

令和 3 年 4 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22194

研究課題名（和文）エクソソームの構造的特徴を捉える蛍光プローブの創出とマーカーフリー解析への応用

研究課題名（英文）Design of fluorescent probes capable of selective recognition of exosomes for marker-free analysis

研究代表者

佐藤 雄介（Sato, Yusuke）

東北大学・理学研究科・准教授

研究者番号：90583039

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：エクソソームが高曲率性膜を有することに着目し、高曲率性膜に見られる脂質パッキング欠損を標的とした両親媒性 α -ヘリックスペプチドを基盤とする蛍光プローブを開発した。このプローブをエクソソーム検出プローブとして活用することで、エクソソーム表面の特定タンパク質マーカーを捕捉する抗体法とは質的に異なり、エクソソーム表面のタンパク質プロファイルに依存しないマーカーフリー検出が可能であることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、細胞間コミュニケーションツールとして多様な生命現象に関与するエクソソームと呼ばれる細胞外小胞の機能解析を可能にする新規な分析技術（蛍光プローブ）の創成を目指したものである。エクソソームに共通する構造的特徴である高曲率性膜表面の脂質パッキング欠損を標的とした新規な蛍光プローブを開発し、このプローブが放出細胞の種類や状態に依存せず、様々なエクソソーム解析に適用しうる高汎用性を有することを見出した。本手法は迅速かつ簡便なエクソソーム検出に加えて、エクソソーム種類間の機能比較など既存法では困難であった解析が可能になるものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have developed new class of fluorescent probes based on amphiphathic helical peptides capable of selectively recognition of lipid packing defects on highly curved membranes for exosome analysis. In contrast to traditional immunoassays that use antibodies for specific protein markers on exosomal membranes, our probes allow marker-free analysis of exosomes without being influenced by the variation in the expression of the protens of the exosomes.

研究分野：分析化学

キーワード：エクソソーム 蛍光プローブ 脂質パッキング欠損 ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エクソソームはほぼ全ての細胞が自発的に放出する細胞外小胞であり、細胞間コミュニケーションを介して細胞の恒常性維持や疾患発症などに密接に関与している。エクソソームが絡む生命現象を理解し、疾患診断・治療への応用を進めていく上で、エクソソーム機能を包括的に解析しうる技術の開発が必要不可欠である。現在、エクソソーム表面に発現している膜タンパク質(例: CD63 や CD9)をマーカーとして用いて、これに対する抗体を活用するイムノアッセイ(例: ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay))が汎用されている。しかし、エクソソームは放出細胞の起源や状態に依存した多様な表面プロファイルを持っているため、本手法では適用しうるエクソソーム種類が限定されるとともに、異なるエクソソーム種類間での相对比较が困難である (Angew. Chem. Int. Ed., 2017, 56, 11916.; Biosens. Bioelectron., 2017, 92, 8.)

2. 研究の目的

本研究では、エクソソーム全般に共通する構造的特徴である高曲率性膜に着目し、これに起因する脂質パッキング構造の緩み(脂質パッキング欠損, Lipid packing defect (LPD))を強力かつ特異的に捕捉する蛍光性ペプチドプローブを新規に創出することで、エクソソームをマーカーフリー (marker-free) 解析することを試みた。

3. 研究の方法

エクソソームでは先述した通り、放出細胞の種類や状態により様々なタンパク質がベシクル表面に存在するため、特定のタンパク質をマーカーとして用いて、これを検出することに基づく分析手法では、検出しうるエクソソームはマーカーが発現している種類に限定されてしまう。これに対して、本研究ではエクソソームが放出細胞によらず、直径 50-150nm 程度の脂質二重膜構造(ベシクル)を有する点に着目し、エクソソームの脂質二重膜構造を標的とした蛍光プローブの開発を目指した。具体的には直径が小さく曲率の高いベシクルにおいて特異的に見られる LPD を結合場とするプローブを設計した。高曲率性膜を選択的に認識しうるタンパク質は小胞輸送など生体内で重要な機能を担っているが、本研究では高曲率性膜結合に特に重要な両親媒性 α -ヘリックス領域を抽出し、プローブのエクソソーム結合部位に用いた。ここではアポリポrotein A-I の C 末端領域(ApoC, 22 残基)を選択し、その N 末端には疎水場感受性色素である Nile Red(NR)を連結したプローブ ApoC-NR を合成した(図 1)。合成リポソームを用いて、ApoC-NR の基礎特性を評価した後に、各種細胞から得られたエクソソームに対する検出に適用した。また、蛍光応答部位としてシアニン誘導体を用いたプローブを設計・合成し、その機能評価を行った。

