

令和元年6月24日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03284

研究課題名(和文) タンパク質の天然ポリカチオン修飾による細胞内直接送達法の基盤構築

研究課題名(英文) Cell-penetrating proteins generated by modification with naturally occurring polycationic polymer

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) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質・酵素のような生体高分子は、通常、細胞膜を透過しない。しかし、これら生体高分子をポリカチオン性ペプチドで化学修飾することで細胞内に直接導入する方法が盛んに試みられている。そこで本研究では、放線菌(土壌微生物)由来の天然ポリカチオン化合物である -ポリリジン(-PL)で、生体高分子をポリカチオン修飾(あるいは -PL修飾と呼ぶ)する基盤技術を確立した。 -PL修飾した酵素・タンパク質は我々の期待通り、動物細胞の生体膜を透過できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質・酵素をポリカチオン修飾する方法として、カチオン性ペプチドとの融合タンパク質、化学的合成されたポリカチオン性分子による修飾(化学的架橋体)が報告されている。しかし、前者の問題点は、カチオン性ペプチド導入に起因する異常タンパク質の形成であり、後者の問題点は、高い反応性官能基を持ったポリカチオン性分子の化学合成にかかる高いコストである。一方、我々の確立した方法は、微生物の力を利用して -PLに高い反応性官能基を低コストに導入できることを特徴としており、得られた -PL-PEG4-azideを用いて -PLの高い生体膜透過性をタンパク質・酵素に付与できる画期的な技術と言える。

研究成果の概要(英文)：Generally, biomacromolecules including proteins and enzymes do not penetrate cell membrane due to their high molecular weights. However, it has been reported that, by modifications with polycationic peptides, the biomacromolecules such as protein show a cell-penetrating activity.

In this study, we focused on -poly-L-lysine (-PL) as a naturally occurring polycationic peptide. To introduce a highly reactive group into the -PL molecule, an -PL producing bacterium was cultivated using the medium supplemented with OH-PEG4-azide. The resulting peptide, -PL-PEG4-azide was purified from the culture broth and used as the cell-penetrating peptide. A fluorescent protein used as a model enzyme was chemically modified with a DBCO group and then was attached to -PL-PEG4-azide via "click chemistry". Expectedly, we observed that the fluorescent protein modified with -PL was able to penetrate the cell membrane and localized in the cytosol in HeLa cells.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ポリカチオン ペプチド 細胞膜透過性 ポリリジン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質・酵素のような生体高分子は、通常、細胞膜を透過しないが、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導入する方法や、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（ポリカチオン性）ペプチドの優れた細胞膜透過性が注目され、タンパク質・酵素をポリカチオン性ペプチドで修飾し、細胞内に直接導入する方法が盛んに試みられるようになってきた。実際に、ポリカチオン性ペプチド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数多く報告されている。現在、細胞生化学的手法の一つとして認知されるとともに、バイオ医薬品（抗体医薬など）の新しい送達法としても期待されている。

### 2. 研究の目的

動物細胞表面には、硫酸基やカルボキシル基を多く含む糖鎖があるため負に帯電している。ポリカチオン修飾タンパク質を細胞に添加すると、静電的に速やかに細胞表面に吸着し、エンドサイトーシス様の経路、あるいは、受動拡散で細胞内に取り込まれると考えられている。細菌においても、その細胞表面は負に帯電しており、ポリカチオン性のペプチド系抗生物質の強力な抗菌活性が優れた細胞膜透過性ととともに説明されている。

したがって、タンパク質・酵素のような生体高分子をより強力に、かつ、より効率良くポリカチオン修飾できれば、細胞膜の破壊や遺伝子工学的手法に頼ることなくタンパク質・酵素を細胞内に直接導入することができる。そこで我々は、放線菌由来の天然ポリカチオン化合物である $\epsilon$ -ポリリジン ( $\epsilon$ -PL) に着目した。我々は、 $\epsilon$ -PL の生合成メカニズムの解明に成功しており (K. Yamanaka, *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, **4**, 766, 2008)、また、アルコール存在下で $\epsilon$ -PL 合成酵素反応を行うことで $\epsilon$ -PL のカルボキシル基末端にアルコールをエステル結合で導入することも見出している。そこで本研究では、この特異な反応を利用して $\epsilon$ -PL で生体高分子を簡潔にポリカチオン修飾（あるいは $\epsilon$ -PL 修飾と呼ぶ）する基盤技術の構築を行なった。

### 3. 研究の方法

#### (1) $\epsilon$ -PL カルボキシル基末端へのアジド基の導入

アルコール存在下で $\epsilon$ -PL 合成酵素反応を行うことで $\epsilon$ -PL のカルボキシル基末端にアルコールをエステル結合で導入できる。また、 $\epsilon$ -PL 生産菌である放線菌 *Streptomyces albulus* をアルコール含有培地で培養することで、同様に $\epsilon$ -PL にアルコールを導入することが可能である。

$\epsilon$ -PL にアジド基を導入できれば、クリックケミストリーで生体高分子を簡潔に $\epsilon$ -PL 修飾することができる。そこで、*S. albulus* の $\epsilon$ -PL 生産培地にアジド基を持った OH-PEG<sub>4</sub>-azide を添加し、 $\epsilon$ -PL にアジド基を導入できるか検証した (図 1、図 2)。さらに、培養条件 (培地組成、温度、培養時間) の最適化を行なった。

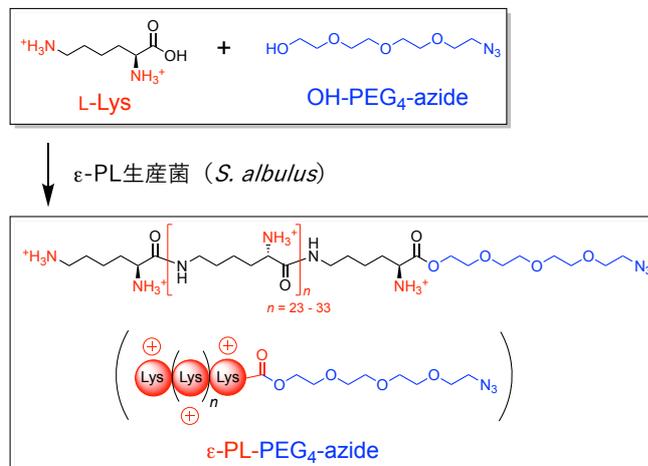


図 1.  $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide の微生物生産

#### (2) 培養液からの $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide の精製

培養上清に bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (BEHS) を加え、有機溶媒に可溶な $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide として回収した。有機溶媒に溶解した $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide に tetrabutylammonium bromide を加え、水溶性の $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide (図 1) として得た。

#### (3) 蛍光タンパク質 monomeric Azami Green (mAG) の $\epsilon$ -PL 修飾

大腸菌で高発現させた His タグ融合 mAG をアフィニティカラムで精製し、重炭酸緩衝液で透析した後 dibenzocyclooctyne (DBCO) 基を化学的に導入した。 $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide を混合し、クリックケミストリーにて $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide/DBCO-mAG (図 3A) を合成した。

#### (4) $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide/DBCO-mAG の動物細胞への取り込み

HeLa 細胞に $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide/DBCO-mAG を添加し、共焦点レーザー顕微鏡で観察するとともに、蛍光強度を指標に取り込み率を算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) $\epsilon$ -PL カルボキシル基末端へのアジド基の導入

$\epsilon$ -PL 生産菌である *S. albulus* を OH-PEG<sub>4</sub>-azide 含有培地で培養し、その培養上清を LCMS で分析したところ、 $\epsilon$ -PL にアジド基が導入された  $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide の生産を確認した (図 2)。また、興味深いことに、 $\epsilon$ -PL のペプチド鎖長が短鎖化する現象を観察した。

