

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07232

研究課題名(和文) 進化分子工学的手法によるsiRNA導入に特化された細胞膜透過ペプチドの選別

研究課題名(英文) Selection of cell penetrating peptide with evolutionary molecular engineering specialized for siRNA delivery

研究代表者

多田 誠一 (Tada, Seiichi)

国立研究開発法人理化学研究所・創発物性科学研究センター・研究員

研究者番号：30598165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、核酸医薬として有用なRNAi分子の細胞内導入に有用な細胞膜透過ペプチド(CPP)を進化分子工学的手法によって選別する手法を構築することを目的として検討を行った。cDNAディスプレイの手法によってmRNAとペプチド鎖を結合させる際に、mRNAの5'末端側にshRNA配列を導入することで、複合体の細胞内移行とshRNAの遺伝子発現抑制能の両面での選別を行うことが可能になる。本研究ではshRNA連結cDNAディスプレイ複合体の生成法を確立し、細胞内移行に伴う遺伝子発現抑制効果も確認したが、培養細胞を用いたCPP選別には複合体選別の収量増加などのさらなる検討が必要であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討により、cDNAディスプレイによるペプチド選別の際に、複合体に様々な修飾を施す余地があることが確認された。今回は細胞内移行と遺伝子発現抑制に焦点を当てて検討を進めたが、今後の検討によってはcDNAディスプレイ複合体に他の低分子化合物や機能性タンパク質を連結することで、従来選別されていた特定の標的を認識するペプチドの選別のみならず、標的検出や薬物送達・薬効の高低に基づいたペプチド選別を実施する可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：I investigated the development of evolutionary molecular engineering selection method of cell penetrating peptides (CPP) for RNAi intracellular delivery based on gene suppression efficiency. I modified the mRNA for cDNA display selection of CPP with shRNA sequence at 5' terminus in order to select the CPP based on both of cellular uptake efficiency and gene suppression efficiency. In this study, I developed the method of preparation of shRNA-conjugated cDNA display complex and confirmed the gene expression efficiency of shRNA domain after cell transfection. However, it was also revealed that the yield of shRNA-conjugated cDNA display complex should be improved for the CPP selection using cultured cells based on gene suppression level.

研究分野：生体材料工学

キーワード：細胞膜透過ペプチド cDNAディスプレイ in vitro セレクション RNAi 細胞内導入 進化分子工学 遺伝子発現抑制 shRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

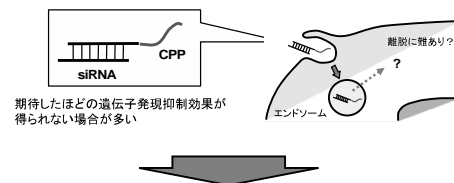
siRNA や shRNA などの短鎖 RNA の細胞内導入による遺伝子発現抑制法は、研究手段としても各種疾患の治療法としても極めて有用であり、抗腫瘍活性のある“核酸医薬”としての応用研究が各所で進められているが、siRNA の細胞内導入に用いる試薬には毒性や導入効率等に難があるものが多く、臨床に向けた導入システムとして決定的なものは依然として開発されていない。siRNA 等の生体高分子の細胞内導入が可能で、より毒性の低い導入法としては、細胞膜透過ペプチド (cell penetrating peptide, CPP) を用いる手法が挙げられる。細胞内に導入する物質にこのペプチドを連結してから細胞に添加することで、様々な分子・粒子を細胞内に導入できるようになる。この CPP を利用した siRNA の導入法についてはすでに各所で検討が進められているが、siRNA 自体は細胞内に導入されるものの、細胞質における siRNA の解離が不十分、あるいは siRNA のエンドソームからの脱出効率の不良等の原因により、細胞内で遺伝子発現抑制効果が発揮されない場合が多く、現在に至るまで有効な RNAi 系核酸医薬の実用化が達成されない一因となっている (Margus et al, Mol. Ther., 2012)。これらの難点を克服するために、CPP とナノ粒子との複合体などの検討も行われているが (Margus et al, Mol. Ther., 2012)、現在よく用いられている CPP は既存タンパク質の一部を利用した配列か、あるいは正電荷に富んだ配列に偏っており、CPP の配列自身にも改良の余地があるため、siRNA 等の導入に適した新規ペプチドの開発には進化分子工学の手法が非常に有効と考えられる。

