

研 究 報 告 書

「生体粒子 vault の立体構造情報を基盤とした新規 DDS の戦略的開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研 究 者: 田中 秀明

1. 研究のねらい

幅広い真核生物が持つ分子量約 1000 万の巨大粒子ボルトは、3 種類のタンパク質 (major vault protein (MVP)、vault poly(ADP-ribose)polymerase (VPARP)、telomerase-associated protein 1 (TEP1)) と 1 種類の非翻訳 RNA (vRNA) によって構成されている。主成分である MVP が 78 個集まることで卵型中空の特徴的な基本骨格を形成し、他の成分は粒子内部に存在する。半分のボルト (half vault) は 39 個の MVP が集合することでお椀のような形を形成し、2 つの half vault がお椀の縁と縁を合わせるようにして (向かい合った MVP の N 末端同士で) 会合することで卵型の粒子を形成している。

本研究では、ボルトの立体構造情報に基づき、遺伝子工学的手法を用いて MVP の N 末端に変異や修飾を加えることで様々な改変粒子を作成する。そして、それぞれの改変粒子の立体構造を X 線結晶構造解析によって決定し、立体構造情報をフィードバックしながらドラッグデリバリーシステム (DDS) への利用に最適な構造を持つ改変粒子を戦略的に開発する。具体的には、pH5 で半分のボルトに解離して、pH7 で再会合するような粒子の開発を目指し、薬剤の取り込みや放出の制御を容易にする。これまでに、pH 依存で可逆的に割ったり閉じたりできるナノカプセルは報告されておらず、この様な粒子を立体構造情報に基づいて開発することで、DDS 開発の新たなモデルケースを確立する。

2. 研究成果

(1) 概要

私は 2009 年にラット肝臓由来ボルトの全体構造決定に成功した (*Science* 323, 384-388(2009))。得られた立体構造情報から、ボルトは主成分である MVP (Major Vault Protein) が 39 個集まってお椀型の半分のボルトを形成し、それら 2 つがお椀の縁と縁を合わせるように会合して、合計 78 個の MVP で卵型粒子を形成することが明らかになった。2 つの半分のボルトは、お椀の縁に集まった MVP の N 末端を突き合わせて会合することによって卵型のボルト粒子を形成するが、その会合はイオン結合と短い分子間 β シートだけで非常に弱いことが分かっていた。したがって、本粒子そのまま (野生型ボルト: W-ボルト) では、粒子内に薬剤等を保持することが出来ず、ナノカプセルとしては利用できないので、N 末端にロイシンジッパー (LZ) と呼ばれるファスナーのようなモチーフを付加した MVP で構成される安定なボルト粒子 (LZ-ボルト) の作成を目指した。LZ は、約 30 残基のアミノ酸で構成される α -ヘリックス 2 本が、互いのロイシン残基で疎水結合することにより形成されるファスナーの様なモチーフである。本研究では、すでに立体構造が報告されていた酵母の転写活性化因子 GCN4 由来の LZ を遺伝子工学的手法で MVP の N 末端に導入した。LZ は互いのロイシン残基で疎水

結合を形成することにより、非常に強固なホモダイマーを作るので、これによりボルト粒子の形成が阻害されることが考えられた。よって、MVP と LZ の間にグリシン 3~6 残基からなるリンカーを挿入して自由度を高めることで、安定で均一な粒子を得る事に成功した。LZ-ボルトの収量は、昆虫細胞 1L 培養あたり 70-80mg で、従来比(W-ボルトと比較して)の 10 倍以上得る事が可能となった。前述したように、W-ボルトのウェスト部位は非常にフレキシブルで、常に開閉していると考えられているため、薬剤等をボルト粒子内部に留めておくためには、VPARP の INT ドメイン(ボルト粒子内部で MVP と会合する)を粒子内部への輸送タグとして用いることが必須であった。しかし、本研究で LZ-ボルトの作成方法が確立できたことにより、INT タグ無しでも薬剤等を取り込み可能なナノカプセル開発に向けた基盤を確立することができた。