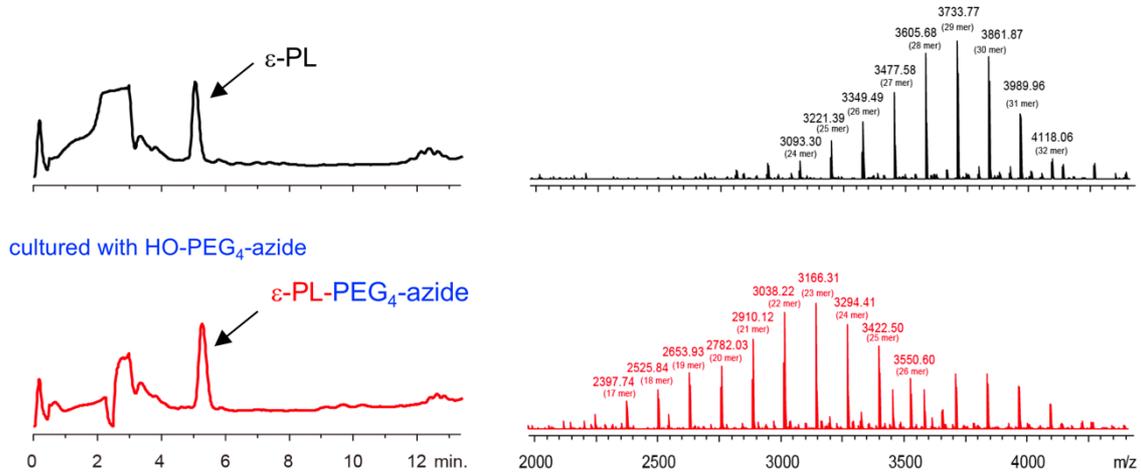


図 2. 微生物生産した  $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide の LCMS 分析

通常の  $\epsilon$ -PL 生産培地で培養した培養上清 (上図) と、OH-PEG<sub>4</sub>-azide 含有培地で培養した培養上清 (下図) を LCMS で分析した。

##### (2) 培養液からの $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide の精製

培養上清に BEHS を加えることで、 $\epsilon$ -PL は BEHS とイオンコンプレックスを形成し非水溶性の沈殿として回収できることが判明した。さらに、この沈殿をイソプロパノールなどの有機溶媒に溶解した後、tetrabutylammonium bromide を加えることで水溶性の  $\epsilon$ -PL として回収できた (K. Ushimaru, et al., *Biomacromolecules*, 18, 1387, 2017)。また本精製法は、 $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide にも適用できることを確認した。

##### (3) 蛍光タンパク質 monomeric Azami Green (mAG) の $\epsilon$ -PL 修飾と動物細胞への取り込み

タンパク質などの高分子化合物も  $\epsilon$ -PL 修飾によって生体膜透過性を付与できるか検証するために、モデル実験として蛍光タンパク質である mAG の PL 修飾を行った。mAG に

