

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04801

研究課題名（和文）カチオン化タンパク質の細胞導入経路の調査

研究課題名（英文）Cationized protein transduction route for mammalian cells

研究代表者

二見 翠（北添翠）（Futami, Midori）

岡山理科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：10467748

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質を化学修飾によりカチオン化することで、負に帯電した細胞表面に静電的に吸着させ、細胞内に任意のタンパク質を導入することができる。本研究ではこのタンパク質細胞導入法について、導入経路を調べた。人工転写因子BDADを導入モデルタンパク質としてカチオン化し、各種エンドサイトーシスの阻害剤で処理した細胞に導入した実験から、クラスリンエンドサイトーシス阻害剤で処理した細胞のみでBDADの導入効率が著しく低下したことで、導入経路にクラスリンエンドサイトーシスが重要であることがわかった。さらに細胞膜タンパク質Syndecan-4のカチオン化タンパク質導入への関与が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カチオン化によるタンパク質導入技術ではタンパク質の種類によっては導入効果が明確に見られないものがあり、その原因究明が課題であった。今回の研究を経て、カチオン化タンパク質の導入経路が明確になり、クラスリン依存性エンドサイトーシスが優位に働いていない細胞や培養条件ではタンパク質導入が著しく難しくなることが分かった。カチオン化によるタンパク質導入法の適用範囲が明確になったことは技術を利用する場合に成否を見通す上で非常に重要であり、さらに今後は導入が難しい細胞・培養条件においても導入が可能になるような工夫を検討するうえで道筋を示す情報である。

研究成果の概要（英文）：By protein cationization through chemical modification, it is possible to electrostatically adsorb them onto the negatively charged cell surface and introduce arbitrary proteins into the cell. In this study, we investigated the pathway by which cationized proteins are introduced into cells.

Using the artificial transcription factor BDAD as a model protein, cationized BDAD proteins were introduced into cells treated with various endocytosis inhibitors. It was demonstrated that only cells treated with the clathrin endocytosis inhibitor showed a significant decrease in the transduction efficiency of BDAD, indicating that clathrin-mediated endocytosis is important for the introduction pathway. Furthermore, the involvement of the cell membrane protein Syndecan-4 in the cationized protein introduction was confirmed.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：タンパク質細胞導入法

1. 研究開始当初の背景

タンパク質を生きた細胞に導入する技術は20年ほど前から報告が出始めており、遺伝子導入技術とは異なる形で中から細胞の機能を制御することができるとして注目されてきた。タンパク質導入の大きな特徴は直接的にゲノムを改変しないことであり、導入したタンパク質の代謝に伴い効果が無くなる。このことは一見デメリットと受け止められるが、見方を変えると一過的な細胞機能の人工制御を可能にするものになる。細胞を用いた再生医療産業が実用化に近づきつつある中、重要度が高まってきている細胞の供給技術にタンパク質導入技術が有用であると考えている。遺伝子疾患への適用を除くと、再生医療での細胞供給では移植臓器に適した機能を持ち、移植後も自己再生を含めて“天然”の働きを遂行する細胞を、体外で安定的に供給する必要がある。

細胞の増殖能と抹消組織としての機能はシーソーの関係であると言われており、増殖能を高めると機能が低下し、機能を高めると増殖能が低下する。そのため増殖と機能の可逆的なバランス関係を維持した細胞を供給する技術が必要となる。細胞の機能制御を担う細胞内タンパク質を導入することができれば、必要な時だけ増殖させる、機能を向上させることが可能であり、移植一定期間を置けば導入したタンパク質がその後の細胞の働きを邪魔することなく代謝されて完全に消え去るため、結果として体内には“天然”に近い細胞が残る。このことから、恒常的に任意のタンパク質を働かせたい場合には遺伝子導入技術が最適であり、一過的な機能発現を望む場合にはタンパク質導入技術が有効であると考えられる。現状ではタンパク質導入法は細胞機能制御としては導入効率、導入効果の面から未成熟であり、技術突破が必要である。

