

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目:基盤研究(B)

研究期間:2007~2008

課題番号:19390467

研究課題名(和文) TLRシグナル抑制因子を用いた蛋白質療法の開発に関する基礎的研究

研究課題名(英文) A fundamental study about development of the protein therapy using suppressors of TLR signaling

研究代表者

花澤 重正 (HANAZAWA SHIGEMASA)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号:60060258

研究成果の概要:細胞膜透過性 SOCS-1,3 および IRAK-M 蛋白質の大腸菌発現系(pET28a)の構築を試みた。SOCS-1 は極めて低発現であった。SOCS-3 は良好に発現し、精製及びリフォールディング系も確立した。この精製タンパク質は本来の SOCS-3 機能を保持していたことから、発現系の確立に成功した。IRAK-M の発現は良好であったが、大腸菌内で部分分解が見られ、完全精製に至らなかった。また、SOCS-3 と DP-1 の相互作用について、その詳細な相互作用領域と組織内での相互作用を確認した。

交付額

(金額単位:円)

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 7,600,000  | 2,280,000 | 9,880,000  |
| 2008 年度 | 6,900,000  | 2,070,000 | 8,970,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:歯学・形態系基礎歯科学

キーワード:口腔細菌学

## 1. 研究開始当初の背景

サイトカインシグナル抑制因子 SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling) は 1997 年に岸本博士、吉村博士、Hilton 博士らにより発見されたサイトカイン誘導性のタンパク質である。現在までに SOCS では、8つの遺伝子ファミリーが知られている。このうち SOCS-1,3 は JAK-STATシグナル伝達系において JAK キナーゼの活性を阻害することにより、そのシグナル伝達機構を抑制することが知られている。SOCS 自体の発現も STAT により誘導されることから、この抑制機構はネガティブフィードバック機構で

ある。また、SOCS-1,3 は LPS の TLR(Toll-like receptor)を介したシグナル伝達系にも抑制的に機能する。また、SOCS-1,3 は癌組織において、自身の遺伝子プロモーターのメチル化による発現抑制が見られることから、腫瘍抑制因子と考えられている。本研究では、2001 年より、SOCS-3 の活性を調節可能な相互作用因子の探索と同時に、新規な SOCS-3 の分子機構を発見する目的で、SOCS-3 相互作用因子の検索を行ない、細胞周期調節性の転写因子 DP-1 を見出していた。しかし、DP-1 は SOCS-3 と相互作用すると、SOCS-3 の JAK キナーゼ抑制能を

強力に阻害した。このような折、Hawiger 博士らのグループにより、細胞膜透過性の MTM (Membrane translocating motif) タグ融合 SOCS-3 がサイトカインシグナル抑制能 (JAK キナーゼ抑制能; STAT1 がリン酸化されることを抑制) を保持すること、LPS シグナルの抑制因子としてマウス個体内で機能することが報告された (Jo D, Hawiger J et. al. Nature Medicine 2005; 11: 892-8)。その他の研究においても細胞膜透過性のタンパク質や核酸の報告が徐々に増え、今後この方法は重要なドラッグデリバリーシステムの一つとして大きく発展する分野だと考えられた。本研究室でも、細胞膜透過性の SOCS-1, 2, 3 の大腸菌による発現系の構築を開始した。また、IRAK-M (Interleukin-1 receptor associated kinase M) についても着目した。IRAK-M は、はじめ IRAK と相同性の高い分子として単離されたが、解析の結果 TLR シグナル伝達系による NF- $\kappa$ B の活性化を抑制する働きが明らかとなり、自然免疫の抑制機構に重要な役割を果たしていることが判明した (Su J. et. al. Cell Signal. 2007;19:1596-601.)。そこで、IRAK-M についても発現系の構築を開始した。

また、前述した SOCS-3 と DP-1 の相互作用については、その詳細な相互作用領域や、SOCS-3 と DP-1 アイソフォーム (DP-1 alpha, DP-1 beta) や DP-1 ファミリー (DP-2, DP-3) との相互作用、個体内における相互作用が不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞膜透過性の TLR シグナル抑制因子を投与するタンパク質療法が有効な抗炎症のタンパク質製剤と成り得ると考え、その基礎と成る細胞膜透過性 SOCS-1, 3 及び IRAK-M を産生する大腸菌発現系を構築することを目的とした。また、発現したタンパク質は高精度で高活性を保持していなければならないことから、精製系及びリフォールディング系の開発も目的とした。また、SOCS-3 と DP-1 の相互作用を詳細に解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

