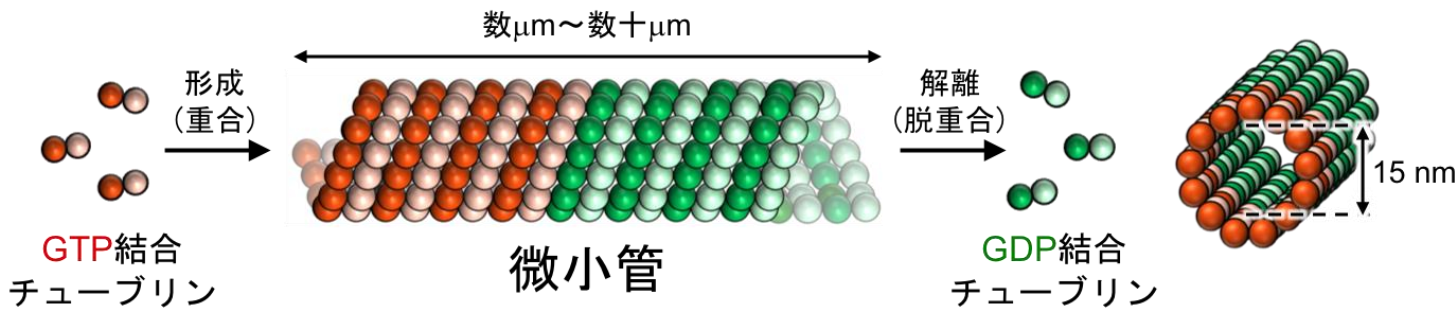


ペプチドによる微小管の 構造安定化への基盤技術の開発

鳥取大学 工学部 化学バイオ系学科
准教授 稲葉 央

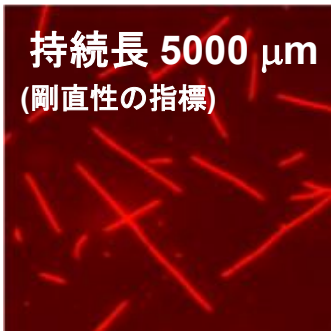
2022年3月8日

微小管とは



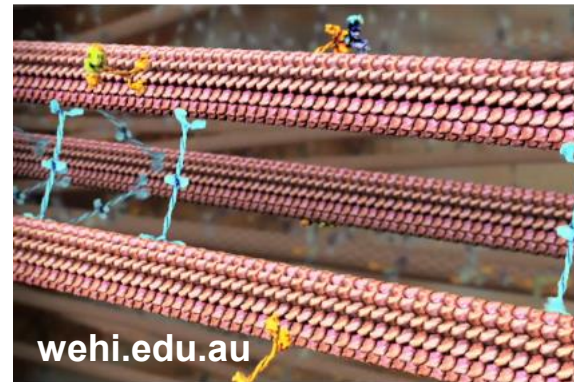
- ・チューブ型構造
- ・細胞機能に重要な役割
- ・分子デバイスの材料として注目

骨格 (強度)

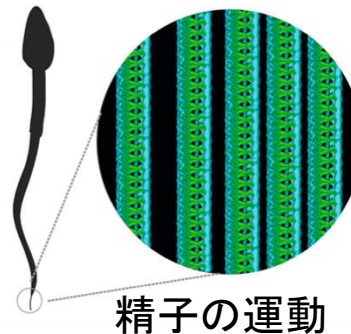
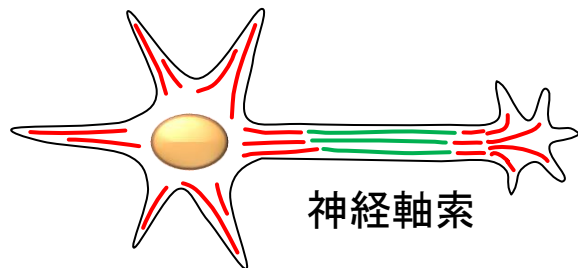
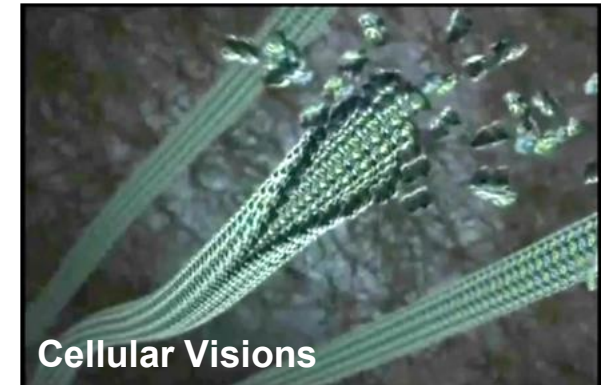


アクチン : 13.5 μm
中間径フィラメント : 0.5 μm

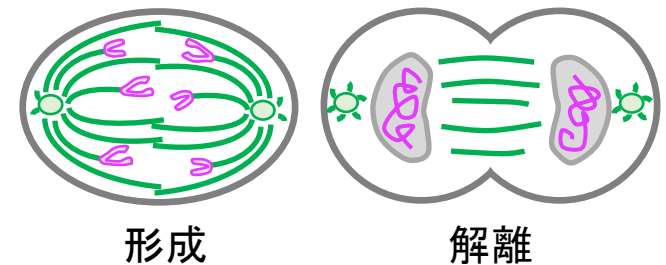
運動



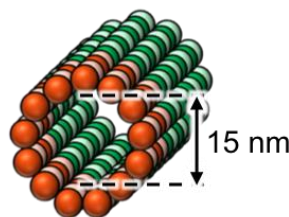
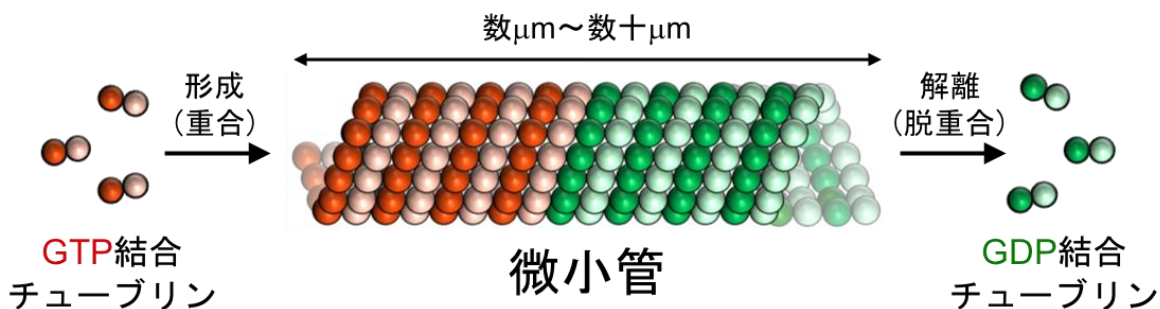
形成・解離



細胞分裂

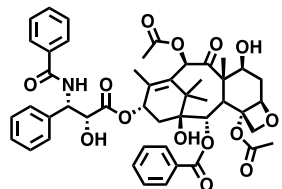


微小管の応用



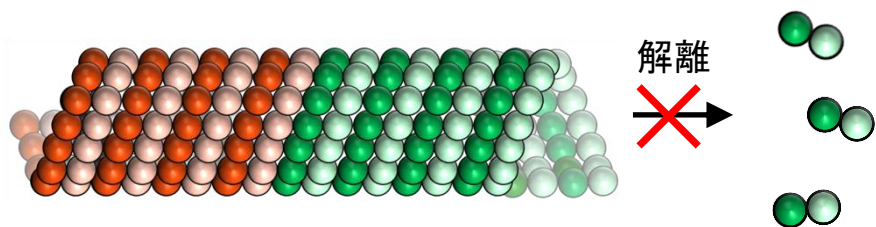
- ・チューブ型構造
- ・細胞機能に重要な役割
- ・分子デバイスの材料として注目

