

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656506

研究課題名(和文) 膜タンパク質の *in vivo* 再構成技術の開発

研究課題名(英文) Development of membrane protein reconstitution technique *in vivo*.

研究代表者

二見 淳一郎 (JUNICHIRO, FUTAMI)

岡山大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：00420498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の細胞内導入技術と生細胞内でのタンパク質の巻き戻し技術を併用して、前駆体タンパク質の細胞内導入に伴う膜タンパク質の再構成技術の開発に取り組んだ。本技術達成に向けて、*in cell folding* 技術の大幅な改善に成功したほか、可逆的変性カチオン化前駆体タンパク質を用いて、翻訳系を経ないタンパク質の成熟化経路がヒト細胞内で駆動することが確認できた。

研究成果の概要(英文)：Combining protein transduction and *in cell folding* techniques, we tried to develop a novel *in cell folding* techniques for membrane protein in living cells. In order to achieve this technology, *in cell folding* technique was drastically improved in this study. Using denatured and reversibly cationized precursor protein, protein maturation events were observed in human cells without translation machinery.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

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：タンパク質工学 化学修飾 細胞内導入 タンパク質フォルディング 細胞内輸送経路 翻訳系

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

組換えタンパク質をヒト培養細胞の外部から一過的に導入して機能させる技術は、主に塩基性ペプチドをタンパク質に付加させる手法を主流として最近の約10年間で多くの成功例が示されてきた。これまでの研究では、主に組換えタンパク質として調製しやすい材料で研究が進められてきたが、動物細胞の表面や細胞内オルガネラに存在する膜タンパク質・受容体の様に、脂質2重膜を介する成熟化過程を伴うタンパク質での成功例はほとんど報告されていない。その1つの理由は、これら膜タンパク質の扱いにくい物性が挙げられる。この課題を解決しうる手段として、我々は変性状態のタンパク質のCys残基に対して可逆的なSS結合を介して正電荷を導入する可逆的変性カチオン化技術を開発しており、難溶性の変性タンパク質に高い水溶性を付与することが可能である。さらにこの可逆的変性カチオン化タンパク質を培養細胞の上清に添加すると、細胞表面への静電的吸着を介して高効率に細胞内へタンパク質を導入させることが可能である。エンドサイトーシス様の経路で取り込まれたタンパク質の多くは細胞内で分解経路に移行するが、エンドソーム様の顆粒内から細胞質中への移行を促進する添加剤等の併用により、一部を細胞質中へ放出させることができる。還元的環境である細胞質内では、可逆的変性カチオン化タンパク質にSS結合で付加されたカチオン性基が還元・解離するため、還元されたタンパク質が細胞質内で自発的/シャペロン依存的に活性構造に巻き戻り、生理機能を発現することが可能である。この一連の過程を経る技術をin cell folding法とし、これまで転写因子タンパク質を中

心に多くの成功例を確認してきた。本研究ではこのin cell folding法を活用して、最終的に膜タンパク質を一過的に細胞内に導入して機能させる新技術へと発展させたいと考えている。しかし本技術の達成には以下の2つの問題解決が必要である。1つ目は分泌シグナルや膜貫通領域といった疎水性の高い領域を含む前駆体タンパク質の調製である。前駆体のままの全長タンパク質の取得には、主に大腸菌を宿主とした生産系を活用するが、一般にこの様な物性のタンパク質は低発現であり、調製が容易ではない。2点目は本手法が膜タンパク質の成熟化経路に適用可能か否かの本質的な問題である。一般に、生細胞内で生合成される膜・分泌タンパク質は、小胞体(ER)上で合成と同時にER内腔に直接注入された後、成熟化経路に移行するco-translational translocation (CTT)経路で合成されている。一方で、合成後の前駆体タンパク質がER内へ移行する経路post-translational translocation (PTT)経路による成熟化が、ヒト細胞内で起こりうるのか?という点は、詳細が未解明である。この成熟化経路に関する解析は多くの報告例があり、高等動物ではイヌ腭臓由来のミクロゾームメンブレン(ERを含む)と前駆体タンパク質を無細胞系で混合するとPTT経路が再現できることが確認されている。これらの背景から、in cell folding法を活用して、生理的な生細胞内でPTT経路により前駆体タンパク質の成熟化を証明できれば、真核生物の細胞内でのタンパク質成熟化経路の詳細な解明にも繋がる。本研究では、難溶性で取り扱いが困難な前駆体タンパク質を可溶化する可逆的変性カチオン化技術と、これを生細胞内で活性構造に巻き戻すin cell folding技術を組み合わせて、上記の課題に対する

実証実験を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究では in cell folding 化技術を活用して膜タンパク質をヒト培養細胞内で再構成させる技術開発を目指し、以下の課題に取り組んだ。

