

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月14日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21550154

研究課題名（和文） 高圧モジュレーションによるタンパク質の細胞内移送

研究課題名（英文） Intracellular protein delivery by high pressure modulation

研究代表者

功刀 滋 (KUNUGI SHIGERU)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授

研究者番号：70111929

研究成果の概要（和文）：

高圧を用いた可逆的蛋白質修飾法である「高圧モジュレーション」を利用して protein transduction domain (PTD) と呼ばれる塩基性ペプチドを抗原モデルタンパク質である卵白アルブミンに付加することで、免疫細胞への移送を促進する技術を開発した。PTD ペプチドの共存下で OVA を熱処理すると粒径 200 nm の蛋白質微粒子が形成された。OVA のマクロファージへの取り込み能は微粒子形成にともない 10 倍程度向上した。微粒子のゼータ電位は -25 mV であることから PTD ペプチドは微粒子内部に局在していることが判った。一方、OVA を PTD ペプチド共存下において 400 MPa の圧力で処理してえられたナノ微粒子のゼータ電位は -15 mV であり、PTD ペプチドは微粒子表面に局在化していることが判った。以上の結果から高圧モジュレーションによりナノ微粒子の細胞移行性を向上できることが示された。

研究成果の概要（英文）：

A novel method for the intracellular delivery of protein using high pressure modulation was developed. The protein transduction domain (PTD), a membrane permeable basic peptide, was conjugated with the antigen model protein ovalbumin (OVA). The heat treatment of the OVA with PTD peptide resulted in the formation of the protein nanoparticle with the zeta potential of -25 mV. On the other hand, the zeta potential of nanoparticle obtained by the pressure treatment at 400 MPa was -15 mV indicating that PTD peptide was localized on the surface of the protein nanoparticle. These results indicate that high pressure modulation is a useful method to improve the the cell uptake of protein nanoparticle.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |

研究分野：高圧生化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：タンパク質、高圧、細胞内移送、塩基性ペプチド、蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

タンパク質や核酸に Protein Transduction domain (PTD) と総称される 10 残基程度の塩

基性ペプチド群を導入すると、細胞外から細胞内への移送させることができる(図1)。この技術は抗原タンパク質の抗原提示細胞内

への移送、遺伝子治療における核内への遺伝子導入、細胞のシグナル伝達研究における細胞質内へのプローブ導入など、医療や生命科学において幅広く利用されている。しかし、この方法をタンパク質の細胞内移送に適用する場合、エンドソームから細胞質への移行が効率的に進まない場合がある上、導入したPTD ペプチドによってタンパク質の正常な立体構造形成や機能発現が阻害される場合もあるため、技術的改善が求められている。

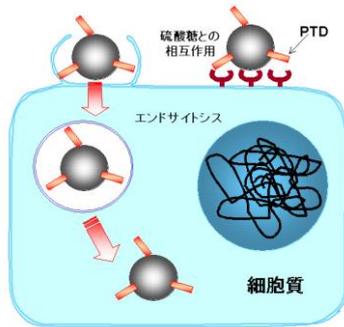


図1：PTD 導入生体高分子の細胞内移送

本研究ではこれまでに進めてきた高压下のタンパク質の機能、構造に関わる研究成果に基づき、高压を用いてPTD ペプチドをタンパク質にコンジュゲートする「高压モジュレーション」を開発した。高压を用いてPTDを導入したタンパク質微粒子を使用することによって、従来の細胞内移送技術における問題を解決することができる。また、この研究は高压という汎用性の高い物理化学的方法を用いるものであり、タンパク質の細胞内移行能に関する様々な技術に応用することが可能である。

2. 研究の目的

我々はこれまで球状タンパク質の多くが100-400 MPa の高压下で中間体変性状態をとることを明らかにしてきた。この状態で蛋白質間相互作用を抑制することで形成される凝集体は可逆性であり、放圧数時間から数日後に解離する。本課題ではこの現象を利用し、HIV 由来のPTD 配列であるTAT ペプチドとタンパク質溶液に高压処理を施すことで、PTD-タンパク質コンジュゲート微粒子を調製することができる(図2)。

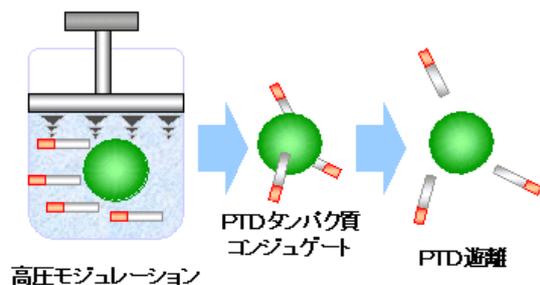


図2：高压モジュレーションによるPTDの導入

このPTD-タンパク質コンジュゲート微粒子は、細胞内に移送後エンドソーム内でPTDを遊離させることで、タンパク質の細胞内移行効率を向上できる可能性がある。このような機能を有するPTD-タンパク質コンジュゲート微粒子を設計するために、モデル系として卵白アルブミン(OVA)を用いて、高温下でのTAT ペプチドとタンパク質による微粒子形成を詳細に調査した。これによって得られたコンジュゲートの諸物性に基づいて压力を用いた処理プロセスを最適化した。