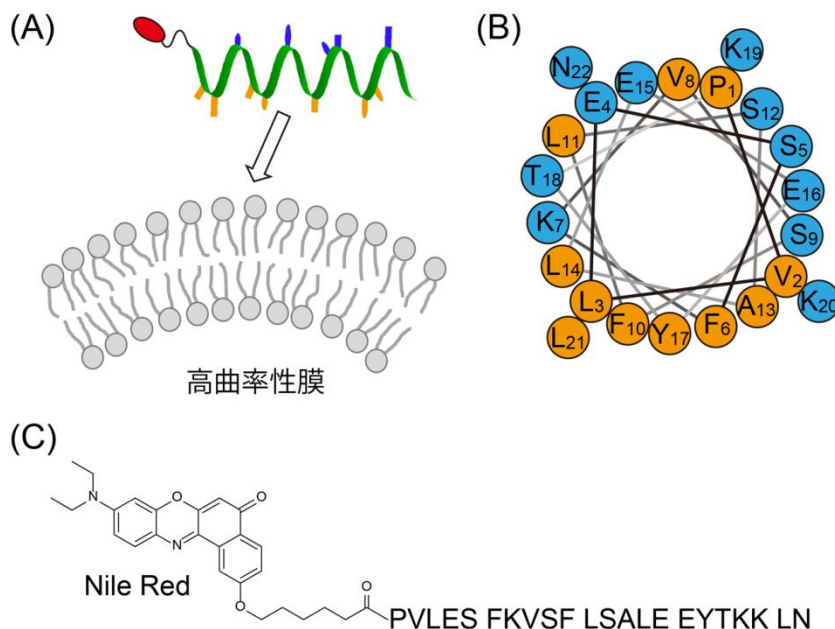


図 1 (A) 両親媒性 α -ヘリックスペプチドを基盤とする蛍光プローブを用いた高曲率性膜センシング。 (B) ApoC の helical-wheel 図(青:親水性アミノ酸残基, オレンジ:疎水性アミノ酸残基)。 (C) ApoC-NR の構造。

4. 研究成果

ApoC-NR は固相合成により合成し、逆相 HPLC による単離精製後に MALDI-TOF-MS により構造同定した。まず Extrusion 法で調製したサイズの異なる (直径 110 nm, 350 nm, 650 nm) 合成リポソーム (脂質組成: 50% POPC, 15% cholesterol, 15% POPE, 20% POPS) を用いて ApoC-NR の結合機能および蛍光応答機能を評価した。ApoC-NR の NR 部位は直径 110 nm のリポソーム (V_{110}) 添加に伴いブルーシフトを伴いながら蛍光強度が著しく増加することが分かった (図 2)。これは ApoC 部位のリポソーム結合に伴い NR 部位が疎水場であるリポソーム表面に近接することに起因している。重要なことに、ApoC-NR の蛍光応答はリポソームのサイズに大きく依存しており、 V_{110} に対する蛍光応答は直径 350 nm (V_{350})、650 nm (V_{650}) のリポソームと比べて著しく大きかった。これは ApoC 部位が高曲率性膜に選択的に結合することを反映しているものと考えられる。また、CD (circular dichroism) 測定の結果、ApoC 部位は V_{110} との結合に伴い α -ヘリックス含有率が増加することが分かった。この結果は、ApoC-NR は膜表面の LPD に対して α -ヘリックスの疎水面が挿入される様式 (疎水性挿入) で結合していることを示唆している。これは、ApoC 配列中に α -ヘリックス構造を不安定化させるプロリン残基を導入させることで高曲率性膜に対する蛍光応答機能を失うという結果からも支持されている。