(1) In cell folding 技術の改善

本技術開発の鍵は、細胞表面に静電的に吸着した後にエンドサイトーシス様の経路で細胞内に可逆的変性カチオン化タンパク質が移行した後に、顆粒内から細胞質への放出促進が重要である。このステップを促進する両親媒性ペプチドの併用条件を最適化するため、人工転写因子とルシフェラーゼレポーターを活用した評価系で本手法の技術改善を進めることとした。

(2) 分泌タンパク質をモデルとした in cell folding の検証と膜タンパク質への応用

N 末端に疎水性の分泌シグナルを付加したままの分泌タンパク質の前駆体タンパク質を大腸菌で生産し、不溶性画分から可逆的変性カチオン化タンパク質を可溶化・精製し、培養細胞に添加することで PTT 経路による再活性化の検証を進めることとした。さらに本手法で特に再構成実験が成功すれば、利用・応用の夢が広がる 7 回膜貫通型受容体の調製を試みた。本サンプルを培養細胞に導入し、生細胞の表面で再構成された受容体の機能発現を確認することを本技術開発の最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) in cell folding 技術の改善

本研究のモデルとして、Gal4 DNA 結合ドメインと VP16 転写活性化ドメインからなる人工転写因子：BDAD を調製した。BDAD

の DNA 結合ドメインに含まれる Cys 残基に対し、TAPS-Sulfonate を用いて可逆的な SS 結合を介して正電荷を付与した TAPS-BDAD を調製し、細胞内導入タンパク質のモデルとした。本サンプルは、HeLa 細胞のゲノム中に Gal4 応答エレメントの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ評価用細胞 HeLa Luciferase Reporter (HLR) 細胞の培養上清に添加した。すなわち、本評価系では in cell folding 経路を経て再活性化をした量が、ルシフェラーゼ遺伝子の発現量として定量できる。この評価系を用いて、タンパク質の添加濃度、エンドソームからの放出を促進する両親媒性ペプチドの添加濃度等を最適化し、さらに経時的にルシフェラーゼ活性を測定することで、in cell folding 法 の速度論的解析を進めた。これらの予備実験で最適化された条件において、ルシフェラーゼ発光のリアルタイムイメージング解析を行い、本技術の技術水準を確認した。

(2) 分泌タンパク質をモデルとした in cell folding の検証と膜タンパク質への応用

N 末端に分泌シグナルを付加したままの各種の分泌タンパク質の発現プラスミド DNA を構築し、大腸菌を宿主とした生産を試みた。不溶性画分に回収されたタンパク質を変性剤中で溶解・還元し、Cys 残基に対して TAPS-Sulfonate を用いて可逆的な SS 結合を介して正電荷を付与した。純度が不十分なサンプルについては逆相 HPLC を用いた高純度精製を行い、プロテインシーケンサーを用いて N 末端に分泌シグナルが付加していることを確認した。次に、本サンプルが PTT 経路で再活性化しうるサンプルであることを確認するため、HeLa 細胞をジギトニンで処理した半透過性細胞に本サンプルを添加し、ATP 依存的なシグナル

ペプチド切断を指標として評価を進めた。さらにヒト培養細胞 (Hek293, HeLa 細胞など) の培養上清に対し、上記(1)で最適化した条件で in cell folding 法を試み、生細胞の培養上清に再分泌されたタンパク質が示す生理活性の評価と N 末端プロセシングの解析を行い、PTT 経路の検証を進めた。さらに、7 回膜貫通型受容体である G タンパク質共役受容体(GPCR)をモデルとして、特に機能発現の評価が容易なアデニレートシクラーゼ活性型を複数選択し、全長タンパク質を大腸菌で過剰発現を試みた。天然型の cDNA を用いた場合、生産量が極めて微量であったため、人工合成遺伝子を用いて大腸菌での生産効率の向上を試みた。

4. 研究成果

(1) in cell folding 技術の改善

TAPS 化 BDAD と HLR 細胞の組み合わせで、レポーター遺伝子の発現量を高感度かつ定量的に評価することが可能であった。エンドソーム様の顆粒内から細胞質中への移行を促進する両親媒性ペプチドは Lue と His のみならなる 26 アミノ酸の合成ペプチドが最も好適であり、細胞毒性等の影響が無視できるレベルで in cell folding 効率を大幅に向上させた。種々の検討の結果、両親媒性ペプチドの添加は TAPS 化 BDAD と同時が最適であり、添加濃度に依存した改善効果を示した。また、TAPS 化 BDAD の添加濃度にも最適値があることが判明し、100nM 以下の低濃度でも十分な機能発現が確認できた。これらの最適化条件を用いて、ルシフェラーゼ遺伝子の発現レベルをリアルタイム発光イメージングにて解析 (産総研四国センター：中島芳浩先生との共同研究) した結果、サンプル添加後 7 時間後には活性上昇が検出され、添加 18 時間後をピーク

