

令和元年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：2016～2018

課題番号：16K01395

研究課題名（和文）分子の表面電荷と異方性構造を利用したタンパク質薬細胞内送達担体の創製

研究課題名（英文）Development of Drug Delivery Carrier for Protein Intracellular Transduction using Surface Charge and Structure Anisotropy of Protein Molecule.

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：剛直で異方性の高い構造を基本骨格とする塩基性人工タンパク質CCPC 140は、極めて高い細胞透過能を示す。本研究から、CCPC 140の細胞への取り込みは、マクロピノサイトーシスに大きく依存することを示す結果が得られた。また、高い細胞透過活性に必要な構造異方性、すなわちアスペクト比は、4.5:1であることを明らかにした。

このCCPC 140とモデルタンパク質を融合したタンパク質の細胞内送達実験をおこなった。その結果、既知の細胞透過性ペプチドと比べ、60～80倍にも達するタンパク質の細胞内デリバリー活性を持つことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究による基礎的な研究成果は、細胞の能動輸送（取り込み）において、輸送する分子の表面電荷と構造が及ぼす影響について定量的なデータを提供することができた。すなわち、高い細胞透過活性に必要な分子の形を明確にすることに成功した。

また応用面では、本成果と今後の研究の進展によって、タンパク質製剤の細胞内薬物送達システムの実現が期待できる。これまでのタンパク質製剤は、がん細胞表面の膜タンパク質などをターゲットとしてきたが、ターゲットを一気に細胞内のタンパク質・核酸に広げることができると考えられる。これによって、これまで治療が困難であった難病の克服や創薬コストの低減などが期待できる。

研究成果の概要（英文）：A rigid and fibrous-structured cationic artificial protein, CCPC 140, had superior cell-penetrating activity. In this study, it was revealed that CCPC 140 penetrated plasma membrane mainly by micropinocytosis. We also investigated that an aspect ratio at 4.5:1 was found to be critical for ensuring superior cell-penetrating activity.

We tested intracellular delivery of fusion protein, CCPC 140 and model protein. The cellular delivery of proteins by CCPC 140 was 60 through 80-fold more efficient than that of cell-penetrating peptide such as octa-arginine.

研究分野：ナノバイオ工学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム コイルドコイル 細胞内デリバリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

創薬分野において、抗体医薬や RNA 医薬などの高分子からなる分子標的薬が注目を集めている。しかしながら、これらの高分子は細胞内に自発的に取り込まれることがないことから、高い細胞透過性を有する薬物送達キャリアの開発が大きな喫緊の課題となっている(1)。一方、アスベストやカーボンナノチューブなどの材料科学の分野からでは、剛直で異方性の高い構造を有する材料に高い細胞透過能があることが広く知られるようになってきた(2)。これら剛直で異方性の高い材料を細胞内薬物送達キャリアに利用する研究は、数多く報告されているが、安全性の面からその実用化には課題も残る。

