

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460148

研究課題名(和文)ヘリックス相互作用認識を利用した人工EGF受容体の創製と細胞機能制御

研究課題名(英文)Development of artificial EGF receptor-ligand system based on coiled-coil peptides to manipulate cell functions

研究代表者

中瀬 生彦(Nakase, Ikuhiko)

大阪府立大学・21世紀科学研究機構・講師

研究者番号：40432322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ヘリックス相互作用認識ペプチドを用いた細胞膜における人工受容体の特異的な二量体化と、その受容体活性化を制御可能なシステム構築を目的としている。モデル受容体としてEGF(epidermal growth factor)受容体を用い、人工ペプチドリガンドを用いることで受容体活性化制御を行った。結果として、分子連結型ペプチドリガンドによって効果的に目的受容体の活性化が達成され、さらに細胞由来ナノマテリアルを融合した新規リガンド創製にも成功している。

研究成果の概要(英文)：To develop artificial receptor-ligand system by usage of artificial coiled-coil peptides to induce receptor dimerization and activation is purpose of research. In this research, artificial epidermal growth factor receptor-ligand system as a model was created to control receptor-based cellular functions. As results, helix peptide ligands effectively activate the artificial receptor on cellular membranes, and the peptide ligand-modified cellular vesicles that can also activate the objective receptor could be successfully developed.

研究分野：細胞ペプチド化学

キーワード：人工受容体 細胞機能制御 ヘリックス相互作用 ペプチド認識

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜に発現する受容体は、通常リガンドが受容体に結合することで受容体構造が変化し、その結果、受容体同士の相互作用からシグナル伝達が誘起される。一方で、生体に無い人工的に作られたリガンドが細胞膜分子と相互作用することでクラスター化し、膜分子の活性化スイッチを“ON”にさせることは非常に興味深い。細胞膜分子を特異的に集合化させることで活性化させるシステムを細胞に組み込み、生体には存在しない分子がリガンドとして働くことができれば、新しい機能性人工受容体として応用性が非常に高い。

研究代表者は、本研究概念の達成の為に、人工コイルドコイルペプチドを用いた、細胞膜における人工受容体の特異的な二量体化と、その受容体の活性化について研究を続けており、現在モデル受容体として EGF (epidermal growth factor) 受容体 (EGFR) を用いて研究を進展させている。

EGFR は、様々な細胞内シグナル伝達を掌り、細胞の分化、発達、増殖、維持に大きく関与する。これらの作用は、EGFR にリガンドの EGF が結合することで受容体が二量体化し、その結果、細胞内キナーゼドメインの活性化及びチロシン残基のリン酸化によってシグナル伝達が誘起される。しかし EGFR は、生体に存在する様々なリガンドによって活性化されるため、本受容体を生体内で機能制御することは難しい。そこで、生体には存在しない人工コイルドコイルペプチドによる、ヘリックス間相互作用認識で活性化できる新しい人工 EGFR の創製とリガンドの作製を試みた。人工リガンドによって特異的に人工 EGFR が二量体化することでリン酸化され、細胞応答として細胞骨格の変化 (ラメリポディア形成) 及び、細胞遊走が促進されることが明らかとなった (Nakase, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2012))。

しかし既存の手法では、受容体活性化の効率が低く (10  $\mu\text{M}$  程度が必要)、人工リガンドが低濃度で高効率に (少なくとも数十 nM で) 活性化できるシステムを新たにつくる必要がある。本研究では、人工リガンドの設計を見直し、高性能の人工 EGF 受容体-リガンドシステムを構築する。また、将来的に *in vivo* での応用実験へと本システムを展開するための、体外から“遠隔操作”で人工受容体の活性化を制御可能なシステム構築に向けた基礎的知見を得る。本システムが、細胞治療における有用な細胞制御法の一つになるように研究を進展させたい。

## 2. 研究の目的

本研究では、コイルドコイルペプチドを用いた人工 EGFR の二量体化の最適化、人工 EGFR の二量体化 (活性化) の可視化を中心に研究を展開する。従来法と比較して、低濃度の人工リガンドでより効率的に E3-EGFR

