結果、小胞体内腔を拡散するカーゴタンパク質の動態をリアルタイムに記録することが可能となった。コンピュータシミュレーションによって Jump distance analysis の妥当性を検討したところ、理論値と極めて高い一致を示したことから Jump distance analysis は分子拡散の解析モデルとして適当であることが示唆された。

そこで、実際に細胞質に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現させて全反射顕微鏡で一分子観察を行ない、取得された画像に対して Jump distance analysis を試みた。その結果、計算された拡散係数は $16.0 \pm 0.4 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ であり、蛍光相関分光法を用いて測定した値と極めて近いものであった。これらの結果から、高時間分解能を有する全反射顕微鏡システムと Jump distance analysis の組み合わせは、細胞内の分子の拡散解析の手法として極めて有用であることが示された。

(2) カーゴタンパク質の動態に影響を与える因子の探索

細胞が受ける様々な外部ストレスは、小胞体におけるタンパク質の品質管理機構に影響を与えることが知られている。そこで、外部ストレスがカーゴタンパク質の小胞体内腔での動態に影響を与えるかを調べた。カーゴタンパク質は糖鎖を介して小胞体膜に結合することが知られていることから、アスパラギン結合糖鎖を付加した蛍光タンパク質 (YE(gly)₂) を、カーゴタンパク質のモデルとして用いた。

今回は代表的な小胞体ストレスの一つとして知られている温度ストレスに着目して解析を試みた。YE(gly)2を発現した細胞を高温ストレス下(42℃)に置き、全反射顕微鏡で観察した。取得した画像に対してJump distance analysisを行なったところ、糖鎖を有しないタンパク質(YE)と比較して距離分布に変化が見られた(下図)。通常の培養条件下(37℃)では両者に有意差が見られなかったことから、カーゴタンパク質は高温ストレス条件下ではアスパラギン結合型糖鎖を介して小胞体膜にtetheringすることが分かった。

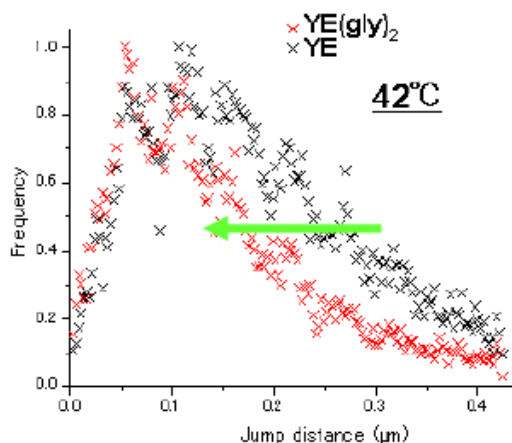


Fig. 2 Jump distance analysisによるアスパラギン結合型糖鎖を介したカーゴタンパク質の高温ストレスに対する応答の解析。

また各種阻害剤を用いた実験により、このtetheringはアクチン細胞骨格による制御を受けることを示唆する結果を得た。これらの結果から、Jump distance analysisは小胞体内腔のカーゴタンパク質の動態を評価する方法として有効であることが示唆された。本研究により提案するカーゴタンパク質の解析方法を用いることにより、小胞体での品質管理に影響を及ぼす因子を、従来用いられてきた生化学的・遺伝学的手法に比較してより直接的かつ非侵襲的に探索および評価することが可能になるものと期待される。加えて本手法の特長として、一部の異常性を持つカーゴタンパク質を検出・評価できる点が挙げられる。バイオ医薬品の生産においては、宿主細胞の改変技術が重要な位置を占める。宿主細胞の評価にあたってはこれまで主にアウトプットが注目されてきた。しかしながらより汎用性がある宿主細胞の構築方法を提案するにあたっては細胞が持つ品質管理能力に着目することが必要不可欠であり、そのためには細胞の品質管理能力の評価系の構築が求め

られる。本研究で構築した系は非侵襲的かつ迅速な品質管理機構の評価が可能であり、効率的なバイオ医薬品の生産を目的とした応用的研究に直接繋がるものと期待される。加えて本研究で提案した解析手法は小胞体の品質管理機構自体の解析にも有効な方法であり、応用的研究のみならず、基礎研究の発展にも寄与することができると考えられる。

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 東恒仁、野本幸男、小林謙、大森孝一、和田郁夫、移植細胞の動態観察のためのIn vivo 蛍光・発光標識法、サージェリーフロンティア、16巻、pp. 79-84、2009年、査読無し

〔学会発表〕(計3件)

- ① 和田郁夫、東恒仁、田中学、Jump distance analysisが示すカーゴタンパク質成熟化におけるアスパラギン結合糖鎖の役割、第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸市
- ② Seisuke Arai, Tsunehito Higashi, Gaku Tanaka, Ikuo Wada, Probing the environment of the endoplasmic reticulum lumen by analyzing jump distance of a cargo protein. 4th Cell Stress Society International (CSSI) Congress on Stress Responses in Biology and Medicine. 2009/10/8, Sapporo.
- ③ 渡辺歴、東恒仁、二光子レーザー顕微鏡を用いた細胞小器官の操作、第20回動物細胞工学シンポジウム、2008年8月4日、東京都

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fmu.ac.jp/home/cellsci/saibou-top.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東恒仁 (HIGASHI TSUNEHITO)
福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90453018

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

和田 郁夫 (WADA IKUO)
福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40182969