

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550195

研究課題名(和文) リポソームを駆使した脂質結合型蛋白質のシームレスな半合成と細胞表面ターゲット

研究課題名(英文) Enhancement by liposome of semi-synthesis of specifically modified protein at the C-terminal and application to living cell

研究代表者

照屋 健太 (Teruya, Kenta)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30372288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質の部位選択的の化学修飾を疎水性化合物によって行うことを目的とした。解決しなければならぬ課題として、反応時の蛋白質変性、縮合精製物の単離、細胞へ添加する際の毒性の低減があり、リポソームを利用することによってこれらの問題を回避することが可能であるかどうかを検証した。結果として縮合生成物の単離、細胞への添加はリポソームを用いることでスムーズに行えたが、細胞での応用では吸着蛋白質のリリースが問題となった。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, semi-synthesis of protein specifically modified with lipophilic compounds was carry out, but not effective. Denaturing protein during the specific condensation, purification of coupling product, and toxicity to live cell are to be adapted for improving effectively. To overcome these difficulties, liposome was employed in each step. As results, separation of coupling product from reaction mixture of condensation, and condensation avoiding denature of protein were carried out smoothly. However, use of liposome in coupling without detergent was not effective. Andmore, release of protein from the liposome was not effective when liposome harboring modified protein was applied to living cell.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合科学・生体関連科学

キーワード：リポソーム 縮合 蛋白質 細胞表面

1. 研究開始当初の背景

(1) 蛋白質ライゲーションの開発・展開により、半合成による位置選択な修飾反応は近年増加している。様々な翻訳後修飾のうち、脂質による蛋白質修飾では、細胞内外の局在を変化させその機能の変化が興味深いものが多いのにもかかわらず、先の選択的修飾では水溶性の化合物の導入した実験例が多く、脂質修飾を施し、生細胞系へ応用した例はほとんど見られなかった。このような背景から代表者は位置選択的蛋白質脂質修飾反応に取り組んだ。調製において、修飾反応時に蛋白質は変性を避けなければならないが、脂質を溶解させるためには、界面活性剤などの投入が必須である。界面活性剤による蛋白質変性を回避するとともに、縮合反応の結果として得られる選択的脂質修飾蛋白質を生細胞等へ応用する際には反応系から界面活性剤を徹底的に除去する必要があるためである。これまでの研究から代表者は、以上のような結論を得た。

(2) リポソームは細胞の人工的なモデルや、薬剤を内包させる目的で汎用されているが、リポソーム形成のためには一度メタノールやクロロホルム等の有機溶媒に溶解させる必要があるため、一般的に蛋白質を変性させることなく、リポソームの形成過程に組み込むことは不可能と考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では翻訳後修飾を模倣する蛋白質分子を生細胞に応用するために、背景の項に述べた内容を実際に検証し、その解決策を提示することを目的とする。上記の目的に合致させるよう、精製を含めた蛋白質 C 末端脂質修飾体半合成のスキームを再検討する。

(2) リポソームを利用することによって蛋白質 C 末端脂質修飾体半合成が機能するかどうかを検証する。

(3) リポソーム上に結合させた蛋白質 C 末端脂質修飾体を生細胞に利用することが可能であるかどうかを検証する。

3. 研究の方法

試験物の調製は、蛋白質部分を蛋白質工学的な調製を利用して C 末端チオエステルとし、修飾部分は N 末端に相当する部分に Cys 残基を配置した修飾部分を化学合成で調製する。蛋白質工学とペプチド化学合成の融合を旨の一つとしている。また、以上の目的を達成する修飾蛋白質調製のためには、蛋白質変性条件を経るはならないという制約を設けた。緑色蛍光蛋白質は変性後では蛍光の回復が困難であることが知られており、変性した蛋白質は検出できないとする。

(1) 試験化合物・蛋白質の調整

緑色蛍光蛋白質 C 末端チオエステル誘導体作成用、(GFP)-intein-CBD 三者融合蛋白質の発現・精製についてはすでに報告してい

る。本申請研究では、縮合生成物と界面活性剤との簡便な分離を指向して、上記融合蛋白質に His タグを導入した発現コンストラクトを構築し、カラム上での洗浄に対しての耐性を試験する。

