

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06575

研究課題名(和文) 嵩高いケージングによるタンパク質の多機能化

研究課題名(英文) Multi functionalization of proteins by sterically bulky caging

研究代表者

山口 哲志 (Yamaguchi, Satoshi)

東京大学・先端科学技術研究センター・講師

研究者番号：80398106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質表面に、刺激分解性リンカーを介して嵩高い保護基を修飾し、多機能性の刺激応答性ケージドタンパク質を創生する研究を行った。親水性ポリマー鎖を嵩高い保護基として修飾すると、加熱しても変性凝集が妨げられるほどタンパク質が安定化され、また、光照射による活性の大幅な回復が確認された。この成果は、タンパク質性医薬品を保管・運搬する際の安定化技術として有望である。また、嵩高い保護基を介したタンパク質の凝集現象を発見し、光溶解性のタンパク質ナノ凝集体として、タンパク質の制御・デリバリー技術として応用した。これらの成果に加え、還元条件や超音波に応答するリンカーの開発も行い、萌芽的な成果を得た。

研究成果の概要(英文)：We created multi-functional caged proteins by modifying sterically bulky protection groups through stimuli-responsive cleavable linkers. Modification of a hydrophilic polymer as the protection group led to strongly stabilize the proteins, so that the modified protein could avoid aggregation even when they were heated. Furthermore, the modified protein was confirmed to drastically recover the activity via light-induced release of the protection group. This molecular technology is a promising tool for stabilizing protein drugs during their storage and transportation. In addition, protein aggregation through a sterically bulky protection group was serendipitously found, and the photolytic protein nano-aggregates were applied to protein regulation and delivery. Moreover, we obtained the preliminary results of both the reductant-responsive and ultrasonic-responsive linkers for expanding the responsibility of the present caged proteins to other external stimuli.

研究分野：化学生物工学

キーワード：ケージド化合物 タンパク質性医薬品 コールドチェーン問題 タンパク質の安定化 PEGylation タンパク質デリバリー ナノ凝集体 超音波応答性

1. 研究開始当初の背景

近年、バイオインフォマティクスと網羅的探索技術の発展により、疾患や重要な生命現象に関わる遺伝子が次々に明らかにされている。そこで、これらの遺伝子がコードするタンパク質を、生命現象の深い理解のために、または、再生医療用の細胞や組織の調製のために、さらには、抗体医薬に続く第三世代のタンパク質性医薬品として活用することが期待されている。一方、細胞内や生体内ではタンパク質が必要な時にだけ必要な場所で適度に働くように、タンパク質の「量」や「活性」が時空間的に制御されている。従って、生体システムと同様にタンパク質の機能を利用するには、狙った時空間でのみタンパク質を望みの量だけ活性化する技術が重要である。また、タンパク質は水溶液中で容易に構造が緩み、不可逆的な凝集やプロテアーゼによる分解を招く。そのため、タンパク質を安定化し、生体内外の目的の場所まで損なうことなく送達する技術も必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質を高い刺激応答性保護基で覆ってその活性を刺激応答性にし、さらに、保護基の組成や表面特性を最適化することにより、タンパク質に高い安定性や水溶性、細胞透過性などの機能を付与した「高い多機能性ケージドタンパク質」の開発を目的とした研究を行う。また、細胞上や生体内でその機能を評価し、本技術を用いた細胞機能の外部制御やドラッグデリバリーへの応用の可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 概要 タンパク質表面に、刺激分解性リンカーを介して高い保護基を修飾し、高いケージドタンパク質を調製した。高い保護基としては、安定性および水溶性が高く、4量体の大きなタンパク質であるストレプトアビジン(SA)や、水溶性が高くタンパク質の安定化剤として広く用いられるポリエチレングリコール(PEG)鎖を用いた。

(2) 刺激応答性リンカー 外部刺激として、時空間的な解像度が高い光刺激を主に用いた。高い保護基を修飾するための反応基(結合基)として、リンカーの末端には、ビオチン基、または、アジド基、アルキン基を導入したものを合成した。さらに、リンカーの水溶性を向上するために、光分解性構造と反応基との間に、PEGオリゴマーやジメチルリジン骨格を挿入したのもも合成した。