研究者らは化学修飾でカチオン化されたタンパク質が非常に効率よく生きた細胞の中に入ることを見出している(参考文献1-7)。この方法で、細胞内部で働くタンパク質を化学修飾でカチオン化して培地に添加するだけで細胞の増殖が開始される、細胞内部で働くタンパク質をカチオン化して培地に添加するだけでその遺伝子が発現誘導されることを明らかにしている。すなわちカチオン化タンパク質は培地中から何らかの経路を通過して細胞膜を通過し、細胞質に入っているという事である。カチオン化タンパク質の導入メカニズムを示唆する研究結果は以下の2つである。カチオン化タンパク質は静電的相互作用により糖鎖などの負に帯電した分子の多い細胞表面に強い親和性を持ち、エンドソーム不安定化ペプチドとの共導入で細胞質全体に広がる(図1)。培地に添加してから5分以内で細胞質に到達する(図2)。これらのことから、カチオン化タンパク質の経路はエンドサイトーシスと直接膜透過の両方が働いていると考えられるが、詳細な導入メカニズムは明らかになっていない(図3)。

2. 研究の目的

本研究ではカチオン化法によるタンパク質導入効率を向上させることを目指し、カチオン化タンパク質の細胞導入メカニズムの解明を目指した研究を行った。これまでの研究からカチオン化タンパク質はエンドサイトーシスと直接膜透過の両方の経路で細胞内に導入されていると考えられるが、蛍光タンパク質の導入研究から考えると細胞内に取り込まれたカチオン化タンパク質の大半がエンドソームに蓄積すると思われる。このことから、カチオン化タンパク質導入において重要となる各種エンドサイトーシス経路の寄与と導入の足掛かりとなる細胞表面上の膜タンパク質について調べた。

蛍光標識カチオン化タンパク質を導入したHeLa細胞

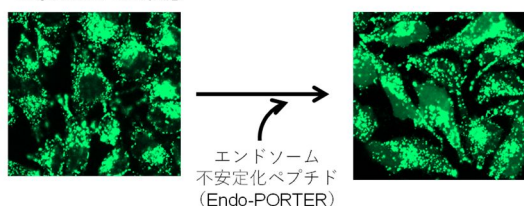


図1. カチオン化タンパク質と共にエンドソーム不安定化ペプチドを導入すると、細胞質全体にカチオン化タンパク質が広がる

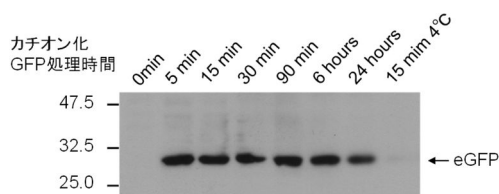


図2. カチオン化した eGFP が細胞質に到達した量を経時的に調べた結果。eGFP はビオチン化し、カチオン化 Avidin を付加する形で間接的にカチオン化している(参考文献5)。

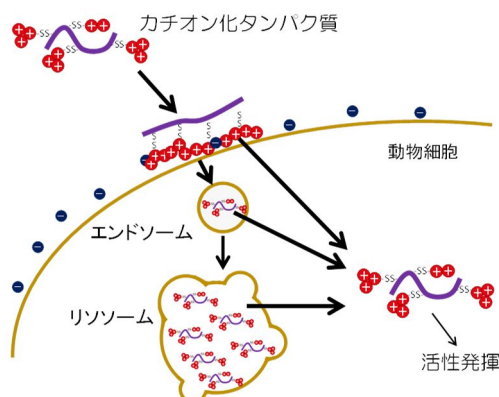


図3. 現在までに想定されているタンパク質導入経路。エンドサイトーシスの経路の種類までは明らかになっていない。

3. 研究の方法

(1) カチオン化タンパク質の細胞導入経路となるエンドサイトーシスの調査

細胞導入モデルタンパク質として人工転写因子 BDAD を用いた。このタンパク質は Gal4 結合ドメインと転写活性ドメインを持っていることから、Gal4 配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を持った細胞 (HLR 細胞) に BDAD を導入することで導入量依存的にルシフェラーゼが発現し、その活性から BDAD の導入量を評価することができる。この HLR 細胞を予めマクロピノサイトーシス、クラスリン依存性エンドサイトーシス、カベオラ依存性エンドサイトーシスの阻害剤で処理し、これらの阻害剤がカチオン化 BDAD の導入にどのような影響を及ぼすのか調べることで導入経路を絞り込んだ。

