

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560955

研究課題名(和文) 遺伝子の自在な装填を可能にする高効率タンパク質 - 核酸ハイブリッド型ベクターの創製

研究課題名(英文) Protein-nucleic acid hybrid vector capable of easily binding genes

研究代表者

後藤 猛 (Gotoh, Takeshi)

秋田大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10215494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：膜透過ペプチドとしてHIV-1由来のTAT，核移行シグナルとしてSV40由来のNLSを付加したEGFPを用い，EGFPのSf9昆虫細胞への輸送挙動を共焦点レーザー顕微鏡により調べた。その結果，TATとNLSをこの順にEGFPに結合させることにより，EGFPはSf9の細胞膜を透過して30分以内に核内まで輸送されることが分かった。次に，TAT-NLSを付加した活性型および不活性型ストレプトアビジンの1：3四量体を作成し，さらにこれにビオチン化遺伝子と結合させ，TATとNLSを有する新規な遺伝子ベクターを構築した。現在，Sf9細胞を用いてこの遺伝子ベクターの輸送能および輸送条件を検討している。

研究成果の概要(英文)：Using cell penetrating peptide TAT (YGRKKRRQRR) from HIV-1 and nuclear localization signal NLS (PKKKRKV) from SV40 virus, which were attached to enhanced green fluorescent protein (EGFP), we examined the cellular uptake and nuclear localization of EGFP by Sf9 insect cells by confocal laser scanning microscopy. As a result, it was found that EGFP carrying both TAT and NLS at the N-terminal end in this order possessed the ability to cross the plasma membrane and nuclear membrane of Sf9 within 30 min. The 1:3 tetramer of active and inactive streptavidin (STVa and STVd), which had TAT and NLS at the N-terminal end in this order, was prepared, and a novel gene vector made up of the streptavidin tetramer and biotinylated gene was constructed. The biotinylated gene was prepared by annealing and ligating a synthetic biotinylated oligonucleotide and a gene having the complementary cohesive end. We are now investigating cellular uptake and nuclear localization of the vector by Sf9.

研究分野：生物化学工学

キーワード：gene delivery streptavidin TAT NLS insect cell

1. 研究開始当初の背景

宿主細胞を用いた組換えタンパク質の生産や遺伝子治療などの観点から、遺伝子の細胞導入に関する数多くの研究が行われてきた。細胞内遺伝子導入のためには、ヌクレアーゼ分解などの生化学的な障害の他、特に細胞膜および核膜の物理的な障害の克服が重要である。培養細胞への核酸導入方法として、リン酸カルシウムや DEAE デキストランとの複合体およびリポソーム封入体をエンドサイトーシスにより取り込ませる方法、高電圧パルスによって細胞膜に空けた穿孔や顕微鏡下で細胞に刺した極細針を介して直接注入する方法などがある。前者のエンドサイトーシス法ではその導入効率は低く、細胞に対して大過剰の DNA が必要となる。一方、後者の物理的注入法の遺伝子導入効率は比較的高いものの特殊な装置を必要とする上、対象は培養細胞に限られる。

自然界で生じる遺伝子導入の例として、ウイルスによる細胞感染が上げられる。中でも、細胞膜を有するエンペロウイルスは、表面タンパク質に膜透過ペプチドと呼ばれる配列を有し、これをあたかも鉤のようにエンドソーム膜に挿入して膜と融合してエンドソームから脱出する。一方、通常の生理状態でも、細胞自身の様々なシグナルペプチドがタンパク質の細胞内トラフィッキングに関与している。核内のタンパク質も核移行シグナルと呼ばれる配列を有し、細胞質で合成された後にインポーチンと呼ばれるタンパク質の助けをかりて核膜の細孔から核内部に輸送される機構が明らかになっている。

近年、このような能動的な細胞内移動メカニズムを遺伝子導入に応用する研究が進められている。例えば、リジンに富むタンパク質のシグナルペプチド付加体に DNA を静電的に吸着させた複合体は、エンドソームからの脱出と核への輸送が促進されることが報告されている。しかし、このようなシグナルペプチドと遺伝子の複合体の導入効率は十分とはいえず、複合体の構造および細胞内安定性に関して更なる研究が求められている。

