

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02918

研究課題名(和文) 微生物由来細胞膜透過性ペプチドを利用したタンパク質・抗体の細胞内導入法の開発

研究課題名(英文) Bacterial CPP-mediated internalization of antibodies and proteins

研究代表者

濱野 吉十 (Hamano, Yoshimitsu)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：50372834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：細菌は、イソペプチド骨格を特徴とするポリカチオン性ホモポリアミノ酸を産生する。本研究では、代表的なポリカチオン性イソペプチドである -ポリ-L- -リジン(-P L)と -オリゴ-L- -リジン(-O L)が、細胞膜を直接貫通して動物細胞に取り込まれ、細胞質全体に拡散することを直接証明した。本研究では、クリックアブルな -P Lおよび -O L誘導体を酵素的に合成し、蛍光色素と結合させて細胞内局在を解析した。興味深いことに、-P Lまたは -O Lを結合させた蛍光タンパク質も細胞内に取り込まれた。さらに興味深いことに、-P Lと結合したCreリコンビナーゼと抗体も細胞内に送達した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体医薬などの高分子医薬は分子標的への特異性が高く、がんやリウマチなど難病とされてきた疾患に対しても優れた治療効果を発揮する。また、近年のバイオテクノロジー技術の革新により高分子医薬の製造法も確立され、現在の医薬品ベストセラー上位のほとんどが高分子医薬になっている。ただし、高分子医薬には弱点もあり、高分子であるため基本的に細胞内に入らない。したがって、高分子医薬の分子標的は細胞表面の受容体などに限定され、治療可能な疾患も限定的である。本研究では、-P Lと -O Lの優れた細胞膜透過性を明らかにするとともに、これらを利用することで高分子医薬を細胞内分子標的にも応用できる基盤技術を構築した。

研究成果の概要(英文)：Bacteria produce polycationic homopoly(amino acid)s, which are characterized by isopeptide backbones. Here, for the first time, we provide direct evidence that two representative bacterial polycationic isopeptides, -poly-L- -lysine (-P L) and -oligo-L- -lysine (-O L), were internalized into mammalian cells by direct cell-membrane penetration and then diffused throughout the cytosol. In this study, we used clickable -P L and -O L derivatives carrying a C-terminal azide group, which were enzymatically produced and then conjugated with a fluorescent dye to analyze subcellular localization. Interestingly, fluorescent proteins conjugated with the clickable -P L or -O L were also internalized into cells and diffused throughout the cytosol. Notably, a Cre recombinase conjugate with -P L entered cells and mediated the Cre/loxP recombination, and -P L was found to deliver a full-length IgG antibody to the cytosol and nucleus.

研究分野：応用微生物学

キーワード：細胞膜透過性ペプチド ポリリジン CPP

### 1. 研究開始当初の背景

酵素、タンパク質、抗体、DNA などの生体高分子は、通常、細胞膜を透過しない。これらの細胞膜透過性を改善する実用的な技術を開発できれば、細胞内の分子標的を狙ったバイオ医薬や核酸医薬を創製することができる。これら生体高分子を直接細胞内に導入する方法として、マイクロインジェクションやエレクトロポレーションなど細胞膜を一過的に破壊して導入する方法、あるいは、リポソームを用いて導入する方法などが用いられてきた。しかし、導入効率や細胞に与える損傷の大きさから必ずしも満足のいく結果は得られていない。一方で、塩基性アミノ酸（アルギニン、リジンなど）を主成分とするポリカチオン性ペプチドは、分子量が 1,000 を超えるにも関わらず、優れた細胞膜透過性を示すことから細胞膜透過性ペプチド (CPP) と呼ばれる。さらに、分子量が数万を超えるタンパク質を CPP で化学修飾することで、タンパク質や酵素を動物細胞内に直接送達できる成功例も報告されている (*Science*, 285, 1569, 1999; *Biopolymers*, 84, 241, 2006)。CPP で修飾された生体高分子が細胞膜を透過できる仕組みについては完全に理解されていないが、動物細胞表面のシアル酸を含む糖鎖の負電荷にポリカチオン性の CPP が静電的に速やかに吸着することでエンドサイトーシス/マクロピノサイトーシスの経路で効率良く細胞内に取り込まれると考えられている。実際に、CPP との化学的架橋体あるいは融合タンパク質としてポリカチオン修飾したタンパク質を調製し、細胞培養液に加えるだけで細胞機能が制御できた例も報告されており、細胞生化学的手法の一つとして認知されるとともに、抗体医薬を含むバイオ医薬の新しいドラッグデリバリーシステム (DDS) として注目されている。

現在、8 残基からなる L-アルギニンペプチド (R8) が既存の CPP として基礎研究レベルで繁用されている。タンパク質や酵素を R8 で修飾する簡便な方法は、N 末あるいは C 末に R8 タグを結合させた融合タンパク質として調製する方法である。しかし、本法は万能な方法ではない。タンパク質の主構造に R8 タグを導入することでタンパク質構造が維持されず不溶性の変性タンパク質となる場合や、R8 タグがタンパク質の表層に存在しない場合には、期待された細胞膜透過性が得られない場合もある。一方で、タンパク質や酵素の表層を化学的に R8 で修飾する方法は、この問題を解決できるが、タンパク質が変性しない温和な条件で R8 修飾するためには、R8 に特異的な反応基 (クリックケミストリーに利用できるアジド基など) を有機化学的に導入する必要がある。また、R8 の合成も固相有機合成法に頼るしかなく、その高額な製造コストは、CPP を利用したバイオ医薬品の DDS 開発の障壁となっている。さらに、既存の CPP は少なからず細胞毒性 (生育阻害) を示すことも解決すべき問題である。

### 2. 研究の目的

タンパク質や酵素の表層を CPP で化学修飾する方法は、細胞膜透過性を付与する目的に極めて有効な手段である。しかし、コストと毒性の問題を解決しない限り実用化への壁を超えることはできない。そこで我々は、R8 や既存の CPP に代わる究極的低コストで無毒なポリカチオン修飾のツールとして、放線菌由来の天然ポリカチオン化合物である  $\epsilon$ -ポリ-L- $\alpha$ -リジン ( $\epsilon$ -P $\alpha$ L) (図 1A)、および、 $\epsilon$ -オリゴ-L- $\beta$ -リジン ( $\epsilon$ -O $\beta$ L) (図 1B) に着目した。さらに我々は、これら天然ポリカチオンの生合成メカニズムの解明 (*Nat. Chem. Biol.*, 4, 766, 2008; *Nat. Chem. Biol.*, 8, 791, 2012) と発展的研究の知見を利用することで、 $\epsilon$ -P $\alpha$ L のカルボキシル