とする一過的な活性化が確認された。以上の結果から、in cell folding 法の技術水準が大幅に改善できたことが確認された。

(2) 分泌タンパク質をモデルとした in cell folding の検証

本実験を進める上で、酵素活性として再活性化が高感度に検出可能な複数の分泌タンパク質前駆体の発現を大腸菌で試みたが、大腸菌で生産可能なものは一部であった。発現に成功したヒト RNase 1 前駆体を TAPS 化して可溶化・精製した後、HeLa 細胞をジギトニンで処理した半透過性細胞に添加した結果、ATP 依存的なシグナルペプチドの切断が確認され、ヒト細胞内で PTT 経路による再活性化が可能なが示唆された。さらに酵素活性がより高いウシ RNaseA 前駆体を TAPS 化し、上記(1)で最適化した条件で HeLa 細胞、Hek293 細胞に添加し、24 時間後の培養上清の酵素活性を測定した結果、有意に高い再活性化・再分泌画分が存在することが確認された。以上の結果から、前駆体タンパク質の生細胞内導入後に、細胞内で翻訳系を経ない PTT 経路によるタンパク質の成熟化が可能なが示唆された。しかし、種々の条件検討によりタンパク質の細胞質内への導入効率を向上させたものの、再分泌・再活性化された画分はごく微量であった。これらの結果を総合的に判断すると、PTT 経路を活用する in cell folding 法は、原理的に活用可能な経路ではある。今後、PTT 経路に乗りやすいシグナルペプチドや補因子の探索により効率が向上できれば、ユニークな応用展開が可能であろう。

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 2 件）

二見淳一郎，“タンパク質の物性を制御するカチオン化技術と工学的応用” *生化学* 85 巻 (2013) 21-25

www.jbsoc.or.jp/old/event/magazine/pdf/85-01-04.pdf

Endy Widya Putranto, Hitoshi Murata, Ken Ichi Yamamoto, Ken Kataoka, Hidenori Yamada, Junichiro Futami, Masakiyo Sakaguchi, Nam Ho Huh “Inhibition of RAGE signaling through the intracellular delivery of inhibitor peptides by PEI cationization. “*Int. J. Mol. Medicine* (2013) 32, 938-944.

doi: 10.3892/ijmm.2013.1467.

〔学会発表〕（計 10 件）

榎原将紘、山口慎二、近藤信次、山田秀徳、二見淳一郎 両親媒性ペプチドの併用による可逆的変性カチオン化タンパク質の in cell folding 技術の改善

日本生物工学会西日本支部第 2 回講演会
2012. 7. 7 岡山大

村田等、Endy Widya Putranto, 阪口政清、二見淳一郎、許南浩 細胞内導入型 RAGE 阻害ペプチドの開発

日本生物工学会西日本支部第 2 回講演会
2012. 7. 7 岡山大

二見 翠、渡邊 泰宜、村田 等、多田 宏子、山田 秀徳、二見 淳一郎 カチオン化アビジンを介したビオチン化タンパク質細胞導入法における導入効率の最適化

第 64 回日本生物工学会大会
2012. 10. 26 神戸

榎原将紘、山口慎二、近藤信次、山田秀徳、二見淳一郎 転写因子タンパク質の in cell folding 法による機能発現技術の開発

第 64 回日本生物工学会大会
2012. 10. 26 神戸

Junichiro Futami Protein Cationization Techniques for Biomedical Engineering Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC)

2012. 10. 27 徳島大

二見淳一郎 （招待）用途に応じたタンパク質の効率的生産

中性子利用研究セミナー

2013. 1. 8 茨城県東海村 日本原子力機構

二見淳一郎 タンパク質カチオン化技術による物性制御と工学的応用

第 13 回 日本蛋白質科学会年会

2013. 6. 13 鳥取

二見淳一郎 変性状態のタンパク質の高度利用と診断薬への応用

化学工学会 第 45 回秋季大会

2013. 9. 16 岡山大学

二見淳一郎（招待）変性状態のタンパク質の高度利用：細胞機能制御と診断薬への応用

INCHEM TOKYO 2013 産学官マッチングフォーラム 2013. 10. 30 東京

二見淳一郎（招待）変性状態のタンパク質の高度利用

第 14 回生命分子ダイナミクスセミナー

2014. 3. 19 東北大学

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二見 淳一郎 (FUTAMI JUNICHIRO)

岡山大学・大学院自然科学・准教授

研究者番号：00420498