(2) 詳細

「昆虫細胞による MVP のみで構成されるボルト粒子の大量発現系の構築」

まず、野生型 MVP (W-MVP) のみで形成されるボルト粒子(W-ボルト)の昆虫細胞(Sf9: *Spodoptera frugiperda*(ヨウトガ) 卵巣細胞由来の細胞)による発現系構築を行った。発現系の構築には、すぐに成功したが、収量が昆虫細胞 1L 培養あたり 1mg と非常に少なかったため、培養条件の最適化を行った。具体的には、培養の際に一般的に使用されるスピナーフラスコではなく、振とう培養機を用いて培養することによるエアレーションの効率化や昆虫細胞に感染させるウィルス液の濃度と感染時間の最適化を行い、従来の約 5 倍(1L 培養あたり 5mg)のボルト粒子を得る事が可能になった。これにより、N 末端に変異や修飾を加えた改変ボルト粒子の大量発現系構築に向けた基盤を確立することができた。

「MVP の N 末端にヒスチジンタグを導入したボルト粒子の大量発現系の構築」

MVP の N 末端にヒスチジンタグ(His タグ)を導入し、コバルトを介して half vault を会合させることを考えた。His タグは、タンパク質のアフィニティー精製によく用いられるタグで、通常は 3-6 個程度の連続した His 残基を遺伝子工学的的手法によってタンパク質の N 末端か C 末端に付加し、Ni や Co などの金属をアガロースなどの担体に固定化したクロマトグラフィーにより、金属に対する親和性(His と金属イオンの配位結合の違い)によってタンパク質を精製する。ここでは、中性付近では、His タグが Co に配位することで、会合していた half vault が、pH が 6 以下になると His のイミダゾール環の N がプロトン化され(His の pKa=6 であるため)、コバルトに配位できなくなって half vault に解離するというメカニズムで開閉する粒子の開発を目指した。遺伝子工学的的手法により、MVP の N 末端に 3 個の連続した His 残基を導入し、昆虫細胞(Sf9)による発現系構築を行った。しかし、発現量が非常に少なく、目的とする粒子は得る事ができなかった。

「MVP の N 末端にロイシンジッパーを導入したボルト粒子の大量発現系の構築」

これまでの研究から、ボルトの構成成分の 1 つである VPARP の C 末端 160 残基(ボルト粒子内で MVP と会合するドメインで、INT と呼ばれる)とボルト粒子を溶液中で混ぜると、INT が粒子内部に取り込まれることが分かっていた。これは、ボルトのウェスト部位(MVP の N 末端

同士)の会合が非常に弱く、フレキシブルで、ここから INT が取り込まれるためであると考えられている。したがって、ボルト粒子内に薬剤等を留めておくためには、N 末端同士をしっかりと固定できる様に設計する必要がある。したがって、私は、MVP の N 末端にロイシンジッパー(LZ)と呼ばれるモチーフを付加することを考えた(図 1)。LZ は、アミノ酸 7 残基おきに疎水性アミノ酸であるロイシンを持ち、これらが分子間疎水結合を形成することにより安定なコイルドコイルを形成する。酵母の転写活性化因子 GCN4 のロイシンジッパーは、33 残基から成る α -helix で、ホモダイマーを形成することが知られている。これを、MVP の N 末端