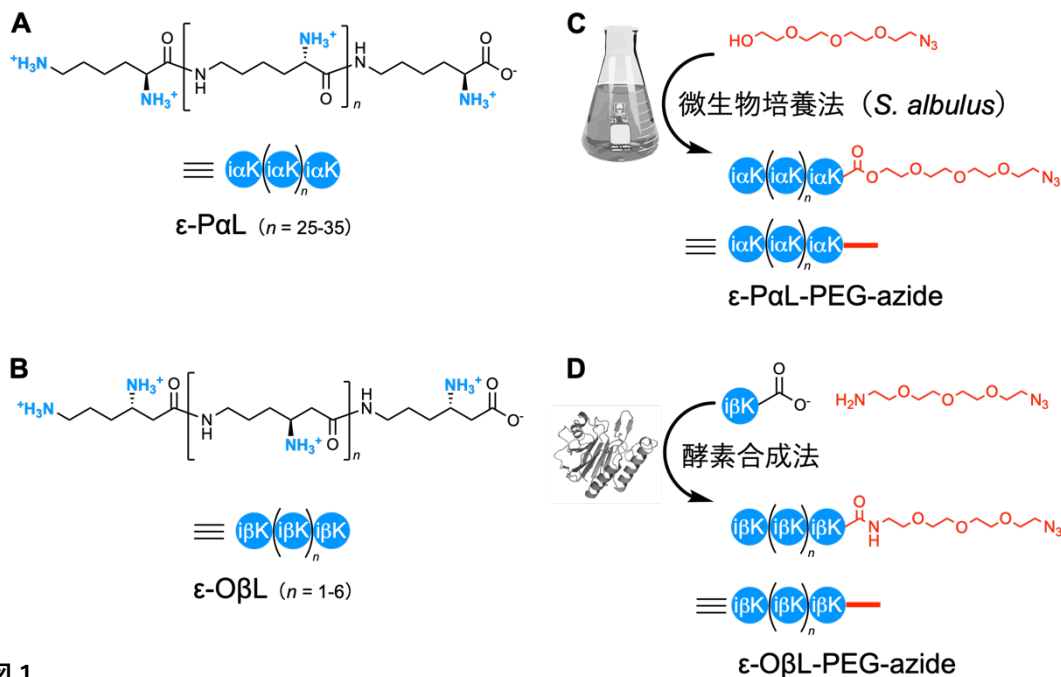


図 1

基末端にアジド基などの反応基を導入する微生物培養法(国際特許 PCT/JP2018/31153) (図 1C)、および、 $\epsilon$ - $0\beta$ L のカルボキシル基末端に反応基を導入できる酵素合成法 (図 1D) を確立した。そこで本研究では、得られた  $\epsilon$ - $P\alpha$ L-PEG-azide および  $\epsilon$ - $0\beta$ L-PEG-azide を用いて、酵素、タンパク質、抗体、DNA などの生体高分子を動物細胞内に直接送達させる基盤技術の構築を行った。

### 3. 研究の方法

#### $\epsilon$ - $P\alpha$ L の細胞内送達の確認

$\epsilon$ - $P\alpha$ L の細胞内送達を確認するために  $\epsilon$ - $P\alpha$ L-PEG-azide を用いて蛍光色素 (FAM) を  $\epsilon$ - $P\alpha$ L で化学修飾した。得られた  $\epsilon$ - $P\alpha$ L-FAM (図 2) を動物細胞 (HeLa 細胞) の培養液に添加し、細胞内に送達するか共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、従来型 CPP である R8 で化学修飾した R8-FAM を調製し、コントロールとして用いた。

#### $\epsilon$ - $P\alpha$ L 修飾によるタンパク質の細胞内送達の確認

$\epsilon$ - $P\alpha$ L で化学修飾したタンパク質が細胞内に送達されるか確認するために、 $\epsilon$ - $P\alpha$ L-PEG-azide を用いて蛍光タンパク質 (mAG) を  $\epsilon$ - $P\alpha$ L で化学修飾した。得られた  $\epsilon$ - $P\alpha$ L-mAG (図 2) を動物細胞 (HeLa 細胞) の培養液に添加し、細胞内に送達するか共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、R8 で化学修飾した R8-mAG を調製し、コントロールとして用いた。

#### $\epsilon$ - $P\alpha$ L 修飾による Cre recombinase の細胞内送達と機能発現

$\epsilon$ - $P\alpha$ L で化学修飾した酵素が細胞内に送達され、機能するか確認するために、 $\epsilon$ - $P\alpha$ L-PEG-azide を用いて Cre recombinase (Cre) を  $\epsilon$ - $P\alpha$ L で化学修飾した。得られた  $\epsilon$ - $P\alpha$ L-Cre (図 2) をプロベクターを保持した動物細胞の培養液に添加し、細胞内に送達し機能発現するか蛍光顕微鏡で観察した。

#### $\epsilon$ - $P\alpha$ L 修飾によるモノクローナル抗体 (mAb) の細胞内送達

$\epsilon$ - $P\alpha$ L で化学修飾した mAb が細胞内に送達されるか確認するために、 $\epsilon$ - $P\alpha$ L-PEG-azide を用いて蛍光標識した mAb (mAb<sup>FAM</sup>) を  $\epsilon$ - $P\alpha$ L で化学修飾した。得られた  $\epsilon$ - $P\alpha$ L-mAb<sup>FAM</sup> (図 2) を動物細胞 (HeLa 細胞) の培養液に添加し、細胞内に送達するか共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### $\epsilon$ - $P\alpha$ L 修飾による DNA の細胞内送達