上記融合蛋白質からチオリシスで得られた(His)-GFP-C チオエステルに対して脂質結合性のペプチドを蛋白質ライゲーションによって融合させる。また、そのためのペプチド合成も併せて行う。

(2) 縮合反応・分離・細胞添加へのリポソーム利用

選択的脂質修飾蛋白質が脂質結合能を獲得できるかどうかを、リポソームへの結合を調べることによって検証する。

(1)の修飾反応の反応液から修飾体のみを精製することができるかどうかを検証する。

修飾する物質によってリポソームへの結合能がどのように変化するかを検証する。

縮合方法として、あらかじめ修飾化合物を組み込んだリポソームを調製し、蛋白質部分とリポソーム上で縮合反応が可能であるかどうかを検証する。

(3) 選択的脂質修飾蛋白質を細胞に添加する際にリポソームが利用可能であるか検証する。

選択的脂質修飾蛋白質を結合させたリポソームを細胞培養時に添加することによって選択的脂質修飾蛋白質が、細胞表面上に移動可能であるか検証する。細胞はマウス神経芽細胞を用い、蛋白質として緑色蛍光蛋白質を用いることで直接その局在を追跡することが可能である。

4. 研究成果

(1) 緑色蛍光蛋白質 C 末端チオエステル誘導体作成用蛋白質発現コンストラクトを基にして GFP のアミノ末端に His タグを Flag タグ・エンテロキナーゼ切断部位を介して導入したプラスミドを構築し、シーケンスを確認した。目的とする融合蛋白質は問題なく得られ、融合蛋白質の状態では GFP は蛍光を発し、キチンカラムに結合することから融合蛋白質全体についてきちんとしたフォールドを有していることが示唆された。インテインの活性、蛋白質スプライシング反応、を利用したチオリシスを行い、界面活性剤非存在下でシングルバンドの緑色蛍光蛋白質チオエステル誘導体(HisGFP-SR)をえた。(図 x のコンロロール)

得られた HisGFP-SR を用いて、アルコールによる変性実験を実施したところ、メタノール、エタノールともに、30%まで GFP の特異的な吸光が 24 時間維持された。このことにより GFP の脂質修飾に際して、界面活性剤除去のために、少量のアルコールを使用して洗浄することが可能であることが示された。(図 1)

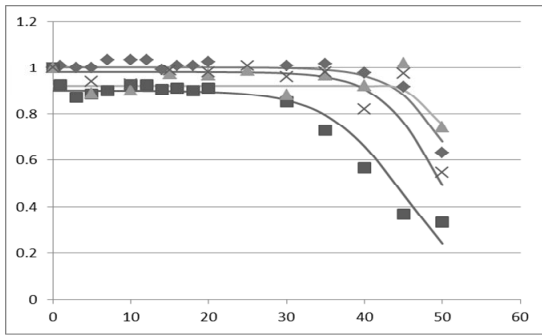


図1 GFP 誘導体のアルコール変性 (横軸は溶液中のアルコール濃度、縦軸は GFP の 488nm での相対的吸光度)

細胞膜表面にある、あるいは細胞表面への結合活性が知られている以下の3種類のペプチドを合成した。すなわち、(a) C 末端 cholesterol 修飾プリオン蛋白質部分ペプチド(PrP(213-230)-linker-cho), (b)狂犬病ウイルス糖蛋白質由来ペプチド (RVGp)、(c) NP41 ペプチドである。(a)は保護・脱保護を工夫することにより、C 末端にリンカーを介したコレステロール修飾を行ったものであり、(b),(c)は神経細胞への結合が確認されているペプチド配列である。これらのペプチドの伸長反応は通常のペプチド合成を用いている。

上記の N 末端にシステインを持つペプチドと HisGFP-SR とを Native chemical ligation 法によるセグメントの縮合を行った。この縮合ではチオール - チオエステル交換反応を起こして S-アミノアシルシステインを生成し、これがさらに分子内で S-N アシル基転位反応を起こし、ペプチド結合が生成される。図2は、HisGFP-SR と PrP(213-230)-linker-cho のスキームを示している。図3は界面活性剤として、CTAB を用いた縮合時の様子である。

