

2022年11月1日

報道関係者各位

慶應義塾大学

ヒト由来膜透過促進ペプチドによって短鎖干渉 RNA を簡単に早く細胞質に送達 ー核酸医薬品の新たなデリバリーシステムの開発に期待ー

慶應義塾大学工学部の土居信英教授らの研究グループは、独自の膜透過促進ペプチドを連結したアルゴノート 2(Ago2)タンパク質を用いて、短鎖干渉 RNA(siRNA) ^{※1} を簡便かつ迅速に細胞質に送達して標的遺伝子を分解(ノックダウン)することに成功しました。siRNA は、さまざまな疾患の原因となる遺伝子の mRNA を分解する核酸医薬としても注目されていますが、従来法で siRNA を細胞質に送達しても細胞質における siRNA と Ago2 との複合体形成が律速となってノックダウン効率が低くなるなどの課題がありました。今回開発した膜透過性 Ago2/siRNA 複合体を用いることで、従来法よりも優れた新たな siRNA 医薬のデリバリーシステムの開発に道を拓くことが期待できます。

本研究成果は 2022 年 10 月 27 日に英国の科学雑誌『*Journal of Nanobiotechnology*』オンライン版に掲載されました。

1. 本研究のポイント

- ・独自のヒト由来膜透過促進ペプチド^{※2}を連結した RNA 結合タンパク質をキャリア(運び屋)として、標的遺伝子に対する siRNA と結合させ、ヒト培養細胞に添加するだけで、他の高価な試薬を一切使用することなく、siRNA を細胞質に送達して標的 mRNA を分解することに成功
- ・特にキャリアとして、siRNA と複合体を形成して標的 mRNA を分解するのに必要なタンパク質である Ago2 を用いることで、従来法よりも迅速に細胞質の標的 mRNA を分解できることを確認
- ・siRNA からなる核酸医薬の新たなデリバリーシステムの開発に期待

2. 研究背景

2006 年のノーベル生理学・医学賞の対象となった RNA 干渉(RNAi)は、標的遺伝子の一部と相補的な配列をもつ短い RNA によって標的遺伝子の発現を抑制する生命現象です。短鎖干渉 RNA(siRNA)は特定の遺伝子の mRNA を分解したときの表現型を観察することで、その遺伝子の機能を推定する基礎研究に欠かせないツールとして広く利用されています。細胞質に導入された siRNA は、アルゴノート 2(Ago2)^{※3}と呼ばれるタンパク質と複合体を形成することで標的遺伝子の mRNA を分解します(図 1 左)。近年、siRNA は、疾患原因遺伝子の mRNA を分解する核酸医薬としての利用も注目されていますが、従来の siRNA 医薬のデリバリーに用いられている脂質ナノ粒子やリガンドコンジュゲートでは、①主な送達先が肝臓の細胞に限られること、②エンドサイトーシス^{※4}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、③siRNA を細胞質に送達させても、siRNA と Ago2 との複合体形成が律速となり、ノックダウン効率が低くなりやすいこと(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, E2696, 2018)などが課題となっていました。