我々は、これらの剛直で異方性の高い材料の持つ高い細胞透過性にヒントを得て、生分解性を備える生体材料であるタンパク質による、剛直で異方性の高い薬物送達担体の開発を進めている。その過程で、タンパク質の中では最も剛直かつ、異方的な構造を形成する α -helical coiled-coil 構造に注目した。 α -helical coiled-coil 構造のみからできているトロポミオシンは、そのアスペクト比が 20:1 に達する高い構造異方性を有する酸性タンパク質である。このトロポミオシンそのものは、細胞透過能を持たないが、トロポミオシン分子表面の電荷特性を細胞透過性が高くなるのが期待できるカチオン性に改変した人工タンパク質 CCPC 140 は、予想をはるかに超えた高い細胞透過性を示した。すなわち CCPC 140 の細胞透過能力は、既知のカチオン性の細胞透過性ペプチド (CPP) の 100~1000 倍に達するのである。さらに、この CCPC 140 は、これまでに試した血球系を含む全ての細胞種において、同様に高い細胞透過能を有することを確認した(3)。しかも CCPC 140 は、多くのリポソーム・ミセル担体が細胞透過能を失う血清培地中で、その細胞透過能はほとんど影響を受けない。また、有効濃度の 100 倍の濃度を投与しても、細胞への顕著な短期毒性も見られなかった。このことは、CCPC 140 は優れた細胞内薬物送達キャリアとして、大きな可能性を持つことを意味する。次に、CCPC 140 の表面電荷の影響を明らかにするために、この CCPC 140 の表面電荷を中性に変えた変異体の細胞透過能を評価した。その結果、CCPC 140 に比べ 1/50 程度にまで細胞透過能は減少するが、それでも既知の CPP と比べると数倍~10 倍高い細胞透過能を示した(4)。この結果は、剛直で異方性の高い構造を持つ分子は、表面電荷に寄らずとも、高い細胞透過能を有することを示している。その後の我々の研究から、CCPC 140 およびその変異体の細胞内への取り込みは、一部、ナノペネトレーションと考えられる受動的な細胞透過も見られるが、主にエンドサイトーシス経路で能動的に行われていると考えられた。これらの知見から、CCPC 140 の高い細胞透過能は、カチオン性の分子表面電荷の特徴と、剛直で異方的な構造を有する分子の形態的特徴の二つが、相乗的に機能し、エンドサイトーシスのいくつかの経路を活性化していると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、CCPC 140 の高い細胞透過能に関与する、分子表面の高いカチオン性と剛直かつ異方的な分子構造を細胞がそれぞれどのように認識し、エンドサイトーシス経路を活性化しているのかを明らかにする。具体的には、既知のカチオン性 CPP と CCPC 140、分子表面の電荷が中性の CCPC 140 変異体それぞれで活性化されるエンドサイトーシス経路について比較検討をおこない、その結果を元に、細胞の能動輸送(取り込み)において、輸送する分子の表面電荷と構造認識が、それぞれ別におこなわれているのか、あるいは協同性といったものが存在するのか検討し、細胞内薬物キャリアの最適な能動的取り込みモデルを構築する。

この知見を元に、人工タンパク質の再設計、細胞透過能の評価から最適な人工タンパク質細胞内薬物送達キャリアの創製および、CCPC 140 および最適化したキャリア分子を用いた分子標的薬の細胞内タンパク質デリバリーシステムの確立をおこなう。CCPC 140 などに、モデルタンパク質としての GFP などの蛍光タンパク質、細胞内シグナル伝達系を標的とするタンパク質としてキナーゼ分子のデコイ、あるいは特異的な抗体を融合、またはコンジュゲートしたものを作製し、細胞内へのデリバリー効率やデコイのリン酸化などから、CCPC 140 のタンパク質薬の細胞内薬物送達キャリアとしての機能評価をおこなう。

3. 研究の方法

(1) 分子設計

ヒト骨格筋 トロポミオシンの α -helical coiled-coil 構造骨格に関与しない分子の外側にあるアミノ酸について、酸性アミノ酸を塩基性アミノ酸に置換した分子を基本とし、必要に応じて分子表面電荷が変わるように設計した。また分子の異方性構造の影響を評価するためアスペクト比が 3.5 : 1 ~ 4.5 : 1 となる人工タンパク質を設計した。

融合タンパク質は、CCPC 140 の C 末側に penta-グリシンリンカーを介して、融合タンパク質の形で発現するように設計した。

(2) 遺伝子操作

タンパク質担体は、遺伝子合成を用いてコーディング配列を作製し、pET3d ベクターの T7 プロモーター配列の下流に挿入、発現した。制限酵素処理、DNA ライゲーション、形質転換など各操作は、常法に従っておこなった。

(3) 細胞透過性タンパク質担体の調製

本研究で用いた組換えタンパク質は、大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株を用いて発現した。発現した大腸菌は、デオキシコール酸ナトリウムを用いて溶菌した後、2 M NaCl により抽出した。その後、熱処理、カラムクロマトグラフィによる精製を行った。精製したタンパク質は、一部 Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 532 (lifetech)を用いて蛍光標識を導入した。

