

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310171

研究課題名(和文)超強力細胞保護ペプチドCPPの機能と応用技術に関する研究

研究課題名(英文)Functional analysis and application of an effective cell-preservation peptide CPP

研究代表者

津田 栄 (TSUDA, SAKAE)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・上級主任研究員

研究者番号：70211381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円、(間接経費) 4,050,000円

研究成果の概要(和文)：代表者らは寒冷地の生物が有する幾つかの不凍蛋白質(AFP)が強力な細胞保護機能を併せ持つことを見出しCPPと名付けた。本研究では、実用化に最適なCPPを見出す為に様々なAFPの組成、分子構造、不凍・細胞保護機能等を詳細に解析し、最終的にカレイ由来のCPPを用いてマウス膵島細胞を数日間生かし続ける技術開発に至った(2013年PLoS ONE)。また、世界初の菌類AFPのX線構造解析(2012年PNAS)やCPP3のNMR構造解析(2013年JBNMR)等に関する基礎と応用の成果を3年間精力的に発表した：論文総数23(うち査読有19)、学会等発表数40(うち招待講演14)、特許出願数1。

研究成果の概要(英文)：Antifreeze proteins (AFPs) found from many organisms can inhibit ice crystal growth for cold-survival. We preliminarily found that some AFPs also show cell-preservation ability and named them CPP (Cell-Preservation Peptide). During the 3-year research period, we have been tested structure-function relationship of various AFPs to obtain the most promising CPP. In 2013, we finally could develop a method to alive rat insulinoma cells for more than 5 days at +4 degree C by using a flat-fish-derived CPP (PLoS ONE, 2013). In addition, we published the 1st crystal structure of fungal AFP (PNAS, 2012) and structure-function of CPP3 based on the multi-dimensional NMR experiments (JBNMR, 2013). Biochemical characterizations and many applicational results about AFP and CPP were also published: 23 publications (incl.19 peer-reviewed articles), 40 presentations (incl.14 invited speeches), and 1 patent claim.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：細胞保護物質 ペプチド 不凍蛋白質 抗凍結作用 3次元分子構造 大量生産 X線回折法 NMR法

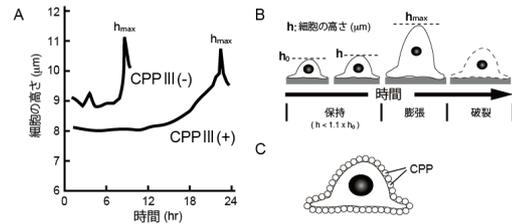
1. 研究開始当初の背景

(1) 生物の体内では、重合度や組成が異なる膨大な種類の蛋白質が絶え間なく合成されており、それらの蛋白質は代謝、運動、貯蔵、免疫反応、構造形成など生命維持に欠かせない多様な生理機能を担っている。蛋白質の中には氷結晶に結合してその成長を阻害する機能を有する種類があり、不凍蛋白質あるいは AFP と呼ばれている。代表者らは、日本国内に生息する魚類、昆虫類、菌類等からアミノ酸組成や鎖長が異なる様々な AFP を発見した。更に、特定種類の AFP が卵子、上皮細胞、肝臓細胞などの生存率を飛躍的に高める事を見出し、それらを AFP とは区別して CPP (Cell-Preservation Peptide の頭文字) と呼ぶことにした。なぜ CPP は細胞保護機能を発揮するのか？その機能は AFP としての機能 (氷結晶結合機能) とどの様に関係するのか？実際に、CPP はどのくらい細胞の生存率を高めるのか？代表者らはこれらの答えを得るための種々の研究プランを練っていた。

(2) AFP の 1 種である CPP は氷結晶結合機能を有している為、代表者らは同機能を活用した CPP の大量調製方法を最優先課題として検討していた。より正確に CPP の細胞保護効果を調べる上で、僅かなコンタミやイオン等を除去する必要があった。代表者は AFP (CPP) が極地魚類のみならず日本国内で捕獲され日本人が日常的に目にするカレイやワカサギなどの魚類の中にも豊富に含まれていることを見出していた。そして、それらの魚肉を原材料とする AFP 大量生産技術の開発を進めていた。企業等の協力も得て複数種類の AFP (CPP) の天然物と遺伝子組換え物を取得する努力を続け、また構造生物学的手法により AFP (CPP) の構造と機能を解明する準備も進めていた。CPP が細胞の生存率を改善する効果を検証する実験システムを構築するとともに、モデル細胞となるヒト肝癌細胞株 HepG2 やマウス膵島細胞株 RIN-5F を必要に応じて培養増殖する手法の確立を試みていた。走査型電気化学顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を設置して、細胞の状態を観察できるように備えていた。特に、AFP が膵島細胞に及ぼす生存率改善効果を染色法やインスリン濃度測定法により解析する手法を検討し実験に備えていた。

