

課題名： 両親媒性ペプチドを用いた革新的細胞核内物質導入技術の開発

氏名： 吉村成弘

機関名： 京都大学

1. 研究の背景

人間や動物の細胞内では、その設計図である遺伝子は「核」という膜で囲まれた入れ物に閉じこめられています。難病治療等に大きな期待が寄せられている「遺伝子治療」や「ドラッグデリバリー」技術では、細胞の外から核の中まで新しい遺伝子や様々な物質を運ばねばなりません。しかし、核には入り口が少ないため、効率よくものを運び込む技術は未だに確立されていません。

2. 研究の目標

本研究者はこれまでに、細胞が本来持っているタンパク質の中で核の中に運搬されるものに着目し、解析することで、タンパク質が核内へ移動するのに必要な性質を同定・抽出することに成功しました。本研究課題では、この知見に基づき、細胞が本来持つ核内への運搬メカニズムを抽出、改変、統合することにより、遺伝子や薬剤を細胞の外から核の中へ高い効率で運搬するための新しい技術を確立します。

3. 研究の特色

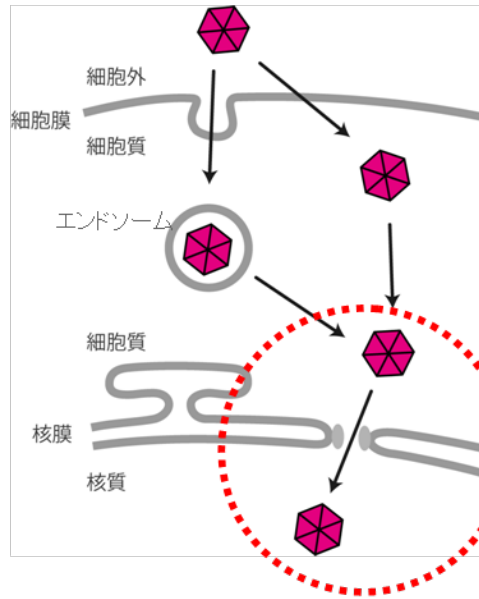
- ・高い安全性：細胞が本来持っているタンパク質の性質を利用
- ・高い簡便性：合成、改変、修飾が容易なタンパク質の小さい断片を利用
- ・高い有用性：細胞の外から核の中までの統合的運搬技術を開発

4. 将来的に期待される効果や応用分野

- ・細胞レベル、実験室レベルでの革新的物質導入技術の確立
- ・組織、個体レベルでの遺伝子治療や薬剤治療における、安全でかつ効率の高い物質導入技術の確立

研究の背景:

細胞核には細胞活動及び遺伝情報の担い手であるDNAが収められている。核内での多様な反応を制御するには、細胞質からの物質輸送が重要な役割を担っている。核は核膜により囲まれているため、細胞質と核との物質移動は核膜孔複合体を通して行われる。近年の研究により、遺伝子やその他の高分子を高い効率で細胞外から細胞内に運搬し、その機能を安定して発揮することができるようになった(第1、第2の障壁)(右図)。しかしながら、細胞質からさらに一步進んで核内へ物質を導入させる場合、核膜というさらに大きな障壁にぶつかることになる(第3の障壁)。核内への遺伝子導入や核内のタンパク質をターゲットとしたドラッグデリバリーにおいては、この核膜が大きな障壁となり、導入効率を著しく低下させていることが知られている。



