

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18970

研究課題名（和文）細胞が遊走地点に残すミグラソームの機能解析に向けたペプチド界面の設計

研究課題名（英文）Design of peptide interface for functional analysis of migrasomes formed at the rear of migrating cells

研究代表者

大河内 美奈（Okochi, Mina）

東京工業大学・物質理工学院・教授

研究者番号：70313301

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：ミグラソームは、細胞が遊走後に接着底面に形成する大きさ約1 μ mの生体膜小胞である。本研究では、スポット合成により多様なペプチド配列を並列に合成できるペプチドアレイを用いることにより、様々な生体膜結合性ペプチドからミグラソームを安定に捕捉できるペプチドを探索した。ここで特定されたペプチドを用いた細胞培養界面は、細胞の接着、遊走、増殖および小胞の形成活性に影響がなく、従来足場タンパク質として利用してきたフィブロネクチンと比較しても安定にミグラソームを捕捉できることが示された。この機能性界面を用いることで細胞のミグラソーム形成過程およびその機能を明らかにできることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外に分泌される小胞は、様々な細胞プロセスや疾病に関与することが明らかとなり、大変注目されている。本研究では、ミグラソームと呼ばれる細胞が遊走する際に軌跡を示すように形成する細胞外分泌小胞に着目した。この小胞は近年、報告されたばかりで機能は明らかになっていない。本研究では、細胞を培養する界面設計に着目し、機能性ペプチドを選ばし利用することで、ミグラソームを安定に捕捉し長期解析可能な培養界面を構築することに成功した。今後、これを用いることによりミグラソームの形成機構や機能が明らかになれば、新たな細胞機能や疾病の制御機構が示される可能性があり、学術的にも社会的に意義深い成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：Migrasomes are biological membrane vesicles about 1 μ m in size that form on the adhesive surface at the rear of cells migration. In this study, we screened functional peptides that can stably capture migrasomes from various biological membrane binding peptides by using peptide arrays. The technique can synthesize various peptide sequences in parallel by spot synthesis process. The cell culture interface using the peptides identified herein has no negative effect on cell adhesion, migration, proliferation and vesicle formation activity, and capture migrasomes stably in comparison to the scaffolding protein of fibronectin. It is expected that the process of forming migrasomes in migrating cells and its function can be elucidated by using this functional interface.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：生体膜小胞 細胞遊走 ペプチド 細胞界面

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体は、様々な細胞から構成されており、これらの細胞がコミュニケーションをとることで、生命機能を維持している。細胞間コミュニケーションに関する分子機構は複数報告されているが、近年、血液、唾液、尿などから見出されるエクソソームが細胞機能の制御やがんなどの疾病にも関与し、細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしていることが報告されている。一方、ミグラソームは、細胞遊走後に形成されるリトラクションファイバーの分岐点付近の細胞接着底面上に細胞移動の軌跡を示すかのように形成される大きさ $1\ \mu\text{m}$ 程度の生体膜小胞であり、その中に $10\text{-}100\ \text{nm}$ 程度の大きさの小胞を多く内包していることが透過型電子顕微鏡観察により報告された(Ma L. *et al.*, Cell Res., 25, 24-38, 2015)。

我々は、様々な材料表面への細胞親和性界面の構築について検討する中で、細胞膜の蛍光イメージングを行ったところ、細胞が遊走後に多数の生体膜小胞を細胞接着底面上に形成することを見出した。これらの生体膜小胞は、上述のミグラソームの特徴と非常に類似していた。細胞接着面に観察される生体膜小胞は、その場所に後から移動してくる細胞への情報伝達、さらには細胞微小環境の構築に寄与するものと期待される。特に、水に溶けにくい脂溶性分子や、安定性の低い RNA などの生体分子を用いる局所空間での細胞間コミュニケーションにおいて、有効なツールであると考えられる。しかしながら、ミグラソームに関する研究報告は少なく、その役割はほとんど分かっていない。これは、細胞培養において用いられるペトリディッシュやガラス表面においては、ミグラソームを明視野で観察できないことや剥がれやすいことなどから注目されず、その詳細な解析が進んでいないものと思われる。そこで、ミグラソームを安定に捕捉できる細胞培養の界面を構築することで、細胞が遊走後に残すミグラソームの形成過程や機能解析を行い、細胞間コミュニケーションにおける役割を明らかにできるものと期待される。特に、周囲の細胞とのコミュニケーションにおける生体膜小胞ミグラソームの機能を明らかにすることができれば、学術的にも意義は大きいものと考えられる。