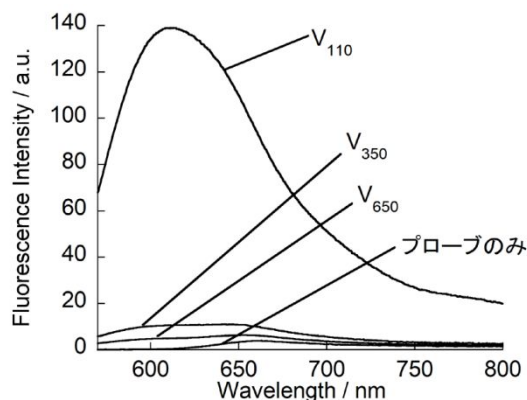


図 2. ApoC-NR の合成リポソームに対する蛍光応答。[ApoC-NR] = 2.0 μ M, [liposome (total lipid)] = 500 μ M。

合成リポソームに対する ApoC-NR の結合力を蛍光偏光測定により評価したところ、 V_{110} に対して最も強い結合力を示すことが分かった (解離定数 $K_d = 4.7 \mu$ M)。この K_d 値は V_{350} 、 V_{650} に対するものと比較して、17 倍、22 倍も小さいものであり、ApoC-NR が高曲率性膜に対して高い結合選択性を持っていることが示された (図 3)。これまでに報告されたカチオン性ペプチドを基盤とし、ベシクル表面のアニオン性脂質との静電相互作用を活用する高曲率性膜選択性プローブ (MARCKS-ED-NBD, *ACS Chem. Biol.*, 2013, 8, 218.) が報告されているが、ApoC-NR の結合選択性はこれと比較して著しく高いことが分かった。静電相互作用を結合駆動力とするプローブの場合、膜曲率に依存せず結合してしまうのに対して、両親媒性 α -ヘリックスペプチドを用いた場合、高曲率性膜で特異的に見られる LPD への結合に基づくため、高い結合選択性が発現しているものと考えている。以上の結果は両親媒性 α -ヘリックスペプチドが高曲率性膜に対する高選択的なプローブ開発に有用であることを示唆している。

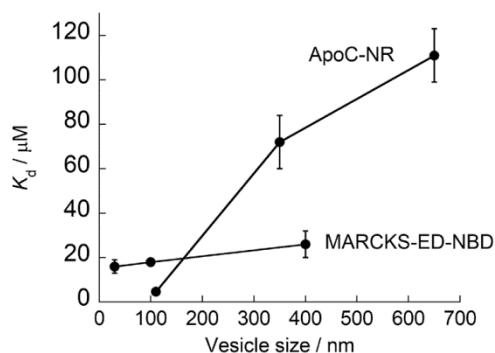


図 3. ApoC-NR, MARCKS-ED-NBD の高曲率膜選択性比較。
[*RSC Advances*, 2020, 10, 38323-38327.] –
Reproduced by permission of the Royal Society of Chemistry

ApoC-NR を K562 細胞由来エクソソームに適用した結果、NR 部位がエクソソームの濃度依存的に蛍光応答を示した。得られた蛍光応答から、検出限界 (limit of detection: LOD) は 5.3×10^5 個/ μ L と算出された。この値は抗体を用いる既存法 (ELISA) に匹敵するものであり、ApoC-NR を検出プローブとして用いる手法が実用的な検出感度を有していることがわかる。一方で、煩雑な操作・多大な時間を要する ELISA とは質的に異なり、本手法ではプローブをエクソソームに混ぜるだけという簡便な手法で迅速に (5 分以内) 検出できるという大きな利点を有している。さらに、BPH-1 細胞、U87MG 細胞、A549 細胞由来エクソソームに対する検出能を検討した結果、ApoC-NR は K562 細胞由来エクソソームと同等の検出感度を示した (LOD/ 10^5 個/ μ L: BPH-1, 2.1; U87MG, 3.2; A549, 1.8)。ここで用いた 4 種類のエクソソームはそれぞれ表面のタンパク質発現パターンが大きく違っていること (*Nat. Commun.*, 2019, 10, 3854.) を考えると、ApoC-NR はエクソソームの表面プロファイルに依存せず、高感度検出が可能であることを強く示唆している。このように、ApoC-NR は既存法とは一線を画し、特定タンパク質マーカーが不要なエクソソーム検出プローブとして機能することを見出した。