第1の障壁

細胞膜の通過、細胞の選択性
エンドソームへの取り込み

脂質、糖、デンドリマー、カチオン性ポリマー
膜透過性ペプチド

第2の障壁

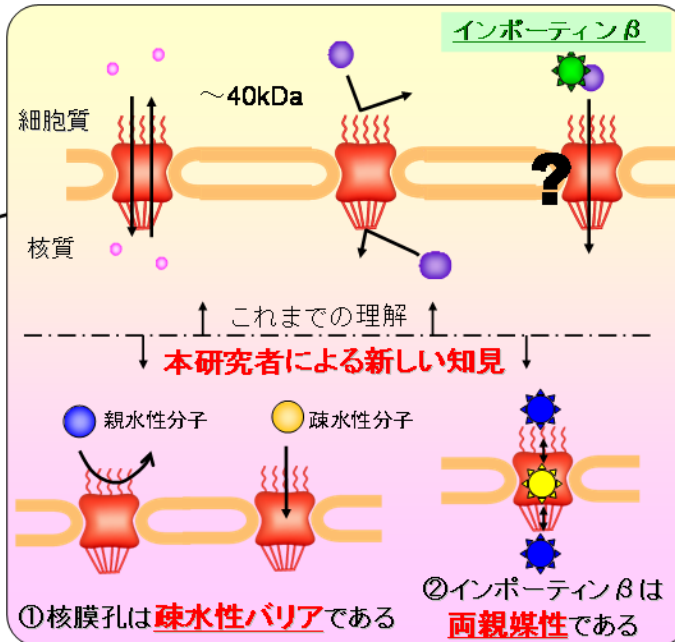
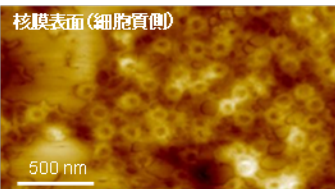
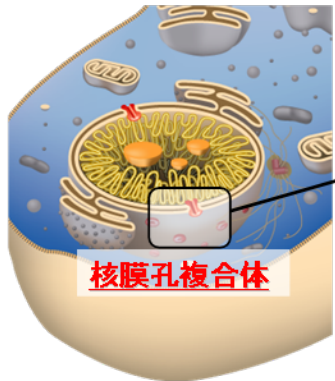
細胞質への脱出、細胞質での安定性

カチオン性ポリマー、pH応答性ポリマー
ウイルス由来ペプチド (H2A, GALA)

第3の障壁

核膜孔の通過

核移行シグナル(NLS)ペプチド
ウイルス由来タンパク質

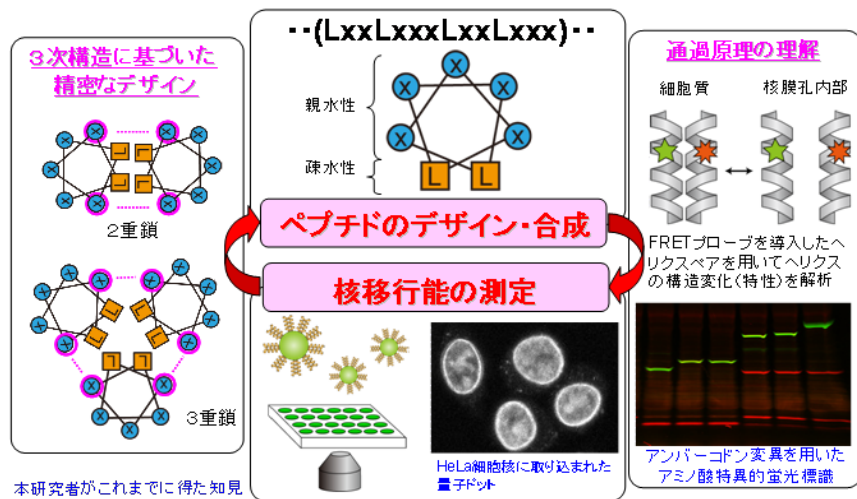


これまでの成果:

・核膜孔内部は疎水性アミノ酸に富む疎水的環境である。核膜孔を構成するサブユニットは疎水性アミノ酸(フェニルアラニンやロイシン)に富んでおり、細胞質に比べると高度に疎水的な環境である。当研究グループは、核膜孔が従来提唱されていた分子サイズのバリアであるだけでなく、疎水性のバリアとして機能している(左図)ことを世界に先駆けて提唱した。

