

ポリヒスチジンの上皮細胞層透過機構の解明と応用研究

所属： 鳥取大学 農学部

助成対象者： 岩崎 崇

概要

細胞膜透過ペプチドである『ポリヒスチジン(His16)』は、腸管上皮細胞層を透過する。そこで、His16にインスリンの分泌を促進する生理活性ペプチドGLP-1を融合することで、経口投与が可能な『経口インスリン制御剤』の開発に挑戦した。GLP-1のNまたはC末端に、His16を付加したHis16-GLP-1またはGLP-1-His16を遺伝子工学的手法により調製した。興味深いことに、未修飾GLP-1と比較して、His16-GLP-1は約2倍のインスリン分泌促進活性を示した。しかし、His16-GLP-1およびGLP-1-His16ともに、有意な腸管上皮細胞層透過は示さなかった。この結果は、His16単独と比較して、His16融合GLP-1では分子量が増加したことに起因すると推測される。一方で、GLP-1のN末端に連続したHis残基を付加することで、生理活性が増強するという予想外の結果を得ることができた。

abstract

New cell-penetrating peptide, His16 peptide, passes the intestinal epithelial monolayer. The His16 peptide is expected as an oral drug delivery carrier. Here, we tried to transport glucagon-like peptide-1 (GLP-1) through the intestinal epithelial monolayer using the His16 peptide. We prepared the hybrid peptide of GLP-1 and His16 peptide. The hybrid peptide showed approximately two times higher insulin secretion-promoting activity than intact GLP-1. However, the hybrid peptide showed no permeability across the intestinal epithelial monolayer. This result may be caused by the limitation of molecular weight delivered by the His16 peptide.

研究内容

背景

これまでに我々の研究室では、新しい細胞膜透過ペプチドである『ポリヒスチジン (His16)』を発見した。ポリヒスチジン (His16) の特徴として、①非常に高い細胞膜透過を示す、②血清の影響を受けない、③タンパク質に融合することで簡便な精製(アフィニティ精製)と細胞内導入が可能になる…といった利点を確認されている¹⁾。さらに、最近の研究から、ポリヒスチジン (His16) は人工的に構築した腸管上皮細胞層を透過するという知見が得られている。ヒト結腸がん細胞株 CaCo-2 を使用したトランスウェルアッセイの結果、腸管上皮細胞層を透過する代表的な細胞膜透過ペプチド(オクタアルギニン: Arg8)と比較しても、ポリヒスチジン (His16) は高い透過率を示すことが確認された(図 1)。

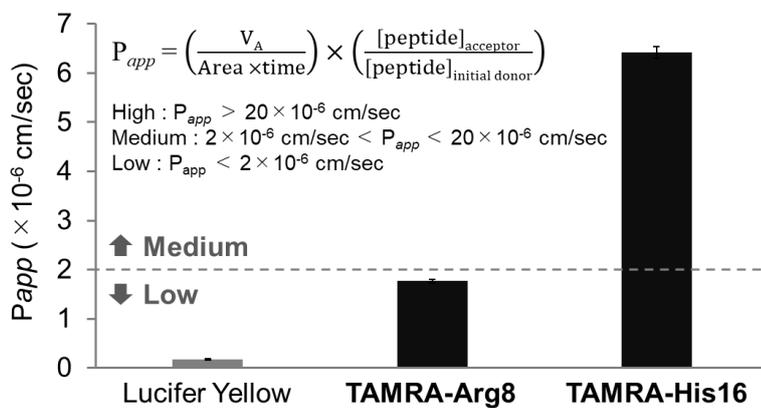


図 1. 人工的に構築した腸管上皮細胞層 (CaCo-2 細胞) に対する透過率を示す。Arg8 または His16 は蛍光色素 TAMRA (Tetramethyl rhodamine) 修飾した。また、Lucifer Yellow は腸管上皮細胞層を透過しないコントロール化合物として使用した。 P_{app} 値が 2 以下の場合には透過効率が低く、2-20 の間であれば中程度を意味する。

目的

そこで本研究では、ポリヒスチジン (His16) を利用した経口薬の開発を目指した。具体的には、インスリンの分泌を促進する生理活性ペプチドである『GLP-1 (Glucagon-like peptide-1)』とポリヒスチジン (His16) を融合することで、経口投与による体内吸収が可能な『経口インスリン制御剤』の開発に挑戦した。

