

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07840

研究課題名(和文) 病原タンパク質の除去を目指した基質・細胞内局在改変型ユビキチンリガーゼの開発

研究課題名(英文) Development of the modified ubiquitin ligase to degrade of a pathogenic protein

研究代表者

立松 健司 (Tatematsu, Kenji)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：00322743

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)：任意の病原タンパク質を標的とする改変型ユビキチンリガーゼの基質認識部位として、Protein Aの抗体結合ドメインを骨格に持ち、一部のアミノ酸残基をランダム化したライブラリーからアフィボディを選抜することを目指して、アフィボディ遺伝子ライブラリーの構築を行った。一方で改変型ユビキチンリガーゼのデリバリーシステムとして、HBVエンベロープタンパク質からなる粒子(BNC)の改変を試み、抗体結合型のLG-BNCを酵母で発現精製した。またウイルス様粒子として改変型BNCを大腸菌で発現精製することに成功し、これが酵母で発現したLG-BNCの代替となりえることを見出した。

研究成果の概要(英文)：As a substrate recognition site of a modified-ubiquitin ligase targeting a pathogenic protein, we aimed to screen an affibody from a library consisted of an antibody binding domain of protein A. Affibody-gene library was constructed from protein A of which some amino acid residues was randomized. On the other hand, as a modified ubiquitin ligase-delivery system, we modified the HBV envelope protein derived particle (bio-nanocapsule: BNC), and resulting antibody-associating BNC, LG-BNC, was expressed in yeast cells and purified. We also succeeded in expressing modified BNC as virus-like particles in E. coli. This particle might be a substitute for LG-BNC expressed in yeast.

研究分野：細胞工学

キーワード：病原タンパク質 タンパク質分解 ユビキチンシステム ドラッグデリバリーシステム 一細胞

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン・プロテアソームシステムによるタンパク質分解系は、真核生物における様々なタンパク質の新陳代謝に関与している。本システムの中核的役割をになうユビキチンリガーゼおよび同複合体は、高度な基質認識によりユビキチン付加を行いプロテアソームによる積極的な分解を促す。最近、本システムによる病原タンパク質の積極的な除去を目指して、病原タンパク質結合能を付与したユビキチンリガーゼが創製されている(文献1)。しかし、病原タンパク質の認識に内在性結合タンパク質が用いられているため、様々な病原タンパク質に対応できる汎用性の高い改変型ユビキチンリガーゼは、まだ実現していない。さらに、病原タンパク質は特定の細胞内画分において機能を発揮することが多いことから、細胞内局在シグナルを搭載した改変型ユビキチンリガーゼは、一層有効であると考えられるが、その実現例はまだない。

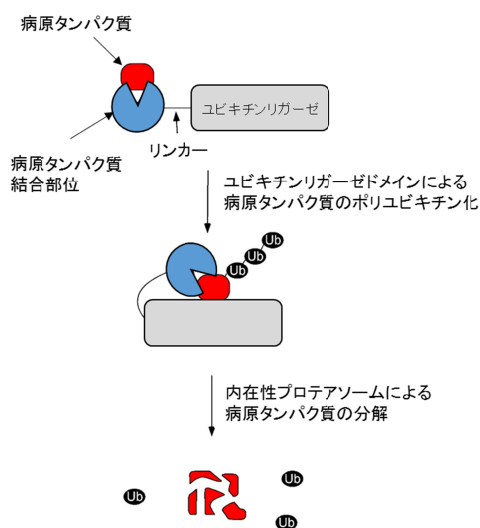


図1 改変型ユビキチンリガーゼの作用機序

2. 研究の目的

本研究は、上記背景の状況を鑑み、特定の細胞内画分に存在する任意の病原タンパク質を積極的に分解できる、全く新しい治療用分子の創製を目指す。がん原遺伝子産物やウイルスタンパク質のような病原タンパク質に特異性をもつペプチドをライブラリーからスクリーニングし、これをユビキチンリガーゼと融合したもの(バイオミサイル)を作成する。これを病変細胞に特異性をもつバイオナノカプセルで細胞へ導入する。病原タンパク質はバイオミサイルによりユビキチン化され、内在性プロテアソームにより速やかに分解されることが期待される。

3. 研究の方法

アルブミンをモデル標的とする。すでに取得済みの抗アルブミン一本鎖抗体とユビキ

チンリガーゼを融合したものを用いて、in vitro で研究コンセプトを検証する。並行して、病原タンパク質に特異的なアフィボディをスクリーニングして改変型ユビキチンリガーゼを構築する。培養細胞へタンパク質導入試薬を用いて改変型ユビキチンリガーゼタンパク質を培養細胞に導入して検証する。また、細胞内導入法については、バイオナノカプセルを用いた方法も検討する。最終的には、担癌マウスを用いて in vivo でバイオナノカプセルによる送達実験を実施し、抗がん効果についての検討を目指した。

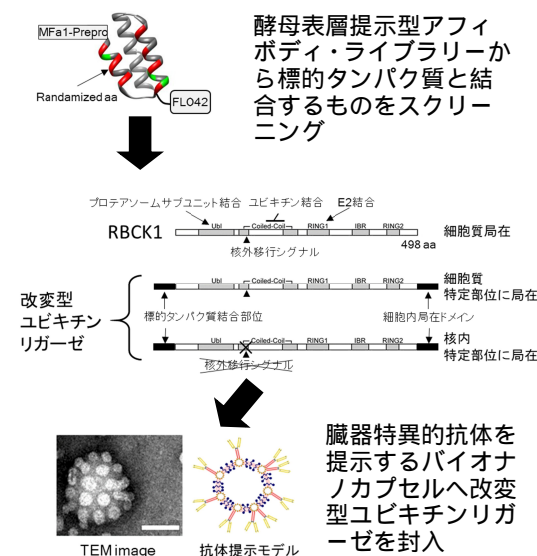


図2 研究コンセプト

4. 研究成果

アフィボディ・ライブラリーの構築

病原タンパク質を選択的に排除する改変型ユビキチンリガーゼのモデル実験系として、抗ヒト血清アルブミン(HSA)一本鎖抗体(Fv)とRBCK1の融合タンパク質Fv-RBCK1を大腸菌で発現精製して、in vitro においてHSAが特異的にユビキチン化されるかどうか検討した。まずFv-RBCK1を大腸菌において発現、精製した。次にin vitro においてHSAを基質としてユビキチン化実験を行ったが、HSAのユビキチン化が観察されなかった。

任意の病原タンパク質をターゲティングするユビキチンリガーゼの基質認識部位として、Protein Aの抗体結合ドメインを骨格にもち

一部のアミノ酸残基をランダム化したアフィボディ・ライブラリーを用いることにした。アフィボディ・ライブラリーの合成遺伝子をT7Select(Novagen)のベクターに組み込み、試験管内パッケージング後、大腸菌ホストに感染して、T7ファージ表面にアフィボディ・ライブラリーを発現するファージライブラリーを作製した。ファージの独立クローン数が100 mlの大腸菌培養スケールにおいて3万程度であった。6アミノ酸残基をランダム化したライブラリーとしては過小で

あり、スクリーニング対象として不適であった。今回用いた T7 ファージライブラリーは、 capsid g10 タンパク質の C 末端にアフィポディ・ライブラリーを融合して発現するものであるが、アフィポディ・ライブラリーが capsid の形成の影響を及ぼしていると考えられた。

改変型ユビキチンリガーゼのデリバリーシステム作製

改変型ユビキチンリガーゼを搭載し、任意の細胞及び臓器を標的とする DDS ナノキャリアとして、B 型肝炎ウイルスエンベロープ(図 3) に由来する抗体結合型バイオナノカプセルを使用する。L タンパク質、G タンパク質

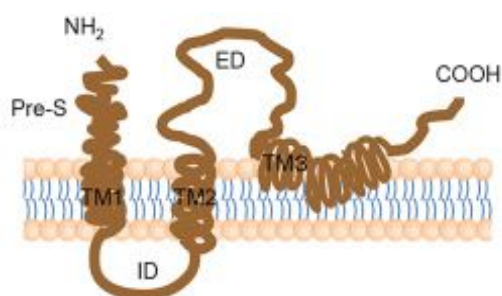


図 3 B 型肝炎ウイルスエンベロープ

の抗体結合部位をもつ新規の LL-BNC と LG-BNC を作製し(図 4 A - C) 既存の ZZ-BNC について比較検討を行った。それぞれの BNC に抗 EGF レセプター抗体を提示させたものを作製し、EGF レセプターを高発現する A431 細胞の培地中に添加したところ、LL-BNC は A431 細胞の高効率に取り込まれた(図 4)

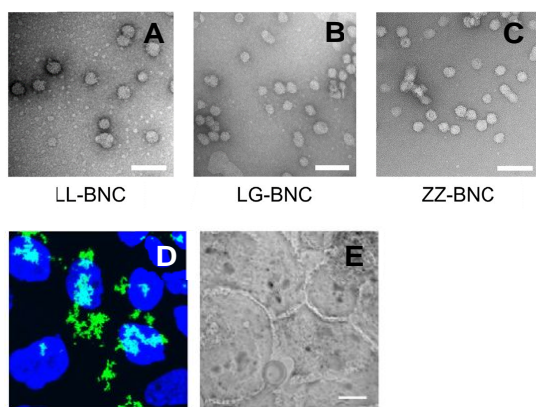


図 4 各 BNC の透過型電子顕微鏡像(A - C) bars = 100 nm。抗 EGFR 抗体を提示させた LL-BNC の A431 細胞内取り込み(D, E)D. 蛍光顕微鏡像 LL-BNC (緑) 核(青)。E. D と同視野の透過像 bar = 10 μ m。

