

研究シーズ探索プログラム 研究課題別評価書

1. 研究課題名

生物時計移植による時間制御型薬物送達システム

2. 研究代表者

寺内 一姫（立命館大学 生命科学部 准教授）

3. 研究シーズ探索成果の概要

薬物治療の重要な目標は、「必要な時」に「必要な量」を「必要な部位」に送り込むことである。ヒトは約 24 時間周期で生体内の様々な物質の濃度を変動させて活動している。そのため、薬物治療において概日リズムに応じ「必要な時」に薬物を投与することができればより高い治療効果が期待できる。本研究では、腸内細菌にシアノバクテリアの生物時計を導入し、治療用タンパク質の発現を時間的に制御することで「必要な時」に治療用タンパク質を生産させる新規なドラッグデリバリーシステムの基盤構築を目指した。光合成生物シアノバクテリアの 3 つの時計タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC を大腸菌内で共発現させ、KaiC リン酸化プロファイルが変動することを見出した。これらの結果は、生物時計をもたない生物に時計を移植可能であることが示唆している。本研究をさらに発展させることで概日リズムに応じて治療用タンパク質を生産するような腸内細菌創出の可能性が見出された。

4. 研究シーズ探索のねらい

ヒトは約 24 時間周期で様々な生体内の物質の濃度を変動させて活動している。したがって、薬物治療において概日リズムに応じ「必要な時」に薬物を投与することは効果的である。薬物治療では、投与する薬物を「必要な時」に、「必要な量」を「必要な部位」に到達させるのが理想である。この目標の実現を目指し「ドラッグデリバリーシステム」が注目され、技術開発が進められている。しかしながら、必要十分量の薬物の放出を時間的に制御する技術は皆無である。

最近、光合成生物シアノバクテリアの 3 つの時計タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC と ATP による生物時計が試験管内で再構成され、タンパク質によるナノサイズ分子時計を駆動させるメカニズムが明らかになりつつある。本研究では、シアノバクテリアの分子時計を活用した時間制御型薬物投与送達システムを構築するための技術開発の基盤構築を目指した。腸内細菌にシアノバクテリアの時計タンパク質 KaiABC を発現させることで概日リズムに応じて治療用タンパク質を生産するような腸内細菌の創出の可能性を探った。

5. 研究シーズ探索の方法と成果

5.1 方法

第1四半期に、ベクター構築用のプライマーを設計しシアノバクテリア由来の *kaiABC* 遺伝子をPCRにより増幅した。その増幅産物を用いて細胞内で3つのタンパク質が共発現するベクターの構築を開始した。一方、KaiABC タンパク質の細胞内発現を確認するため抗体が研究期間後期に必要なため、その抗原とする Kai タンパク質精製を開始した。

第2四半期において、第1四半期より開始したベクター構築が完了し、大腸菌にベクター導入した。組換え大腸菌において、タンパク質発現を誘導し、細胞内においてタグ抗体を用いたウエスタンブロット法により、KaiA の発現を確認した。一方、抗原とする Kai タンパク質精製においては、精製度の高いタンパク質が得るための精製方法を検討した。

第3四半期において、KaiA KaiB, KaiC タンパク質の精製が終了し、抗体作製を開始した。作業は専門業者に委託し、各タンパク質をウサギに免疫することでポリクローナル抗体を作製した。KaiC 抗体は第3四半期に、KaiA および KaiB 抗体は第4四半期に作製が完了した。

第3四半期および第4四半期において、組換え大腸菌の菌体濃度を常に一定に保つような連続培養系を構築した。連続培養は生育温度 37°C および 30°C で実施し、培地に抗生物質および発現誘導剤を加えた。シアノバクテリアの生物時計再構成系においては 30°C での実験データが蓄積しているため、再構成系との比較検討のため、30°C での培養を主に実施した。プラスミドをもつ大腸菌形質転換体を連続培養し、経時的に集菌した。作製した抗体を用いたウエスタンブロット法により大腸菌細胞内の KaiA、KaiB および KaiC タンパク質の発現状態を検証した。特に KaiC タンパク質についてはリン酸化状態の様態を検討した。