(2) カチオン化タンパク質の導入に関わる細胞表面上タンパク質

ポリアルギニン等のカチオン性ペプチドを付加するタンパク質導入法は方法が異なるものの「カチオンを付加する」という点においては共通している。オクタアルギニンを付加したタンパク質は細胞表面上の Syndecan-4 を足掛かりとして細胞に結合し、クラスリン依存性エンドサイトーシスにより細胞内に入るといった報告がある (参考文献 8)。カチオン化タンパク質についても Syndecan-4 が細胞導入に関わる可能性があると考え、siRNA により Syndecan-4 の発現を抑えた HLR 細胞に対してカチオン化 BDAD の導入がどのように変化するのか調べた。

また、Syndecan-4 以外の膜タンパク質の関与も考え、カチオン化 BDAD が結合する細胞表面上のタンパク質の探索も行った。Biotin 化したカチオン化 BDAD を HLR 細胞と接触させたのち架橋剤で固定化、その細胞抽出液をストレプトアビジン固定化磁気ビーズで精製したのちに SDS-PAGE で解析を行った。

4. 研究成果

(1) カチオン化タンパク質の細胞導入経路となるエンドサイトーシスの調査

まずエンドサイトーシス経路を絞り込むために、マクロピノサイトーシス阻害剤 Go6983 とクラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤 sucrose、カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤 Nystatin で HLR 細胞を処理し、カチオン化 BDAD をエンドソーム不安定化作用のある Endo-PORTER とともに細胞に導入した。これらの阻害剤は予備検討により細胞増殖に影響がない濃度で使用した。その結果、Go6983 と Nystatin での事前細胞処理は BDAD の導入効率に影響を与えなかったのに対し、Sucrose は著しく BDAD の導入効率を低下させた (図 4A)。このことからカチオン化 BDAD の導入にはクラスリン依存性エンドサイトーシスの関与が大きいと考え、この結果の信頼性を高めるためにさらに 2 つのクラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤を使い、BDAD の導入効率に与える影響を調べた。その結果 Dynasore および Chlorpromazine 両方で BDAD の導入量低下が見られたことから、やはりカチオン化タンパク質の導入経路はクラスリン依存性エンドサイトーシスが重要であることがわかった (図 4B)。