結果

生理活性を有する GLP-1 (7-37) (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG) の N 末端または C 末端に、ポリヒスチジン (His16) を付加した融合ペプチド (His16-GLP-1 または GLP-1-His16) を遺伝子工学的手法により調製した(図 2)。この調製過程において、ポリヒスチジン (His16) は His-Tag として機能し、簡便なアフィニティ精製が可能であることを確認した。

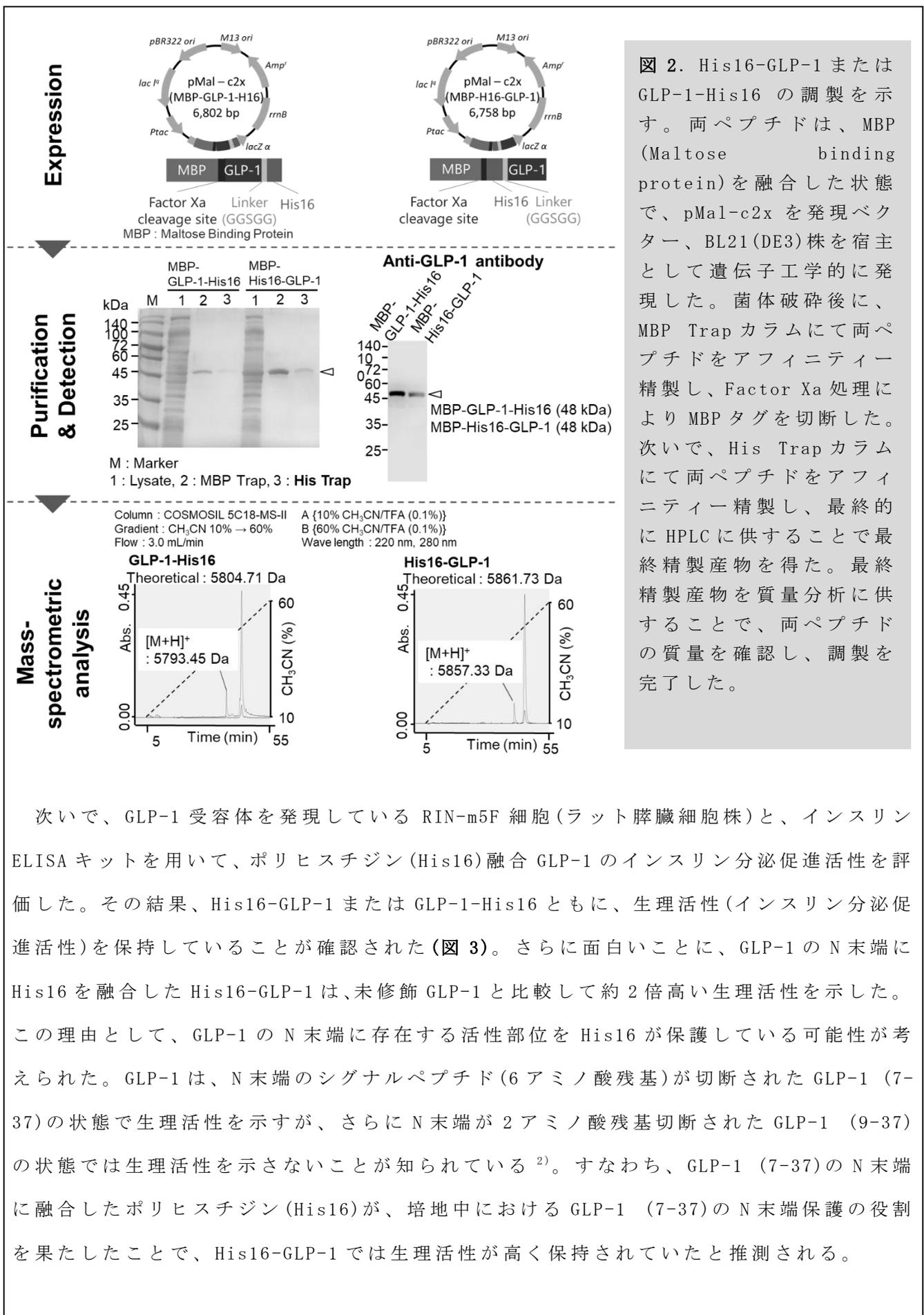


図 2. His16-GLP-1 または GLP-1-His16 の調製を示す。両ペプチドは、MBP (Maltose binding protein) を融合した状態で、pMal-c2x を発現ベクター、BL21 (DE3) 株を宿主として遺伝子工学的に発現した。菌体破碎後に、MBP Trap カラムにて両ペプチドをアフィニティー精製し、Factor Xa 処理により MBP タグを切断した。次いで、His Trap カラムにて両ペプチドをアフィニティー精製し、最終的に HPLC に供することで最終精製産物を得た。最終精製産物を質量分析に供することで、両ペプチドの質量を確認し、調製を完了した。

次いで、GLP-1 受容体を発現している RIN-m5F 細胞 (ラット膵臓細胞株) と、インスリン ELISA キットを用いて、ポリヒスチジン (His16) 融合 GLP-1 のインスリン分泌促進活性を評価した。その結果、His16-GLP-1 または GLP-1-His16 ともに、生理活性 (インスリン分泌促進活性) を保持していることが確認された (図 3)。さらに面白いことに、GLP-1 の N 末端に His16 を融合した His16-GLP-1 は、未修飾 GLP-1 と比較して約 2 倍高い生理活性を示した。この理由として、GLP-1 の N 末端に存在する活性部位を His16 が保護している可能性が考えられた。GLP-1 は、N 末端のシグナルペプチド (6 アミノ酸残基) が切断された GLP-1 (7-37) の状態で生理活性を示すが、さらに N 末端が 2 アミノ酸残基切断された GLP-1 (9-37) の状態では生理活性を示さないことが知られている²⁾。すなわち、GLP-1 (7-37) の N 末端に融合したポリヒスチジン (His16) が、培地中における GLP-1 (7-37) の N 末端保護の役割を果たしたことで、His16-GLP-1 では生理活性が高く保持されていたと推測される。

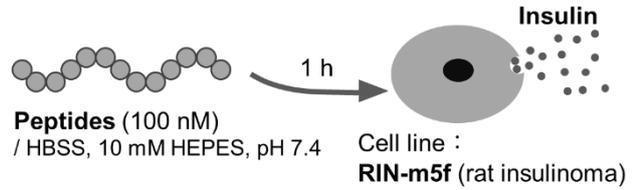
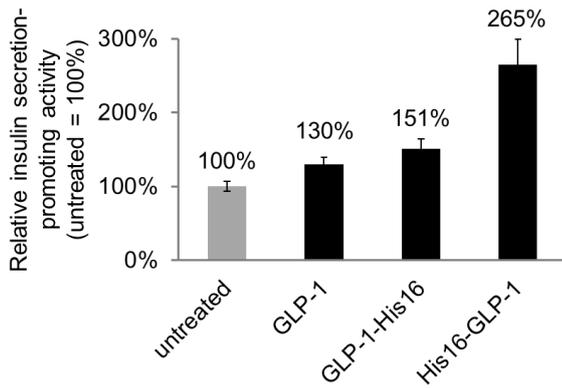


図 3. GLP-1 およびポリヒスチジン (His16) 融合 GLP-1 のインスリン分泌促進活性を示す。各ペプチドを RIN-m5F 細胞に添加し、1 時間後に培養上清に分泌されたインスリンを ELISA により定量した。

そこで、人工的に構築した腸管上皮細胞層 (cell monolayer) の上部 (Apical 側) から、ポリヒスチジン (His16) 融合 GLP-1 を添加し、腸管上皮細胞層の下部 (Basolateral 側) へ移行したポリヒスチジン (His16) 融合 GLP-1 の生理活性を、前述と同様の手法により定量した。その結果、未修飾 GLP-1 と比較して、ポリヒスチジン (His16) 融合 GLP-1 では有意なインスリン分泌促進活性の上昇は確認されなかった (図 4A)。この原因を探るべく、ポリヒスチジン (His16) 融合 GLP-1 の腸管上皮細胞層の透過を検証したところ、His16-GLP-1 および GLP-1-His16 とともに、腸管上皮細胞層をほとんど透過していないことが確認された (図 4B)。

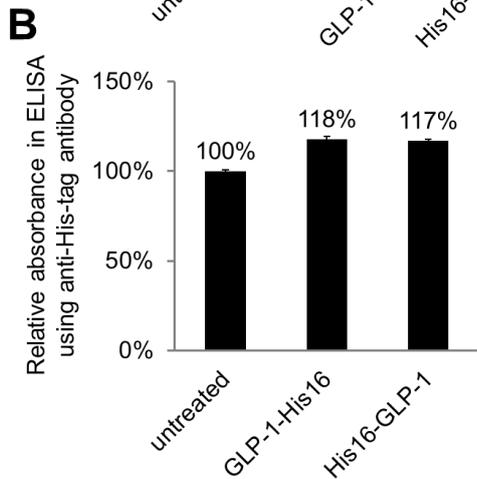
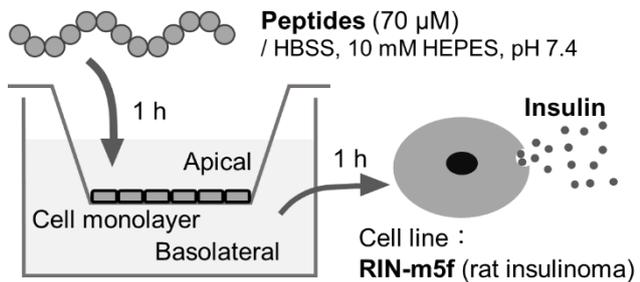
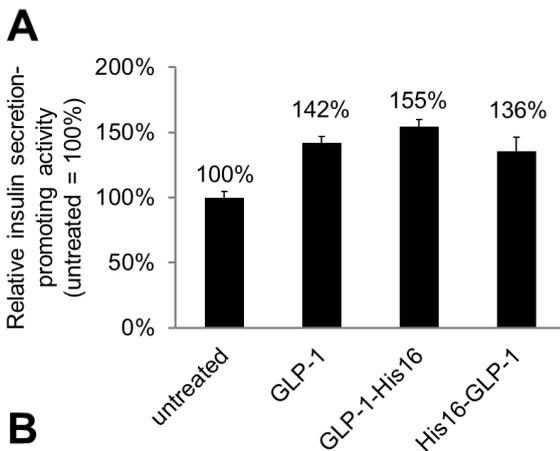


図 4. (A) 腸管上皮細胞層を透過した後の GLP-1 およびポリヒスチジン (His16) 融合 GLP-1 のインスリン分泌促進活性を示す。腸管上皮細胞層の上部から各ペプチドを添加し、下部の培養上清を RIN-m5F 細胞に添加した。1 時間後に分泌されたインスリンを ELISA により定量した。(B) 腸管上皮細胞層を透過したポリヒスチジン (His16) 融合 GLP-1 量を示す。腸管上皮細胞層の下部の培養上清に対し、抗 His-Tag 抗体を使用した免疫沈降を実施した。次いで、回収されたペプチド量を ELISA により定量した。

これまでの先行研究において、蛍光色素 (TAMRA) を修飾したポリヒスチジン (His16) は効率的に腸管上皮細胞層を透過することが確認されていた。一方で、本研究ではポリヒスチ

ジン(His16)を融合した GLP-1 は腸管上皮細胞層を透過しないことが確認された。この差は、ポリヒスチジン(His16)に融合した化合物の分子量の差に起因すると考えている。TAMRAは分子量 385.5 である一方で、GLP-1 は分子量 3355.7 である。分子量約 2970 の差が、ポリヒスチジン(His16)の腸管上皮細胞層透過の可否を分けたものと推測される。

今後

本研究では、目的としていた『経口インスリン制御剤の開発』を達成することは出来なかった。しかし一方で、副産物的な結果として、『GLP-1 の N 末端に His16 を融合することで、生理活性が約 2 倍に増強される』という知見を得ることができた。この結果は、GLP-1 の N 末端に His 残基を複数融合することで、生理活性を増強しつつ、簡便な精製(アフィニティー精製)が可能な GLP-1 を創出できることを意味している。今後は、本知見をベースにして、高機能性 GLP-1 の開発を進めていく所存である。

謝辞

本研究に対して助成いただきました、住友電工グループ社会貢献基金および関係者の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) T. Iwasaki, Y. Tokuda, A. Kotake, H. Okada, S. Takeda, T. Kawano, Y. Nakayama. (2015) *J. Control. Release*, **210**, 115-124.
- 2) C.F. Deacon. (2004) *Horm. Metab. Res.*, **36**, 761-765.

本助成に関わる成果物

[口頭発表]

- 1) Y. Uemura, S. Sasahara, Y. Nishimura, T. Kawano, T. Iwasaki: New Cell-penetrating Peptide as Oral Drug Delivery Carrier. AFELiSA 2018 (Korea)

[ポスター発表]

- 1) 植村優那、笹原駿介、西村悠希、河野強、岩崎崇：細胞膜透過ペプチドを用いた経口糖尿病治療薬の開発 第 50 回若手ペプチド夏の勉強会 (ポスター発表賞受賞)