2. 研究の目的

バキュロウイルスを遺伝子ベクターとする昆虫細胞による組換えタンパク質生産は、培養が容易で高発現と翻訳後修飾が可能である等の優れた特徴を有しているため、哺乳動物細胞のタンパク質生産の方法として盛んに利用されている。しかし、組換えバキュロウイルスの構築に時間を要する他、ウイルスは不安定であること、低下するウイルスの力価をその都度求めなければならず、それには煩雑な操作と時間、熟練が必要とされるなど、問題も多い。本研究では、ストレプトアビジンと TAT および NLS の融合体を構築し、これに目的遺伝子を結合させた、タンパク質と核酸からなるハイブリッド型のベクター (PNh ベクター) を開発することを目的とする。

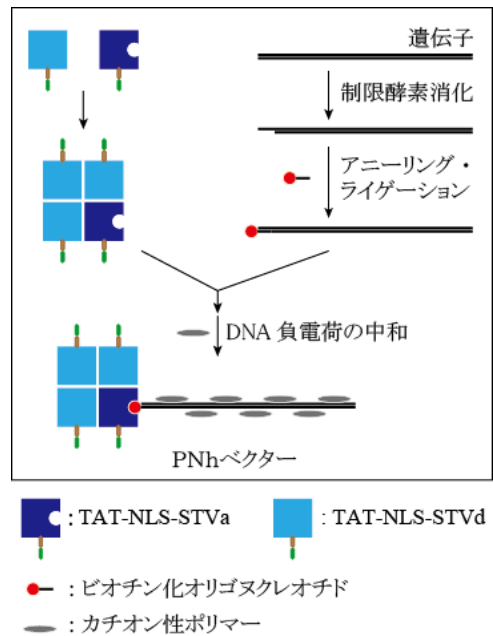


図1 PNhベクター構築スキームの概念図

3. 研究の方法

(1) シグナルペプチドのデータベースおよび論文検索から、膜透過ペプチドとして HIV-1 由来の TAT (YGRKKRRQRR)、核移行シグナルとして SV40 由来の NLS (PKKKRKV) を選択した。これらの昆虫細胞への輸送能を明らかにするために、ストレプトアビジンの代わりに強化緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を用い、その N 末端側に TAT および NLS を有し、さらに精製のための His タグを C 末端側に有する EGFP の発現ベクターを 4 種類、コントロールとして単独の EGFP 発現ベクターをそれぞれ構築した。これらを用いて大腸菌 Express Iq (NEB) を形質転換し、IPTG によりこれらの組換えタンパク質を発現させた。大腸菌を超音波破碎して得られた可溶性画分を Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、EGFP、TAT-EGFP、NLS-EGFP、TAT-NLS-EGFP、さらにシグナルペプチドの結合順序が異なる NLS-TAT-EGFP を得た。

(2) 昆虫細胞に *Spodoptera frugiperda* Sf9 を用いた。Sf9 を新鮮培地に懸濁させて DAPI により細胞核を染色するとともに、シグナルペプチド付加 EGFP を添加して 28 °C で所定時間インキュベートし、EGFP の昆虫細胞内への輸送の挙動を蛍光顕微鏡ならびに共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(3) ストレプトアビジンは四量体を形成するために、これにビオチン化遺伝子を結合させると複合体は巨大化して細胞輸送に影響を及ぼすことが危惧される。そこで、通常の高活性型ストレプトアビジン (STVa) と共にビオチン結合能の無い不活性型 (STVd) も用いることとし、それぞれの TAT、NLS、His タグ付加体の cDNA を有する pCold I (Takara) 発

現ベクターを構築し、大腸菌 BL21 を形質転換した。コールドショックおよび IPTG による発現誘導の後、Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製して TAT-NLS-STVa および TAT-NLS-STVd を得た。これらを 6 M グアニジン塩酸塩で変性させ、TAT-NLS-STV-a と TAT-NLS-STV-d を 1 : 3 で混合した溶液を透析してストレプトアビジン四量体を再構成した。

(4) 緑色蛍光タンパク質変異体 (GFPuv) の cDNA を有する組換えバキュロウイルス DNA を鋳型とし、Sph I 認識配列を付加したプライマーを用いてバキュロウイルスポリヒドロプロモーター (P_{polh}) の上流から終止コドンの下流までを含む領域を PCR 増幅した。Sph I で処理した後、ピオチン化オリゴヌクレオチドとアニーリングさせ、ライゲーション処理した。得られたピオチン化 DNA および TAT-NLS-STVa と TAT-NLS-STVd の 1 : 3 四量体を混合し、さらに DNA の負電荷の中和のために PEI を十分量添加して PNH ベクターを構築した。