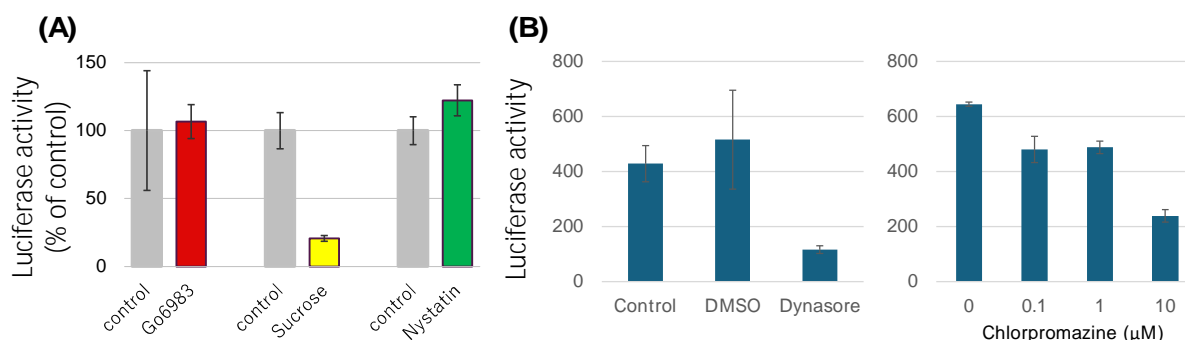


図 4. 各種エンドサイトーシス阻害剤によるカチオン化 BDAD の細胞導入に対する影響

タンパク質導入については導入時の培地条件として血清の存在の影響が古くから議論されてきた。カチオン化ペプチドでは血清がペプチド導入の邪魔になると言われてきたが (参考文献 9) カチオン化 BDAD についてはむしろ血清が無いとタンパク質導入が著しく低下するという結果が得られている (図 5)。この結果は、血清の中には様々な増殖因子やサイトカイン等が含まれており、これらは受容体に結合することでクラスリン依存性エンドサイトーシスを促進するため、クラスリン依存性エンドサイトーシスを主な導入経路とするカチオン化タンパク質は活発に細胞内に取り込まれ、血清非存在下ではクラスリン依存性エンドサイトーシス自体の頻度が下がることから導入効率が著しく低下すると考えられる。一方カチオン性ペプチドについては導入経路がクラスリン依存性エンドサイトーシスではなくマクロピノサイトーシスだと考えられており (参考文献 10) マクロピノサイトーシスは血清が促進するものではなく、むしろ血清中に含まれる酸性タンパク質がカチオン性ペプチドに接触することでペプチド導入を阻害すると予想される。以上の結果から考えると、細胞の培養条件としてクラスリン依存性エンドサイトーシスを引き起こす血清や増殖因子等を含まない培養条件の細胞にはカチオン化タンパク質

導入が困難であると予想され、細胞に影響を与えないクラスリン依存性エンドサイトーシスを引き起こす工夫が必要になると考えている。

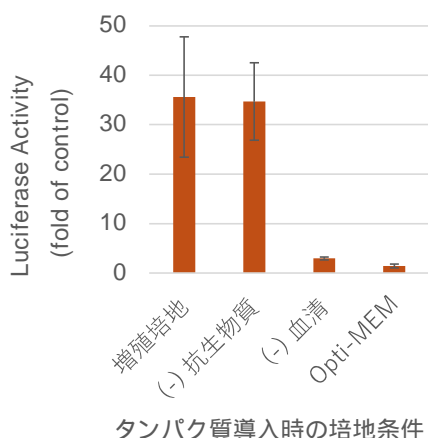


図 5. カチオン化 BDAD の導入には血清条件が大きく影響する

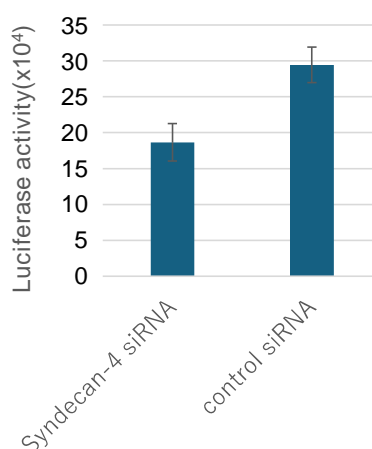


図 6. Syndecan-4 の発現を抑制することでカチオン化 BDAD の導入量の低下がみられた

(2) カチオン化タンパク質の導入に関わる細胞表面上タンパク質

カチオン化タンパク質の細胞導入の最初の足掛かりとなる細胞表面分子との相互作用について調べるため、まず Syndecan-4 とカチオン化タンパク質の導入との関係性を調べた。

