

博 士 論 文

Manipulation and Controlled Assembly of
Biomolecules by Using Molecular Glues

(分子糊を用いた生体分子の機能制御と組織化)

内 田 紀 之

分子糊を用いた生体分子の機能制御と組織化

相田研究室 37-127129 内田 紀之

【1】緒言

生体はタンパク質や細胞などの生体分子ユニットを超分子的に組み上げた集合体を利用し、様々な生体现象を駆動させている。その精密かつ多様な機能は人間の想像を遙かに超えたものであり、これを模倣しようと、現在まで核酸やペプチドなど様々な生体分子を用いた自己集合体が開発されてきた^(1,2)。とりわけタンパク質は、多彩な機能を持つ魅力的な生体分子であるが、その複雑な三次元構造のため、自己集合体の構築はとりわけ困難であり、その設計指針の確立がいまなお切望されている。

このような背景を踏まえ、本研究ではまず始めにタンパク質に対して非共有結合的な接着を共有結合的な固定へと光変換可能な分子糊の設計・開発を行い、タンパク質複合体の固定化を生物物理学的観点から調査した。次にこの光反応性分子糊を用いてチューブリンタンパク質のシート状集合体を貼り合わせることで、チューブリンを構成要素としたベシクル状の構造体を構築することに成功した。さらに“生体分子の自己集合体の構築”の応用展開として細胞接着性足場材料を用い、三次元的な細胞集合体の構築を行った。

【2】光反応性分子糊によるキネシン-微小管複合体の固定と接着力の生物物理的評価⁽¹⁾

はじめに、生体分子を段階的に固定化する分子糊としてグアニジン (Gu^+) とベンゾフェノン (BP) が多数末端に担持された樹状型分子 $\text{Glue}^{\text{BP}}\text{-FITC}$ (Figure 1) を設計・合成し、その機能を評価した。 Gu^+ は生体分子表面に普遍的に存在するオキシアニオン性官能基と塩橋を形成することができ、 Gu^+ を末端に多数有する分子は生体分子に対して非共有結合的に接着する分子糊として振る舞う⁽³⁾。さらに、この可逆的な接着状態の $\text{Glue}^{\text{BP}}\text{-FITC}$ に UV を照射すると、 Gu^+ の近傍に存在する BP の光反応により $\text{Glue}^{\text{BP}}\text{-FITC}$ はタンパク質表面と共有結合を形成し (Figure 2)、その接着状態を不可逆的に固定できる⁽⁴⁾。 $\text{Glue}^{\text{BP}}\text{-FITC}$ のタンパク質への固定化能を調べるため、モデルタンパク質として牛血清アルブミン (BSA) を $\text{Glue}^{\text{BP}}\text{-FITC}$ と混合し、UV 照射前後のサンプルをドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって

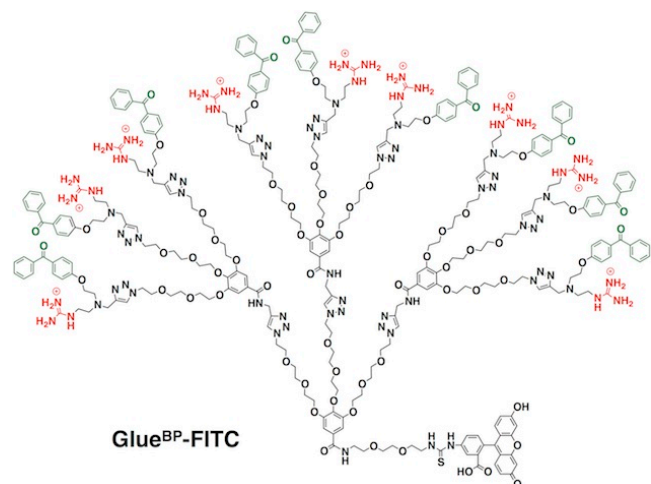


Figure 1. Molecular structures of a photo-fixable molecular glue $\text{Glue}^{\text{BP}}\text{-FITC}$ carrying nine adhesive guanidinium ion (Gu^+)/photoreactive benzophenone (BP) pairs.