4. 研究成果

(1) 組換え大腸菌により発現させたシグナルペプチド付加 EGFP を Ni アフィニティークロマトグラフィーにより精製して SDS-PAGE で確認したところ、EGFP、TAT-EGFP、NLS-EGFP、TAT-NLS-EGFP および NLS-TAT-EGFP がほぼ単一に精製できたことを確認した。そこで、これらを Sf9 昆虫細胞の懸濁液に添加して 28 °C でインキュベートし、EGFP の細胞内輸送の経時的な挙動を蛍光顕微鏡により観察した。その結果を図 2 に示す。シグナルペプチドを有していない単独の EGFP および NLS-EGFP を添加した場合は、30 分経過後も細胞内からの蛍光がほとんど見られなかった。一方、TAT を有する TAT-EGFP、TAT-NLS-EGFP および NLS-TAT-EGFP を添加した場合、10 分後には EGFP による緑色蛍光

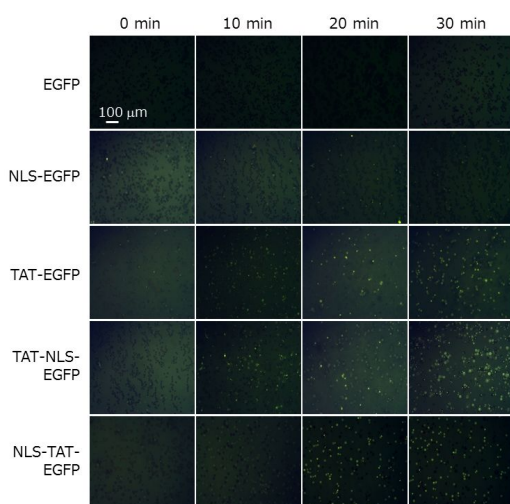


図 2 シグナルペプチド付加 EGFP の Sf9 昆虫細胞への輸送挙動

を発する細胞が確認され、その細胞数は時間経過とともに増加した。

そこで、各シグナルペプチド結合 EGFP の添加 30 分後における昆虫細胞内の EGFP の分布状況を共焦点レーザー顕微鏡により調べた。その結果を図 3 に示す。TAT を有していない単独の EGFP 並びに NLS のみを付加した EGFP を添加した場合、先と同様に Sf9 昆虫細胞内に EGFP に起因する蛍光は認められない。これに対して、TAT-EGFP では細胞全体から蛍光が観察され、さらに TAT-NLS-EGFP では蛍光は昆虫細胞の核の位置に局在化していることが分かった。このことから、EGFP は TAT により Sf9 昆虫細胞内に輸送され、さらに NLS により核内にまで輸送されることが確認された。

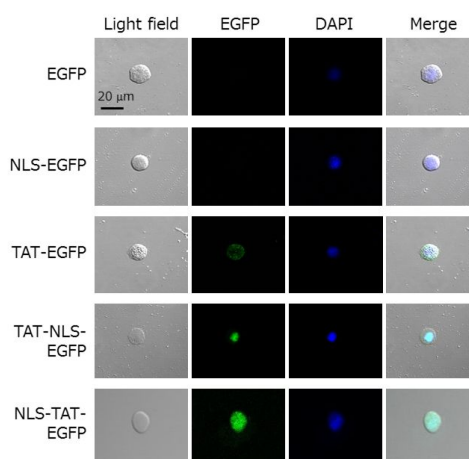


図 3 シグナルペプチド付加 EGFP の添加 30 分後における Sf9 昆虫細胞内分布

一方、TAT と NLS の位置関係を逆にした NLS-TAT-EGFP を用いたところ、EGFP は Sf9 昆虫細胞内に輸送されるものの細胞核内には到達できていない。これは、細胞膜透過後に TAT 部位が加水分解され、核移行シグナルである NLS が EGFP から脱離してしまったためと思われる。

以上の結果から、TAT ペプチド と NLS ペプチドを目的タンパク質の N 末端に付加することにより、細胞外から昆虫細胞の核内に短時間で輸送させることが可能であり、それらの結合順序は NLS、TAT とする必要があることが分かった。