また、本技術を他の刺激応答性に拡張するために、還元剤分解性リンカーや、超音波応答性超分子リンカーの合成も行った。

(3) SA修飾ケージドタンパク質 PEGオリゴマーを介して光分解性のニトロフェニル構造とビオチン基とをつないだビオチン

化光分解性リンカーを、標的タンパク質に修飾し、ゲル濾過法により精製した。得られた修飾タンパク質に大過剰のSAを混ぜ、タンパク質表面に導入したビオチンとの相互作用を介して、タンパク質表面をSAで被覆した。標的タンパク質としては、植物由来の毒性タンパク質であるサポリン(Sap)と、モデル薬物であるドキシソルピシン(Dox)を修飾したトランスフェリン(Dox-Tf)を用いた。

市販のタンパク質導入試薬を用いてヒト子宮頸癌HeLa細胞にケージドSapを導入し、細胞内での光活性化を試みた。光照射の有無による細胞生存率の違いを定量的に評価した。また、ケージドDox-TfをHeLa細胞培養液に加え、培養液中での光活性化を試みた。同様に、光照射後の細胞生存率を評価した。

(4) 光分解回収型 PEGylation 法 光分解性のニトロフェニルリンカーを介して分子量5000のPEG鎖を修飾し、透析法によってPEG化タンパク質を精製した。濁度測定により、PEG修飾による熱安定性の向上(凝集抑制)を評価した。モデルタンパク質として、ニワトリ卵白リゾチーム(HEL)を用い、PEG修飾前後での溶菌活性の変化を定量的に評価した。その後、光照射によるPEG鎖のタンパク質表面からの脱離をSDS-PAGEで確認し、光照射前後での活性の変化を同様に評価した。また、PEG鎖の末端にビオチンを導入し、光脱離後にSA修飾磁気ビーズを用いて遊離したPEG鎖の回収を試みた。遊離PEG鎖の除去は、吸光測定によって確認した。

(5) 光溶解性タンパク質凝集体 上記のビオチン化光分解性リンカーを導入したタンパク質に対して、適当な等量のSAを加えることにより、SA4量体を介して標的タンパク質の凝集体を調製した。SAを添加し攪拌後、直ちに大過剰のビオチンを添加し、凝集体の成長を止めた。標的タンパク質ごとに凝集体形成効率が最も高いSAの等量を最適化した。凝集体形成効率は、上清に溶存している標的タンパク質の量をSDS-PAGEによって定量し、最も溶存量が少ないものを最適とした。得られた凝集体に光照射を施し、リンカーの光分解に伴う凝集体の溶解を評価した。光照射後に、上清に放出される標的タンパク質の量をSDS-PAGEおよび活性測定によって定量した。

標的タンパク質としては、HELおよび蛍光修飾Tf、Dox-Tf、Sapを用いた。光溶解性HEL凝集体の微小化法として、w/oマイクロエマルジョン法を用いた。得られた微小化凝集体のサイズを、動的分散法(DLS)および透過型電子顕微鏡(TEM)により評価した。同様に、光溶解性Sap凝集体のサイズも評価した。さらに、蛍光標識SAを用いて調製した光溶解性Sap凝集体をマウスの尾静脈に注射し、マウス全身へ血流に乗って送達される様子をIn vivo imaging system (IVIS)を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) SA 修飾ケージドタンパク質 水溶性の高いテトラ PEG リンカーを導入することにより、ビオチン化光分解性リンカーの水溶性を大きく向上することに成功した。その結果、修飾タンパク質の水溶性も大きく向上し、修飾後の凝集を抑制でき、タンパク質への光分解性リンカーの修飾量も大幅に向上した(図1)。

