

D316

酵素を用いたカチオン性合成分子修飾による蛋白質の細胞内導入

(東大院工)○(学)石原 亘・(正)山口 哲志・(正)平川 秀彦・(正)長棟 輝行*

【緒言】 近年、体細胞からの iPS 細胞の創製など、遺伝子導入による細胞機能の人為的な変換技術が再生医工学において注目されている。しかし、遺伝子導入による細胞機能の変換プロセスでは、遺伝子発現量や発現時期の厳密な制御が困難であり、変換プロセスの最適化が難しい。そこで、目的遺伝子の代わりに、その遺伝子の発現産物である蛋白質を直接細胞に導入し、細胞機能を制御する技術が注目されている。

本研究室では、ペプチド転移酵素である SortaseA (SrtA)を用いた人工分子の部位特異的修飾技術の開発を行ってきた。SrtA は、認識配列 LPETG の T と G の間を切断し、そこに GG 末端をもつ別のペプチド、あるいは蛋白質を連結する反応を触媒する。そこで、SrtA を用いて脱エンドソーム機能を有する細胞膜透過性分子を蛋白質へ部位特異的に修飾し、目的蛋白質を失活させずに効率良く細胞内に導入する方法の確立を目指して研究を行った(Fig. 1)。

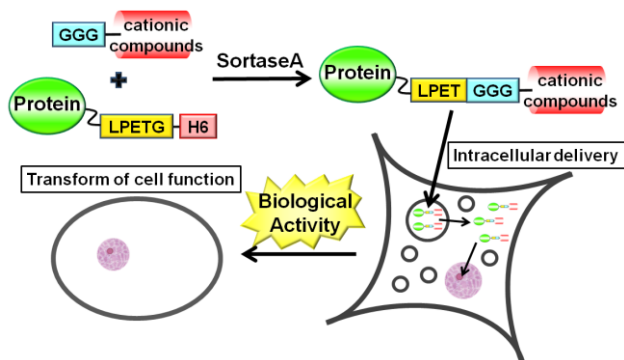


Fig. 1 本研究の概略図

【実験方法】 モデル蛋白質として緑色蛍光蛋白質 (EGFP) を選択し、遺伝子工学的に C 末端に SrtA の認識配列である LPETG 配列と His-tag とを付加した EGFP-LPETG-H6 を大腸菌を宿主として発現した。次に、C 末端側に細胞膜透過性分子を修飾したトリグリシンを合成した。細胞膜透過性分子として、①R9 ペプチド、②Alexa Fluor 546(AF546)修飾 R9 ペプチド、③カチオン性ポリマー(poly(Asp(DET)))を用いた。SrtA を用いて 37°C で 4 時間連結反応を行った。His-tag が付加されている SrtA 及び副産物は His-tag 精製を利用して除去した。

細胞膜透過性分子を連結した EGFP の PBS 溶液 (~20 μM) を HeLa 細胞培養ディッシュに添加し、37°C で静置して細胞内に導入した。PBS で洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡観察により、EGFP の導入を確認した。また、ピレンブチレートを用いる場合は、

ピレンブチレートを添加し、2 分間インキュベートした後、R9 連結 EGFP を添加した。

【結果及び考察】 SrtA を用いて細胞膜透過性分子を EGFP-LPETG-H6 に連結し、Ni キレートカラムによって精製した。連結反応が進行した EGFP は、His-tag が切断されるので、Ni キレート樹脂に吸着されない。実際に、連結反応後、未吸着画分に EGFP が回収され(Fig. 2)、MALDI-TOF MS 測定により、細胞膜透過性分子が連結されたことが確認された。

まず、R9 ペプチドを連結した EGFP の細胞内への導入を試みたところ、ポリアルギニン配列を遺伝子工学的に付加した既報と同様に、エンドサイトーシス経路で細胞内に導入されることが確認された(Fig. 3A)。また、ピレンブチレートの併用によって、細胞質内に導入できることも確認できた(Fig. 3B)。遺伝子工学的なポリアルギニンの付加に伴う発現量の低下や、フォールディングの阻害がおこる蛋白質に対して、SrtA を用いた連結法は、細胞内導入の有効な手段になると考えられる。

次に、脱エンドソーム機能が報告されている poly(Asp(DET))ポリマーを連結した EGFP の導入も試みたところ、重合度 15 以下のポリマーでは、細胞内への導入が確認できなかった。本発表では、同じく脱エンドソーム機能が報告されている AF546 修飾 R9 ペプチドを連結した結果と併せて詳細に報告する。

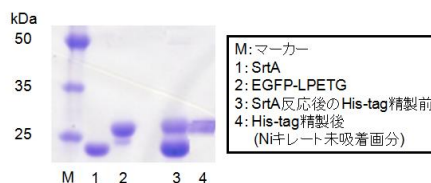


Fig. 2 SrtA 反応後の SDS-PAGE 解析結果

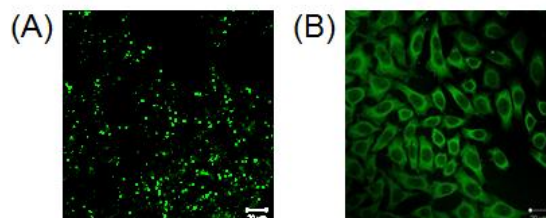


Fig. 3 R9 連結 EGFP 導入後の共焦点レーザー顕微鏡画像 (ピレンブチレート: 0 μM(A), 50 μM(B))

【結言】 蛋白質に LPETG 配列を付加して発現させることで、SrtA によって簡便に細胞膜透過性分子を連結でき、細胞内へ導入できることが分かった。

*Tel: 03-5841-7356, E-mail: nagamune@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp