

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14654

研究課題名（和文）生体膜透過性タンパク質キャリアの創製と膜反応・包接反応の制御

研究課題名（英文）Design of biomembrane penetrating protein and their membrane/encapsulation reaction control

研究代表者

坂江 広基（Sakae, Hiroki）

金沢大学・物質化学系・助教

研究者番号：00779895

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：貯蔵タンパク質であるフェリチンの水溶液中および生体膜のモデル反応場としての分極液液界面における分子包接特性と界面反応挙動を分光電気化学的に研究した。フェリチンサブユニットと物質の相互作用が包接に大きく寄与していることを明らかにする一方で、フェリチンが相間移動（膜透過）しないことが新たな課題として浮かび上がった。この課題を、細胞膜透過性ペプチド（CPP）によって克服しようと試みている。また、新規CPPの -ポリ-L- -リジンに蛍光修飾を施すことで、その膜透過機構も解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

限定された手法の中ではあるがフェリチンの薬剤キャリアとしての可能性を見出した。包接効率に寄与する要因を明らかにし、モデル反応場を用いて色素を包接させることでフェリチンの界面反応機構を解析する方法論を示すことができた。フェリチンを薬剤キャリアとして利用する際の課題を明示し、その解決法の一つとして細胞膜透過性ペプチド（CPP）修飾を提案した。これまで未解明であったCPPの膜透過機構を分光電気化学的に明らかにし、本来膜透過性を示さない物質の膜透過も達成した。本研究成果は、CPPやフェリチンを利用した高度なドラッグデリバリーシステムの展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Molecular encapsulation property and interfacial reaction behavior of ferritin, which is a storage protein, were studied in aqueous solutions and at polarized liquid|liquid interfaces as a model of biomembrane through the spectroelectroscopic method. The interaction between ferritin subunits and substances significantly contributed to the encapsulation behavior. On the other hand, a new problem that phase transfer (membrane permeation) of ferritin does not occur arose. Cell-penetrating peptides (CPP) have been used to solve this problem. The membrane permeation mechanism of a novel CPP, -poly-L- -lysine, was elucidated through a fluorescent labeling.

研究分野：界面分析化学，分光電気化学

キーワード：液液界面 生体膜模倣界面 分光電気化学 生体関連物質 細胞膜透過性ペプチド 薬剤キャリア 分子包接 フェリチン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

近年、研究が盛んに行われているドラッグデリバリーシステム (DDS) では、特にナノ粒子に薬剤を内包させるナノ DDS 技術が注目されているが、DDS の要件を満たすナノ粒子キャリアの開発は容易ではないうえに、体内動態を制御することは困難である。また、薬剤のスクリーニングに用いられている既存の方法は、薬剤の受動輸送による相間分配については評価できるものの、能動輸送や動的輸送過程に関する知見は得難い。

一方で、二種の混じり合わない電解質溶液間の界面 (ITIES) は、界面電位差に依存して物質輸送などの反応が生じる。また、リン脂質を添加することで界面に自己組織化膜が形成されるため生体膜モデルとして有用であり、薬剤など小分子の膜透過性評価などに利用されている。しかし、一般的な電気化学測定法では生体高分子を対象とした場合、応答が複雑になり解析が困難である。そのため、タンパク質などの生体高分子の膜反応研究に、ITIES を利用するには、実験的な工夫が必須である。

これまでに研究代表者は、機能性色素や薬剤分子、生理活性物質に対する分子カプセルとしての多分岐高分子の分子包接特性や界面反応機構を、独自の分光電気化学測定法を用いて明らかにしてきた。そこで本研究では、生体適合性を有するナノ粒子キャリアとして、鉄の貯蔵を担うケージ状タンパク質であるフェリチンに着目し、蛍光色素を用いることで ITIES におけるフェリチンの界面反応挙動の分光電気化学解析を試みる。さらに、最近、特定の条件下で、フェリチンによる難溶性薬剤の可溶化現象を見出した。本発見は、低溶解性のために投与量が制限されている薬剤に対して有効である。しかし、フェリチンそのものが膜透過されないことも判明したため、吸収効率の改善が課題として残った。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞膜透過性ペプチド (CPP) を化学修飾したフェリチンを新たに作製し、フェリチンの膜透過性を改善する。ITIES における CPP 修飾フェリチンの反応挙動を詳細に解析し、CPP 修飾フェリチンの体内動態に関する基礎的知見を得る。また、溶液中におけるフェリチンと薬剤や色素などとの相互作用を研究し、フェリチンの包接特性を明らかにする。種々の物質を内包した CPP 修飾フェリチンの界面反応機構を解明し、刺激応答性キャリアの膜反応に関する知見を得る。生体膜透過性を飛躍的に向上させた新規の CPP 修飾フェリチンの界面反応機構と包接特性を定量的に解明・制御することで、高機能な DDS 構築に関する知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

フェリチンは 24 個のサブユニットが集合しケージを構成している。このケージ構造は pH に依存して可逆的に分解・再構築するため薬剤キャリアとして注目されている (図 1)。フェリチンへの薬剤の内包については多数の研究結果が報告されているが、体内動態に言及しているものはない。本研究では、生体膜のモデル反応場としての水 | 1,2-ジクロロエタン (DCE) 界面における、フェリチンの反応機構を電位変調蛍光 (PMF) 分光法を用いて研究することで、フェリチンの体内動態に関する基礎的知見を得た。その過程で、フェリチンの膜透過性改善の必要性が示唆されたため、CPP を用いて改善を試みた。すなわち、新規の CPP として  $\epsilon$ -ポリ-L- $\alpha$ -リジン ( $\epsilon$ PL) を用い、フェリチン外殻に露出しているリジン残基にクリック反応による  $\epsilon$ PL の共有結合修飾を試みた。また、 $\epsilon$ PL の界面 (膜) 反応機構についても、蛍光色素で標識化することで検討した。

一方で、フェリチンの分子包接特性の評価には内在する鉄の除去が必要であることが示唆されたため、従来の還元剤を用いた透析によって鉄の除去を行い、アポフェリチンを作製した。ポルフィリンは周辺環境 (配位構造) に応じてスペクトルが鋭敏に変化する機能性色素であり、広く研究された分光試薬である。研究代表者も用いてきた 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinato zinc(II) (ZnTPPS<sup>4-</sup>) を被包接分子として、アポフェリチンの分子包接特性を吸収・蛍光スペクトル測定によって評価した。

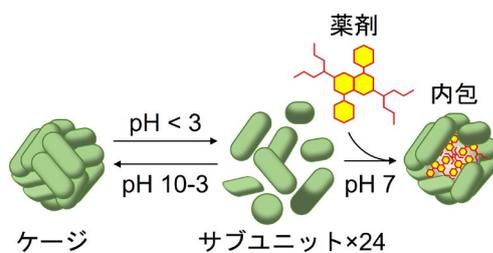


図 1 フェリチンの可逆な構造変化と薬剤内包。

その過程で、フェリチンの膜透過性改善の必要性が示唆されたため、CPP を用いて改善を試みた。すなわち、新規の CPP として  $\epsilon$ -ポリ-L- $\alpha$ -リジン ( $\epsilon$ PL) を用い、フェリチン外殻に露出しているリジン残基にクリック反応による  $\epsilon$ PL の共有結合修飾を試みた。また、 $\epsilon$ PL の界面 (膜) 反応機構についても、蛍光色素で標識化することで検討した。

一方で、フェリチンの分子包接特性の評価には内在する鉄の除去が必要であることが示唆されたため、従来の還元剤を用いた透析によって鉄の除去を行い、アポフェリチンを作製した。ポルフィリンは周辺環境 (配位構造) に応じてスペクトルが鋭敏に変化する機能性色素であり、広く研究された分光試薬である。研究代表者も用いてきた 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinato zinc(II) (ZnTPPS<sup>4-</sup>) を被包接分子として、アポフェリチンの分子包接特性を吸収・蛍光スペクトル測定によって評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ITIES におけるフェリチンの反応挙動

