

クモ毒を改良し抗体を細胞内へ輸送

—細胞は壊さず出入り口のみを開く分子の作製—

概要

抗体は体の中にウイルスなどの異物が入り込むと、その異物と結合し排除する役割を担うタンパク質です。私達の体は、どのような異物が侵入しても鍵と鍵穴のように特定の分子を認識してうまく結合する抗体を作り出し、ウイルスの侵入や増殖を防いでいます。抗体は高い認識能力と強い結合力という特長を活かし、特定の分子の解析など、生命科学研究の道具として盛んに利用されています。例えば、抗体を生きた細胞の中で働かせることができれば、細胞内の特定のタンパク質の分布の確認や生理活性の調節が可能になり、細胞内で特定のタンパク質が果たしている役割を詳しく知ることができます。ところが、抗体は分子サイズが大きいため単独で細胞の中に入ることができません。抗体を生きた細胞内で機能させるべく抗体を細胞内に導入するためにこれまでいくつかの手法が試みられてきましたが、効率性・汎用性の高い導入法は開発されておらず、生命科学研究の実験ツールとしての応用は難しいままでした。

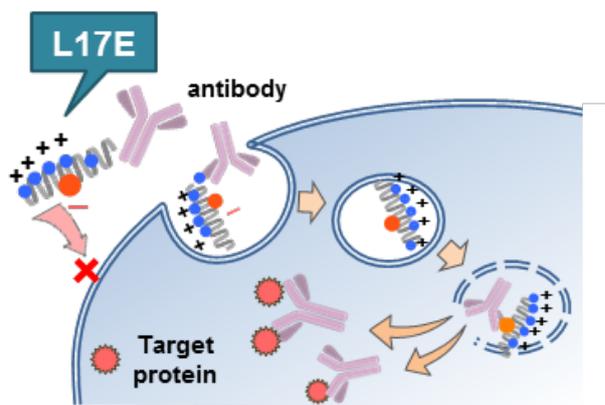
抗体のようなバイオ高分子の細胞内導入には、細胞自身の養分取りこみ作用「エンドサイトーシス」の利用が現実的です。この場合、抗体を細胞内へ運ぶには取りこみ小胞（以下、エンドソーム）から効果的に細胞内に放出されることが必要になります（図）。しかし、これまでの手法では放出効率が低く、抗体がリソソームという細胞内の器官に運ばれ分解されてしまい期待される効力を発揮できないという問題がありました。

抗体のようなバイオ高分子の細胞内導入には、細胞自身の養分取りこみ作用「エンドサイトーシス」の利用が現実的です。この場合、抗体を細胞内へ運ぶには取りこみ小胞（以下、エンドソーム）から効果的に細胞内に放出されることが必要になります（図）。しかし、これまでの手法では放出効率が低く、抗体がリソソームという細胞内の器官に運ばれ分解されてしまい期待される効力を発揮できないという問題がありました。

今回京都大学と大阪府立大学などの研究グループは細胞膜を不安定化する役割を持つクモ毒由来の溶血ペプチド ¹M-lycotoxin をもとに、エンドソームを効果的に不安定化するペプチド **L17E** を開発しました。M-lycotoxin は細胞膜の構造を強く乱し破壊する機能があります。今回の研究では M-lycotoxin のアミノ酸配列を一部置き換えることで、細胞膜自体は破壊せず、エンドソームの膜を効果的に不安定化させることに成功しました。この結果、抗体を効果的に細胞内へ放出することが可能となりました。このペプチドを用いて、細胞外から導入した抗体により、特定のタンパク質の細胞内での局在の可視化や、細胞内のタンパク質相互作用に基づく情報伝達を調節できることも示されました。

今回開発した方法は、細胞内の生理活性タンパク質の役割の解明を目的とした基礎研究のみならず、新しい医薬品や治療法の開発支援ツールという観点においても、非常に応用範囲が広いと考えられます。抗体はバイオ医薬品としても大きな注目を浴びていることから、本手法は細胞内のタンパク質を標的とする抗体医薬品を細胞内へ運ぶための新しい方法論の開発の端緒になるかも知れません。

論文は5月23日、*Nature Chemistry* に掲載されました。



図：クモ毒由来の溶血ペプチドを改変した画期的な細胞内抗体輸送ツール

¹ 少数のアミノ酸が結合した分子

1. 背景

抗体などのバイオ高分子の効率的な細胞内導入を達成する方法論の開発は、生命科学研究の進展のみならず、新しい医療・医薬品の開発における大きな貢献が期待できます。バイオ高分子を細胞内へ運ぶ戦略として、エンドソームを不安定化することで、エンドソームに捕捉されたバイオ高分子を細胞内に放出する手法が試みられてきましたが、細胞内でバイオ高分子を放出する効率が低いままでした。このような背景から、エンドソーム膜のみを不安定化し効率よく細胞内へ放出させる新規ペプチドの開発を行いました。

