

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月7日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05856

研究課題名(和文) ペプチドジッパー法により細胞内運搬したタンパク質や機能性ペプチドの効果的機能改善

研究課題名(英文) Effective functional improvement of proteins and peptides delivered into cell by peptide zipper method

研究代表者

北松 瑞生 (KITAMATSU, Mizuki)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：60379716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、細胞内に薬剤となるタンパク質や機能性ペプチドを安全にかつ効率的に運搬することによって、病気を治療することを目的にしている。今回申請者は、Nanogタンパク質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。これらのペプチドを混ぜるとNanogタンパク質が細胞質内、さらには核膜内に運搬されて、Nanogの持つ機能をうまく発現させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、体を構成する重要な物質である細胞が正常に活動するために、安全にその細胞内に薬剤を運搬することを目指している。薬剤としてタンパク質やペプチドを用いているが、それらを運搬するための物質は、そのタンパク質やペプチドに細胞外では連結、細胞内では分離していることが、その薬剤の効率を高めるためのポイントの一つとなる。本研究はその方法に関するものである。この方法が実現すれば、これまで治療が難しかった病気を多く含む多くの病気を効果的に治療する新たなアプローチを与えることができる。

研究成果の概要(英文)：We aim to treat diseases by safely and efficiently delivering proteins and functional peptides into cells. Here, we conjugated the Nanog protein to a heterodimeric leucine zipper peptide (LzK). In addition, an cell-penetrating peptide was conjugated to LzE peptide that forms a hybrid with LzK. When these peptides were mixed, the Nanog protein was successfully delivered into the cytoplasm and further into the nucleus, and the function possessed by Nanog protein was successfully expressed.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：ペプチド タンパク質 細胞内運搬ペプチド ペプチド核酸 細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、多くのタンパク質(またはペプチド)がどのように生体システム(細胞)のメカニズム・機能に関わっているかが理解されてきた。そして、このメカニズム・機能の理解をそのまま利用してタンパク質を医薬として用いれば、新しい医薬を迅速に得ることができる。しかし現在、タンパク質を医薬として用いる場合、細胞表面上の受容体を標的にすることが多く、細胞内部の遺伝子、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、細胞内でその機能を発現・維持することが難しいためである。もし細胞内部のこれらをタンパク質医薬の標的にできれば、標的の種類が格段に増え、これまで不可能だった病気の治療も可能になるだろう。このことからタンパク質のドラッグデリバリーシステムのさらなる開発は必要である。

タンパク質(またはペプチド)の細胞内デリバリーにおいて細胞内運搬ペプチド(以下 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にタンパク質と CPP とを直接融合させたもの(タンパク質-CPP 直接融合体)がある(引用文献 1、図 1(A))。しかし一般的な 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 直接融合体の合成自体、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、タンパク質の機能(活性)が阻害されてしまう(引用文献 2、図 1(A)右)。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、いくつかの研究グループにより検討されている。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(引用文献 3)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(引用文献 4)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たり、毒性が心配される金属イオンを用いたり、といった問題がある。

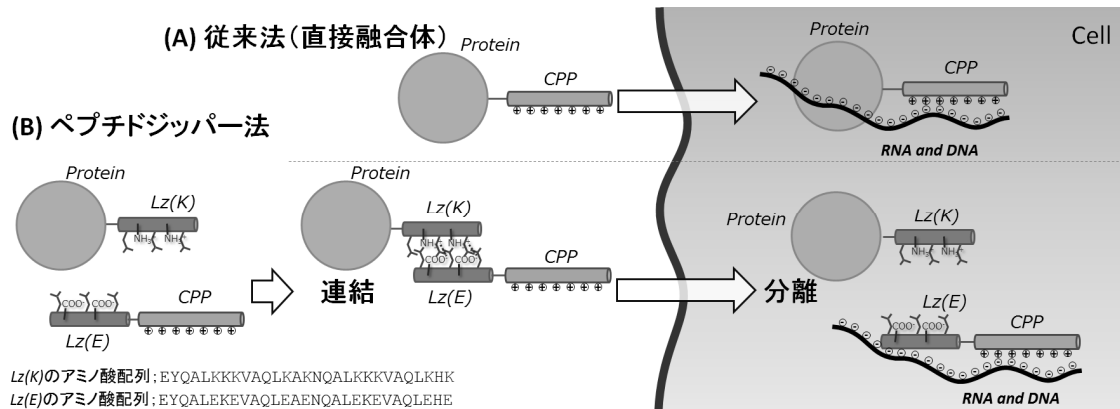


図 1 タンパク質-CPP 直接融合体による細胞内運搬と本研究(ペプチドジッパー法)による細胞内運搬の概要図。

これまで申請者は、ペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid、以下 PNA、Nielsen ら、引用文献 5)と CPP のコンジュゲートを運搬体として用い、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(引用文献 6)。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、タンパク質(またはペプチド)を細胞内に運搬することを考案した(ペプチドジッパー法; 図 1(B))。この方法ならばタンパク質の変性の心配や、金属イオンを用いる必要が無い。