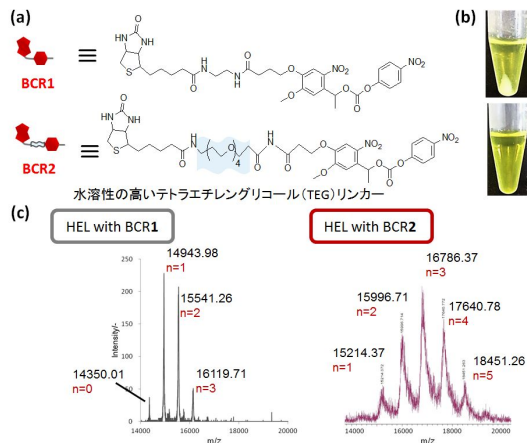


図1 ビオチン化光分解性リンカーへの TEG リンカー導入 (a) TEG 導入前のリンカー (BCR1) と TEG 導入後のリンカー (BCR2) の構造式。(b) BCR1 を修飾した HEL の水溶液 (上) と BCR2 を修飾した HEL の水溶液 (下) の写真。(c) BCR1 および BCR2 を修飾した HEL の MALDI-TOF MS スペクトル。

水溶性が高く修飾量が多い BCR2 を用いて Sap を修飾し、SA との複合体を作成した。タンパク質導入試薬 Bioporter を用いて、このケージド Sap を細胞内に導入した。この際、蛍光標識 Sap と蛍光標識 SA を用い、共焦点走査型レーザー顕微鏡 (CLSM) によって蛍光観察を行ったところ、Sap と SA に標識したそれぞれの色素の蛍光が細胞内の同一の場所から観察されたことより、細胞内への導入が確認された。そこで、光 (365 nm, 1 J/cm²) を照射し、48 時間後の細胞生存率を定量したところ、ケージド Sap を導入して光を照射した場合のみ、未処理の Sap を導入した場合と同様の低い細胞生存率 (40%以下) が確認された(図2)。これより、細胞内で光依存的な活性化が可能であることが確認された。

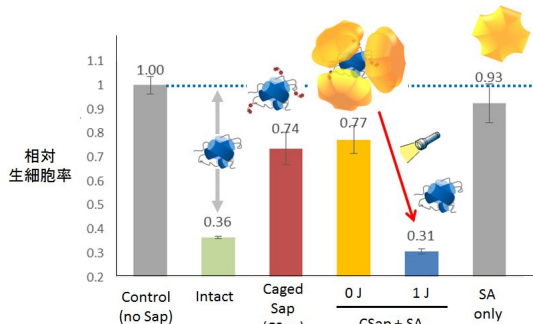


図2 ケージド Sap 導入細胞の生細胞率

同様にケージド Dox-Tf を細胞培養液に加えて光照射を施したところ、光依存的な細胞生存率の低下が確認された。これは、光照射によって Dox-Tf が細胞表面の Tf 受容体に認識されるようになり、細胞内に取り込まれて Dox を放出したことに因ると考えられる。実際に、光照射を施した場合のみ、アポトーシスによって収縮した細胞内から Dox の赤色蛍光が確認された(図3)。このように、SA 修飾ケージドタンパク質は、細胞内や細胞表面で光活性化され、選択的にその機能を発揮することが示された。

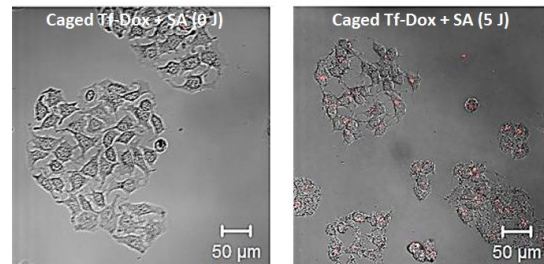


図3 ケージド Dox-Tf を添加した細胞の CLSM 画像 (左) 光照射無。(右) 光照射有 (5 J/cm²)

(2) 光分解回収型 PEGylation 法 モデルタンパク質として HEL を用いたところ、光分解性の PEG 化試薬を 25 等量以上作用させることによって、ほぼ全ての HEL を PEG 化できることが SDS-PAGE により示された(図4)。

