

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：32407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05285

研究課題名(和文) 高い構造異方性を持つ細胞透過性人工タンパク質の細胞透過機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of cell-penetration of an artificial coiled-coil protein carrier having high structure anisotropy.

研究代表者

佐野 健一 (Sano, Ken-Ichi)

日本工業大学・基幹工学部・教授

研究者番号：80321769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質やペプチドをがん細胞に直接導入し、治療に応用することは古くから進められてきた。しかし、従来の運び屋による細胞への導入は、その効率が低く、大きな問題になっていた。我々が創製した細胞透過性人工タンパク質は、従来の運び屋と比べ、1000倍に達する高い細胞透過活性を示す。この研究では、この人工タンパク質の細胞透過機構の解明を進めた。その結果、この人工タンパク質特有の分子構造によって、既知の運び屋が細胞に働きかける経路とは異なる経路で細胞に働きかけ、細胞内に取り込まれること、さらに、細胞に働きかけるそもそもの活性が既知の運び屋よりも大きいことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究成果により、細胞透過人工タンパク質が、従来から知られている細胞表面にある糖鎖だけでなく、別の糖鎖へ強く結合し、その結果、細胞内への導入を効率よく誘導できることが明らかになった。さらに、人工タンパク質の細胞表面への結合そのものによって生じる細胞膜への力学的なストレスが、細胞内への導入に大きく関与していることを示したことは、応用利用だけでなく、基礎科学における新たな知見を与えた。これらの知見は、細胞内への運び屋の新たな設計指針を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Efficient delivery of proteins and peptides into cancer cells are investigated, and tried to apply it to treatment. However, previously investigated drug delivery carriers for cell-penetration did not show enough efficiency for intracellular delivery, which restrict the use of cancer therapy. In a previous study, we have created an artificial protein cell-penetrating carrier, and its cell-penetrating activity shows ~ 1000 times greater than that of previously reported carriers. In this study, we have investigated that the mechanism of the superior cellular internalization of the artificial protein carrier. As a result, it is revealed that the behavior of the artificial protein carrier cell-penetration based on the structural properties of the molecule differs from that of previously reported carriers, and also cleared that the efficiency of the binding and activation of cell-penetration activity of the artificial protein is much greater than that of previously reported carriers.

研究分野：生体分子工学

キーワード：細胞内デリバリー コイルドコイル構造 ナノ構造

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus) の持つ TAT タンパク質由来のカチオン性ペプチドが、細胞透過能を持つことが報告されたことをきっかけに、数多くのカチオン性細胞透過ペプチド (Cell-Penetrating Peptide (CPP)) を用いた細胞内ドラッグデリバリーシステム (DDS) 担体の開発が進められてきた。他方、材料科学分野の知見から、アスベストやカーボンナノチューブといった針状のナノ材料が、極めて高い細胞透過能を持つことが分かっていた。我々は、これら両者の特徴を兼ね合わせた生分解性のある分子が、細胞内 DDS 担体として優れた特性を示すと考え、タンパク質としては最も剛直かつ、大きな異方性構造を形成する α -helical coiled-coil 構造に着目した。そこで、分子全体が α -helical coiled-coil 構造からなり、表面電荷がカチオン性の人工タンパク質 CCPC 140 を設計・創製した(1)。この CCPC 140 は、既知の CPP と比べ 1000 倍にも達する極めて高い細胞透過能を示す。CCPC 140 は、タンパク質を細胞内に効率良く直接導入することができることもわかった。CCPC 140 にモデルタンパク質である GFP を融合した CCPC 140-GFP は、最も広く使われている CPP の一つである Octa-Arginine ペプチドを融合した GFP に比べ、少なく見積もっても 20 倍の効率で GFP が細胞内に導入された(2)。

