

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	カチオン性くし型共重合体による膜融合E5ペプチドの構造・機能制御
Title(English)	
著者(和文)	坂本和歌子
Author(English)	Wakako Sakamoto
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11487号, 授与年月日:2020年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:丸山 厚,石井 佳誉,金原 数,櫻井 実,堤 浩
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11487号, Conferred date:2020/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： 博士 (工学)	Academic Degree Requested Doctor of
学生氏名： Student's Name	坂本 和歌子		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	丸山 厚
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)	

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

核酸やタンパク質といった生体高分子からなる高分子医薬は、その高い標的特異性から副作用を低減でき、高い効果を示すと注目されている。しかし、高分子医薬は核や細胞質といった細胞内で効果を示すものが多く、細胞膜バリアを通過する必要がある。生体内では生体高分子を輸送するシステムが制御されているが、人工的に細胞外から細胞内へ高分子を輸送する場合、エンドソーム・リソソーム系に分解されるため困難である。そこで、両親媒性ペプチドが形質膜やエンドソーム・リソソーム膜といった細胞膜を不安定化させるツールとして注目されてきた。インフルエンザウイルスの膜融合タンパク質、ヘマグルチニンの N 末端部分を模倣して合成された E5 ペプチドもその一つである。5つのグルタミン酸残基を含む E5 ペプチドは、pH の低下に伴ってランダムコイルからヘリックスに構造転移し、膜融合能や膜破壊能といった膜不安定化能を示す。しかし、E5 は酸性 pH で誘起する両親媒性ヘリックス構造の高い疎水性から、凝集して活性が低下するという問題があった。そこで、これまでに我々は、カチオン性くし型共重合体であるポリアリルアミン-*graft*-デキストラン (PAA-*g*-Dex) が E5 の凝集解消と活性向上に有用であることを報告している。主鎖にカチオン性のポリアリルアミン、側鎖に親水性のデキストランを持つ PAA-*g*-Dex は E5 と可溶性複合体を形成し、酸性 pH だけでなく中性 pH でもヘリックス構造へのフォールディングを誘起した。そのフォールディングに伴って、E5 の膜破壊活性が向上することも確認されており、PAA-*g*-Dex がシャペロン様活性を持つと示された。そこで本論文では、PAA-*g*-Dex/E5 複合体の膜不安定化能のメカニズム解析と細胞系への展開を目的とした。以下、全 5 章からなる本論文の概要について述べる。

第 1 章「序論」では、生体内における脂質膜ダイナミクスの制御の仕組み、人工シャペロンの有用性、高分子医薬の膜透過性向上に向けたシステムの開発、膜融合 E5 ペプチドの特性・課題点など、研究背景や本論文の目的を示した。

第 2 章「カチオン性くし型共重合体の E5 ペプチドに対するシャペロン効果」では、細胞膜がヘテロな構造であり、その組成が細胞種や細胞周期によっても異なることに着目し、E5 と脂質膜間の相互作用に脂質組成が与える影響やそれに対するカチオン性くし型共重合体のシャペロン効果の解析を行った。様々な脂質組成からなるリポソームを調製し、それらリポソームと E5 間の相互作用を PAA-*g*-Dex 存在下・非存在下で円偏光二色性スペクトル測定やトリプトファン蛍光スペクトル測定により検証した。また、蛍光色素を内包したリポソームを調製し、その蛍光色素の漏出を検出することで E5 の膜破壊活性も評価した。これらにより、E5 が膜選択性を持つことや、カチオン性くし型共重合体がリポソーム懸濁液中の E5 ペプチドを部分的なフォールディング構造から完全な構造へ転移させ、E5 の膜選択性に影響を与えず活性を促進したこと、さらに E5 の脂質膜への吸着やポア形成のための会合を促進したことなど、カチオン性くし型共重合体の E5 に対するシャペロン機能発現機構を議論した。