抗がん剤開発



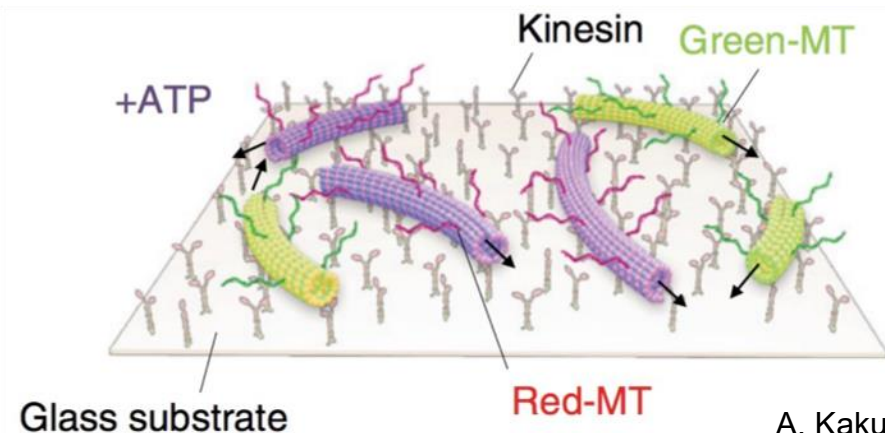
タキソール
(パクリタキセル)

微小管内部のポケットに結合し、
安定化することで抗がん剤として働く



高コストや副作用のため、微小管を
安定化できる代替品が求められている

材料応用

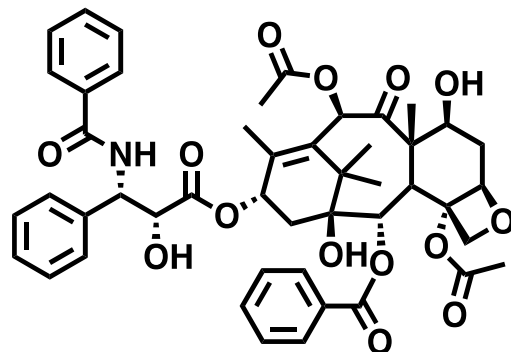


A. Kakugo et al.,
Nat. Commun., 2018, 9, 453

微小管の運動を利用した
輸送システムやマイクロデバイス

内部の利用はない。加えて微小管自体の
不安定性が材料として利用する上で課題

微小管安定化の従来技術と問題点



薬剤 (タキサン系)
タキソール

微小管内部のポケットに結合して安定化する分子
→抗がん剤および微小管安定化剤として汎用的に利用される。

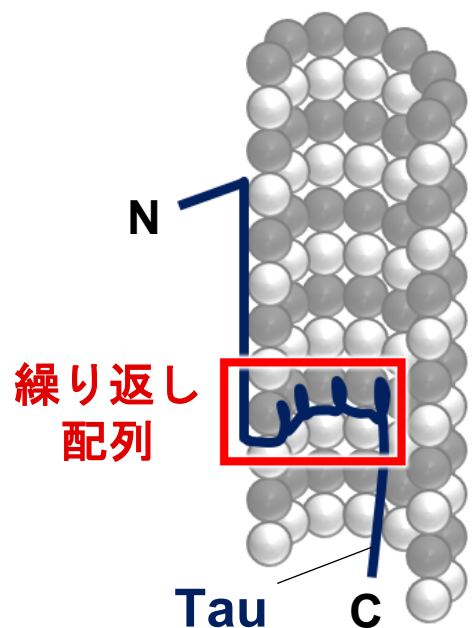
課題：合成の困難さ、低い水溶性、毒性など

「微小管内部にもものを入れる」「微小管の安定化」の技術ほぼなし

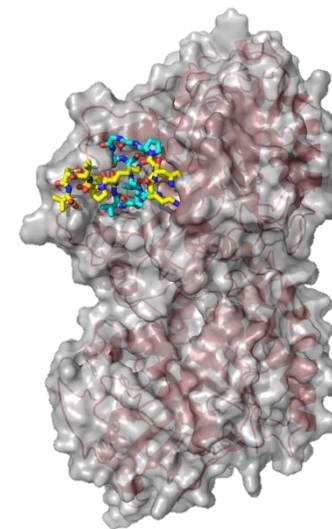


タキサン系薬剤に変わる微小管安定化剤が必要

微小管内部に結合するペプチドの開発

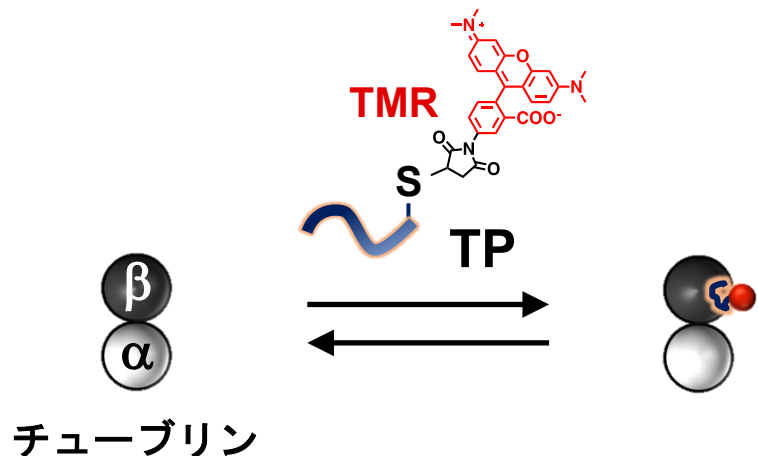


Tau由来ペプチド (TP)
CGGGKKHVPGGGSVQIVYKPVDL

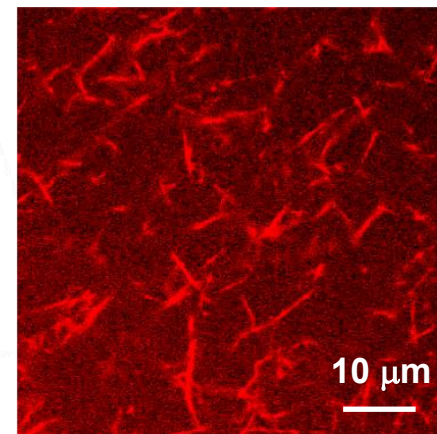
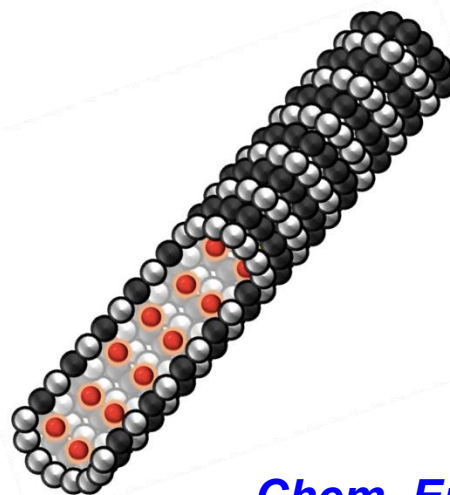