論文報告および特許出願予定により割愛。

#### $\epsilon$ - $0\beta$ L の細胞内送達の確認

$\epsilon$ - $0\beta$ L の細胞内送達を確認するために  $\epsilon$ - $0\beta$ L-PEG-azide を用いて蛍光色素 (FAM) を  $\epsilon$ - $0\beta$ L で化学修飾した。得られた  $\epsilon$ - $0\beta$ L-FAM (図 2) を動物細胞 (HeLa 細胞) の培養液に添加し、細胞内に送達するか共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### $\epsilon$ - $0\beta$ L 修飾によるタンパク質の細胞内送達の確認

$\epsilon$ - $0\beta$ L で化学修飾したタンパク質が細胞内に送達されるか確認するために、 $\epsilon$ - $0\beta$ L-PEG-azide を用いて蛍光タンパク質 (mAG) を  $\epsilon$ - $0\beta$ L で化学修飾した。得られた  $\epsilon$ - $0\beta$ L-mAG (図 2) を動物細胞 (HeLa 細胞) の培養液に添加し、細胞内に送達するか共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

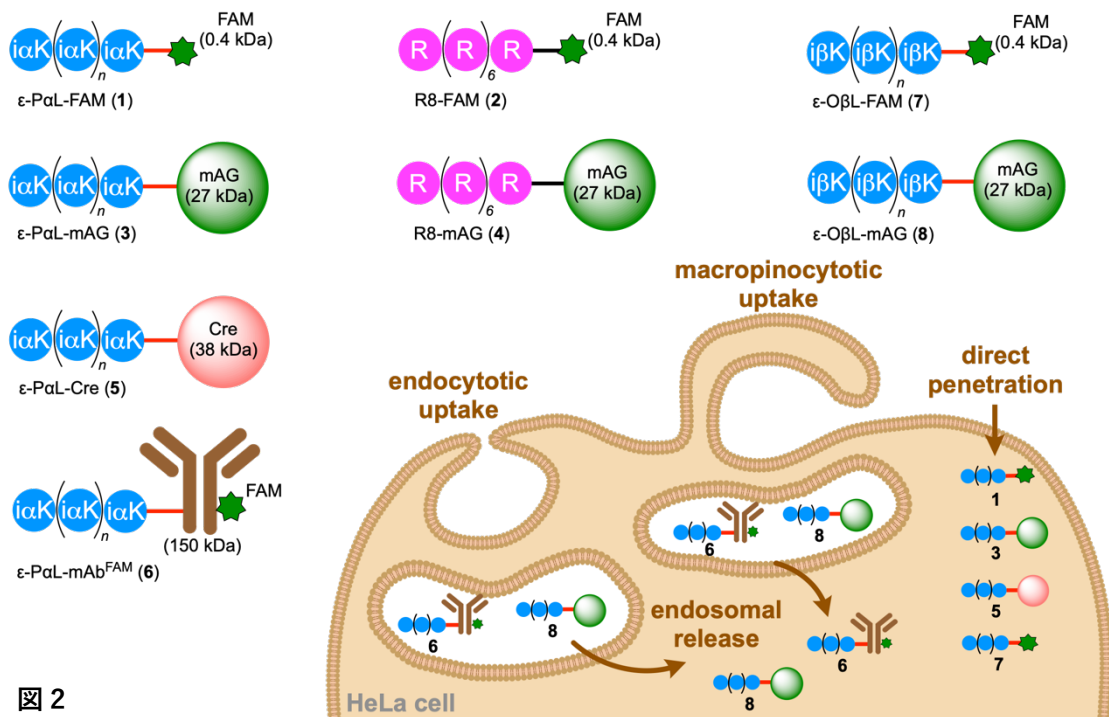


図 2

### 4. 研究成果

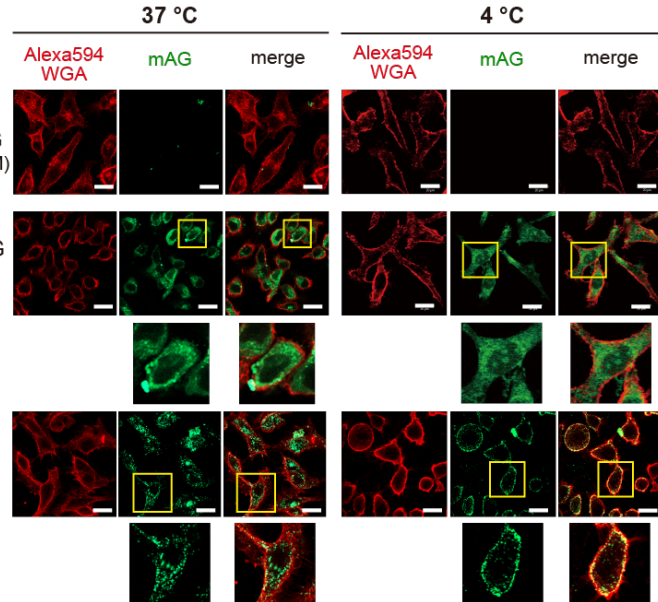
### $\epsilon$ -P $\alpha$ L の細胞内送達の確認

$\epsilon$ -P $\alpha$ L の細胞内送達を確認するために  $\epsilon$ -P $\alpha$ L-PEG-azide を用いて蛍光色素 (FAM) を  $\epsilon$ -P $\alpha$ L で化学修飾した。得られた  $\epsilon$ -P $\alpha$ L-FAM (図 2) を動物細胞 (HeLa 細胞) の培養液に添加し、細胞内に送達するか共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、 $\epsilon$ -P $\alpha$ L-FAM は 37°C と 4°C の両温度条件において細胞内への送達が観察された。