3. 研究の方法

(1) 高温下におけるTAT-OVA コンジュゲート微粒子形成機構

①TAT と OVA の相互作用解析

HIV 由来PTDであるTAT (RKKRRQRRR) ペプチドとOVAの常温、常圧下における相互作用を解析した。N末端をフルオロセインによって蛍光標識したTAT (f-TAT) とOVAに対する吸着等温線を蛍光偏光解消法によって解析した。TATの偏光解消度を一定濃度のOVA共存下で共存化でOVAとで複合体を形成させ、OVAの結合量と解離定数を算出した。

②高温下におけるOVAとTATの相互作用解析とコンジュゲートの物性

OVAをf-TAT共存下で80°Cにおいて熱処理し、微粒子に取り込まれるTATを定量した。形成されたOVA-TAT微粒子の形態を電子顕微鏡によって観測するとともに、顕微鏡電気泳動法によってゼータ電位を測定し、微粒子の表面電荷を解析した。

(2) TAT-OVA微粒子は硫酸糖との相互作用によって起るエンドサイトシスによってエンドソームに移行する。このプロセスを効率化する微粒子設計のために、TAT-OVA微粒子の細胞内動態をモニターした。具体的にはタンパク質を蛍光標識し、細胞内の動態を共焦点顕微鏡で観測した。この実験ではOVAにフルオレセインで蛍光標識し、微粒子の細胞内移送を定量化した。

(3) 高压モジュレーションによるOVAへのTAT導入と微粒子の細胞内導入

高温下でのTAT-OVA微粒子形成機構をもとに高压モジュレーションによってOVA-TAT微粒子を調製する方法を明らかにした。TAT共存下でOVAが凝集する400 MPaまでの压力を加え、微粒子を調整する。電子顕微鏡、ゼータ電位測定により微粒子の諸物性を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 高温下におけるTAT-OVA コンジュゲート微粒子形成機構

①TAT と OVA の相互作用解析

等電点4.6のOVAは中性pHでは負に帯電するため、塩基性のTATとは静電的引力が作

用する。OVA と TAT の相互作用を解析するために、濃度一定の OVA 共存下における異なる濃度の f-TAT の蛍光異方性を測定した。FITC-TAT ペプチド濃度上昇にともなう蛍光異方性の変化量から OVA 一分子あたりの TAT の結合量を算出した。図 3 に示す OVA と TAT の結合のスキッチャードプロットから、OVA と TAT は溶液中で 1 : 1 で結合し、 Kd は $2.7 \mu\text{M}$ と算出された。この結合にともなう ΔG は -36.7 kJmol^{-1} である。

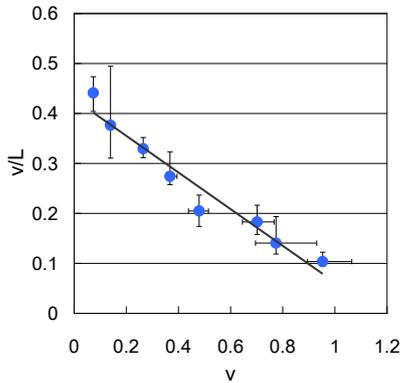


図 3 : OVA-TAT 結合のスキッチャードプロット

TAT の結合に伴って OVA は立体構造変化を起こさないことを DSC による転移温度測定および CD による二次構造測定によって確認した。以上の結果から、TAT は OVA の天然構造に大きく影響を与えず、主に静電的相互作用によって結合することが示唆された。

②高温下における OVA と TAT の相互作用解析

TAT ペプチドの共存下において 80°C で 30 min 処理することによって、TAT-OVA 微粒子を調製した。OVA 濃度に対して等量～6 倍量のモル濃度の TAT を用いた結果を比較すると、2 倍モル濃度の TAT ペプチドを混合したサンプルが図 4 に示すように均一に分散したナノ粒子を形成していることが明らかとなった。