この CCPC 140 の高い細胞透過能は、構造異方性と表面電荷の両方に依存することがわかっている。すなわち、CCPC 140 の表面電荷を中性に変えた変異体の細胞透過活性は、1/50 程度にまで減少する(3)。また、CCPC 140 の変異体・誘導体の細胞透過活性の比較から、CCPC 140 が示す高い細胞透過活性には、4.5 : 1 以上の分子アスペクト比が必要であることを明らかにした(4, 特開 2017-206464)。このように、これまで我々は CCPC 140 の高い細胞透過能に必要な物理化学的性質に焦点を当てて研究を進めてきた。

一方、CCPC 140 の細胞透過メカニズムについても、CPP と同じく複数の経路が関与していることを明らかにしてきた。CCPC 140 は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) と細胞膜上で相互作用し、GPCR シグナルが誘起するエンドサイトーシスによって細胞膜を通過する。この GPCR 経路は、CPP と同じカチオン性の分子表面電荷によるものと考えられるが、CCPC 140 の特徴である分子の剛直性、構造異方性による高い細胞透過活性の発現機構を明らかにするには至っていなかった。しかしながら当時、我々の研究から、膜タンパク質の糖鎖修飾であるグリコサミノグリカンが CCPC 140 の細胞透過活性に重要な役割を果たしていること、CPP では明らかになっていないグリコサミノグリカンとの相互作用が惹起するエンドサイトーシス機構の存在が示唆される結果が得られている。このグリコサミノグリカンが関与する経路は、CCPC 140 の物理化学的性質に依存する可能性が極めて高いことが示唆された。

そこで本研究では、グリコサミノグリカンと CCPC 140 との相互作用に焦点を当て、CCPC 140 の細胞内輸送メカニズムを明らかにする。

2. 研究の目的

本研究は、CCPC 140 の細胞透過メカニズムを明らかにすることで、細胞外分子の刺激によるエンドサイトーシスの活性化機構、構造異方性を有する分子の受動輸送機構を明らかにすることを目的とした(図 1)。具体的には、グリコサミノグリカン依存的な能動輸送経路における CCPC 140 の物理化学

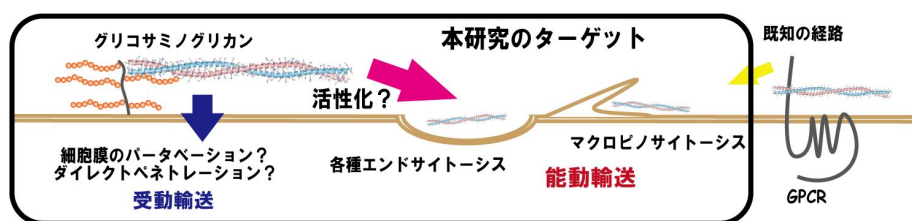


図 1. 本研究の概要

的性質によって活性化されるパスウェイの解析、高い構造異方性を持つカチオン分子が細胞膜に与える物理刺激を膜張力、膜粘度変化として定量的に評価することであり、これらの研究成果を通して、細胞内 DDS 担体としての最適化や、CCPC 140 の高い細胞透過能を利用した低分

子葉の細胞内デリバリーシステムの開発を進める。また長い研究の歴史を持つが、未だ生物学における重要な課題として残る、エンドサイトーシスのものを理解する一助となる研究をも目指す。

3. 研究の方法

(1) グリコサミノグリカン依存的エンドサイトーシス機構の解明

グリコサミノグリカンを合成する酵素を欠損した Chinese hamster ovary 由来の *pgsA*-745 株とグリコサミノグリカン合成能を保持する同系の CHO-K1 細胞を用いて、CCPC 140 およびその派生体の細胞透過活性を比較することにより、グリコサミノグリカン依存的エンドサイトーシスの影響を調べた。

CCPC 140 の派生体は、分子の表面電荷が実験条件ではほぼ中性である CCPC 140 p16.5 と表面電荷は CCPC 140 と変わらないが、特定の分子構造を取らず、構造が不安定な CCPC 62 を用いた。