4°C はエネルギー依存的なエンドサイトーシスによる細胞内取り込みが抑制される。したがって、 $\epsilon$ -P $\alpha$ L-FAM はエネルギー非依存的な細胞膜直接透過によって取り込まれることが判明した (図 2)。R8-FAM も同様の実験結果を与えた。

### $\epsilon$ -P $\alpha$ L 修飾によるタンパク質の細胞内送達の確認

$\epsilon$ -P $\alpha$ L で化学修飾したタンパク質が細胞内に送達されるか確認するために、 $\epsilon$ -P $\alpha$ L-PEG-azide を用いて蛍光タンパク質 (mAG) を  $\epsilon$ -P $\alpha$ L で化学修飾した。得られた  $\epsilon$ -P $\alpha$ L-mAG (図 2) を動物細胞 (HeLa 細胞) の培養液に添加し、細胞内に送達するか共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、 $\epsilon$ -P $\alpha$ L-mAG は 37°C と 4°C の両温度条件において細胞内への送達が観察された (図 3)。4°C においても細胞内への取り込みが観察されたことから、 $\epsilon$ -P $\alpha$ L-mAG は 27kDa の生体高分子誘導体であるにも関わらず、エネルギー非依存的な細胞膜直接透過によって取り

図 3



込まれることが判明した (図 2)。他方、R8-mAG は、37°C の温度条件においてのみ、細胞内への取り込みが観察され (図 3)、また、エンドソーム内に局在することを確認した (図 2)。

### $\epsilon$ -P $\alpha$ L 修飾による Cre recombinase の細胞内送達と機能発現

$\epsilon$ -P $\alpha$ L で化学修飾した酵素が細胞内に送達され、機能するか確認するために、 $\epsilon$ -P $\alpha$ L-PEG-azide を用いて Cre recombinase (Cre) を  $\epsilon$ -P $\alpha$ L で化学修飾した。得られた  $\epsilon$ -P $\alpha$ L-Cre (図 2) をプロベクターを保持し

