

Title	膜傷害性ペプチド変異体を用いたタンパク質の細胞内導入(Abstract_要旨)
Author(s)	秋柴, 美沙穂
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2019-03-25
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k21711
Right	許諾条件により本文は2020-03-25に公開; 許諾条件により要旨は2019-06-25に公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（薬科学）	氏名	秋柴 美沙穂
論文題目	膜傷害性ペプチド変異体を用いたタンパク質の細胞内導入		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>近年、バイオ高分子医薬品の開発が急速に進んでいる。中でも抗体は、その高い標的特異性から分子標的薬としての積極的な応用が図られている。しかし一般に抗体は細胞内に移行しないため、抗体医薬の標的は細胞外の因子に限られる。もし、抗体を細胞に効率よく導入できれば、今後の抗体医薬の適用範囲は大幅に拡大すると期待できる。</p> <p>外来のタンパク質を細胞内に導入し、所望の活性を発揮させるためには、細胞を傷害せずサイトゾルへ効率よく移行させる必要がある。これを目的として、タンパク質をエンドサイトーシスによって取り込ませた後、エンドソームから脱出させる方策が多く開発されてきた。しかし、医療への展開を考える際には、エンドソームからサイトゾルへの放出活性の大幅な向上が必要である。</p> <p>本研究では、外来タンパク質をサイトゾルへ導入する手法として、クモ毒由来の強膜傷害性ペプチドを利用するアプローチについて検討を行った。第一章では、クモ毒由来の天然の溶血ペプチドの配列を改変し、得られた変異体を用いて抗体を導入できることを示した。第二章では、開発したペプチドが従来のエンドソーム作用性分子と異なる性質を持つことに着目し、細胞内移行機構について検討を加えた。</p> <p>第一章 クモ毒由来膜傷害性ペプチドの改変と生理活性タンパク質の細胞内導入</p> <p>エンドソーム脱出効率の向上をはかるため、強力なエンドソーム不安定化ペプチドを新たに開発し、抗体をはじめとするタンパク質の細胞内送達を実現することを目指した。</p> <p>天然の毒素ペプチドの持つ強い膜傷害活性に着目し、その強い膜傷害活性をエンドソーム選択的に発揮させることを期待して配列を改変した。すなわち、細胞毒性の低減と同時に、エンドソーム膜への選択的な傷害を実現するため、膜傷害性を有する塩基性毒素ペプチドM-lycotoxin (IWLTKFLGKHAAKHLAKQQLSKL-amide) 中の疎水性アミノ酸を酸性アミノ酸に置換した誘導体9種を作製した。この変異によりほとんどのペプチドの細胞毒性は30倍以上低減した。さらに誘導体存在下、高分子薬物モデルとしてデキストラン (10 kDa) を細胞に投与した。ペプチド非存在下ではデキストランは点状の細胞内分布を示すのに対し、細胞全体へと広がったデキストランの分布を与える誘導体もあった。これは、通常エンドソームに捕捉される分子が、ペプチドの作用によりサイトゾルへ放出されることを示唆する。特にL17E変異体 (IWLTKFLGKHAAKHEAKQQLSKL-amide) で処理した細胞においては、約50%の細胞でサイトゾルのデキストランの移行が認められた。このペプチドを用いることで、生理活性を持つタンパク質 (組み換え酵素Cre、抗体) を細胞内に導入できることが確認された。</p> <p>エンドソーム選択的な膜不安定化活性を得るためには、エンドソームの成熟化に伴うpHの低下を利用する試みが多く用いられてきた。しかし、L17EはpH依存的な膜傷害能を示さず、L17EはpH 5.0とpH 7.4において同程度の膜傷害活性を持つことが明らかとなった。一方で、L17Eは中性脂質からなるリポソームに顕著な相互作用を示さないものの、酸性脂質を含有したリポソームに対して選択的な膜傷害性を発揮した。このことから、L17Eはエンドソームへの移行に伴い、pHではなく脂質組成の変化に応答し、エンドソーム不安定化効果を発揮する可能性が示唆された。併せて、L17Eが細胞への物質取込を誘導する性質を有していることを見出した。</p>			

第二章 L17Eペプチドが介する高分子のサイトゾル移行機序の検討

第一章で得たL17Eペプチドは、pH選択的な膜傷害性を示さず、従来のエンドソーム作動性分子とは異なる機序で細胞内導入を行う可能性が考えられた。ここでは、エンドサイトーシスの一連の過程におけるL17Eの作用の場を明らかにすることを目的とした。L17Eは、投与後数分でデキストランを細胞内に導入しており、さらに、初期エンドソームの形成は必要でないことが明らかとなった。これらの結果は、L17Eはエンドサイトーシスの極めて早い段階（初期エンドソーム形成前）に高分子をサイトゾルに移行させる可能性を示唆する。

一方、L17Eが細胞の物質取込機構を誘起することから、アクチン細胞骨格に与える影響を詳細に検討した結果、L17Eは細胞膜のラフリングを誘導することが明らかとなった。マクロピノサイトーシス誘導の各段階に対する阻害剤存在下にL17Eの効果を評価したところ、ラフリングを阻害するサイトカラシンDおよびアミロライド処理下にL17Eによるデキストランのサイトゾルへの移行が抑制された。これらの結果は、L17Eによる細胞内導入には、L17Eが誘導するアクチン重合に伴う細胞膜のラフリングが重要であることを示唆する。さらに、L17E投与により細胞膜の内側に主に存在するホスファチジルセリン等の脂質の細胞表面への露出が認められたが、ATP枯渇条件ではこれが抑制されることを見出した。これらの結果から、L17Eは、ラフリングが誘起された細胞膜に高分子が透過する一過性のポアを形成する可能性が示唆された。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

近年、抗体等の高分子化合物の医薬品として広く応用されるようになってきた。しかしながら、高分子医薬品をもちいて細胞内因子を標的とすることはできず、これは、親水性の高分子であるタンパク質をサイトゾルに送達する技術がいまだ確立していないことに起因する。申請者は、生体高分子をサイトゾルへ送達する手法の確立に向けて、クモ毒由来の強膜傷害性ペプチドを利用するアプローチについて検討した。

第一章では、膜傷害性ペプチドを改変した L17E ペプチドを開発し、それをを用いて抗体を細胞内に導入できることを示した。申請者はまず、クモ毒ペプチド中の膜傷害に重要な働きを及ぼすアミノ酸(ロイシン)をグルタミン酸に置換することで、細胞膜に対しての破壊作用を抑えられることを示した。さらに、ペプチドの作用により通常エンドソームに滞留する分子がサイトゾルに放出されることを見出した。得られたペプチドの利用により、抗体は効果的に細胞内に移送され、細胞内情報伝達を調節可能なことが示された。抗体は高い分子識別能力を持つタンパク質である。これを利用して細胞内の分子の検出や分子間相互作用の調節が可能となり、細胞生物学の基礎研究に有用なツールとなることが期待される。

第二章では、L17Eペプチドが細胞に投与後5分という比較的短い時間で高分子(デキストラン)をサイトゾルに導入することに着目し、その作用機序に関して検討を加えた。まず、5分間でのデキストランのサイトゾル送達にはエンドソームの成熟は必要ではない一方で、マクロピノサイトーシスの誘導が必要であることを明らかにした。また、L17Eによって誘導されるラッフリングがデキストランのサイトゾル送達に関わる可能性を指摘した。本章で検討された高分子のサイトゾル移行機序は、これまでに検討されてきた直接膜透過やエンドソームを経由する細胞内送達経路とは異なるものであり、細胞内送達法の開発に新たな概念を与えるものだと期待できる。

以上、本論文は、生体高分子をサイトゾルへ送達する手法の確立に向けて、生体膜と相互作用するペプチドを利用するアプローチの有用性と、新規の細胞内送達経路の可能性を指摘するものであり、細胞内送達法の開発に有用な知見を与えるものと考えられる。

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。また、平成31年2月18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： 2019 年 6 月 25 日以降