(3) 代表者らは AFP (CPP) が細胞に対してどのように働くかに関して予備的知見を得ていた。即ち、型の CPP (CPP) を代表的な細胞保存液であるユーロコリンズ液 (EC 液) に溶解し、その中に浸したヒト肝癌細胞 HepG2 の状態を走査型電気化学顕微鏡 (SECM) により観察した。SECM は観察対象物の表面近くを微小な

探針で走査するもので 1 個の細胞を電気信号として捉え画像化することができる。この方法を用いて測定した 1 個の HepG2 細胞の高さの経時変化を図 1 に示す。



このように、CPP を含まない保存液に浸した細胞は保存開始から約 6 時間その状態を保持しているものの、約 8 時間を過ぎた頃から急激に膨張し、約 9 時間後には破裂死に至ることが示された (図 1 A, B)。この細胞が保持 膨張 破裂の状態変化を起こすことは CPP を含む液に浸した場合にも同様を示唆されたが、“保持”の時間は CPP を含まないときに比べて 2 倍以上も長くなった (図 1 A)。すなわち CPP は細胞膜表面に吸着し (図 1 C)、その膨張を防ぐことによって状態の“保持”時間を延長するという事が研究開始当初に示唆されていた。

2. 研究の目的

(1) 種々の CPP の量産手法を開発すること。既に CPP であることが判明した複数の AFP について、細胞保存実験に供する為に必要なグラム量以上の試料粉末の精製手法を開発する。通常であれば 10 ミリグラム程度の蛋白質を作製することで、組成、生理活性、構造等の基礎的な知見を得る事ができるが、多くの母集団と繰り返し実験を必要とし、市販の保存液などに溶解した後は事実上回収不能となる細胞生存率測定実験にはグラム量以上が必要である。これまでの予備的実験によって CPP 生産法開発には十分な見通しがあるが、しかし CPP の高純度品を精製する過程で使用する緩衝液の成分や天然物あるいは大腸菌由来の微量の夾雑物 (コンタミ) それ自体が、保存対象となる細胞の生存率を低下させ、死滅させてしまう懸念があるため、これらの安定的除去法を含む CPP 量産手法を開発する必要がある。

(2) 種々の AFP について 3 次元分子構造を解明すること。AFP の構造を比較することで、細胞保護性能を有する AFP (=CPP) とそうでない AFP の違いを明らかに出来る可能性がある。氷結晶結合活性に関しては、僅か 1 アミノ酸残基の違いが活性を大きく変化させることが知られている。また分子表面に存在する結合水の数も AFP によって異なる等の予備的知見もあり、構造解明は CPP の機能発現メカニズムの検討を可能

にするとえる。CPPが分子表面にある結合水を通じて細胞表面の水分子に何らかの働きかけをする可能性も考えられる。このような細胞保護メカニズムの議論に必要な構造情報の取得が研究目的の一つである。

(3) CPPが発揮する細胞保護性能の限界を明らかにすること。本研究では(1)で作製したCPPを比較的単純な組成からなる一般的な細胞保存液に溶解したもの(CPP液)を作製し、同液を用いてモデル細胞を+4℃で保存して、その生存率の経時変化を明らかにする。ここで従来の細胞保存液を用いた場合でも、細胞は24~72時間程度であれば生存可能とされる。従って、同保存液にCPPを添加したときに、細胞の生存時間が90~120時間(あるいはそれ以上)更に延長されるのか否かを明らかにしたい。また、注目する細胞の生存率がCPP(AFP)の種類に依存して異なるのかどうかを明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) AFP(CPP)量産手法の開発。既に捕獲したカレイやワカサギなどのAFP生産魚種を用いて筋肉すり身懸濁液を調製し、同液から夾雑物を除去してAFPあるいはCPPだけを分離抽出する方法を検討する。また、大腸菌やメタノール資化性酵母などを宿主に用いてCPPの遺伝子組換え体を発現して精製する方法も検討する。ベクターの最適コドンへの置換、重複コピー領域の導入、宿主の選択、高密度培養の利用なども併せて検討する。精製過程におけるCPPの有無は顕微鏡により氷結晶結合機能をアッセイすることで微量かつ瞬時に判定できる。精製試料の安全性を確保する為の手法を検討しエンドトキシン試験も実施する。

