

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22274

研究課題名(和文)植物の超低温生存力を支える蛋白質の機能を利用した革新的保存技術に関する研究

研究課題名(英文)A study on innovative storage technology by using protein function which supports plant survival under the ultra-low temperature

研究代表者

原 正和 (Hara, Masakazu)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：10293614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、バイオ医薬品、特に抗体製剤が盛んに開発されている。抗体の安定性を高めるためには多量の保存剤の添加と低温管理が必要である。しかし凍結融解によって抗体は凝集し、製剤としての性能が著しく低下する。一方われわれは、植物種子の凍結保存性に関するタンパク質デハイドリンのFセグメントが、タンパク質の凍結変性を強力に抑制することを見出した。本研究では、抗体の凍結凝集がFセグメントによって効率よく抑制できることを示し、その凍結保護作用のメカニズムについて考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、種子の低温耐性に関与し、一定の形をとらない天然変性タンパク質であるデハイドリンが、他のタンパク質を凍結ストレスから守る仕組みを解明した点である。社会的意義としては、デハイドリンの機能がバイオ医薬品、特に抗体製剤の保存技術を格段に向上させる可能性を示した点である。

研究成果の概要(英文)：Recently, biopharmaceuticals especially antibody drugs have been actively developed. A large amount of preservatives and cold storage are required to stabilize the antibody solution. Freezing and thawing, however, promotes the antibody aggregation, and then the drug performance is remarkably decreased. Meanwhile, we found that F segment of dehydrin, a protein involved in the freezing stability of plant seeds, potently inhibited the cryodenaturation of proteins. In this study, we showed that the cryoaggregation of antibody could be efficiently inhibited by F segment, discussing the mechanism of cryoprotection.

研究分野：植物機能生理学

キーワード：超低温保存 タンパク質保護 天然変性タンパク質 デハイドリン

1. 研究開始当初の背景

今日、国際的な医薬品開発において、バイオ医薬品は大きなシェアを占めつつある。とりわけ抗体製剤は、標的への選択性が高いため、切れ味が良くオーダーメイド化しやすいというメリットがある。一方、抗体は不安定であり、生産、輸送、保管、調剤の一連のプロセスで適切なコールドチェーンを整備する必要がある。保存条件が不適切な場合、抗体は凝集し、活性の低下、異常な抗原性、チューブやシリンジ内での詰まり等、医療現場において不都合な結果をもたらす[1]。これを防ぐため、高濃度の保存剤（数%~10%の糖質、アミノ酸、界面活性剤等）が添加されているが[2]、それでもなお凍結融解を繰り返すことは禁忌であり、正確な温度管理が不可欠である。今日、医療現場は多様化し、添加剤の低減、凍結融解を繰り返しても使用可能な剤形が求められている。しかし現在の技術ではそれは困難である。

さて、植物の種子には超低温で保存できるものと冷蔵ですら保存できないものがある。こうした種子の保存性に関与しているタンパク質にデハイドリンがある。デハイドリンは、植物固有の天然変性タンパク質であり、超低温保存が可能な完熟種子の胚に蓄積している。また、成長中の植物においても、低温や乾燥ストレスを受けると発現が誘導される。デハイドリンは、植物の種子の登熟段階で発現する late embryogenesis abundant (LEA) タンパク質においてグループ 2 に分類される。他の LEA タンパク質同様、発見以来 30 年以上経過した今でも機能の全容解明には至っていない。とはいえ、デハイドリンは LEA タンパク質の中では研究が進んでおり、本研究の代表者もまたその機能解明に関わってきた[3]。これまでに見出されたデハイドリンの機能の多くは、生体分子の保護に関わるものである。中でも特徴的な活性として凍結感受性酵素の保護作用がある。

代表者は、デハイドリンの凍結保護作用メカニズムを究明するため、凍結感受性酵素のモデルとして用いられる乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase、LDH) を使い、デハイドリンの凍結保護ドメインを探索した。その結果、低温誘導性デハイドリンのいくつかには、N 末端側に 15 アミノ酸からなる共通配列が存在し、その配列のみでも高い LDH 凍結保護活性を示すことが判明した。そこでこの配列を NK3 と呼び、抗体製剤の凍結安定性の向上に利用しようと考えた。ところで、われわれが NK3 の凍結保護作用を見出した頃、ノルウェー科学技術大学の Strimbeck 博士が低温誘導性デハイドリンに見られる共通配列を F セグメントと呼ぶことを提案した[4]。奇しくも F セグメントは NK3 と同じ配列を指していた。そこで、本報告書並びに学術論文では、Strimbeck 博士の呼称を採用し NK3 を F セグメントと表記する[5]。

