

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21760634

研究課題名(和文) 人工機能性分子の酵素修飾による蛋白質の細胞内および細胞膜への導入と細胞機能の改変

研究課題名(英文) Regulating cell function by introduction of the proteins enzymatically modified with synthetic functional molecules into cell membrane or cytoplasm

研究代表者

山口 哲志 (YAMAGUCHI SATOSHI)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：80398106

研究成果の概要(和文)：酵素を用いて蛋白質の C 末端特異的に合成分子を修飾し、効率よく細胞膜および細胞質に蛋白質を導入する技術を開発した。PEG 脂質を細胞膜上で目的蛋白質に修飾する技術を開発し、この技術を使って癌細胞上に抗体を導入して樹状細胞による癌細胞の貪食効率を向上することに成功した。また、ラジカル発生色素を含む細胞膜透過ペプチドを目的蛋白質に修飾し、光照射によって目的蛋白質を細胞質内へ導入する技術も開発した。

研究成果の概要(英文)：We developed technologies that can transfer target proteins into cellular membrane and cytoplasm by enzymatically-specific modification of the C-terminal of target proteins with synthetic functional molecules. By the present technologies, target proteins could be modified with PEG-lipid on cellular membrane. This method realized that the efficiency in the phagocytosis of dendritic cells for cancer cells was successfully enhanced by introducing antibodies onto cancer membranes. In addition, we developed a method that can easily transfer target proteins to cytoplasm by attaching cell-penetrating peptide bearing the dye, which generates radical under photo-irradiation, to target protein and irradiating light after cellular uptake of the present modified protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学生物工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能バイオプロセス

キーワード：蛋白質、細胞内導入、酵素、細胞免疫療法、癌、抗体、膜透過性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、細胞機能の人為的な改変技術が再生医工学の大きな柱としてますます注目されている。特に、ポストゲノムの時代に入って、目的の細胞機能を司る遺伝子を導入する手法が試みられるようになってきた。この手法が進展すれば、豊富なゲノム情報を基に、細胞機能の合理的な改変が可能となると考えられ、非常に魅力的である。しかし、様々

な遺伝子導入法が存在するが、①転写・翻訳ステップで滞り遺伝子産物が発現しないことが多々ある、②細胞内での遺伝子発現時期や発現量を制御するのが困難である、といった問題点がある。つまり、遺伝子導入による細胞機能の改変プロセスは、制御が困難であるのが現状である。そこで、目的遺伝子の代わりにその遺伝子の発現産物である蛋白質を、望みのタイミングで望みの量だけ細胞に

導入すれば、細胞機能の制御がより直接的に、設計通りに行えるのではないかと考えられる。

(2) 蛋白質の細胞内への導入法の一つとして、1990年代後半から、細胞膜透過性のペプチドを目的蛋白質に付加する方法が盛んに研究されるようになったが、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれるため、細胞内には入るもののエンドソームから脱出できず、導入した蛋白質の多くが目的の機能を発揮できずに分解されてしまうという問題点もある。従って、エンドソームからの放出を促進するような合成分子の修飾について研究が行われている。一方、蛋白質を細胞表層へ導入する方法は、細胞膜上の蛋白質に化学的にランダム修飾する古典的な方法がほとんどで、細胞や導入蛋白質の機能を損なわずに効率良く導入する手法は無いのが現状である。

2. 研究の目的

(1) まず、酵素反応を用いて細胞内導入用合成分子を部位特異的に修飾し、目的蛋白質を失活させずに効率良く細胞内に導入する方法を確立する。また、応用研究として、Sox2やOct3/4、Klf4、c-Mycといった組換え転写因子を調製して細胞内導入用合成分子の修飾によって細胞内に導入し、蛋白質導入によって線維芽細胞からiPS細胞へと誘導できるかを明らかにしたい。