(4) *in vitro* 細胞実験

各培養細胞に、蛍光標識した人工タンパク質担体を培地中に投与し、10 分~72 時間培養した後、位相差顕微鏡・蛍光顕微鏡およびイメージベースサイトメータによる細胞透過性評価を行った。また、各濃度において、人工タンパク質担体投与 72 時間後、WST-1 assay (TAKARA) による短期細胞毒性評価試験をおこなった。

4. 研究成果

(1) CCPC 140 の細胞透過経路の解析

我々が開発した CCPC 140 は、剛直で異方性の高い構造を基本骨格とするカチオン性人工タンパク質であり、既知の CPP と比較して、極めて高い細胞透過能を示すが、その細胞透過機構についてはほとんど分かっていない。この CCPC 140 の細胞透過機構を明らかにすることで、細胞内薬物送達キャリアの最適化が実現できると考えた。CCPC 140 の細胞内への取り込みは、ATPase の阻害剤実験から、主に広義のエンドサイトーシス経路で進むことは分かっていたが、その詳細は分かっていたいなかった。そこで、各種エンドサイトーシス経路の阻害剤を用いた実験をおこない、CCPC 140 の取り込みはマクロピノサイトーシスに大きく依存することを示す結果が得られた。過去の CPP 研究においてもマクロピノサイトーシス経路は、細胞透過に重要な役割を果たしていると考えられる結果が得られている。それにも関わらず、最近の CPP 研究からは、マクロピノサイトーシス経路以上に他のエンドサイトーシス経路が重要な役割を果たすという知見が得られており、混迷を極めている。

後述する細胞内タンパク質デリバリー実験からは、さらに驚きの結果が得られた。すなわち、CCPC 140 と融合するタンパク質によって、細胞透過経路が異なるというものである。GFP (緑色蛍光タンパク質) を融合した CCPC 140 は、エンドサイトーシス阻害剤を用いた実験から、確かにエンドサイトーシス経路は、CCPC 140-GFP の細胞透過の一経路として機能しているが、非エンドサイトーシス経路、恐らくナノペネトレーションを考えられる他の機構により細胞に透過していることを示唆する結果が得られた。さらに、細胞膜への GFP 由来の蛍光の蓄積が、GFP を融合していない CCPC 140 と比べて、CCPC 140-GFP では長時間観察されていることから、レセプター依存的なエンドサイトーシスが抑制されていることが示唆された。これらの結果は、本研究の最終目的であるタンパク質薬の細胞内送達システムの確立において極めて重要な知見を与えるものである。関連して CCPC 140 と相互作用する細胞表面構造の網羅的解析に向けて、CCPC 140 とピオチン化酵素の融合タンパク質の設計、発現・精製を進めた。残念ながら現在のところ発現が上手くいっていない。今後の課題となっている。

CCPC 140 の持つ構造異方性がどのように細胞透過に効いているのか、すなわち、高い細胞透過能に必要な最小なアスペクト比は、いくつなのかを明らかにするために、アスペクト比は小さいが、剛直な coiled-coil 構造を維持する変異体の設計をおこなった。設計は、過去の研究を参考に、トロポミオシンの疎水性相互作用領域の主にアラニン残基をロイシンに変えておこなった。その結果、アスペクト比が 4.5:1, 4:1, 3.5:1 の剛直な構造骨格をカチオン性人工タンパク質の創製に成功した。これらの人工タンパク質の *in vitro* 試験の結果から、アスペクト比が 4.5:1 の分子では、アスペクト比が 10:1 の CCPC 140 と同等の細胞透過活性を示したのに対して、3.5:1 の分子ではランダム構造をとるカチオン性ポリペプチドと同等の低い細胞透過活性しか示さなかった。また、4:1 の分子は、4.5:1 と 3.5:1 の分子の中間の活性を示した。これ

