

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 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23651237

研究課題名（和文）

蛋白質の中枢神経系デリバリー・ターゲティング・イメージング

研究課題名（英文）

Protein delivery and targeting to neuronal cells and its fluorescence imaging

研究代表者

堀 雄一郎 (HORI YUICHIRO)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：00444563

研究成果の概要（和文）： 中枢神経疾患の診断・治療には、中枢神経細胞への分子デリバリー技術の開発が必要とされている。本研究では、血液脳関門を通過し中枢神経に導入されることの知られている狂犬病ウイルス糖蛋白質由来 RVG ペプチドを用いた蛋白質デリバリー法の開発を行った。また、nAChR 結合ペプチドの中から新規神経細胞導入ペプチドを見出した。これらのペプチドを利用して、蛋白質及び小分子プローブを神経細胞に導入する技術を開発した。

研究成果の概要（英文）： The molecular delivery to the central nervous system is required for the diagnosis and treatment of neurodegenerative diseases require. In this research, we developed a technique for protein delivery to neuronal cells using RVG peptide derived from rabies virus glycoprotein. We also discovered novel peptides as carriers to neuronal cells by synthesizing nAChR-binding peptides. These peptides allow the selective internalization of a protein and a small molecule probe into neuronal cells.

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	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：神経細胞、デリバリー、ペプチド

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病をはじめとする多くの中枢神経疾患は、発病にいたるメカニズムが不明なものが多く、有効な早期診断法や治療法が確立されていない。また、中枢神経疾患の研究や医療における大きな問題点として、疾患の診断・治療のための有効な診断用プローブや医薬品が開発されていないことに加え、これらの分子を脳内に送達する一般的な技術がないことがあげられる。これは、血液脳関門が障壁となることと分子の神経細胞選択性がないためであり、分子の構造によっては、中枢神経系へと導入することができない。

近年、抗体医薬品などの蛋白質医薬品が、小分子医薬品では効果のない疾病に対する治

療薬として近年大きな注目を集めている。これらの蛋白質医薬品は、特異性や副作用の低さなどの利点があり、がんや自己免疫疾患等に臨床応用されている。しかしながら、中枢神経疾患では、前述のとおり、血液脳関門の障壁により蛋白質医薬品を脳内へ送達できないため、実用化には至っていない。一方で、その医療効果の高さから中枢神経疾患への応用の期待が高まっている。これまでに、膜透過ペプチドなどを利用して血液脳関門を通過する分子が開発されてきたが、神経細胞選択性が低いことが問題であった。そこで、本研究では、この問題を解決することを目的として、選択的な神経細胞デリバリー技術の開発を行った。

2. 研究の目的

我々は、血液脳関門を通過し、神経細胞に選択的に導入されることが知られている狂犬病ウイルス糖蛋白質由来 RVG ペプチドに着目した。本研究では、このペプチドにより蛋白質の表面を化学修飾し、その修飾分子の神経細胞選択性に関して検討した。また、RVG ペプチドが nAChR に結合することに着目し、種々の nAChR 結合ペプチドの神経細胞導入能や細胞選択性に関して明らかにするとともに、これらのペプチドにより蛋白質を神経細胞に導入可能かを検討した。最後に、神経細胞内の生体シグナルを可視化するための分子プローブを神経細胞に導入するために、特異的蛋白質修飾技術を開発した。この技術を用いて、蛋白質の特異的部位に分子プローブを導入し、神経細胞導入ペプチドによるデリバリー法と組み合わせ、蛋白質とともに分子プローブを神経細胞に導入する方法に関して検討した。

3. 研究の方法

(1) EGFPのRVG修飾と神経細胞導入

導入するモデル蛋白質として、緑色蛍光蛋白質EGFPを選択し、RVGペプチドによりEGFPを修飾し、その修飾蛋白質を利用して神経細胞への導入に関して検討した。RVGペプチドの合成は、Fmoc固相法により行い、アルデヒド基と結合するアミノオキシ基をペプチド末端につないだ。合成したペプチドをHPLCにより精製し、その質量をESI-MSにより確認した。また、Succinimidyl *p*-formylbenzoate (SFB)とEGFP表面のLys残基及びN末端アミノ基を反応させることにより、アルデヒド基を蛋白質表面に提示した。その後、ペプチドとEGFPを反応させ、SDS-PAGEを行い修飾反応の確認を行った。次に、RVG修飾EGFPを種々の培養細胞(マウス神経芽細胞腫由来細胞Neuro-2a、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞CHO-K1、ヒト胎児腎由来細胞HEK293T、ヒト子宮頸癌由来細胞HeLa-S3)に添加し、細胞に対する導入選択性を検討した。