(2) AFP(CPP)分子構造解析。上記の量産手法を用いて作製したAFPの天然物と遺伝子組換え体の結晶を結晶化キットにより作製する。つくば放射光実験施設並びに大型放射光実験施設 Spring-8 を用いてX線回折実験を行う。また¹³Cグルコースと¹⁵N塩化アンモニウムを栄養源として含む最少培地により遺伝子組換え体の発現を行う事により¹³C/¹⁵Nラベル化AFPを作製する。この試料に対して現有の高分解能NMR装置を用いて多次元NMRスペクトルを取得することによりAFP(CPP)の構造情報を取得し水溶液構造を決定する。NMRとX線のいずれの構造解析にも研究室内に構築したデータ解析システムを使用する。

(3) CPP細胞保護性能の解析。CPPを溶かした既存の細胞保存液の中にヒト肝癌細胞株 Hep G 2 やマウス膵島細胞株 R I N - 5 F を浸し、走査型電気化学顕微鏡や共

焦点レーザー顕微鏡を用いて各細胞の状態を観察する。更に、CPPが膵島細胞に与える生存率改善効果を染色法やインスリン濃度測定法により解析する。

4. 研究成果

(1) AFP(CPP)量産手法の開発。共同研究先企業より提供を受けたカレイ等魚体の筋肉すり身由来の10~30%純度のAFP(CPP)粗精製品を原材料とすることで約92%純度の高純度品を精製する技術を開発した。HPLC等の微量精製法を使わず、活性炭や樹脂を入れたビーカーに蛋白質溶液を注入溶出する等の大容量・高効率の精製技術を取り入れ、1週間でグラム量の蛋白質を生産する実験システムを作成した(図2)。大腸菌を宿主として用いた遺伝子組換え体の発現精製システムも併せて構築した。従来のCPP天然物について見出された遺伝子を大腸菌のコドンに変換したものを作成したほかプロモータ遺伝子や培養条件の最適化を図った。更にキノコ類AFPの天然物と組換え体の精製法を検討したほか、最少培地による¹³C/¹⁵Nラベル化蛋白質の発現と精製も行い異種核多次元NMR実験用サンプルとした。こうした試料作製方法の確立が全ての研究成果をもたらす基礎になった。



図2. 量産されたAFP(CPP)の高純度試料.

特に、細胞保存実験用CPPの純度をSDS電気泳動と逆相クロマトグラフィーにより精査し、さらにエンドトキシン試験と培養細胞株を使った細胞毒性試験により精査した。エンドトキシン量は血液透析などに用いられる使用基準と同等の低い値であり、試料が十分な安全性を有することが示唆された。

(2) AFP(CPP)分子構造解析。魚類型並びに型AFPに細胞保護効果が確認された為、これらをCPP並びにと呼んでAFPと区別した。CPPの¹³C/¹⁵Nラベル化AFPの作製に成功し、多次元パルスNMR実験とスペクトル解析を行って水溶液構造を決定した(図3左)。また、CPPとしての機能が期待されているキノコ類AFPの分子構造を世界で始めて決定することにも成功した(図3右)。いずれの分子表面にも氷の単位格子様に配置した結合水の組が存在している事が示唆され、4の低温

下に晒された細胞表面を覆う氷様配座をもつ水分子をAFP(CPP)が選択的に認識

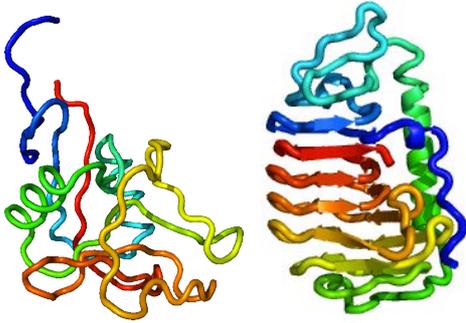


図3. 魚類型CPPとキノコ類AFPの分子構造

して結合する可能性が示唆された。これらの結果に加え、新規に取得した魚類AFPの遺伝子とアミノ組成の解析、蛍光ラベルAFP(CPP)が吸着した氷結晶表面や細胞表面の検出技術、AFP氷結晶形状修飾能の制御技術、AFP様機能を有する合成多糖類の開発などに関して多くの知見を得て論文並びに学会等で発表するに至った。