進化分子工学はランダムな配列のペプチド鎖の集合体から目的の機能を有するペプチド鎖の選別を進め、最終的に高い機能を有する配列を特定する手法であり、すでに複数の研究グループがこの手法を利用して新しい CPP を報告している (Gao et al, Bioorg. Med. Chem., 2002.)。しかしこれらの報告では、ペプチドの選別基準がペプチド自身の細胞内取り込みの善し悪しにのみ設定されており、siRNA 導入時の発現抑制能は考慮されていない。そのため、これらの報告にある手法で得られた CPP が遺伝子発現抑制能の点で高い機能を有しているとは限らず、ペプチド配列の特定後に改めて siRNA 等の細胞内導入の有効性の評価を行う必要がある。よって、進化分子工学的手法によって siRNA 導入時の発現抑制能の高低に基づいて CPP の選別を実現する手法が求められていた。

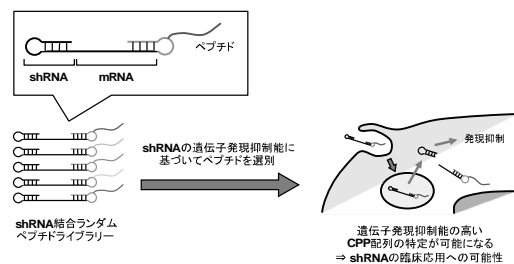
2. 研究の目的

本研究では、進化分子工学の手法による CPP の選別時に遺伝子発現抑制能による選別を行い、より有効な CPP 配列を得る手法の検討を行う (図 1)。cDNA ディスプレイ法の手法に倣って mRNA とランダムペプチドライブラリーの結合を行う際に、mRNA の 5' 末端側に shRNA 配列を付加しておき、shRNA 部位を含んだ mRNA-ランダムペプチド複合体を用いて培養細胞によるペプチドの選別を行う。培養細胞には予め蛍光タンパク質を恒常的に発現させた細胞株を用い、shRNA には蛍光タンパク質の発現を抑制する配列を選んでおくことで、ランダムペプチドのうち細胞内導入が可能な配列では shRNA が導入され、蛍光タンパク質の発現が抑制されて細胞の蛍光強度が低下するため、セルソーターを用いることで、shRNA が導入され蛍光強度が減弱した細胞のみ回収可能になると期待される。回収された細胞を破碎して PCR を行うことで細胞内に移行した cDNA の配列解析が可能になるため、細胞内導入と遺伝子発現抑制が実現したペプチド配列を特定することができると考えられる。今回は新規 CPP 配列選別法の構築に必要な shRNA 連結 cDNA ディスプレイ複合体の作成と選別条件の決定を行う。

■ 従来の細胞膜透過ペプチド(CPP)による siRNA 導入



■ 進化分子工学の手法によって遺伝子発現抑制能の高いCPPを選別



- ・細胞内導入する物質の機能に基づくCPP選別法の確立
! 進化分子工学的手法における新たなアプローチ
- ・shRNAをはじめとする各種生理活性高分子への展開の可能性
核酸・タンパク質医薬の適用範囲を細胞内へと拡張できる可能性

図 1 本課題の概要

3. 研究の方法

一連の cDNA ディスプレイ法に基づく CPP 選別法の構築を行った。

mRNA ディスプレイ法、あるいは cDNA ディスプレイ法と呼ばれる方法は、ランダム配列のペプチドライブラリーをコードする mRNA とその翻訳産物であるペプチドを、ピューロマイシンを介して共有結合で連結することにより、目的のペプチド鎖を選別した後に核酸部分の RT-PCR を行うことで、分取したペプチド鎖の増幅・再合成を可能にする手法である (Yamaguchi et al, Nucleic Acids Res., 2009.)。ペプチド鎖の選別と選別配列の増幅を繰り返すことで目的のペプチド配列を分取し、解析することが可能になる。今回の計画ではペプチドの選別時にペプチドの細胞内導入を伴うため、mRNA 部分の安定性向上を目的として選別前に RT-PCR を行い、mRNA と

