

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22680041

研究課題名(和文) 酵素タグと細胞内抗体導入法を組み合わせた細胞ターゲティングシステムの開発

研究課題名(英文) Development of a novel active targeting system based on split SNAP-tag

研究代表者

三重 正和 (MIE, Masayasu)

東京工業大学・総合理工学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40334528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,400,000円、(間接経費) 4,920,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は酵素タグと細胞内抗体導入法を組み合わせた細胞ターゲティングシステムの開発を目的とした。ここでは酵素タグとして利用するSNAP-tagを分割したsplit SNAP-tagが、融合したタンパク質の分子間相互作用に応じて活性を回復することを見出し、分子間相互作用検出の新たな手法となることを示した。また、分子認識素子としてDNAアプタマーを利用する可能性を考慮し、ファージ由来Gene A\*タンパク質を利用したDNA-タンパク質ハイブリッド分子作製法を構築した。

研究成果の概要(英文)：In this experiment, a novel active targeting system based on split SNAP-tag was developed. Firstly, split SNAP-tag complementation was studied. Split SNAP-tags, fragments of divided SNAP-tag were fused to proteins that can interact with each other. After incubation with a fluorescent SNAP-tag substrate, cells that expressed split SNAP-tag fusion proteins generated fluorescent signals when these proteins interacted. It was shown that split SNAP-tag labeling method should be a useful tool for visualization of protein-protein interaction processes.

Next, for using DNA aptamer in our system, we developed a method for site-specific labeling of single-stranded DNA (ssDNA) to a recombinant protein of interest (POI) through the Gene-A\* protein (Gene-A\*) from bacteriophage phi X174, without any chemical modifications of ssDNA.

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：SNAP-tag complementation タンパク質間相互作用 ターゲティング

## 1. 研究開始当初の背景

細胞ターゲティングは、イメージング・DDS などにおける重要な基盤技術である。細胞ターゲティングにおいて標的細胞が特異的に発現するタンパク質の認識には、優れた分子認識能を有する抗体が一般に使用されている。しかしながら、抗体は細胞膜透過能を持たないことから、その標的分子は細胞膜表面タンパク質に限定されていた。細胞機能を司るタンパク質の多くが細胞内に存在することを考えれば、細胞内分子を標的とすることにより細胞ターゲティングの可能性が飛躍的に広がるものと考えられる。つまり、抗体分子を細胞内へと導入することが可能になれば、細胞内タンパク質をも細胞ターゲティングの標的とすることが可能になるものと期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、独自に開発した生細胞内への抗体導入法を基盤とし、この方法と酵素タグを組み合わせた細胞内分子を標的とした細胞ターゲティングシステムの構築を目的とした。ここでは酵素タグとして human alkylguanine-DNA alkyltransferase (hAGT) の変異体である SNAP-tag に着目した。この SNAP-tag は、リガンドと特異的に化学結合する。したがって、目的タンパク質とタグ酵素を融合し、蛍光分子・放射性分子・抗がん剤等をリガンドに修飾すれば、目的タンパク質を様々な分子で、任意のタイミングにラベリングすることが出来る。しかしながら、通常 SNAP-tag は常時活性を示すため、ターゲティングシステムにおいては分子認識に依存した活性の制御が必要とされる。そこで本研究では、分割した酵素が近接した際に、その酵素活性を回復する *-complementation* に着目し、この方法が SNAP-tag にも適用できるのではないかと考え、分割した SNAP-tag (split SNAP-tag) の評価を行った。

また、split SNAP-tag の検討と並行して細胞ターゲティング素子として DNA アプタマーを利用する可能性を考慮し、SNAP-tag タンパク質と DNA 分子を簡便に結合させる方法として、ファージ由来 Gene A\*タンパク質を利用した DNA-タンパク質ハイブリッド分子構築法の開発を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) split SNAP-tag システムの構築

#### SNAP-tag の分割位置の検討

既に報告されている SNAP-tag の立体構造と過去の論文を参考にして、SNAP-tag の 91-92 番目のアミノ酸の間を分割位置として選択した。PCR により、N 末端側と C 末端側の split SNAP-tag 断片の遺伝子を増幅した。

これらを、ヘテロダイマーを形成することが知られている Jun、Fos タンパク質遺伝子の 上流、または下流に挿入し、動物細胞発現プラスミドを構築した。これらのプラスミドを動物細胞に導入し、融合タンパク質を発現させ、蛍光分子が標識された SNAP-tag 基質を加えた。未反応基質を培地交換により除去した後、細胞を共焦点顕微鏡により観察した。

#### split SNAP-tag を用いたタンパク質間相互作用イメージング

次にホモダイマーを形成する FKBP12 の変異体である FM タンパク質下流に split SNAP-tag 断片を融合したプラスミドを構築し、動物細胞内で発現させた。このとき、SNAP-tag の基質が結合する split-SNAP 断片には FM に加え、核移行シグナル、あるいは膜結合配列を融合した。タンパク質を細胞内で発現させた後、と同様に共焦点顕微鏡により観察した。