Taxolと同じ
内部ポケットに結合

微小管内部への結合



GTP or
GTP analog
重合



Chem. Eur. J., 2018, 24, 14958

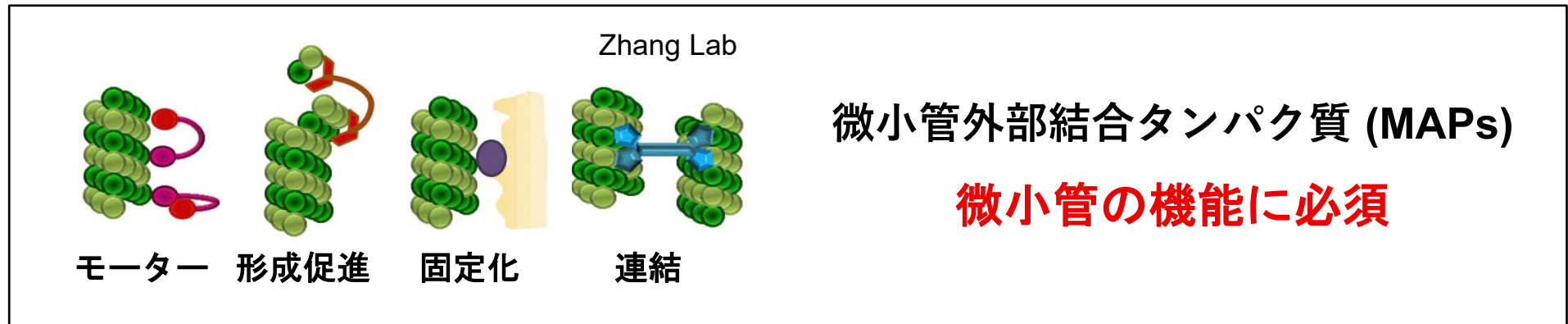
Tau由来ペプチドの特徴



Tau由来ペプチド (TP)

CGGGKKHVPGGGSVQIVYKPVDL

- ・ 様々な分子に連結可能
- ・ 合成が容易
- ・ 配列改変可能
- ・ 高い水溶性 (~ mM)
- ・ 細胞毒性なし
- ・ 微小管内部に結合するため
外部に結合するタンパク質の機能を損なわない



TPを元に微小管構造を安定化できれば、生体応用・材料応用におけるタキサン系とは異なる新しい技術となる

本技術の特徴・従来技術との比較

共通

- ・ タキソールに比べ合成が容易で製造コストが低い
- ・ 様々なタンパク質を内包可能、それにより微小管の構造、安定性を調整できる
- ・ ペプチド配列を変えることで、微小管への結合の強さを調整できる

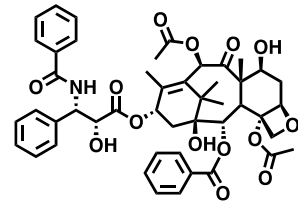
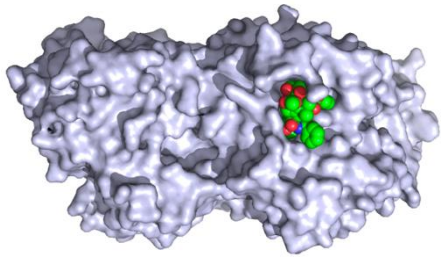
抗がん剤開発

- ・ 従来のタキソール骨格（高コストや副作用）に依存した設計から脱却した新しい設計
- ・ ペプチド配列最適化により副作用の軽減や抗がん活性の調整が可能
- ・ ペプチドのみでの細胞内の微小管への結合は確認済み（ACS Omega, 2019）

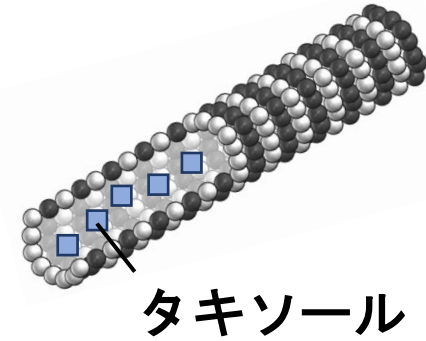
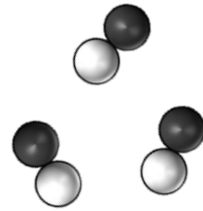
材料応用

- ・ 安定な微小管として利用可能
- ・ 長さや剛直性、運動性が変化した微小管を提供（これまでにない「用途に応じた微小管」）
- ・ 内包したタンパク質の輸送・放出が可能（外部への結合に比べ微小管機能を阻害しない）

TPの微小管安定化効果

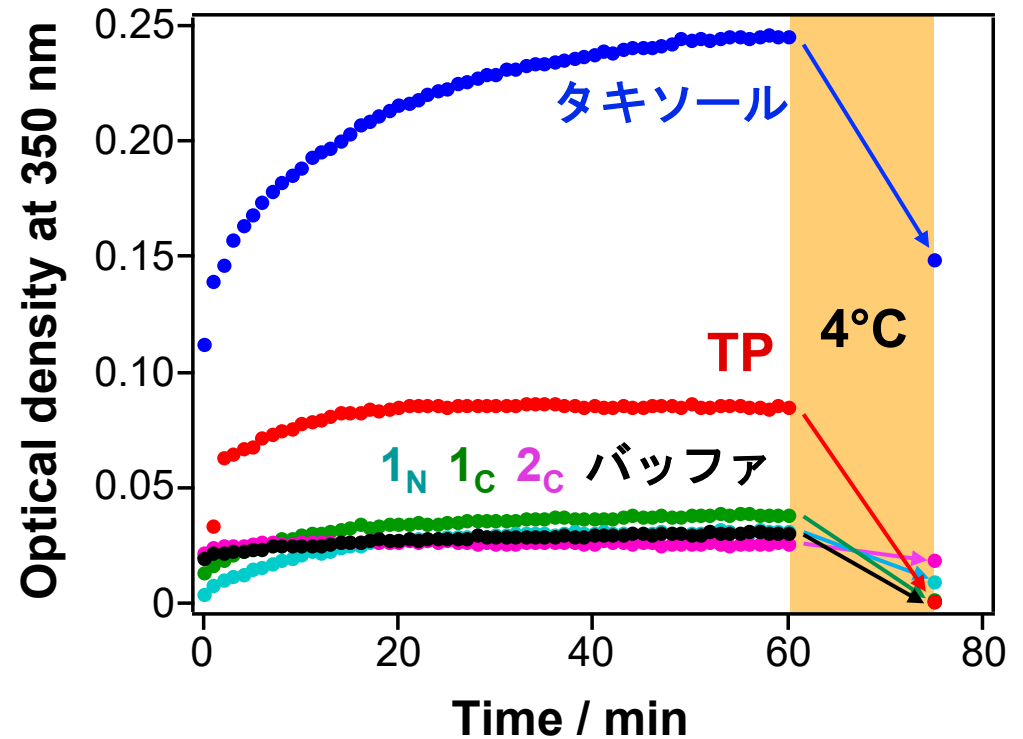
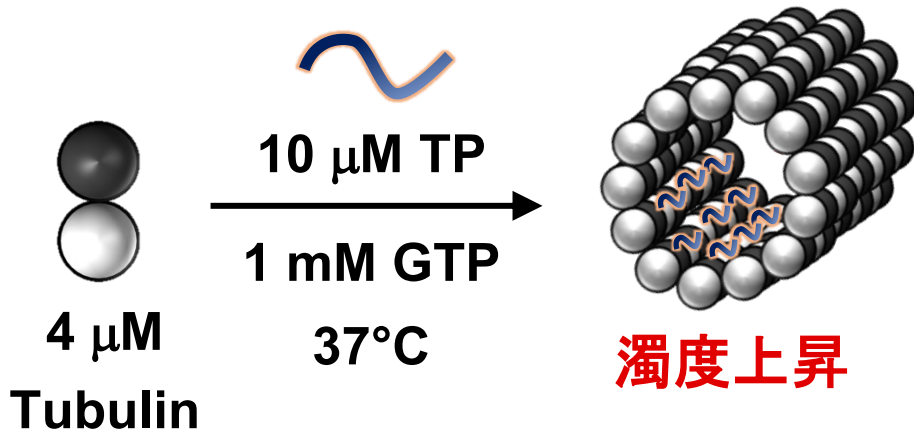