細胞膜透過性タグとして MTM を使用することにした。MTM をコードするオリゴ DNA を大腸菌用の発現プラスミド (pET28a) に組み込んだ。この際、目的タンパク質の N 末端側、C 末端側に MTM が融合できるよう 2 つのカセットプラスミドを作成した。目的タンパク質として SOCS-1, 3 及び IRAK-M をコードする cDNA を PCR 法により増幅し、各々の制限酵素で消化後、制限酵素で消化したカセットプラスミドと pET28a そのものに組込んだ。これらのタンパク質を大腸菌 BL21(DE3) で IPTG 誘導により発現させた。封入体に発現したタンパク質を尿素やグア

ニジン塩酸変性条件下において、アフィニティーカラム (ニッケルやコバルトレジン) で精製した。この変性状態の精製タンパク質は、タンパク質変性剤を除去する透析によりリフォールディング (タンパク質の高次構造の巻き戻し) を行なった。このリフォールディングでは再凝集が起こりやすいため、条件検討を重ねた。SOCS-3 については精製、リフォールディングがうまく行ったので、細胞膜透過性の確認と、細胞膜透過後の機能解析を行なった。機能解析は JAK キナーゼの抑制能について STAT3 のリン酸化を指標としたウエスタンブロット解析により行なった。また、我々は SOCS-3 が DP-1 と相互作用することも見出していたので、DP-1 との相互作用についても調べた。SOCS-1, IRAK-M についてはうまく行かない箇所があったため、それぞれ問題箇所について条件検討を行った。

SOCS-3 と DP-1 の相互作用について、相互作用部位を決定するため、SOCS-3, DP-1 共に欠変異体を作成した。これらを用い免疫沈降—ウエスタンブロット法により、相互作用部位の検討を行った。SOCS-3 と DP-1 アイソフォーム (DP-1 alpha, DP-1 beta) の相互作用を調べた。DP-1 ファミリー (DP-2, DP-3) を PCR 法によりクローニングし、SOCS-3 との相互作用を調べた。個体内における SOCS-3 と DP-1 の発現を調べた。両方の発現組織を用い、免疫沈降—ウエスタンブロット法により、相互作用を確認した。

## 4. 研究成果

SOCS-1 は単体、MTM タグを融合したもの共に極めて低発現であった。そこで、宿主の菌体種、誘導物質である IPTG の濃度、誘導温度、エアレーション等について発現条件の検討を行なったが、特に効果はなかった。SOCS-3 は最終濃度 0.1mM の IPTG 誘導で良好に発現した。発現は主に封入体に見られた。この発現した大腸菌を超音波破碎により破碎後、遠心分離により封入体を沈殿させた。この沈殿した封入体を緩衝液で溶解後、遠心分離を行ない、この操作を繰り返すことで封入体の洗浄を進め、精制度は 80% 以上になった。また、さらに変性条件下におけるニッケル又はコバルトレジンによる精製で精制度は 95% 以上になった。次に各種緩衝液による透析により、尿素やグアニジン塩酸等の変性剤を取り除くリフォールディングを行なったが、単なる緩衝液を用いた透析では多くのタンパク質が再凝集した。そこで、界面活性剤の種類や濃度、アルギニンの有無等について条件検討したところ、アルギニン存在下で透析することにより約 20~40% の可溶化度でリフォールディングが可能となった。この精製タンパク質を FITC ラベル後細胞に添加し、共焦点レーザー顕微鏡にて、細胞内への導入を調べたところ、

MTM融合のSOCS-3(N末、C末融合のどちらも)が有意に導入されたことから、融合したMTMの機能は十分であると判断した。また、導入されたSOCS-3のJAK-STATシグナル伝達系におけるJAKキナーゼ抑制能を調べるため、STAT3のチロシン残基のリン酸化を指標としたウエスタンブロット解析を行なったところ、細胞膜透過性SOCS-3は有意にJAKキナーゼ抑制能を示した。また、細胞膜透過性SOCS-3は細胞内のDP-1と相互作用しDP-1活性を阻害した。これらの結果から、我々が開発した細胞膜透過性SOCS-3は本来のSOCS-3機能を保持しており、発現系の確立に成功した。IRAK-M発現は良好であったが、大腸菌内で部分分解が見られ、完全精製に至らなかった。この分解機構を調べるため、発現条件を宿主の菌体種、誘導物質であるIPTGの濃度、誘導温度について検討したが改善効果が見られなかった。また、分解部位の同定にも至らなかった。