### (2) Gene A\*タンパク質を利用した DNA-タンパク質ハイブリッド分子構築法の開発

#### Gene A\*タンパク質の発現と活性評価

Gene A\*遺伝子は X174 ファージゲノムより PCR により増幅した。増幅した遺伝子を pET32c ベクターに挿入した発現用プラスミドを構築し、大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換した。タンパク質の発現を誘導した後、大腸菌を破碎し、末端を FITC 標識した Gene A\*認識配列を含むオリゴ DNA を加え、Gene A\*と反応させた。その後、サンプルを SDS-PAGE により分離し、蛍光スキャナーでタンパク質と DNA の結合を評価した。

#### Gene A\*融合タンパク質の構築とその機能評価

Gene A\*と GFP、ルシフェラーゼ、抗体結合タンパク質等の融合タンパク質を遺伝子工学的に作製した。大腸菌内で発現させた融合タンパク質は His タグを利用して精製した。ルシフェラーゼとの融合タンパク質は、DNA アプタマーと結合させ、発光によるリガンドの検出を試みた。抗体結合タンパク質との融合タンパク質では、結合させた DNA 部分を増幅する方法により抗原抗体反応の検出を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) Split SNAP-tag システムの構築

はじめに分割した SNAP-tag が分割断片の近接により活性を回復するかを検討した。相互作用することが知られている Fos・Jun タンパク質を分割した SNAP-tag 断片に遺伝子工学的に融合し、動物細胞内で発現させた。蛍光標識した SNAP-tag 基質を加え反応させた後、未反応の基質を除去し蛍光顕微鏡下で観察した (Fig.1)。



後、海外からの問い合わせがあるなど、大きな注目を受けている。

本研究では、以上の成果が得られた。当初の研究計画を完遂するに至らなかったが、基本原理となる split SNAP-tag システムの可能性を明らかにし、細胞ターゲティングを実現するために、このシステムが利用可能であることを示した。

#### 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8件)

1: Matsumoto R, Hara R, Andou T, Mie M, Kobatake E. Targeting of EGF-displayed protein nanoparticles with anticancer drugs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014 (in press) doi: 10.1002/jbm.b.33162. (査読有)

2: Bae J, Mie M, Kobatake E. Development of a specific siRNA delivery system into HeLa cells using an IgG-binding fusion protein. *Biotechnol Lett*. 2013 35(12):2081-9. doi: 10.1007/s10529-013-1299-y. (査読有)

3: Mie M, Kai T, Le T, Cass AE, Kobatake E. Selection of DNA aptamers with affinity for pro-gastrin-releasing peptide (proGRP), a tumor marker for small cell lung cancer. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013 169(1):250-5. doi:10.1007/s12010-012-9956-5. (査読有)

4: Mashimo Y, Maeda H, Mie M, Kobatake E. Construction of semisynthetic DNA-protein conjugates with Phi X174 Gene-A\* protein. *Bioconjug Chem*. 2012 23(6):1349-55. doi: 10.1021/bc300118m. (査読有)

5: Mie M, Naoki T, Uchida K, Kobatake E. Development of a split SNAP-tag protein complementation assay for visualization of protein-protein interactions in living cells. *Analyst*. 2012 137(20):4760-5. doi: 10.1039/c2an35762c. (査読有)

6: Akter F, Mie M, Grimm S, Nygren PÅ, Kobatake E. Detection of antigens using a protein-DNA chimera developed by enzymatic covalent bonding with phiX gene A\*. *Anal Chem*. 2012 84(11):5040-6. doi: 10.1021/ac300708r. (査読有)

7: Mie M, Thuy NP, Kobatake E. Development of a homogeneous immunoassay system using

protein A fusion fragmented Renilla luciferase. *Analyst*. 2012 137(5):1085-9. doi: 10.1039/c2an15976g. (査読有)

8: Andou T, Endoh T, Mie M, Kobatake E. Direct detection of RNAs in living cells using peptide-inserted Renilla luciferase. *Analyst*. 2011 136(12):2446-9. doi: 10.1039/c1an15130d. (査読有)

[学会発表](計6件)

1: 豊永恭平・三重正和・小島英理, 分子刺激応答により自己組織化する DNA-タンパク質ハイブリッド分子の構築, 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 3 月 27-30 日, 名古屋大学

2: 直木達彦・三重正和・小島英理, Split SNAP-tag を利用したタンパク質間相互作用の蛍光イメージング法の開発, 2013 年電気化学会秋季大会, 2013 年 9 月 27-28 日, 東京工業大学

3: 依田毅・三重正和・小島英理, PhiX174GeneA\*タンパク質を利用した DNA の細胞表面提示法の開発, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 22-25 日, 立命館大学

4: 直木達彦・三重正和・小島英理, Protein Labeling with Split SNAP-Tag by Protein Interaction Dependent Reconstitution in Living Cells, The First International Symposium on Biofunctional Chemistry, 2012 年 11 月 28-30 日, 東京工業大学

5: 真下泰正・鈴木繁哉・三重正和・小島英理, PhiX174 Gene A\*タンパク質を用いた DNA - タンパク質融合分子作製法の開発とその応用, 第 6 回バイオ関連化学シンポジウム, 2012 年 9 月 6 - 8 日, 北海道大学

6: 三重正和・直木達彦・小島英理, Split-SNAP tag を利用した新規分子イメージング法の開発, 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 2011 年 9 月 13 日, つくば国際会議場

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

三重 正和 (MIE, Masayasu)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・准教授

研究者番号: 40334528