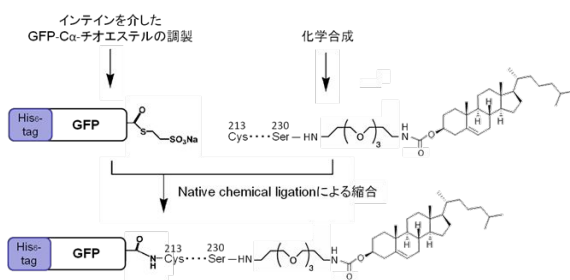


図2 縮合反応のスキーム

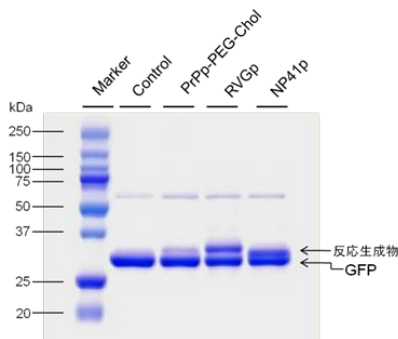


図3 縮合反応液の SDS-PAGE

化合物・ペプチドと結合した蛋白質は移動度のシフトが観察された。この反応後の溶液の処理としては界面活性剤の除去が必要である。透析による除去を試みたところ、縮合した蛋白質は透析膜に強固に結合し洗い出されてこないことが観察された。そこで、反応液を Ni-NTA カラムに結合させ、大量のバッファーで洗浄すると同時に、蛋白質の濃縮が可能であることがわかった。

(2) 縮合反応・分離へのリポソーム利用

先の縮合では界面活性剤存在下で行った(図2)。この脂質結合部分をリポソーム形成時に混在させることにより、チオエステルとの反応部位を含んだリポソームの作成を試みた。今回は、リンカーを含まず、フォスファチジルエタノールアミン(PE)を脂質として選択し、システインが末端になるように合成(Cys-PE)を行った。これらを含みリポソームを形成させた。TLC 上で確認を行ったところ、Cys-PE はリポソームに取り込まれたものの、GFP チオエステルとの反応は追跡できず、リポソーム上に十分な蛍光は検出されなかった。この解決策として、PE と Cys の間に親水性リンカーを挿入した化合物の合成を完了したが、この系で反応の確認は行っていない。

PrP(213-230)-linker-cho および対照として PrP(213-230)-linker と縮合した HisTag-GFP-C -チオエステルを含む溶液を、細胞膜のモデルとしてリポソーム懸濁液と混合した。一定時間の後、遠心分離でリポソームを回収し、その懸濁液を UV ランプで観察すると、HisTag-GFP-PrPp-PEG-Chol との混合液で GFP 由来の蛍光が見られた(図4)。さらに、SDS-PAGE で上清およびリポソームに含まれる蛋白質成分を分析すると、未反応の GFP は上清に回収され、脂質結合部を持つ縮合生成物のみがリポソームに結合していることが明らかになった(図5)と、同時に反応液から、簡便に縮合生成物を濃縮することが可能となった。

上記のように蛋白質ライゲーションを利用した部位特異的蛋白質脂質修飾体の半合成による調製において、リポソームは縮合生成物の精製および濃縮に非常に有用であることが明らかになった。

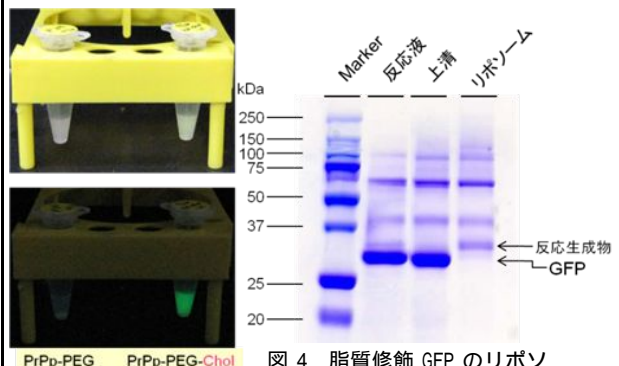


図4 脂質修飾 GFP のリポソームへの結合

(3) リポソームの生培養細胞への利用

Cys-PE に蛍光標識を導入し、最初の試験体とした。この化合物では変性を考慮しない調製系を組めるので、最初のコントロールとした。培養細胞に Cys-PE 蛍光物質誘導体を導入した結果、PE のうち、ジミリスチル型がジパルミトイル型よりも Neuro2a 細胞に対して良好な結合を示し、検出に必要なおよその量を推定する判断材料となった。His-GFP の PE 修飾体では、縮合反応後の透析時に透析膜への吸着がみられ必要な縮合生成物を得ることができず、生細胞への投与は実施できなかった。

リポソーム上に結合させた蛋白質 C 末端脂質修飾体を細胞培養培地中に添加したところ、HisTag-GFP-PrPp-PEG-Chol 含有リポソームは FBS を含む培地中で凝集し、その凝集体でのみ蛍光が観察された。その後 12 時間ほどの時間を置いたが、細胞で GFP 由来の蛍光は観察できなかった。

以上の結果から、リポソームを変性状態を避けなければならぬ蛋白質の脂質修飾体半合成の過程に組み込むことができ、精製や濃縮に有用であり、一連の調製過程をスムーズに進行させることが可能であった。しかしながら、生細胞系にまでその応用を広げるためには、リポソーム表面から脂質修飾体半合成を再びリリースさせる工夫が必要であることがわかった。リポソームの組成や、細胞に添加する際の溶液条件等の検討が必要であることがわかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Shirai T, Saito M, Kobayashi A, Asano M, Hizume M, Ikeda S, Teruya K, Morita M, Kitamoto T.

Evaluating prion models on comprehensive mutation data of mouse PrP

Structure, 22, 560-571, 2014

doi: 10.1016/j.str.2013.12.019.

Nishizawa K, Oguma A, Kawata M, Sakasegawa Y, Teruya K, Doh-ura K.

Efficacy and mechanism of a glycoside compound inhibiting abnormal prion protein formation in prion-infected cells: implications of interferon and phosphodiesterase 4D interacting protein

Journal of Virology, 88, 4083-4099, 2014

doi: 10.1128/JVI.03775-13.

Teruya K and Doh-ura K.

Amyloid-binding compounds and their anti-prion potency

Current Topics in Medicinal Chemistry 13:2522-2532, 2013.

<http://www.eurekaselect.com/115698/a>

rticle

Hattori Y, Kinami G, Teruya K, Nosaka K, Kobayashi K, Akaji K.

A Practical Synthesis of a Hydroxylated Sesquiterpene Coumarin 10' R-acetoxy-11'-hydroxyumbelliprenin by the regioselective dihydroxylation

HETEROCYCLES, 87, 423-428, 2013

DOI: 10.3987/COM-12-12636

Teruya K, Tanaka T, Kawakami T, Akaji K, Aimoto S.

Epimerization in Peptide Thioester Condensation.

Journal of PEPTIDE SCIENCE 18, 669-677, 2012

doi: 10.1002/psc.2452

Kawahara I, Haruta K, Ashihara Y, Yamanaka D, Kuriyama M, Toki N, Kondo Y, Teruya K, Ishikawa J, Furuta H, Ikawa Y, Kojima C, Tanaka Y.

Site-specific isotope labeling of long RNA for structural and mechanistic studies.

Nucleic Acids Research. 40, e7, 2012

doi: 10.1093/nar/gkr951.

Akaji K, Konno H, Mitsui H, Teruya K, Shimamoto Y, Hattori Y, Ozaki T, Kusunoki M, Sanjoh A.

Structure-Based Design, Synthesis, and Evaluation of Peptide-mimetic SARS 3CL Protease Inhibitors

Journal of Medicinal Chemistry 54, 7962-7973, 2011.

doi: 10.1021/jm200870n.

Unno M, Shinohara M, Takayama K, Tanaka H, Teruya K, Doh-ura K, Sakai R, Sasaki M, Ikeda-Saito M.

Binding and Selectivity of the Marine Toxin Neodysiherbaine A, and its Synthetic Analogues, to GluK1 and GluK2 Kainate Receptors

Journal of Molecular Biology 413, 667-683, 2011.

doi: 10.1016/j.jmb.2011.08.043.