2. 研究の目的

細胞間コミュニケーションに利用される生体膜小胞形成は、細胞機能の制御やがんなどの疾病に關与する重要なバイオプロセスである。我々は、エレクトロニクス材料表面に細胞親和性の界面の構築について検討する中で、材料に自己組織的に結合するペプチド配列と細胞親和性ペプチド配列を連結したペプチドの設計を行い、結合した細胞の細胞膜を染色した蛍光イメージングを行ったところ、細胞遊走後に多数の生体膜小胞が細胞接着底面上に観察されることを見出した。これらの生体膜小胞は、細胞遊走後に形成されるリトラクションファイバーの分岐点付近に多く見られ、細胞接着底面上にあたかも細胞移動の軌跡を示すかのように形成されていた。これらの特徴から、この生体膜小胞はミグラソームではないかと考えた。

しかし、ミグラソームの機能はほとんど明らかにされていない。これは、ミグラソームを安定に捕捉し、解析する技術基盤が十分でないことに起因していると思われる。そこで本研究では、細胞が産生するミグラソームの捕捉に適したペプチド界面を設計することを目的とした。生体膜小胞を安定に捕捉するためのペプチドの選定には、多様な任意配列のペプチドを並列に化学合成できるスポット合成法を用い、生体膜との相互作用が見込まれる脂質膜結合性ペプチド、膜透過性ペプチド、インテグリンリガンドなどを候補として、細胞培養に影響がなく、ミグラソームを安定に捕捉できるペプチド配列を探索した。ミグラソーム捕捉界面を構築することで、特定の細胞に由来するミグラソームのマニピュレーションや近接細胞への情報伝達過程について詳細な解析が可能となり、ミグラソームの機能解明に向けた研究が飛躍的に進展できるものと期待される。本研究で実施する研究項目として、以下の二つが挙げられる。

- (1) 細胞およびミグラソーム結合性ペプチドの探索
- (2) ペプチド界面でのミグラソーム形成過程のイメージング

3. 研究の方法

マウス線維芽細胞 NIH-3T3 およびヒト皮膚繊維芽細胞 NHDF をダルベッコイーグル培地 (DMEM) に血清 FBS10%、ペニシリン ストレプトマイシン溶液 5% を添加し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で培養した。細胞膜透過性ペプチド 15 種類、ウイルス由来の細胞膜融合ペプチド 4 種類、カチオン性抗菌ペプチド、インテグリンリガンドなどから構成されるペプチドライブラリーをセルロース膜上に合成したペプチドアレイを用いて細胞をリン酸緩衝液中で播種することにより、生体膜結合ペプチドのスクリーニングを実施した。

探索した生体膜結合ペプチドは、C 末端に GGGC 残基を付加して合成した。架橋剤として 4-マレイミドブチロリキススクシニイミド (GMBS) を用いてアミノ基修飾ガラス基板にシステイン残基を付加したペプチドを修飾し、倒立蛍光顕微鏡を用いた細胞およびミグラソームのタイムラプス画像の取得により、ミグラソームの形成過程および消失過程を観察した。その後、 3.7% ホルムアルデヒドを用いて細胞を固定化し、CellMaskOrange により脂質膜を染色した。画像データを ImageJ によって解析し、遊走距離や軌道を解析した。次に、インテグリンリガンドと細胞膜結合性ペプチドの 2 種類のペプチドを混合して修飾することで、基板上のミグラソームと細胞を分画できるペプチド界面を構築し、ミグラソーム形成後に Ethylenediamine-N, N, N', N' - tetraacetic acid (EDTA) 処理による細胞剥離について検討した。

4. 研究成果

マウス線維芽細胞 NIH-3T3 を用いて、細胞およびミグラソームの捕捉が可能な生体膜結合ペプチドのスクリーニングを行った。細胞膜との親和性を示すことが期待される様々なペプチドで構成されるペプチドライブラリーをセルロース膜上に合成したペプチドアレイを用いて、細胞をリン酸緩衝液中で播種して洗浄後、結合した細胞数を計数することで生体膜結合ペプチドを探索した。その結果、細胞膜透過性ペプチド 2 種類およびウイルス由来細胞膜融合ペプチド 1 種類において、生体膜結合性が高いことが示唆された。そこで、これらのペプチド候補について、細胞足場としての接着活性やこれらを足場ペプチドとして用いた際の細胞生存率、生体膜小胞の形成数などを評価することで、細胞の接着、遊走、増殖および小胞の形成活性に影響のない細胞足場ペプチドを設計した。従来、細胞足場ペプチドとして用いてきたインテグリンリガンドは細胞の接着活性および細胞生存率は高い結果が得られたが、ミグラソームの形成数は少ない傾向がみられた。一方、選出された細胞膜親和性ペプチドおよびウイルス由来細胞膜融合ペプチドは、細胞の接着活性がやや低い傾向がみられたが、ミグラソームの形成数は多くリトラクションファイバーも長い傾向がみられた。また、足場タンパク質であるフィブロネクチンと比較しても高い形成数が確認された(図 1、2)。そこで、本ペプチドを用いて細胞イメージングを行ったところ、ミグラソームの形成過程および消失過程を詳細に観察することが可能であった。

次に、本ペプチドとインテグリン結合性ペプチドを混合して修飾した基板を用いて細胞培養を行うことで、両者の特性を併せもつ特性が得られた。さらに、細胞培養後に EDTA 処理による細胞の剥離も可能であり、基板に捕捉されたミグラソームとの分離を行うことができた。以上のことから、細胞遊走に伴い形成されるミグラソームを安定に捕捉し、回収することが可能なペプチドを用いた細胞界面を構築できた。今後、機能解析により細胞の情報伝達過程における役割などを明らかにできるものと期待される。

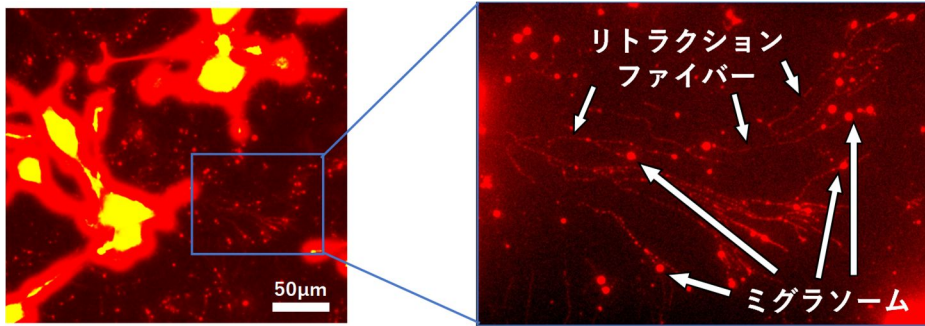


図 1 細胞が遊走後にペプチド修飾基板上に形成したミグラソームおよびリトラクションファイバー

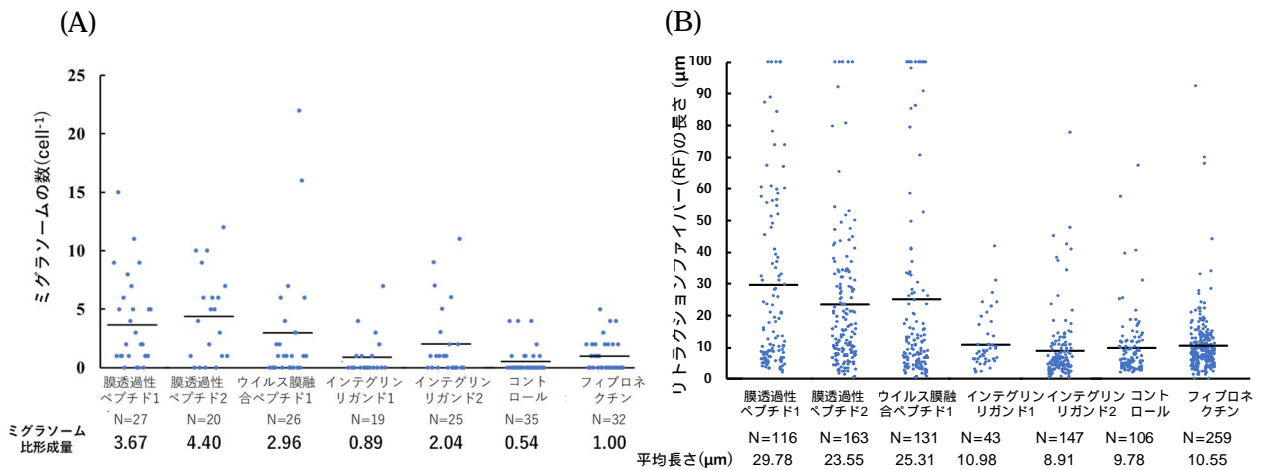


図 2 各ペプチド修飾基板上に細胞が形成したミグラソームの数(A)およびリトラクションファイバー長(B)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Komikawa Takumi, Tanaka Masayoshi, Tamang Abiral, Evans Stephen D., Critchley Kevin, Okochi Mina	4. 巻 31
2. 論文標題 Peptide-Functionalized Quantum Dots for Rapid Label-Free Sensing of 2,4,6-Trinitrotoluene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 1400 ~ 1407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.0c00117	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Komikawa Takumi, Tanaka Masayoshi, Yanai Kentaro, Johnson Benjamin R.G., Critchley Kevin, Onodera Takeshi, Evans Stephen D., Toko Kiyoshi, Okochi Mina	4. 巻 153
2. 論文標題 A bioinspired peptide matrix for the detection of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 112030 ~ 112030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2020.112030	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tanaka Masayoshi, Saito Shogo, Kita Reo, Jang Jaehee, Choi Yonghyun, Choi Jonghoon, Okochi Mina	4. 巻 21
2. 論文標題 Array-Based Screening of Silver Nanoparticle Mineralization Peptides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2377 ~ 2377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21072377	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Suwatthanarak Thanawat, Tanaka Masayoshi, Minamide Taisuke, Harvie Andrew J., Tamang Abiral, Critchley Kevin, Evans Stephen D., Okochi Mina	4. 巻 10
2. 論文標題 Screening and characterisation of CdTe/CdS quantum dot-binding peptides for material surface functionalisation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 8218 ~ 8223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0RA00460J	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka Masayoshi、Minamide Taisuke、Takahashi Yuta、Hanai Yosuke、Yanagida Takeshi、Okochi Mina	4. 巻 48
2. 論文標題 Peptide Screening from a Phage Display Library for Benzaldehyde Recognition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 978 ~ 981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.190318	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 大河内美奈、田中祐圭、丸井貴皓、筒井真楠、横田一道、鷲尾隆、谷口正輝、河合知二
2. 発表標題 フラジェリン認識ペプチドを修飾したポアセンサによる微生物の検出
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第37回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 児美川拓実・矢内健太郎・田中祐圭・大河内美奈
2. 発表標題 ペプチドアレイを用いた爆発物認識ペプチドプローブの探索
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第37回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Suwatthanarak Thanawat、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題 Screening of exosome-binding peptides from EWI-2 protein
3. 学会等名 第70回生物工学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 立松宗一郎、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題 薄層グラファイト上への細胞膜結合性ペプチド界面の構築
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大河内 美奈、児美川 拓実、矢内 健太郎、Wang Jin、田中 祐圭、小野寺 武、都甲 潔
2. 発表標題 TNT抗体フラグメントを用いた爆発性化合物の検出
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部翔太、田中祐圭、有馬彰秀、筒井真楠、谷口正輝、大河内美奈
2. 発表標題 高感度検出に向けたペプチド修飾ポアセンサの開発
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中祐圭、イルファハヌンハルリサ、高橋雄太、大河内美奈
2. 発表標題 細菌結合性ペプチドの探索とZnO表面へのone-pot修飾による細菌捕捉界面の構築
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齊藤彰吾、立松宗一郎、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題 複合ペプチドによる細胞-ナノ材料界面の構築
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第38回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Thanawat Suwattharak, Masayoshi Tanaka, Mina Okochi
2. 発表標題 Screening of peptides binding to cancer-derived exosomes from EWI-2 protein
3. 学会等名 The 24th Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mina Okochi
2. 発表標題 Mina Okochi, Biosensing using the functional peptide probes screened by peptide array
3. 学会等名 電気化学会第86回大会内第65回化学センサ発表会(台湾とのジョイントセッション)(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mina Okochi
2. 発表標題 Detection of individual cells using a peptide-functionalized solid nano-pore
3. 学会等名 The Second International Workshop by the 174th Committee JSPS on Symbiosis of Biology and Nanodevice (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suwatthanarak Thanawat、Minamide Taisuke、Tanaka Masayoshi、Harvie Andrew J.、Tamang Abiral、Critchley Kevin、Evans Stephen D.、Okochi Mina
2. 発表標題 Screening of CdTe quantum dot-binding peptides for quantum dot-antibody bioconjugation
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCCHE2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shogo Saito, Soichiro Tatematsu, Masayoshi Tanaka, Mina Okochi
2. 発表標題 Design of peptide interface on highly oriented pyrolytic graphite substrate to observe the cytoplasmic face of cell membrane
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCCHE2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤彰吾、立松宗一郎、Lee Hua-Yun、田中祐圭、大河内美奈
2. 発表標題 強固な細胞接着能を有する材料構築に向けた探査化ペプチド設計
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中祐圭、林美伶、高橋雄太、大河内美奈
2. 発表標題 光学的特性を選択可能な金ナノ粒子グリーン合成ペプチドの効率的探索
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 児美川拓実、Abiral Tamag、田中祐圭、Kevin Critchley、Stephen D. Evans、大河内美奈
2. 発表標題 爆発性芳香族化合物の簡便・迅速な検出に向けたTNT認識ペプチド修飾量子ドットの作製
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 児美川拓実、Abiral Tamag、田中祐圭、Kevin Critchley、Stephen D. Evans、大河内美奈
2. 発表標題 TNT認識ペプチド修飾量子ドットを用いた爆発物の迅速検
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第39回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊健一、手塚沙也可、野口紘長、田中祐圭、早水裕平、大河内美奈
2. 発表標題 単層二硫化モリブデンを用いた破骨細胞のプロトン放出計測
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masayoshi Tanaka, Mina Okochi
2. 発表標題 Mineralization peptide screening for one-pot gold nanoparticle syntheses
3. 学会等名 ICPAC2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	田中 祐主 (Tanaka Masayoshi) (60533958)	東京工業大学・物質理工学院・助教 (12608)	