(2) CCPC 140 が活性化するエンドサイトーシス経路の解明

エンドサイトーシス阻害剤存在下で、CCPC 140 およびその派生体の細胞透過活性を比較することにより、CCPC 140 の剛直で異方性の高い構造、カチオン性の表面電荷のどの物理化学的性質に基づいて、どのエンドサイトーシス経路を活性化するのか調べた。阻害剤には、カベオラエンドサイトーシス阻害剤と知られている Nystatin、Rho-GTPase family の活性を阻害し、アクチンのダイナミクスを阻害し、マクロピノサイトーシスを阻害する jasplakinolide、Rho-GTPase 依存的なマクロピノサイトーシスを阻害する Toxin B を用いた。CCPC 140 およびその派生体の細胞透過活性は、Fluorescence-activated cell sorting (FACS)による定量評価と蛍光顕微鏡による観察をおこなった。

(3) 近接ビオチン化法による CCPC 140 のターゲットの解明

近接ビオチン化酵素を融合した CCPC 140 を作成し、ビオチン化される分子の同定から、CCPC 140 がターゲットとするタンパク質の同定を試みた。ビオチン化酵素には、反応速度が早いことが知られている TurboID を用いた。

4. 研究成果

(1) CCPC 140 のグリコサミノグリカン依存的エンドサイトーシス (投稿中, 5)

ほぼ全ての CPP による細胞透過には、細胞表面のプロテオグリカン、特にグリコサミノグリカン(GAGs)が重要な役割を果たしていることが知られている。GAGs 合成酵素を Chinese hamster ovary 由来の *pgsA*-745 を用いた研究から、多くの CPP の細胞透過の最初の段階として酸性の GAGs と塩基性の CPP の静電的な結合によって、広義のエンドサイトーシスが活性化されることがわかっている。この電気的な結合によって活性化されるエンドサイトーシスが、数 μM の CPP 投与時の主要な細胞透過経路となっていると考えられている。

本研究から、CCPC 140 でも同様に細胞透過には、GAGs が重要であることが明らかになった。すなわち、CCPC 140 の投与濃度が 100 nM 以下で、*pgsA*-745 への顕著な透過活性の低下が見られた。一方、1 μM 投与時において、GAGs 欠損細胞への透過活性の低下は見られず、CCPC 140 の細胞透過量が飽和することがわかった。GAGs 以外の細胞表面糖鎖であるシアル酸は、CPP において細胞透過の最初の段階に関与する可能性が示唆されている。これらのことを併せて考えると CCPC 140 は、GAGs との結合によって活性化されるエンドサイトーシスを主要な細胞透過機構としているが、それ以外のシアル酸らとの静電的な結合によって活性化されるエンドサイトーシス経路も機能しており、高濃度 (1 μM) 投与時では、GAGs 経路を完全に補完できるポテンシャルを有することが明らかになった。

他方、特定の構造を有さない CCPC 62 では、既知の CPP と同様に GAGs への結合が、細胞透過活性に重要であること、シアル酸らの経路は、高濃度 (1 μM) 投与でも、GAGs 経路を補完できないことを明らかにした。また、表面電荷を持たない CCPC 140 p16.5 では、GAGs があっても静電的な結合がないことから、エンドサイトーシスの活性化はわずかに見られただけであった。

(2) CCPC 140 が活性化するエンドサイトーシス経路の解明 (投稿中, 5)

エンドサイトーシス阻害剤を用いた CCPC 140 とその派生体の細胞透過活性評価をおこなった。Caveola エンドサイトーシス阻害剤である nystatin は、構造をとらないカチオン性の CPP では、その細胞透過活性を阻害しないことが知られている。先行研究と同様に、特定の構造をとらない CCPC 62 では、nystatin による細胞透過活性の影響は、GAGs の有無に関わらず見られなかった。一方で、CCPC 140 に対しては、GAGs を持つ細胞において、エンドサイトーシスによる細胞透過への阻害が見られた。この阻害効果は、表面電荷が中性の CCPC 140 pI6.5 でも見られた。これらの結果から、CCPC 140 の剛直で異方的な構造によって、GAGs 依存的 caveola エンドサイトーシスを活性化することがわかった。

