



Photosensitizer and polycationic peptide-labeled streptavidin as a nano-carrier for light-controlled protein transduction

光増感剤・ポリカチオン性ペプチド修飾ストレプトアビジンの
光応答性タンパク質導入キャリアとしての利用

(JBB, Vol. 120, No. 6, 630–636, 2016)

南畑 孝介¹・前田 泰一²・山口 哲志³・石原 亘²
石渡 晟²・高森 智史²・山平 真也²・長棟 輝行^{2*}

細胞に対して、DNAやタンパク質を導入することで、細胞の生死、分化挙動などの、いわゆる細胞の運命制御が可能となる。一般的には、導入する分子としてDNAが選択され、ウイルスベクター法などを用いて細胞内に導入されるが、転写ならびに翻訳の過程を経るため、導入したDNAが機能発現するタイミングを制御することは困難である。一方、転写翻訳産物であるタンパク質を時空間的に制御して細胞内に導入できれば、タンパク質が細胞に与える影響を詳細かつリアルタイムにて解析可能になるなど、さまざまな有用な知見が生まれ得ると期待される。しかし、巨大な親水性分子であるタンパク質は、そのままでは細胞膜を透過できない。これまでに、タンパク質をカチオン性ポリマー¹⁾や細胞膜透過性ペプチド(CPP)²⁾と複合化させ、エンドサイトーシス経路を介して導入する技術などが開発されてきたが、導入後のタンパク質をエンドソーム内から細胞質へと脱出させなければ、分解され、十分な機能が発揮されない。プロトンスポンジ効果などのエンドソーム脱出機構を有するキャリアも多数報告されているが、その多くは脱出のタイミングを制御可能なものではない³⁾。このように、時空間的に制御されたタンパク質の細胞内導入には多くの課題があった。

そこで我々は、光増感剤およびCPPで修飾したストレプトアビジン(SA)を細胞内導入用のキャリアとして用い、タンパク質導入を時空間的に制御できるシステムの構築を目的とした。光増感剤とは光照射により励起状態となり、周辺の酸素へエネルギー移動を起こすことで活性酸素種(ROS)を発生させる化合物である。ROSは、エンドソーム膜を破壊することが知られており、エンドソーム脱出機構として利用できる⁴⁾。一方、CPPによるタンパク質の細胞内導入法は、CPPとの複合化により対象タンパク質に十分なカチオン性を付与できない場合、細胞内への導入効率が低下する。そこで四つのビオチン結合部位を有するSA四量体を足場にCPPを複数集積させることで強カチオン性のナノキャリアと

し、空いたビオチン結合部位に対象タンパク質を担持させた。「光」は照射位置、量、タイミングの制御が厳密に可能な外部刺激であり、上述の光増感剤・CPP修飾SAナノキャリアと光照射を組み合わせることで細胞内へのタンパク質導入とエンドソームからの脱出を時空間的に制御できると考えた。

光増感剤としてAlexa Fluor 546 (AF546)を、CPPとしてポリアルギニン(R₁₅)、モデル対象タンパク質としてチオレドキシニン-EGFPキメラ(tEGFP)を選択した。SAにビオチンを介してAF546標識CPPを修飾することで、HeLa細胞内にSAが高効率に取り込まれ、光照射前には細胞内のエンドソームに局在して顆粒状に見えていたAF546の蛍光が、光照射後において細胞質全体に広がる様子を確認した。さらに、ビオチン化tEGFPとAF546標識CPPを1:3のモル比でSA上に集積させることで、比較的大きな負電荷を有するtEGFPを光照射に応じて細胞質内に導入できた。R₉をCPPとして用いた場合や、SAに対するCPPのモル比が2以下の場合、さらにtEGFPとCPPを遺伝子工学的に融合した場合には、細胞内へのタンパク質取り込みが十分に達成できなかったことから、SA上でCPPを集積化させ、強カチオン性ナノキャリアとする意義も実証できた。

画像データを用いて定量的に系を実証するためには、コントラストが高い観察結果を再現性良く得る必要があり、数多くのコントロール実験とともに、幾度もの最適化が必要であった。しかし、その過程においてタンパク質導入時に必要とされる条件が次第に明らかにされ、本系の完成度は高められた。今後、分化誘導に関わるタンパク質を細胞内に導入し、分化に至る過程を詳細に解析するなど広範な研究に用いられることが期待される。

- 1) Futami, J. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 95 (2005).
- 2) Pack, D.W. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **67**, 217 (2000).
- 3) Berg, K. *et al.*: *Cancer Res.*, **59**, 1180 (1999).
- 4) Matsushita, M. *et al.*: *FEBS Lett.*, **572**, 221 (2004).

* 著者紹介 東京大学大学院工学系研究科 (教授) E-mail: nagamune@bio.t.u-tokyo.ac.jp

¹東京大学大学院工学系研究科 (現、九州大学大学院工学研究院 (特任助教))

²東京大学大学院工学系研究科、³東京大学先端科学技術研究センター