

Development of synthetic complex coacervates as an effective tool for intracellular protein delivery

李, 秉璋

<https://hdl.handle.net/2324/7396170>

出版情報 : Kyushu University, 2025, 博士 (システム生命科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)



氏 名	李 秉璋			
論 文 名	Development of synthetic complex coacervates as an effective tool for intracellular protein delivery (細胞内へのタンパク質送達のための効果的ツールとしての合成複合コアセルベートの開発)			
論文調査委員	主 査	九州大学	准教授	岸村 顕広
	副 査	九州大学	教授	森 健
	副 査	九州大学	教授	神谷 典穂 (工学府)

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

細胞内へのタンパク質送達は、細胞レベルの治療の観点だけでなく、生細胞の機能制御においても重要な技術である。細胞内での生体分子凝縮体形成は、細胞内でタンパク質などの機能分子を集める現象として注目を集めており、その形成原理は、タンパク質を効果的にカプセル化する技術へと展開可能である。中でも、複合コアセルベート (complex coacervate, 以下 CC) はそのモデル材料として注目を集めている。しかし、既存の CC では、その細胞毒性、低い細胞取り込み効率、低いタンパク質濃縮能、エンドソームにおける分解などの課題が、その応用を妨げている。本論文では、これらの課題を解決することを狙い、CC の細胞取り込みを上げる新手法の開発を行うとともに、独自の材料設計に基づいた CC を開発している。特に、細胞の新規前処理法の開発、構成ポリマーの側鎖修飾による荷電密度の調整およびエンドソーム溶解ペプチドの併用手法の確立による、毒性、取り込み効率、タンパク質濃縮能、エンドソーム脱出能の改善について、詳細な検討が行われている。

本論文において得られた成果は以下のとおりである。

第一に、CC の細胞内取り込みが低いという課題解決に向けて、CC と細胞膜との相互作用を大幅に増強する新規「プレコーティング法」を開発している。プレコーティング法では、CC 処理前に細胞を低濃度のカチオン性ポリマーに短時間曝露させるが、これにより細胞毒性を最小限に抑えつつ、CC の細胞表面への吸着を促進する結果につながっている。CC の構成ポリマーの陽イオンと陰イオンの荷電数の比を調整することで、良好な細胞取り込み効率と細胞生存率を両立する比として 1.1 を見出している。プレコーティング法を用いることで、接着細胞 (HeLa) と浮遊細胞 (Jurkat) の両細胞種において、CC の取り込み量が改善されている。

第二に、タンパク質封入効率を改善するために、CC を構成するアニオン性ポリマーの側鎖のカルボキシル基の 40%を疎水性のブチル基で修飾することで電荷密度を低下させている。この側鎖修飾ポリマーから作製した CC (CC-mods) はタンパク質への親和性が向上し、特に本研究で用いたタンパク質のうち BSA、GFP(-29)、IgG で封入効率が向上している。タンパク質封入 CC-mods は、プレコーティング法と組み合わせることにより細胞取り込み効率が改善され、マクロピノサイトー

シスが取り込み経路として大きく寄与することを明らかにしている。

第三に、エンドソームによる分解を避けるためのエンドソーム脱出のため、エンドソーム溶解ペプチドである L17E、E3MPH16、および A10L を CC に組み込んでいる。これらのペプチドは、エンドソームからの脱出を促進する異なるメカニズムを持っているが、タンパク質を封入した CC-mods と共送達した場合、3 つのペプチドすべてがタンパク質のエンドソーム脱出と細胞質分布を促進できることを見出している。特に A10L を用いた場合に、高いエンドソーム脱出能と低い細胞毒性を示すことを見出し、ペプチド濃度等の条件の最適化により、さらなる毒性低減にも成功している。

以上、要するに、本論文では、従来の CC の弱点であった低い細胞取り込み効率、低いタンパク質封入効率、低いエンドソーム脱出能、高い毒性などの問題点をそれぞれ解決することに挑戦し、それらを一定程度克服する手法を開発するに至っている。ここで得られた知見は、細胞レベルでの治療や細胞機能の制御に向けた応用に向けて新たな道を切り開いており、その価値は大きいと考えられ、機能組織化学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士（システム生命科学）の学位を受ける資格があるものと認める。