Jasplakinolide の添加によって、アクチンのダイナミクスを抑制することによる包括的なマクロピノサイトーシス阻害の影響は、CCPC 140 とその派生体において、GAGs の有無に関わらず見られた。このことから、マクロピノサイトーシスは、CCPC 140 の細胞透過においても主要な役割を果たしていることが改めて確認できた。構造をとらないカチオン性の CPP では、Rho-GTPase family の一つである Rac1 による制御によって活性化されるマクロピノサイトーシスが重要な役割を果たすことが知られている。Toxin B は、Rho-GTPase family の阻害剤であり、CPP の細胞透過を阻害する。同様に構造をとらない CCPC 62 では、GAGs の有無に関わらずその細胞透過活性は低下した。一方で、剛直で異方的な構造をとる CCPC 140 や CCPC 140 pI6.5 では、Toxin B は、これらの細胞透過活性に GAGs に関わらず影響を与えなかった。

現在、我々が考えている CCPC 140 の構造由来する特徴的な細胞透過機構を図 2 に示す(6)。この図からは、CCPC 140 の細胞透過機構は CPP とは異なり、どちらかと言えば SV40 のようなウイルスに近いことがわかった。

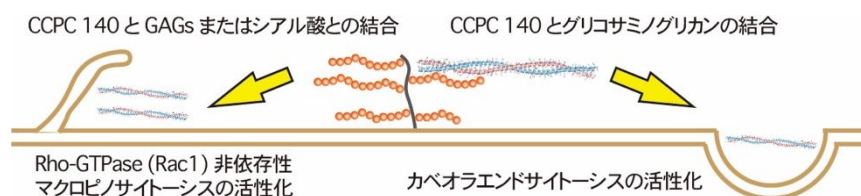


図 2. CCPC 140 が活性化するエンドサイトーシス

さらにこれらの解析結果と他の研究グループの報告(7)から、マクロピノサイトーシスの過程でおこる、細胞膜による”wrapping process”と細胞膜にかかる力学的な不可が、エンドサイトーシスの活性化に寄与することが示唆された。

(3) 近接ビオチン化法による CCPC 140 のターゲットの解明

近接ビオチン化酵素を融合した CCPC 140 を作成し、ビオチン化される分子の同定から、CCPC 140 がターゲットとするタンパク質の同定を試みた。最初に、ビオチン化酵素に BioID を用いた予備実験をおこなったが、BioID はその反応に 16-24 時間を要することから、CCPC 140 の細胞透過に要する ~60 min には遠く及ばないことから、反応速度が早いことが知られている TurboID を用いることとした。CCPC 140-GFP 融合タンパク質作成時に有効であったペンタグリシンを CCPC 140 と TurboID のリンカー配列に用い、融合タンパク質を作成したが、ほとんどが不溶性になり、また可溶化した画分にはビオチン化活性が見られなかった。そこで、リンカー配列の検討を行った。CCPC 140 が相互作用するタンパク質を同定するという本研究の目的には、リンカー配列は短い方が望ましい。融合タンパク質のリンカーとして、GS リンカーとして知られている GGGGS の 3 回繰り返し配列を参考に、(GGGGS)_n をリンカーに CCPC 140 と TurboID の融合タンパク質の作成、ビオチン化活性の評価を進めた。その結果、n が 2 または 3 のとき、目的の融合タンパク質が形成され、ビオチン化活性を持つことを確認した。しかしながら、立体構造の影響のためか、TurboID のビオチン化活性の低下が見られ、実際に細胞に対してビオチン化実験をおこなったが、解析に十分なビオチン化タンパク質を得ることができなかった。しかしながら、リンカー配列の最適化に関する知見は、他のペプチドやタンパク質の細胞内デリバリーに有効であることを確認した。

(4) CCPC 140 の吸着による細胞膜に与える物理的刺激

高い構造異方性を持つカチオン分子が細胞膜に与える物理刺激を膜張力、膜粘度変化として定量的に評価することを目指し、自作装置開発を進めた。ブラッシュアップを進めており、定量評価の実現も間近になってきた。