らの結果から、高い細胞透過能に必要なアスペクト比は、4.5:1であることを明らかにした(図1)。

(2) タンパク質の細胞内デリバリー
本研究の目的である細胞内タンパク質デリバリーには、最初に CCPC 140 と融合したタンパク質の細胞内デリバリーを試みた。モデルタンパク質として、上述した GFP を用い、CCPC 140-GFP を作製した。対象実験として、CPP のひとつである octa-arginine (R8) を融合した R8-GFP も作製し、細胞透過活性を GFP 由来の蛍光を指標に比較した。FACS による解析の結果、CCPC 140-GFP の投与濃度が R8-GFP の投与濃度の 1/20 でも、各細胞からの平均蛍光強度は 3 倍にも達し、1/10 のときには 8 倍に及んだ。この結果は、CCPC 140 は典型的な CPP と比較して単純計算で 60~80 倍に及ぶタンパク質の細胞内デリバリー活性を持つことを意味する。

しかしながら R8 と異なり、CCPC 140-GFP は融合タンパク質の発現において、その立体構造障害の問題が残る。この問題は、GFP のみならず他のタンパク質でも同様である。この立体構造障害の原因と考えられる問題の一つに、CCPC 140 が二本鎖平行 α -helical coiled-coil 構造を形成していることが考えられた。そこで、分子設計を白紙からおこなった。まず、Protein Data Bank から一本鎖逆平行 α -helical coiled-coil 構造を形成する分子を探索した。次に、これらのタンパク質のうち、coiled-coil 構造の全長が 9 nm を超えるもの、すなわちアスペクト比が 4.5:1 を超えるものを選んだ。次に、分子表面がカチオン性になるように分子設計を施した人工遺伝子を合成、発現し、機能評価を進めた。最初に設計した分子は、高い細胞透過能に重要な 37 における構造安定性を欠いたことから、構造をより安定化する分子の再設計を進めている。