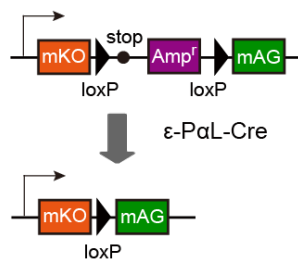
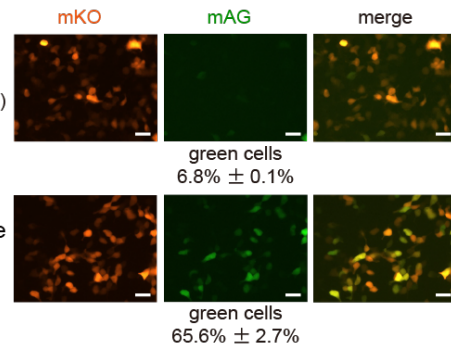


図 4



た動物細胞の培養液に添加し、細胞内に送達し機能発現するか蛍光顕微鏡で観察した。その結果、 $\epsilon$ -P $\alpha$ L-Cre は細胞内に送達し、プロベクター内に存在する loxP 配列の遺伝子組換え反応を触媒し、mKO-mAG の融合タンパク質を発現することを確認した (図 4)。

### $\epsilon$ -P $\alpha$ L 修飾によるモノクローナル抗体 (mAb) の細胞内送達

$\epsilon$ -P $\alpha$ L で化学修飾した mAb が細胞内に送達されるか確認するために、 $\epsilon$ -P $\alpha$ L-PEG-azide を用いて蛍光標識した mAb (mAb<sup>FAM</sup>) を  $\epsilon$ -P $\alpha$ L で化学修飾した。得られた  $\epsilon$ -P $\alpha$ L-mAb<sup>FAM</sup> (図 2) を動物細胞 (HeLa 細胞) の培養液に添加し、細胞内に送達するか共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、 $\epsilon$ -P $\alpha$ L-mAb<sup>FAM</sup> は 37°C の温度条件のみ細胞内への送達が観察され、エネルギー依存的なエンドサイトーシスによって取り込まれることが判明した (図 5)。しかし、細胞質内での拡散と核内への移行も観察されたことから、エンドソームからリリースされることも確認した (図 2)。

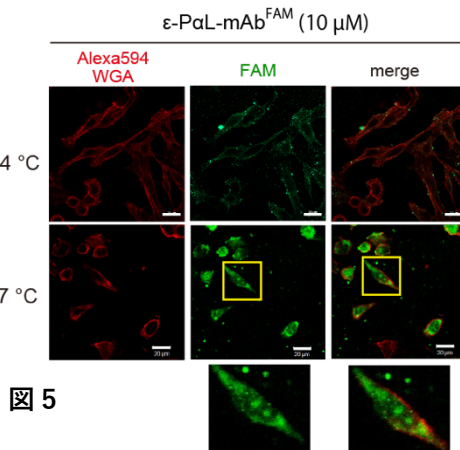


図 5

### $\epsilon$ -P $\alpha$ L 修飾による DNA の細胞内送達

論文報告および特許出願予定により割愛。

### $\epsilon$ -O $\beta$ L の細胞内送達の確認

$\epsilon$ -O $\beta$ Lの細胞内送達を確認するために $\epsilon$ -O $\beta$ L-PEG-azideを用いて蛍光色素(FAM)を $\epsilon$ -O $\beta$ Lで化学修飾した。得られた $\epsilon$ -O $\beta$ L-FAM(図2)を動物細胞(HeLa細胞)の培養液に添加し、細胞内に送達するか共焦点レーザー顕微鏡で観察した。 $\epsilon$ -O $\beta$ Lは、 $\epsilon$ -P $\alpha$ Lと比較するとそのペプチド鎖長が顕著に短い。そこで、ペプチド鎖長と細胞内移行について調べたところ、4残基以上のペプチド鎖長において細胞内への移行が観察され、ペプチド鎖長が長くなるほどその細胞内移行効率が向上した(図6)。また、37°Cと4°Cの両温度条件において同様の結果を与えたことから、 $\epsilon$ -O $\beta$ Lはエネルギー非依存的な細胞膜の直接透過によって細胞内に取り込まれることが判明した(図2)。