タキソール



タキソール：微小管内部に結合して安定化

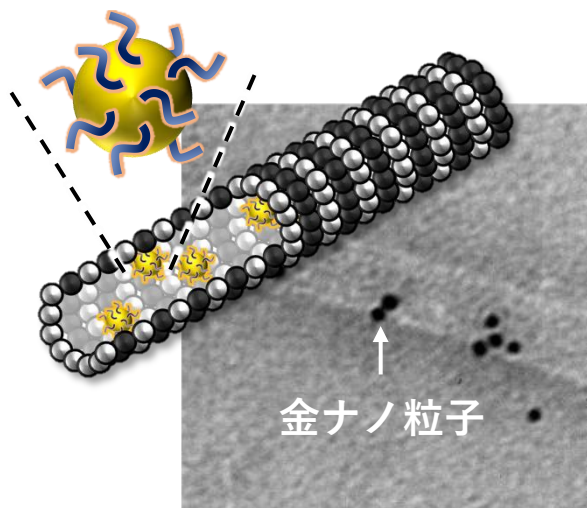
微小管形成解析



TPは微小管形成を促進（安定化）するがタキソールほどの効果はない

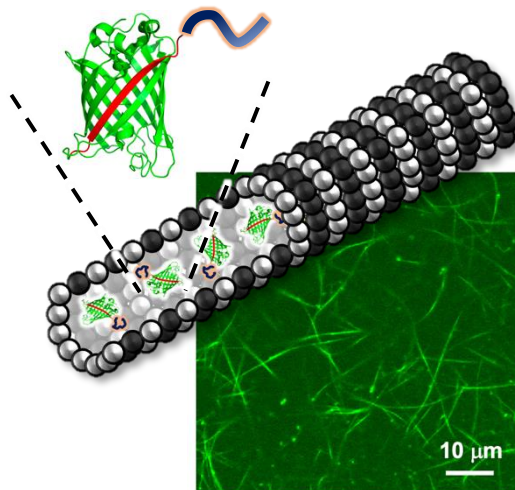
微小管内部への分子導入

金ナノ粒子



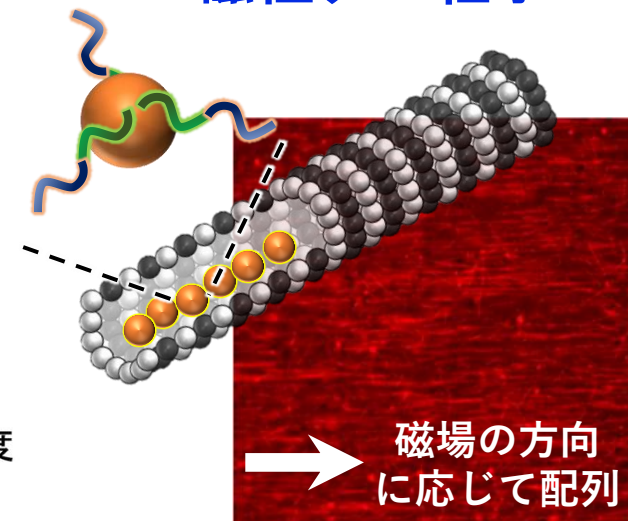
Chem. Eur. J., 2018, 24, 14958,
Chem. Lett., 2022, in press

蛍光タンパク質



Chem. Commun., 2019, 55, 9072

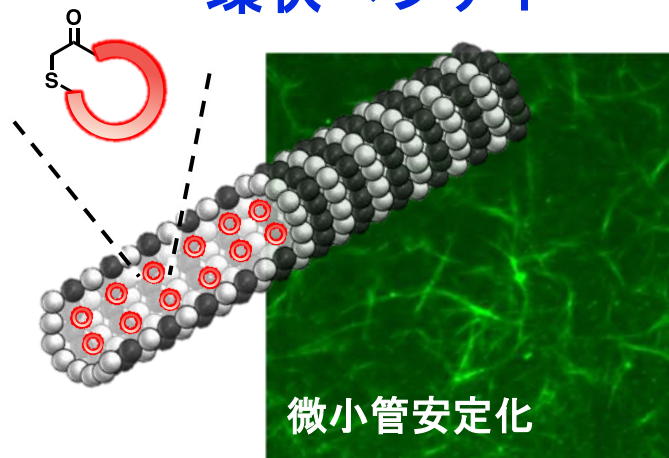
磁性ナノ粒子



Nano Lett., 2020, 20, 5251

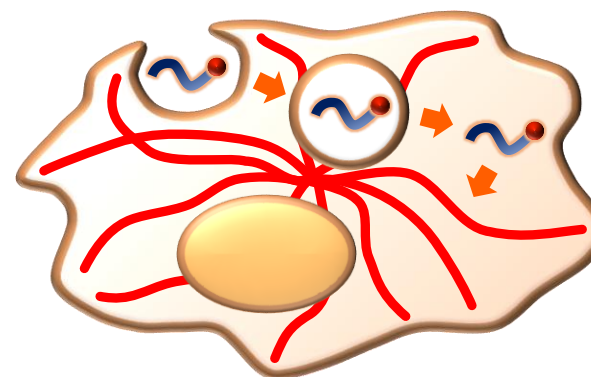
- ↑ 全長
- ↑ 剛直性
- ↑ 安定性
- ↑ 運動速度

環状ペプチド



Polym. J., 2020, 52, 1143

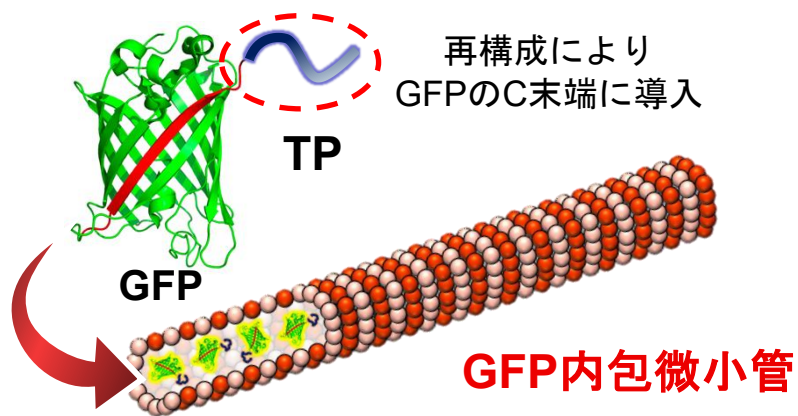
細胞内への結合



ACS Omega, 2019, 4, 11245

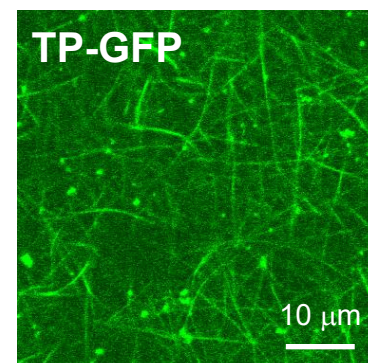
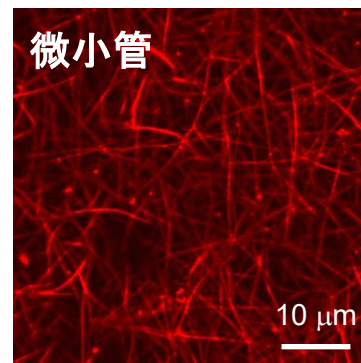
Bull. Chem. Soc. Jpn., 2021, 94, 2100 (Account)

タンパク質内包による微小管の安定化①



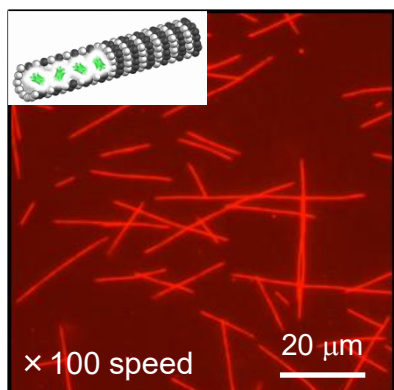
微小管への結合解析

内部への結合は抗GFP抗体の
結合解析により評価



キネシン基板上における構造・運動解析

TP-GFP内包微小管

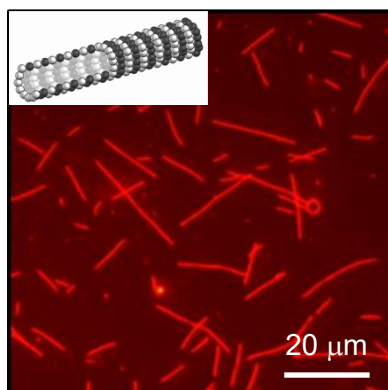


全長
1.7倍

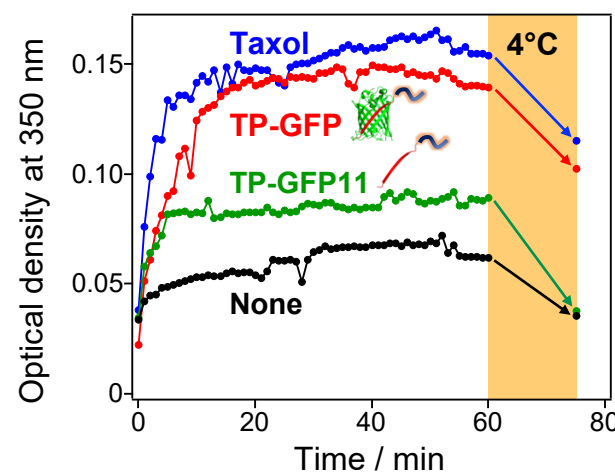
持続長
(剛直性の指標)
4.0倍

運動速度
1.2倍

通常の微小管



微小管形成解析

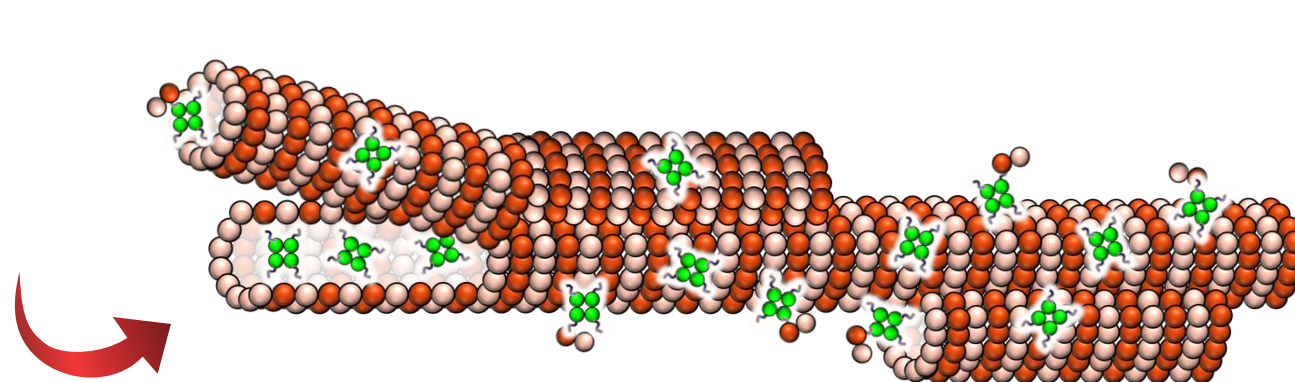
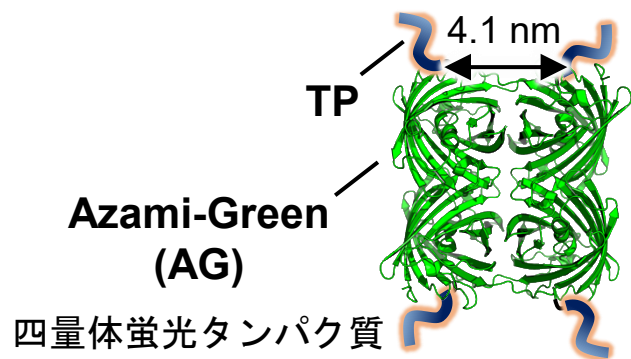


Taxolと同程度
微小管を安定化

- ・ TPを用いることでGFPの微小管への内包を達成
 - ・ GFP内包により微小管の全長・剛直性・運動速度・安定性が増大
- ➡天然のタンパク質内包微小管の機能を人工的に模倣

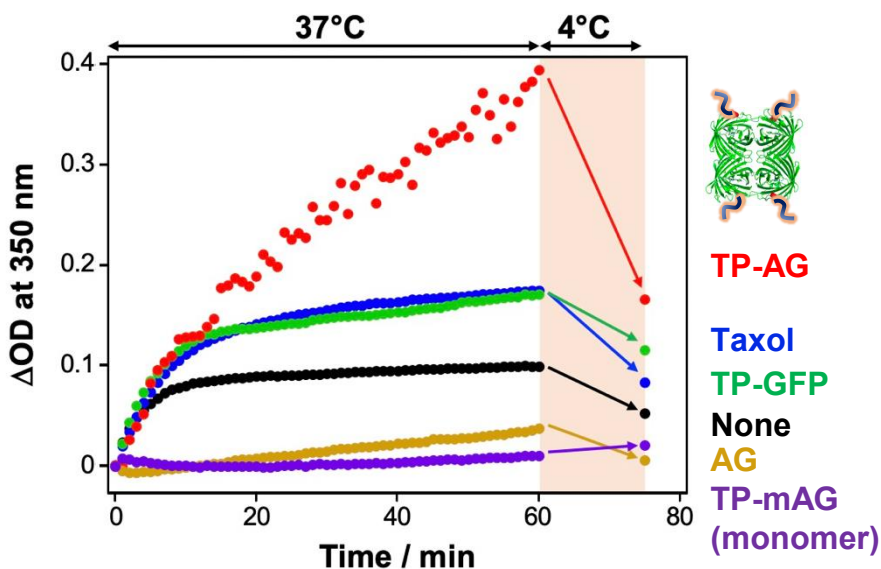
Chem. Commun., 2019, 55, 9072; 特願2020-028653

