

## 論文の内容の要旨

論文題目 Design of Molecular Glues for Non-covalent Chemical Modification of Biomacromolecules  
(生体高分子の非共有結合的化学修飾を可能にするモレキュラーグルーの開拓)

氏名 大黒 耕

### 【1】緒言

生命現象の分子レベルでの解明が進み、様々な生体高分子の役割が明らかにされてきた。これに伴い、化学・生命科学分野での中心的課題は「いかに生体高分子の機能を制御するか」へと推移しており、生体高分子、とりわけ多様な生体反応の担い手であるタンパク質をベースとした新しい機能性分子の開発に注目が集まっている。有機化学反応を基盤とした生体分子修飾は、この目的を達成するための極めて有力な手段であるが、共有結合形成の足場となる官能基の有無、立体的な制約、反応性などの問題をクリアしなければならず、同時に遺伝子工学的手法を必要とするケースも少なくない。一方、非共有結合的な生体高分子の化学修飾は、抗原-抗体やレセプター-リガンドなどを利用した手法が広く展開されているものの、標的とする生体高分子に対しては前述の共有結合法、あるいは遺伝子工学的手法に依拠しており、汎用性の面で十分ではない。

本研究では、生体高分子が普遍的に有しているオキシアニオン性官能基を標的とし、これらと塩橋形成を介して強く相互作用するグアニジン(グアニジニウムイオン)を利用することで、生体高分子の非共有結合的化学修飾を可能にする汎用的方法論を開拓することに焦点を置いた。生理的条件下においても十分に強固な結合を実現する戦略として多点相互作用の利用を考え、グアニジニウム基を末端に有する水溶性 dendrimer を設計した(Figure 1)。この dendrimer は柔軟なトリエチレングリコール鎖を骨格にもつため、標的とする生体高分子表面に応じて自在に接着できる、分子の糊として働く。また、この dendrimer のフォーカルコアには多様な機能団を導入することができるため、目的に応じた機能拡張を極めて容易に行うことが可能である。

### 【2】ホモロピックな接着による微小管の安定化

モレキュラーグルーの接着作用がタンパク質会合体に及ぼす影響を調べるため、 $\alpha$ ,  $\beta$ -チューブリンヘテロ二量体の巨大会合体である微小管を標的とした。 $\alpha$ ,  $\beta$ -チューブリン二量体は GTP 存在下で温度依存的な重合・脱重合挙動を示し、37 °C ではチューブ状の微小管に重合し、15 °C では

モノマーユニットである $\alpha$ ,  $\beta$ チューブリン二量体へと脱重合する。このチューブリンの重合・脱重合は 340 nm の散乱光強度から評価することができる。GTP(1 mM)存在下、チューブリン二量体(2.5 mg/mL)を 37 °C でインキュベートして得た微小管を 15 °C に冷却すると速やかに脱重合する(Figure 2b, square)。一方、モレキュラーグルー(Glue-OMe; 100  $\cdot$ M)を添加した微小管は、冷却後もほとんど散乱強度が現象しないことが明らかとなった(Figure 2b, triangle)。これは微小管安定化剤として広く知られるパクリタキセル(100  $\cdot$ M; Figure 2b, circle)と同様の結果であり、また、接着能力の低い Glue<sup>GO</sup>-OMe (3つのグアニジニウム基をもつ第0世代 dendrimer; 300  $\cdot$ M)では、このような散乱光強度の維持は確認されなかった(Figure 2b, diamond)。Glue-OMe を添加したサンプルを透過型電子顕微鏡(TEM)で観察した結果、チューブ状の構造体が確認でき、モレキュラーグルーが微小管構造を脱重合に対して安定化させる機能をもつことが示された(Figure 2c)。

### 【3】ヘテロロピックな接着によるアクトミオシンの滑り運動制御

モレキュラーグルーは微小管(チューブリン重合体)のような同一タンパク質の会合体をホモロピックに接着できるだけでなく、異種のタンパク質からなる会合体のヘテロロピックな接着が可能である。このようなヘテロロピックな接着のデモンストレーションとして、アクトミオシン(アクチン-ミオシン会合体)の滑り運動を停止させることに成功した(Figure 3a)。ミオシンを固定化したスライドガラス上に、ローダミン-ファロイジンで安定化・蛍光標識したアクチンフィラメント(0.8 ng)を ATP(2 mM)とともに添加し、蛍光顕微鏡で観察した。アクチンフィラメントは既報の値とほぼ同様の速度(4.6  $\cdot$ m/sec)でミオシン上を移動したが、ここに Glue-OMe(10  $\cdot$ M)を添加するとその運動は完全に停止した(Figure 3b, c)。この運動停止は ATP を含むバッファーでの洗浄により解除することができるため、タンパク質の不可逆的な変性によるものではなく、モレキュラーグルーの接着によるものであると考えられる(Figure 3b, c)。一方、接着力の低い Glue<sup>GO</sup>-OMe では過剰量(50  $\cdot$ M)の添加でも滑り運動の停止は見られなかった(Figure 3b)。