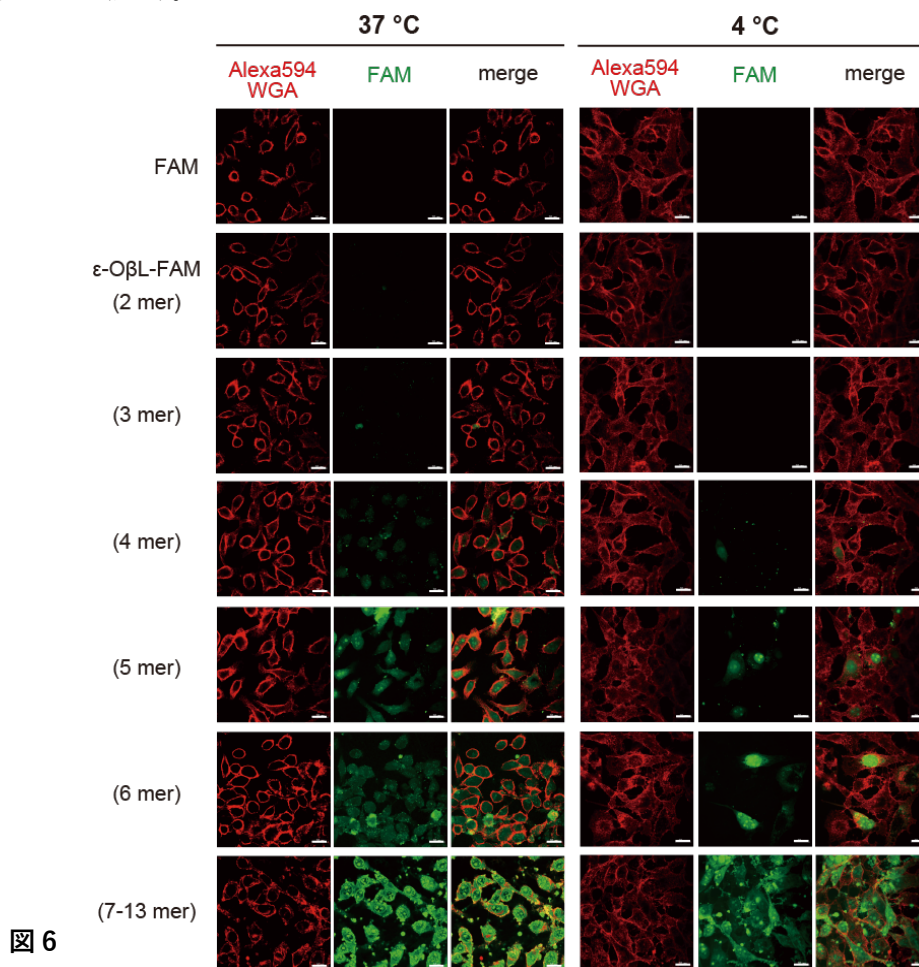


図 6

#### $\epsilon$ -O $\beta$ L修飾によるタンパク質の細胞内送達の確認

$\epsilon$ -O $\beta$ Lで化学修飾したタンパク質が細胞内に送達されるか確認するために、 $\epsilon$ -O $\beta$ L-PEG-azideを用いて蛍光タンパク質(mAG)を $\epsilon$ -O $\beta$ Lで化学修飾した。得られた $\epsilon$ -O $\beta$ L-mAG(図2)を動物細胞(HeLa細胞)の培養液に添加し、細胞内に送達するか共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、 $\epsilon$ -O $\beta$ L-mAGは37°Cの温度条件において細胞内への送達が観察された(図7)。4°Cにおいては細胞内への取り込みが観察されなかったことから、 $\epsilon$ -O $\beta$ L-mAGはエネルギー依存的なエンドサイトーシスによって取り込まれることが判明した(図2)。