タンパク質内包による微小管の安定化②



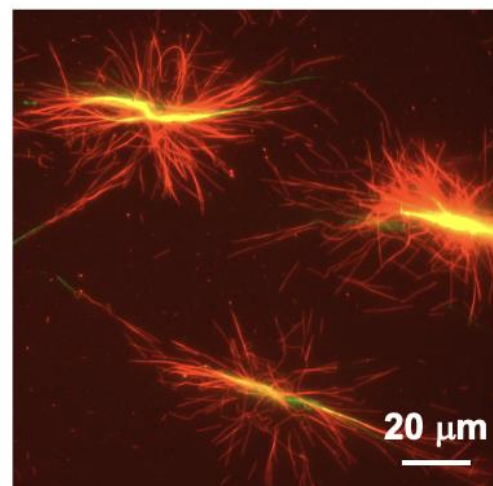
微小管形成解析

より顕著な安定化

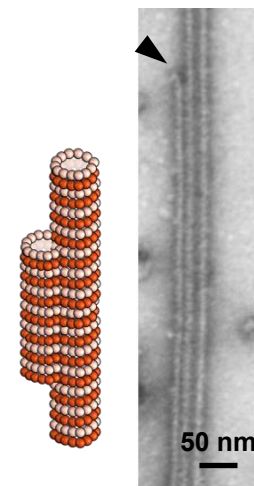


微小管超構造体形成

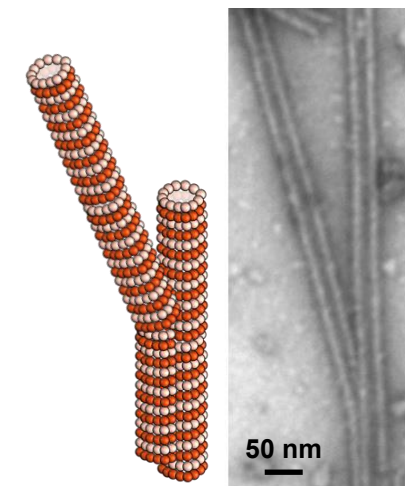
アスター構造



ダブレット



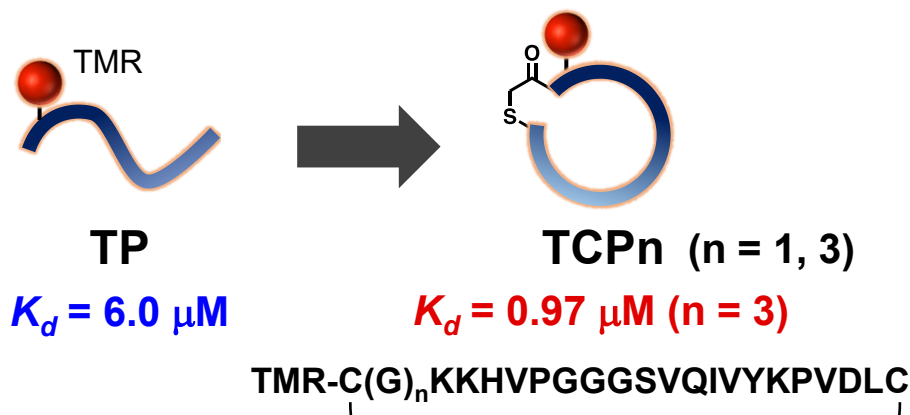
分岐



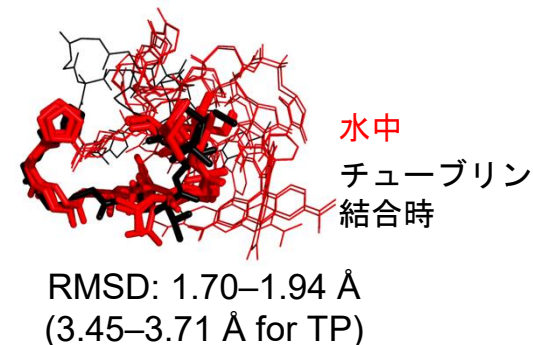
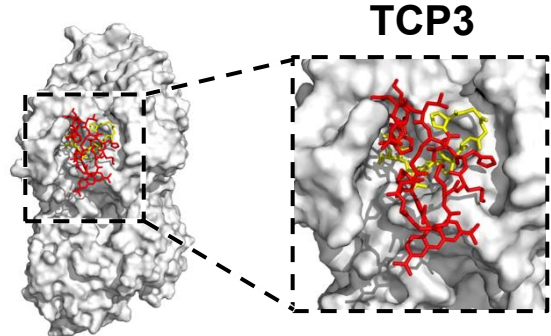
TPを用いたAGの内包および微小管外部への結合により、微小管の顕著な安定化および超構造体（アスター・ダブレット・分岐など）形成を確認

bioRxiv, 2022 (DOI: <https://doi.org/10.1101/2022.01.27.476107>)

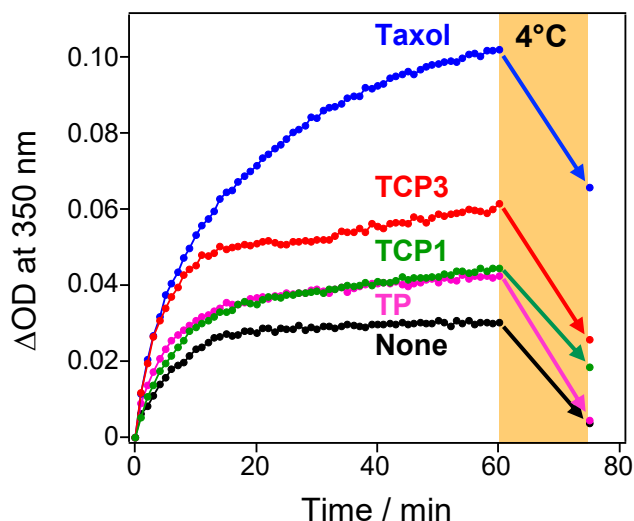
環状ペプチドによる微小管の安定化



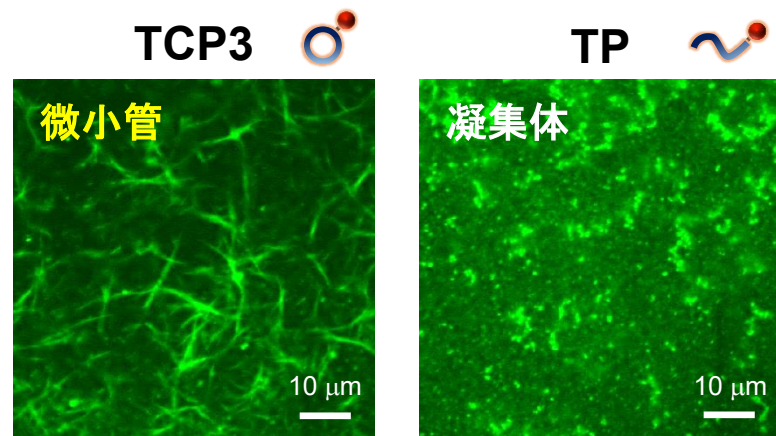
分子力場計算



濁度測定による微小管形成解析



微小管の安定化

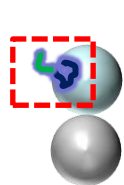


一般的に不安定なGTP微小管を安定に形成

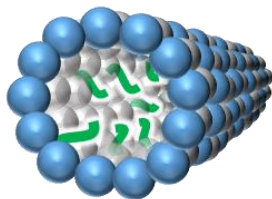
- TPの環化によりチューブリンに強く結合 (TPの6倍)
- 環状ペプチドによる不安定なGTP型微小管の安定化

磁性ナノ粒子内包による微小管の配列化

HYPTLPLGSSTYGGGKKHVPGGGSVQIVYKPVDL
 CoPt結合ペプチド TP

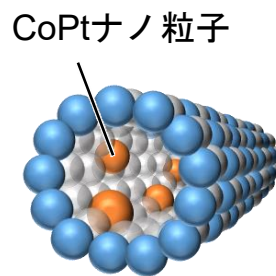


GMPCPP
 Polymerization



ペプチド内包

1) $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
 $(\text{NH}_4)_2\text{PtCl}_4$
 2) NaBH_4



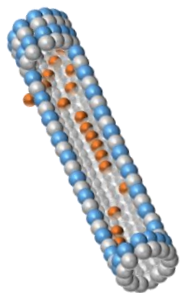
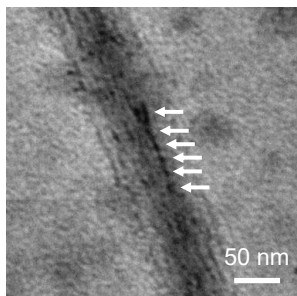
CoPtナノ粒子

磁性ナノ粒子
 内包微小管

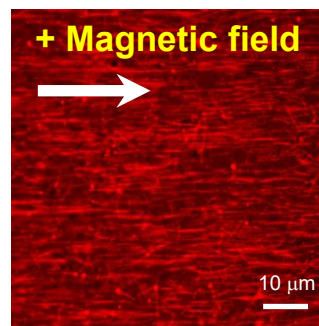
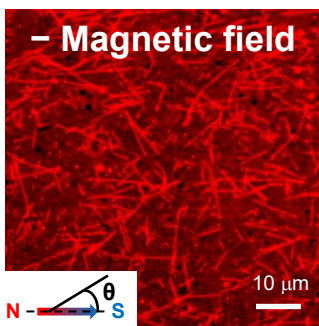
磁場による配列化