解析した。その結果、UV照射前のサンプルにおけるBSAのバンド上にはFITC由来の蛍光が観察されなかったのに対し (Figure 2b, ii)、UV照射後はBSAのバンド上にFITCの蛍光が観察され (Figure 2b, iii-vi)、確かにUV照射によってGlue^{BP}-FITCのBSAに対する非共有結合的な接着が共有結合的に固定されていることが示された。

次にモータータンパクであるキネシンと微小管の複合体⁽⁵⁾に対してGlue^{BP}-FITCを作用させ、タンパク質複合体間を段階的に固定化できるかを評価した。キネシンはATPをエネルギー源として微小管上を滑走することが知られている。しかし、キネシン-微小管の複合体にGlue^{BP}-FITCを加え、UV照射によって固定化を行った後にATPを添加したところ、キネシンは微小管上を滑走しなかった。これは、キネシンと微小管の会合-解離が連続して行われる滑走活動がGlue^{BP}-FITCによるキネシン-微小管複合体の固定により阻害されたためだと考えられる。これに対し、UV照射を行わなかった場合、可逆的なGlue^{BP}-FITCの接着

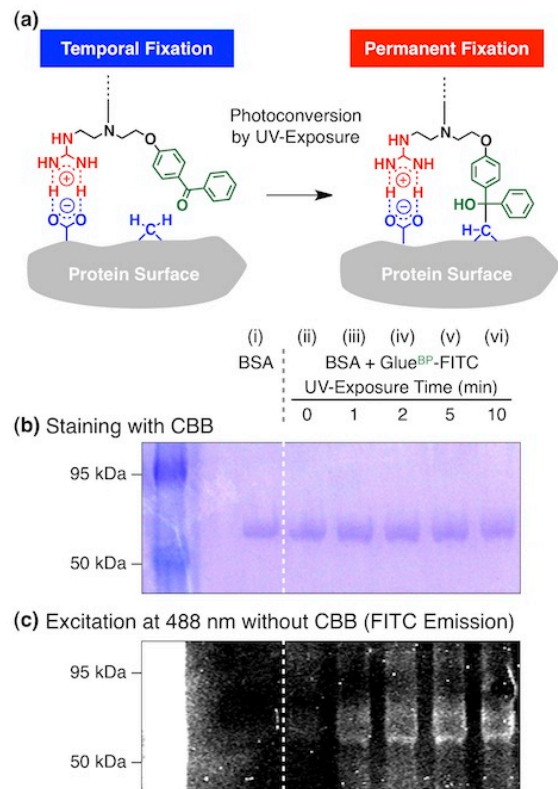


Figure 2. (a) Schematic illustration of the photo-fixable molecular glue concept: Glue^{BP}-FITC covalently binds to a protein via photoexcitation of benzophenone (BP) units after noncovalent adhesion mediated by formation of salt bridges between guanidinium (Gu⁺) ions and protein oxyanions. (b, c) SDS-PAGE profiles of BSA (5.0 μM) in (i) the absence and (ii-vi) the presence of Glue^{BP}-FITC (3.0 μM) (ii) before and (iii-vi) after UV exposure at 310 ± 5 nm for (iii) 1, (iv) 2, (v) 5, and (vi) 10 min, developed by (b) staining with CBB or (c) fluorescence emission of FITC excited at 488 nm.