水溶液中でのフェリチンと非包接分子の相互作用を、吸収・蛍光スペクトル測定によって確認した。被包接分子として、周辺環境に依存して蛍光強度が変化するためタンパク質のフォールディング状態の研究などに用いられる、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸 (ANS<sup>-</sup>) を用いた。フェリチンケージがサブユニットに分解している酸性条件下で ANS<sup>-</sup> の蛍光強度が著しく増大し、中性付近でケージを構成しているフェリチン共存下では蛍光強度はほとんど変化しなかった。水 | DCE 界面における PMF 応答は、水溶液中でフェリチンサブユニットと ANS<sup>-</sup> が相互作用していた酸性条件下で減少するとともに ANS<sup>-</sup> の相間移動する電位がシフトした。これらの結果は、水溶液中で正に帯電したフェリチンケージあるいはフェリチンサブユニットと ANS<sup>-</sup> が効果的に静電相互作用し形成された会合体から ANS<sup>-</sup> が界面領域で解離し相間移動するが、これらフェリチン化学種は界面吸着性を有するために、ANS<sup>-</sup> の相間移動が妨げられたことを示唆している (図2)。注目すべきは、フェリチン自身が相間移動しない点であり、フェリチンを薬剤キャリアとして用いるためには改善しなければならない必須の課題であることが明らかになった。

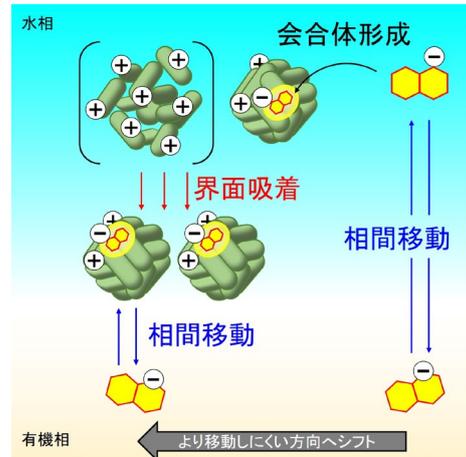


図 2 ITIES におけるフェリチンと ANS<sup>-</sup> の相互作用.

##### (2) アポフェリチンの分子包接特性の定量的評価

内在鉄を除去したアポフェリチンを用いて、ケージ開閉過程での分子包接特性を、ZnTPPS<sup>4+</sup> をプローブとして定量的に評価した。pH によってアポフェリチンのケージ/サブユニット構造変化を制御した。ZnTPPS<sup>4+</sup> の濃度を固定し、アポフェリチン濃度を変化させて、Soret 帯の変化を追跡した。その結果、アポフェリチンサブユニット 1 つに対して ZnTPPS<sup>4+</sup> が 1 分子会合することが明らかになり、この会合体の安定性には配位可能な中心亜鉛金属が重要な役割を担っていることも示された。これらの研究成果は、アポフェリチンの薬剤キャリアとしての機能を示唆するものである。

##### (3) 生体膜模倣界面における蛍光標識化εPL の反応挙動

CPP は文字通り細胞膜透過能を有するペプチドである。中でもアルギニンやリジンに富む塩基性ペプチドはそのポリカチオン性も合わさって、不溶性と膜透過性を一挙に改善できる画期的な CPP であり、ドラッグデリバリーシステムで注目されている。一方で、従来の CPP は精製や付加反応が煩雑・高価であり、毒性も懸念されていた。本研究では、安価かつ無毒なεPLに着目し、新たな CPP としてフェリチンの膜透過性改善に利用することにした。それに先立ち、εPL の膜透過反応を詳細に研究した。生体関連色素であるカルボキシフルオレセイン (FAM) をεPL に共有結合させ蛍光標識化し (FAM-εPL)、PMF 測定を適用した。また水 | DCE 界面にリン脂質単分子膜を形成させ、生体膜模倣反応場を構築した。FAM-εPL が界面吸着を伴い相間移動することが明らかになり、その移動は生体膜との相互作用によって促進された (図3)。また、単独では膜透過しない FAM がεPL 修飾を施すことで透過することも示され、εPL の CPP としての有用性が示された。予想に反して、共有結合を介さず、ポリカチオン性εPL とアニオン性 FAM の静電相互作用によるイオン会合体は膜透過性を示さなかった。今後、フェリチンへの修飾を試みるとともに、さらなるεPL の応用を目指す。

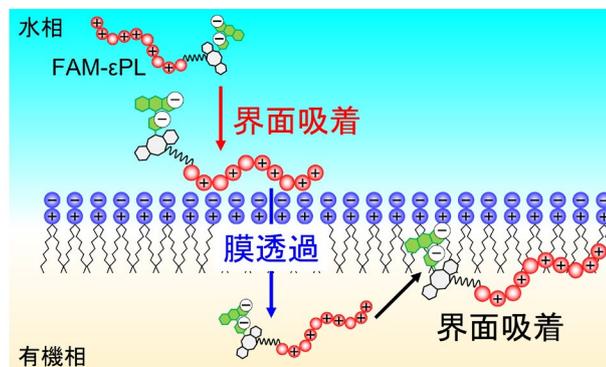


図 3 蛍光ラベル化εPL の膜透過機構

## 5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sakae Hiroki, Takasuga Koji, Yokoyama Takashi, Nagatani Hirohisa	4. 巻 888
2. 論文標題 Interfacial association of ferritin with anionic fluorescent probe at the 1,2-dichloroethane/water interface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Electroanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 115175 ~ 115175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jelechem.2021.115175	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Sakae Hiroki	4. 巻 97
2. 論文標題 Spectroscopic Analysis of Apoferritin Associates with the Water Soluble Porphyrins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photochemistry and Photobiology	6. 最初と最後の頁 930 ~ 935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/php.13476	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 UEMATSU Kohei, YAMAGATA Junpei, SAKAE Hiroki, KATANO Hajime, OSAKAI Toshiyuki	4. 巻 37
2. 論文標題 Fluorination Effect on the Gibbs Transfer Energy for Methylene Group from 1,2-Dichloroethane or 1,1,1,2,3,4,4,5,5,5-Decafluoropentane to Water	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1707 ~ 1712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.21p129	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Yokoyama Takashi, Andoh Yoshiyuki, Kunisawa Takanori, Mineda Kazutaka, Inoue Maika, Shimoda Kohsuke, Yoshise Masakazu, Hyohdoh Shohta, Yamamoto Masashi, Akai Toshiya, Takano Kouhei, Hashitani Hiroyuki, Hirawa Mayuko, Masuda Wakako, Yoden Nozomi, Sakae Hiroki, Zenki Michio	4. 巻 39
2. 論文標題 Selective determination of formaldehyde by high-performance liquid chromatography with porous graphitic carbon column using N,N -bis(9-anthrylmethyl)propane-1,3-diamine as derivatizing reagent	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 285 ~ 295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-022-00240-1	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Katano Hajime、Sawazaki Yuto、Sakae Hiroki、Uematsu Kohei	4. 巻 38
2. 論文標題 Tetraphenylantimony(V)-assisted transfer of hydroxide and fluoride anions across the 1,6-dichlorohexane   water interface	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1067 ~ 1072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-022-00135-1	査読の有無 有
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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 坂江広基
2. 発表標題 ケージ状物質による分子包接と液液界面反応の制御
3. 学会等名 日本分析化学会中部支部・北陸地区講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroki Sakae
2. 発表標題 Spectroelectrochemical study of ferritin-anionic fluorescent probe association at the 1,2-dichloroethane/water interface
3. 学会等名 72th Annual Meeting of ISE (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片野肇、坂江広基、植松宏平
2. 発表標題 界面電位差規制下でのイオン溶媒抽出による -ポリリジン誘導体の単離精製
3. 学会等名 第67回ポラログラフィーおよび電気分析化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植松宏平、田中恵里菜、田中才也、坂江広基、片野肇
2. 発表標題 有機溶媒   水界面での直鎖カルボン酸イオンの移動電位に対する有機溶媒鎖長の効果
3. 学会等名 第67回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会
4. 発表年 2021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
研究協力者	濱野 吉十  (Hamano Yoshimitsu)		
研究協力者	丸山 千登勢  (Maruyama Chitose)		
研究協力者	武内 大和  (Takeuchi Yamato)		

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
---------	---------