2. 研究の目的

本研究の目的は、F セグメント (NK3 と同義) を用いた抗体製剤の凍結安定性の向上である。ここで F セグメントに関し、1) 凍結保護メカニズムの解明、2) 新たな保護ペプチドの探索、3) 抗体保護作用の検証を実施する。その結果、バイオ医薬品の保存問題の克服に貢献し、高分子の安定化に関する普遍的な理論を提唱する。

3. 研究の方法

1) 凍結保護メカニズムの解明: F セグメントなどのペプチドは化学合成によって調製した。LDH はウサギの筋肉に由来するリコンビナントタンパク質を用いた。F セグメントの凍結保護作用は、液体窒素を使って LDH 溶液を凍結融解し、酵素活性の低下、疎水面の露出、凝集による濁度上昇の三項目で評価した。水溶液中での F セグメントの二次構造は、円偏光二色性 (circular dichroism、CD) スペクトルと二次構造組成予測ソフトウェアによって解析した。3D モデル構築ソフトウェアでペプチドの溶液中での構造を推定した。

2) 新たな保護ペプチドの探索: ダイコンは市販のハツカダイコンを用いた。肥大根をおろしイオン交換クロマトグラフィーによって活性タンパク質を精製した。同定は MALDI-TOF MS/MS で行った。

3) 抗体保護作用の検証: 抗体のモデルとして市販の精製ウシγグロブリンを用いた。濁度は 415 nm の吸収で評価した。凝集粒子は位相差光学顕微鏡によって観察し、サイズを測定した。

4. 研究成果

4.1. 結果と考察

デハイドリンは植物固有の天然変性タンパク質であり、保存配列Kセグメント(代表的配列TypK、EKKGIMEKIKEKLPG)を1つ以上もっている [3]。Kセグメント以外にも、セリンの繰返し配列を含むSセグメント、われわれとStrimbeck博士が別々に見出したFセグメント(DRGLFDLFGKKEEV)などがある。デハイドリンの発現は低温や乾燥のほか、いくつかのストレスによって誘導されるが、特に低温によって強く誘導されるデハイドリンサブタイプのFSKn型には、N末端付近にFセグメントが存在する。われわれは、シロイヌナズナの4つのFSKn型デハイドリン(COR47、ERD14、ERD10、At4g38410)のFセグメントが、いずれも同程度のLDH凍結失活抑制活性を示すことを確認した [5]。そのうえでCOR47のFセグメントをFsegと称し、以下の研究に用いた。

1) 凍結保護メカニズムの解明: Fsegには5つの疎水性アミノ酸が存在する。以前われわれが実施したKセグメントのLDH凍結保護メカニズム研究によれば、活性の発現にはKセグメントに含まれる4つの疎水性アミノ酸が不可欠であることが分かっている [6]。そこで、Fsegにおいても、疎水性アミノ酸が活性発現に重要な役割を担っている可能性を考えた。Fsegの疎水性アミノ酸を親水性非電荷アミノ酸であるトレオニンへ置換したところ、保護活性は著しく低下した。逆に、疎水性アミノ酸のみを既存の位置に残し、それ以外のアミノ酸をグリシンへ置換した配列を試したところ、Fsegとほぼ同程度の活性を示すことが分かった。従って、FsegのLDH凍結保護作用は、疎水性アミノ酸に依拠することが明らかになった [5]。

Fsegの二次構造をCDスペクトルで解析したところ、バッファー中では無秩序構造の含有率が85%を占め、概ね変性状態にあることが判明した [5]。一方、溶液における3Dモデルを構築したところ、FSKn型のデハイドリン(COR47、ERD14、ERD10、At4g38410)のFセグメントは、全体としては緩く解けた構造を示すが、5つの疎水性アミノ酸のうち4つが近接して疎水性領域を形成することが予想された。この疎水性領域はペプチドの内部に折り畳まれず溶液へ露出しており、この状態がFセグメントの活性発現に重要である可能性が示唆された。FセグメントとKセグメントにはアミノ酸配列に類似性はないが、共に顕著な保護活性をもつ。興味深いことに、Kセグメントの3Dモデルでも4アミノ酸による疎水性領域の露出が描出された [6]。LDHの凍結保護活性の発現には、緩いペプチド構造の中で疎水性領域が形成されることが重要であると考えられる。