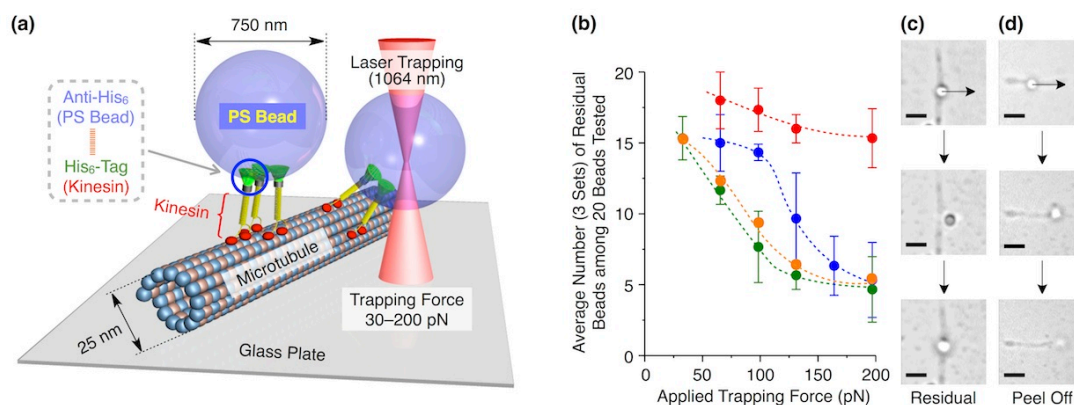


Figure 3. (a) Schematic illustration of the experimental setup using “optical tweezers” for evaluating the peel-off profiles of PS beads at 24 °C in a buffer. In a flow cell (~10 μL), PS beads (4.7 pM) having anti-His₆ antibodies were allowed to attach noncovalently to the His₆ tag sequence of kinesin (5.7 nM) that had been hybridized beforehand with microtubules (0.4 mg/mL) immobilized on the glass substrate. The cell was then UV irradiated at 300 nm. (b) Average numbers of residual PS beads that were not peeled off at various trapping forces applied. Samples were untreated (green) or (orange) treated with UV exposure for 3 min, or treated with Glue^{BP}-FITC (4 μM) without (blue) or with (red) UV exposure. (c, d) Bright-field microscopy traces of PS beads (c) returning and (d) peeled off after the laser trapping was turned off. Scale bars = 1 μm.

は解離し、その結果キネシンは微小管上を滑走した。

さらに、非共有結合的な仮留め状態と共有結合的な固定化された状態における Glue^{BP}-FITCの接着力を評価するため、ポリスチレンビーズ (PSビーズ) を担持したキネシンと微小管の複合体をガラス基板上に調製し、PSビーズに対してレーザートラッピング法⁶⁾ (光ピンセット) による引っ張り試験を行い、その挙動を調査した (Figure 3a)。Glue^{BP}-FITCによって固定されたキネシン-微小管間の相互作用が光ピンセットのPSビーズに対する捕捉力よりも強ければ、PSビーズは少し引っ張られた後に光ピンセットから解離して元の場所に戻る (Figure 3c)。一方、キネシン-微小管相互作用が光ピンセットの捕捉力よりも弱ければ、PSビーズは微小管上から引き剥がされる (Figure 3d)。キネシン-微小管を Glue^{BP}-FITC で非共有結合的に貼り合わせた仮留め状態の場合 (Figure 3b, blue)、未処理の場合 (Figure 3b, green) よりも多くのPSビーズが微小管上に残るものの、捕捉力を200 pN程まで増加させると、解離するPSビーズの割合は未処理の場合とほぼ同様であった。これに対し、UV照射によってキネシン-微小管を Glue^{BP}-FITC で固定した場合、200 pN程の捕捉力においても多くのビーズが微小管上から解離せず、キネシンが微小管上に固定化されていることがわかった (Figure 3b, red)。

【3】チューブリンシートを分子糊で貼り合わせたチューブリンベシクルの作成¹²⁾

次に光反応性分子糊の応用を模索するため、Gu⁺とBPの接着ユニットを3つ有し末端コアにカルボン酸 (CO₂⁻) を有する Glue-CO₂⁻ を合成し、チューブリンタンパク質の二次元集合体であるシート状構造体に作用させたところ、ベシクル状の構造体が形成されることを見いだした (Figure 4)。チューブリンタンパク質は細胞骨格のひとつである微小管の構成タンパク質であり、チューブリンユニット間が上下方向と左右方向が相互作用することで二次元的な集合体を構築することができる⁷⁾。GTPが結合したチューブリン (Tu-GTP) と加水分解されないGTP類似体である GTP* が結合したチューブリン (Tu-GTP*, Figure 4a) との混合物 (Tu-GTP:Tu-GTP* = 1:5) を集合化させたところ、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察においてシート状構造体が確認された。これは立体構造が異なるチューブリンユニットを集合化させたことで、シート構造の端が結合できず、チューブ構造が形成できないためであると考えられる。このチューブリンシートに Glue-CO₂⁻ を加え、その後光照射によって固定したところ、驚くべきことにTEM画像においてベシクル状の構造体が観察された。また、興味深いことに、このTuVにGTPを加えて100分間インキュベートすると、構造が崩壊したチューブリンの凝集体が観察された。これに対しATP、CTP、UTPを加えた場合、ベシクル状構造体は保持された。これはGTPの添加によってTuVの主要な構成ユニットであるTu-GTP* 上の GTP* がGTPで置き換わり、その後チューブリン上でGDPへと加水分解されることで、自己集合能が低いGDP結合型チューブリンが多く生じたためだと考えられる。細胞のエネルギー源の一つであるGTPは細胞分裂期において細

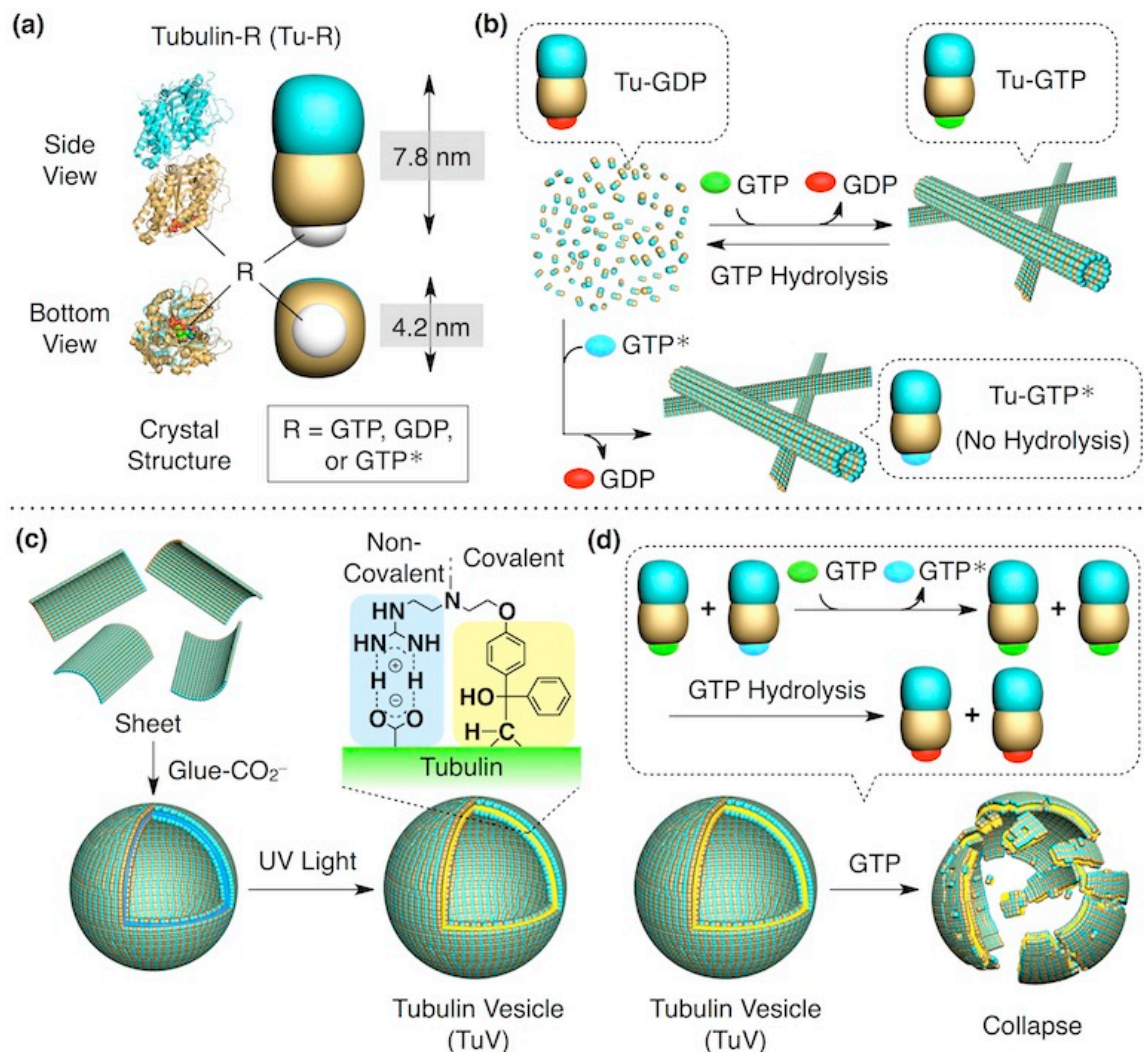


Figure 4. (a) Schematics representations of tubulin dimer (Tu-R) hybridized with guanine nucleotide GTP, GDP, or GTP* at the bottom of β -tubulin unit. (b) Schematic representations of self-assemblies of tubulin depending on the hybridized guanine nucleotides (GTP, GDP, or GTP*). In the presence of GTP, GDP on monomeric Tu-GDP unit is replaced to GTP and Tu-GTP units polymerize into microtubule. Then, GTP hydrolysis on microtubule transforming to Tu-GDP units results in depolymerization into monomeric Tu-GDP units. Tu-GTP* units, hybridized by the addition of non-hydrolyzable GTP* to Tu-GDP, irreversibly form microtubule without GTP hydrolysis. (c) A schematic representation of the transformation of tubulin sheet into tubulin vesicle (TuV). Tubulin sheets are prepared by mixing GTP and GTP* (GTP/GTP* = 1/5) to monomeric Tu-GDP units. Tubulin sheets are transformed into TuV by the addition of Glue-CO₂⁻ and subsequent UV irradiation. (d) Upon addition of GTP, GTP* on tubulin unit is replaced to GTP, and subsequently undergo GTP hydrolysis resulting in collapse of TuV.

