タンパク質導入試薬

河崎 陸・佐々木善浩・秋吉一成*

Protein transduction reagents

1. はじめに

遺伝子工学の進展によって、多種多様なタンパク質を自在に設計・合成可能な時代となった。それにともなう、抗体医薬をはじめとした 130 種類を超えるタンパク質医薬品が、がん治療や再生医療をはじめとした先端医療において臨床応用されてきている。

これまでのタンパク質医薬品は、抗体やサイトカインなど細胞表面のレセプターや血中成分等を認識するなど、細胞外で機能を発現させるものが大部分を占めるが、細胞内で機能させる系も重要である。タンパク質医薬品によって得られる機能は一過性であるため、核酸医薬のように転写・翻訳の過程で生じうるサイレンシングや導入細胞ゲノム中へのランダムな DNA 挿入による変異などの副作用を回避できるなどの利点も有している。

一般に、タンパク質医薬品は構造安定性に乏しく、その活性を保持することが困難である。また、生体において、プロテアーゼによる分解を受けることで、その機能を失ってし

まう。さらに、細胞内でタンパク質の機能を発現させるためには、一般的に細胞質への輸送が重要であると考えられている。それらに加え、タンパク質の種類によっては、核やミトコンドリアなど特定のオルガネラへの選択的な輸送が要求される。これらの背景のもと、タンパク質をその活性を保持したまま、細胞内へ輸送するシステム、すなわち“protein transduction”の開発が強く望まれている。

これまでにカチオン性脂質、膜透過ペプチド、高分子カプセル、高分子ナノゲルなどさまざまなタンパク質ナノキャリアが設計・合成されてきた。これらの系については優れた総説¹⁾があるのでそちらを参照されたい。本稿では現在、試薬として市販されているタンパク質ナノキャリアの例とその特徴について記述する。

2. カチオン性脂質

リポフェクタミンなど核酸導入試薬に代表されるカチオン性脂質は、細胞内への高い導入効率を示すことが知られている。このカチオン性脂質は、負に帯電している細胞膜表面と強く相互作用し、細胞内へと効率的に核酸分子を導入することができるため、広く用いられている。この核酸の系と類似の原理により、タンパク質を導入しえるカチオン性脂質の例を表 1 に示す。

カチオン性脂質を利用したタンパク質導入試薬の多くは、静電相互作用によってタンパク質との複合体を形成する。したがって、分子量の小さなペプチド分子から高分子量のタンパク質まで、その分子量を問わず幅広く適用可能であることが 1 つの特徴である²⁾。また、カチオン性脂質とタンパク質を混合し、非共有結合により複合体を簡便かつ迅速に作製できることや、共有結合による複合化と比較して、複合化タンパク質がその活性を保持しやすいことも特徴である。

一方で、カチオン性脂質は、高濃度条件下においては細胞毒性を示すこと、静電相互作用によりタンパク質を変性させる可能性があることなど、多量のタンパク質導入に際しては、注意が必要である。しかしながら、低分子のカチオン性の脂質分子を利用したタンパク質導入試薬は比較的安価に入手可能であるという魅力から、使用濃度を限定する場合には極めて有効なタンパク質導入手法であるといえる。

3. 膜透過ペプチド

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の TAT タンパク質由来の塩基性ペプチド (TAT ペプチド) が膜透過性を有することが知られている。この TAT ペプチドやオリゴアルギニンなどの塩基性アミノ酸からなる膜透過ペプチドの機能を利用し、多くの生理活性物質の細胞内導入が試みられてきた³⁾。なかでも、目的のタンパク質と、同様にアミノ酸からなる膜透過ペプチドを遺伝子工学的に結合させることが可能であることから、細胞内導入手法として多くの報告がなされている。

また、膜透過ペプチドを非共有結合的にタンパク質に結合することでタンパク質導入を行う系もいくつか

* Riku Kawasaki, Yoshihiro Sasaki,
Kazunari Akiyoshi
京都大学大学院工学研究科
高分子化学専攻
生体機能高分子研究室
〒 615-8510
京都府京都市西京区京都大学桂 A3-317
TEL: 075-383-2589 FAX: 075-383-2590
Department of polymer chemistry,
Graduate School of Engineering,
Kyoto University
E-mail: akiyoshi@bio.polym.kyoto-u.ac.jp

例がある(表2)。この系では、塩基性アミノ酸に加え、疎水性アミノ酸クラスター構造を有する両親媒性ペプチドをタンパク質と混合することで、疎水性相互作用により膜透過ペプチドをタンパク質に結合する。この系においては、複合化のために静電相互作用を利用するカチオン性脂質の系と比較し、タンパク質がその活性を保持しやすい。また先の系のようにタンパク質自体を遺伝子工学的に改変することなく、混合操作のみで、膜透過ペプチドをタンパク質に結合できるという簡便性からタンパク質導入試薬として有用である。

4. センダイウイルス由来のエンベロープ

ウイルスのもつ高い感染力を利用し、細胞内へと効率的に生理活物質を導入できることが示されている。例えば、RNA ゲノムを有し、マウスやラットを宿主とする呼吸器病を引き起こすことが知られているセンダイウイルスの膜融合機能を利用した核酸導入が報告されてきた。センダイウイルスはその細胞膜表面にHN と F の2種類の糖タンパク質を発現しており、このHN タンパク質は、細胞表面に露出しているシアル酸受容体と特異的に結合する。その後、F タンパク質によって、膜融合

が誘起され、核酸を細胞内に導入することが可能である。このセンダイウイルスを無毒化したエンベロープ(HVJ-E)を利用することで高い遺伝子導入とその治療効果が報告されている。