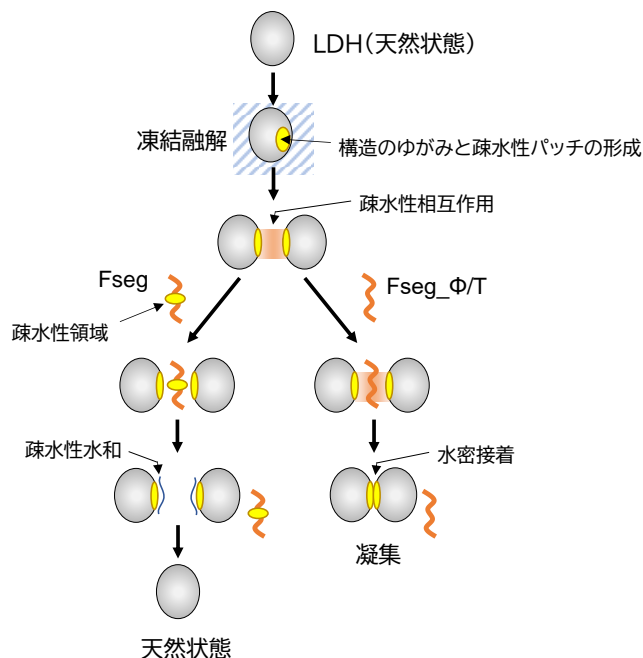


図1 Fセグメント(Fseg)による低温感受性酵素(乳酸脱水素酵素、LDH)の推定保護メカニズム。天然状態のLDHは、凍結融解によって構造がゆがみ、疎水性パッチが生じる。LDHは分子衝突の際に疎水性相互作用によって会合し凝集する。Fsegは疎水性領域によってLDH間の会合に介入し、LDHを天然状態に戻す。一方、Fsegの疎水性アミノ酸を親水性アミノ酸へ変換すると、LDH同士の会合を阻止できず、疎水性パッチを介して密着し、LDHは凝集する。

LDHは4量体であるが、凍結融解によって構造がゆがみ、内側に畳み込まれた疎水性アミノ酸が表面へ露出し、疎水性パッチを形成すると考えられる。このプロセスは、疎水性環境に依存して蛍光を発する色素によってモニターすることができた。疎水性パッチは融解時の分子衝突の際に接着面となりLDHは凝集する。Fセグメントは、緩い構造によるかさ高さ、溶媒に提示した疎水性領域によって、LDHの分子衝突を効果的に回避していると考えられる (図1)。

2) 新たな保護ペプチドの探索: 当初、Fセグメントのアミノ酸配列バリエーションからFセグメントを超える活性をもつペプチドの探索を試みた。しかしFセグメントの活性はバリエーション内でさほど違いがないことから、様々な植物のタンパク質抽出物から直接保護活性を調査する方法をとった。その結果、ハツカダイコンの抽出物に高いLDH凍結保護活性が見出され、その活性本体は、ダイコン液胞性カルシウム結合タンパク質(RVCaB)であることが判明した[7]。RVCaBは天然変性タンパク質であり、ハツカダイコン肥大根の主要な可溶性タンパク質であった。同定された凍結保護ドメインは15アミノ酸からなり、その配列はFセグメントともKセグメントとも異なっていたが、4個の疎水性アミノ酸を含んでいる点で共通していた。また、本タンパク質を効率よく調製する方法を見出した。