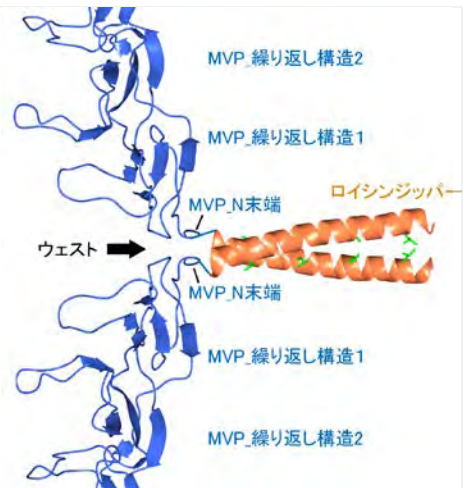


図 1. LZ-ボルトの概略図

に付加するが、LZ の疎水結合は非常に強固なので、直接付加するとボルト粒子の形成を阻害することが考えられた。したがって、MVP の N 末端にある程度の自由度を持たせるため、MVP と LZ の間にグリシン残基から成るリンカーを挿入することにした。その結果、グリシンを 3 残基または 6 残基挿入(LZ-MVP_Gly3、LZ-MVP_Gly6)すると、均一な粒子が高い収量で得られることが分った(図 2)。LZ-ボルトの発現は、細胞数が 1×10^6 cell/ml の培養液 1L に 1% 量 (10ml) のウィルス液 (P4 もしくは P3) を加えて中 3 日間培養することで、昆虫細胞 1L 培養あたり 70–80mg (ゲルろ過クロマトグラフィー後の高純度精製品) の粒子を得る事が可能になった。これは、W-ボルトと比較して約 16 倍以上の収量であり、将来、ボルトを利用したナノカプセルとして利用した DDS を開発する際に大幅なコストダウンにつながる(特願 2012-253031)。

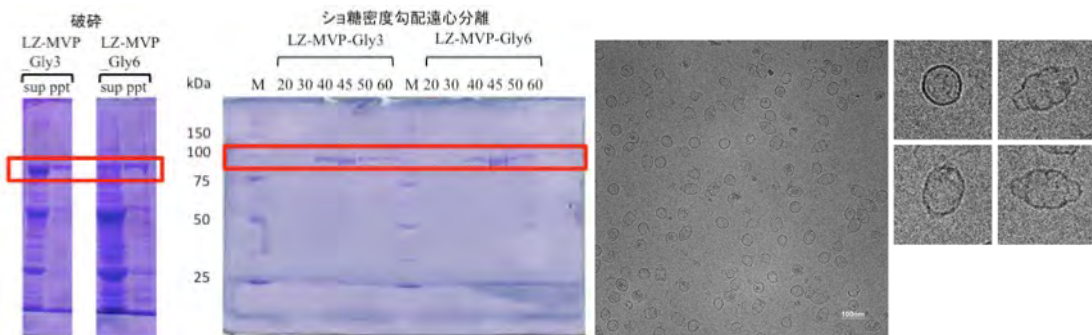


図 2. LZ-ボルトの SDS-PAGE とクライオ電顕による観察

3. 今後の展開

本研究により、昆虫細胞 1L 培養あたり従来比 (W-ボルトと比較して) の約 16 倍のボルト粒子を得る事が可能となった。ボルトは、DDS などに利用可能なナノカプセルとして期待されているので、本発明により収量が一桁上がったことで、大幅なコストダウンにつながる。また、本粒子を基盤として、pH 依存で可逆的に開閉制御可能な粒子の開発が進むことが期待できる。

4. 自己評価

ボルトをナノカプセルとして利用したドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発は、米国 UCLA の L. H. Rome 教授の研究室を中心に行われている。彼らは、薬剤の粒子内部への取り込みのために、ボルトの構成成分で粒子内部に存在する VPARP の C 末端 160 残基(INTドメイン:粒子内部で MVP との結合する)をタグとして利用している。これは、粒子内部に薬剤を保持させておくためでもある。しかし、この方法では、ボルトの大きな内部空間を活かし切れていない。私が開発を目指す、「卵を割ったり、閉じたりするように pH 依存で可逆的に開閉制御可能なナノカプセル」では、このようなタグがなくとも pH を変化させるだけで、どんなものでも粒子内部に取り込む事が可能となる。現時点では、目的とするナノカプセルの開発には至っていないが、MVP の N 末端にロイシンジッパーを付加した LZ-ボルトの開発に成功したので、今後は LZ-ボルトを基盤としてさらなる粒子の改変を進める事で、pH 依存で可逆的に開閉制御可能なナノカプセルの開発を目指す。また、LZ-ボルトはボルトウェスト部位の相互作用を強固にただけでなく、従来比の約 16 倍の収量でボルト粒子を得る事を可能にした。ボルトは、DDS などに利用可能なナノカプセルとして期待されているので、本発明により、収量が一桁上がったことで、大幅なコストダウンにもつながる。

5. 研究総括の見解

分子量約 1000 万の巨大粒子ボルト(vault)に対し、改変粒子を作成し、ドラッグデリバリーシステム(DDS)への利用に最適な改変粒子を開発することを研究のねらいとしている。具体的には、pH5 で解離して、pH7 で再会合するような粒子を開発して、薬剤の取り込みや放出を制御することをめざしている。ボルト粒子の会合力は非常に弱く、そのままでは、ナノカプセルとして利用できないので、ロイシン・ジッパーの付加とグリシン 3~6 残基からなるリンカーを挿入して安定化と自由度向上をはかった。その結果、従来比の 10 倍以上の収率で安定な粒子を得る事に成功した。

本研究で、効率的に LZ-ボルトの作成方法を確立したことは評価できるが、当初の狙いである pH 依存で可逆的に開閉制御可能な粒子の開発が全く手づかずであったことは残念である。ボルトが研究者が考えるように「卵を割ったり、閉じたりするように pH 依存で可逆的に開閉制御可能なナノカプセル」なのかが現時点で不明であることを考えると、果たしてボルトが pH 応答性 DDS 素材として適した物質であるかどうかという原理的視点から再検討する必要もあると考えられる。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Tanaka H and Tsukihara T, Structural studies of large nucleoprotein particles, vaults. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, **88**, 416-433 (2012).
2. Casanas A, Querol-Audí J, Guerra P, Pous J, Tanaka H, Tsukihara T, Verdaguer N, Fita I, New features of vault architecture and dynamics revealed by novel refinement using the deformable elastic network approach. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. (in press)

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

発 明 者: 田中 秀明

発明の名称: 人工生体粒子およびその製造方法

出 願 人: 独立行政法人科学技術振興機構

出 願 日: 2012/11/19

出 願 番 号: 特願 2012-253031

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 田中秀明、生体粒子ボルトを利用したナノカプセルの開発、第 1 回ネイチャーインダストリーアワード～若手研究者からの発信～(大阪科学技術センター主催、日刊工業新聞社共催)、大阪府大阪市、2012 年 11 月 20 日

2. Tanaka H, Structure determination of rat vault, a large nucleoprotein complex at 3.5Å resolution. 日本生物物理学会第 49 回年会、兵庫県姫路市、2011 年 9 月 16 日～18 日(招待講演)

3. Tanaka H, The mechanisms of self-assembly of the vault, the largest cytoplasmic ribonucleo-protein complex. XXII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2011), Madrid, Spain 23 -24 August, 2011.

4. 田中秀明、謎の巨大分子ボルトの全立体構造情報の利用 ～機能解明とDDS への応用を目指して～ SENRI(Seminar for Enchaining of Research & Industry)の会、大阪府吹田市、2010 年 12 月 24 日(招待講演)

5 Tanaka H, X-ray crystal structure of rat vault, a large nucleoprotein complex at 3.5Å resolution. International Symposium at Chungbuk National University, Chungbuk, Korea, November 17-18 2010. (invited talk)

受賞

1. 平成 22 年度文部科学大臣表彰 若手科学者賞 受賞(2010 年 4 月 13 日)
2. 大阪大学 飛翔 30 研究フェロー(若手研究トップ 30)受賞(2010 年 10 月 6 日)
3. 大阪科学技術センター 第1回ネイチャー・インダストリーアワード特別賞 受賞(2012年11月20日)

著作物

1. 田中秀明、加藤公児、住澤知之、山下栄樹 ミニレビュー「全立体構造決定から切り開く謎の巨大粒子ボルトの機能解明」 生化学 83, 392-395. (2011 年 5 月)

プレスリリース等

ネイチャー・インダストリーアワード～若手研究者からの発信～ 日刊工業新聞 12-13 面 (2012 年 12 月 21 日)