(2) また、酵素反応を用いて部位特異的に脂質化PEG修飾を行い、目的蛋白質を失活させずに細胞表層に提示させる方法も同時に確立する。細胞表層への蛋白質提示法の応用研究として、免疫細胞の機能強化を例証したい。具体的には、樹状細胞表層にエフェクター細胞を活性化させるリガンドを提示させ、抗腫瘍活性が促進できるかを明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) 細胞質内導入用蛋白質の調製

緑色蛍光蛋白質(EGFP)にペプチド連結酵素Sortase A(SrtA)の認識配列LPETGGを付与したものの(EGFP_{-LPETGG})を発現・精製した。一方、膜透過性ペプチドであるポリアルギニン(R9)にもう一つのSrtA認識配列であるトリグリシン(G3)をN末端につなげたG3R9ペプチドを合成し、光誘起ラジカル発生能のある蛍光色素Alexa Fluor 546(AF546)を修飾した細胞質導入ペプチド(G3R9-AF546)を調製した(図1a)。また、ポリアスパラギン酸にプロトンポンプ効果を有するジエチレントリアミンを修飾した修飾ペプチドにG3配列をつなげたもの(G3-pAspDET)も合

成した(図1b)。これらの合成ペプチドをSrtA反応によりEGFP_{-LPETGG}のC末端特異的に修飾し、アフィニティーカラム等を用いて精製した。

(2) 細胞質内導入の検討

(1)で調製した修飾蛋白質をヒト子宮頸癌HeLa細胞の培養皿に添加した。G3R9-AF546修飾EGFPの場合は、2~4時間の培養後、光照射(546nm)を施し、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー走査型顕微鏡(CLSM)を用いて細胞質内への導入を確認した。

(3) 転写因子の発現・精製条件の検討

ヒトの転写因子にLPATGG配列を付与したSox2_{-LPETGG}、Oct3/4_{-LPETGG}、Klf4_{-LPETGG}、c-Myc_{-LPETGG}をクローニングし、大腸菌(Rosetta株)を用いた大量発現条件を検討した。さらに、発現産物の不溶性分画からのリフォールディング条件の検討を行った。(4)で検討した添加剤群を用いて、網羅的に条件検討を行った。

(4) リフォールディング添加剤の開発

蛋白質のリフォールディング効率を向上させる添加剤を見つけるために、モデル蛋白質の変性還元体を種々の添加剤を含む緩衝液で大希釈し、巻き戻された活性体の収率をモデル蛋白質の酵素活性を指標に決定した。具体的には、種々のイオン液体を含む緩衝液と、ポリマーと有機溶媒の混合水溶液とを用いて、それらの収率向上効果を調べた。

(5) 細胞質膜導入の検討

PEG脂質(PEG-dioleyl)にG3を付与したG3-PEG-dioleylを合成し(図1c)、HeLa細胞の培養皿に添加して細胞表層に自発的に修飾した。続いて、SrtAとモデル蛋白質であるEGFP_{-LPETGG}を添加して、細胞表層においてEGFPのC末端にG3-PEG-dioleylを修飾した。細胞表層上での連結反応を蛍光顕微鏡観察、および、蛍光フローサイトメーター(FACS)を用いて評価した。また、細胞のライセートをウエスタンブロット解析することによって、分子レベルで修飾の評価も行った。

(6) 樹状細胞による貪食実験

抗体(IgG₁およびIgG_{2a})のFcドメイン(Fc1、Fc2a)をクローニングし、LPETGG配列を付与して、COS7細胞を宿主として発現させた。このFc1_{-LPETGG}、Fc2a_{-LPETGG}を(5)と同じ方法で、紫外線照射(1h)によってアポトーシス誘導させたマウスリンパ腫E.G7細胞の細胞膜に導入した。このE.G7細胞をマウス骨髄から取得・分化させた樹状細胞と3時間共培養後、樹状細胞によるHeLa細胞の貪食効

ることを見出した (図 3)。

最後に、転写因子のリフォールディングにおいて、網羅的に添加剤ライブラリーの効果を調べたところ、イオン液体の原料の一種である *N*-エチル-*N*-メチルイミダゾリウム塩酸塩を添加した場合に収率が向上することが確認できたが、従来のアルギニン塩酸塩より大幅に向上させるには至らなかった。しかしながら、4 種類の転写因子が十分な収量で得られる条件は決定することが出来たため、今後は (1) で開発した技術を用いて、転写因子の導入量の調節と細胞機能の変換効率について研究を進展させたい。