Syndecan-4 はオクタアルギニンペプチドを付加したタンパク質の導入において関与していることが明らかになっており、膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンという性質からその強いアニオン性でカチオン化タンパク質細胞表面への濃縮にも関わっている可能性が考えられる。siRNA により Syndecan-4 の発現を抑制した HLR 細胞に対してカチオン化 BDAD を導入したところ、完全にはないが導入量の低下が見られた。このことから、Syndecan-4 はカチオン化タンパク質の導入において関与があると考えられる。しかし、カチオン化 BDAD の導入量低下は限定的であったことから、他の細胞表面分子の関与も考えられる。そこでビオチン化したカチオン化 BDAD を用意し、これと結合する細胞表面タンパク質の探索を試みた。ビオチン化したカチオン化 BDAD を細胞表面に接触させ、DSSTP により架橋を行った後、ストレプトアビジン固定化磁気ビーズを用いて細胞抽出液を精製し、SDS-PAGE で解析したところ、カチオン化 BDAD を加えた場合のみに見られるタンパク質バンドが検出された(図 7)。このバンドに由来するタンパク質を今後同定する予定である。

これまでの研究からタンパク質の種類によっては導入効果が明確に見られないものがあり、その原因究明が課題であった。今回の研究を経て、カチオン化タンパク質の導入経路が明確になり、クラスリン依存性エンドサイトーシスが優位に働いていない細胞や培養条件ではタンパク質導入が著しく難しくなることが分かった。カチオン化によるタンパク質導入法の適用範囲が明確になったことは技術を利用する立場から考えると一定の成果であるが、今後はさらに導入が難しい細胞・培養条件においても導入が可能になるような工夫を考える必要がある。クラスリン依存性エンドサイトーシスを誘導する受容体へのリガンド刺激等によるカチオン化タンパク質の導入効率改善には大きく興味を持っている。

また本研究の主題からは少し外れるが、カチオン化 BDAD が結合する細胞表面タンパク質を探索する研究の過程で高濃度のカチオン化 BDAD が必要となり、濃縮の予備検討の過程でカチオン化タンパク質の濃縮が非常に簡単であることが分かった。通常タンパク質の濃縮の難易度はタンパク質の種類に依存し、数 mg/ml まで濃縮することも困難であるものがある。それに対してカチオン化タンパク質は検討したものすべてで 10mg/ml 程度に濃縮が可能であり、この特性はタンパク質の高密度な固相化において非常に有利であり、タンパク質カチオン化を新しい領域へ発展する道が開かれたと考えている。

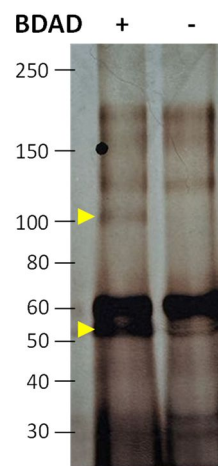


図 7. カチオン化 BDAD で細胞表面を処理した細胞のみで検出されるバンドが確認された(黄色矢印)

参考文献

1. Futami J., et. al., J. Biosci. Bioeng., 99(2), 95-103, 2005.
2. Murata H., et. al., Biochemistry, 45(19), 6124-32, 2006.
3. Kitazoe M., et. al., J. Biochem., (Tokyo), 137(6), 693-701, 2005.
4. Murata H., et. al., J. Biosci. Bioeng., 105(1):34-8 2008.
5. Kitazoe M., et. al., Biotechnology J., 5(4):385-92, 2010.
6. Futami M., et. al., Bioconjug. Chem., 23(10):2025-31 2012.
7. Futami M., et. al., J Biosci Bioeng., 123(4):419-424 2017.
8. Kawaguchi Y., et. al., Bioconjug. Chem., 27(4):1119-1130 2016
9. Bendefallah N., et. al., Bioconjug. Chem., 17(3):750-758 2006
10. Wadia, J.S., et. al., Nat. Med., 10(3):310-315 2004

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 二見 翠
2. 発表標題 カチオン化タンパク質細胞導入法の導入経路調査およびエンドソーム不安定化ペプチドとの組み合わせ検討
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒住 英里、田口 聡大、二見 翠
2. 発表標題 抗原タンパク質全体をリガンドとした自己抗体吸着器の開発
3. 学会等名 化学工学会第89年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------