cDNA で 2 本鎖構造を形成させた状態で培養細胞に添加して選別操作を行う (cDNA ディスプレイ法、図 2A)。

そのため、まず図 2A に示す cDNA ディスプレイ複合体の調製に必要な“ピューロマイシン結合 DNA リンカー”の作製から開始した。この DNA リンカーの合成は既報の手法に沿って実施した (Mochizuki et al, ACS Comb Sci., 2011.)。リンカーの合成後、mRNA との連結、無細胞翻訳系によるペプチド鎖の合成と連結と、RT-PCR による cDNA 部分の合成を行い、cDNA ディスプレイ複合体作製法の検討を行った。この時使用する mRNA には、細胞内に導入する shRNA 配列を 5' 末端に連結したものを使用し、後のペプチド選別の過程で起こる複合体の細胞内取り込みの際に shRNA による遺伝子発現抑制が誘導されるようにした。この時、培養細胞を用いた選別後の PCR で増幅される配列には原理上 shRNA 配列が含まれないはずなので、選別操作を繰り返すにはその都度 shRNA 配列を付与するために長鎖プライマーを用いた PCR が必要になるため、PCR による shRNA の連結の可否について検討した。

以上の検討を行い、cDNA ディスプレイ複合体を繰り返し調製する手法を確立させた後、培養細胞を用いた CPP 選別の条件検討を行った。CPP の選別には赤色蛍光タンパク質 DsRed を恒常的に発現した HeLa 細胞株を樹立し、同細胞に DsRed 発現抑制 shRNA を連結した cDNA ディスプレイ複合体を添加して、複合体の細胞内取り込みに伴う DsRed 発現量低下と蛍光強度低下に基づいて選別を行うため (図 2B)、種々の検討を行った。

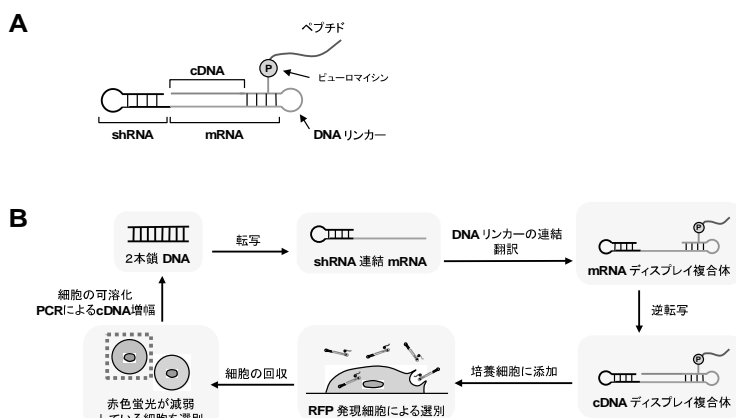


図 2 cDNA ディスプレイ法による CPP の選別。
A: cDNA ディスプレイ複合体の構成、B: CPP 選別過程の概念

4. 研究成果

(1) shRNA 連結 cDNA ディスプレイ複合体の生成

まず、CPP の選別時に遺伝子発現抑制効果を有する shRNA を連結させた mRNA (sh-mRNA) を使用するため、sh-mRNA による cDNA ディスプレイ複合体の作製が可能かどうか評価を行った。当初は sh-mRNA の持つ 5' 側のヘアピン構造が cDNA ディスプレイ複合体生成に必要な転写、翻訳、逆転写などの工程に影響を及ぼす可能性が危惧されたため、ヘアピン構造部分と mRNA 部分との間に 18 塩基ほどのスペーサー配列を挿入した。その結果、複合体作製の一連の工程であるヘアピン構造を持つ sh-mRNA の全長転写、ピューロマイシン結合 DNA リンカーとの結合形成、ペプチド鎖の翻訳とピューロマイシンを介した sh-mRNA との連結、mRNA 部分の逆転写による cDNA の生成、ヘアピン構造を有するプライマーによる cDNA からの PCR 増幅の 5 点を確認し、複合体作成が可能であることが示された。特ににおいては、使用する無細胞翻訳系の由来が原核細胞の場合と哺乳細胞の場合でペプチドの連結効率に大きな差があることが確認された。またにおいても、ペプチド連結後の複合体を精製せずとも逆転写反応が進むことが確認されたため、ペプチド選別作業の短縮・効率化が期待される。これらの結果より、ペプチド選別作業に必要な項目をひととおり確認できたといえる。さらに、の工程で生成された cDNA ディスプレイ複合体の精製・濃縮法にも改良を加え、ビオチンの可逆的な結合・解離が可能なたマビジン類縁体であるタマビジン固定化ビーズを用いることで効率的に複合体を精製できることを確認した。以上より、一連の検討によって CPP 選別に必要な shRNA 連結 cDNA ディスプレイ複合体の精製法を構築できた。