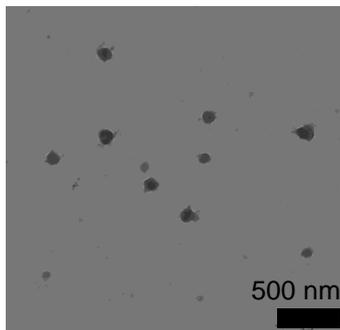


図 4 : 高温下で形成した OVA-TAT ナノ粒子の TEM 像

さらに、溶媒に用いたリン酸緩衝液 (pH7.5) のリン酸濃度の影響を $0.5 \sim 10 \text{ mM}$ の範囲において調査したところ、 1 mM 以上の濃度においては不均一な粒子溶が形成された。以上より均一なナノ粒子の状家は 0.5 mM リン酸バ

ッファーで OVA と TAT ペプチドをモル比 1 : 2 となることが明らかとなった。TAT ペプチドによって調製した OVA ナノ粒子の分散安定性を DLS の粒径分布によって評価すると、粒子調製後 72 時間ほどは非常に安定に粒子が分散していた。

③TAT-OVA ナノ粒子の表面電荷

OVA ナノ粒子化に寄与した OVA と TAT の量を f-TAT を用いて定量的に評価した。OVA に対して 2.5 倍モル濃度以上 TAT を混合した場合、取り込まれる TAT の量は一定となり、3 倍モル濃度以上 TAT を混合すると、OVA 凝集体は不定形となった。このことから TAT-OVA ナノは平均 2.5 のモル比で TAT を取り込んでおり、過剰に加えた取り込まれない TAT ペプチドは均一な粒子の形成を阻害することがわかった。

TAT-OVA ナノ粒子の表面電荷解析するために、水溶液中の粒子の電気泳動をレーザーによって可視化しその速度を解析した。TAT-OVA ナノ粒子はプラス電極に移動し、その泳動速度からゼータ電位は -25 mV と算出された。したがって TAT は微粒子の表面に局在しておらず、ナノ粒子内部に取り込まれている可能性がしめされた。

(2) TAT-OVA 微粒子の細胞内移送

マウス由来のマクロファージ細胞 (RAW264) に対する TAT-OVA 微粒子の取り込みを解析した。FITC 標識した OVA と TAT を共存させて形成した蛍光性ナノ粒子の RAW264 に対する取り込み量をフローサイトメトリーによって定量した。粒子化していない FITC-OVA では、細胞のみの蛍光強度とほとんど差がみられなかったが蛍光性 TAT-OVA ナノ粒子化では取り込み効率が高く、FITC-OVA 単独と比較して、細胞内への取り込み量は約 500 倍向上していた。

さらに、RAW264 細胞に取り込まれた TAT-OVA ナノ粒子とエンドソームをそれぞれ異なる染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡で観測することにより、エンドソーム内への取り込みを観察した。図 5, 6 に FITC-OVA および TAT-OVA をそれぞれ取り込んだ RAW264 の顕微鏡像をしめす。FITC-OVA は緑色、エンドソームは赤色で染色され、重ね合わせ像において黄色で示された部位は OVA がエンドソーム内に取り込まれたことを示す。これらの結果を比較すると、TAT-OVA NP において顕著に OVA が取り込まれていることが明らかとなった。フローサイトメトリーの結果と一致することから、TAT-OVA ナノ粒子の細胞移送性の高さを裏付ける結果となった。

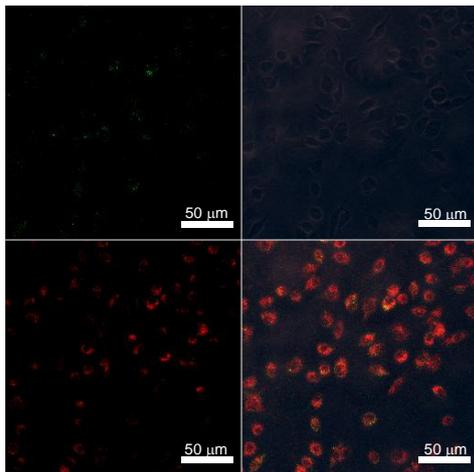


図 5 : FITC-OVA を取り込んだ RAW264 の顕微鏡画像

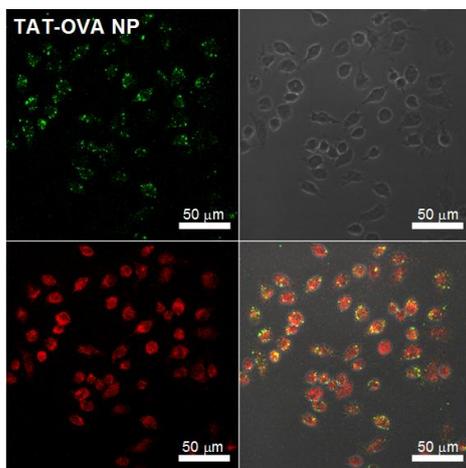


図 6 : TAT-OVA ナノ粒子を取り込んだ RAW264 の顕微鏡画像

以上のマウス由来のマクロファージ細胞である RAW 264 を用いた細胞取り込み効率の実験結果より、タンパク質単独より TAT によるタンパクナノ粒子において数百倍の取り込み効率を向上させることが可能となった。