同様の原理を用い、HVJ-Eによりタンパク質を細胞内導入することも可能である⁴⁾。この手法においては、膜透過処理を行ったHVJ-Eとタンパク質を混合することでエンベロープ内部へのタンパク質の封入を行う。ここで、タンパク質をより効率的に封入するため、目的タンパク質と結合する分子をあらかじめウイルスに封入する手法も用いられてい

表1 カチオン性脂質型タンパク質導入試薬

試薬名	会社名	URL
BioPORTER	Genlantis	http://www.funakoshi.co.jp/contents/613
Pro-DeliverIN	OZ Biosciences	http://www.ozbiosciences.com/transfection-protein/35-pro-deliverin-transfection-reagent.html
Ab-DeliverIN	OZ Biosciences	http://www.ozbiosciences.com/protein-delivery/34-ab-deliverin-transfection-reagent.html
PULSin Kit	Polyplus-transfection SAS	http://www.polyplus-transfection.com/case-studies/protein-intracellular-delivery/
Proteinfectin	Targeting Systems	http://targetingsystems.net/protein-delivery.php
Fuse-It P	NIPPON Genetics Co, Ltd.	http://www.n-genetics.com/product_detail.html?item_id=4679

表2 膜透過ペプチド型タンパク質導入試薬

試薬名	会社名	URL
Chariot	Active motif	https://www.activemotif.com/catalog/37/chariot-protein-delivery-reagent
Xfect Protein	Clontech	http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100006775
JBS Transduction Kit	Jena Bioscience	http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/catalog/2536_optimized_protein_nucleic_acid_internalization_cocktails.html
Cellvader	GE Healthcare	http://www.gelifesciences.co.jp/technologies/cellular_science/pdf/cellvader.pdf

表3 その他のタンパク質導入試薬

試薬名	会社名	マテリアル	URL
GenomONE	石原産業	HVJ-E	http://www.iskweb.co.jp/hvj-e/transfection/top/proteindatajp.pdf
SelfMag	OZ Biosciences	磁性ナノ粒子	http://www.ozbiosciences.com/custom-magnetofection/60-selfmag-custom-transfection-kit.html

る。この系は、カチオン性脂質や膜透過ペプチドの系と比較して、比較的複雑な操作が必要ではあるが、ウイルスの特性を利用した非常に高い導入効率、分子量の大きい抗体分子やエンベロープのスペースを利用し比較的少量のタンパク質を細胞内送達できる点で極めて魅力的である。

5. 酸化鉄ナノ粒子

酸化鉄ナノ粒子をはじめとする磁性ナノ粒子の磁気誘導特性を利用したタンパク質の細胞内導入も可能である。この系は、他のキャリアと異なり、物理的な力を利用することから比較的細胞種によらず細胞内へ物質導入することが可能である。

例えば、酸化鉄ナノ粒子の表面に修飾された反応性官能基とタンパク質中に含まれるアミノ基やカルボキシル基とを反応させることで、タンパク質を磁性ナノ粒子に固定化することができる。ここで未反応のタン

パク質や他の試薬などは磁気により、分離精製可能であり、その操作性の簡便さも本手法の利点の1つである。

しかしながら、タンパク質を磁性ナノ粒子に結合するために共有結合を用いていることから、タンパク質がその活性を失う、もしくは低減することが多い。この理由から、利用しえるタンパク質の種類に制限があるが、細胞に対して、極めて非侵襲な磁場を用いる本手法は非常に有用である。また、製品化はされていないが、非共有結合的な相互作用を利用してタンパク質と磁性ナノ粒子を複合化し、タンパク質の高い活性を保持したまま細胞内導入を行う系も報告されている⁵⁾。

6. おわりに

細胞内タンパク質導入は、遺伝子導入のような転写・翻訳・翻訳後修飾を必要としないこと、また機能発

現のタイミングが重要な転写因子を利用した細胞の脱分化技術や分化誘導においても有効であることなどから、その開発が期待されている。それらに加え、転写制御・がん化のメカニズムなど分子生物学的な機能解析を進めていくうえで、基礎生物学的にもタンパク質の細胞内導入は、今後さらにその需要が増すものと考えられる。すでにいくつかの試薬が販売されているが、いまだその課題は多く、今後、より高効率かつ簡便な導入技術の開発が期待される。

文献

- 1) Y. Lu *et al.*, *J. Contr. Rel.*, 194, 1-19 (2014).
- 2) J. A. Zuris *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 33, 73-80 (2015).
- 3) D. Xu *et al.*, *J. Contr. Rel.*, 229, 130-139 (2016).
- 4) Y. Kondo *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 332, 10-17 (2008).
- 5) R. Kawasaki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* DOI:10.1002/anie.201602577 (2016).

“DDS”用語解説 No.318

GRAS

GRASとは、Generally Recognized As Safe (「一般に安全と認められる」)の頭文字をとったもので、食品に添加される物質において一定の使用目的における条件下での安全性が、その分野の専門家の知見や経験により証明された物質のことをいう。現在、GRASとしてFDAにリストされている物質は370種類を超えており、炭水化物、脂質、タンパク質、無機・有機物などがあげられる。

1958年に米国議会は、新規「食品添加物」に市販前承認を義務付けたが、その時点でもすでに、多くの物質は害なく食品に使用されていた(例えば、酢、塩、スパイス、食品用酵素、辛子、醤油など)。米国議会は、それらの物質にまで科学的試験や市販前承認を課すことは意図しておらず、1958年よりも前から安全に使われてきたという歴史ある物質については例外を設けた。また、1958年以降に開発された物質についても、資格を有する専門家が食品への使用に際して安全と認めればそれも例外とすることとした。これらに該当する物質がGRAS物質である。

近藤 啓 (Hironu Kondo)
アステラス製薬株式会社 製剤研究所