3) 抗体保護作用の検証: 抗体の温度安定性については、高温変性の研究例は多いものの、凍結による物性変化を研究した例は少ない。そこでまず、凍結融解による凝集実験系を確立した[8]。抗体のモデルとしてウシγグロブリン(BGG)を用い、酸性から塩基性に至る条件で凍結したところ、pH 5~8で凍結融解後の濁度上昇が観察され、特に抗原抗体反応の最適pH(6.5~7.0)で凍結凝集が起きやすいことが分かった。凍結融解の回数を変化させたところ、濁度の上昇は1回目から起こり、回数の増加に応じて濁度が高くなった。明瞭な濁度変化は3回目の凍結融解で得られたので、以降凍結融解の回数を3回とした。この時、視覚的な濁りの原因となる凝集粒子のサイズは20~200 μm程度であった(図2)。この実験系を用い、Fセグメントを添加して凍結融解後の濁度を測定したところ、Fセグメントの濃度に依存して濁度が低下した。本実験系におけるFセグメントの50%保護濃度は6.4 μMであり(図3)、Kセグメントの同値よりも低かった。つまり、FセグメントはKセグメントよりBGGの凍結保護活性が高いといえる。BGGの凍結凝集は一般的な保護剤、つまり糖アルコール、ツビッターイオン型適合溶質、アミノ酸、ポリオール(実際の抗体製剤に用いられるものを含む)によって抑制されたが、Fセグメントと比較すると、質量パーセント濃度にして数十倍から数百倍の添加量を必要とした。以上の結果から、FセグメントはBGGの凍結凝集を顕著に抑制することが示された。なお、KセグメントもまたBGGの凍結凝集を効果的に抑制するが、その作用機構については現在研究中である。

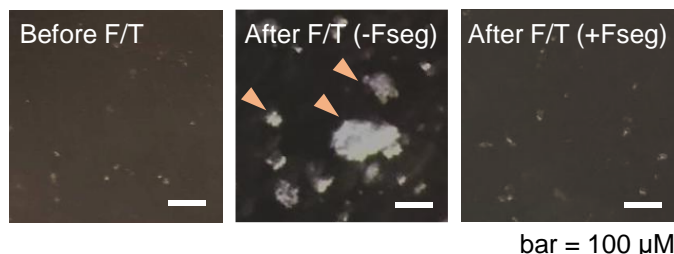


図2 ウシγグロブリン(BGG)の凍結融解後の光学顕微鏡観察。F/Tは凍結融解を示す。BGGを凍結融解すると凝集体が観察されるが(-Fseg)、Fセグメントを加えておくと凝集は軽減された(+Fseg)。矢頭は凍結融解後に生じる凝集物のいくつかを示す。

4.2. 結論

近年、バイオ医薬品特に抗体製剤の開発が盛んである。抗体は凍結によって凝集しやすいため、抗体製剤には多量の保護剤が添加されている。しかし製剤を繰返し凍結融解することは禁忌であり、徹底した温度管理が必要である。添加剤の低減と、凍結融解を繰り返しても使用可能な剤形が望ましいが、その実現には超えるべき技術上のハードルがある。研究代表者は、植物種子の貯蔵性に関与するデハイドリンの機能研究を進める過程で、低温誘導性デハイドリンに見られるFセグメントが、低温感受性酵素の凍結失活を効果的に抑制することを見出した。そこで、Fセグメントの凍結保護作用のメカニズムを解明し、抗体の凍結安定性を高めるため、本研究を実施した。Fセグメントの顕著な凍結保護活性は、5つの疎水性アミノ酸に依拠することが判明した。Fセグメントは概ね緩く解けた構造をとるが、疎水性アミノ酸が近接することによって疎水性領域を形成すると予測された。つまり、Fセグメントは、緩く無秩序な構造と疎水性相互作用によって、保護対象タンパク質の分子衝突による凝集を抑制していると考えられる。さらに、凍結保護活性を示す新たな植物天然変性タンパク質を見出し、未報告の保護ドメインを特定した。ウシγグロブリンを抗体のモデルとし、凍結凝集系を確立した。Fセグメントは、一般的な保護剤よりも顕著にウシγグロブリンの凍結凝集を抑制した。以上の結果を総括すると、Fセグメントは抗体の保存剤として有望であると結論できる。

