

疎水性相互作用に基づく細胞膜修飾により細胞を機能化する分子の開発

畠中, 渉

<https://hdl.handle.net/2324/2236204>

出版情報：九州大学, 2018, 博士（工学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

氏 名 : 畠中 渉

論 文 名 : 疎水性相互作用に基づく細胞膜修飾により
細胞を機能化する分子の開発

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

細胞は、細胞膜上の種々の膜タンパク質を利用して様々な機能を発揮している。そのため細胞膜は、細胞の外界に対するフロンティアといえる。現在、種々の手法で膜を修飾することで細胞に新たな機能を付与する研究が盛んである。膜を機能化する手法のなかでも疎水性相互作用に基づいて膜に直接分子を修飾する手法は、その簡便さや汎用性だけでなく遺伝子変異の危険性がなく有望である。しかし、本手法に基づいて機能化した細胞を実用化する場合や機能化自体の拡張を見据えた場合、未だ課題が残されている。そこで本論文では、疎水性相互作用に基づいた膜修飾による細胞の機能化を達成する分子の開発をテーマに、以下の二点に取り組んだ。一点目は、細胞治療に用いる細胞の機能化法の開発を目指して、提示分子の膜上での提示時間の延長を目的としたペプチド型膜アンカーの開発とその評価を行った(二章)。二点目は、膜貫通タンパク質の機能模倣を目指して、膜貫通状態での膜修飾を実現する膜貫通分子(TM)の合成とその修飾法の開発(三章)および膜貫通状態で細胞内外に分子を提示可能なTMの効率的な合成法の開発(四章)を行った。

本論文の構成は以下の通りである。

第一章では、本論文の導入として、細胞膜修飾による細胞の機能化手法および、数ある手法の中で、特に疎水性相互作用に基づく細胞膜修飾による細胞の機能化についてまとめた。

第二章では、細胞の機能化を目的に疎水性相互作用に基づいた膜修飾を使用する場合に課題となる、提示される分子の寿命の短さを克服する膜修飾分子の開発を行った。本研究では、細胞膜外葉に分子を安定に提示できる一連のペプチド型膜アンカーの合理的な設計およびその機能評価を行った。ペプチド型膜アンカーを採用した理由は、(1) 配列上に複数の疎水基を導入できるため、疎水性向上に基づく安定性の向上が容易、(2) 固相合成法により配列を正確に制御でき、構造の最適化が容易という二点にある。ペプチド型膜アンカーに導入する疎水基の種類や数、導入位置を詳細に検討した結果、XX2と名付けたペプチドが最も優れた性能を示した。XX2は、他の膜修飾分子と比較しても高効率な細胞膜修飾および、膜上でのより長い半減期を達成した。また、XX2はリサイクリングエンドソームによって細胞膜へ再提示された。そこで、XX2にオリゴエチレングリコール鎖を介してビオチンを提示した分子を合成し細胞に添加した結果、細胞膜上にビオチンを介してストレプトアビジン(SA)を提示することに成功した。以上のことから、XX2が疎水性相互作用に基づ

いた膜修飾の課題を克服するモチーフとして有望であることが示された。

第三章では、膜貫通状態での膜修飾を達成するための分子およびその修飾法を開発した。これが達成されると、膜貫通タンパク質の機能を模倣した分子の開発に繋がり、細胞の機能化の幅が広がると考えられる。そこで、これを達成する分子として、膜透過部を有する TM を提案した。膜透過部は、既報の膜電位感受性の膜透過分子から着想を得て、疎水性のペプチド型膜アンカーにカチオン性のアルギニンを導入した設計である。TM は、膜透過部が疎水性相互作用により膜に修飾され、膜電位により生じるクーロン力を感じて細胞膜を透過し膜内葉まで移行して、膜貫通を達成することが期待された。膜透過部として二種類のペプチドを合成し評価したところ、疎水基としてリトコール酸を導入した peptide **1** が細胞膜を透過した。また **1** は、ミトコンドリアに集積したこと、膜電位阻害条件で膜を透過しなかったこと、人工膜上で膜透過ペプチド特異的なシグナルを示したことから膜電位によって直接膜を透過することが示唆された。そこで、**1** を膜透過部としてビオチンを修飾した TM を合成し細胞に添加した。その結果、TM 単体では膜を透過したものの、TM 添加後すぐに SA を添加するとビオチンと SA の認識が細胞膜上で起こり、膜透過が抑制された。すなわち、TM のみでは膜を完全に透過し細胞質へ移行するが、親水性かつ巨大な SA により TM の完全な膜透過が抑制され、膜透過部のみが膜を透過して膜貫通状態を達成している可能性が示された。

第四章では、第三章で示唆された TM の膜貫通状態の達成の証明を細胞膜の内外に分子を提示する TM を用いて試みた。TM が膜内葉上に提示する分子としてタンパク質 (eDHFR) に対するリガンドであるトリメトプリム (TMP) を採用した。また TM は、複雑な構造のため、従来の固相合成法による合成が困難と予想された。そのため、固相合成法とクリック反応を組み合わせたスキームで合成を行ったところ、TM の合成に成功した。この TM が第三章で報告した TM と同様に、SA との複合体化に依存した膜透過の抑制を示すことがわかり、膜貫通状態の達成が期待された。しかし、eDHFR を細胞質に発現する細胞に TM を添加しても、期待した eDHFR の細胞質から細胞膜内葉への局在の変化は見られなかった。この原因として (1) 細胞膜表面を覆う糖鎖層の立体障害、(2) TM の凝集および (3) TMP の膜内葉への埋没の三点が疑われた。今後、これらの原因を究明するためには、(1) の場合、膜貫通部の長い TM を合成するという対策の他に、糖鎖層の薄い K562 細胞や糖タンパク質の糖鎖が欠損した細胞株を使用する実験が有効と考えられる。(2) の場合、大過剰の SA に TM を添加して複合体化すること、TMP 近傍に正荷電を導入することが有効と考えられる。(3) の場合、TMP が膜に埋もれないように TMP 近傍に荷電を導入するなど分子設計の改良が有効であると考えられる。

第五章では、本論文の総括を行うとともに、本研究の今後の展望について述べた。