(3) CPP細胞保護性能の解析。市販の細胞保存液は、無機塩、グリセロール、糖、アミノ酸などを含み、細胞の周囲の浸透圧やpHを整えてなるべく生体内に近い環境を作る働きをする。そこで、タンパク質を含まない

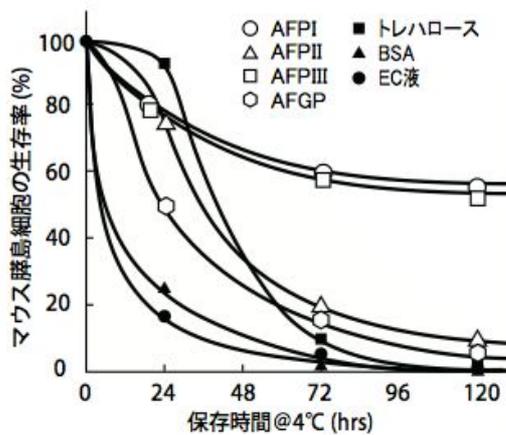


図4. マウス膵島細胞の生存率の経時変化プロット

市販の細胞保存液に各種AFPを溶かした液を用いた場合のマウス膵島細胞の生存率を調べた。AFPとしてはカレイ由来のAFP、ワカサギ由来のAFP、タラ由来のAFGPなどを用いた。対照実験には、細胞保護効果があることで知られるウシ血清アルブミンやトレハロースを細胞保存液に溶解したものを用いた。実験は、37°Cで培養したマウス膵島細胞を10 mg/ml濃度の不凍タンパク質を含む細胞保存液に浸し4°Cの冷蔵庫内で保存して行った。実験開始時の生細胞数を100%として、保存開始から24、72、120時間後の生細胞の割合(%)を調べた。

図4は、市販の細胞保存液()にAFP

(), AFP (), AFGP (), トレハロース (), ウシ血清アルブミン () を溶かしたものを調製し、各々に約100,000個のマウス膵島細胞を浸漬したときの生存率の時間依存性を示したものである。このように、特にカレイ類がもつ不凍タンパク質(AFP)を用いたときに、120時間後で約60%という高い生存率が得られた。これに対し、ウシ血清アルブミンやトレハロースを用いたときには、膵島細胞は72時間以内にほぼ死滅した。更に、このAFPを含む細胞保存液を用いて120時間非凍結温度下で保存した膵島細胞を体温付近(37°C)に戻したところ、保存前と同レベルのインスリン分泌能力を保っていることが判明した。こうしてAFPがCPPとして働くことが示された。

本研究では更に共焦点レーザー顕微鏡を用いてCPP(AFP)が細胞に結合する様子を観察した。CPPを蛍光物質で標識した溶液にマウス膵島細胞を浸し、1時間経過した後の顕微鏡画像を図5左に示す。このように、CPPは膵島細胞の細胞膜にまんべんなく吸着していることが確認された。また、蛍光色素でウシ血清アルブミンを標識したものをを用いて同様の実験を行ったところ、カレイ由来のCPPの細胞膜への結合能力はウシ血清アルブミンよりもはるかに優れていることが判明した(図5右)。

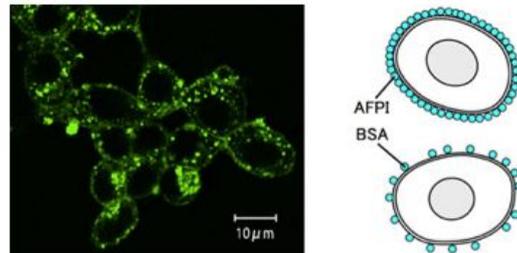


図5. 共焦点レーザー顕微鏡による細胞観察結果

従来の細胞保存液に浸された細胞は、時間経過と共に膨張して最終的に破裂し機能を失うことが示唆されている。従って本実験結果はAFPが細胞膜に吸着して細胞の膨張とそれに続く破裂を抑制し、結果的に細胞機能を維持できる期間を延長すると推察された(図5)。

