

微生物由来ポリカチオン性イソペクチドの細胞膜透過性に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2025-05-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 武内, 大和 メールアドレス: 所属:
URL	https://fpu.repo.nii.ac.jp/records/2000103

氏 名	武内 大和
-----	-------

(論文内容の要旨)

微生物は二次代謝産物として ϵ -poly-L- α -lysine (ϵ -P α L) や ϵ -oligo-L- β -lysine (ϵ -O β L) などのホモポリアミノ酸を生産する。それらホモポリアミノ酸の多くはポリカチオン性である。ポリカチオン性のペプチドは細胞膜透過性ペプチド (CPP) として知られ、優れた細胞内取り込み能力を有するため、ドラッグデリバリー分野で汎用されている。本研究では、 ϵ -P α L 及び ϵ -O β L が従来型の CPP と同様に細胞膜透過性を有すると仮定し、その検証を行った。第 1 章では ϵ -P α L の細胞膜透過性について、第 2 章では ϵ -O β L の細胞膜透過性について、第 3 章では ϵ -P α L の従来型 CPP の細胞膜直接透過促進効果について検証した。

【第 1 章 ϵ -P α L の細胞膜透過性に関する研究】

ϵ -P α L は非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) に分類される ϵ -P α L 合成酵素 (PIs) によって生合成されることが報告されている (*Nat. Chem. Biol.*, 4, 766-772, 2008)。PIs の基質特異性を応用し、クリックケミストリーに利用できる官能基を有する ϵ -P α L を微生物発酵法にて合成した。得られた ϵ -P α L-PEG-azide を蛍光色素、タンパク質/酵素、抗体に結合させた各 ϵ -P α L コンジュゲートの細胞内分布を解析した。その結果、 ϵ -P α L が優れた細胞膜透過性を示すとともに、 ϵ -P α L-タンパク質コンジュゲートが速やかに細胞内に送達され細胞内で機能発現することも確認した。驚くべきことに、150 kDa の抗体も ϵ -P α L とのコンジュゲートにすることで細胞内に移行することを明らかにした。

【第 2 章 ϵ -O β L の細胞膜透過性に関する研究】

streptothricin (ST) は ϵ -O β L 構造を有し、生物に対して毒性を示す。

その毒性は ϵ -O β L のペプチド鎖長が長くなることで増強されるため、 ϵ -O β L 構造が ϵ -P α L と同様に CPP として機能し、ST のコア構造を細胞内へ送達する構造モチーフであると予想した。 ϵ -O β L 構造は、NRPS によって生合成されることが報告されている (*Nat. Chem. Biol.*, 8, 791-797, 2012)。 ϵ -O β L 生合成酵素の基質特異性を応用し、クリックケミストリーに利用できる官能基を有する ϵ -O β L (ϵ -O β L-PEG-azide) を酵素合成した。 ϵ -O β L の細胞膜透過性を評価した結果、ペプチド鎖長が 4 残基以上で細胞膜透過性を示し、ST の細胞膜透過に ϵ -O β L が寄与することを証明した。

【第 3 章 ϵ -P α L-タンパク質コンジュゲートによる従来型 CPP-タンパク質コンジュゲートの細胞膜直接透過誘導】

また、従来型 CPP として汎用される octa-arginine ペプチド (R8) とタンパク質のコンジュゲートはエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれ、エンドソーム内にトラップされる。そのため、R8 によって細胞内へ輸送されたタンパク質はリソソームによって分解される可能性が高く、細胞内での機能発現は期待できない。興味深いことに CPP の過剰添加によってエンドソームからリリースされた例が報告されており、 ϵ -P α L またはその誘導体を共存させることで同様の効果が得られると期待した。 ϵ -P α L または ϵ -P α L-タンパク質コンジュゲートを R8-タンパク質コンジュゲートと共存させ、動物細胞に処理したところ、 ϵ -P α L-タンパク質コンジュゲートを共存させた時のみ、R8-タンパク質コンジュゲートは動物細胞の細胞膜を直接透過し、細胞質に拡散した。以上の結果から、 ϵ -P α L-タンパク質コンジュゲートにおいて、R8-タンパク質コンジュゲートを細胞内に直接送達させる促進剤としての機能を見出した。