

## 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20日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700561

研究課題名（和文） タンパク質ナノ構造体を利用した siRNA 送達システムの開発

研究課題名（英文） Development of protein nanocage for siRNA delivery

## 研究代表者

田畑 栄一（TABATA SHIGEKAZU）

九州大学・薬学研究院・学術研究員

研究者番号：00539828

## 研究成果の概要（和文）：

本研究課題は、タンパク質を利用した新しい薬剤送達システムの開発における基礎研究であり、薬剤の運び屋として利用する sHsp16.5 を目的に合わせて機能化するための改変、および調製法の確立を目指した。細胞内で sHsp16.5 薬剤を放出できるようにするために分解の目印を導入し、これが正しく機能している可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

In this project, I tried preparing functionalized sHsp16.5 as a drug carrier. I fused sHsp16.5 with a tag which directed proteins to degradation in cells and some results indicated that the tag could work properly.

## 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	3,300,000	990,000	4,290,000

## 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

キーワード：薬物送達システム、siRNA、ナノバイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノミクス、プロテオミクスといったオミックス研究の進展に伴う生命現象の分子レベルでの解明により、薬剤の標的分子の探索が急速に進展している。また、ハイスループットスクリーニングなどによる薬剤候補化合物の選別方法も進歩しており、これらの分野の技術発展は創薬研究に多大な貢献をもたらした。これに対し、その薬剤を患部に効率よく送り届ける技術である DDS の研究はまだまだ発展途上である。

正常組織への作用が原因の副作用や、体内での安定性の低さにより候補化合物を実用化できない、といった問題は DDS 技術の発展により克服可能な課題であり、DDS は今後

の医療の発展に貢献する技術として期待されている。特に、本申請課題において送達する薬剤として想定している siRNA は、相補的な配列の mRNA の分解を誘導することで遺伝子発現を抑制する機能を持ち、現在急速に開発が進められている核酸医薬の一つとして期待されている。

しかし、医薬品として利用するには体内での安定性の低さが難点であり、siRNA を安定な状態で細胞内に送達できる DDS 技術は siRNA の医薬品としての実用化に寄与すると考える。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、ナノサイズのカプセル

(以下、ナノカプセル)を形成するタンパク質 sHsp16.5 を DDS キャリアとして利用し、siRNA を細胞内に送達する手法を構築することを目的とする。sHsp16.5 は 16.5kDa のタンパク質で、カプセル状の 24 量体を形成する。カプセルの直径は 12 nm で、カプセル内部は直径 6.5 nm の空洞になっている。また、このナノカプセルには低分子化合物が自由に往来できる穴があいており、薬剤の封入、放出が可能構造になっている。これらの構造的特徴は sHsp16.5 が DDS キャリアとして利用出来る可能性を秘めており、さらにはタンパク質なので遺伝子工学的に変異、もしくは各種タグを導入することで機能を改変することも容易である。sHsp16.5 をはじめ、タンパク質は通常そのままでは細胞内に取り込まれることはないが、タンパク質を導入することで細胞膜透過性を亢進するタグが開発されており、sHsp16.5 にもこの細胞膜透過性タグを導入することで、siRNA を細胞内に運搬する DDS キャリアとしての利用が可能になると期待される。

以上の点を踏まえ、siRNA を特定の組織、患部に送達する DDS 技術に発展させるための基礎研究として、sHsp16.5 が形成するナノカプセルに siRNA を封入し、細胞内に送達する技術の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

以下の 5 つの課題をクリアすることで本研究課題の目標達成を目指す。

(1) ナノカプセルを組み換えタンパク質として大腸菌発現系にて調製する。

(2) ナノカプセルの内部にはジスルフィド結合を形成していない Cys 残基があり、この Cys の側鎖のチオール基を利用して siRNA を固定化する。そのために、最適な反応条件、特に混合比や反応時間などの検討を行う。

(3) 調製したナノカプセルが細胞内に移行するかどうか確認する。

(4) (2) で確立した手法で siRNA をナノカプセルに封入し、細胞内の環境を模した還元条件下において封入した siRNA 放出されるかどうか評価する。

(5) ナノカプセルで siRNA を細胞内に導入し、細胞にレポーター遺伝子として発現させている GFP の発現が抑制されるか確認する。

### 4. 研究成果

まず、ナノカプセルのコンストラクトの設計を行った。sHsp16.5 は、それ自身はカプセル様構造体を形成するのみで細胞内に移行するなどの機能は持ち合わせていない。そこで、B 型肝炎ウイルスの感染において重要な役割を担っている PreS2 ドメイン中の 12 残