・核膜孔を通過するタンパク質は、親・疎水性によって篩い分けられる。タンパク質の疎水性とその核膜孔通過能との間には明確な相関関係が存在する。核輸送因子であるインポーチンβは両親媒性αヘリクスを多数有し、親水性と疎水性とをともに示すタンパク質である。当研究グループはインポーチンβの両親媒性構造に着目することで、その核膜孔通過原理を世界に先駆けて解明した(左図)。

I : 高い核移行能を有する両親媒性ペプチドの設計・最適化・通過原理の理解



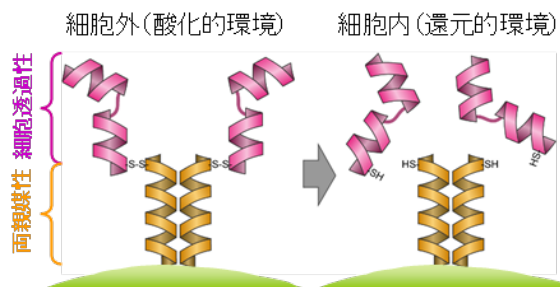
・両親媒性ナノペプチドの設計・最適化

本研究者はこれまでに天然に存在するタンパク質中に含まれる両親媒性コイルドコイル領域が核膜孔通過に有効であることを見出している。ここでは、そのアミノ酸配列(30-50残基)を側鎖の性質や3次元構造に基づいて改変したペプチドライブラリを構築し、より高い効率で核膜孔を通過するペプチドを探索する。また、非天然アミノ酸等を用いて側鎖を修飾し、構造および機能の多様化をめざす(左図)。

・核内移行原理の基本的理解

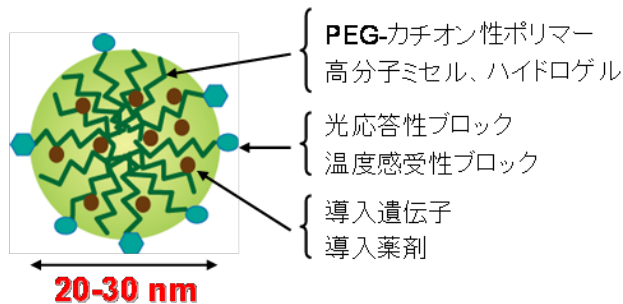
両親媒性ペプチドが核膜孔を通過する原理を理解するために、ペプチドの高次構造変化をリアルタイムで検出するFRETシステムを構築する(左図)。

II : 細胞膜通過および細胞選択性モジュールの付加および検討



核膜孔通過モジュールに加え、細胞外から細胞内への取り込みを促進させるためのモジュールを付加する。ここでは、これまでに研究が行われてきた膜透過性ペプチドを両親媒性ペプチドに付加し、核移行能を維持したまま、さらに細胞内への取り込み効率を上昇させる。また、特定の細胞をターゲットとした物質導入技術確立のためのモジュール導入を検討する。特に、これまでに報告されている葉酸やEGF等を両親媒性モジュールに結合させ、癌細胞等をターゲットとした技術の確立に取り組む。

III : 輸送物質の封入・放出技術の統合とシステム構築、実用化



・輸送物質を封入したナノ粒子の作成とナノコンポジットカプセルの構築

核膜孔を通過する物質の物理的サイズの上限は約40 nm程度と考えられている。ここでは、様々なポリマー材料を用いて輸送物質を封入したナノ粒子を作成し、これを両親媒性ペプチドで外包することで多機能性ナノコンポジットカプセルを構築する。

・封入物質の核内放出メカニズムの探索と実用化に向けたシステム統合

温度感受性高分子や光応答性物質を用いて封入物質をカプセルから放出するためのメカニズムを探索し、統合する。また、これまでの項目で得られた成果を統合し、細胞外から核内までの統合的システムを構築すると共に、実用化にむけた検討を行う。