精製したAFP(CPP)試料に対する純度検定やエンドトキシン検査の結果から、本研究で用いたAFP(CPP)の食用魚類由来天然物試料ならびに遺伝子組換え体の安全性が確かめられた。もしも同試料が副作用を示さずに細胞膜を保護するだけの機能を示すのであれば、これを従来ある様々な細胞保存液に添加するだけで、同液にCPPの細胞保護効果がプラスされる可能性がある。マウス膵島細胞について観察された今回の不凍タンパク質の保護効果はヒトの膵島に対しても同様に発揮されることが期待される。本研究はまた血小板や細胞シートなど凍結に不向きな細胞(群)の非凍結状態における

保存時間を延長する技術をもたらし新たな可能性を示した。

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23件)

Basu, K., Garnham, C.P., Nishimiya, Y., Tsuda, S., Braslavsky, I., and Davies, P.L. : Determining the ice-binding planes of antifreeze proteins by fluorescence-based ice plane affinity. *Journal of Visualized Experiments* 83, e51185 (2014). DOI: 10.3791/51185. 査読有.

Sakaki, K., Cristov N., Tsuda, S., and Imai, R. : Identification of a novel LEA protein involved in freezing tolerance in wheat. *Plant and Cell Physiology*, 55 (1) 136-147 (2014). DOI: 10.1093/pcp/pct164. 査読有.

Kamijima, T., Sakashita, M., Miura, A., Nishimiya, Y., and Tsuda, S. : Antifreeze Protein Prolongs the Life-Time of Insulinoma Cells during Hypothermic Preservation. *PLoS ONE* 8(9), e73643 (2013). DOI:10.1371/journal.pone.0073643. 査読有.

Ideta, A., Aoyagi, Y., Tsuchiya, K., Kamijima, T., Nishimiya, Y., and Tsuda, S. : A simple medium enables bovine embryos to be held for seven days at 4 °C. *Scientific Reports*, 3 (1173) 1-5 (2013). DOI:10.1038/srep01173

Kumeta, H., Ogura, K., Nishimiya, Y., Miura, A., Inagaki, F., and Tsuda, S. : A defective isoform and its activity-improved variant of a type III antifreeze protein from *Zoarces elongatus* Kner. *J. Biomol. NMR*, 55 (2), 225-230 (2013). DOI: 10.1007/s10858-012-9703-9. 査読有.

Izumi, R., Matsushita, T., Ohyabu, N., Fujitani, N., Naruchi, K., Shimizu, H., Tsuda, S., Hinou, H., and Nishimura, S.-I. : Microwave-assisted solid-phase synthesis of antifreeze glycopeptides. *Chem. Eur. J.*, 19, 3913-3920 (2013). DOI: 10.1002/chem.201203731. 査読有.

Garnham, C.P., Nishimiya, Y., Tsuda, S., and Davies, P.L. : Engineering a naturally inactive isoform of type III antifreeze protein into one that can stop the growth of ice. *FEBS Letters*, 586, 3876-3881 (2012). DOI: 10.1016/j.febslet.2012.09.017. 査読有.

津田 栄 : 国産魚類由来の不凍タンパク質 . 日本極限環境生物学会誌 (Mini Review)、vol.11、No.2、2012、pp.64-69. <http://www.extremophiles.jp/gakkaishi.html>. 査読有.

Kondo, H., Hanada, Y., Hoshino, T., Garnham, C.P., Davies, P.L., and Tsuda, S. : Ice-binding site of snow mold fungus antifreeze protein deviates from structural regularity and high conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109 (24), 9360-9365 (2012). DOI: 10.1073/pnas.1121607109. 査読有.

Ishiwata, A., Sakurai, A., Nishimiya, Y., Tsuda, S., and Ito, Y. : Synthetic study and structural analysis of the antifreeze agent xylomannan from *Upis ceramboides*. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 19524-19535 (2011). DOI: 10.1021/ja208528c. 査読有.

[学会発表](計40件)

津田 栄 : 不凍蛋白質の機能解明に基づく技術創生 . 第1回北海道大学オープンファンシリティシンポジウム、2014年3月10日 . 札幌市 . 招待講演 .

出田篤司、津田 栄、西宮佳志、土屋加那美、中村雄気、青柳敬人 : Hypothermic storage for 10 days of bovine embryos using type III antifreeze protein. 2014 Meeting of International Embryo Transfer Society (IETS) 2014年1月11日 . ネバダ州レノ市、米国 .