の二量体化及び活性化できるシステムを構築する。本研究課題では、受容体の複合体形成から活性化を誘導するための最適な人工受容体と人工リガンドの設計を行い、申請者の専門の研究分野であるペプチド化学、遺伝子工学、細胞分子生物学といった様々な手法を駆使することでオンデマンドに活性化できる受容体を創製する。また、人工細胞を作製するための研究も現在盛んに行われているが、本手法が人工細胞において細胞外から細胞内へシグナルを伝達する新しい技術になり得ると考える。さらに、*in vivo* における人工受容体として利用する為の基礎的知見を得ることで、現在大きな注目を浴びている、機能性細胞を直接的に患者体内に移植する新しい治療技術 (細胞治療) に本手法が大いに役立てることは間違いない。

## 3. 研究の方法

研究代表者はこれまで、コイルドコイルヘテロ二量体を形成する人工ペプチド E3 ((EIAALEK)<sub>3</sub>) / K4 ((KIAALKE)<sub>4</sub>) を利用し、E3 配列を融合した人工受容体 E3-EGFR の細胞膜での構築及び、化学的架橋により二量体化した K4 リガンドを創製し、本リガンドで人工受容体を刺激することで、受容体の二量体化及び活性化による細胞機能の制御に成功している (Nakase, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2012))。人工受容体は、EGFR の二量体化に関わる細胞外ドメイン I~III とドメイン IV の一部を欠失させ、天然のリガンドでは二量体化できないように設計した。その細胞外に提示される N 末端部分に、E3 配列を組み込んだ受容体 (E3-EGFR) を、遺伝子工学的に細胞膜に発現させた。この受容体に対して、受容体が活性化時に相互作用する距離として考えられている 10 オングストローム前後のリンカーを用いて 2 分子の K4 ペプチドを連結した人工リガンドを合成し、そのリガンドによる受容体の二量体化形成及び活性化の制御を試みている。

しかしながら、本来のコイルドコイルペプチドの Kd 値は数十 nM の範囲内であるものの、本研究で用いたペプチドリガンドでは受容体活性化に 10  $\mu\text{M}$  程度の濃度が必要であり、さらに低濃度で受容体を活性化できる技術の開発が強く望まれる。現段階で高いリガンド濃度が必要な理由として、細胞表面上でのリガンドと受容体の結合が十分でないことや、細胞膜上での更なる density の高い受容体のクラスター化が必要であることが推測される。本研究ではそれらを改善すべく、(i) 水中での分子間相互作用及び細胞膜への吸着量の増大を狙ったリガンドの疎水性基をもつアシル化、(ii) マルチなりガンド配列を膜上にもつ小胞構造の構築、(iii) (i) 及び (ii) で作製したリガンドの受容体活性化の検討 (受容体クラスター形成時における構造安定性及び活性化レベルの検討) を中心に研究を進めた。

#### 4. 研究成果

研究代表者がこれまで開発した K4 リガンドとして、ビスマレイミドエタンでシステインの側鎖を介して K4 ペプチドを二量体化させたペプチドリガンド (2 分子連結型 K4 リガンド: BMOE-C) を創製した。この BMOE-C を用いて、extracellular domain として E3 配列を融合した epidermal growth factor receptor (E3-EGFR) の受容体二量体化、及び、受容体活性化の検討では、EGFR の cytoplasmic domain チロシン 1173 のリン酸化を指標とし、western blot で確認した結果、10  $\mu$ M 程度のペプチドリガンド濃度が受容体の活性化に必要であることが示されている。本手法で、E3-EGFR のクラスター化と受容体活性化は特異的に誘導できるが、将来的に *in vivo* で本システムを利用する為にはさらに低濃度で受容体の二量体化、及び、活性化可能なシステム・リガンド創製が必要不可欠であった。

そこで、培養液中でのリガンド自体のクラスター化 (人工リガンド分子同士が会合しやすくなるように)、及び、リガンドの細胞膜集積性の向上を狙い、K4 ペプチドリガンドに様々な疎水性基を結合した K4 リガンド分子の設計、及び、合成を行った。BMOE-C の手法と同様にリンカー部位はシステイン残基を介してリンカー結合を行った。また N 末端には疎水度の異なる各種の疎水性基を縮合させることで、2 分子連結型 K4 リガンドを合成した。