弱い磁場 (0.37 T) で配列化

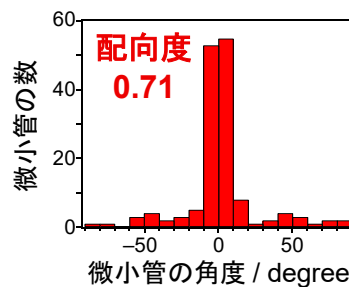
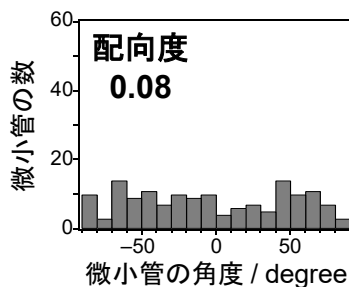
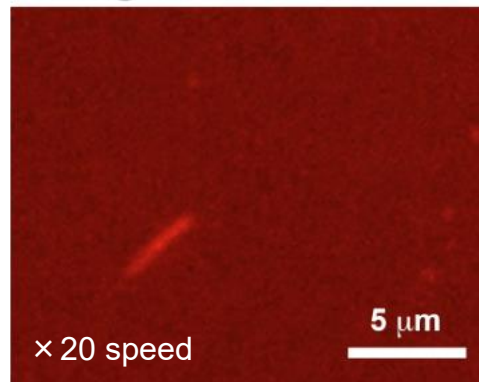
透過型電子顕微鏡像



一部連続して
 CoPtナノ粒子が配列化



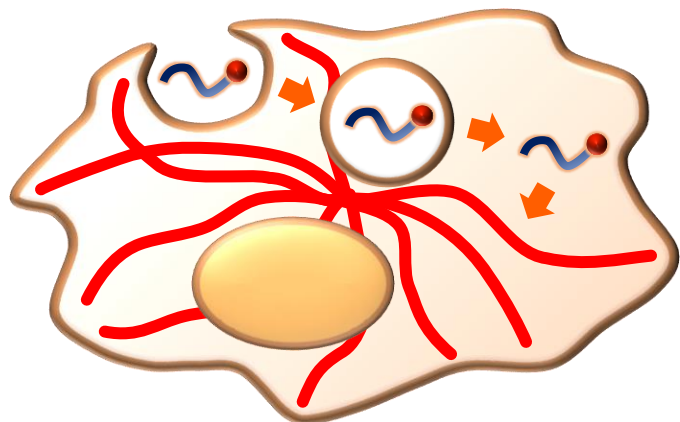
-Magnetic field



運動中の磁場の印加
 により運動方向制御

- ・ 微小管内部における磁性CoPtナノ粒子合成
 - ・ 運動性を保持したまま磁場配列化 (磁場なしと比べ9倍の配向度)
- ➡ 磁場に応答して運動方向が変化する磁性微小管の構築

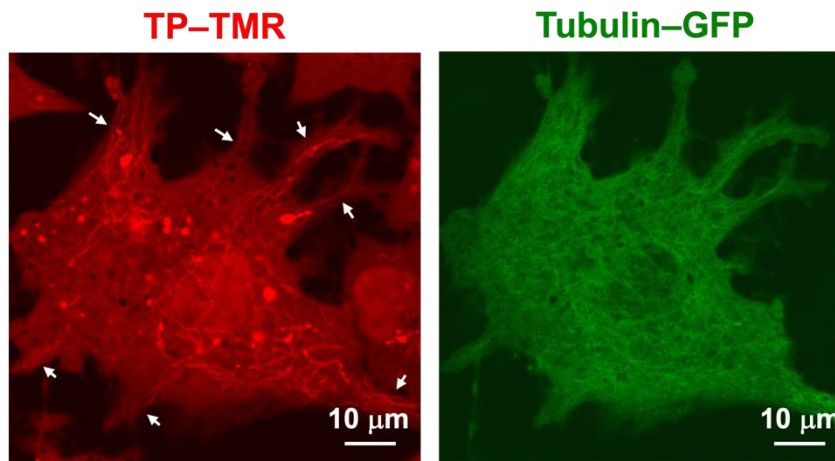
細胞内微小管への結合



HepG2細胞への取り込みと
細胞内微小管への結合

細胞内微小管への結合解析

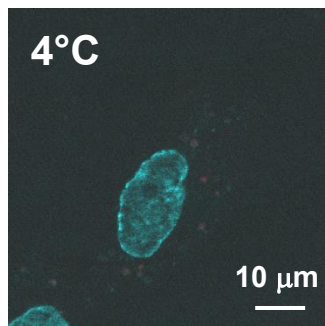
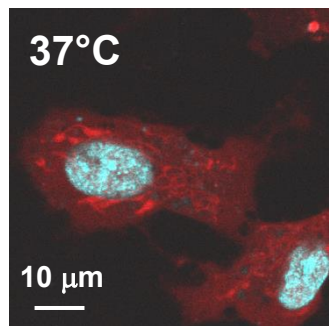
10 μ M TP-TMR, 6 h



取り込みの温度依存性

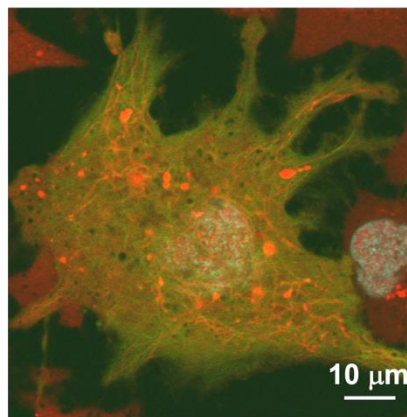
10 μ M TP-TMR, 3 h

TP-TMR/Hoechst 33342 TP-TMR/Hoechst 33342

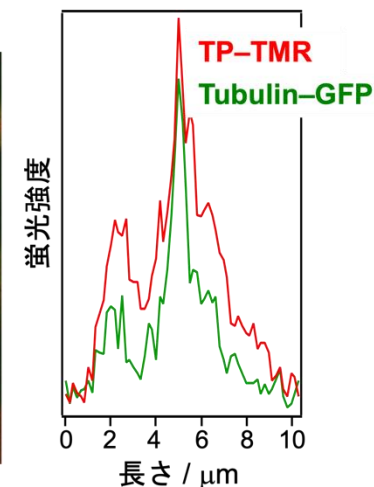
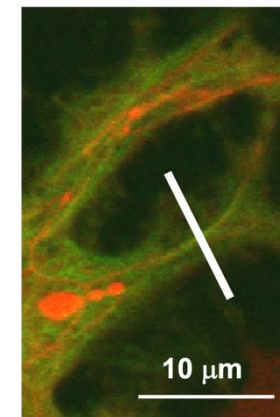