(3) 蛋白質の細胞膜導入技術の確立

G3-PEG-dioleyl を細胞膜に導入した HeLa 細胞に対し、SrtA と EGFP-_{LPETGG} とを作用させることによって、細胞膜上に EGFP を修飾できることが CLSM 観察により確認できた (図 4)。FACS を用いて解析した結果、EGFP 蛍光陽性細胞率は 84% となり、非常に効率良く細胞膜上に目的蛋白質を導入できることが示された。また、EGFP 修飾細胞を回収して得たライセートを解析したところ、未反応の EGFP のバンドよりも高分子量側に G3-PEG-dioleyl が修飾されたと思われる EGFP のバンドが確認され、設計通りに細胞膜上で部位特異的な G3-PEG-dioleyl 修飾が行われていることが示された。

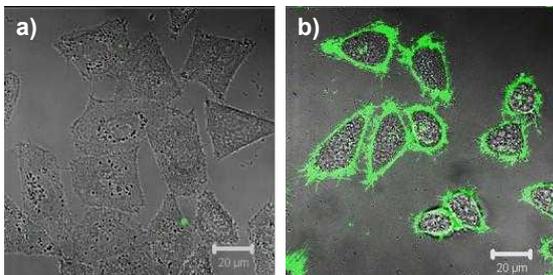


図 4 HeLa 細胞上での EGFP への PEG 脂質修飾後の蛍光顕微鏡画像 (緑色蛍光像)
G3-PEG-dioleyl 導入細胞に a) EGFP-_{LPETGG} のみを添加。b) EGFP-_{LPETGG} と SrtA とを添加

SrtA を用いて *in vitro* で蛋白質に脂質を部位特異的に修飾し細胞膜に導入する技術が、研究実施期間中に他のグループから発表された。我々の成果は、細胞膜上で修飾する点のみがオリジナルであることになったが、この点は潜在的に実用面で大きなメリットがあると考えられる。なぜなら、疎水性の高い脂質を予め蛋白質に修飾することは、蛋白質の変性や凝集を強く招くため、親水性の高いモデル蛋白質では可能であっても、実用的な蛋白質では困難である場合が多い。一方で、我々の技術では、疎水性の高い脂質部分は修飾前に細胞膜に刺さっているため、修飾時や修飾後に変性や凝集が起こることは無く、す

でに修飾直後には目的の細胞膜上に導入された状態になる。従って、細胞表層蛋白質修飾法として、非常に便利なツールとなることが期待される。

(4) 樹状細胞による癌食食促進技術の確立

体外で樹状細胞に癌細胞を食食させ、その樹状細胞を患者の体内に戻して癌免疫を活性化させる樹状細胞療法が注目されている。樹状細胞療法では、癌細胞の食食効率の向上が重要である。近年、癌細胞に抗体が結合すると、樹状細胞表層の Fc 受容体が抗体の Fc ドメインを認識して、癌細胞の食食効率を向上させることが報告された。しかし、癌細胞に結合する抗体を、種々の癌細胞毎に取得するのは容易ではないため、治療効果の向上が期待できる癌は限られる。そこで、我々は、

(3) で開発した細胞表層蛋白質修飾法を用いて、任意の癌細胞表面に抗体を結合する手法の開発を試みることにした。

癌細胞上で Fc1-_{LPETGG}、Fc2a-_{LPETGG} を反応させ、抗体染色法により評価したところ、EGFP と同様に細胞表層への修飾が確認された。そこで、樹状細胞と共培養して、癌細胞の食食を調べた結果、抗体を修飾していない癌細胞と比べて、食食率が大きく向上した (図 5)。これより、部位特異的修飾を介して Fc を癌細胞に提示させることにより、樹状細胞による食食効率が向上することが示された。この成果は、癌の樹状細胞療法の効率を大きく向上させる可能性があり、現在行っているマウスを用いた抗腫瘍活性評価実験において、実際に我々の方法で食食させた樹状細胞を尾静脈注射した個体は、Fc 未修飾の癌細胞を食食させた樹状細胞を用いた場合に比べて、高い抗腫瘍効果を示している。今後、この抗腫瘍効果のメカニズムについて幾つかの免疫生物学的な検討をさらにを行い、今回開発した食食促進法がその主要因であることを明確にし医療応用へと進めたい。