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として、ヘテロ二量体化ロイシンジッパー(引用文献 7 以下 Lz)がある。Lz 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 2 種類のペプチド(以下それぞれ Lz(K)および Lz(E))から成り、Lz(K)/Lz(E)間のロイシンジッパーの相互作用および静電相互作用による 1/1 の強い相互作用を示す。これまで申請者は、このペプチドジッパー法によって機能性ペプチドの一種であるオートファジー誘導ペプチド Beclin 1 が、同条件の直接融合体では起こすことのできないオートファジー誘導に成功した(引用文献 8)。本申請では、上記 Lz 修飾機能性ペプチドと同様に Lz 修飾タンパク質を合成し、これらタンパク質の細胞内での機能発現・維持・向上について検討した。

2. 研究の目的

本申請は、「細胞外から運搬したタンパク質(またはペプチド)の細胞内での効果的機能発現」を目的とする。この目的のためにヘテロ二量体化ロイシンジッパーやペプチド核酸を介してタンパク質(またはペプチド)と細胞内運搬ペプチドとを連結・分離させる技術(ペプチドジッパー法; 図 1(B))を用いる。上記タンパク質(またはペプチド)として Nanog タンパク質、p53 タンパク質およびオートファジー誘導ペプチド Beclin 1 を用い、これらが細胞内で効果的に機能発現できるか検討する。本研究の成果は、細胞表面上ではなく、細胞内での薬剤標的を狙うことが可能となり、新たな医薬開発の革新的方法となる。

3. 研究の方法

Nanog タンパク質が連結した LzK は、遺伝子工学的手法により合成し、細胞内運搬ペプチド (CPP) が連結した LzE は、ペプチド固相法により合成した。また、CPP-LzE コンジュゲートに赤色蛍光色素 Tmr を修飾したペプチドや LzK に緑色蛍光色素 Fam を修飾したペプチド合成したペプチドを合成した。これらの混合物は蛍光スペクトルを用いてハイブリッドの形成を確認した。

4. 研究成果

我々ははじめに LzK と LzE のハイブリッド形成を介して化合物が CPP によって細胞内に運搬できるかどうかを調べるために、Fam を修飾した LzK と Tmr を修飾した LzE-CPP を用いて、U-251MG 細胞をその 1 対 1 混合物中で培養させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した(図 1)。その結果、静電的相互作用によってハイブリッドを形成し、かつ CPP が連結した LzK と LzE の組み合わせのときにだけ、細胞内で Fam の蛍光が観察できた。この結果は、LzK と LzE がハイブリッドを形成し、CPP によって化合物が細胞内に運搬できることを示している。

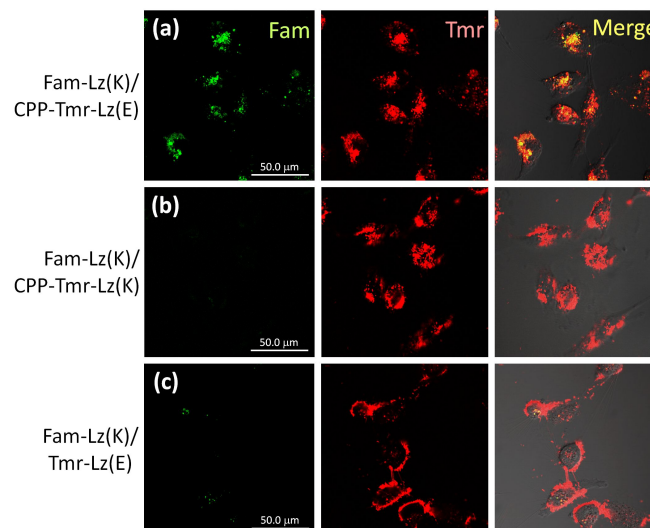


図 1 各ペプチドの 1:1 混合物中で培養した U251MG 細胞の共焦点レーザー顕微鏡の画像。

次に我々は、実際に Nanog タンパク質と LzK を連結させた融合体を作成し、CPP-LzE ペプチドとハイブリッドを形成させ、細胞内に運搬した後、その Nanog タンパク質の機能発現を Rnd3 タンパク質の発現量から評価した(図 2)。その結果、LzK と LzE の静電的相互作用を介して CPP によって細胞内に運搬された Nanog タンパク質は、うまく核内にまで移行して、その機能を発現していることが明らかとなった。

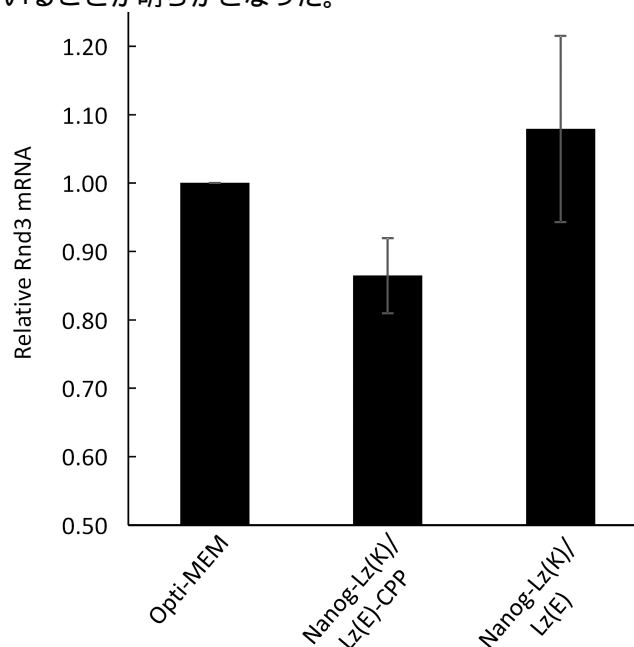


図 2 Nanog タンパク質が存在しない場合 (Opti-MEM)、本システムにより Nanog タンパク

質を細胞内に運搬した場合 (Nanog-LzK/LzE-CPP)、CPP が連結していない場合 (Nanog-LzK/LzE) における Rnd3 タンパク質の発現量の評価。

引用文献

Gupta, B.; Levchenko, T. S.; Torchilin, V. P., Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, **2005**, 637-51.

Hitsuda, T.; Michiue, H.; Kitamatsu, M.; Fujimura, A.; Wang, F.; Yamamoto, T.; Han, X.-J.; Tazawa, H.; Uneda, A.; Ohmori, I.; Nishiki, T.; Tomizawa, K.; Matsui, H., A Protein transduction method using oligo-arginine (3R) for the delivery of transcription factors into cell nuclei, *Biomaterials*, 33, **2012**, 4665-4672.

Schneider, A. F. L.; Wallabregue, A. L. D.; Franz, L.; Hackenberger, C. P. R., Targeted subcellular protein delivery using cleavable cyclic cell-penetrating peptides, *Bioconjugate Chem.*, 30, **2019**, 400-404.

June, R. K.; Gogoi, K.; Eguchi, A.; Cui, X.; Dowdy, S. F., Synthesis of a pH-sensitive nitrilotriacetic linker to peptide transduction domains to enable intracellular delivery of histidine imidazole ring-containing macromolecules, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, **2010**, 10680-10682.

Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Kim, S. K.; Norden, B.; Nielsen, P. E., PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogenbonding rules, *Nature*, 365, **1993**, 566-568.

Kitamatsu, M; Kubo, T.; Matsuzaki, R.; Endoh, T.; Ohtsuki, T.; Sisido, M., Carrier PNA for shRNA delivery into cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, **2009**, 3410-3413,

Wendt, H.; Leder, L.; Härmä, H.; Jelesarov, I.; Baici, A.; Bosshard, H. R., Very rapid, ionic strength-dependent association and folding of a heterodimeric leucine zipper, *Biochemistry*, 36, **1997**, 204-213.

Hakata, Y.; Tsuchiya, S.; Michiue, H.; Ohtsuki, T.; Matsui, H.; Miyazawa, M.; Kitamatsu, M., A novel leucine zipper motif-based hybrid peptide delivers a functional peptide cargo inside cells, *Chem. Commun.*, 51, **2015**, 413-416.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

*Yoshiyuki Hakata, Hiroyuki Michiue, Takashi Ohtsuki, Masaaki Miyazawa, *Mizuki Kitamatsu

A Leucine Zipper-based Peptide Hybrid Delivers Functional Nanog Protein inside the Cell Nucleus

Bioorg. Med. Chem. Lett. 2019, 29(7), 878-881 査読有

DOI:10.1016/j.bmcl.2019.02.004

〔学会発表〕(計 2 件)

中尾一晴, 隅田健斗, 北松瑞生, 副島哲朗

ペプチドで表面修飾された無機ナノブロックの自己集合挙動

第 19 回関西表面技術フォーラム, 兵庫県神戸市・甲南大学 (ポートアイランドキャンパス), 2017/11/16-17

中尾一晴, 隅田健斗, 北松瑞生, 副島哲朗

ペプチドを接着分子とする金属ナノ粒子の自己集合

日本化学会第 97 回春季年会, 東京都・慶應義塾大学 (日吉キャンパス), 2017/3/16-19

〔その他〕

ホームページ等

http://www.apch.kindai.ac.jp/kitamatsu_lab/

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：道上 宏之

ローマ字氏名：MICHIEUE, Hiroyuki

所属研究機関名：岡山大学

部局名：中性子医療研究センター

職名：准教授

研究者番号(8桁): 20572499

(2)研究協力者

研究協力者氏名：博多 義之

ローマ字氏名：HAKATA, Yoshiyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。