基のペプチド配列 (以下、PreS2 ペプチド) と酵母の細胞内におけるタンパク質の分解シグナル CL1 タグを導入することにした。タンパク質に PreS2 ペプチドを融合すること細胞内へ移行できるようになることが知られており、また CL1 タグは酵母だけでなくほ乳類細胞でも分解シグナルとして機能することが確認されている。以上のような 2 種類のタグを融合することで、sHsp16.5 ナノカプセルを、細胞内に移行して封入した薬剤を放出すべく分解を受けるように機能改変できると考え、このようなコンストラクトを設計した。ただし、CL1 タグには Cys が 1 残基存在し、これがナノカプセルの調製、そしてカプセル内への siRNA の封入の際に問題になるそそれが高いため、Ser に置換したタグ (以下、CL1m タグ) を使用した。

pET ベクターに sHsp16.5、PreS2 ペプチド、そして CL1m タグをコードする遺伝子を組み込んで発現ベクターを作成し、大腸菌発現系での調製を試みた。しかし、正しくカプセル構造を取っていない封入体の状態で発現したため、巻き戻しによる立体構造の再生を試みた。あらかじめ Guanidin Buffer (6 M 塩酸グアニジン 0.1 M NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH8.0) で封入体を可溶化し、PD-10 カラムにより Refolding Buffer (1 M Arginine-HCl, 0.1 M Tris-HCl pH8.0, 5 mM DTT, 2 mM EDTA) に Buffer 置換を行った。大過剰の Refolding Buffer に可溶化した封入体を加えて変性剤を希釈し、これにより立体構造を再生する手法である希釈法でも検討したが、脱塩カラムを使用した手法が収率 10%前後であったのに対し、希釈法ではその半分の 5%前後であった。PD-10 カラムを使用した方法では希釈法に比べて時間と手間がかからないため、sHsp16.5 の Refolding には脱塩カラムを用いた方法が適していることが分かった。

PD-10 カラムで巻き戻した sHsp16.5 を、精製もかねてゲルろ過クロマトグラフィーで分析したところ、溶出位置が、sHsp16.5 モノマーの分子量から予想される位置よりも前であったため、オリゴマーを形成していることが確認できた (図 1)。で示したピークフラクション) を電気泳動で確認したところ、不純物の夾雑タンパク質の混入が確認されたことから (図 2)、さらに純度を上げるため陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を試みた。ただし、回収したフラクション (図 1 の矢印で示したピークフラクション) を電気泳動で確認したところ、不純物の夾雑タンパク質の混入が確認されたことから (図 2)、さらに純度を上げるため陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を試みた。

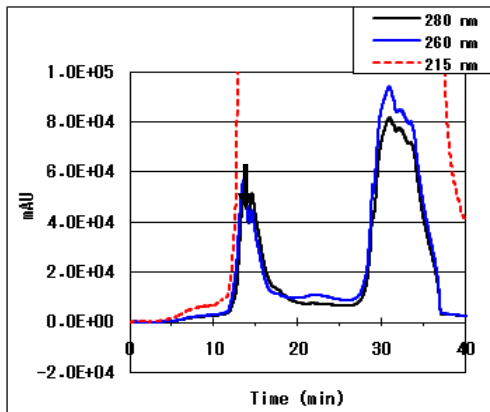


図1. 巻き戻した sHsp16.5 ナノカプセルのゲルろ過クロマトグラフィー

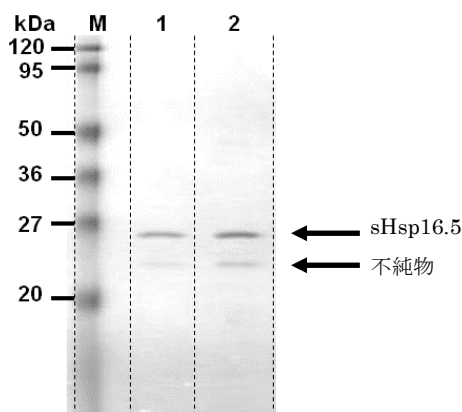


図2. 図1にて矢印で示したピークフラクションの SDS-PAGE

しかし、それでもこの不純物は除去できなかった。電気泳動の結果を見ると分子量は sHsp16.5 よりも小さいため、仮に sHsp16.5 が 24 量体を形成しているとするならばその分子量はおよそ 600kDa となり、ゲルろ過クロマトグラフィーで不純物のバンドとは分離が可能にはずである。しかし、ゲルろ過クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーともに不純物の除去ができないことから、この不純物は refolding 前に混入していた不純物のタンパク質が、refolding の過程で sHsp16.5 に取り込まれたものである可能性が高い。そもそも、sHsp16.5 は特定の条件下でシャペロン活性を有しており、変性したタンパク質を吸着することが知られている。よって、この性質のために refolding の過程において不純物タンパク質を取り込んでしまった可能性は十分あり得る。

