

論文の内容の要旨

論文題目 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)

氏名 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。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を設計・開発を行い、タンパク質複合体の固定化を生物物理的な側面から調査した。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、三次元的な細胞自己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

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理的条件下で生体分子間を非共有結合的に接着する。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。モデルタンパク質

として牛血清アルブミン (BSA) を用い、Glue^{BP}-FITCのタンパク質への固定化能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) によって解析したところ、Glue^{BP}-FITCのBSAに対する非共有結合的な接着が光照射によって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に対してGlue^{BP}-FITCを作用させ、タンパク質複合体間を固定化できるか評価した。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 Glue^{BP}-FITCで接着した後に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 (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。その結果、光を照射する前のよりも光照射後の方が、多くのPSビーズが引っ張り試験後も微小管上に留まり、確かに光固定によってキネシン-微小管複合体が強く接着していることが示された。

【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

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Glue₆₀^{BP}-CO₂⁻ (Figure 3b) 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 (TuV) が形成されることを見いだした (Figure 3)。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。加水分解されないGTP類似体であるGMPCPPが結合したチューブリン (Tu-GMP, Figure 3a) とGTPが結合したチューブリン (Tu-GTP) の混合物を集合化させたところ、チューブリンがシート状構造体を形成していることが透過型電子顕微鏡 (TEM) によって観察された (Figure 3d, g)。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Glue₆₀^{BP}-CO₂⁻を加え、その後光照射によって固定したところ、ベシクル状の構造体が構築できることを見いだした (Figure 3e, h)。さらに、このTuVにGTPを加えたところ、ベシクル構造の崩壊が確認された (Figure 3f, i)。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-GMP上のGMPCPP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胞内に高濃度で存在する。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、次に抗がん剤であるドキソルビシンを内包したTuV (TuV^{DOX}) を作成し、癌細胞であるHep3B細胞の培地中に添加してドキソルビシンの細胞内へのデリバリーを行い、TuVのキャリアーとしての機能を評価した。

その結果、TuVは細胞内に取り込まれ、かつドキシソルビシンだけを添加した場合よりも効率的にHep3B細胞内の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

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細胞接着性タンパク質であるフィブロネクチン (FN) とゼラチン (G) の交互積層法 (LBL法) によって細胞接着性薄膜を高分子足場材料上に作成し、それを用いて細胞の三次元集合体を構築した (Figure 4)。モデルの足場として、繊維状のポリカーボネートウレタンウレア (PCUU) を使用し、FN-G膜でコートされたPCUU (PCUU^{FN-G}) を用いて膀胱平滑筋 (BSMCs) および、癌化させた尿路上皮細胞であるUROtsa細胞を培養したところ、FN-G膜がコートされていないPCUUでは多くの細胞が死滅するのに対し、PCUU^{FN-G}上で培養した場合は高い生存率で細胞が培養できることが顕微鏡観察によって確認された。また、UROtsa細胞をPCUU^{FN-G}上で積層させて培養したところ、多層の細胞層を構築することが組織切片の顕微鏡観察によって示された。これらの結果より、高分子足場材料をFN-G膜でコートすることで、効果的に細胞を培養することが可能な足場材料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。