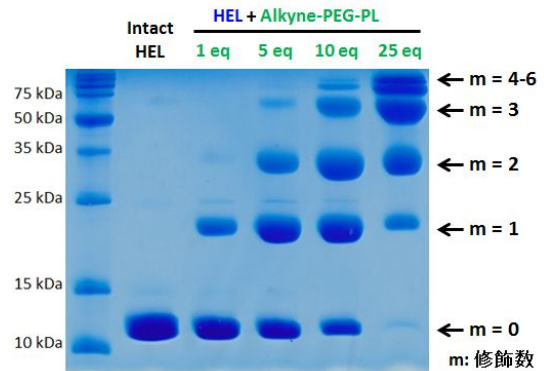


図4 種々の等量で PEG 化した PEG 化 HEL の SDS-PAGE 結果

そこで、この PEG 化 HEL 水溶液を昇温し、熱変性およびそれに伴う凝集体形成を濁度測定によって評価したところ、十分に PEG 化を施した HEL は、極めて安定であり 90 以上でも全く凝集しないことが示された(図5a, b)。一方で、このように高度に安定化した PEG 化 HEL は、全く活性を有しないことも明らかになった。これは、高高い PEG 鎖を修飾することにより、HEL 表面が被覆されて凝集が完全に抑制されるとともに、活性発現に必要な活性部位も遮蔽されてしまうことを示唆する。そこで、次に、光照射を施したところ、PEG 鎖が脱離し、光依存的に活性が回復することが示された(図5c)。

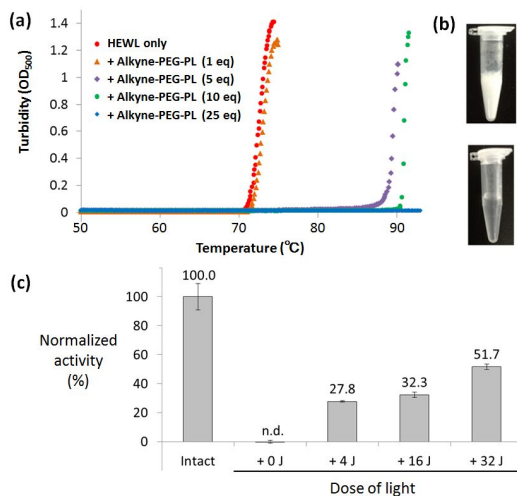


図5 PEG化HELの昇温凝集実験と光依存的な活性化 (a) 図4で示した様々な等量でPEG化したHELの昇温時の濁度。(b) 未処理のHEL水溶液(上)と25等量でPEG化したHEL水溶液(下)の高温処理後の写真。(c) 25等量でPEG化したHELの光照射後の相対細菌活性。

この光分解可能な高度PEG化技術は、タンパク質医薬品の保管・運搬時の安定化技術として極めて有望である。そこで、ベッドサイドで光照射によってPEGを脱離させて再活性化した後、直ちに患者に投与できるように、脱離したPEG鎖を簡単に除去する技術も開発した。具体的には、PEGの末端にビオチン基を導入し、光照射後にSA修飾磁気ビーズで処理することにより、PEG鎖が除去できることが、吸光測定によって確認された。

(3) 光溶解性タンパク質凝集体 上記のSA修飾ケージドタンパク質を調製時に、SAの添加量を偶々減らした際、凝集体の形成を発見した。そこで、この手法を用いて光溶解性タンパク質凝集体(Photodegradable protein aggregate: P-Agg)を調製する方法を開発した。HELをモデルとして最も凝集体形成効率の高い比率を目視とSDS-PAGEにより調べた。その結果、BRC2を平均3個程度修飾したHELでは、1対1の割合でSAと混ぜることにより、ほぼ全ての修飾HELが凝集体に含まれ、上清には全く残らないことが分かった(図6)

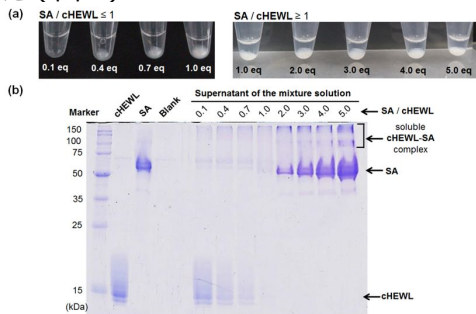


図6 BCR2修飾HELとSAとを用いた光溶解性HEL凝集体の形成 (a) 種々の割合で混

ぜて遠心分離操作を施した際のチューブの写真。(b) 凝集体形成および遠心操作後の上清のSDS-PAGE結果。

得られた光溶解性HEL凝集体の懸濁液に光照射を施し、遠心分離操作後に目視および上清のSDS-PAGEによって凝集体の光溶解を確認した。その結果、光依存的に凝集体が溶解し、上清に未修飾の活性HELが放出されることを確認した(図7)。