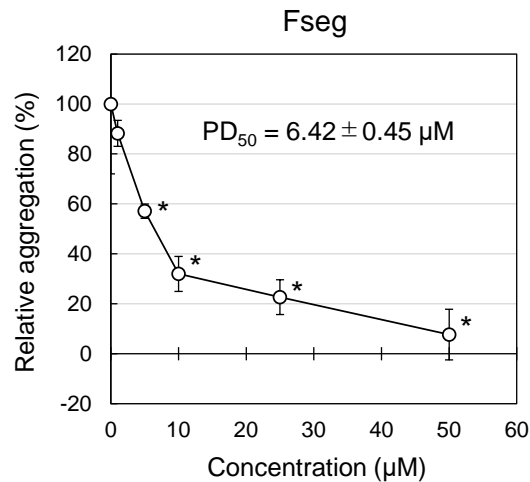


図3 Fセグメント(Fseg)によるウシγグロブリン(BGG)の凍結凝集抑制作用。縦軸は相対凝集(%)であり、凍結融解による濁度の増加分を示す。Fセグメントを加えない条件での増加分を100%とした。シンボルとエラーバーは平均±SDを示す(4回の繰返し)。*はFセグメントを添加しない条件に対して有意な差が見られた場合に付した(Dunnett's test, $p < 0.05$)。グラフ中の PD_{50} 値は、相対凝集を50%低下させたFセグメントの濃度を示す。

<引用文献>

- [1] Moussa et al. (2016) Immunogenicity of therapeutic protein aggregates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105, 417-430
- [2] 内山ら (2014) 抗体医薬品の溶液物性 *薬剤学*, 71, 12-18 他
- [3] Hara M (2010) The multifunctionality of dehydrins: an overview. *Plant Signaling & Behavior*, 5, 503-508
- [4] Strimbeck GR (2017) Hiding in plain sight: the F segment and other conserved features of seed plant SKn dehydrins. *Planta*, 245(5), 1061-1066
- [5] Ohkubo T, Kameyama A, Kamiya K, Kondo M, Hara M (2020) F-segments of *Arabidopsis* dehydrins show cryoprotective activities for lactate dehydrogenase depending on the hydrophobic residues. *Phytochemistry*, 173, 112300
- [6] Hara M, Endo T, Kamiya K, Kameyama A (2017) The role of hydrophobic amino acids of K-segments in the cryoprotection of lactate dehydrogenase by dehydrins. *Journal of plant physiology*, 210, 18-23
- [7] Osuda H, Sunano Y, Hara M (2021) An intrinsically disordered radish vacuolar calcium-binding protein (RVCaB) showed cryoprotective activity for lactate dehydrogenase with its hydrophobic region. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 1130-1137
- [8] 大須田、原 (2021) デハイドリンによるγ-Globulin 凍結凝集抑制作用に関する研究 第38回植物バイオテクノロジー学会(つくば)大会 講演番号2B01 9月10日

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomohiro Ohkubo, Ayuko Kameyama, Keita Kamiya, Mitsuru Kondo, Masakazu Hara	4. 巻 173
2. 論文標題 F-segments of Arabidopsis dehydrins show cryoprotective activities for lactate dehydrogenase depending on the hydrophobic residues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 112300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.phytochem.2020.112300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Honami Osuda, Yui Sunano, Masakazu Hara	4. 巻 182
2. 論文標題 An intrinsically disordered radish vacuolar calcium-binding protein (RVCaB) showed cryoprotective activity for lactate dehydrogenase with its hydrophobic region	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 1130-1137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 横山 知佳、大久保 智博、神谷 慶太、原 正和
2. 発表標題 シロイヌナズナデハイドリンの乳酸脱水素酵素凍結保護活性における疎水性アミノ酸の役割
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会（京都）大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保 智博、神谷 慶太、亀山 阿由子、原 正和
2. 発表標題 デハイドリンの凍結保護活性に対する疎水性アミノ酸の重要性
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会（京都）大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masakazu Hara
2. 発表標題 Proteins in seeds for surviving under deep freeze conditions
3. 学会等名 2019 National Tsing Hua University-Shizuoka University Bilateral Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masakazu Hara
2. 発表標題 Adaptation of plants to extreme temperatures -Key proteins in seeds for surviving under deep freeze conditions-
3. 学会等名 Universiti Teknologi Malaysia, 2nd International Postgraduate Symposium in Biotechnology 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大須田 穂波、原 正和
2. 発表標題 ハツカダイコン肥大根に含まれる天然変性タンパク質の精製と凍結保護活性に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会[仙台]
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大須田 穂波、原 正和
2. 発表標題 デハイドリンによる -Globulin凍結凝集抑制作用に関する研究
3. 学会等名 第38回植物バイオテクノロジー学会(つくば)大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡大学農学部 原研究室
<https://www.agr.shizuoka.ac.jp/abc/envplant/index.html>

静岡大学グリーン科学技術研究所 原 正和
<https://green.shizuoka.ac.jp/staff/097/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------