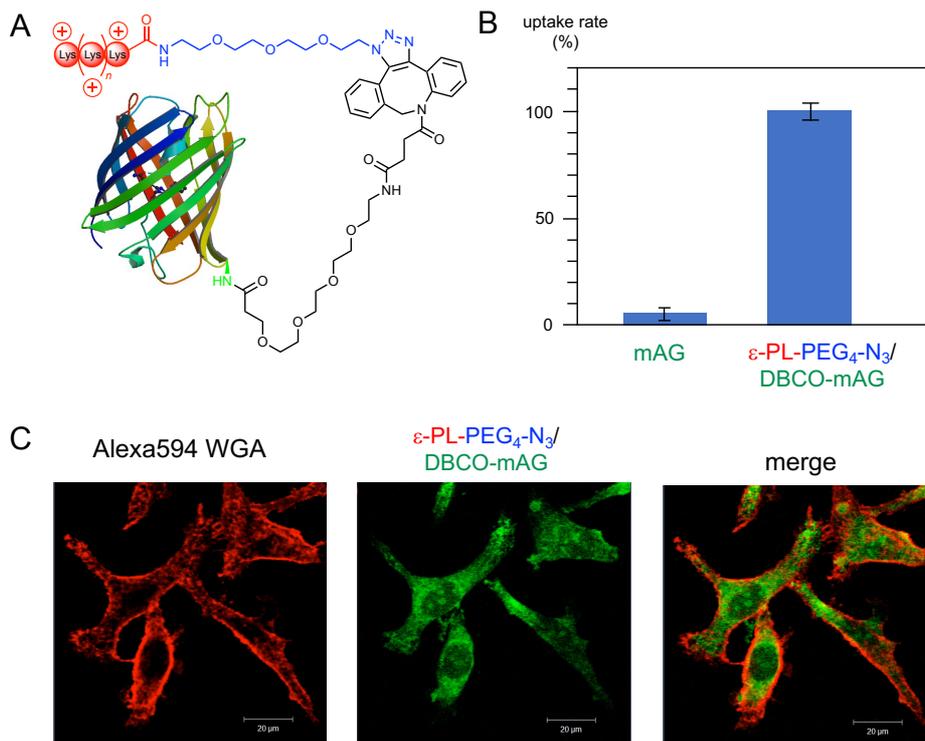


図 3.  $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide/DBCO-mAG の生体膜透過性

dibenzocyclooctyne (DBCO) 基を化学的に導入し、さらに $\epsilon$ -PL-PEG-azide (図 1、図 2) を混合し、クリックケミストリーにて $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide/DBCO-mAG (図 3A) を合成した。HeLa 細胞を用いて動物細胞内への取り込みを観察したところ、未修飾の mAG と比較して取り込み率が 10 倍以上向上した (図 3B)。また、細胞内に取り込まれた $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide/DBCO-mAG の一部は、核内にも局在することが共焦点レーザー顕微鏡観察によって判明した (図 3C)。

$\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide/DBCO-mAG は、濃度依存的に細胞に取り込まれ、処理後 5~15 分で取り込みが完了することが判明した (図 4)。