次に、疎水性基をもつペプチドリガンドを用いて、E3-EGFR のクラスター化と活性化の評価を行った。結果として、ペプチドリガンドのアシル化による長鎖炭素数に応じて、受容体の活性化が著しく上昇した。従来の BMOE-C の場合では、受容体の活性化が困難とされた $\sim$ 10 nM のペプチドリガンド濃度においても E3-EGFR 受容体の活性化が誘導されることが確認された。一方で、疎水性度が高いペプチドリガンドほど細胞毒性を引き起こしやすいことも明らかとなり、受容体活性と細胞毒性のバランスを考慮した最適化が必要であることも明らかとなった。しかしながら、本技術で、低濃度且つ高効率に標的受容体を活性化できる機能性の高いリガンド分子が創製できることが確認された。さらに現在、K4/E3 とは別のコイルドコイル形成分子 (例えば Jun-Fos 等) を用いた人工受容体リガンド活性化システムの構築も行っており、複数の受容体発現において、ロイシンジッパーペプチド特異的な受容体制御技術の確立に向けて研究を引き続き展開している。

さらに本研究では、機能的・効率的な受容体活性化可能な人工リガンドの開発のため、細胞由来マテリアルである 100 nm 程度の大きさを有する細胞分泌小胞 (エクソソーム) を利用し、小胞膜上に人工ヘリックスペプチドの構築を行った。結果として、小胞膜上へのロイシンジッパーペプチドの密度、及び、

ペプチドの構築構造の違いによってヒト乳癌細胞上に発現させた人工 EGFR の活性化効率に大きく影響を与えることが示された。また、効果的に EGFR の活性化を示す条件によって、EGFR の Tyr1173 のリン酸化、及び、そのシグナル応答によるアクチン骨格への影響 (ラメリポディア形成) の可視化に成功し、本手法が人工 EGFR の発現に依存した人工受容体-リガンドシステムの開発における重要な基盤的知見が得られるに至った。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. **Ikuhiko Nakase**, Creation of artificial receptors activated by coiled-coil peptides and cellular regulation, *Yakugaku Zasshi* 135, 375-381 (2015) 査読有り

2. **Ikuhiko Nakase**, Shiroh Futaki, Combined treatment with a pH-sensitive fusogenic peptide and cationic lipids achieves enhanced cytosolic delivery of exosomes, *Scientific Reports* 5, 10112 (2015) 査読有り

3. **Ikuhiko Nakase**, Nahoko Bailey Kobayashi, Tomoka Takatani-Nakase, Tetsuhiko Yoshida, Active macropinocytosis induction by stimulation of epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras expression potentiates cellular uptake efficacy of exosomes, *Scientific Reports* 5, 10300 (2015) 査読有り

4. Yusuke Azuma, Tim Kukenshoner, Guangyong Ma, Jun-ichiro Yasunaga, Miki Imanishi, Gen Tanaka, **Ikuhiko Nakase**, Takahiro Maruno, Yuji Kobayashi, Katja M. Arndt, Masao Matsuoka and Shiroh Futaki, Controlling leucine-zipper partner recognition in cells through modification of  $\alpha$ - $\gamma$  interactions, *Chemical Communications* 50, 6364-6367 (2014) 査読有り

[学会発表] (計 21 件)

1. **Ikuhiko Nakase**, Intracellular Delivery System Based on Biofunctional Peptide-Modified Exosomes, Institute for Chemical Research International Symposium 2016 (ICRIS'16) –Research Network Based on ICR MOU–

(2016 年 3 月 8 日、京都大学化学研究所、宇治市、京都)

2. **中瀬生彦**、機能性ペプチドを利用したエクソソームの細胞膜分子認識と薬物送達促進、蛋白研セミナー (Mechanism of Biology on the Membrane : 生体膜上の生物化学) (2016 年 3 月 3 日、ホテル阪急エキスポパーク、吹田市、大阪)

3. **中瀬生彦**、機能性ペプチド修飾型エクソ

ソームの細胞認識と薬物送達、第25回NMMSセミナー（2016年2月27日、徳島大学、徳島市、徳島）

4. **Ikuhiko Nakase**, Effective cellular uptake of exosomes modified with biofunctional peptides, 第8回武田科学振興財団薬科学シンポジウム「生命分子から薬をつくる-中分子を中心に」（2016年1月21日、武田薬品工業株式会社研修所、吹田市、大阪）

5. **中瀬生彦**, 機能性ペプチド修飾型エクソソームを基盤にした薬物送達技術の開発、第37回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（2015年11月20日、熊本大学、熊本市、熊本）

6. **Ikuhiko Nakase**, Nahoko Bailey Kobayashi, Tomoka Takatani-Nakase, Tetsuhiko Yoshida, Increased Cellular Uptake of Exosomes via Active Macropinocytosis Induction, 27<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials（2015年8月31日、ICE Krakow Congress Centre, Krakow, Poland）