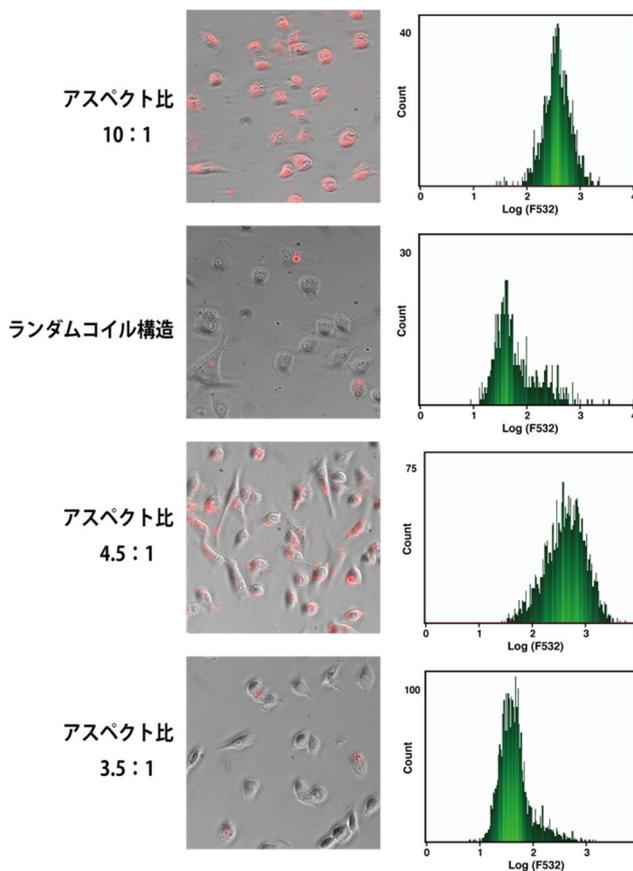


図1. 分子アスペクト比の影響
American Chemical Society より許諾を得て、
主な発表論文等 雑誌論文 より転載。

<引用文献>

- Donaldson, K.; Murphy, F. A.; Duffin, R.; Poland, C. A. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part. Fibre Toxicol.* 2010, 7, 5.
- Copolovici, D. M.; Langel, K.; Eriste, E.; Langel, U. Cell- penetrating peptides: design, synthesis, and applications. *ACS Nano* 2014, 8, 1972–94.
- Nakayama, N.; Hagiwara, K.; Ito, Y.; Ijiro, K.; Osada, Y.; Sano, K. Superior cell penetration by a rigid and anisotropic synthetic protein. *Langmuir* 2015, 31, 2826–32.
- Nakayama, N.; Hagiwara, K.; Ito, Y.; Ijiro, K.; Osada, Y.; Sano, K. Noncationic rigid and anisotropic coiled-coil proteins exhibit cell-penetration activity. *Langmuir* 2015, 31, 8218–23.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Nakayama N., Takaoka S., Ota M., Takagaki K., Sano K. “Effect of the Aspect Ratio of Coiled-Coil Protein Carriers on Cellular Uptake” *Langmuir*, 34, p14286-14293, 2018 (査読有) DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02616.

Sano K., Iijima K., Nakayama N., Ijiro K., Osada Y. “Efficient Cellular Protein Transduction Using a Coiled-coil Protein Carrier” *Chem. Lett.*, 46, p719-721, 2017 (査読有) DOI:10.1246/cl.170060

萩原 恭二、佐野 健一、居城 邦治、新倉 謙一、阿部 洋、伊藤 嘉浩、RNAiを用いたナノメディシンの開発、化学工業、67, p941-947, 2016 (査読無)

〔学会発表〕(計 8 件)

中山 典久、高垣 謙太郎、太田 恵美、高岡 匠、佐野 健一、構造異方性を持つ細胞内薬物送達担体における分子のアスペクト比の影響 第91回日本生化学会大会 2018年

野亦 裕太、結城 翼、中山 典久、飯田 良、三友 秀之、居城 邦治、長田 義仁、佐野 健一、二価イオンが安定化する alpha-helical coiled-coil 構造 2018年度 日本生化学会関東支部例会、2018年

Ken-Ichi Sano, Norihisa Nakayama, Kentavo Takagaki, Megumi Ota, Sho Takaoka, Rigid, fibrous-structured protein showed superior cell-penetrating activity, 255th ACS National Meeting & Exposition (国際学会) 2018年

佐野 健一、生物と物質の相互作用に学ぶ～細胞透過性人工タンパク質の創製、第9回 バイオナノシステムズ研究会(招待講演)、2017年

佐野 健一、細胞透過性コイルドコイルタンパク質とその構造安定化機構 高分子学会埼玉支部懇話会(招待講演)、2016年

Ken-Ichi Sano, Norihisa Nakayama, Kanako Iijima, Kuniharu Ijiro, Yoshihito Osada, Coiled-Coil Protein Works as an Efficient Carrier for Cellular Delivery AsiaNano 2016(国際学会) 2016年

佐野 健一、居城 邦治、長田 義仁、生物と材料の相互作用に学ぶ機能性材料の創製～優れた細胞透過性を有する剛直で構造異方性の高いタンパク質の創製～ 第65回高分子討論会 2016年

佐野 健一、結城 翼、渡邊 真弓、中山 典久、飯田 良、三友 秀之、居城 邦治、コイルドコイルタンパク質構造安定化における分子鎖内インターフェース形成に寄与しない残基の影響 第89回 日本生化学会 2016年

〔図書〕(計 1 件)

萩原 恭二、佐野 健一、伊藤 嘉浩、siRNAにおけるDDS技術 -DDS先端技術の製剤への応用開発(分担執筆) 技術情報協会 p211-220, 2017年

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: タンパク質

発明者: 佐野 健一、中山 典久、高垣 謙太郎

権利者: 株式会社 バイオミメティクスシンパシーズ

種類: 特許

番号: 特開 2017-206464

出願年: 2016

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等: <http://nit-chem-sanolab.lomo.jp/>

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。