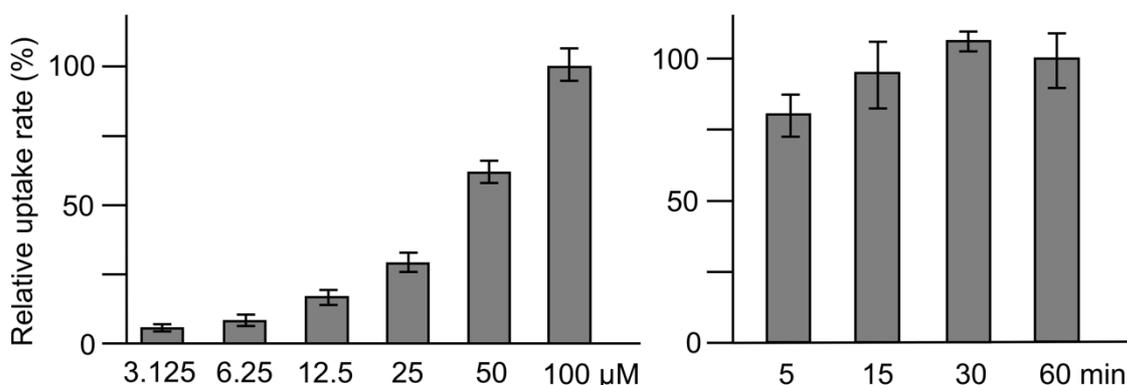


図 4.  $\epsilon$ -PL-PEG<sub>4</sub>-azide/DBCO-mAG の動物細胞への取り込み

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Kazuya Yamanaka, Yoshimitsu Hamano, Draft genome sequence of the most traditional  $\epsilon$ -poly-L-lysine producer, *Streptomyces albulus* NBRC14147, *Microbiol. Resour. Announc.*, 8, e01515-18 (2019). 査読あり
- ② Hajime Katano, Mami Maruyama, Yasuhiro Kuroda, Kohei Uematsu, Chitose Maruyama, Yoshimitsu Hamano, Partition of amines and lysine oligomers between organic solvent and water under a controlled interfacial potential difference, *J. Electroanal. Chem.*, 820, 97-102 (2018). 査読あり
- ③ Yukina Tatsuta, Kazuaki Kasai, Chitose Maruyama, Yoshimitsu Hamano, Kazuhiko Matsuo, Hajime Katano, and Shu Taira, Imaging mass spectrometry analysis of ubiquinol localization in the mouse brain following shortterm administration, *Sci. Rep.*, 7, 12990 (2017). 査読あり
- ④ Kazunori Ushimaru, Chitose Maruyama, Yoshimitsu Hamano, and Hajime Katano, Antimicrobial activity of  $\epsilon$ -poly-L-lysine after forming a water-insoluble complex with an anionic surfactant, *Biomacromolecules*, 18, 1387-1392 (2017). 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

- ① 微生物由来の天然ポリカチオンを利用した生体高分子の細胞内送達法：濱野 吉士，日本農芸化学会 2019 年度大会 (シンポジウム)，2019 年 3 月，東京
- ② 機能性高分子の  $\epsilon$ -poly-L-lysine 修飾による細胞内送達法の確立：武内大和，牛丸和乗，加藤康夫，丸山千登勢，濱野吉士，日本農芸化学会 2019 年度大会，2019 年 3 月，東京
- ③ 機能性分子の $\epsilon$ -poly-L-lysine 修飾による生体膜透過性・水溶性の一挙改善：武内大和，牛丸和乗，加藤康夫，丸山千登勢，濱野吉士，酵素工学会第 80 回講演会，2018 年 11 月，東京
- ④ 生体膜透過性・水溶性の一挙改善を志向した機能性低分子化合物の $\beta$ リジンペプチド修飾：兼田公平，武内大和，加藤康夫，丸山千登勢，濱野吉士，第 11 回北陸合同バイオシンポジウム，2018 年 10 月，加賀市
- ⑤ 機能性分子の $\epsilon$ -poly-L-lysine 修飾による生体膜透過性・水溶性の一挙改善：武内大和，牛丸和乗，加藤康夫，丸山千登勢，濱野吉士，第 11 回北陸合同バイオシンポジウム，2018 年 10 月，加賀市
- ⑥ 生体膜透過性・水溶性の一挙改善を志向した抗がん剤ドキシソルビシンの $\epsilon$ -poly-L-lysine 修飾：松村文香，武内大和，加藤康夫，丸山千登勢，濱野吉士，第 11 回北陸合同バイオシンポジウム，2018 年 10 月，加賀市
- ⑦ 機能性分子の $\epsilon$ -poly-L-lysine 修飾による生体膜透過性・水溶性の一挙改善：武内大和，牛丸和乗，加藤康夫，丸山千登勢，濱野吉士，2018 年度日本農芸化学会中部支部 183 回例会，2018 年 9 月，名古屋市，学生優秀発表賞 受賞 (企業奨励賞)
- ⑧ 機能性分子の $\epsilon$ -poly-L-lysine 修飾による生体膜透過性・水溶性の一挙改善：武内大和，牛丸和乗，加藤康夫，丸山千登勢，濱野吉士，2018 年度日本放線菌学会大会，2018 年 9 月，

- 東京、学生優秀発表賞 受賞
- ⑨ 機能性低分子化合物のポリリジン化による生体膜透過性・水溶性の一挙改善：武内大和，牛丸和乗，加藤康夫，丸山千登勢，濱野吉十，日本農芸化学会 2018 年度大会，2018 年 3 月 17，名古屋市

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：クリック官能基をもつ  $\epsilon$ -ポリ-L-リジン誘導体、その製法、及びその用途

発明者：濱野吉十，牛丸和乗

権利者：福井県立大学

種類：国際特許

番号：PCT/JP2018/031153

出願年：2018 年

国内外の別：国内外

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：丸山千登勢

ローマ字氏名：MARUYAMA, Chitose

所属研究機関名：福井県立大学

部局名：生物資源学部

職名：准教授

研究者番号（8 桁）：20452120

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：武内 大和

ローマ字氏名：TAKEUCHI, Yamato

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。