(2) 新規nAChR結合ペプチドの創製と神経細胞導入

蛍光色素であるフルオレセイン誘導体をつないだ新規nAChR結合ペプチドをFmoc固相法にて合成した。ペプチドをHPLCにより精製しESI-MSにより質量を確認した。まず、神経細胞導入能を検討するために、これらのペプチドをヒト子宮頸癌由来細胞HeLa-S3およびマウス神経芽細胞腫由来細胞Neuro-2aに添加し、共焦点蛍光顕微鏡にて観察した。また、神経細胞選択性を調べるために、それぞれの細胞にペプチドを添加した後、その蛍光強度をプレートリーダーを用い算出した。これらのペプチドの細胞毒性の有無は、MTTアッセイにより検討した。

次に、nAChR結合ペプチドの神経細胞導入メカニズムを明らかにするために、添加するペプチドの細胞導入に対する濃度依存性に関する実験及び各種阻害剤を用いた実験を行った。

更に、nAChR結合ペプチドで修飾した蛋白質が神経細胞へ導入されるかを検討した。用いた蛋白質は、EGFPである。蛋白質表面のアミノ基とSuccinimidyl *p*-formylbenzoateを反応させ、アルデヒド基を提示させた後、アミノオキシ基をつないだペプチドと反応させることで、EGFPをnAChR結合ペプチドで修飾した。これら修飾EGFPをHeLa-S3とNeuro-2aに添加し、共焦点蛍光顕微鏡にて観測した。

(3) 小分子プローブ結合蛋白質の神経細胞導入

蛋白質の小分子による特異的修飾を達成するために、特定の分子に特異的部位で結合する蛋白質を用いた蛋白質標識技術を開発した。このために、我々は、Photoactive yellow protein (PYP)と呼ばれる蛋白質に着目した。PYPは、125アミノ酸からなる小蛋白質であり、リガンドである桂皮酸誘導体とCys69の部位で特異的に結合することが知られている。そこで、このリガンドに蛍光色素であるフルオレセインをつないだプローブFCANBを設計した。PYPと神経導入ペプチドを融合させ、この融合蛋白質にFCANBを結合させることで、ペプチド部位への非特異な修飾反応による神経細胞導入効率の低下が起こらないようにした。

まず、プローブのPYPへの結合に関して検討した。プローブとPYPを反応させ、SDS-PAGEにより解析した。また、これらの反応物の蛍光・吸収スペクトルを測定した。

次に、プローブ分子が結合したペプチド融合PYPタグが、神経細胞に選択的に導入されるかを検討した。この実験は、Neuro-2aとHeLa-S3にそれぞれ蛋白質を添加し、細胞を蛍光顕微鏡で観察することにより行った。

4. 研究成果

(1) EGFPのRVG修飾と神経細胞導入

EGFPをRVGペプチドで修飾し、SDS-PAGEで確認したところ、修飾反応を示す蛍光バンドが観測された。修飾されたペプチド当量数は、EGFP1分子あたり1~3であった。1分子以上修飾されたEGFPの割合は、蛍光バンドの強度から見積もったところ、全体のEGFPの67%であった。マウス神経芽細胞腫由来細胞Neuro-2aを含む4種類の培養細胞にRVG修飾EGFPと非修飾EGFPを添加したところ、RVG修飾EGFPを添加したNeuro-2aからのみ蛍光が観測された。非修飾EGFPの場合は、蛍光が観測されなかったことから、RVG修飾の結果、Neuro2aに対する細胞導入が可能になったと考えられる。また、その他の非神経細胞からは、蛍光が観測されなかったことから、RVG修飾により神経由来細胞への選択的な導入ができたと考えられる。