そこで、refolding の直前の封入体の状態で精製し、不純物のタンパク質を除去してから巻き戻すことで上記の問題点を解消できると考え、さらに His-tag を追加したコンストラクトを作成すべく発現ベクターを改変した。PreS2 ペプチド、CL1m タグを融合した

sHsp16.5 と同様、大腸菌発現系において封入体として発現したため Guanidin Buffer で可溶化した。His-tag は変性条件下でも精製用タグとして機能するため、Ni-NTA 樹脂を用いたアフィニティ精製をすることにした。sHsp16.5 を Ni-NTA 樹脂に吸着した後、洗浄して不純物タンパク質を除去し、その上で 250 mM イミダゾールで溶出した。一連の操作で使用する Buffer にはすべて 6 M の塩酸グアニジンを加えてある。溶出したフラクションはグアニジンを含んでいてそのままでは SDS-PAGE で流せないため、吸着、洗浄、溶出の各ステップが終了した段階の樹脂をサンプリングし、これを SDS-PAGE で流して不純物が除去できているかどうか確認することにした (図3)。

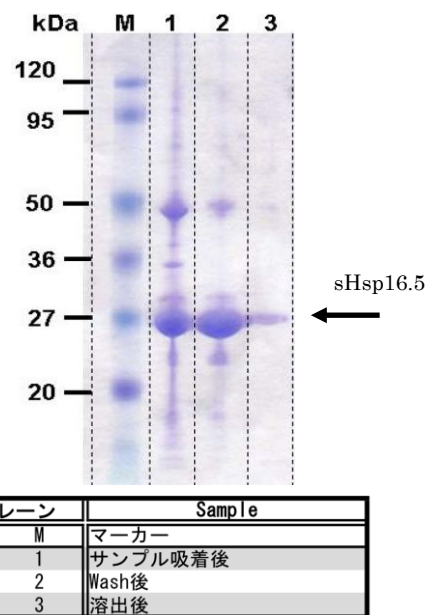


図3. 封入体を His-tag で精製した際の各ステップの純度確認

まず、可溶化した封入体を Ni-NTA 樹脂で処理した点では、樹脂に sHs-16.5 以外に多くのタンパク質が吸着していた (図3 レーン1)。洗浄により不純物タンパク質のバンドは減っているが、それでもまだ残っている (図3 レーン2)。溶出後の樹脂には sHsp16.5 の一部が残っていたということは、不純物も一緒に溶出したということであり (図3 レーン3)、His-tag 精製では不純物タンパク質を十分除去することはできなかった。

純度は十分に改善できなかったが、一方で分解のタグである CL1m タグが機能するかどうか評価した。CL1 タグによるタンパク質の細胞ないでの分解はユビキチン依存的に進行するため、CL1m の機能をユビキチン化が起こるか否かで評価することにした。巻き戻し

て調製した sHsp16.5 ナノカプセルを、ユビキチンキナーゼを豊富に含むウサギ設計ライセートで処理することで、ユビキチン化のみが進行するので、ウエスタンブロッティングで反応を評価した。ユビキチンの分子量は 8.6 kDa であり、ユビキチン化が起これば分子量が「8.6×付加数」 kDa だけ大きくなるが、抗 sHsp16.5 抗体で検出すると、ウサギ赤血球ライセートで処理することで、36-50 kDa にかけて、新しい 2 本のバンドが現れた (図 4)。