胞内に高濃度で存在する⁽⁸⁾。このため、GTP応答性キャリアーは癌細胞などへのドラッグデリバリーシステム (DDS) として利用できる可能性がある。そこで、次にTuVのDDSキャリアーとしての機能を評価した。まずFITCで修飾されたチューブリンを構成要素を含むTuV (FL-TuV) を作成して癌細胞であるHep3B細胞に投与し、その後共焦点顕微鏡観察 (CLSM) を行ったところ、細胞内からFITCの蛍光が観察され、TuVが細胞内に取り込まれることがわかった。次に抗がん剤であるドキソルビシンを内包したTuV (TuV \supset DOX) を作成し、Hep3B細胞内への薬剤送達を行った。TuV \supset DOXをHep3B細胞の培地中に加え、24時間後に細胞の生存率を評価したところ、70 \pm 7%の細胞が死滅し、ドキソルビシンを加

えた場合 (52±18%) よりも高効率で細胞死を誘導した。また、TuVを細胞に投与した場合、細胞死はほとんど観察されず、TuV自体の細胞毒性は極めて低いことがわかった。これらの結果より、TuVにドキシソルビシンを封入することでより効率的に細胞内へと送達し、細胞死を誘導できることが示された。

【4】細胞接着性グルースキャフォールドによる細胞の三次元集合体構築^[3]

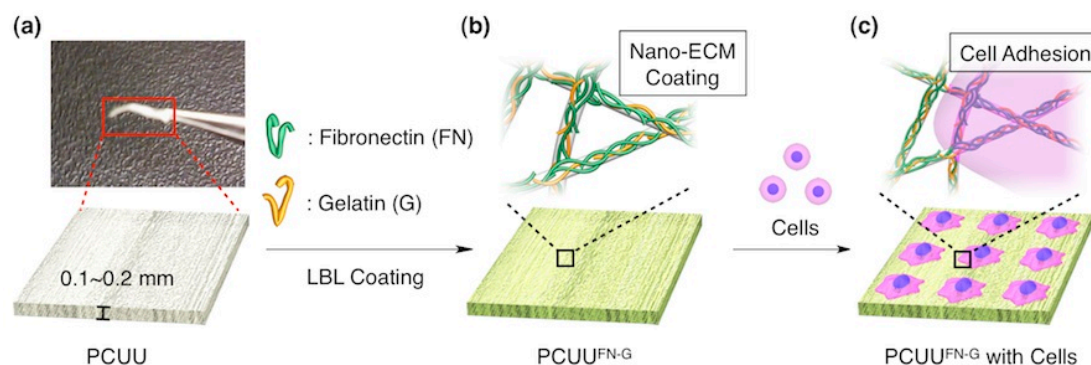


Figure 5. Preparation of extracellular matrix (ECM) films onto a poly(carbonate urethane)urea (PCUU) scaffold, and followed by seeding cells on the scaffold. A fibrous PCUU scaffold (a) was coated with fibronectin (FN) and gelatin by layer-by-layer (LBL) technique (PCUU^{FN-G}; b) allowing for adhesion of cells to the scaffold (c).

