

平成22年度科学研究費補助金実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号 3 2 6 9 2 2. 研究機関名 東京工科大学
3. 研究種目名 基盤研究(C) 4. 研究期間 平成22年度～平成24年度
5. 課題番号 2 2 5 6 0 7 7 6
6. 研究課題名 経口投与可能なタンパク質医薬品の創製
7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
2 0 3 6 7 1 9 7	サトウ アツシ 佐藤 淳	応用生物学部	教授

8. 研究分担者(所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。)

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

下欄には、当該年度に実施した研究の成果について、その具体的内容、意義、重要性等を、交付申請書に記載した「研究の目的」、「研究実施計画」に照らし、600字～800字で、できるだけ分かりやすく記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

本研究では、ラクトフェリン(LF)をキャリア分子として使用し、他のタンパク質医薬品をLFに結合させた融合タンパク質は、LFと同様の腸管吸収動態を示して腸管から吸収されると考えた。LFに融合するタンパク質医薬品は、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を選び、遺伝子組換え法で、N末端側、およびC末端側にLF全長が位置するLF全長/G-CSF、G-CSF/LF全長融合タンパク質を安定発現するdhfr遺伝子欠損CHO細胞株を樹立した。さらに、LFの腸管吸収に必要な一次配列を明らかにすることを目的として、LFのN末端側半分の配列であるN lobeに注目し、N末端側、およびC末端側にN lobeが位置するN lobe/G-CSF、G-CSF/N lobe融合タンパク質を安定発現するdhfr遺伝子欠損CHO細胞株を樹立した。融合タンパク質の発現は、T 175 cm² フラスコを用いた静置培養で行った。各細胞株を無血清培地に細胞濃度1x10⁶ cells/mlで巻き込み、7日間培養して培地上清を回収した。その後、細胞は新しい無血清培地に再懸濁してさらに7日間培養を行った。各融合タンパク質の精製は、陽イオン交換担体であるMacroCap SP (GEヘルスケアバイオサイエンス社)を使用した。無血清培地で培養した培地上清を、10 mMリン酸バッファー(pH 7.6)で平衡化したカラムに注入して、融合タンパク質をカラム担体に結合させた。10 mMリン酸バッファー(pH 7.6)で洗浄後、0.2 M NaClを含む10 mMリン酸バッファー(pH 7.6)から、0.1 M刻みでNaCl濃度を上げるステップワイズ塩濃度溶出法で融合タンパク質を溶出させた。この方法で純度約90%以上の融合タンパク質を得ることができた。

10. キーワード

- (1) ラクトフェリン (2) G-CSF (3) 融合タンパク質
- (4) (5) (6)
- (7) (8) (裏面に続く)

11. 研究発表（平成22年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計(1)件 うち査読付論文 計(1)件

著者名	論文標題				
Kanako Kato, Naomi Tamaki, Yoshiki Saito, Tomohito Fujimoto, Atsushi Sato	Amino group PEGylation of bovine lactoferrin by linear polyethylene glycol (PEG)-p-nitrophenyl active esters				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Biological & Pharmaceutical Bulletin	有	33	2010	1253-1255	

著者名	論文標題				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	

著者名	論文標題				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	

〔学会発表〕 計(1)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名	発表標題		
矢野 和義, 佐々木 典子, 柳田奈那美, 坂口 菜央, 平塚 淳典, 佐藤淳, 横山憲二, 軽部 征夫	全自動二次元電気泳動装置を用いたタンパク質の分離とリン酸化パターンの解析		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本分子生物学会、第4回バイオ関連化学シンポジウム	2010年9月	大阪大学豊中キャンパス（大阪）	

〔図書〕 計(0)件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

12. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別

13. 備考

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

--