

2017年4月6日

報道関係者各位

慶應義塾大学

## タンパク質の細胞質送達を促進するヒト由来ペプチドを発見 ーバイオ医薬品の効率的な細胞内デリバリーにつながる成果ー

慶應義塾大学理工学部の土居信英教授らは、ヒト胎盤形成における細胞融合に関与するタンパク質であるシンシチン1の部分ペプチド（膜融合ペプチド；FP<sup>\*1</sup>）が、従来の細胞膜透過性ペプチド（CPP<sup>\*2</sup>）によるタンパク質の細胞質への送達効率を数十倍向上させることを発見しました。抗体などのタンパク質やもっと小さなペプチドからなる医薬品は究極の分子標的薬として注目されていますが、細胞膜透過性が低いという欠点がありました。今回、発見したヒト由来FPは、これらのバイオ医薬品を従来よりも効率よく細胞質に運ぶことが期待できるとともに、初めて見出されたヒト由来のFPであり免疫原性の懸念が少ないという利点もあります。本研究成果は2017年4月4日に国際学術誌「Journal of Controlled Release」オンライン版に掲載されました。

### 1. 本研究のポイント

- ・受精や胎盤形成における細胞膜融合プロセスに関与するヒト天然タンパク質の部分ペプチド（膜融合ペプチド）が、さまざまな高分子の人為的な膜透過を促進するためのツールとして利用できる可能性を提唱
- ・従来の細胞膜透過性ペプチドによるタンパク質の細胞質への送達効率を数十倍向上させることができ、かつ、免疫原性の懸念がないヒト・シンシチン1由来の膜融合ペプチドを発見
- ・細胞内抗体医薬や中分子（ペプチド、核酸）医薬のデリバリーシステムへの応用に期待

### 2. 研究背景

標的分子に対して高い特異性と親和性をもつ抗体、ペプチド、核酸などのバイオ医薬品は、従来の化学合成医薬品と比べて副作用の恐れが少なく治療効果が高い究極の分子標的薬として注目されていますが、細胞膜透過性が低いため、従来の抗体医薬品は細胞外の標的に作用するものばかりで、細胞内の疾患標的に作用させることは困難でした。これまでにHIV1由来の細胞膜透過性ペプチド（CPP）であるTATや、ポリアルギニンなどのCPPを利用して抗体などのタンパク質を細胞質に送達させる研究が行われてきましたが、エンドサイトーシス<sup>\*3</sup>で細胞内に取り込まれた後、エンドソームから膜透過して細胞質に離脱する効率が低いことが課題となっていました（図1上）。この効率を上げるために、インフルエンザウイルス由来のHA2などの膜融合ペプチド（FP）を組み合わせることでCPPによる膜透過を促進できる例も報告されていましたが（図1下）、それでも効率は十分とはいえませんでした。昨年、我々はウニの受精に関与するバインディンというタンパク質の部分ペプチドが、融合したタンパク質や共添加した抗体、酵素、核酸などの高分子の細胞内送達を促進できることを発見しました（J. Control. Release 212, 85-93, 2015）。しかし、これらのペプチドはヒト由来ではないため、医薬品に応用する場合は免疫原性の懸念がありました。

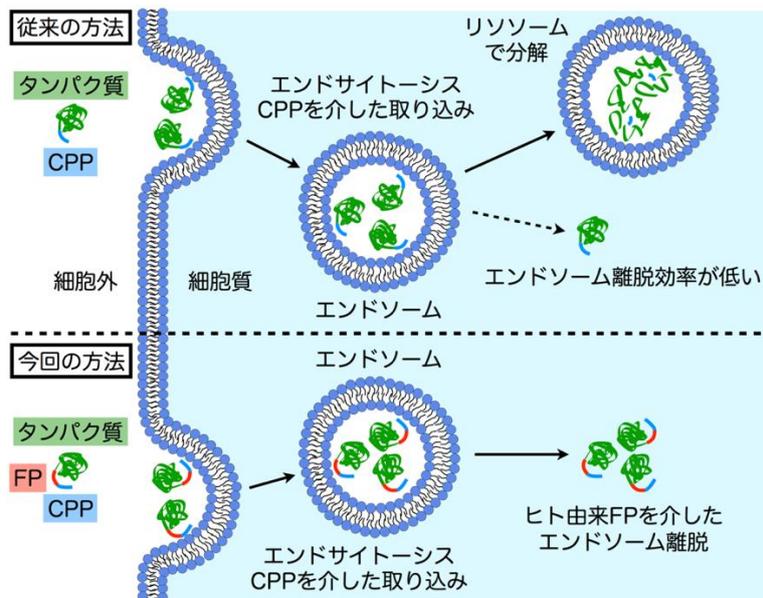


図1 細胞膜透過性ペプチド (CPP) および膜融合ペプチド (FP) によるタンパク質の細胞質送達

### 3. 研究内容・成果

そこで今回我々は、ヒトの受精に関与することが知られていた IZUMO1 およびヒト胎盤形成における細胞融合に関与するシンシチン1 というタンパク質の中から (図2 a)、人工的な膜透過促進ペプチドとして機能し得る部分ペプチドを探索しました。具体的には、様々なサイズのヒト由来 FP 候補ペプチドを CPP である TAT とともに蛍光タンパク質 eGFP に融合し、タンパク質を大腸菌で大量発現・精製して (図2 b)、ヒト培養細胞に添加しました。その後、タンパク質の細胞内への取り込みを蛍光顕微鏡で観察した結果、特に、シンシチン1 の19アミノ酸残基のペプチド (S19 と命名) を融合した場合に、高い取り込みが観察されました (図2 c)。このとき、ヒト培養細胞の増殖や生存には影響がありませんでした。細胞質に送達した分子数を正確に定量するために、核移行配列を融合したタンパク質を調製し、取り込み後、核まで運ばれた融合タンパク質を定量したところ、細胞質送達の効率が数十倍向上していることが分かりました (図2 d)。さらに、S19 の効果は、様々なヒト培養細胞に対して、eGFP 以外のタンパク質を融合した場合にも観察されました。