(3) 高圧モジュレーションによる OVA への TAT 導入と微粒子の細胞内導入

高温下における TAT-OVA 微粒子形成実験によって明らかにされた実験条件を用いて、高圧モジュレーションによる TAT-OVA 微粒子の形成を検討した。まず、0.1-400 MPa の領域での OVA の蛍光スペクトルを測定し立体構造変化への影響を調査した。300 MPa 以上の圧力をかけると OVA の蛍光スペクトルの最大波長に 5 nm 程度のレッドシフトがみられ、立体構造の局所的変化が生じたことが示された。一方 OVA の凝集を濁度測定によって観すると、0.1-400 MPa の領域で濁度の増大は見られなかった。そのため、OVA は 300 MPa の領域では、顕著な自己会合を伴わない局所的な変性を起こすことが示された。一方、TAT 共存下では、300MPa 以上で顕著な濁度上昇がみられ、局所的変性に伴って TAT の結合を伴う微粒子の形成が示唆された。

そこで TAT 共存下で OVA を 400MPa で処理した溶液において形成される凝集体の電子顕微鏡観察を行った。図 7 に示すように高圧モジュレーションによってもナノ粒子が形成されることが判明した。

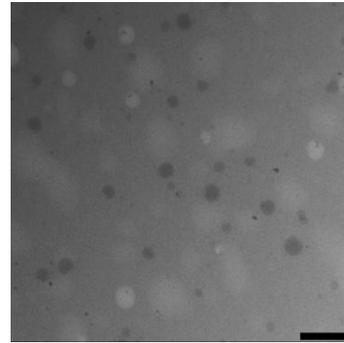


図 7 : 高圧モジュレーションによって形成された OVA-TAT ナノ粒子の TEM 像

400 MPa の圧力で処理して高圧によって形成された TAT-OVA 微粒子のゼータ電位は-15 mV であり、PTD ペプチドは微粒子表面に局在化していることが判った。以上の結果から高圧モジュレーションによりナノ微粒子の細胞移行性を向上できる可能性が示された。今後得られた微粒子の細胞内移行性を調査し、高圧モジュレーションによって得られた微粒子の効果を確認する。

本研究成果により高温によって TAT ペプチドと OVA は複合体を形成し、細胞内移行性を有するナノ微粒子を形成することがわかった。ゼータ電位測定の結果から、形成したタンパク質微粒子の表面は負帯電しており、TAT ペプチドは微粒子内部に埋もれている可能性が示唆された。このことは温度摂動によって形成された微粒子の物性は細胞内移行に最適ではないことが示された。

一方、これまでの研究で OVA は高圧下では高温とは異なる機構で凝集することが判っており、TAT ペプチド共存下における高圧処理によって細胞内移行性に優れたタンパク質微粒子が得られる可能性が示された。そこで今後の研究においては圧力摂動下におけるタンパク質微粒子形成機構の詳細を明らかにするとともに、その知見を新たなタンパク質細胞内移行技術として応用する研究を展開する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

①Tanaka N., Morimoto Y., Noguchi Y., Tada T., Waku T., Kunugi S., Morii T., Lee Y-F., Konno T., Takahashi N. “The mechanism of fibril formation of a non-inhibitory serpin ovalbumin revealed by the identification of amyloidogenic core regions” *J. Biol. Chem.* (査読有) 286, p. 5884-5889 (2011)
doi: 10.1074/jbc.M110.176396
<http://www.jbc.org/content/286/7/5884.full>

〔学会発表〕(計4件)

- ①市川将弘 (田中直毅) 「カチオン性ペプチドによる抗原タンパク質のナノ粒子化と免疫療法への応用」第61回高分子学会年次大会、平成24年5月29日、パシフィコ横浜
- ②市川将弘 (田中直毅) 「細胞透過性ペプチドによる抗原タンパク質のナノ粒子化と抗原提示細胞への移送」第59回日本生化学会近畿支部例会、平成24年5月19日、京都大学宇治キャンパス
- ③市川将弘 (田中直毅) 「免疫療法への応用に向けた抗原タンパク質のナノ粒子化」日本化学会第92春季年会平成24年3月28日、慶應義塾大学日吉キャンパス
- ④ 寺澤希実 (田中直毅) 「免疫療法への応用へ向けた抗原タンパク質のナノ粒子化」第60回高分子討論会、平成23年9月29日、岡山大学津島キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

功刀 滋 (KUNUGI SHIGERU)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
研究者番号：70111929

(2) 研究分担者

田中 直毅 (TANAKA NAOKI)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・
准教授
研究者番号：60243127

(3) 連携研究者

()

研究者番号：