(図 5)。これより、部位特異的修飾を介して Fc を癌細胞に提示させることにより、樹状細胞による食食効率が向上することが示された。この成果は、癌の樹状細胞療法の効率を大きく向上させる可能性があり、現在行っているマウスを用いた抗腫瘍活性評価実験において、実際に我々の方法で食食させた樹状細胞を尾静脈注射した個体は、Fc 未修飾の癌細胞を食食させた樹状細胞を用いた場合に比べて、高い抗腫瘍効果を示している。今後、この抗腫瘍効果のメカニズムについて幾つかの免疫生物学的な検討をさらにを行い、今回開発した食食促進法がその主要因であることを明確にし医療応用へと進めたい。

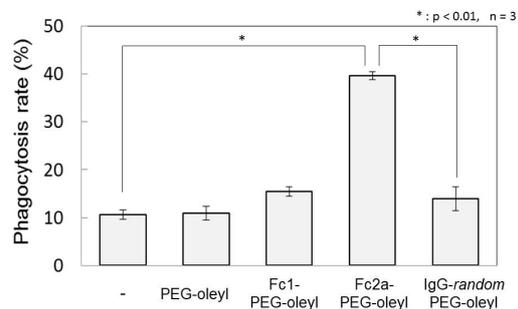


図 5 E.G7 細胞上への抗体 Fc ドメイン修飾と樹状細胞による食食効率の関係

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 E. Yamamoto, S. Yamaguchi and T. Nagamune, "Protein Refolding by N-Alkylpyridinium and N-Alkyl-N-methylpyrrolidinium Ionic Liquids", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **164**, 957-967 (2011). 査読有
- ② E. Yamamoto, S. Yamaguchi and T. Nagamune, "Synergistic effects of detergents and organic solvents on protein refolding: control of aggregation and folding rates", *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 10-15 (2011). 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 富田麗, 山口哲志, 長棟輝行, 「酵素を用いた細胞膜表層抗体 Fc 提示法の開発と樹状細胞療法への応用」, 化学工学会第76年会, 東京, 東京農工大学, 2011年3月.
- ② 山本悦司, 山口哲志, 前田泰一, 長棟輝行, 「界面活性剤及び有機溶媒併用によるタンパク質リフォールディング収率の相乗的向上効果」, 化学工学会第76年会, 東京, 東京農工大学, 2011年3月.
- ③ S. Yamaguchi, "Development of Small Molecular Artificial Chaperone for Protein Refolding and Artificial Chaperone-Assisted Proteomics Technology", 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS 2010), Rimini, Italy, September 2010.
- ④ 石原亘, 山口哲志, 平川秀彦, 長棟輝行, 「部位特異的ポリカリオニック分子修飾による蛋白質の細胞内導入」, 化学工学会第75年会, 鹿児島, 鹿児島大学, 2010年3月.
- ⑤ 富田麗, 山口哲志, 長棟輝行, 「樹状細胞による抗体アンカーリング癌細胞の貪食と癌細胞特異的免疫の活性化」, 化学工学会第41回秋季大会, 東広島, 広島大学, 2009年9月.
- ⑥ 富田麗, 山口哲志, 長棟輝行, 「ジスルフィド特異的 PEG 脂質化抗体の DC 細胞免疫療法への応用」, 第24回生体機能関連化学シンポジウム, 福岡, 九州大学, 2009年9月.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 哲志 (YAMAGUCHI SATOSHI)
東京大学・大学院工学系研究科・助教
研究者番号: 80398106

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: