

京都大学	博士（薬学）	氏名	游 皓欣
論文題目	Development of novel systems promoting intracellular protein delivery （タンパク質の細胞内導入を促進する新しい方法論の開発）		
Introduction The delivery of proteins or peptides to intracellular targets is believed a powerful method for cellular manipulation. The plasma membrane, however, formed a barrier which makes the intracellular delivery of these large and hydrophilic molecules a difficult task. The employment of certain short cationic peptides, named cell-penetrating peptides (CPPs), has been proven advantages of efficient and non-toxic promotion of protein internalization. CPPs comprise peptides containing several arginine (Arg) and lysine (Lys) residues, such as HIV-1 Tat (48-60), penetratin and oligoarginine peptides (Rn, n=7-12). Many articles have reported that the basic residues are important for the mechanisms of the translocation ability of CPPs. The delivery strategies being employed include covalent conjugation or non-covalent association (complexation) of CPPs with the cargoes to be delivered intracellularly. There are still arguments regarding the mechanisms of the CPP-mediated delivery of proteins. Yet, it is believed that the first step in the delivery process is a CPP-dependent recruitment of cargoes onto the cellular membranes via electrostatic interaction. Then, the cargoes are internalized into cells via the endocytosis pathway. Though CPPs have been extensively utilized for the protein/peptide delivery <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>, there are still several important issues remaining to be clarified. This study is focused on two topics: the first, a better method for preparation of CPP-conjugated proteins utilizing expressed protein ligation (EPL); and the second, design of novel endosomolytic peptides for efficient protein delivery. 1. Expressed protein ligation for the preparation of fusion proteins with cell penetrating peptides EPL is a useful method for the native chemical ligation of proteins with other proteins or peptides. This study assessed the practicability of EPL in the preparation of fusion proteins of enhanced green fluorescent protein (EGFP) with chemically synthesized CPPs for intracellular delivery. Using intein-mediated purification with an affinity chitin-binding tag (IMPACT) system, the thioester of EGFP (EGFP-SR) was prepared. Optimization of the ligation of EGFP-SR with arginine 12-mer (R12) produced the fusion protein in high yield. One of the advantages of EPL procedure is allowing the fusion of proteins to non-gene-coded CPP. Fusion proteins of EGFP with R12 and the D-isomer of R12 prepared by EPL showed similar levels of cellular uptake compared to the fusion protein directly expressed in <i>Escherichia coli</i>. Another advantage of EPL procedure is allowing the preparation of EGFP-R12 containing a low level of endotoxin (ET), via the satisfactory ET removal of EGFP-SR			

prior to ligation with the R12 peptide.

2. Design of novel pH-dependent endosomolytic peptides for efficient intracellular protein delivery

There is growing evidence that endosomal escape is a critical step to obtain the biological effects of the proteins intracellularly delivered by CPPs. Inefficient endosomal escape leads to the entrapment of the internalized proteins in the endocytic vesicles. The usage of pH-dependent endomolytic peptide has been reported to be advantageous for cytosolic delivery of bioactive proteins. My work has focused on designing new, more efficient endosomolytic peptides based on hemolytic peptide. Hemolytic peptides are the membrane-active peptides which can induce hemolytic effect of blood cells. These peptides also induce cytotoxicity to mammalian cells by fusion with plasma membrane and interfere with its integrity. The membrane fusion ability of the hemolytic peptides makes them appropriate leads for the design of endosomolytic peptides. In the present study, δ -hemolysin produced by *Staphylococcus* and chrysopsin-1 from red sea bream were selected, since they have highly hemolytic ability, both with a HC_{50} at 1 μ M. Several mutations to Lys or glutamic acid (Glu) were introduced into the parent peptides, named as mHemo and mChry, respectively. The results of cellular treatment showed that the cytotoxicity of the mutated peptides is highly reduced compared with their parent peptides. The internalization assay showed the diffuse distribution of the FITC-labeled mHemo and mChry in the cells, indicating their endosomal escape. These results suggest that mHemo and mChry may function as endosomolytic peptides.

(論文審査の結果の要旨)

細胞内へのタンパク質やペプチド送達を利用した細胞機能の制御は新しい治療法の開発につながる。細胞膜透過性ペプチド (cell penetrating peptide, CPP) はタンパク質やペプチドの細胞内導入送達ベクターとして期待されているが、その臨床的応用には、導入効率の一層の向上と安全性の担保が必要となる。

第一章では、申請者はexpressed protein ligation (EPL)を用いたCPP付加タンパク質の調製法の検討を行った。遺伝子組み換え技術によりCPP付加タンパク質を調製する際に、CPPへの付着に起因する大腸菌由来内毒素 (エンドトキシン) の混入が問題となるが、申請者はEPL法により、遺伝子組み換え技術により調製したタンパク質を化学合成したペプチドと選択的に連結することで、エンドトキシンプリーのCPP付加タンパク質を高収率で調製可能であることを示した。この結果は、同時に非天然アミノ酸などを含む様々なCPPを目的タンパク質に付加する方法論を提供するものである。

第二章では、効率的なタンパク質の細胞内導入をねらい、新規pH感受性エンドソーム融解ペプチドの設計を行った。タンパク質や核酸などの生体高分子の細胞内導入においては、エンドサイトーシスによる細胞内取り込みを利用するものがほとんどであるが、これらの生理活性発現のためには導入物質のエンドソームからサイトゾルへの移行が必要である。このための新しい方法論として、申請者は溶血性ペプチド δ -hemolysisとchrysopsin 1にグルタミン酸残基を導入することで、中性領域での膜親和性は減弱されるものの、酸性領域では膜傷害性を発揮する新規pH感受性エンドソーム融解ペプチドの創出を行った。得られたペプチドは、顕著な細胞毒性を伴うことなく、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた高分子薬物モデルとしての70kDaデキストランを効果的にサイトゾルに送達することが出来た。

以上、本論文は、CPP付加タンパク質の調製、ならびにエンドソーム脱出という観点から、タンパク質の細胞内導入を促進する二つの新しい方法論の開発を行ったものであり、今後の細胞内送達系の開発ならびにそれを利用した臨床的応用への展開に有益な知見を提供するものである。

よって本論文は博士 (薬学) の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成24年2月23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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成25年3月31日以降