(2) 新規 nAChR 結合ペプチドの創製と神経細胞導入

合成した新規 nAChR 結合ペプチドを HeLa-S3 及び Neuro-2a に添加し観察したところ、全ての細胞において Neuro-2a のみから蛍光が観測された。また、ペプチド添加後の細胞をトリプシン処理により剥離し、細胞を界面活性剤により溶解した。その細胞溶解液の蛍光強度をプレートリーダーで測定したところ、全てのペプチドにおいて、Neuro-2a の蛍光強度が HeLa-S3 に比べ大きいことが示された。特に、RVG ペプチドおよび新規 19 アミノ酸ペプチドには、他のペプチドに比べ 2 倍以上の Neuro-2a 選択性が確認された。また、MTT アッセイの結果、どのペプチドにも細胞毒性は確認されなかった。

ペプチド濃度を $5\mu\text{M}$ ~ $20\mu\text{M}$ の範囲で、細胞に添加したところ、 $5\mu\text{M}$ では、どのペプチドも細胞膜上もしくは細胞の突起上から蛍光が観測された。一方、濃度を増加させるにつれて、細胞の内部から蛍光が観測されるようになった。また、新規ペプチド添加細胞からは、蛍光が主に細胞内の部分的な凝集体から観測され、RVG ペプチド添加細胞からは、均一な蛍光が観測された。この結果から、二つのペプチドで細胞内導入メカニズムが違う可能性が示唆された。

そこで、各種阻害剤を添加しペプチドの細胞導入メカニズムを調べた。まず、AChR アンタゴニストである α -ブングアロトキシンを添加し、新規ペプチド及び RVG ペプチドの導入が阻害されるかどうかを検討した。プレートリーダーにより細胞内導入量を定了したところ、 α -ブングアロトキシンの添加により、両ペプチドとも約 50% の導入量の低下が観測された。さらに、マクロピノサイトーシス阻害剤であるサイトカラシン B とクラスリン依存的エンドサイトーシス阻害剤クロルプロマジンを利用し、新規ペプチド及び、RVG ペプチドの導入量を比較した。サイトカラシン B を添加した場合には、新規ペプチド及び RVG ペプチドともに Neuro-2a 導入量の低下が確認された。一方、クロルプロマジンを添加した場合、RVG ペプチドでは導入量の低下が確認されたものの、新規ペプチドからは導入量に変化はなかった。

上記の結果を次のように考察した。本研究で合成した nAChR 結合ペプチドは、すべて Neuro-2a に選択性を示した。特に、そのうちのひとつである 19 アミノ酸からなるペプチドは、細胞内部に導入されることが明らかとなった。一方で、その新規ペプチドの神経細胞内への導入メカニズムは、細胞内蛍光分布の違いから RVG ペプチドとは異なることが示唆された。実際に、エンドサイトーシス阻害剤の実験から、RVG ペプチドは、クロルプロ

マジンにより導入量が低下したものの、新規ペプチドに対して影響が確認されなかったことから、導入経路に違う部分があると考えられる。また、両ペプチドともに、 α -ブングアロトキシンにより、Neuro-2a 導入量の低下が見られたことから、その導入には、nAChR が関与していると考えられた。しかしながら、 α -ブングアロトキシンの濃度を増加させても、完全に導入を阻害することができなかったことから、nAChR との結合以外の経路でも Neuro-2a に導入されている可能性が示唆された。

最後に、新規ペプチドもしくは RVG ペプチドで EGFP を修飾し Neuro-2a へ導入可能かを検討した。修飾反応は、SDS-PAGE で確認した。修飾 EGFP を HeLa-S3 もしくは Neuro-2a に添加し、共焦点蛍光顕微鏡で観測したところ、両修飾 EGFP ともに HeLa-S3 からは蛍光は観測されず、Neuro-2a から選択的に蛍光が観測された。

(3) 小分子プローブ結合蛋白質の神経細胞導入

PYP と神経細胞導入ペプチドを融合させた蛋白質の遺伝子をクローニングし、大腸菌にて発現させた。精製後、蛋白質の純度を SDS-PAGE にて確認したところ、単一バンドが得られた。