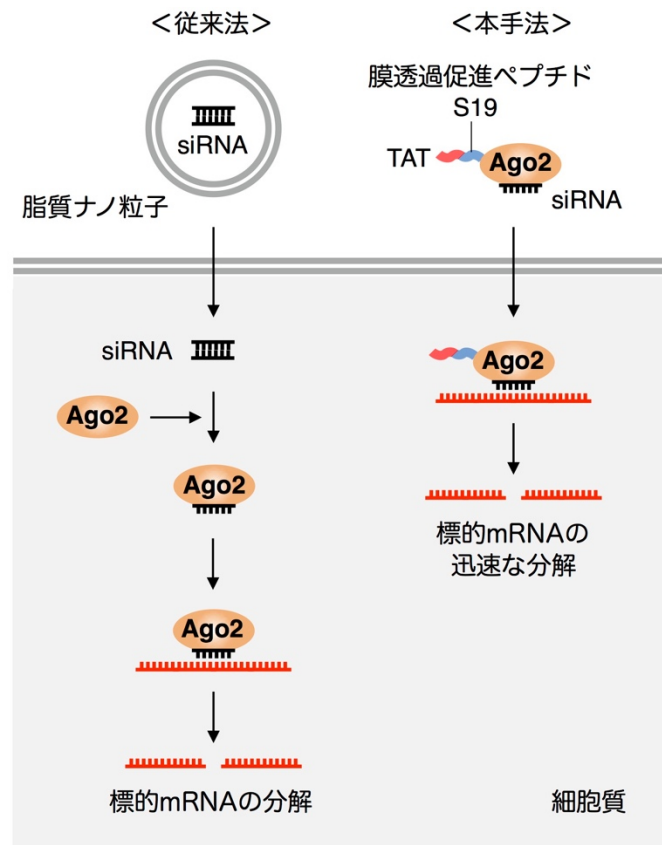


図1 siRNAの細胞質へのデリバリー

3. 研究内容・成果

そこで今回本研究グループは、上記の課題を克服するために、以前本研究グループが発見したヒト由来膜透過促進ペプチドの1つであるS19(*J. Control. Release* 255, 1-11, 2017)をsiRNAの細胞質デリバリーに応用することにしました。

まず、膜透過促進ペプチドS19と細胞透過性ペプチドTATを連結したRNA結合タンパク質を大腸菌で大量発現・精製し、蛍光標識siRNAと結合させた複合体をヒト培養細胞に添加しました。その後、siRNAの細胞内への取り込みを蛍光顕微鏡で観察し、細胞内の標的mRNAを定量した結果、S19を連結していない場合と比べて高い細胞内取り込みとノックダウン効率を確認できました。このときsiRNAとの結合力が異なる2種類のRNA結合タンパク質を用いて比較したところ、siRNAと強く結合するキャリア(運び屋)タンパク質を用いた場合のほうが細胞内取り込みは高いが、逆にsiRNAがキャリアタンパク質から離れにくいとAgo2との複合体を形成しにくくなるためノックダウン効率は低くなってしまったというジレンマが生じました。この問題はAgo2自身をキャリアとして用いることで解決するのではないかと考えました(図1右)。

そこで次に、S19とTAT(またはTATのみ)を連結したAgo2を昆虫細胞で大量発現・精製し、同様の実験をおこなったところ、やはりS19を連結していないTAT-Ago2を用いた場合と比べてTAT-S19-Ago2を用いると高い細胞内取り込みとノックダウン効率を確認できたことから、S19がおそらくエンドソーム離脱を促進することでsiRNAの細胞質デリバリーを促進していることが確認できました。さらに、脂質を用いてsiRNAのみを送達する従来法と比べて、TAT-S19-Ago2とsiRNAとの複合体のみを添加したほうが短時間で効率的な分解を実現できました。

4. 今後の展開

本研究により、独自のヒト由来膜透過促進ペプチドを連結したAgo2をキャリアとして用いることで、他の高価な試薬を一切使用することなく、siRNAを簡便かつ迅速に細胞質に送達できることが示

されました。最近、ヒト由来膜透過促進ペプチド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、バイオ医薬品の細胞選択的なデリバリーにも応用できることが示されており(*J. Biol. Chem.* 298, 102097, 2022)、将来的には siRNA 医薬を肝臓以外の組織・細胞に効率よく送達できる新たなデリバリーシステムに発展させることも期待できます。

<原論文情報>

タイトル (和訳) : Cytoplasmic delivery of siRNA using human-derived membrane penetration-enhancing peptide(ヒト由来膜透過促進ペプチドによる短鎖干渉 RNA の細胞質デリバリー)

著者名 : 中村 桃子、藤原 慶、土居 信英

掲載誌 : *Journal of Nanobiotechnology* (DOI : 10.1186/s12951-022-01667-4)

<用語説明>

※1 短鎖干渉 RNA (siRNA) : RNA 干渉により標的 mRNA の配列特異的な切断を引き起こす。細胞内では長い前駆体二本鎖 RNA として合成され、細胞質で Dicer というタンパク質によって 21~23 塩基の小さな二本鎖 siRNA に短縮され、その後、一本鎖 siRNA を含む RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) が形成され、標的 mRNA を相補的な領域で切断する。低分子干渉 RNA ともいう。

※2 ヒト由来膜透過促進ペプチド : 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 の部分ペプチドであり、TAT など従来の細胞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。

※3 アルゴノート 2 (Ago2) : 上記 RISC の複合体形成には多くのタンパク質が関与することが知られているが、Ago2 はその中の必須構成タンパク質であり、RISC の核となる siRNA と Ago2 との複合体は最小 RISC と呼ばれる。

※4 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 E-mail : doi@bio.keio.ac.jp

・本リリースの配信元

慶應義塾広報室 (望月)

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

E-mail : m-pr@adst.keio.ac.jp <https://www.keio.ac.jp/>