

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	奥 彰彦
論文題目	生体高分子の細胞内導入に関するペプチド化学的アプローチ		
(論文内容の要旨)			
<p>ペプチドは、天然タンパク質の機能モチーフを援用できる点、非天然アミノ酸の導入や化学修飾の可能性、その設計や合成の容易さから魅力ある生体制御素材と言える。本研究においては、この特長を活かして、生体高分子の細胞内導入に関する新しいアプローチを開発すべく、以下の研究を行った。</p>			
第一章 ユビキチン多量体の細胞内導入を目指した新規リンカーの創出			
<p>ユビキチンは細胞内に広く存在し、様々な細胞活動に寄与する重要なタンパク質である。細胞内において、ユビキチン同士が次々に結合し、多量体を形成することで、その機能が発揮されることが知られている。化学修飾等を加えた人工ユビキチンの細胞内導入は、ユビキチンの細胞内機能解明のための有力な方法論となり得る。ユビキチンの重合化は、ユビキチン分子のC末端グリシンと、もう一分子のユビキチンのリジン側鎖との間のイソペプチド結合形成を通して行われる。また、細胞内の脱ユビキチン化酵素 (DUB) により、このイソペプチド結合は加水分解される。従って、細胞内へと導入した人工ユビキチンを用いた研究を可能とするためには、DUBによる分解に対し安定な多量体形成法を創出することが必要となる。学位申請者は、ユビキチン間を架橋する新規リンカー[Boc-Cys(Trt)-aminoethyl-maleimide (Trt=trithyl) (1)]の開発によりこの問題の解決を図った。</p> <p>C末端のグリシン2残基を欠失したユビキチンのチオエステル体(2)、並びに、48位のリジン残基をシステインに置換したユビキチン(3)を調製した。(3)のチオール基と(1)を反応後、トリフルオロ酢酸により、リンカー(1)のBoc基とTrt基の除去を行った。次いで、(2)とライゲーションすることにより、DUBに対して高い耐性を有する人工ユビキチン二量体(4)を得た。細胞膜透過性ペプチドの一種であるTatペプチドと(4)とをジスルフィド結合で架橋し、pyrenebutyrate存在下に細胞とインキュベーションすることで、(4)の細胞内送達を達成した。</p>			
第二章 カルモジュリン由来ペプチドの相互認識を利用した膜融合系の開発			
<p>カルシウム結合タンパク質として知られるカルモジュリンはEF-handと呼ばれる4つのヘリックス-ループ-ヘリックス領域でカルシウムイオンと結合する。また、このカルモジュリンのN末端から3番目と4番目のEF-handに対応するペプチド(EF3/EF4)同士が相互作用することが示唆されている。学位申請者は、カルシウムイオン刺激により二量体形成がスイッチできる相互認識素子として、両ペプチドを取り上げ、その認識様式に関して検討を加えた。さらに、これを用いて、カルシウムイオンによりスイッチ可能な膜融合系の開発を行った。</p>			

まず、**EF3**と**EF4**のN末端側、C末端側それぞれにシステインを導入したペプチドをレドックスバッファー中で反応させ、ジスルフィド架橋の優先性を検討した。野生型のカルモジュリンの構造をとった時システインが近接するようなヘテロ二量体が優先的に生成したことから、この二量体のトポロジーは野生型に近いものであることが示唆された。次いで、**EF3**と**EF4**のN末端を、ポリエチレングリコールをリンカーとしてコレステロールで修飾した**Chol-EF3**、**Chol-EF4**を作製し、これらを用いて、**EF3**と**EF4**を脂質膜上に提示したりポソームを調製した。リポソーム膜上に導入した蛍光色素のエネルギー移動(**FRET**)の解消を指標に膜融合効率を評価したところ、**EF3**と**EF4**とを提示したりポソームを混合した際には、カルシウムイオンの添加により**FRET**の解消が見られたが、ペプチドを提示していないリポソームでは**FRET**の解消は見られなかった。このことから、**EF3**と**EF4**のヘテロ二量体形成が膜融合を促進することが示唆された。また、これらの膜融合促進ペプチドの細胞融合への応用の可能性についても検討した。細胞懸濁液に蛍光標識した**Chol-EF3**、**Chol-EF4**をそれぞれ添加後、これらの細胞を混合し、カルシウムイオン存在下にインキュベーションを行った結果、細胞融合が誘起されることが示唆された。

以上の結果は、生体高分子の細胞内導入に関する新しい方法論を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

ペプチドはタンパク質に比べその設計や合成が容易であるため、化学的な修飾を施すことで天然のタンパク質にはない機能を付加することができる。申請者は本論文において、生体高分子の細胞内導入に関連した以下の研究を行った。

第一章では、ユビキチン多量体の細胞内導入に応用可能な新規クロスリンカーの創製を行った。ユビキチン多量体は細胞内で脱ユビキチン化酵素により分解される。これを考慮し、新規リンカー[Boc-Cys(Trt)-aminoethyl-maleimide (Trt=trithyl) (1)]を設計・合成した。このリンカーで連結された人工ユビキチン二量体においては、脱ユビキチン化酵素の求核攻撃部位のカルボニル基に対応する位置がアルキル鎖となっており、脱ユビキチン化酵素に対して高い安定性を持つことが確認された。また、膜透過ペプチドを用いて、この人工ユビキチン二量体が効率的に細胞内導入可能であることが示された。

第二章では、カルモジュリン由来ペプチドを用いた新規膜融合システムの開発を行った。カルモジュリンを構成する4つのEF-handの3番目と4番目に相当するペプチド(EF3/EF4)がカルシウムイオン存在下にヘテロ二量体を形成することが知られていた。本研究では、このEF3とEF4を認識タグとして利用した、カルシウムイオン依存的な会合・機能制御系の構築の可能性を検討した。レドックスバッファー中でのモデルペプチドのジスルフィド架橋形成様式の検討から、このヘテロ二量体のトポロジーは野生型のカルモジュリン構造と類似したものであることが示唆された。次に、EF3とEF4をリポソーム表面に提示させることで、カルシウム依存的なヘテロ膜融合が可能であることを示した。さらに、この方法の培養細胞の融合への応用の可能性についても検討した。

以上、本論文では、ペプチド化学的手法に基盤を置き、天然のタンパク質の構造や機能に着想を得た新規リンカー・新規ペプチドタグの開発を行った。これらは、生体高分子の細胞内導入に関連する新しい方法論を提供するものである。

よって、本論文は博士(薬科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成28年2月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日：平成28年6月24日以降