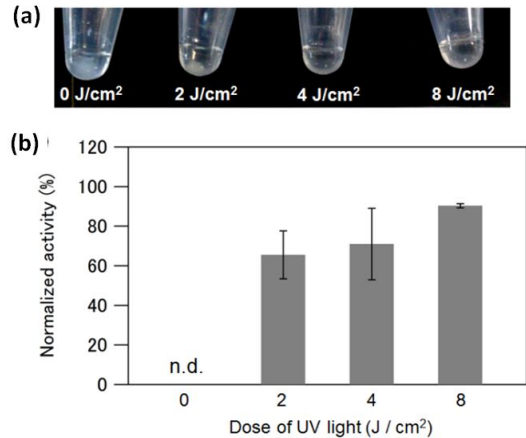


図7 光溶解性HEL凝集体の光依存的な溶解 (a) 種々の光量を照射後の凝集体の写真。(b) 光照射後の上清に放出されたHELの細菌活性を定量化した結果。

同様の方法でDox-TfのP-Aggを作成した。上記のSA修飾ケージドDox-Tfと同様に培養液に添加し、光照射に応じた細胞死誘導が可能かどうかを調べた。その結果、光照射(8 J/cm²)時のみ、Dox-Tfを添加した場合と同様の細胞死誘導を確認した(図8)。

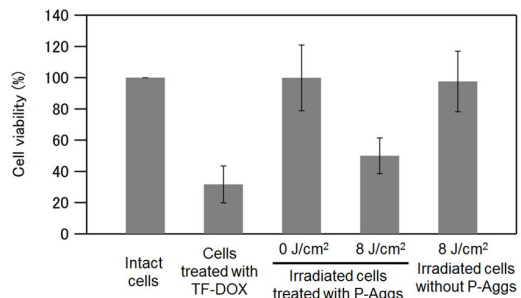


図8 光溶解性Dox-Tf凝集体を用いた光依存的な細胞死誘導。

同様の方法でSapのP-Aggを作成したところ、極めて微小な数10 nmの凝集体が形成されたことが、DLSおよびTEMで示された(図9a)。そこで、市販のタンパク質導入試薬を用いてこのナノ凝集体を細胞内に導入し、光照射の有無による細胞生存率の違いを評価した。その結果、P-Aggを導入して光照射(3 J/cm²)を施すことによって、大きく細胞生存率を低下させられることが示された(図9b)。また、蛍光標識を施したSapのP-Aggをマウスの尾静脈から注入し、血中安定性を確認し