(5) CCPC 140 による低分子薬の細胞内デリバリー

本研究成果である CCPC 140 の細胞透過機構の解明によって、CCPC 140 の高い細胞透過能を利用した低分子薬の細胞内デリバリーシステムの開発を進めた。CPP を用いて抗がん剤低分子薬を細胞内に導入、薬理効果を発現することを示す報告がある。しかしながら、CPP の細胞透過活性が低いいため、通常数 μM 以上の濃度で CPP-低分子薬コンジュゲートを投与する必要がある。抗がん剤低分子薬の多くは、その IC_{50} が数 nM ~数十 nM であり、CPP の細胞透過活性では DDS キャリアとして不十分であることがわかる。今回、明らかにした CCPC 140 の細胞透過機構から、細胞内での低分子薬の遊離を促進するリンカーを設計した。また、実際に低分子抗がん剤をコンジュゲートした CCPC 140 の IC_{50} は、抗がん剤低分子薬単体投与時の IC_{50} の 1/5 程度まで低下する結果を示した（未発表）。現在、さらなる投与量の低減に向けた設計を進めている。

引用文献

- (1) N. Nakayama et al., Superior cell penetration by a rigid and anisotropic synthetic protein. *Langmuir* 31, 2826–2832, 2015.
- (2) K. Sano et al., Efficient cellular protein transduction using a coiled-coil protein carrier. *Chem. Lett.* 46, 719–721, 2017.
- (3) N. Nakayama et al., Noncationic rigid and anisotropic coiled-coil proteins exhibit cell- penetration activity. *Langmuir* 31, 8218–8223, 2015.
- (4) N. Nakayama et al., Effect of the aspect ratio of coiled-coil protein carriers on cellular uptake, *Langmuir* 34 (47), 14286–14293, 2018.
- (5) K. Sano and Y. Nomata, Coiled-coil protein carriers and unstructured cell-penetrating peptides differ in their activation of certain endocytosis pathways, *submitted*.
- (6) 佐野健一, 繊維状人工タンパク質の優れた細胞透過活性, *細胞* 54, 222–225, 2022.
- (7) X. Yi, et al., A universal law for cell uptake of one-dimensional nanomaterials. *Nano Lett.* 14, 1049–1055, 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 佐野健一	4. 巻 54
2. 論文標題 繊維状人工タンパク質の優れた細胞透過活性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 48-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石田啓太、佐野健一
2. 発表標題 細胞透過活性の向上を目的とした細胞透過人工タンパク質の多量体化
3. 学会等名 高分子学会北関東支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野健一
2. 発表標題 コイルドコイルタンパク質が活性化するグリコサミノグリカン依存性カベオラエンドサイトーシス
3. 学会等名 第3回 北大セミナー 『ナノバイオエンジニアリングの最前線』
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田啓太、佐野健一
2. 発表標題 細胞透過人工タンパク質の多量体化による細胞透過活性への影響
3. 学会等名 日本生化学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 貫井千聖、佐野健一
2. 発表標題 タンパク質の物理化学的性状が細胞への取り込み経路を制御する
3. 学会等名 日本生化学会関東支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐野健一、池添泰弘
2. 発表標題 コイルドコイルタンパク質が惹起するグリコサミノグリカン鎖依存のカベオラエンドサイトーシス
3. 学会等名 日本生化学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ken-Ichi Sano, Yuta Nomata, Yasuhiro Ikezoe
2. 発表標題 Effect of Glycosaminoglycans on Endocytosis and Direct Penetration for Cell Internalization of Coiled-Coil Protein Carrier
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野亦 裕太、佐野 健一
2. 発表標題 Coiled-Coil Protein Carrierの細胞透過活性における細胞表面の糖鎖修飾の重要性
3. 学会等名 高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野 健一、野亦 裕太、池添 泰弘
2. 発表標題 Coiled-Coil Protein Carrierの細胞透過活性に細胞表面のグリコサミノグリカン鎖が及ぼす影響
3. 学会等名 日本生化学会年会
4. 発表年 2020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	池添 泰弘 (Ikezoe Yasuhiro) (70334315)	日本工業大学・基幹工学部・教授 (32407)	

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
---------	---------