

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007 年度 ～ 2008 年度  
 課題番号：19500408  
 研究課題名（和文） Fmoc-NTA-COOH 試薬を用いた  
 混合活性化型蛋白質導入法の開発  
 研究課題名（英文） The development of protein delivery systems  
 based on Fmoc-NTA-COOH reagent  
 研究代表者  
 秋山 暢丈（AKIYAMA Nobutake）  
 東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：00338865

## 研究成果の概要：

細胞膜透過性を有するペプチド配列を用いた蛋白質導入法の新規技術の開発及びその応用方を目的とし、非天然アミノ酸を導入できる試薬を用いての合成法を、特に細胞膜透過配列の検討に着目し改良し、蛋白質導入効率の向上を達成した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：薬物伝達システム・機能性素材・蛋白質導入・糖鎖修飾

## 1. 研究開始当初の背景

Fmoc 化学を用いたペプチド合成装置に用いて、任意の位置に Nitrilotriacetic acid (NTA) 構造を側鎖に持つ非天然型アミノ酸を導入出来る Fmoc-(NTA)-COOH 試薬の作成方法既に開発済みであった。このアミノ酸を導入する事により、得られたペプチドはニッケル、もしくはコバルトイオンを配位する事が出来る。これらのイオンが配位されたペプチドはヒスチジンタグと呼ばれる連続した 6 つのヒスチジンペプチドと結合する事が可能である。

この開発された試薬を用いて、細胞膜透過配列と NTA 基を含むペプチドを合成しうる

事を証明した。また、NTA 基を導入する際の合成は定量的に近く、これらの非天然型アミノ酸を含むペプチド(tat-NTA)の合成および精製手法を開発した。

合成された合成ペプチドを細胞内への蛋白質導入の試薬として利用する予備実験として、核移行シグナルとヒスチジンタグ、もしくはヒスチジンタグのみを N 末端領域に持つ  $\beta$ -Galactosidase 蛋白質を遺伝子組み換え工学により作成し、この蛋白質と tat-NTA、ニッケル塩を高イオン強度下で混合することにより、非共有結合により選択的に結合させ、生理的食塩濃度に調整した後に、細胞に添加することにより、 $\beta$ -Galactosidase 活性

を細胞に付加しうる事は判明していたが、導入効率の観点からの改善が必要とされた。

## 2. 研究の目的

蛋白質の新しい導入法として上述のペプチド合成試薬を活用するためには、細胞導入効率の改善および導入すべき蛋白質の作成、およびその評価法の開発が特に急がれ、また実際への応用例を検討する必要がある。

以上の観点から上述のペプチド合成試薬を用いた取り扱いが安全な高効率な新しい蛋白質導入手法の確立を目指し、技術的改良および一般的な使用に耐えうる普遍性の証明を本研究課題の目的とした。

## 3. 研究の方法

研究開始時に  $\beta$ -Galactosidase 蛋白質を細胞に導入しうる事が判明していた、蛋白質導入試薬、ニッケル塩、およびヒスチジンタグを混合することにより、複合体を形成し細胞に添加するというプロトコルで実験を本研究課題でも基礎とした。しかし、その評価方法として  $\beta$ -Galactosidase 蛋白質は高効率で検出出来る利点はあるが、膜透過ペプチドを含む蛋白質の特性である蛋白質変性作用の為、導入蛋白質の高次構造の不安定化に由来する導入蛋白質の不溶化が認められていた。この不溶化は細胞に導入後、導入されなかった蛋白質を洗浄により除去する際に、それらを阻害する可能性が高く、結果として導入が認められたとしても、不溶化に基づく細胞膜への付着との区別が難しい。

これらの点をクリアにする為に、導入されなかった蛋白質を蛋白質分解酵素を用いて不活化する事により、問題の解決を目指した。

アッセイ系の改良と共に、導入効率の改善を目指すため、特に細胞膜透過ペプチドの配列に着目し、複数の配列を化学合成し細胞膜透過活性を調べた。

それでも、細胞膜へのダメージに基づく細胞内への蛋白質導入の結果、細胞が  $\beta$ -Galactosidase 活性を示す可能性も否定し難い為、新しいアッセイ系の開発を次に行った。

新しいアッセイ系は上述の問題を解決すると共に本課題の蛋白質導入法の有用性を実証する例を選択した。

最初にバクテリオファージ P1 由来の遺伝子組み換え酵素である CRE リコンビナーゼ

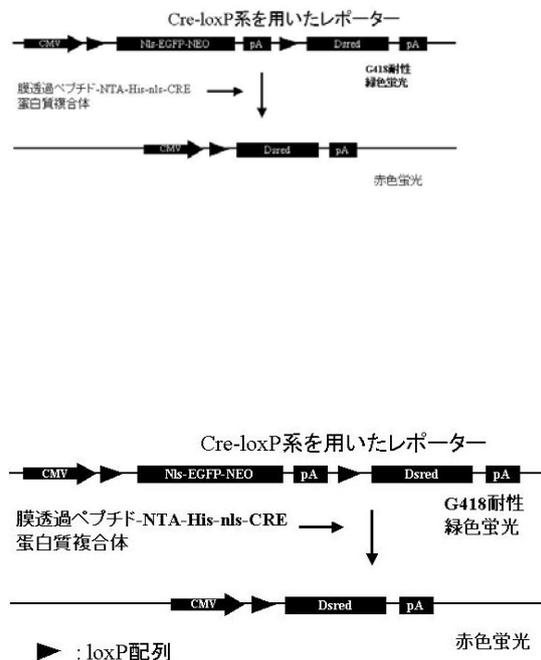


図 1

このレポーターの導入により、導入された細胞は nls-EGFP-NEO 融合蛋白質を発現し、緑色蛍光を示すと共に、G418 耐性となり選択が可能となる。この下流の最初の pA 配列が RNA の転写を止め、転写に由来する loxP 配列の組み換えを抑制する。この細胞に Cre リコンビナーゼを導入する事により、loxP に挟まれた遺伝子が切り出され、赤色蛍光蛋白質を発現する構造となり、組み換えが生じた細胞を検出出来る。

このレポーターで検出するためには、導入蛋白質が活性を持ったまま核内に移行し、組み換えを起こす必要があり、CRE リコンビナーゼの構造強度の弱さに由来する膜透過ペプチドと融合させた際の失活し易さを考慮すれば、より実践的な検出系で効率的な実験計と言える。

実際の応用に直結したアッセイ系として、造血系幹細胞に発現させる事により、その幹細胞を増殖する事の出来る HoxB4 遺伝子をクローニングし、本システムに合致した蛋白質を発現させる系の構築を目指した。

同様に制御性 T 細胞を誘導させうるマスター遺伝子である FoxP3 遺伝子、Garp 遺伝子に関しても同様のアプローチを行った。

本課題のシステムの有効性についての特徴で構造が脆弱な蛋白質を膜透過性の付与に由来する活性の低下を最小限に抑えられる事が挙げられる。この観点からシステムの改良を行うにおいて、活性のある蛋白質を調製方法が課題として往々にして問題点となる。応用領域は哺乳類細胞であるため、通常導入の必要のある蛋白質は、哺乳類由来の蛋白質である。蛋白質の発現法としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、麦芽等様々な方法

論があるが、本課題では哺乳類細胞を用いる事が活性の点から一番有望である。

本研究グループはインターロイキン-31 (IL-31) の解析を行っている際に IL-31 が非常に効率よく非調節性の蛋白質分泌能を示す知見を得た。この非調節性蛋白質分泌能に関与する領域を特定するため、変異欠失体を作成し解析を進めた結果、糖鎖修飾と細胞の無極性との関連が判明し、その知見を元に哺乳類細胞を用いた蛋白質細胞外放出ベクターを作成し、様々なモデル蛋白質を発言させ、その活性と秋涼の点から解析を行い、本課題に適合する発現ベクターの作成に成功し、ルーチンワークによる活性蛋白質の調製法を確立した。

ヒスチジン結合性細胞膜透過ペプチド、及び、導入蛋白質及びレポーターを作成し、より効率の良い蛋白質の導入方法を検討した。

同時に本システムの対応する導入蛋白質の作成の為、蛋白質の細胞外への放出機構を解析した。

#### 4. 研究成果

最初に膜透過ペプチドの配列の検討を行った。C末端に NTA 基を持つ protein transduction domain (PTD) と HIV 由来の tat 由来の複数の細胞膜透過ペプチドを、ペプチド合成装置を用いて合成した。得られたペプチドは担体レジンからの切り出しから透析処理を行い、HPLC にて精製した。いずれの精製においてもメジャーなバンドが目的物として精製され、そのピークが目的物である事をマスペクトル解析により確認できた。以上の事より NTA 側鎖を導入する本課題の試薬の反応効率の高さと普遍性が証明できた。

得られたペプチドを用いて、ニッケル塩存在下でヒスチジンタグを N 末端に持つ  $\beta$ -Galactosidase 蛋白質と更に核移行シグナルを持つ蛋白質との複合体を作成し、これらの複合体の蛋白質導入効率の検討を *Hela*, *Cos-1* 細胞等複数の細胞を用いて行った。その結果、ptd 由来の配列を用いた際に最大の効率を示した。また、細胞導入において問題となる不溶体形成も ptd 由来の配列を用いた際に最も抑制されており、この配列の有効性が認められた。このため、以降の実験はこの配列を用いて行うこととした。また、ptd 由来の配列を用いて複合体を形成する際に、従来は高イオン強度 (0.5M NaCl 相当) が必要であったが、改良後、その必要がなくなり生理食塩強度で有効に細胞膜透過複合体が形成出来るようになり、蛋白質の機能保全の観点からも有効な結果となった。