た。その結果、数時間に渡って全身に滞留することが確認され、コンパクトな凝集体構造がタンパク質の血中滞留性を向上している可能性が示唆された。

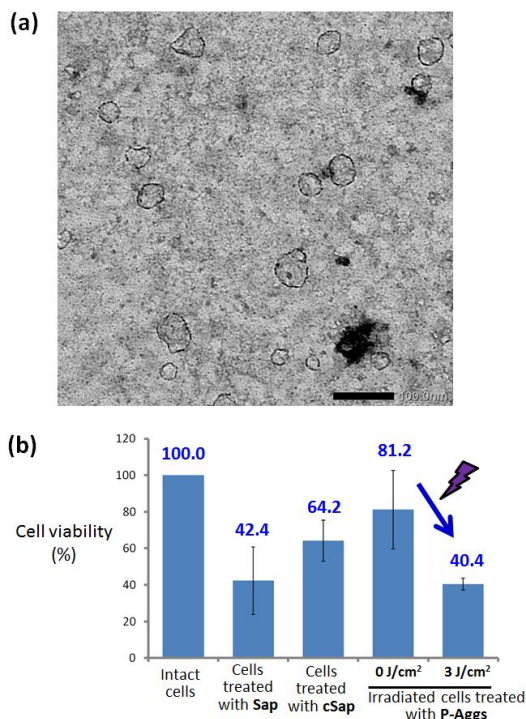


図9 光溶解性 Sap 凝集体の光依存的な溶解と細胞毒性 (a) 光溶解性 Sap 凝集体の TEM 像。(b) 光照射の有無による細胞生存率の違い。

以上のように、我々が開発した嵩高いケーシング技術を用いて、タンパク質を光応答性に変換でき、細胞内や細胞表層で光活性化可能であることを示した。また、研究計画通りに、嵩高い保護基を PEG 鎖にすることで、タンパク質を高度に安定化し、かつ、投与直前に活性体に変換できる技術を開発することに成功した。この技術は、幅広いタンパク質性医薬品への応用が期待され、独自の PEG 回収技術と併せて、特許出願も行った。さらに、本研究の開発途中で、光溶解性タンパク質凝集体の調製法を偶然見出し、生体内での安定性も高く、望みのタイミングで光を照射した時にだけ活性タンパク質を大量に放出できる技術として、その萌芽的な研究結果を得ることができた。

これ以外にも、当初の計画に従って、還元剤で切断されるリンカーの合成や、超音波照射によって分断される超分子リンカーの開発も行い、また本研究を進める過程で、要素技術として光依存的にタンパク質を細胞内に導入する基礎技術や、非共有結合的な相互作用でタンパク質表面を PEG 化する技術などについても成果が得られた。

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 4 件)

(1) JK. Minamihata, Y. Maeda, S. Yamaguchi, W. Ishihara, A. Ishiwatari, S. Takamori, S. Yamahira, T. Nagamune, Photosensitizer and Polycationic Peptide-Labeled Streptavidin as a Nano-Carrier for Light-Controlled Protein Transduction, *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 630-636, 2015.

(2) A. Ishiwatari, S. Yamaguchi, S. Takamori, S. Yamahira, K. Minamihata, T. Nagamune, Photolytic protein aggregates: versatile materials for controlled release of active proteins, *Adv. Health. Mater.*, **5**, 1002-1007, 2016.

(3) E. Yamamoto, S. Yamaguchi, T. Nagamune, Protein refolding is improved by adding nonionic polyethylene glycol monooleyl ethers with various polyethylene glycol lengths, *Biotechnol. J.*, DOI: 10.1002/biot.201600689.

(4) 山口 哲志, タンパク質デリバリーのための光溶解性タンパク質凝集体, *月刊「細胞」*, **49**, 615-619, 2017.

〔学会発表〕(計 19 件)

(1) 山口 哲志, 石渡 晟, 山平 真也, 南畑 孝介, 長棟 輝行, 「光溶解性タンパク質凝集体微粒子の開発」, 第 25 回バイオ・高分子シンポジウム, 東京工業大学大岡山キャンパス, 神奈川, 2015 年 7 月 24 日

(2) 山口 哲志, 石渡 晟, 山平 真也, 南畑 孝介, 岡本 晃充, 長棟 輝行, 「タンパク質デリバリーのための光溶解性タンパク質凝集体の開発」, 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム, 熊本大学黒髪南キャンパス, 熊本, 2015 年 9 月 10 日

(3) 山口 哲志, 金兵 知毅, 塩田 英史, 岡本 晃充, 「光分解性 PEGylation 法のタンパク質安定化と再活性化への応用」, 第 67 回日本生化学会大会, 城山観光ホテル, 鹿児島, 2015 年 10 月 28 日

(4) 山口 哲志, 石渡 晟, 山平 真也, 南畑 孝介, 長棟 輝行, 「タンパク質デリバリーのための光溶解性タンパク質凝集体微粒子」, 化学工学会第 81 年会, 関西大学千里山キャンパス, 大阪, 2016 年 3 月 14 日

(5) 金兵 知毅, 山口 哲志, 塩田 英史, 岡本 晃充, 「タンパク質の光分解回収型 PEGylation 法の開発」, 日本化学会第 96 春季年会, 同志社大学京田辺キャンパス, 京都, 2016 年 3 月 26 日

(6) 山口 哲志, 「生命現象の操作と可視化のための刺激応答性分子ツール」, 日本化学会第 96 春季年会, 同志社大学京田辺キャンパス, 京都, 2016 年 3 月 26 日