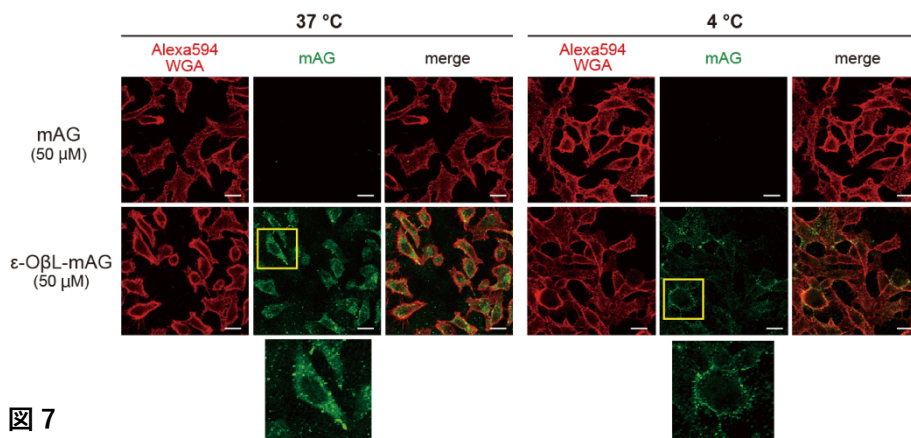


図 7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeuchi Yamato, Ushimaru Kazunori, Kaneda Kohei, Maruyama Chitose, Ito Takashi, Yamanaka Kazuya, Ogasawara Yasushi, Katano Hajime, Kato Yasuo, Dairi Tohru, Hamano Yoshimitsu	4. 巻 5
2. 論文標題 First direct evidence for direct cell-membrane penetrations of polycationic homopoly(amino acid)s produced by bacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-04110-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 武内大和, 牛丸和乗, 兼田康平, 丸山千登勢, 濱野吉十
2. 発表標題 微生物由来ポリカチオンペプチドを利用したタンパク質の細胞内送達
3. 学会等名 2021年度日本放線菌学会大会（オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武内大和, 長谷部文人, 丸山千登勢, 濱野吉十
2. 発表標題 -poly-L-lysineによるCPP修飾タンパク質の細胞内送達促進
3. 学会等名 2022年度日本農芸化学会（オンライン）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山中 雅喜, 小倉 知也, 武内 大和, 長谷部 文人, 丸山 千登勢, 濱野 吉十
2. 発表標題 -poly-L-lysine-doxorubicinコンジュゲートを用いたDNA導入技術の開発
3. 学会等名 2023年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武内大和, 長谷部文人, 丸山千登勢, 濱野吉十
2. 発表標題 -poly-L-lysine による従来型CPP-タンパク質コンジュゲートの細胞膜透過性改善
3. 学会等名 2023年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小倉 知也, 鈴木 海渡, 武内 大和, 長谷部 文人, 丸山 千登勢, 濱野 吉十
2. 発表標題 ポリカチオンイソペプチド修飾した中分子ペプチドの細胞膜透過性と生理活性の評価
3. 学会等名 2023年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshimitsu Hamano
2. 発表標題 -lysine oligopeptides chain enhances intracellular uptake of streptothricin
3. 学会等名 4th International Conference on Natural Products Discovery and Development in the Genomic Era, SIMB (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshimitsu Hamano
2. 発表標題 Biosynthesis and cell-penetrating activity of polycationic homopoly(amino acid)s
3. 学会等名 19th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (ISBA) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshimitsu Hamano
2. 発表標題 Cytosolic protein delivery with clickable polycationic isopeptides made by the biosynthetic enzymes
3. 学会等名 KMB 50th Anniversary, 2023 Annual Meeting & International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究 分担 者	丸山 千登勢  (Maruyama Chitose)	福井県立大学・生物資源学部・准教授	
	(20452120)	(23401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------