第 3 章「カチオン性くし型共重合体/E5 ペプチド複合体が細胞膜に与える効果」では、HL-60 細胞を対象に、タンパク質の細胞内から細胞外、細胞外から細胞内への透過性を、乳酸脱水素酵素アッセイや共焦点顕微鏡観察、フローサイトメトリー解析により評価した。その結果、カチオン性くし型共重合体による E5 の活性化機能がリポソーム膜のみならず生細胞に対しても効果的であり、タンパク質の細胞膜透過性を高められることを示した。また、MTT アッセイや Calcein-AM 染色による生存率評価より、この複合体では界面活性剤であるジギトニンに比べて細胞へのダメージを軽減しつつ膜透過性が向上できることを明らかにした。

第 4 章「カチオン性くし型共重合体による標的細胞への E5 感受性のプログラミング」では、標的細胞で E5 を活性化するシャペロン活性を持つ新規くし型共重合体を設計し、その活性を評価した。

最後に第 5 章「結論」では、本研究で得られた知見をまとめた。

このように人工的にデザインしたシャペロン様活性を持つナノマテリアルの研究は、医療や工業・農業といった様々な分野で注目されている生体高分子のハンドリングのしやすさを改善すると共に、その機能を自在に操作可能となり、生体高分子の効果の幅を広げると期待される。同時に、シャペロン様活性を持つナノマテリアルの設計や生体高分子の特性に関する基礎的な知見を得ることもつながる。こうした知見は生命現象の理解を深め、その生命現象を人工的に模倣・操作する革新的な技術の創出の一端を担うと期待している。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	坂本 和歌子		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	丸山 厚	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Biomaterials which artificially destabilize cellular membranes, have been studied for drug delivery and immunotherapy. A fusogenic E5 peptide derived from influenza virus exhibits coil-to-helix transition with decrease in pH, leading to membrane disrupting and fusogenic activity. However, the activity at acidic pH decreased because high hydrophobicity in amphiphilic helical structure induced aggregation. In previous study, it was revealed that poly(allylamine)-*graft*-dextran (PAA-*g*-Dex) formed a soluble inter-polyelectrolyte complex with E5 to induce the coil-to-helix transition and enhanced membrane disruptive activity at not only acidic pH but also neutral pH.

In this study, mechanism of the membrane destabilization induced by PAA-*g*-Dex/E5 was analyzed and PAA-*g*-Dex/E5 system was applied to living cells. Effects of PAA-*g*-Dex on the interaction between E5 and DOPC liposomes were assessed by circular dichroism measurements. Membrane disrupting activity of E5 was detected by leakage of fluorescence molecules, Acid red, from the liposome. The degree of E5 helicity in DOPC liposome suspensions at neutral pH increased with the addition of PAA-*g*-Dex, indicating the disrupting activity was enhanced even at neutral pH. At acidic pH, the addition of PAA-*g*-Dex did not affect the helicity, however, enhanced the disrupting ability of E5. EC_{50} decreased from $0.70 \mu M$ to $0.15 \mu M$. These results indicated that PAA-*g*-Dex not only folded E5 into mature state but also promoted adsorption of matured E5 onto membrane surface and association for pore formation. In liposomes with various compositions, the secondary structure and the activity of E5 with or without PAA-*g*-Dex was also assessed. PAA-*g*-Dex enhanced the activity with the intrinsic membrane selectivity of E5, indicating PAA-*g*-Dex is useful as chaperones for E5. The effect of PAA-*g*-Dex/E5 on cellular membranes was then assessed using lactose dehydrogenase (LDH) assay to detect leakage of LDH from cytosol. PAA-*g*-Dex did not induce any leakage while PAA caused 70% leakage. The result indicated dextran shielded the cation derived from PAA, leading to reduction of the cytotoxicity of PAA. At both pH 5.4 and 7.4, E5 did not cause any leaks while E5 with PAA-*g*-Dex resulted in considerable leakage. The result indicated that the promotion of E5 activity induced by PAA-*g*-Dex was also effective for HL-60 cells. Finally, I designed a novel cationic comb-type copolymer specifically activating E5 on target cells.

In conclusion, effective artificial chaperones which promoted the interaction with lipid membranes, folding without aggregation and enhanced the target specificity were designed. This knowledge is envisioned to be helpful in design of tools for artificially programming cellular functions such as substance transportation and cell death.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).