(2) 図 1 に示す遺伝子ベクターのタンパク質部位を調製するために、N 末端側から TAT と NLS を付加したストレプトアビジン 2 種 (TAT-NLS-STVa と TAT-NLS-STVd) の cDNA を有する、pUC18 ならびに pCold I をベースとするプラスミドベクターを調製し、大腸菌 Express Iq および BL21 をそれぞれ形質転換した。図 4 は、得られた組換え大腸菌を培養して発現したタンパク質を SDS-PAGE で分析した結果を示している。pUC18 ベースの組換え大腸菌 Express Iq では不溶性の TAT-NLS-STVa と TAT-NLS-STVd が大量に生

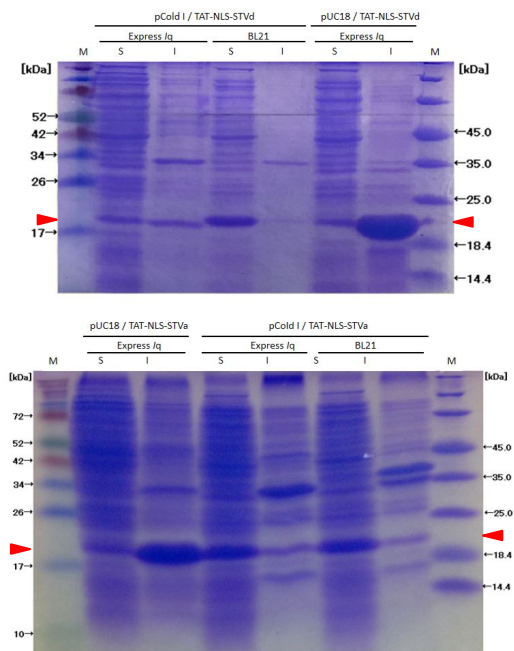


図4 組換え大腸菌により発現させたシグナルペプチド付加ストレプトアビジンのSDS-PAGE分析

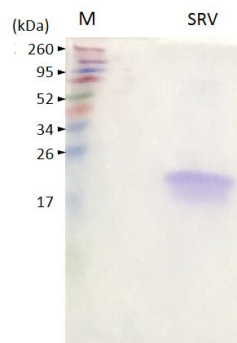


図5 Ni カラムアフィニティクロマトグラフィー精製後のシグナルペプチド付加ストレプトアビジンのSDS-PAGE分析

成するのに対し、pCold I のコールドショック発現系では、可溶性画分により多くの組換えタンパク質が生成していた。

可溶性 TAT-NLS-STVa と TAT-NLS-STVd を回収し、Ni-アフィニティクロマトグラフィーにより精製したところ、SDS-PAGE でほぼ単一バンドに精製された(図5)。そこで、これらをグアニジン塩酸塩溶液で変性させた後、TAT-NLS-STVa と TAT-NLS-STVd を 1:3 の割合で混合し、透析により四量体を形成させた。一方、 P_{polh} 下流に GFPuv 遺伝子を付加した DNA を Psh I で消化し、その付着末端と相補的なオリゴヌクレオチドのビオチン化体をアニーリングさせ、ライゲーションした。これに PEI 溶液を添加してインキュベートし、PNh ベクターを構築した。

この PNh ベクターを Sf9 昆虫細胞懸濁液に添加して 28 でインキュベートした。しかし、3 日後においても GFPuv 発現に起因する緑色蛍光を発する細胞は認められなかった。PEI のみで被覆した DNA による動物細胞のトラ

ンスフェクションは、効率は極めて低いもの可能であると報告されているが、コントロールとして用いた、DNA のみを PEI で負電荷を中和したものについても GFPuv の発現は確認されなかった。したがって、添加した DNA 量が不十分であったことが原因として考えられる。また、TAT-NLS はリジンとアルギニンに富む塩基性ペプチドであることから、ストレプトアビジンに結合した DNA は PEI による負電荷の中和の前に TAT-NLS に静電的に結合し、TAT-NLS が埋没してしまった可能性も考えられる。現在、PNh ベクターの各構成ユニットの混合順序および量などについて検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

T. Gotoh, K.-I. Kikuchi, K. Hori, S. Takahashi, Surface plasmon resonance applicability study using immobilized recombinant human renin to screen for renin inhibitory activity, Jpn. J. Food Chem. Safty, 22 (1) 18-24 (2015) 査読有り

〔学会発表〕(計 13 件)

白岩直士, 横田早希, 村田和美, 齋 匯成, 後藤 猛, 膜透過ペプチドおよび核移行シグナルペプチドを用いた EGFP の Sf9 昆虫細胞への輸送挙動, 第 25 回日本素材物性学会年会, 2015. 6. 25, 秋田ビューホテル(秋田)

白岩直士, 横田早希, 村田和美, 齋 匯成, 後藤 猛, Sf9 昆虫細胞への外来物質輸送に及ぼす膜透過ペプチド及び核移行シグナルペプチドの効果, 秋田応用生命科学研究会第 25 回講演会, 2015. 6. 12, 秋田総合食品研究センター(秋田)

中西智, 佐藤幸保, 足立高弘, 後藤 猛, 回転逆さコーンを有する通気攪拌培養器の開発のための基礎検討, 秋田応用生命科学研究会第 25 回講演会, 2015. 6. 12, 秋田総合食品研究センター(秋田)

白岩直士, 横田早希, 齋 匯成, 村田和美, 後藤 猛, シグナルペプチドを用いた EGFP の Sf9 昆虫細胞への輸送挙動, 平成 26 年度化学系学協会東北大会, 2014. 9. 20, 山形大学(米沢)

横田早希, 後藤 猛, ビオチンリガーゼを用いたバキュロウイルスレセプター候補タンパク質の探索, 平成 26 年度化学系学協会東北大会, 2014. 9. 20, 山形大学(米沢)

中西 智, 佐藤幸保, 足立高弘, 後藤 猛, 回転逆さコーンを有する通気攪拌培養器を利用した大腸菌の培養, 第 66 回日本生物工学会大会, 2014. 9. 10, 札幌コンベンションセンター(札幌)

M. Miyawaki, K. Tsuchida, S. Yokota, S. Takahashi, S. Nirasawa, T. Gotoh, Efficient production of human angiotensin-converting

enzyme 2 by Sf9 insect cells ,化学系学協会東北大会 , 2013. 9. 28 , 東北大学 (仙台)

S. Yokota, H. Mizumura, T. Ieda, T. Nakamura, N. Ohya, T. Gotoh , Expression of *cis*-prenyltransferase from *Lactarius volemus* by baculovirus-infected insect cells , 化学系学協会東北大会 , 2013. 9. 28 , 東北大学 (仙台)

横田早希 , 阿部望美 , 佐藤真一 , 佐藤愛香 , 後藤 猛 , Real-time PCR によるバキュロウイルス定量とタイター測定への応用 , 化学工学会秋季大会 , 2013. 9. 19 , 岡山大学 (岡山)

横田早希 , 水村仁美 , 家田偉史 , 中村武史 , 大谷典正 , 後藤 猛 , チチタケ由来シス型プレニルトランスフェラーゼのクローニングと大腸菌および昆虫細胞による発現 , 第 65 回日本生物工学会大会 , 2013. 9. 10 , 広島大学 (広島)

佐藤幸保 , 二瓶雄太 , 中西 智 , 後藤 猛 , 回転逆さ円錐体の揚水現象を利用した新規バイオリアクターの開発 , 化学工学会盛岡大会 2013 , 2013. 8. 9 , 岩手大学 (盛岡)

横田早希 , 水村仁美 , 家田偉史 , 中村武志 , 大谷典正 , 後藤 猛 , 昆虫細胞発現系による 昆虫細胞発現系による *Lactarius volemus* 由来シス型プレニルトランスフェラーゼの生産 , 化学工学会盛岡大会 2013 , 2013. 8. 9 , 岩手大学 (盛岡)

T. Gotoh , Y. Shido, H. Ono, S. Yokota, S. Takahashi, Recombinant protein production by baculovirus-infected insect cells with cost-effectively inhibiting proteolytic degradation, 19th Regional Symposium on Chemical Engineering, 2012, 11. 7 , Inna Hotel Kuta-Denpasar-Bali (Bali, Indonesia)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

〔その他〕
特になし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 猛 (GOTOH, Takeshi)

秋田大学・大学院工学資源学研究科・教授
研究者番号 : 1 0 2 1 5 4 9 4