

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410181

研究課題名(和文)ヘテロ二量体化ロイシンジッパー法によるタンパク質の細胞内運搬技術の開発

研究課題名(英文)Development of intracellular delivery method of proteins by hetero-dimerized leucine zippers

研究代表者

北松 瑞生 (KITAMATSU, Mizuki)

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号：60379716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、病気の治療を目的として、細胞内に機能性タンパク質や機能性ペプチドを運搬する方法の開発を目指している。今回申請者は、オートファジー誘導ペプチド(Beclin 1)とヘテロ二量体化ロイシンジッパーペプチド(LzK)を連結させた。また、細胞内運搬ペプチドとLzKの対となるペプチド(LzE)を連結させた。これらのペプチドは混ぜると、Beclin 1が細胞内に運搬され、オートファジーを誘導できた。

研究成果の概要(英文)：For purpose of treatment of disease, we develop a method for delivering a functional proteins or functional peptides into cells. In this work, we synthesized an autophagy-inducing peptide (Beclin 1) modified with a hetero-dimerization leucine zipper peptide (LzK). We also synthesized a cell-penetrating peptide modified with a pair of LzK (LzE). When these peptides were mixed, Beclin 1 was successfully delivered into the cell, and the peptide induced autophagy.

研究分野：生物有機化学

 キーワード：ペプチド DDS 細胞 ロイシンジッパー 細胞内運搬ペプチド p53タンパク質 Nanogタンパク質 ペ
 プチド核酸

1. 研究開始当初の背景

機能性タンパク質を医薬として用いることは、従来の低分子医薬と比べ、毒性が低い(生体由来である)副作用が低減できる(分子量サイズが大きい)ことから、新しい医薬開発に貢献できる。しかし現在のタンパク質医薬は、細胞表面上の受容体を標的にすることが多く、細胞内の遺伝子、タンパク質、小器官を標的にすることはほとんどない。それは細胞内にまでタンパク質をうまく運搬し、細胞内でその機能・効果を維持することが難しいためである。もし細胞内部の物質をタンパク質医薬の標的にできれば、治療の幅が増え、これまで不可能だった病気の治療も可能になる。このことからタンパク質の DDS 法のさらなる開発は必要である。

タンパク質の細胞内デリバリーにおいて CPP を用いる方法は、シンプルかつユニークである。従来法として遺伝子工学的手法によりタンパク質と CPP とを直接融合させるもの(タンパク質-CPP 融合体)がある。しかし CPP は正電荷を多く含む特殊な配列であることが多く、そのためタンパク質-CPP 融合体の合成自体、困難なことがある。さらにその融合体が細胞内に運搬されても、CPP のせいで細胞内部にある mRNA や tRNA など負電荷を有する高分子と非特異的吸着を生じ、タンパク質が目的の場所にまで運搬されない、さらにはタンパク質の活性が阻害されてしまう(Michiue ら、Biomaterials 2012)。そのため細胞内部でタンパク質と CPP とを分離する方法が求められ、いくつかの研究者によって検討されている。

例えば、タンパク質と CPP とをジスルフィド結合を介して連結させたもの(A)やタンパク質と CPP とにリガンドを修飾し、金属イオンを介して連結させたもの(B)、タンパク質-リガンド相互作用を介して連結させたもの(C)などがある。しかしこれらは、タンパク質の変性、合成・精製の難しさを含んでいる(A)、毒性が心配される金属イオンを用いる(B)、運搬したいタンパク質よりもサイズの大きなタンパク質を用いる(C)といった問題がある。

2. 研究の目的

これまで我々は、ペプチド核酸-CPP コンジュゲートを運搬体として使い、PNA/RNA 間相互作用を介して、機能性 RNA を細胞内に運搬することに成功している(Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009)。この方法をヒントに、ペプチド/ペプチド間相互作用を介して、機能性タンパク質を細胞内に運搬することを提案する。この方法だと、タンパク質の変性の心配や、金属イオンやサイズの大きなタンパク質を用いる必要がなく、画期的な運搬方法となる。

このペプチド/ペプチド間相互作用を示す適当なペプチドはあまり存在しないが、多くの論文を調査し、ヘテロ二量体化ロイシンジ

ッパー(Bosshard ら、Biochemistry 1999)にたどり着いた。これはロイシンジッパーにそれぞれ正電荷(リジン)と負電荷(グルタミン酸)を適当に配列中に含めたペプチド(以下それぞれ Lz(K)および Lz(E))で、A/B 間の 1/1 の強い相互作用を示す。本申請では、種々のヘテロ二量体化ロイシンジッパーを修飾したタンパク質や CPP を合成し、これらの細胞内運搬能力、細胞内での機能性維持・向上について検討した。

3. 研究の方法

研究の方法のほとんどは研究成果に含めるが以下に一例を示す。ペプチド固相法を用いて Lz(K)もしくは Lz(E)を修飾した CPP と Lz(K)もしくは Lz(E)を修飾したオートファジー誘導ペプチド Beclin 1 を合成した。これらのペプチドは混合して細胞とインキュベートさせた。オートファジー誘導を検出するキットを用いて、それら細胞がオートファジーを誘導したかを調べた。

4. 研究成果

我々は、今回のヘテロ二量体化ロイシンジッパーが CPP に修飾された状態でもペプチド/ペプチド間相互作用を示すかを調べるために、水溶液中で Lz(K)を修飾した蛍光色素 Fam と Lz(E)を修飾した CPP 搭載蛍光色素 Tmr との蛍光共鳴エネルギー移動による蛍光強度の変化を測定した。その結果、ヘテロ二量体化ロイシンジッパーはうまくペプチド/ペプチド間相互作用を示すことがわかった。同種同士(Lz(K)と Lz(K))ではペプチド/ペプチド間相互作用を示さないこともわかり、この相互作用が特異的であることも確認した。この蛍光色素に修飾された Lz(K)と Lz(E)とをさらに混合して、細胞とともにインキュベーションしたところ、Lz(E)と Lz(K)とはともに CPP によって細胞内に運搬されることも蛍光顕微鏡の観察により明らかになった(図 1)。

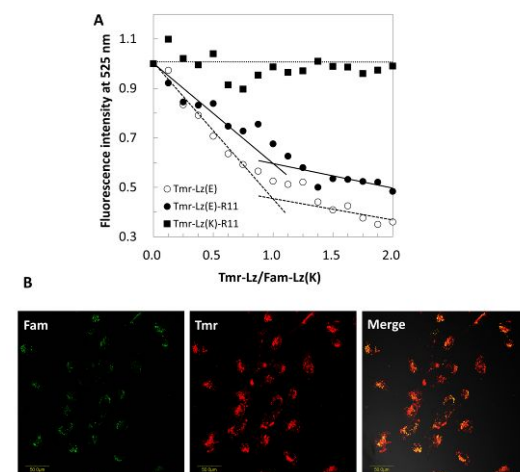


図 1

次に我々は、Lz(K)を修飾した Beclin 1 を合成し、これと Lz(E)を修飾した CPP とを混合して、細胞とインキュベートした。このとき、オートファジー誘導を示す LC3 タンパク質を検出することで、細胞にオートファジーが誘導したかを調べた。その結果、本法におけるペプチドとインキュベートした細胞から LC3 が検出され、うまくオートファジーを誘導していることが明らかとなった。その他のネガティブコントロールからはオートファジーが検出されないことも確認した (図 2)