FCANB の合成は、1-bromo-4-(methoxy methoxy)-2-methylbenzene を出発物質として、8 ステップで行い、その構造を NMR 及び質量分析によって確認した。神経細胞導入ペプチド融合 PYP と FCANB を反応させ、SDS-PAGE で解析したところ、融合蛋白質を示すバンドから蛍光が観測された。このことから、PYP と FCANB は結合していることが示された。また、変性条件で電気泳動していることと、試料に熱処理を加えていることから、その結合は、共有結合であることが示された。蛍光スペクトルを測定したところ、FCANB の蛍光は、反応初期において非常に弱く、反応の進行と共に、蛍光強度が上昇することが示された。FCANB とフルオレセイン単独の吸収スペクトルを比較すると FCANB の可視領域の吸収極大波長が長波長シフトしていた。これらことから、基底状態でリガンドである桂皮酸誘導体もしくはニトロベンゼンとフルオレセインが会合し、その結果消光していると考えられた。また、FCANB は結合反応の進行に伴い、蛍光強度が上昇したことから、結合により会合の解消が起こったことが示唆された。

次に、FCANB の結合した融合蛋白質を Neuro-2a に添加し、共焦点蛍光顕微鏡で観察したところ、Neuro-2a の細胞内から蛍光が観測された。一方、この蛋白質を HeLa-S3 に添加し、共焦点顕微鏡で観察したところ、

Neuro-2a の場合とは異なり、細胞内からは蛍光が観測されなかった。このことから、蛋白質に結合したプローブを神経細胞に選択的に導入することができることが示された。また、Neuro-2a に添加する蛋白質の濃度依存性についても検討したところ、5 μ M では、主に細胞膜から蛍光が観測され、20 μ M では、Neuro-2a の細胞内から蛍光が観測された。

(4) 結論

Rabies virus糖蛋白質由来RVGペプチドを利用することで、蛋白質の神経細胞導入が可能となった。また、nAChR結合ペプチドを合成・解析することにより、新規神経細胞導入ペプチドを見出した。これらのペプチドが神経細胞に導入されるメカニズムについて知見を得るとともに、蛋白質導入のためのツールとなることを示した。最後に、特異的蛋白質修飾技術を利用して、小分子プローブを蛋白質とともに神経細胞に導入する技術の開発に成功した。

以上のように本研究で開発した技術は、中枢神経系疾患の診断・治療のための小分子プローブや蛋白質医薬品を脳内神経細胞に導入するための有用なツールとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Hori, Y., Nakaki, K., Sato, M., Mizukami, S., Kikuchi, K., Development of Protein-Labeling Probes with Redesigned Fluorogenic Switch Based on Intramolecular Association for No-wash Live-cell Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.*, In press (2012)
DOI: 10.1002/anie. 201200867

[学会発表] (計5件)

① 堀 雄一郎、中木 恭兵、佐藤 基、菊地 和也、PYP タグと新規桂皮酸型プローブを利用した蛋白質ラベル化法の開発と無洗浄生細胞イメージング、日本化学会第92春季年会、2012年3月25日、横浜

② 堀 雄一郎、則信 智哉、菊地 和也、ジメチルアミノクマリン誘導体をリガンドとした新規発蛍光型PYPタグプローブの開発と無洗浄生細胞イメージング、日本薬学会第132年会、2012年3月30日、札幌

③ Hori, Y., Nakaki, K., Norinobu, T., Kikuchi, K., Design of Fluorogenic Probes for Protein Labeling Method Based on Photoactive Yellow Protein (PYP) Tag and

Live Cell Imaging, Nature Chemical Biology Symposium 2011, 2011年10月20日、21日、USA

④ 堀 雄一郎、中木 恭兵、則信 智也、菊地 和也、Photoactive Yellow Protein (PYP) タグと蛍光強度増大型プローブを利用した蛋白質標識法の開発と生細胞イメージング、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011年9月12日、筑波

⑤ 堀 雄一郎、江頭 有佳、村松 慎一、菊地 和也、アセチルコリン受容体結合ペプチドによる蛋白質の神経細胞導入に関する研究、第6回ケミカルバイオロジー学会、2011年9月12日

[その他]

ホームページ:

<http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 雄一郎 (HORI YUICHIRO)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 00444563