SOCS-3とDP-1の相互作用部位については、免疫沈降—ウエスタンブロット解析の結果、DP-1はSOCS-3の156-172アミノ酸領域に相互作用した。また、DP-1のC末端側欠失変異体はHEK293細胞での発現が悪く、免疫沈降が行なえなかったが、酵母Two-hybridスクリーニングで取得出来たDP-1領域から、SOCS-3はDP-1の240-410アミノ酸領域に相互作用部位があると考えられた。

また、SOCS-3はDP-1 WTとDP-3に相互作用したが、DP-1 alpha、DP-1 beta、DP-2とは相互作用しなかった。個体内においてはSOCS-3とDP-1は肺と精巣で発現が見られた。両方の発現組織を用い、免疫沈降—ウエスタンブロット法により、相互作用を確認したところ両組織でSOCS-3とDP-1の相互作用が見られた。

#### 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 3件)

①Chen YR、関根圭輔、田中稔、宮島篤、その他2名、Y-Box Binding Protein-1 Down-Regulates Expression of Carbamoyl Phosphate Synthetase-I by Suppressing CCAAT Enhancer-Binding Protein-Alpha Function in Mice. Gastroenterology. 2009年、査読有り

②舩廣善和、嘉山謙一、福島晶絵、馬場孝治、双津牧雄、上谷能彬、後藤道雄、山口登、花澤重正、SOCS-3 inhibits E2F/DP-1 transcriptional activity and cell cycle progression via interaction with DP-1. The Journal of

Biological Chemistry. 283. 31575-31583.

2008年、査読有り

③山口登、神尾宜昌、福本敏、野中和明、二ノ宮裕三、花澤重正、山下喜久、その他2名 Adiponectin inhibits induction of TNF-alpha/RANKL-stimulated NFATc1 via the AMPK signaling. FEBS Lett. 582:451-456. 2008年、査読有り

[学会発表] (計 8件)

①舩廣善和、佐藤あまね、石黒友理、花澤重正、細胞膜透過性タグ融合サイトカインシグナル抑制因子SOCS-2の大腸菌による発現系の確立、日本農芸化学会、2009年3月29日、福岡

②荒川貴史、舩廣善和、上谷能彬、花澤重正、細胞周期調節性転写因子DP-1のプロテアソームを介する分解機構；その分解制御領域Stabilon及びDegronの同定、日本農芸化学会、2009年3月29日、福岡

③稲垣みずき、舩廣善和、関泰一郎、有賀豊彦、花澤重正、その他4名、遺伝子組換え型細胞膜透過性RAR $\alpha$ の発現系の確立と前骨髄球性白血病細胞に関する分化誘導作用、日本農芸化学会 2009年3月29日、福岡

④尾勝圭、舩廣善和、小島裕久、花澤重正、サイトカインシグナル抑制因子SOCS-7の新規機能の解析；TRIAD3はSOCS-7の新たな相互作用因子である、日本農芸化学会、2009年3月28日、福岡

⑤舩廣善和、双津牧雄、馬場孝治、花澤重正、SOCS-3とDP-1の相互作用による細胞周期調節機構の解析、日本分子生物学会、2008年12月12日、神戸

⑥上谷能彬、舩廣善和、荒川貴史、花澤重正、細胞周期調節性転写因子DP-1のプロテアソーム系を介する自己分解機構、日本分子生物学会、2008年12月12日、神戸

⑦小島裕久、舩廣善和、花澤重正、SOCS-7はNF- $\kappa$ Bシグナル活性化因子TRIP6と相互作用しそのシグナルを負に制御する、日本分子生物学会、2008年12月12日、神戸

⑧双津牧雄、舩廣善和、渡邊希、花澤重正、Erk2によるヒトSOCS-3のS159のリン酸化とJAK-STATシグナル伝達系制御、日本分子生物学会、2008年12月12日、神戸

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称：白血病治療に応用可能な細胞膜透過性タグおよび核移行シグナル融合RAR $\alpha$ タンパク質の大量発現系、精製系の確立

発明者：花澤重正、舩廣善和

権利者：日本大学

種類：

番号：特願 2009-077375

出願年月日：2009 年 3 月 26 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/NA/0006908/profile.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

花澤 重正 (HANAZAWA SHIGEMASA)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60060258

### (2) 研究分担者

大森 喜弘 (OHMORI YSHIHIRO)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：50194311

舩廣 善和 (MASUHIRO YOSHIKAZU)

日本大学・大学院総合科学研究科・講師

研究者番号：00336083

関根 圭輔 (SEKINE KEISUKE)

明海大学・歯学部・助手

研究者番号：00323569

### (3) 連携研究者