また、本プローブ設計では NR 以外にトリメチンシアニン誘導体(Cy3)が蛍光応答部位として有用であることを見出した。特に、シアニン色素に長鎖アルキル鎖を導入した誘導体(図4)ではアルキル鎖による脂質二重膜挿入の寄与もあり、高曲率性リポソームに対する強い結合力が発現した。さらに、アルキル鎖導入 Cy3 を有するプローブは ApoC-NR と同様にマーカフリー検出に適用しうることを見出した。この結果は本研究で提案する両親媒性 α -ヘリックスペプチドを用いたプローブがマーカフリー検出における有用なプラットフォームとなることを示唆するものである。また、シアニン誘導体を蛍光応答部位として用いた場合ヘテロ環構造やメチンリンカー長を調節することでその蛍光波長を合理的に制御することが可能であるため、異なる蛍光波長を有するプローブの併用に基づくマルチプレックス解析など様々な応用に展開できると期待できる。

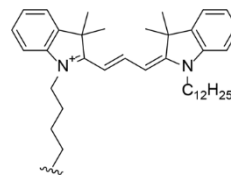


図4. アルキル鎖を導入した Cy3 の構造.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yusuke Sato, Kazuki Kuwahara, Kenta Mogami, Kenta Takahashi, Seiichi Nishizawa	4. 巻 10
2. 論文標題 Amphipathic helical peptide-based fluorogenic probes for a marker-free analysis of exosomes based on membrane-curvature sensing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 38323-38327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0ra07763a	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 最上絢太、桑原和貴、佐藤雄介、西澤精一
2. 発表標題 エクソソーム検出を指向した両親媒性 ヘリックス構造を有する蛍光ペプチドプローブの開発
3. 学会等名 みちのく分析科学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桑原和貴、最上絢太、佐藤雄介、西澤精一
2. 発表標題 Nile Red を導入した両親媒性 ヘリックス構造を有するペプチドプローブの開発とエクソソーム解析への応用
3. 学会等名 Chem-Bio Joint Seminar 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤雄介
2. 発表標題 RNA・エクソソームを標的とした蛍光性プローブの開発と分析化学的応用
3. 学会等名 第7回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 最上 絢太、桑原和貴、佐藤雄介、西澤精一
2. 発表標題 エクソソーム検出を指向した蛍光ペプチドプローブの設計とその機能評価
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桑原和貴、最上 絢太、佐藤雄介、西澤精一
2. 発表標題 両親媒性 ヘリックス構造を有する蛍光性ペプチドプローブの機能改良とエクソソーム解析への展開
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤雄介
2. 発表標題 細胞外小胞を標的とした蛍光性ペプチドプローブの設計とその応用
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 最上 絢太、桑原和貴、佐藤雄介、西澤精一
2. 発表標題 両親媒性 ヘリックス構造を有する蛍光ペプチドプローブの合成とエクソソーム検出への応用
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桑原和貴、最上絢太、佐藤雄介、西澤精一
2. 発表標題 エクソソーム機能解析を指向した蛍光性ペプチドプローブの機能改良
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桑原和貴、最上絢太、佐藤雄介、西澤精一
2. 発表標題 エクソソーム機能解析を指向した蛍光性ペプチドプローブの機能改良
3. 学会等名 2019年度日本分析化学会東北支部若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤雄介
2. 発表標題 Amphipathic helical peptide-based fluorescent probes for exosomes by membrane curvature recognition
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yusuke Sato
2. 発表標題 Amphipathic helical peptide-based fluorescent probes for analysis of extracellular vesicles
3. 学会等名 Pittcon 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------