7. **中瀬生彦**, 機能性ペプチドを搭載したエクソソームの薬物運搬、第7回日本RNAi研究会、第2回日本細胞外小胞学会（2015年8月27日、グランドプリンスホテル広島、広島市、広島）

8. **Ikuhiko Nakase**, Nahoko Bailey Kobayashi, Tomoka Takatani-Nakase, Tetsuhiko Yoshida, Active Macropinocytosis Induction Potentiates Exosome-mediated Intracellular Delivery, 42<sup>nd</sup> Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society（2015年7月28日、Edinburgh International Conference Centre, Edinburgh, Scotland）

9. **中瀬生彦**, 機能性ペプチド搭載型エクソソームの開発と細胞内薬物導入、生体分子素子技術を礎とするメディカルバイオ研究の最先端国際シンポジウム（2015年7月14日、東北大学 多元物質科学研究所、仙台市、宮城）

10. **Ikuhiko Nakase**, Shiroh Futaki, Efficient cellular uptake of exosomes using cationic lipids and pH-sensitive fusogenic peptide CPP Paris 2015（2015年7月2日、Univerreite Pierre et Marie Curie (UPMC), Paris, France）

11. **中瀬生彦**, エクソソームを基盤にした薬物運搬技術の開発、ナノバイオ国際共同研究教育拠点・第4回若手国内シンポジウム、第8回ナノバイオ若手ネットワークシンポジウム（2015年6月12日、長良川国際会議場、岐阜市、岐阜）

12. **中瀬生彦**, ドラッグデリバリーの現状と問題、第7回光科学異分野横断セミナー（2015年5月26日、大阪府立大学、堺市、大阪）

13. **中瀬生彦**, ベイリー小林菜穂子、中瀬朋夏、吉田徹彦, マクロピノサイトーシス誘導によるエクソソームの細胞内移行促進日本膜学会第37回年会（2015年5月15日、早稲田大学、新宿区、東京）

14. **Ikuhiko Nakase**, Efficient intracellular delivery using functional peptide-modified exosomes, Swiss-Japanese Chemical Biology Symposium 2014（2014年10月2日、University of Bern, Bern, Switzerland）

15. **Ikuhiko Nakase**, Cellular regulation technology using functional peptides in systems of exosome-mediated delivery and artificial receptors, The 8<sup>th</sup> NanoSquare Workshop（2014年9月19日、大阪府立大学、堺市、大阪）

16. **中瀬生彦**, 細胞内へ効率的に目的物質を送達する～機能性ペプチドとエクソソームの利用～、第2回BNCTなかもずセミナー（2014年8月22日、大阪府立大学 BNCT研究センター、堺市、大阪）

17. **中瀬生彦**, ペプチド化学と細胞工学を基盤とした薬物送達システムの開発、第3回光科学異分野横断セミナー（2014年7月29日、大阪府立大学、堺市、大阪）

18. **Ikuhiko Nakase**, Development of intracellular delivery systems based on exosomes and modification with functional peptides, 18<sup>th</sup> Korean Peptide Protein Society Symposium（July 8, 2014, Hanwha Resort, Haeundae, Busan, South Korea）

19. **中瀬生彦**, ヘリックス間相互作用認識で活性化される人工受容体の構築と細胞機能制御、日本薬学会第134年会 薬学における生命指向型化学（生命現象解明を加速する統合的アプローチを探る）（2014年3月30日、ホテル日航熊本、熊本市、熊本）

20. **中瀬生彦**, 小松青平、田中弦、二木史朗、ヘリックス相互作用で活性化可能な人工EGF受容体の創製と活性化におけるリガンド構造の影響、日本ケミカルバイオロジー学会第8回年会（2013年6月19日、東京医科歯科大学、文京区、東京）

21. **中瀬生彦**, ヘリックスニ量体型リガンドで活性化される人工EGF受容体の構築と細胞機能制御、第13回日本蛋白質科学会年会（2013年6月13日、とりぎん文化会館、鳥取市、鳥取）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

大阪府立大学 ナノ科学・材料研究センター

<http://www.nanosq.21c.osakafu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中瀬 生彦 (NAKASE, Ikuhiko)

大阪府立大学 21 世紀科学研究機構 ナノ

科学・材料研究センター 特別講師

研究者番号：40432322

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：