5.2 成果

Kai タンパク質共発現用プラスミドの作製および大腸菌への導入は、計画通り実施することができた。3つの時計タンパク質の抗原精製および抗体作製は、計画より時間はかかったが、最終的には研究に用いることができる力価の抗体を得ることができた。

連続培養した大腸菌内で KaiC タンパク質が発現していることを、作製した KaiC 抗体を用いてウエスタンブロット法により確認した。タンパク質の電気泳動における移動度の違いから、リン酸化型 KaiC および非リン酸化 KaiC が共存することが観察された。KaiC タンパク質の2つのリン酸化状態を検知できたことは、細胞内での時計機能を評価することにおいて極めて重要である。

シアノバクテリア由来の *kaiABC* を導入した大腸菌において、KaiC のリン酸化状態は発現誘導後経時的変動を示した。一方、対照実験として *kaiC* 遺伝子単独の発現ベクターをもつ大腸菌においては同条件下で、KaiC のリン酸化状態は時間変化せず一定であった。時計遺伝子 *kaiABC* を導入した大腸菌において、KaiC のリン酸化状態が経時変化を示したことから、細胞内で各 Kai タンパク質が活性型として発現していると考えられる。これらの結果は大腸菌で *kaiABC* を共発現させることで KaiC のリン酸化状態を周期的に変動させる可能性を示唆している。

6. 自己評価

本研究では、腸内細菌にシアノバクテリアの時計タンパク質を発現させることで、概日リズムに応じて有用タンパク質を生産するような腸内細菌の創出の可能性を探った。シアノバクテリアの3つの時計タンパク質が大腸菌内で共発現可能となり、KaiCのリン酸化状態が経時変化を示すことを見出したことにより、本研究が研究シーズの芽となる可能性は大きくなった。本来生物時計を持たない生物に、生物時計を移植する試みが、早期に可能であると予測される結果を得ることができた。最終目標である有用タンパク質生産を時間制御する基盤技術確立にむけて本研究をさらに発展させることが必要であると考えられる。一方、予定より時間がかかる事態が発生したことにより、研究期間内に時計情報出力系の確立にまではいたらず、計画途中となった。研究シーズ探索のプログラムは終了するが、本研究の成果を生かして、タンパク質生産が時間制御可能となる腸内細菌の創出に向けて、引き続き研究を進展させたい。

7. POの見解

本研究はKaiタンパク質による生物時計の分子メカニズムを利用して時間制御型薬物送達システムの開発を目指したものである。生物時計を腸内細菌に移植し、特定時間に有用タンパク質を作り出すことを目指したものである。光合成微生物シアノバクテリアで見いだされた生物時計に関連する蛋白KaiABCの3つを大腸菌で発現させ、KaiCのリン酸化が24時間周期で振動することを確認した。

KaiABCが大腸菌においても生物時計に有効であることを示したが、目的とする薬物となるようなタンパク質をこれらKai分子複合体により生成できるかの検証はできていない。Kai下流分子も発現させ、コンセプトの実証を行う必要がある。提案の方式が実現されれば、多方面での応用が考えられるが、現状ではまだ見通しが立たない。薬学、医学を巻き込む段階にはなく、基礎生物学の域から脱していない。今後の発展を期待したい。

8. 研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

なし

(2)特許出願

なし

(3)口頭発表

①学会

国内 1 件, 海外 0 件

- ・ 寺内一姫 安部さゆり、「生物時計は大腸菌で機能するか？生物時計移植の試み」第36回日本生体エネルギー研究会(大阪大学銀杏会館、2010年11月18-20日)

②その他

国内 0 件, 海外 0 件

(4)その他の成果(受賞、著書、招待講演、特記事項等)

なし