Kakizawa T, Sanjoh A, Kobayashi A, Hattori Y, Teruya K, Akaji K.

Evaluation of superior BACE1 cleavage sequences containing unnatural amino acids.

Bioorganic Medicinal Chemistry 19, 2785-2789, 2011.

doi: 10.1016/j.bmc.2011.

[学会発表](計 11 件)

第 31 回 メディシナルケミストリーシンポジウム 2013 年 11 月 広島

ヒドロキシメチルカルボニル型及びヒドロキシエチルアミン型 BACE1 阻害剤の合成と活性評価

小林数也、秋山朋美、野原由江、後藤紗希、岡部真実、佐藤夏美、伊藤美紀、上野佳奈美、服部恭尚、照屋健太、三城明、中川敦史、山下栄樹、赤路健一

4th Asia-Pacific International Peptide Symposium (APIPS), Nov. 8, Osaka.
Evaluation of Hydroxymethylcarbonyl- and Hydroxyethylamine-type BACE1 Inhibitors Containing a Superior BACE1 Cleavage Sequence.

Kazuya Kobayashi, Tomomi Akiyama, Yukie Nohara, Saki Goto, Mami Okabe, Natsumi Sato, Miki Itoh, Kanami Ueno, Yasunao Hattori, Kenta Teruya, Akira Sanjho, Kenichi Akaji.

日本薬学会 第 133 年会 2013 年 3 月 27-30 日、横浜

ヒドロキシエチル型 BACE1 阻害剤の設計と立体選択的合成

野原由江、秋山明美、佐藤夏美、岡部真美、小林数也、服部恭尚、照屋健太、今野博行、赤路健一

メディシナルケミストリーシンポジウム 2012 年度大会 (2012 年 11 月 28-30 日、東京)

複合体構造に基づくペプチド型 SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤の設計・合成と活性評価

服部恭尚、今野博行、照屋健太、三城明、尾崎健、楠木正己、赤路健一

第 49 回ペプチド討論会 (2012 年 11 月 7-9 日、鹿児島市)

SARS 3CL プロテアーゼ・阻害剤複合体の構造解析

照屋健太、尾崎健、今野博之、服部恭尚、楠木正己、三城明、赤路健一

第 49 回ペプチド討論会 (2012 年 11 月 7-9 日、鹿児島市)

Ti(IV)を用いた還元的アミノ化反応による置換基導入を行ったヒドロキシエチルアミン骨格の合成

野原由江、岡部真実、小林数也、服部恭尚、照屋健太、今野博行、赤路健一

第 49 回ペプチド討論会 (2012 年 11 月 7-9 日、鹿児島市)

BACE1 高認識切断配列を含むヒドロキシエチル型阻害剤の合成

秋山朋美、後藤紗希、山口充、小林数也、相馬洋平、服部恭尚、照屋健太、今野博行、赤路健一

第 37 回反応と合成の進歩シンポジウム (2011 年 11 月 7-8 日、徳島市)

BACE1 阻害剤を指向した置換ヒドロキシエチルアミン型プロテアーゼ阻害剤の合成と評価

服部恭尚、西崎綾、出口綾香、嶋本康弘、照屋健太、三城明、今野博行、赤路健一
たんぱく研セミナー「ペプチド・蛋白質合成の未来像」 (平成 24 年 3 月 3 日、

吹田市)

Interactions of prion protein

照屋健太

AI MECS11 (November 31-December 2, 2011, Tokyo, Japan)

Syntheses of Hydroxyethylamine Derivatives Containing Side-Chain Mimetic and Peptide Sequence for BACE1 inhibitor

Hattori, Y.; Akiyama, T.; Nohara, Y.; Nishizaki, A.; Deguchi, A.; Shimamoto, Y.; Teruya, K.; Konno, H.; Akaji, K.
第 48 回ペプチド討論会 (2011) 札幌市 平成 23 年 9 月 27-29 日

C 末端を疎水性化合物で修飾したタンパク質へのリポソームの選択的な結合
遠藤祐里奈・服部恭尚・赤路健一・照屋健太

6. 研究組織

(1) 研究代表者

照屋 健太 (TERUYA, Kenta)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30372288