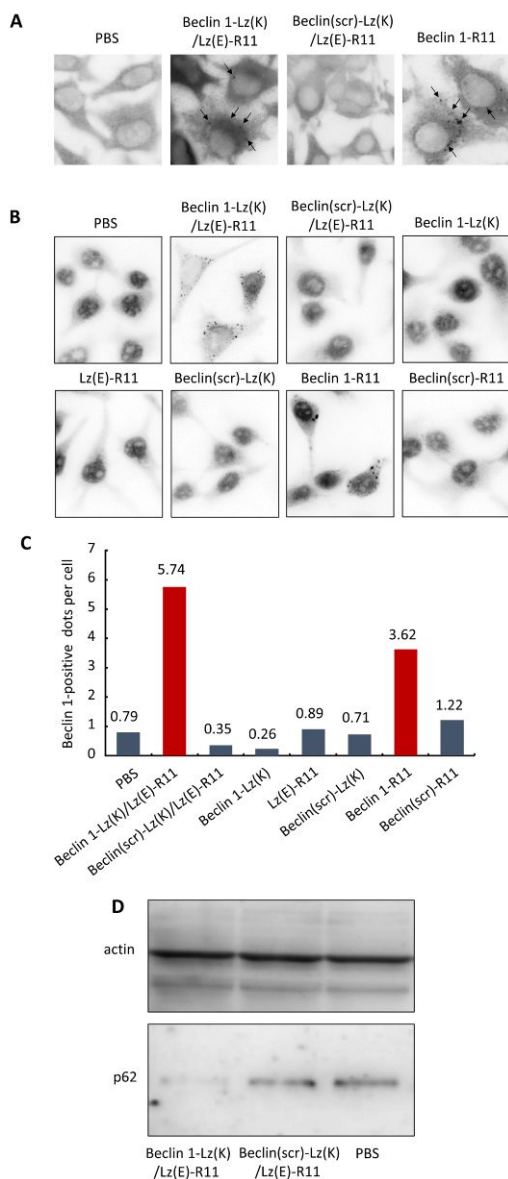


図 2

上記のオートファジー誘導は直接、Beclin 1 と CPP とを連結したペプチドでも確認された。しかし、このペプチドはアポトーシス検出キットにより確認したところ、重篤な細胞死も併発することが明らかになった。一方で、本法で運搬した Beclin 1 は、オートファジーのみを誘導することが明らかとなった。この

結果は、細胞内に運搬されたとき CPP が Beclin 1 の機能に影響を及ぼしてしまうことをしめしており、本法が示すように、細胞内では CPP を機能性ペプチドから分離することがその効果を有効に引き出せることを示している。

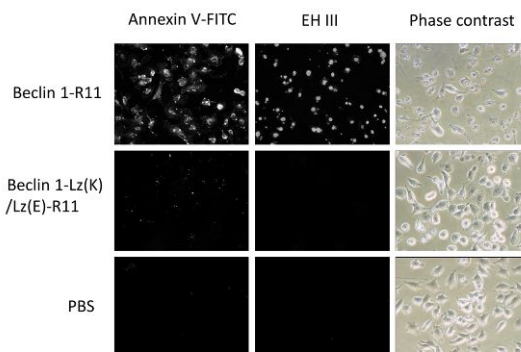


図 3

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 1 件)

1. Novel Leucine Zipper Motif-Based Hybrid Peptide Delivers a Functional Peptide Cargo Inside Cells, *Y. Hakata, S. Tsuchiya, H. Michiue, T. Ohtsuki, H. Matsui, M. Miyazawa, *M. Kitamatsu, *Chem. Commun.* **2015**, *51*(2), 413-416, DOI:10.1039/c4cc07459a, 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. ペプチドハイブリッド法によるオートファジー誘導ペプチドの細胞内輸送、鷺森直人、北松瑞生、博多義之、宮澤正顯、第 29 回関西地区ペプチドセミナー、2014 年 11 月 29 日、大阪府・吹田市・関西大学 (千里山キャンパス)

2. ペプチド-ペプチドハイブリッド法によるオートファジー誘導ペプチドの効果的輸送、鷺森直人、博多義之、北松瑞生、第 46 回若手ペプチド夏の勉強会、2014 年 8 月 5 日、京都府・宮津市・京都府立青少年海洋センター - Delivery of peptides into cells by peptide-peptide hybrid method, Mizuki Kitamatsu and Takashi Ohtsuki, 2014/6/26, 15th Tetrahedron Symposium, London, UK

[その他]

近畿大学工学部応用化学科 生物物理化学 研究室 ホーム ページ ; http://www.apch.kindai.ac.jp/kitamatsu_lab/

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

北松 瑞生 (KITAMATSU, Mizuki)

近畿大学・工学部・講師

研究者番号：60379716

(2)研究分担者

道上 宏之 (MICHIE, Hiroyuki)

岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20572499