

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	川口 祥正
論文題目	光架橋法によるオクタアルギニンの細胞内取り込み受容体の同定と細胞内移行経路の解明		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>細胞を制御するペプチドやタンパク質、核酸などの生理活性高分子が創製されており、それらを効率よく細胞内に送達できる細胞内導入法の開発が求められている。細胞膜透過性ペプチド (Cell-Penetrating Peptides; CPPs)は、低毒性で、それらを効率よく細胞内に導入できるため、細胞内送達キャリアとして注目を集めている。一方で、高い導入効率が得られない場合もあり、より効率的な送達キャリアの創製が望まれている。CPPsの細胞内取り込みには、種々のエンドサイトーシスの関与が報告されているが、細胞内移行に関わる膜受容体については同定が進んでいない。CPPsの受容体を明らかにすることで、その受容体を介した細胞内移行経路を標的とした、より効率的な新規送達キャリアの創製が可能になると期待できる。そこで、本研究では、代表的なCPPsで、効率的な細胞内送達が可能なおクタアルギニン (R8)に着目し、光架橋法によるR8の細胞内取り込みに関わる受容体の同定を目的に検討を行った。</p> <p>第一章 光架橋法によるオクタアルギニンの相互作用タンパク質の同定</p> <p>筆者らは、光反応基ジアジリンを導入したドデカアルギニン (R12)を用いた検討により、R12の細胞内取り込みにC-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4)が受容体として関与することを以前に報告した。しかし、R8の細胞内移行にはCXCR4の関与は認められず、別の受容体の関与が示唆された。そこで、本章では、光架橋法によりR8と相互作用する細胞表面タンパク質を同定することを目的に検討を行った。まず、光反応基としてジアジリン、精製タグとしてビオチンを導入した光反応性R8 (Biotin-Photo-R8)を合成した。細胞にBiotin-Photo-R8を添加し、UV照射により架橋を行った。細胞を溶解後、ストレプトアビジンビーズを用いて架橋タンパク質の濃縮を行い、SDS-PAGEにより分離後、抗biotin抗体によるウエスタンブロット、および銀染色による解析を行った。その結果、約40 kDaの位置にバンドが検出され、質量分析法により解析したところ、細胞質に局在するタンパク質であるLanthionine synthetase component C-like protein 1 (LanCL1)が同定された。LanCL1を強制発現させると、R8の取り込みが約20%増加したことから、LanCL1が細胞内へのR8の取り込みに関与するタンパク質である可能性が示唆された。以上から、光架橋法はR8の相互作用タンパク質を同定する上で有用であることが確認されたが、LanCL1は細胞質のタンパク質であり、目的の膜受容体の同定</p>			

には至っておらず、光架橋法には改善が必要であると考えられた。

第二章 オクタアルギニンのクラスリン依存性エンドサイトーシス受容体の同定

第一章において、光架橋法によりR8の相互作用タンパク質の同定に成功したものの、R8の細胞内移行に関わる細胞表面の受容体は得られなかった。その原因として、(1)ビーズからの非選択的な溶出法、および、(2)膜タンパク質以外のタンパク質の混入が考えられた。そこで、第二章では、上記の二点を解決する新たな光架橋法を開発し、R8の細胞内移行に関わる受容体の同定を目的とした。まず、架橋タンパク質を選択的に溶出するために、還元的切断可能なジアゾベンゼンを切断リンカーとして導入した新規PhotoR8CLを合成した。PhotoR8CLで光架橋後、(2)の膜タンパク質以外の混入を防ぐために、膜画分を抽出した。それをストレプトアビジンビーズにより濃縮し、還元処理により架橋タンパク質を溶出した。その結果、17種類の膜タンパク質が同定された。これらのタンパク質の中で、Syndecan-4 (SDC4)をRNAi法によりノックダウンしたところ、R8の細胞内移行量が減少した。よって、SDC4がR8の取り込みに関与していることが示唆された。また、各種エンドサイトーシス阻害剤を用いてR8の細胞内移行経路について検討を行ったところ、SDC4はR8のクラスリン依存性エンドサイトーシス (Clathrin-Mediated Endocytosis; CME)による取込みに関与することが示唆された。また、共焦点顕微鏡観察により、CMEのマーカであるトランスフェリンとSDC4、および、R8の三者が、共局在して細胞内に取り込まれていることが確認された。以上の結果より、SDC4はR8のCMEの受容体であることが明らかとなった。さらに、R8との融合タンパク質の細胞内送達においても、R8と同様に、SDC4がCMEの受容体として寄与することが示唆された。

本研究では、第一章で得られた光架橋法に関する知見をもとに、第二章で切断リンカーと光反応基を組み合わせたことで、非特異的吸着によるバックグラウンドが低減され、リガンドと相互作用する膜タンパク質の同定が可能となった。これにより、R8の細胞内移行に関わる膜タンパク質としてSDC4が同定された。さらに、SDC4はR8のCMEの受容体であることが初めて明らかとなった。本研究は、SDC4を介した細胞内移行経路を標的とする、より効率的な細胞内送達キャリアの創製につながると期待される。

(論文審査の結果の要旨)

Tatやオリゴアルギニンペプチドなどの細胞膜透過性ペプチド (Cell-Penetrating Peptides; CPPs)の細胞内移行には、種々のエンドサイトーシスの関与が報告されている。CPPsの細胞内移行に関わる受容体を同定することは、CPPsの細胞内移行機序の解明への足がかりになるとともに、より効率的な細胞内送達キャリアの創製や細胞標的法の開発につながると期待される。申請者は、代表的なCPPsの一つであるオクタアルギニン (R8)の受容体の同定、およびその細胞内移行経路の解明を目指して光架橋法を用いた研究を行い、以下に示すような価値ある知見を得た。

第一章では、光反応基であるジアジリンをR8に導入した光反応性R8 (Biotin-Photo-R8)を用いて、R8の相互作用タンパク質として細胞質に局在するLanthionine synthetase component C-like protein 1 (LanCL1)を同定した。LanCL1を強制発現させた細胞において、R8の細胞内移行量が増加したことから、この細胞質タンパク質がR8の細胞内取り込みに何らかの形で関与する可能性を示した。

第二章においては、化学的に切断可能な光反応性プローブ (PhotoR8CL)を開発し、夾雑タンパク質の中から光架橋されたタンパク質を選択的に溶出させた。候補となる17種のタンパク質をRNAi法によってノックダウンすることで、Syndecan-4 (SDC4)がR8の細胞内移行に関与することを示した。ノックダウン、および阻害剤を用いた更なる検討により、SDC4がR8のクラスリン依存性エンドサイトーシス (Clathrin-Mediated Endocytosis; CME)の受容体であることを示した。さらに、SDC4のCMEが、R8との融合タンパク質の細胞内移行にも関わることも示した。

以上のように、申請者は光架橋法により、R8の細胞内移行への関与が示唆されるタンパク質としてLanCL1を、また、そのCME受容体としてSD4を初めて同定した。これらの成果は、R8の細胞内移行機序の解明に重要な知見を与え得る。また、これらのタンパク質に着目した組織・細胞選択、あるいは、効率的な細胞内送達キャリアの創製も期待される。

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。

さらに、平成28年2月22日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日：平成28年6月22日以降