LG-BNC にリポソームを融合した virosome を作成することにも成功した。これによりリポソーム側にまず改変型ユビキチンリガーゼを封入し、LG-BNC と融合することにより標的部位への送達が可能となる。しかしながら

LL-BNC, LG-BNC は、ともに出芽酵母で発現させており生産性が低かった。そこで大腸菌で HBV のエンベロープタンパク質の発現を試みた。まず、HBV エンベロープタンパク質の様々な欠失変異体を作成し、エンベロープタンパク質の 3 つの膜貫通部位のうち、2 番目膜貫通部位から 3 番目膜貫通部位前半(237aa~335aa)をもつ変異体(NC, 図 5)を、自発的な粒子形成を示す最短の変異体として見出した。次に大腸菌での発現を改善するために N 末端側に基づく改変を NC 変異体に加えたもの(m NC, 図 5)を大腸菌で発現したところ、大腸菌において効率的に粒子として発現して精製にも成功した。この粒子は直径が約 28 nm であり、がん組織へのドラッグデリバリーに適したサイズであった。また C 末端部分が粒子の外側にあるために、C 末端側に Protein L および G を融合すれば、酵母で発現精製した LG-BNC の代替となりえることも見出した(図 6)。

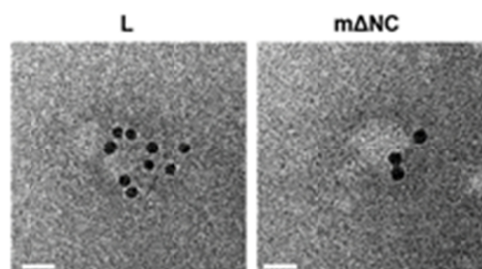


図 6 L および m NC 粒子の免疫電子顕微鏡像抗 S 抗原と結合した金コロイドで染色した。

<引用文献>

1. Prabha CR. et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2012) 96, p1111-23

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Li Hao, Kenji Tatematsu, Masaharu Somiya, Masumi Iijima, and Shun'ichi Kuroda. Development of a macrophage-targeting and phagocytosis-inducing bio-nanocapsule-based nanocarrier for drug delivery. *Acta Biomater.* 査読有, 2018 2018 **73**, 412-423. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.04.023.

立松健司、黒田俊一 全自動 1 細胞解析単離装置 - 開発経緯と応用事例 -, 科学と生物 査読無, 2017 年, 55 巻, 684-689

Li Hao, Keisuke Onbe, Qiushi Liu, Masumi Iijima, Kenji Tatematsu, Seno Masaharu, Hiroko Tada, and Shun'ichi Kuroda. Synthesis and assembly of

図 5 NC および m NC の構造点線は、L タンパク質全長を示す。

Hepatitis B virus envelope protein-derived particles in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有, 2017 **490**, 155-160.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.06.015

Kenji Tatematsu, Masumi Iijima, Nobuo Yoshimoto, Tadashi Nakai, Toshihide Okajima, and Shun'ichi Kuroda. Bio-nanocapsules displaying various immunoglobulins as an active targeting-based drug delivery system. *Acta Biomater.* 査読有, 2016 **35**, 238-47
DOI: 10.1016/j.actbio.2016.02.010

〔学会発表〕(計4件)

李昊、立松健司、黒田俊一、能動的標的化能をもつ抗体提示型バイオナノカプセルの高効率細胞内取り込みメカニズム、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年、京都女子大学(京都市)

Kenji Tatematsu and Shun'ichi Kuroda Bio-nanocapsules Displaying Various Immunoglobulins as an Active Targeting-based Drug Delivery System. The 20th ISIR International Symposium (国際学会), 2016 年, Knowledge Capital congress convention center (Osaka, Japan)

立松健司、李昊、飯嶋益巳、黒田俊一、様々な抗体を提示可能なバイオナノカプセルによる能動的標的化 DDS ナノキャリアの開発、第 68 回日本生物工学会大会、2017 年、富山国際会議場(富山市)

立松健司、岡本一起、飯嶋益巳、黒田俊一、バイオナノカプセルを用いた抗炎症タンパク質 MTI-II の生体内ピンポイント送達法の開発、第 67 回日本生物工学会大会、2015 年、城山観光ホテル(鹿児島市)

〔図書〕(計1件)

立松健司、黒田俊一、キャノン財団、ナノテクノロジーが拓く 未来の医療、2017 年、91-113

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/smb/outline.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立松 健司 (TATEMATSU, Kenji)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号: 00322743

(2) 研究分担者

黒田 俊一 (KURODA, Shun'ichi)
大阪大学・産業科学研究所・教授
研究者番号: 60263406

藤井 郁雄 (FUJII, IKUO)
大阪府立大学・理学系研究科・教授
研究者番号: 70189984

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし