

医学的応用に向けた細菌毒素に由来する 機能性ナノバイオツールの作製

田端 厚之^{1*}, 坂倉 永里子², 友安 俊文¹, 長宗 秀明¹

Development of Functional Nano-Bio Tool Derived from Bacterial Protein Toxin for Clinical Application

by

Atsushi TABATA, Eriko SAKAKURA, Toshifumi TOMOYASU, Hideaki NAGAMUNE

A novel functional protein tool derived from cholesterol-dependent cytolysin was developed and its application for clinical field such as a drug delivery system was investigated. This tool is composed of both of a functional-domain to connect the drug carrier and a targeting-domain to recognize the target cell. The recombinant protein consisted of a lung tumor specific peptide, domain 1-3 of intermedilysin with an introduced disulphide-bond to block the conformational change and pore-formation, and domain 4 of *Streptococcus mitis*-derived human platelet aggregation factor, was prepared using bacterial-expression system then investigated its function. It was shown that the prepared protein tool could specifically deliver a model of drug-carrier vesicles to human lung tumor cells *in vitro*. This result suggests that the novel functional protein tool constructed in this study has the superior properties for clinical application.

Key words: Cholesterol-Dependent Cytolysin, Functional Protein Tool, Drug Delivery System,
Clinical Application, Bacterial Protein Toxin

-
- 1 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部
Department of Biological Science and Technology,
Life System,
Institute of Technology and Science,
The University of Tokushima Graduate School
2 徳島大学大学院先端技術科学教育部
Graduate School of Advanced Technology and Science,
The University of Tokushima

*連絡先: 〒770-8506 徳島市南常三島町2-1
徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部

1. まえがき

ある種の病原性グラム陽性細菌が産生する毒素タンパク質として、コレステロール依存性細胞溶解毒素(CDC)が知られている。CDCは標的細胞膜上に存在する受容体を介して結合後、数十分子が会合して環状構造体を形成し、CDCの分子構造が変化することによって直径250-300Åの孔を形成することにより細胞毒性を示す⁽¹⁾。このCDCの分子構造は

ファミリー間で高度に保存されている4つのドメインから構成され、分子構造が変化して細胞膜に穴を開けて毒性を示すドメイン1-3(膜孔形成部)と、細胞膜結合性を示すドメイン4(細胞結合部)に機能的に分けられる⁽¹⁾。このように、CDC分子全体では細胞毒性を示すが、CDCの各構成部分に限定して注目してみると、個々の部分構造は広範な応用性を秘めた機能性ドメインであることが見出される。我々は、ヒトに対して日和見的に感染し、時に脳や肝臓などの深部臓器に重篤な膿瘍を形成する*Streptococcus intermedius* が産生するCDCであるインターメディシン(ILY)の構造や機能に関する研究を一貫して行っており、これまでに様々な知見を得ている⁽²⁾⁽⁶⁾。ILYは典型的なCDCとは異なって細胞膜コレステロールを受容体とはせず、生体内で過度の免疫応答から自己の細胞傷害を保護するために重要な細胞膜タンパク質であるヒト型CD59を受容体とすることによって、ヒト細胞特異的な作用特性を示す⁽⁷⁾。この特性はILYを細胞傷害性の毒素分子と認識する上では我々にとっては大変な脅威であるが、その部分構造に注目した場合はヒト細胞に特異的に反応性を示す機能分子としての利用が想定されて興味深い。また、ILYの発見と時期を同じくして、川崎病患児から分離された*Streptococcus mitis* Nm-65株からヒトの血小板凝集活性を示す*Streptococcus mitis*由来ヒト血小板凝集因子(Sm-hPAF)が報告され⁽⁸⁾、その後の検討でこの分子はCDCに属し、典型的なCDCと同様に細胞膜コレステロールを受容体として認識するのみならず、ILYと同様にヒト型CD59も認識することが明らかになった。以上のILYおよびSm-hPAFが示す受容体認識性は、ヒト細胞指向的な分子特性として様々な応用性が期待される。

ところで、近年の分子生物学分野の発展は目覚ましく、タンパク質などの生体分子の人工的な機能改変が可能となってきた。例えば、酸化還元条件の制御によって開裂可能なジスルフィド結合(SS結合)をILYの膜孔形成に関与する領域に導入して分子内での構造変化を抑制すると、即時には膜孔形成活性を発現しないが、還元開裂処理で随時に活性化可能な機能分子に変換が可能である。また、上記のように部分的な分子修飾に止まらず、本来は持ち合わせない異種タンパク質の機能部位を分子生物学的手法によって特定のタンパク質と融合させることも可能であり、このような‘キメラタンパク質’は次世代の新規有用機能分子として注目されている。

本研究では、多くのCDCの中から水溶性や安定性に優れ、ヒト指向的な認識性を示すILYおよびSm-hPAFを研究対象とし、我々がこれまでに蓄積してきた豊富な知見に基づいて、

分子生物学的手法によって本来の毒素分子の機能に付加価値を付与した新規機能性分子の構築について検討を行った。具体的には、ILYに対して膜孔形成活性を制御するためSS結合を導入して分子構造の変化を抑制した分子を構築し、またそのドメイン4をSm-hPAFのドメイン4と変換することによってヒト型CD59と細胞膜コレステロールの双方に結合性を示すCDC(ss)分子を考案した。さらに、その細胞膜結合部の対極に位置するドメイン1のN末端に肺癌細胞を特異的に認識するペプチドであるlung tumor specific peptide(LTSP)⁽⁹⁾を連結したキメラ体(LTSP-CDC(ss))を作製し、細胞膜結合部を介してリボソームやモデル細胞膜(主に赤血球膜)を損傷せずに結合することが可能な新規分子を考案した。この分子は、LTSPの標的であるヒト肺癌細胞に集積して結合した後に、還元開裂剤の投与によってSS結合が開裂して本来の毒素機能を発揮し、その結果、標的細胞を破壊することが可能となる。このシステムは、副作用(非特異的作用)の少ない効果的な薬剤封入リボソームのドラッグデリバリーシステムに応用が可能であると期待される。

2. 方法

2.1 機能性ナノバイオツールの分子設計

今回設計した機能性ナノバイオツールは、標的細胞(癌細胞など)を特異的に認識して結合するターゲティングドメイン、毒素タンパク質の機能および特性を利用した機能性ツールであるCDC機能ドメイン、の両ドメインを有し、CDC機能ドメインのC末端に存在するドメイン4に運搬対象(薬剤封入リボソームなど)を連結させることにより構成される(Fig.1B)。今回の研究では、これまでの我々の研究によって蓄積されてきた知見を基にして、*Streptococcus intermedius* が産生するヒト細胞に特異的な細胞傷害毒素タンパク質であるILYをCDC機能ドメインの原型として選択した(Fig.1A)。なお、野生型のILYでは標的細胞膜への結合に続いてILY分子の集合と分子構造変化を伴った一連の反応が進行し、結果として細胞膜に孔を形成してしまう。そこで、SS結合をILYの分子内、具体的にはドメイン2と膜孔形成時に構造変化を生じるドメイン3の間に導入することによって、細胞膜結合能を保持したままで膜孔形成能を抑制した改変体ILY(ss)を構築した。さらに、ILYそのままでは、その受容体認識特性によって運搬対象との連結がヒト型CD59を介してのみに限定されてしまうため、ILYのドメイン4をSm-hPAFの該当部位に置換することによって、ヒト型CD59のみならず細胞膜コレステロールとの結合性も示す分子を考案

した。また、ターゲティングドメインに採用する分子としては分子構造に対する立体障害性を最小限にするために低分子ペプチドに注目し、肺癌細胞を優先的に認識して結合するペプチドとして報告されているlung tumor specific peptide (LTSP)を選択した⁹⁾。これらの両部位を融合させたタンパク

質を組換えキメラタンパク質として大腸菌発現系を用いて調製した。なお、機能性ナノバイオツールに連結する運搬対象としては、赤血球膜およびフルオレセインを封入したコレステロール含有リポソームを用いた (Fig.1B)。以上の構造を有した機能性ナノバイオツールを、以後プロトタイプツールと表記する。

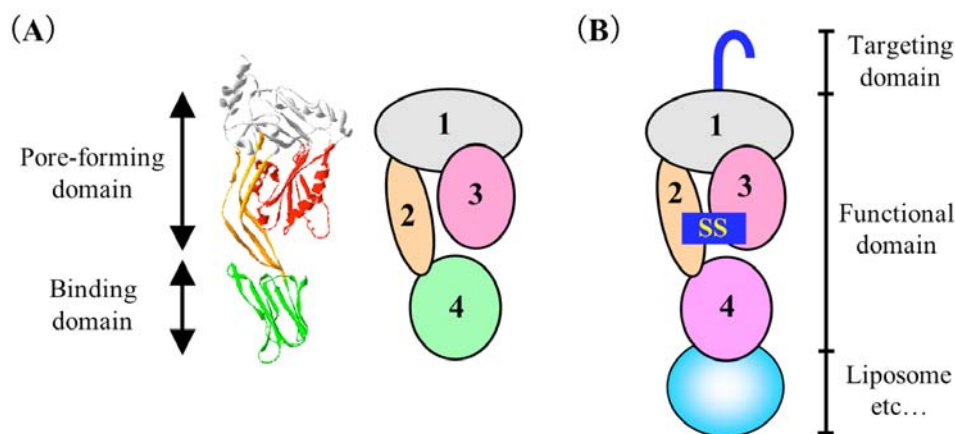


Fig. 1: Model structure of ILY (A) and its derivative functional protein tool (B). Domain 4 was swapped with that of Sm-hPAF in (B).

2.2 プロトタイプツールの運搬対象モデル送達能の評価

ヒト肺癌細胞A549を細胞培養プレートに播種し、通常の細胞培養条件で48時間培養した。培養後、蛍光観察を行うために赤色蛍光色素Nile Redで標識化した赤血球膜(NR)を運搬対象として連結したLTSP-CDC(ss) (LTSP-CDC(ss)-NR)、および比較対照としてターゲティングドメインを持たないCDC機能ドメインのみのCDC(ss)にNRを連結させた分子(CDC(ss)-NR)およびNRのみを準備し、A549の培養液に添加して結合反応を行った。反応後の培養上清を除去してPBSで洗浄後、倒立型蛍光顕微鏡 (Axiovert 135, ZEISS) 及び顕微鏡用高精度デジタルカメラ (DXM 1200, ニコン) を用いて観察した。

2.3 プロトタイプツールの標的細胞認識特異性の評価

プロトタイプツールの標的細胞認識特異性の評価は、プロトタイプツールの標的であるヒト肺癌細胞A549とその対照として用いたヒト正常線維芽細胞NB1RGBの混合培養に対して検討を行った。また、プロトタイプツールとして連結させる運搬対象モデルには緑色蛍光色素フルオレセインを内部に封入して蛍光ラベルした平均粒径100nmのコレステロール含有リポソーム(FCL)を選択し、LTSP-CDC(ss)-FCLを調製して用いた。作製したサンプルの観察は、共焦点レーザー顕微鏡システム

(倒立顕微鏡ECLIPSE TE2000-E, Nikon)を用いて行った。

3. 結果と考察

3.1 機能性ナノバイオツールの分子設計

Fig.1Bで設計した機能性ナノバイオツールについて、ターゲティングドメインとCDC機能ドメインはキメラタンパク質として大腸菌発現系を用いて発現させ、精製を行った。目的タンパク質を発現させるための発現ベクターを遺伝子組換え技術を用いて作製し、その遺伝子配列が目的通り構築されていることを遺伝子配列解析により確認した。この発現ベクターを大腸菌に導入して発現系を構築した結果、効率的な目的タンパク質の発現を確認し、比較的簡便な精製過程を経て高純度かつ高収量(1リットルの培養系からmgオーダーの目的タンパク質の精製が可能)で目的タンパク質を調製することができた。

続いて精製した組換えキメラタンパク質の機能に関する検討を行った。まず、ドメイン4の細胞膜結合能について赤血球膜との結合性で評価した結果、組換えキメラタンパク質においても元来のドメイン4と同様に細胞膜結合性が確認された。また、機能ドメイン分子内に導入したSS結合の存在と機能については還元条件下での溶血活性測定によって評価した結果、還元条件下でSS結合が開裂することにより元来の分子と同等の溶血活性を示した。以上より、作製したLTSP-CDC(ss)が運搬

対象モデルである赤血球膜との結合能を有すること、また赤血球膜の開封を還元剤により制御することが可能であることを確認した。

3.2 プロトタイプツールの運搬対象モデル送達能の評価

調製したLTSP-CDC(ss)のターゲティングドメインであるLTSP部分が、組換えキメラタンパク質として融合発現させた場合でも肺癌細胞を特異的に認識して結合する機能を保持しているかについて、運搬対象モデルとしてNile Redで蛍光標識した赤血球膜(NR)を用いて検討を行った。その結果、

CDC(ss)-NRおよびNRではヒト肺癌細胞株A549への結合が確認されなかった(Fig. 2A, BおよびE, F)のに対し、LTSP-CDC(ss)-NRはA549への結合が観察された(Fig. 2C, G)。一方、ヒト正常線維芽細胞株NB1RGBではLTSP-CDC(ss)-NRの結合は観察されなかった(Fig. 2D, H)。以上の結果から、作製したLTSP-CDC(ss)-NRは、運搬対象モデルである赤血球膜を連結した状態でLTSPを介してヒト肺癌細胞A549を認識して特異的に結合する機能を有することが確認された。

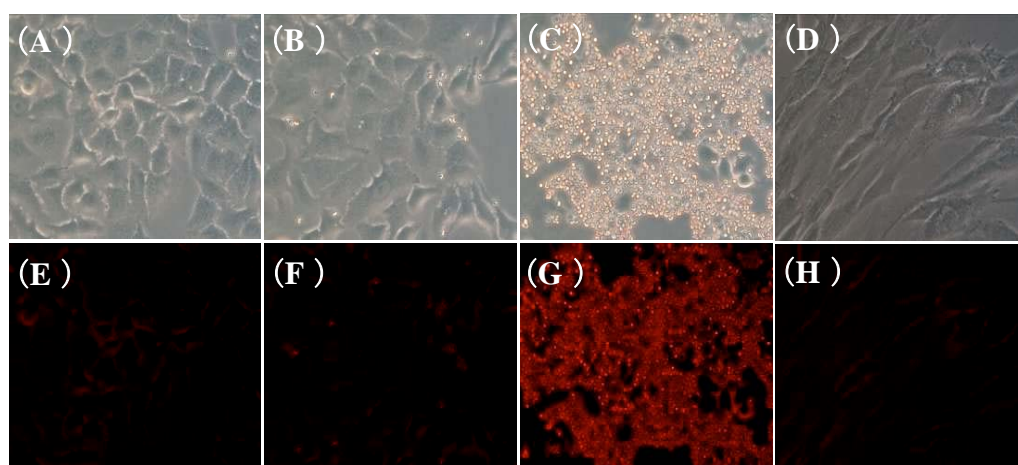


Fig. 2: Functional and effective delivery of LTSP-CDC(ss)-NR to target cells. A549 (A, B, C, E, F, G) and NB1RGB (D, H) treated with NR (A, E), CDC(ss)-NR (B, F), and LTSP-CDC(ss)-NR (C, D, G, H) were observed in bright field (A, B, C, D) and dark field (E, F, G, H), respectively .

3.3 プロトタイプツールの標的細胞認識特異性の評価

上記の単独培養系における検討に続き、ヒト肺癌細胞株A549とヒト正常線維芽細胞株NB1RGBを混合培養した系について、作製したプロトタイプツールの標的細胞認識特異性を評価した。基本的には先の単独培養系と同様に行ったが、プロトタイプツールをより実用モデルに近づけるために、運搬対象モデルとして緑色蛍光色素フルオレセインを封入したコレステロール含有リポソーム(FCL)を検討に用いた。その結果、混合培養系においても、また運搬対象としてFCLを用いた場合でも、プロトタイプツールLTSP-CDC(ss)-FCLはA549を特異的に認識して結合することが示された(Fig. 3)。以上の結果より、本研究で設計し作製したプロトタイプツールは、ターゲティングドメインとCDC機能ドメインのそれぞれの機能を保持して組換えキメラタンパク質として調製され、赤血球膜やコレステロール含有リポソームなどの運搬対象モデルを連結した状態で

標的細胞に特異的に送達可能であることが示された。

今後は、特にターゲティングドメインについて更に改良を加え、標的とする細胞種や組織の適用範囲の拡大を目指して検討を行うことが必要である。また、最終的にこの機能性ナノバイオツールの医学的応用を考える場合は、その詳細な作用特性や作用メカニズムを明らかにしておく必要がある。そのため基礎的な研究についても、継続して行っていく予定である。

4. 結言

本研究は、一般的には我々の敬遠対象である細菌由来の毒素タンパク質について、その部分構造と機能に注目することによってこれまで見過ごされてきた機能を再発掘し、その応用を目指した基礎研究である。特に応用を目指す分野に関しては、癌治療などで注目されている作用部位特異的なドラッグデリバリーシステムに着目した。本研究の特色は、まさに「禍

(細菌毒素)を転じて福(機能性ナノバイオツール)と成す」という逆転の発想の元で、細胞性医薬品や薬品封入リポソームによるドラッグデリバリーシステムなどの医療分野への応用が可能な機能性ナノバイオツールの開発を目指している。本研

究の進展状況に関しては、実用化を考えた場合はまだ取り組むべき課題が山積であるが、着実にその有用性が見出されてきている。従って、今後の研究展開が多いに期待される。

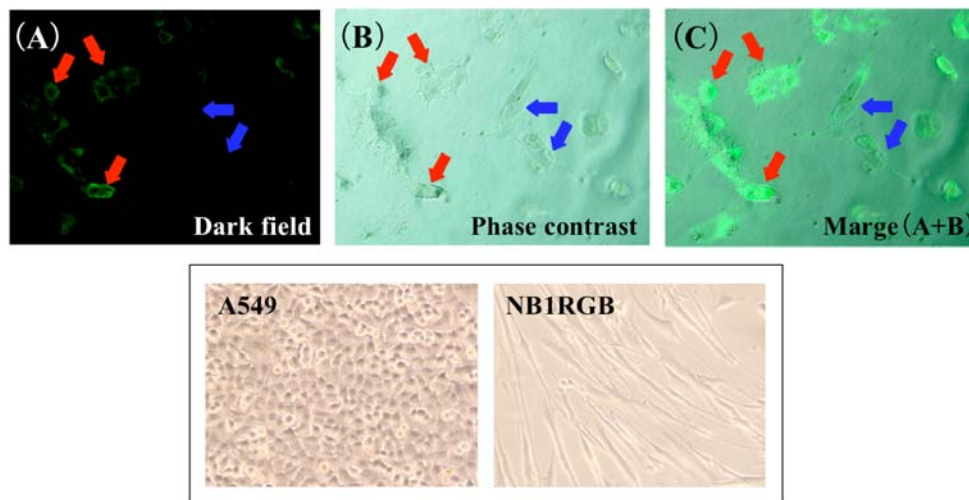


Fig.3. Specificity of the model vehicle delivery for LTSP-CDC(ss)-FCL to target cell. Dark field observation (A) was indicated the specific delivery of LTSP-CDC(ss)-FCL to A549 in the mixed culture system. LTSP-CDC(ss)-FCL was specifically bound to A549 (red arrow). However, little binding was shown to NB1RGB (blue arrow). Typical morphology of A549 and NB1RGB was also shown in the square bracket.

5. 謝辞

本研究は、平成19年度徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部研究プロジェクトによる研究成果の一部をまとめたものです。本研究の助成を賜りました関係者各位に、深く感謝致します。また、本研究の成果は第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会(BMB2008)にて発表致しました。本研究にご協力頂きました皆様に、重ねて厚く御礼申し上げます。

6. 参考文献

1) R. K. Tweten: Cholesterol-Dependent Cytolysins, a Family of Versatile Pore-Forming Toxins, *Infection and Immunity*, Vol. 73, No. 10, 6199-6209 (2005).

2) H. Nagamune, C. Ohnishi, A. Katsuura, K. Fushitani, R. A. Whiley, A. Tsuji, Y. Matsuda: Intermedilysin, a novel cytotoxin specific for human cells secreted by *Streptococcus intermedius* UNS46 isolated from a human liver abscess, *Infection and Immunity*, Vol. 64, No. 8, 3093-3100 (1996).

3) M. G. Macey, R. A. Whiley, L. Miller, H. Nagamune: Effect on polymorphonuclear cell function of a human-specific cytotoxin, intermedilysin, expressed by *Streptococcus intermedius*. *Infection and Immunity*, Vol. 69, No. 10, 6102-6109 (2001).

4) H. Nagamune, K. Ohkura, A. Sukeno, G. Cowan, T. J. Mitchell, W. Ito, O. Ohnishi, K. Hattori, M. Yamato, K. Hirota, Y. Miyake, T. Maeda, H. Kourai: The human-specific action of intermedilysin, a homolog of streptolysin O, is dictated by domain 4 of the protein, *Microbiology and Immunology*, Vol. 48, No. 9, 677-692 (2004).

5) H. Nagamune, K. Ohkura, K. Umezu, H. Shouji, H. Kourai: A cell membrane modification technique using domain 4 of intermedilysin for immunotherapy against cancer, *Anticancer Research*, Vol. 24, No. 5C, 3367-3372 (2004).

- 6) A. Sukeno, H. Nagamune, R. A. Whiley, S. I. Jafar, J. Aduse-Opoku, K. Ohkura, T. Maeda, K. Hirota, Y. Miyake, H. Kourai: Intermedilysin is essential for the invasion of hepatoma HepG2 cells by *Streptococcus intermedius*, *Microbiology and Immunology*, Vol. 49, No. 7, 681-694 (2005).
- 7) K. S. Giddings, J. Zhao, P. J. Sims, R. K. Tweten: Human CD59 is a receptor for the cholesterol-dependent cytolysin intermedilysin, *Nature Structural and Molecular Biology*, Vol. 11, No. 12, 1173-1178 (2004).
- 8) H. Ohkuni, Y. Todome, F. Okibayashi, Y. Watanabe, N. Ohtani, T. Ishikawa, G. Asano, S. Kotani: Purification and partial characterization of a novel human platelet aggregation factor in the extracellular products of *Streptococcus mitis*, strain Nm-65, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Vol. 17, No. 2, 121-129 (1997).
- 9) T. Oyama, K. F. Sykes, K. N. Samli, J. D. Minna, S. A. Johnston, K. C. Brown: Isolation of lung tumor specific peptides from a random peptide library: generation of diagnostic and cell-targeting reagents, *Cancer Letter*, Vol. 202, No. 2, 219-230 (2003)