Glue-OMe(10  $\cdot$ M)存在下におけるミオシン(80  $\cdot$ g)の ATPase 活性は  $61.3 \pm 1.1$  mol/mg $\cdot$ min であり、Glue-OMe を投与していないミオシン ATPase 活性( $57.3 \pm 0.7$  mol/mg $\cdot$ min)とほぼ同等の値を示した。この結果も、アクトミオシンの滑り運動の停止がタンパク質の変性による機能損失によるものではなく、アクチン-ミオシン間の接着によることを支持するものである。

### 【4】モレキュラーグルーを用いた細胞内タンパク質デリバリー

モレキュラーグルーの接着モチーフとして利用しているグアニジニウム基はリン脂質二重膜中のリン酸基とも強く相互作用するため、細胞膜透過性を向上させる働きをもつことが広く知られている。本研究において、モレキュラーグルーがタンパク質への接着と細胞膜透過の二つの役割を果たすことで、極めて効率的な細胞内タンパク質デリバリーを実現することに成功した(Figure 4)。

はじめに、前項で扱ったアクチンをデリバリーの標的モデルとした。Alexa Fluor 633 で蛍光標識したアクチン(50 nM)と種々のモレキュラーグルー(1  $\cdot$ M)または市販のカチオン性脂質をベース

としたタンパク質導入試薬(SAINT-PhD; 15  $\mu$ M)を血清無添加の Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; 1 mL)中で混合し、これをヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞( $1.0 \times 10^5$  cells)に投与し、37  $^{\circ}$ C で4時間インキュベートした。細胞内に取り込まれたタンパク質の総量はフローサイトメトリーで測定される各細胞の平均蛍光強度で評価した。その結果、フォーカルコアに疎水性官能基であるベンゾフェノンを導入した Glue-BP が、市販される最も高効率なタンパク質導入試薬の一つである SAINT-PhD を上回る高いデリバリー活性を示すことを見出した(Figure 5)。一方、デンドリマーのフォーカルコアがメチルエステルである Glue-OMe や親水性の蛍光分子 FITC を導入した Glue-FITC ではタンパク質デリバリー活性は確認できなかった。以上の結果より、タンパク質への強い相互作用と、疎水性のフォーカルコアによる細胞膜への高い親和性を両立する分子構造が細胞内へのデリバリーに重要であることがわかる。さらに、Glue-BP による細胞内タンパク質デリバリーは 10%の仔ウシ血清(FBS)存在下でも非常に効率良く進行することも明らかとなった(Figure 5)。

同様の方法でアクチンを導入した HeLa 細胞を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。SAINT-PhD を用いた場合には、エンドサイトーシス経路による取り込みに典型的な粒状の画像が観察された(Figure 6a)。これに対し、Glue-BP を用いた場合には細胞質全体に蛍光が観察され、また一部は細胞核内へと移行していることが明らかとなった(Figure 6b)。同様の実験をエネルギー依存的な取り込みが停止する低温条件(4  $^{\circ}$ C)で行ったところ、蛍光強度は低下したものの細胞質内への取り込みが確認された(Figure 6c)。以上の結果を考慮し、モレキュラーグルー(Glue-BP)を介した細胞内タンパク質デリバリーのメカニズムを次のように推定した(Figure 4)。(1)末端のグアニジニウム基を介して標的タンパク質へと接着する。(2)この複合体が細胞膜表面に接近すると一部のグアニジニウム基が細胞膜中のリン酸基と相互作用し始める。(3)細胞膜表面に複合体が集積し、疎水性のベンゾフェノンユニットが膜の疎水性部分へと貫入し、膜透過が促進される。

Glue-BP を用いたタンパク質デリバリーは、標的タンパク質の機能を損なうことなく進行する。緑色蛍光タンパク質(EGFP)はタンパク質の立体構造に起因する蛍光を示すが、Glue-BP を用いて HeLa 細胞に導入した後も、その蛍光は失われなかった(Figure 6d)。

## 【5】結言

グアニジニウム基を接着モチーフとして有する一連のデンドリマーを開発した。これらのデンドリマーは分子の糊(モレキュラーグルー)として働き、種々の生体高分子をはじめとするオキシアニオン性表面へと非共有結合的に接着する。この強い接着機能を利用してタンパク質の会合体をホモトロピックあるいはヘテロトロピックに接着安定化することに成功した。また、疎水性官能基を導入することで細胞膜への親和性を向上させ、接着したタンパク質を極めて高い効率で細胞内へと導入することに成功した。