

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650296

研究課題名（和文）精製リプログラミング因子による piPS 細胞樹立効率化

研究課題名（英文）Improvement of efficiency of piPS cell development

研究代表者

萩原 義久 (HAGIHARA YOSHIHISA)

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究グループ長

研究者番号：50357761

研究成果の概要（和文）：

本研究では精製転写因子の細胞導入による piPS 細胞樹立の効率化を目指し、まずは蛋白質の細胞導入を簡便に調べることのできる培養細胞系の開発を行った。また、蛋白質の細胞導入とともに用いることでエンドソームから細胞質への物質移行を促進させる添加剤としてハチ毒ペプチド変異体を検討した。変異ペプチドは設計通りの物理化学的、生理学的性質、則ち天然型メリチンより低毒性かつ溶血活性を有する、を示したが、想定した細胞外物質の細胞内移行の促進効果は見られなかった。このことは、ペプチドの添加のみでは内容物の効率的な細胞質移行には不十分であることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

To improve efficiency of development of the piPS cell, we successfully constructed the cultured cell system to evaluate the transduction of purified transcription factor proteins into cell. Then, we synthesized honey bee venom toxin melittin analogues to fluctuate the endosome membrane and promote the emission of substances into cytosol. Biophysical and physiological characteristics were those close to designed, in which the analogues had a hemolytic activity but low toxicity. However, the transduction of biomolecules was not enhanced by the melittin analogues, suggesting that incubation of biomolecules with peptides is not enough to induce the protein transduction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：細胞・組織工学

## 1. 研究開始当初の背景

精製した蛋白質による iPS 細胞(piPS 細胞)が樹立(Zhou et al., Cell Stem Cell., 4, 381, 2009, Kim et al., Cell Stem Cell., 4, 472, 2009)され、核酸を用いない新技術として大きな注目を集めている。piPS 細胞の特長として 1)染色体への外来遺伝子の取り込みによる潜在的な危険性が存在しない、2)遺伝子

組換え生物に対する社会的アレルギーが回避可能、3)医療用組換え蛋白質では高度な生産設備等のインフラが整備されている、ことが挙げられる。これらの利点により、piPS 細胞の医療応用への優位性は高く、今後は高効率かつハイスピードな piPS 細胞作製技術の開発競争が激化するものと考えられる。

## 2. 研究の目的

1) 新規発光モニター系による蛋白質導入および転写活性化の効率化: 本研究の主目的である piPS 作製の高効率化とハイスピード化には、精製転写因子の細胞導入と、標的遺伝子の転写活性化の高効率化が鍵となる。我々が独自に開発した多色リアルタイム発光測定法 (Noguchi et al., *Biochemistry*, 49, 8053, 2010) および生物発光イメージング系 (Nakajima et al., *PLoS ONE*, 5, e10011, 2010) を駆使し、各リプログラミング因子の細胞導入及び標的遺伝子活性化の高効率化と、piPS 細胞作成のための最適化を行う。

2) 精製転写因子の細胞質-核移行を促進する改変ハチ毒ペプチドの開発: 細胞外から細胞内に導入された精製転写因子が核に到達するためには、まずエンドソーム膜を通過し細胞質に放出されなければならない。蛋白質の細胞導入ではほとんどの蛋白質がエンドソームに蓄積してしまうことが問題となるが、人工合成ペプチド添加によりエンドソーム内部の物質の細胞質への移行促進が可能である (Summerton, *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1058, 62, 2005)。本研究では極めて高い膜分断・融合活性を有するハチ毒メリチンをもとに、転写因子のエンドソーム外移行を既存ペプチドよりも効率的に促進する新型ペプチドを開発する。

## 3. 研究の方法

1) 蛋白質導入および転写活性化の効率化  
本研究の主目的である piPS 作製の高効率化とハイスピード化には、精製転写因子の細胞導入と、標的遺伝子の転写活性化の高効率化が鍵となる。リプログラミング因子の細胞導入による標的遺伝子の転写活性化に伴う発光で定量を可視化することが可能な発光培養細胞系を樹立構築し、精製転写因子の濃度依存的な転写活性化をモニターする系を構築する。

2) 精製転写因子の細胞質-核移行を促進する改変ハチ毒ペプチドの開発  
遺伝子導入を効率化するために、エンドソームからの DNA の放出を促す His を含む両親媒性合成ペプチドが Endo-Porter (<http://www.gene-tools.com/node/24>) として市販されており、このペプチドは DNA 以外の生体高分子の細胞質移行を生じることが知られている。そこで本研究では極めて高

い、膜分断、融合活性 (溶血活性) を有する天然ペプチドをモチーフにすることで、Endo-Porter を凌ぐ細胞質移行促進ペプチドを開発する。メリチンはハチ毒に含まれる 26 アミノ酸残基

(GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH<sub>2</sub>) よりなる両親媒性のペプチドであり、強力な溶血活性を有することが知られている。メリチンは中性で正に強く帯電しており、この正電荷間の反発のために溶液中でランダムコイルになっている。N 末端及び 3 つのリジン残基をアセチル或はサクシニル化し電荷間の反発を減少させた修飾メリチンでは正電荷量の減少に比例してヘリックス 4 量体を形成し

(Hagihara et al., *Biochemistry*, 31, 11908, 1992)、逆に溶血活性が消失した (萩原 & 後藤、未発表データ)。本研究ではアルギニンとリジン残基をヒスチジンに置換した変異メリチンを固相合成法により作製する。作製したペプチドについては 2 次構造含量、及び細胞毒性、溶血活性の pH 依存性を評価した。これらペプチド存在下で細胞への形質転換効率に変化が見られるか観察を行った。

## 4. 研究成果

1) 新規発光モニター系による蛋白質導入および転写活性化の効率化: リプログラミング因子を大腸菌で発現、精製、ポリカチオン化することで、高濃度の可溶性蛋白質を得た。一方、評価用発光細胞として、OCT3/4/SOX2 応答配列、TK プロモーターおよび緑色発光ルシフェラーゼを連結したカセットを、マウス繊維芽細胞のゲノムに挿入した安定細胞株を樹立した。続いてカチオン化リプログラミング因子を安定細胞株の培養液に添加し、発光をリアルタイムに測定したところ、濃度依存的な発光の増加が認められたことから、精製リプログラミング因子により標的遺伝子が活性化されたことが確認された (図 1)。

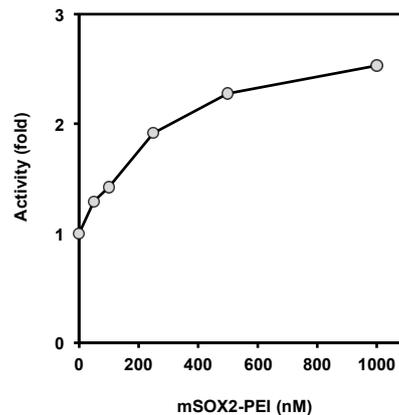


図 1: カチオン化 mSOX2 タンパク質の細胞導入による濃度依存的転写活性

2) 精製転写因子の細胞質-核移行を促進する  
 改変ハチ毒ペプチドの開発:当初の計画にあ  
 った変異メリチンペプチド (His5 :  
 GIGAVLHVLTTLGLPALISWIHHHHQQ-NH2) を固相合  
 成法により作製した。円偏光二色性 (CD) を  
 用いて二次構造の pH 応答性を調べたところ、  
 アルカリ性では当初期待していた  $\alpha$ -ヘリッ  
 クスではなく  $\beta$ -シート構造を有することが  
 示唆された。そのため、ヒスチジンの個数の  
 異なる複数のペプチドを合成、精製した (図  
 2)。

Wt GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-CONH2  
 His2 GIGAVLKVLTTGLPALISWIHRHRQQ-CONH2  
 His2Glu1 GIGAVLKVLTTGLPALISWIHRHRQE-CONH2  
 His3 GIGAVLHVLTTLGLPALISWIHRHRQQ-CONH2  
 His4 GIGAVLKVLTTGLPALISWIHHHHQQ-CONH2  
 His5 GIGAVLHVLTTLGLPALISWIHHHHQQ-CONH2

図 2 : 合成したメリチン変異体。導入したヒスチジン  
 を赤で示す。His5 が当初計画した変異体。

これらペプチドについて CD を用いて、2 次構  
 造及びその pH 依存性を調べた (図 3、4)。

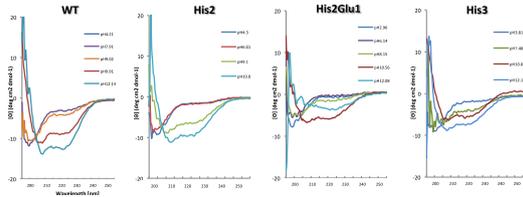


図 3 : 合成したメリチン変異体の CD スペクトル。

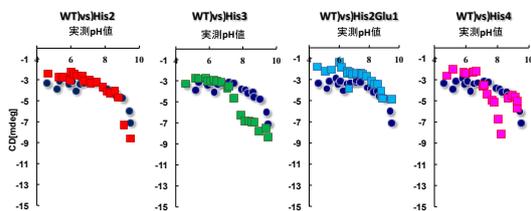


図 4 : メリチン変異体の 2 次構造含量の pH 依存性。  
 青丸は WT の結果を示している。CD の値が負に大き  
 くなる程 2 次構造含量が増加する。

この結果から、His3 及び His4 が酸性ではヘ  
 リックス構造を有さないが、中性から弱アル  
 カリ領域で天然型 (WT) よりヘリックス含量  
 が高い、研究計画で想定した挙動を示す変異  
 ペプチドであることが示された。

精製転写因子を細胞に導入するために使う  
 添加剤としては細胞毒性が低いことが必要  
 である。そこで作製したペプチドの NIH3T3  
 に対する毒性評価を MTT アッセイにより行っ  
 た (図 5)。

WT は  $1 \mu\text{M}$  程度で約半数の細胞が傷害を受け  
 るのに対して、His3 では  $2.5 \mu\text{M}$ 、His4 では  
 $5 \mu\text{M}$  で半数の細胞が生存していた。これらの

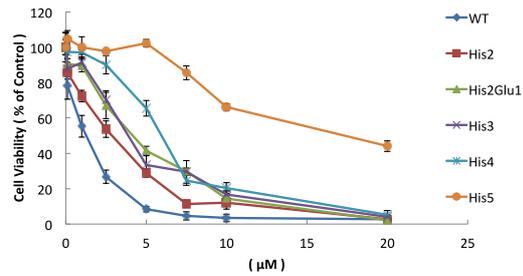


図 5 : メリチン変異体の細胞毒性。

結果から中性では変異ペプチドの毒性は導  
 入したヒスチジンの個数により減少するこ  
 とが明らかとなった。また興味深いことに  
 His5 では細胞毒性の低下が顕著であったが、  
 これは変異により  $\alpha$ -ヘリックス構造を形成  
 できなくなっているためと想定された。また  
 天然型、及び変異ペプチドの培養細胞毒性の  
 pH 依存性を調べた。天然型メリチンは弱酸性  
 で顕著に細胞毒性が増加すること、変異メリ  
 チンでは pH6-9 の範囲では細胞毒性が変化し  
 ないことを見出した (図 6)。

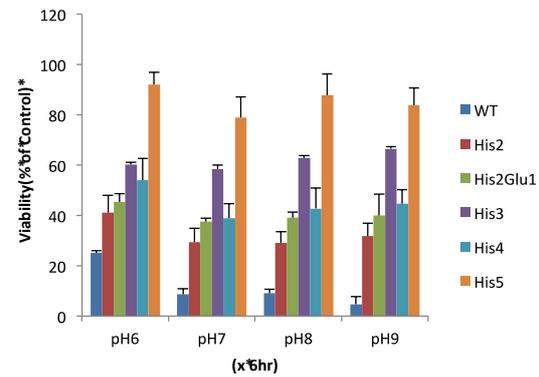


図 6 : メリチン変異体の細胞毒性の pH 依存性。

メリチンでは塩基性アミノ酸の反発により  
 中性付近ではランダムコイル状になってお  
 り、生体膜と相互作用し、その構造を攪乱す  
 る。この作用は本研究の目的であるエンドソ  
 ームの膜の破壊と内容物の細胞質への放出  
 に必須なものである。膜攪乱作用は溶血活性  
 により測定される。WT、His2、His3 は中性で  
 高い溶血活性を示し、His4 及び His2Glu1 が続  
 いた。一方で酸性では WT の溶血活性の低下  
 が顕著であった。特に His3 は細胞毒性が WT

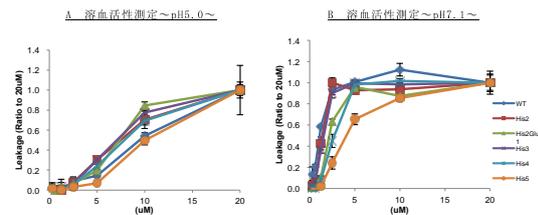


図 7 : メリチン変異体の溶血活性。

より低く、また酸性で WT を凌ぐ溶血活性、則ち膜攪乱効果、を有すると考えられることから精製転写因子の細胞導入に最適と考えられた。

これを確認するために天然型及び変異メリチンについて生体物質の細胞質-核移行効果を調べるために、ペプチド存在下で蛍光蛋白質をコードしたプラスミドの培養細胞への形質転換を行った。その結果、ペプチドを添加することによる形質導入/形質転換効率の上昇はいずれの条件においても観察されなかった。また、大腸菌における形質転換への添加効果についても評価を実施したが添加効果は観察されなかった。

以上の実験から膜の攪乱効果を維持したまま、ヒスチジンによってペプチドのヘリックス-コイル転移の pH 依存性、及び細胞毒性を制御できることが明らかとなったが、生体物質を効率的に核移行させるためには、生体物質とメリチンを同時に取り込ませる等のさらなる改良が必要であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

萩原 義久 (HAGIHARA YOSHIHISA)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学  
研究部門・ストレスシグナル研究グループ長  
研究者番号：50357761

#### (2) 研究分担者

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学  
研究部門・生体機能制御研究グループ長  
中島 芳浩 (NAKAJIMA YOSHIHIRO)  
研究者番号：10291080