

TSUBAME 共同利用 令和 5 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 exosomes 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。それらのループに対してモデルペプチドをグラフトしたところ、野生型の CD63 と比較して発現が変化する領域があることがわかった。よって変化の小さい領域に対して、標的化ペプチドを搭載した。一方で、標的タンパク質への結合は確認できず、構造的揺らぎが標的タンパク質結合へ重要であることが示唆された。

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 were suitable for grafting. Grafting model peptides onto these loops showed regions where expression changed compared to wild-type CD63. Therefore, we equipped targeting peptides onto regions with minimal changes. However, binding to the target protein was not confirmed, suggesting that structural fluctuations may be crucial for target protein binding.

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

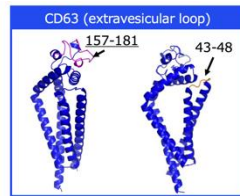


図 1. CD63 の細胞外ループ領域.

された。次に、FLAG をグラフトした CD63 を細胞に発現させた。その結果、165-172 にグラフトした際に、発現パターンが野生型の CD63 と比較して大きく変化することが明らかとなった。この原因として、ループ中にシステインが含まれており、ジスルフィド結合に大きな影響を与えることが原因であると考えられた。よって、ループ 157-164 および 173-180 の 2 箇所について、それぞれ標的化ペプチドをグラフトして標的タンパク質への結合を評価した。その結果、標的タンパク質への結合は確認できなかった。

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。揺らぎが小さく、発現パターンが維持される領域に対して標的化ペプチドをグラフトしたところ、標的タンパク質への結合は確認できなかったため、ある程度の揺らぎがあることが適切な結合モードを取ることに重要である可能性が考えられた。今後は、このエントロピーロスのない状態で結合可能な配列の探索を display screening を活用して行い、標的化を実現する。