2. 研究手法・成果

バイオ高分子を細胞内に放出するためには、エンドソームの膜に強く作用し、これを不安定化する必要があります。そこで、今回の研究では強力に細胞膜を破壊する天然の溶血ペプチドに着目しました。細胞膜を破ることで細胞を死に至らしめるような強い膜傷害性をエンドソーム膜にのみ働くよう改良することで、効率的なバイオ高分子の輸送に使うことができると考えました。

クモ毒由来の溶血ペプチド M-lycotoxin を出発物質として、アミノ酸配列を改変したペプチドを設計し、性質の評価をしました。配列中の疎水性残基の一部を酸性のアミノ酸に置換することにより、野生型 M-lycotoxin が持つ強い細胞傷害性はみられなくなりました。さらに、L17E という変異体の 1 つが、細胞膜は破壊せずエンドソームからの物質放出のみを手助けすることもわかりました。

今回の研究では L17E ペプチドと導入したいタンパク質を混合し細胞に投与することで、タンパク質の活性を細胞内で発揮させることが出来ることを明らかにしています。特に、L17E ペプチドを用いることで、その大きさから導入が困難であった抗体を細胞内に導入し、細胞内分子の認識や細胞内分子の活性を阻害することに成功しました。また、細胞から分泌される小胞（エクソソーム）を薬物送達技術として利用する試みが積極的になされていますが、今回の方法によってエクソソームに内包されたタンパク質も効果的に細胞内に移送できることも示されました。

エンドソーム内部は低 pH となることが知られており、これまでのバイオ高分子輸送手法ではこの特徴を用いていました。一方、細胞内である程度成熟したエンドソームは負電荷を帯びた脂質が多く含まれることが近年明らかにされました。今回開発したペプチドは pH の差には反応せず、負電荷を帯びた膜にのみ作用する特徴を持っています。脂質の組成に反応しエンドソームに働きかけるペプチドはこれまであまり検討されていませんでした。この研究は、脂質組成変化に着目したエンドソーム不安定化ペプチドのデザイン戦略の有用性を示唆しており、細胞内への物質送達ツールの開発に新しい設計指針を与えられそうです。

3. 波及効果、今後の予定

今回開発したペプチドは、まず細胞内可視化や相互作用解析、細胞活性制御といった生命科学研究の基礎研究ツールとして活用できると考えられます。抗体に代表される特定の分子のみを認識するタンパク質を細胞内に輸送することで、小分子では特異的な認識が困難だった細胞内因子の阻害などが期待できます。導入したいタンパク質を改変する必要はなく、既存のタンパク質をそのまま用いて細胞機能を制御することができるため、非常に簡便な生命科学研究の実験ツールとして利用してもらえそうです。

創薬支援ツールとしては医薬品の細胞内標的の探索やバイオ医薬品・抗体医薬品等の細胞内活性評価といった応用にも有用でしょう。その中で細胞内に薬剤を送る効率の向上への利用も期待されます。

加えて、本研究では薬剤を輸送するための新たなコンセプトも提示できたと考えています。エンドソーム膜は酸性脂質を多く含有んでいます。酸性 pH 下で酸性脂質に選択的に作用するペプチドを網羅的に探索することで、新たなエンドソーム不安定化ペプチドの創出につながる可能性があります。

今回の成果をより多くの研究者に使用して貰うために、本ペプチドの市販化を検討しています。

※本研究で開発した技術は株式会社ペプチド研究所が実施許諾を受けています。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は JSPS 科学研究費補助金 (基盤研究(A): 15H02497、新学術領域研究(研究領域提案型) : 16H01145) の支援を受けました。また、関連特許には特願 2014-198741、PCT/JP2015/077395 があります。

<論文タイトルと著者>

タイトル : Cytosolic antibody delivery by lipid-sensitive endosomolytic peptide

著者 : Misao Akishiba, Toshihide Takeuchi, Yoshimasa Kawaguchi, Kentarou Sakamoto, Hao-Hsin Yu, Ikuhiko Nakase, Tomoka Takatani-Nakase, Fatemeh Madani, Astrid Gräslund, and Shiroh Futaki*

掲載誌 : *Nature Chemistry*