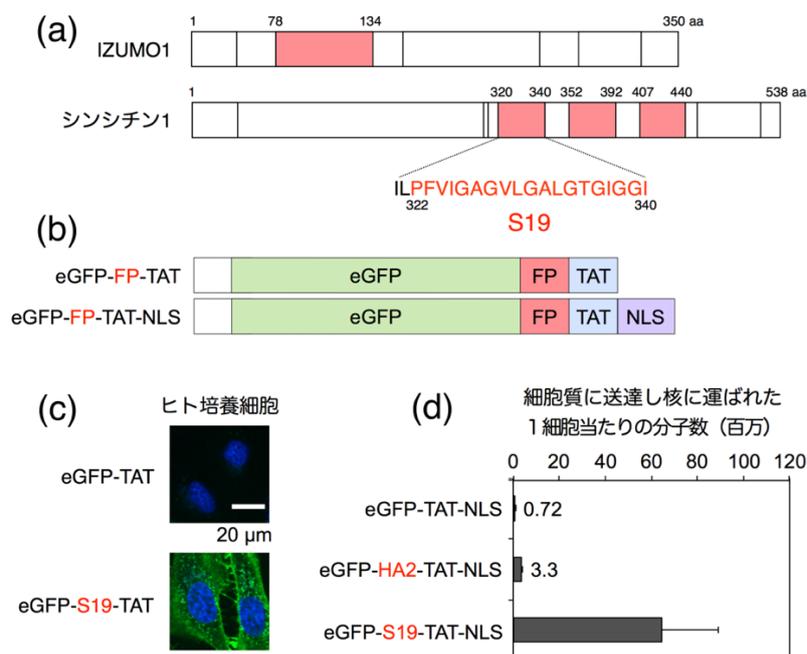


図2 (a) ヒト由来 FP 候補領域 (赤色) と最適化された S19 のアミノ酸配列。(b) FP 融合タンパク質。eGFP は蛍光タンパク質、TAT は CPP、NLS は核移行配列を示す。(c) S19 を融合すると効率よく eGFP (緑色) はヒト培養細胞に取り込まれる。(d) 細胞質に送達した融合タンパク質のみが NLS により核まで運ばれるので、核に含まれる分子数をカウントすることで細胞質送達分子数の下限を推定できる。S19 は FP がいない場合よりも約 90 倍、従来の FP である HA2 よりも約 20 倍高い細胞質送達効率を示した。

#### 4. 今後の展開

本研究により、新たに発見したヒト由来の FP が、CPP とともに連結した様々なタンパク質の細胞質送達効率を向上させることが示されました。従来の CPP はタンパク質だけではなく siRNA などの核酸医薬の細胞質送達にも応用されており、今回発見したヒト由来 FP を融合することで、核酸の細胞質送達の効率をさらに向上させることも期待できます。また、ヒト由来 FP を細胞表面マーカーに対する抗体と組み合わせることで、様々なバイオ医薬品を細胞選択的に運ぶ技術への応用も目指しています。

##### <原論文情報>

掲載誌 : Journal of Controlled Release

論文タイトル : Human-derived fusogenic peptides for the intracellular delivery of proteins

著者 : Kei Sudo, Keisuke Niikura, Kouta Iwaki, Shunshi Kohyama, Kei Fujiwara, Nobuhide Doi

DOI : 10.1016/j.jconrel.2017.03.398

##### <用語説明>

※1 膜融合ペプチド (FP) : インフルエンザウイルスの膜表面にあるヘマグルチニンというタンパク質の部分ペプチド HA2 が有名。ウイルス膜が宿主の細胞膜と融合するために必要で、疎水性アミノ酸や負電荷のアミノ酸を多く含む傾向があり、酸性 pH でコンフォメーションが変化して膜を不安定化するとされているが、例外もある。

※2 細胞膜透過性ペプチド (CPP) : タンパク質や核酸など様々な生体高分子に連結することで、それらのヒト細胞内への取り込みを促進するペプチド。HIV1 由来の TAT やポリアルギニンなど、正電荷をもつアミノ酸を多く含み、細胞膜の負電荷と相互作用して、主にエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれると考えられている。

※3 エンドサイトーシス : 細胞が細胞外の物質を取り込む過程の 1 つであり、細胞膜が内側に陥入して、細胞外分子を取り込んだ小胞を形成する。この小胞はエンドソームと呼ばれる小胞と融合した後、リソソームと融合して取り込んだ分子が消化される。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、各社科学部等に送信させていただいております。

##### ・研究内容についてのお問い合わせ先

慶應義塾大学 理工学部 生命情報学科 教授 土居 信英 (どい のぶひで)

TEL : 045-566-1772 FAX : 045-566-1440 E-mail : doi@bio.keio.ac.jp

##### ・本リリースの配信元

慶應義塾広報室 (竹内)

TEL : 03-5427-1541 FAX : 03-5441-7640

Email : m-koho@adst.keio.ac.jp http://www.keio.ac.jp/