出田篤司、津田 栄、西宮佳志、土屋加那美、中村雄気、青柳敬人 : 不凍蛋白質 (AFP) を利用した牛初期胚の非凍結保存液開発に関する研究 . 日本胚移植研究会研究発表大会 . 2013年8月26日 . 札幌市 .

津田 栄 : Antifreeze Protein from Japanese Organisms: Functional Analysis for the General Use. 50th Annual Meeting of the Society for Cryobiology (CRYO2013)、2013年7月29日 . ワシントン DC, 米国 . 招待講演 .

石原和成、花田祐一、近藤英昌、三浦 愛、津田 栄 : トウガレイ由来 I 型不凍蛋白質の構造機能解析 . 日本生物物理学会年会、2013年10月29日 . 京都市 .

花田祐一、近藤英昌、三浦 愛、津田 栄 : Ice-Binding Structure of a bacterial hyperactive antifreeze protein. 第7回国際構造ゲノム会議-構造生命科学 (ICSG2013-SLS) 2013年7月30日 . 札幌市 .

津田 栄 : NMR Analyses to identify key determinants to regulate ice-binding activity of type III antifreeze protein. 2012 生体磁気共鳴国際会議(ICMRBS2012). リヨン, 仏国.

津田 栄 : Recent technological developments utilizing antifreeze protein. 1st International Ice-Binding Protein Conference and Workshop (IBP2011), 2011 年 8 月 3 日、キングストン, カナダ. 招待講演.

津田 栄 : 不凍タンパク質の分子機能解明に基づく新技術の創成. 極限環境生物学会第 12 回シンポジウム. 2011 年 6 月 13 日. つくば. 招待講演.

津田 栄 : 不凍タンパク質の分子機能解析と応用技術研究. 酵素工学会 第 65 回講演会. 2011 年 4 月 22 日、京都. 招待講演.

〔図書〕(計 1 件)

近藤英昌、津田 栄、シーエムシー出版(監修: 今中忠行). 極限環境生物の産業展開. 2012 年、121-129.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 細胞延命効果を有するペプチドを用いた牛胚の不凍結保存液及び保存方法
発明者: 西宮佳志、上島達郎、津田 栄
権利者: (独) 産業技術総合研究所
種類: 特許
番号: 特願 2012-019052
出願年月日: 2012 年 01 月 31 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

プレスリリース・報道・広報誌ほか

産総研 TODAY Research Hotline 「細胞治療に役立つカレイ由来不凍タンパク質 - 鱒島細胞の 120 時間チルド保存を可能に -」2014 年 3 月 6 日.

つくばサイエンスニュース 「マウスの鱒島細胞、凍結せず 5 日間の保存に成功 - カレイから抽出の不凍タンパク質使う」2013 年 9 月 16 日.

日経バイオテク ON LINE アカデミック版 「産総研、魚の不凍たんぱく質で鱒島細胞を 120 時間非凍結保存、ニチレイが素材提供」2013 年 10 月 2 日

産総研公式 HP 「主な研究成果: カレイ由来

の不凍タンパク質により細胞保存期間を延長 - 120 時間の非凍結保存をマウス鱒島細胞で実証 -」2013 年 9 月 20 日.

SPRING-8 大型放射光施設 光のひろば 「キノコの不凍タンパク質 不凍機能の解明」2012 年

産総研 TODAY Research Hotline 「キノコの不凍タンパク質 強力な不凍機能をもつタンパク質の立体構造を決定」2012 年 12 月号.

つくばサイエンスニュース 「キノコの不凍タンパク質の分子構造と機能を解明: 産業技術総合研究所/北海道大学など」2012 年 6 月 3 日

産総研公式 HP 「プレスリリース: キノコの不凍タンパク質の分子構造と不凍機能のメカニズムを解明 - 強力な不凍機能をもつタンパク質をキノコが生産 -」2012 年 5 月 29 日.

研究成果を公開している HP:

<https://staff.aist.go.jp/s.tsuda/> 他

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 栄 (TSUDA, Sakae)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・上級主任研究員

研究者番号: 7 0 2 1 1 3 8 1

(2) 研究分担者

近藤英昌 (KONDO, Hidemasa)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号: 8 0 3 5 7 0 4 5

研究分担者

西宮佳志 (NISHIMIYA, Yoshiyuki)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号: 0 0 3 5 7 7 1 6

研究分担者

坂下真実 (SAKASHITA, Mami)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号: 2 0 3 5 7 0 9 9

(3) 連携研究者

なし