4°Cで取り込み抑制⇒エンドサイトーシス

TP-TMR/Tubulin-GFP
/Hoechst 33342



拡大図



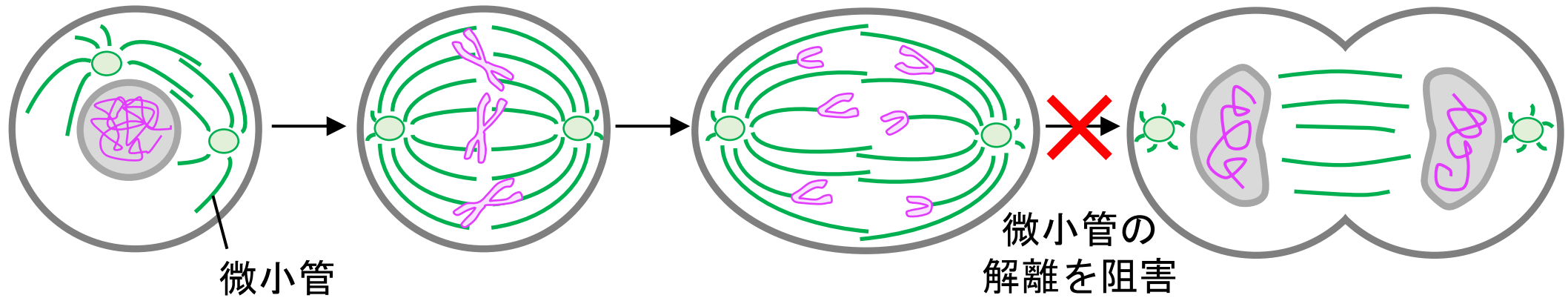
エンドサイトーシスによる取り込みと脱離により細胞内微小管に結合

ACS Omega, 2019, 4, 11245

想定される用途(生体応用)

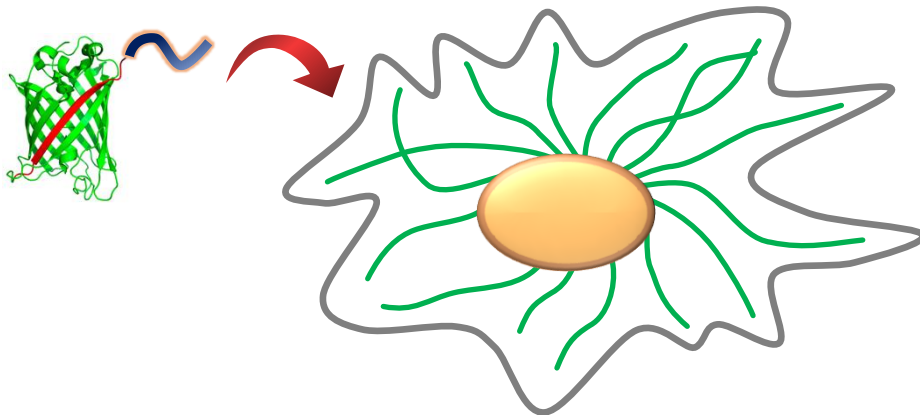
抗がん剤としての利用

微小管の形成や解離を阻害→細胞分裂を抑制



- ・微小管安定化による抗がん剤はタキソールのみ
- 微小管を標的とした抗がん剤開発の新たな設計指針を示す

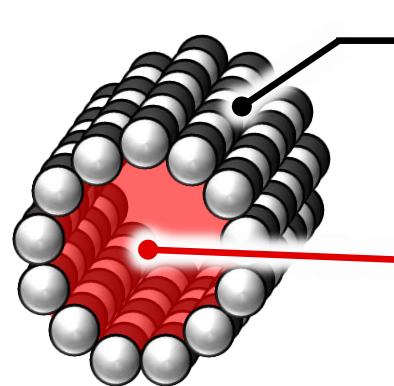
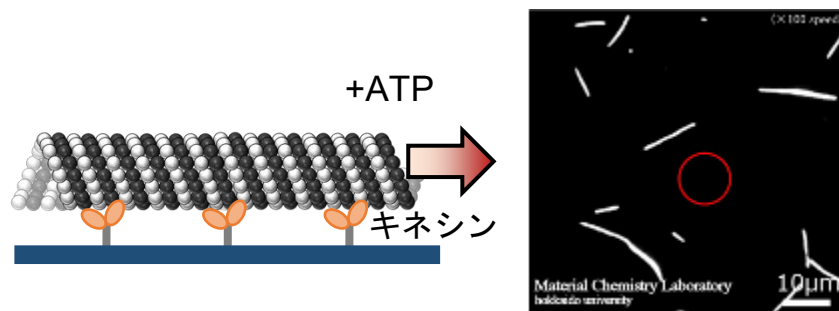
細胞内微小管へのタンパク質内包



細胞の構造・分化などの性質の改変

想定される用途(材料応用)

モータータンパク質の運動
→ アクティブマターとしての応用



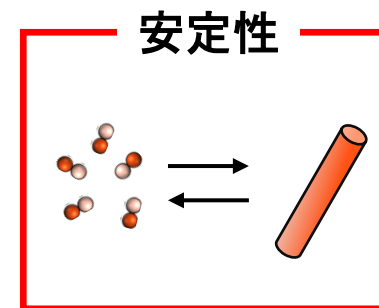
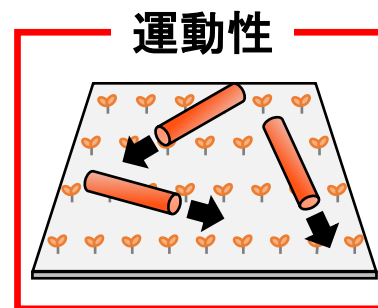
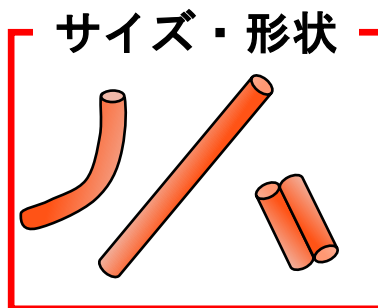
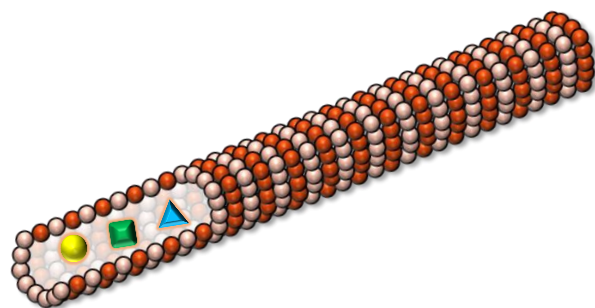
外部表面

天然：モータータンパク質
非天然：アミノ酸への修飾

内部空間

天然：
非天然： ?

微小管内部への分子導入は未開拓 → 内包による構造・機能制御



- ・ 微小管を作るための試薬は市販されている (Cytoskeleton, Inc.) が、これまでそのまま使われており、微小管自体の性質を変える手法は報告例がなかった
→ 微小管を安定化し、その性質を自在に変えることができる新しい手法
- ・ 微小管への分子内包、輸送、放出の技術はなかった
→ 本技術により可能となる。デバイスやドラッグデリバリーへの応用

実用化に向けた課題と今後の計画

生体応用

- ・細胞内への取り込み量の増加、細胞内の微小管への効率的な結合が必要
- 細胞透過ペプチドの融合、ペプチドの配列スクリーニング

材料応用

- ・内包物が微小管にどのような影響を与えるか予測が難しい。
- モデル計算による解析、様々なタンパク質や金属ナノ粒子を内包して
その影響を評価
- ・内包物の放出挙動が不明
- 放出される条件の探索および最適化

企業への期待

生体応用

- ・ 細胞内への分子輸送技術、および細胞への影響（細胞死、形態、運動等）を評価できる系を持つ企業との共同研究を希望（サンプル提供可能）

材料応用

- ・ 内包物（一次元的に配列化することで機能発現が期待できる分子、輸送や放出を目指す分子）の提案・提供を希望

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : タンパク質を内包した人工微小管
- 出願番号 : 特願2020-028653
- 公開番号 : 特開2021-134144
- 出願人 : 鳥取大学
- 発明者 : 稲葉央、松浦和則、山本昂久、岩崎崇、角五彰

お問い合わせ先

**国立大学法人鳥取大学
研究推進機構**

TEL 0857 - 31 - 5546

FAX 0857 - 31 - 5571

e-mail sangakucd@ml.cjrd.tottori-u.ac.jp