(2) 培養細胞を用いた複合体選別条件の検討

本研究では CPP 配列の選別時に shRNA 連結 cDNA ディスプレイ複合体を培養細胞に添加して複合体を細胞内に取り込ませ、shRNA 部分の発現抑制効果によって細胞内の蛍光タンパク質発現量を低下させることで蛍光強度に基づく選別を行う。そのため、発現抑制を担う shRNA には通常よりも非常に分子量の大きな修飾が施されることになり、shRNA の発現抑制能の低下が懸念された。そこでまず、cDNA ディスプレイ複合体生成の基点となる sh-mRNA を用いて、遺伝子発現能の低下が見られるか確認を行った。ルシフェラーゼ発現を抑制する shRNA 配列を作成し、センス鎖の 3' 末端に mRNA 配列を連結した sh-mRNA を調製して、Lipofectamine RNAiMAX 試薬を用いてルシフェラーゼ発現 HeLa 細胞に導入したところ、sh-mRNA は同配列の siRNA 単体をトランスフェクトした場合とほぼ同等の活性を示した。このことから、shRNA へのセンス鎖の 3' 末端への修飾は遺伝子発現抑制能に大きな影響を及ぼさない可能性が示唆された。

次に、cDNA ディスプレイ複合体の細胞内取り込み実験の条件検討を行った。本選別系では細胞内への cDNA ディスプレイ複合体の移行の有無を、複合体中の DNA リンカー部分に存在するフルオレセイン分子の蛍光に基づいて評価するため、個々の細胞において蛍光修飾リンカーの蛍

光が検出できるような複合体添加量と細胞数の比を推定することが重要になる。このため、フルオレセイン修飾した既存の膜透過ペプチド（CPP）を合成して培養細胞に添加し、CPP の細胞内移行量と蛍光検出に必要な添加量の推定を行った。複数の既知 CPP で検討した結果、個々の細胞内の蛍光の有無を検出するには少なくとも $0.1\mu\text{M}$ 以上の CPP を添加する必要があることが確認された。実際に cDNA ディスプレイ複合体を用いて細胞内移行に基づいた選別をする場合、複合体全体の分子量は CPP 単一分子よりも顕著に大きいため、細胞内移行量が低下する可能性が考えられる。そのため、選別時には培養細胞への複合体添加量をさらに増やす必要があると推定された。加えて、複合体が細胞内に移行し、蛍光を有するようになった細胞の選別にはセルソーターの利用を想定していたが、セルソーターでの細胞分取には少なくとも 105 個以上の細胞が必要とされているため、これまでの検討で得られていた複合体量のスケールアップ、もしくはより少ない細胞数での細胞分手法の検討が必要となった。

以上の知見を踏まえ、今後の機会に向けて複合体生成法と細胞分手法の検討を同時に進行させ、RNAi 効率に基づいた CPP 選別法の確立への検討を継続させていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 K. C. Tara Bahadur, Tada Seiichi, Zhu Liping, Uzawa Takanori, Minagawa Noriko, Luo Shyh-Chyang, Zhao Haichao, Yu Hsiao-hua, Aigaki Toshiro, Ito Yoshihiro	4. 巻 54
2. 論文標題 In vitro selection of electrochemical peptide probes using bioorthogonal tRNA for influenza virus detection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 5201 ~ 5204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8cc01775a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Marziyeh Karimiavargani, Seiichi Tada, Noriko Minagawa, Yoshihiro Shimizu, Takuji Hirose, Yoshihiro Ito, Takanori Uzawa	4. 巻 25
2. 論文標題 Phosphorogenic and Spontaneous Formation of Tris(bipyridine)ruthenium in Peptide Scaffolds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Peptide Science	6. 最初と最後の頁 e3158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/psc.3158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 多田 誠一、皆川 倫子、鷓澤 尊規、伊藤 嘉浩
2. 発表標題 化学拡張型進化分子工学的手法によるインフルエンザウイルスの電気化学的検出
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----