導入を目的とした蛋白質の構造に関して

は、N 末端からヒスチジンタグ、ついで SV40 ウイルス由来の核移行シグナルを配置した構造が最も導入効率が高く、核移行シグナルを欠失すると、効率は極端に低下した。この事は核移行シグナルが細胞外への再放出を核に留める事により抑制している事が示唆された。用いる金属についてはニッケルの方がコバルトよりも効率が数倍高かった。

上記の結果、導入プロトコルが確立出来たため、より応用を目指した Cre リコンビナーゼの導入の検討を行った。

上記のプロトコルを用いた結果、*Hela*, *Cos* 細胞とも loxP 配列による遺伝子の組み換えが効率よく誘導され、どちらの細胞でもほぼ 100% に近い効率で緑色蛍光の細胞が赤色蛍光に変化する事が確認され、本課題の方式の有効性が確認できた。

以上の一連の実験から本課題の方法では細胞導入時に試験管の中で活性化されたため、導入する蛋白質が組み換えのレベルが P1 であれば、P1 で行える利点があり、膜透過活性を持つ蛋白質の取り扱う量も最小限であったため、安全性の観点からも有効であった。

更なる実践的な応用として造血系肝細胞の増殖を目指して *mHoxB4* 遺伝子を、制御性 T 細胞の誘導を目指して、*mFoxP3*, *Garp* 遺伝子のクローニングを行った。現在、得られた cDNA を用いて、蛋白質の発現、精製の検討を行っている所である。

ついで実際に導入する蛋白質の精製法の改良を目指した細胞外への蛋白質分泌特性を示すインターロイキン-31 の解析を行った。変異欠損体の作成による解析の結果その結果、非調節性の蛋白質分泌は無極性の細胞において、シグナルペプチドと N 型糖鎖修飾により高効率に促進される事が判明した。この結果を図 2 および 3 に示す。

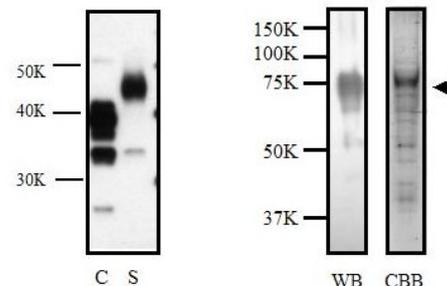


図2

図3

図2において、IL-31由来のシグナルペプチドと人工的に合成したN型糖鎖修飾サイトおよび緑色蛍光蛋白質を1つの蛋白質として発現させるcDNAを293由来細胞に発現させた結果である。Cは細胞質分画で、Sは培養液中の蛍光蛋白質を免疫染色したものである。45kD付近の糖鎖修飾された蛋白質が効率的に放出されている事がわかる。

図3においてヒト癌抑制遺伝子p53を同様に発現させ、ワンステップで精製した結果を示す。左は精製前の培養液中のp53蛋白質の免疫染色、右はクマジー染色の結果である。条件検討無くp53蛋白質が精製されている事がわかる。得られた蛋白質は選択的DNA結合活性を持つ事も証明された。

以上の事より簡便に哺乳類細胞の蛋白質を発現精製するシステムが出来、蛋白質導入に関する蛋白質精製の問題点を解決出来た。これらの事を付記に示した論文に投稿し受理された。

更に、これらの発現ベクターの改良を行い、現在300mlの培養で約10mgの蛋白質を簡便に単離出来る発現系に改良した。これらの事も現在投稿準備中である。

蛋白質の発現精製および導入プロトコルの確立が出来たため、研究課題の目標は達成はほぼ完成できたと考えており、この開発された技術は医療応用および研究開発に有効だと思われる。

現在その有効性の実証を本研究課題の遂行中に得た材料を用いて、証明を進めている所である。

Fmoc-NTA-COOH試薬を用いた高効率の蛋白質導入試薬を作成し、実際にCreリコンビナーゼが細胞に導入され、核内で機能する事を証明した。また、導入蛋白質の作成の為、蛋白質細胞外放出ベクターを作成した。

## 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1件)

Enhancing activity of N-glycosylation for constitutive proteins secretions in non-polarized cells

Biochemical and Biophysical Research Communications 381 (2009) 612-618 (査読有り)

Nobutake Akiyama, Yuji Ohno, Takahiro Fukuda, Yosinobu Manome, Saburo Saito

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋山 暢丈 (AKIYAMA Nobutake)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00338865

### (2) 研究分担者

齋藤 三郎 (SAITO Saburo)  
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10186934  
馬目 佳信 (MANOME Yoshinobu)  
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：30219539  
渡辺 美智子 (WATANABE Michiko)  
東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10158660  
大野 裕治 (OHNO Yuji)  
東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60142478

### (3) 連携研究者