さらに、「生体分子間の接着制御による自己集合体の構築」というコンセプトの応用展開としてフィブロネクチン (FN) とゼラチン (G) の交互積層法⁽⁹⁾ (LBL法) によって細胞接着性薄膜をコーティングした高分子足場材料の作成し、それを用いて細胞の三次元集合体を構築した (Figure 5)。また、足場材料のモデルとして、ポリカーボネートウレタンウレア (PCUU) 足場⁽¹⁰⁾を用いた。ローダミン (Rh) ラベル化されたFN (Rh-FN) およびFITCでラベル化されたG (FITC-G) の溶液にPCUUを交互に浸し、各工程における蛍光強度を測定したところ、RhとFITCの蛍光強度がLBL膜を調製する工程において段階的に増加することが明らかとなり、FNとGによる薄膜(FN-Gフィルム)がコートされたPCUU(PCUU^{FN-G})が作成されていることが確認された。PCUU^{FN-G}の細胞の播種効率を調べるため、まず始めに膀胱平滑筋 (BSMCs) をPCUU^{FN-G}上に播種し、二日後に α -アクチンに対する免疫染色とDAPIによる核染色を行い、顕微鏡観察を行ったところ、PCUU^{FN-G}上に多くのBSMCsが播種されてことが確認された。これに対し、FN-GフィルムがコートされていないPCUUを用いた場合では、BSMCsの死細胞が主として観察された。グルコース代謝活性からその生存率を評価したところ、播種後二日目のサンプルにおいてPCUU^{FN-G}に播種されたBSMCsはPCUU上のBSMCsよりも高いグルコース代謝活性を示した。また、PCUU上のBSMCsにおける二日目と三日目のグルコース代謝活性の上昇がほとんど見られなかったのに対し、PCUU^{FN-G}上で培養したBSMCsは二日目から三日目にかけてグルコース代謝活性が大きく増加し、BSMCsがPCUU^{FN-G}上で増殖できることが示された。

さらに、人工膀胱組織構築⁽¹¹⁾への応用を見据え、癌化させた尿路上皮細胞であるUROtsa細胞を用い、PCUU^{FN-G}上に多層の細胞層の構築を行った。四層分に相当するUROtsa細胞をPCUU^{FN-G}上に播種し一日培養後にスライス切片を作成し、H&E染色によってUROtsa細胞を可視化させたところ、PCUU^{FN-G}上にUROtsa細胞が多層構造を構築しているのが観察された。対してPCUUを用いた場合、細胞間結合ネットワークが崩壊した細胞層が構築された。さらに、生細胞を検出する試薬であるカルセインAMと死細胞を検出するエチジウムホモダイマー1を用いて生細胞と死細胞の同時染色を行い、PCUU^{FN-G}上のUROtsa細胞の生存挙動を蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、PCUU^{FN-G}上に構築されたUROtsa細胞層から、生細胞に由来するカルセインの蛍光が全体にわたって観測され、死細胞に由来するエチジウムホモダイマー1の蛍光はほとんど検出されなかった。これらの結果より、モデルとして用いたPCUU足場材料はFN-Gフィルムでコーティングを行うことで、BSMCsやUROtsa細胞を効率的に播種することが可能な細胞培養足場として利用可能であることが示された。

【5】 結言

本研究では、グアニジンとベンゾフェノンを接着モチーフとした樹状型分子を開発し、これらがタンパク質を段階的に接着する光反応性分子糊として機能することを見いだした。また、チューブリンタンパク質のシート集合体を光反応性分子糊で貼り合わせることでチューブリンを構成要素としたベシクル状構造体の構築に成功した。さらに、フィブロネクチンとゼラチンの交互積層膜をコーティングした細胞接着性高分子足場材料を作成し、その足場上で細胞の三次元集合体を構築した。

【6】 参考論文

- (1) K. V. Gothelf, *et al. Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5636.
- (2) K. Matsuura *RSC Adv.* **2014**, *4*, 2942.
- (3) T. Aida, *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1626.
- (4) G. D. Prestwich, *et al. Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 64.
- (5) R. D. Vale, *et al. Science* **2004**, *303*, 676.
- (6) S. M. Block, *et al. Rev. Sci. Instrum.* **2004**, *75*, 2787.
- (7) T. Mitchison, *et al. Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13*, 83.
- (8) M. Griffin, *et al. Biochem. J.* **1996**, *313*, 803.
- (9) M. Akashi, *et al. Adv. Mater.* **2012**, *24*, 454.
- (10) W. R. Wagner, *et al. Biomaterials* **2010**, *31*, 4249.
- (11) S. Bolduc, *et al. Sci. World J.* Volume 2013, Article ID 154564.

【7】 投稿論文

- [1] N. Uchida, *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1626.
- [2] N. Uchida, *et al. to be submitted.*
- [3] N. Uchida, *et al. J. Biomed. Mater. Res. A submitted.*