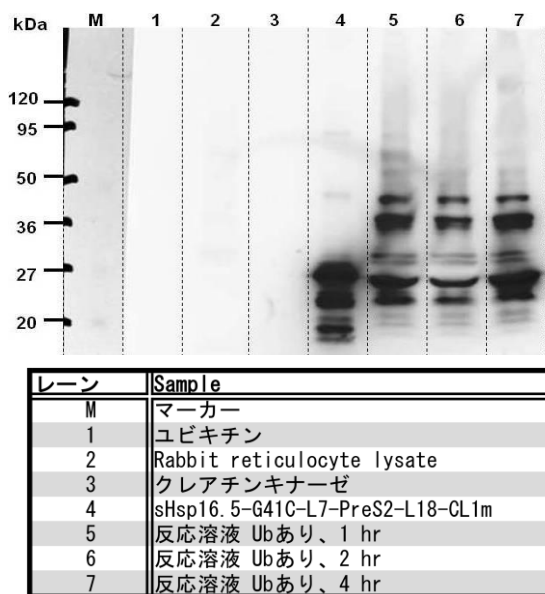


図 4. sHsp16.5 をウサギ赤血球ライセートで処理し、ウエスタンブロッティングにて抗 sHsp16.5 抗体で検出した結果

処理していない sHsp16.5 (図 4 レーン 4) と比べるとウサギ赤血球ライセートで処理した場合 (図 4 レーン 5-7) のバンドパターンの違いは明らかで、10 kD ほどの間隔で 2 本バンドがある。この結果から、今回作成した sHsp16.5 は何らかの修飾を受けることが確認できた。10 kDa ほど分子量が増えることから、ユビキチンに修飾である可能性は十分ある。

以上のように、まずナノカプセルの調製では封入体からの巻き戻しによる調製では、不純物タンパク質を取り込んでしまう傾向が非常に強く、はじめから立体構造を形成した状態で可溶性画分に発現させることが必要であることが分かった。

また、導入した機能性タグのうち、CL1m タグについてはユビキチン化を誘導している可能性が示唆されたことから、分解誘導タグとして利用できる可能性が十分ある。本研究課題で得られた sHsp16.5 の調製に関する知見は発表論文に一部反映されているが、本申請課題を発展させるには今後は得られた知

見を基に分解タグとしての CL1m タグのさらなる評価、そして封入体にならない調製法の確立が必要である。  
ることになる。

#### 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 2 件)

(1) Masaharu Murata, Sayoko Narahara, Kaori Umezaki, Riki Toita, Shigekazu Tabata, Jing Shu Piao, Kana Abe, Jeong-Hun Kang, Kenoki Ohuchida, Lin Cui, Makoto Hashizume, Liver cell specific targeting by the preS1 domain of hepatitis B virus surface antigen displayed on protein nanocages, International Journal of Nanomedicine, 査読あり, 第 7 巻, 2012, 4353-4362  
DOI : 10.2147/IJN.S31365

(2) Riki Toita, Masaharu Murata, Shigekazu Tabata, Kana Abe, Sayoko Narahara, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang, Makoto Hashizume, Development of Human Hepatocellular Carcinoma Cell-Targeted Protein Cages, Bioconjugate Chemistry, 査読あり, 第 23 巻, 2012, 1494-1501  
DOI : 10.1021/bc300015f

[学会発表] (計 5 件)

(1) Shigekazu Tabata, Munetsugu Kido, Kazushi Tani, Itaru Hamachi, Akio Ojida, Design of a Highly Reactive Peptide Tag-Probe Pair for Selective Covalent Labeling of Cell Proteins, The First International Symposium on Biofunctional Chemistry 2012 (ISBC2012), 2012 年 11 月 28 日~2012 年 11 月 30 日, 東京工業大学 東工大蔵前会館(東京都)

(2) 田畑栄一、城戸宗継、浜地格、王子田彰夫、高反応性ペプチドタグデザインに基づいたタンパク質特異的ラベル化システムの開発 (2)、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 22 日~2013 年 3 月 25 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県)

(3) 城戸宗継、田畑栄一、浜地格、王子田彰夫、高反応性ペプチドタグデザインに基づいたタンパク質特異的ラベル化システムの開発 (1)、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 22 日~2013 年 3 月 25 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県)

(4) 田畑栄一、城戸宗継、多仁一司、浜地

格、王子田彰夫、高反応性ペプチドタグデザインに基づいたタンパク質特異的ラベル化法の開発、日本薬学会第133年会、2013年3月27日～2013年3月30日、パシフィコ横浜(神奈川県)

(5) 田畑栄一、城戸宗継、浜地格、王子田彰夫、タグ・小分子プローブペアを用いたタンパク質の特異的ラベル化、第11回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム、2012年9月15日～2012年9月16日、九州大学医系キャンパス(福岡県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田畑 栄一 (TABATA SHIGEKAZU)

九州大学・大学院薬学研究院・学術研究員  
研究者番号：00539828

### (2) 研究分担者

なし