(7) S. Yamaguchi, S. Yamahira, T. Nagamune, A. Okamoto, 「Photo-responsive chemical tools for single-cell manipulation and analysis」, 26th IUPAC international symposium on

photochemistry, 大阪市民中央公会堂, 大阪, 2016年4月7日

(8) 東 昂太郎, 山口 哲志, 東 隆, 岡本 晃充, 「タンパク質デリバリーを志向した超音波ヒドロゲル」, 化学工学会第48回秋季大会, 徳島大学常三島キャンパス, 徳島, 2016年9月7日

(9) 山口 哲志, 石渡 晟, 南畑 孝介, 山平 真也, 岡本 晃充, 長棟 輝行, 「細胞内薬剤デリバリーのための光溶解性トランスフェリン凝集体の開発」, 第68回日本生物工学会大会, 富山国際会議場, 富山, 2016年9月28日

(10) 金兵 知毅, 山口 哲志, 塩田 英史, 岡本 晃充, 「PEG鎖長の異なる光分解回収型PEGylation試薬の合成と評価」, 第68回日本生物工学会大会, 富山国際会議場, 富山, 2016年9月29日

(11) S. Yamaguchi, A. Ishiwatari, S. Yamahira, K. Minamihata, T. Nagamune, 「Photolytic Protein Aggregates for Controlled Release of Active Proteins」, 17th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2016), Melbourne Convention Center, Melbourne, Australia, 2016年10月26日

(12) K. Higashi, S. Yamaguchi, T. Azuma, A. Okamoto, 「Supramolecular crosslinked hydrogel for ultrasound-responsive protein release」, The 22nd Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC2016), 宮崎シーガイアリゾート, 宮崎, 2016年10月28日

(13) S. Yamaguchi, A. Ishiwatari, K. Minamihata, A. Okamoto, T. Nagamune, 「Photolytic protein aggregates for controlled release of active proteins」, The 11th SPSJ International Polymer Conference (IPC2016), 福岡国際会議場, 福岡, 2016年12月14日

(14) 東 昂太郎, 山口 哲志, 東 隆, 岡本 晃充, 「超音波タンパク質デリバリーシステムを志向した超分子架橋ヒドロゲルの改良」, 日本化学会第97春季年会, 慶応大学日吉キャンパス, 神奈川, 2017年3月16日

(15) 山口 哲志, 金兵 知毅, 長棟 輝行, 岡本 晃充, 「ポリエチレングリコール鎖との相互作用設計によるタンパク質の凝集制御」, 第66回高分子討論会, 愛媛大学城北キャンパス, 愛媛, 2017年9月21日

(16) 山口 哲志, 「光応答性分子ツールを用いた細胞操作および解析」, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第36回研究会, 桐生市民文化会館, 群馬, 2017年10月4日

(17) S. Yamaguchi, 「Photo-responsive chemical tools working on cell surfaces」, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions 2017, 名古屋大学東山キャンパス, 愛知, 2017年11月30日

(18) 山口 哲志, 金兵 知毅, 岡本 晃充, 長棟 輝行, 「タンパク質性医薬品の安定化のための嵩高い光分解性高分子保護基の開発」, 化学工学会第83年会, 関西大学千里山キャンパス, 大阪, 2018年3月13日

(19) 山口 哲志, 山本 悦司, 長棟 輝行, 「タンパク質リフォールディングにおけるポリエチレングリコール脂質のタンパク質凝集抑制効果」, 化学工学会第83年会, 関西大学千里山キャンパス, 大阪, 2018年3月14日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: タンパク質を安定化するための化合物

発明者: 山口 哲志, 岡本 晃充, 塩田 秀史

権利者: 国立大学法人東京大学

種類: 特許出願

番号: 2015-179135

出願年月日: 2015年9月11日

国内外の別: 国内

名称: タンパク質を安定化するための化合物

発明者: 山口 哲志, 岡本 晃充, 塩田 秀史

権利者: 国立大学法人東京大学

種類: PCT

番号: JP2016-076697

出願年月日: 2016年9月9日

国内外の別: 国外

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 哲志 (YAMAGUCHI SATOSHI)

東京大学・先端科学技術研究センター・講師

研究者番号: 80398106

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()