

TSUBAME 共同利用 令和 4 年度 学術利用 成果報告書

利用課題名 機能性ペプチド提示エクソソームの創製
英文: Development of exosome with displaying functional peptides

利用課題責任者
Yoshimasa Kawaguchi

所属
Kyoto University, Institute for Chemical Research
URL: <https://www.kuicr.kyoto-u.ac.jp/sites/>

邦文抄録(300 字程度)

近年、エクソソームは薬物送達キャリアとして注目を浴びている。一方で、その特異性や膜融合効率については課題が残されている。そこで、本研究では、エクソソームに提示されている CD63 において機能性ペプチドをグラフトすることで、細胞への取り込み促進や標的化することを目的に検討を行った。まず、機能性ペプチドをグラフトするのに適したループかどうか CD63 の細胞外ループにおいて揺らぎの計算を実施した。その結果、CD63 の細胞外ループは比較的揺らぎが小さいことがわかった。さらに、それらのループに機能性ペプチドをグラフトしたところ、野生型の CD63 と比較して大きく発現パターンや細胞局在が変化する領域があることが明らかとなった。今後は、グラフトがおよぼす発現への影響と揺らぎの関係を明らかにしていく予定である。

英文抄録(100 words 程度)

Exosomes have gained attention as a drug delivery carrier, but their specificity and membrane fusion efficiency are still challenging. This study aims to promote cell uptake and targeting by grafting functional peptides onto CD63, which is presented on exosomes. The extracellular loops of CD63 were found to have relatively low fluctuations and suitable for grafting. Grafting functional peptides onto these loops revealed significant changes in expression patterns and cellular localization. Further research will focus on the relationship of grafting on expression and fluctuations.

Keywords: 5つ程度

exosome, graft, peptide, CD63, fluctuation,

背景と目的

エクソソームは、細胞外小胞体であり、細胞から分泌され、異なる細胞間の情報伝達や、疾患の診断や治療のバイオマーカーとして注目されている。しかし、エクソソームを治療や診断に応用するには、標的細胞への送達や取り込みを促進させる必要がある。また、エクソソームに薬物等を内封して薬物送達に利用する場合、標的細胞に取り込まれた後に膜融合による薬物のサイトゾルへの放出が必要であり、効率的な膜融合の促進も課題の一つである。これらの問題を解決することで、エクソソームがより一層有用性の高い drug delivery system に発展させられると考えられる。そこで本プロジェクトでは、機能性ペプチドをエクソソームのマーカータンパク質である CD63 にグラフトし、標的細胞への送達や取り込み促進を達成することを目的とした。

概要

エクソソームは、細胞から放出される 50nm から

150nm の細胞外小胞の一種である。エクソソームは、マイクロ RNA やタンパク質などを内包しており、細胞間コミュニケーションツールとしての役割を果たしており、がん診断や薬物送達キャリアとしても注目されている。一方で、薬物キャリアとして活用するには、エクソソームを標的細胞に特異的に送達する必要がある。そこで、エクソソームの表面に機能性ペプチドを導入することで、新たな機能性エクソソームの創製を目指した。各種機能性ペプチドを CD63 の細胞外ループにグラフトすることで、標的化や取り込み促進が可能かどうか検討した。

結果および考察

CD63 の細胞外ループを 157-164、165-172、173-180 の 3 つの領域に分割して、それぞれの配列と機能性ペプチドのモデル配列として FLAG tag を入れ替え、AMBER によ

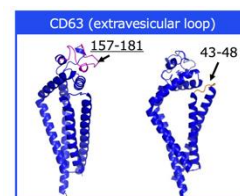


図 1. CD63 の細胞外ループ領域。

って構造の揺らぎ計算を実施した (図 1)。その結果、CD63 の細胞外ループ領域はどのペプチド配列でも揺らぎはほとんどないと算出された。次に、機能性ペプチドをグラフトした CD63 を細胞に発現させた。157-164 にグラフトした場合は、野生型の CD63 と比較して、ほとんど細胞内局在や糖鎖修飾において変化はなく、良好な発現パターンを示した(下図)。その一方で、FLAG 抗体による免疫染色では、弱い蛍光シグナルが検出された。計算された構造において、このループ領域は強固にヘアピン構造をとっていることから、抗体に認識されにくかったと示唆された。次に、165-172、173-180 に対して、FLAG 配列をグラフトした場合には、野生型 CD63 と比較して、細胞内局在が大きく変化し、ウェスタンブロットにおいても多量体のバンドが確認された(図 2)。特に、小胞体に多くが滞留してしまっていることから、

数多くあるものの、その細胞内局在や多量体化については検討されてこなかった。よって、今後、グラフトが与える細胞内局在の変化について詳細に検討することで、細胞内局在や多量体による凝集を回避し、ユニバーサルに機能性ペプチドを提示可能なループ領域の探索を実施する。

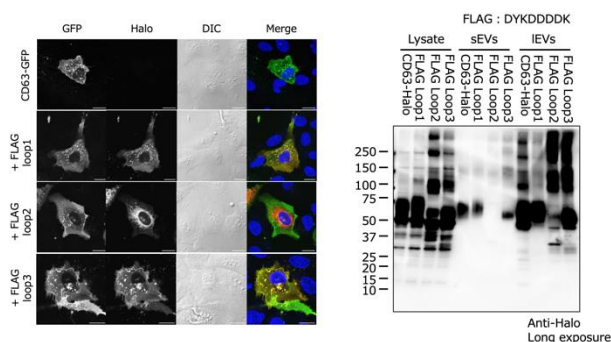


図 2. CD63-GFP と FLAG グラフトした CD63-Halo を発現させた細胞における免疫染色 (左). ウェスタンブロット (右)

これらの領域にグラフトすることで、多量体化または凝集し細胞内輸送に影響を与えていると考える。特に、165-172 には二つのシステインがあり、野生型ではジスルフィド結合を形成しており、グラフトすることによって、ループ中のジスルフィド結合を適切に形成できなくなって、チオールが剥き出しになったことで小胞体において多量体が形成され、輸送が正常に行われなかったことが原因ではないかと考えられた。

まとめ、今後の課題

CD63 に機能性ペプチドをグラフトし、構造の揺らぎを計算したところ変化はなかったことから、エントロピーロスなく機能性ペプチドを提示できる可能性が示唆された。一方で、グラフトするループによっては局在が変化したり、多量体化することが明らかとなった。これまで、CD63 に機能性分子を遺伝子工学的に導入した例は