

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24550035

研究課題名(和文) 生体膜の揺らぎによるポリペプチドの拡散と膜透過の動的な多核NMR解析

研究課題名(英文) Multinuclear Dynamic NMR of Diffusion and Transport of Polypeptides by Membrane Thermal Fluctuation

研究代表者

岡村 恵美子 (Okamura, Emiko)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：00160705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：脂質二分子膜内外の分子の運動をNMRで直接観測し、膜の熱的な揺らぎにもとづく物質の輸送過程を明らかにした。まず、観測困難な“細胞サイズベシクル(直径10～20 μm)”中の分子の運動状態が、汎用されるナノサイズベシクル(直径100 nm前後)と異なることを見出した。次に、膜内コレステロールが膜揺らぎを調節して、物質輸送を制御する様子を見出した。

さらに、揺らぎによる膜透過を、生きた細胞を用いてNMRリアルタイム計測し、速度論解析を行うことが可能となった。このような動的NMRによる速度論解析が、ペプチド鎖の切断など、ペプチドの生化学反応の時間分解計測に適用可能であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Molecular dynamics in membrane inside and outside was quantified by multinuclear, dynamic NMR in situ, in relation to the thermal fluctuation of membranes. First, the lipid membrane dynamics was successfully characterized in cell sized vesicles (CSVs) of 10-20 μm-diameters by using solution-state NMR. The dynamic structure of CSVs was found to be different from nano-sized vesicles of ~100 nm-diameters frequently used. The contribution of membrane fluctuation to molecular transport was also quantified in the presence of various amounts of cholesterol in the membrane.

The peptide permeation to living cell inside was also observed by real-time in-cell NMR in situ and analyzed by first-order kinetics. Such kinetic approach was also applicable to time-resolved studies of biochemical reactions in peptides such as peptide bond cleavage in human-lens crystallin fragment in situ.

研究分野：生物物理化学

キーワード：生物物理 界面・表面物性 超精密解析 NMR 膜輸送

1. 研究開始当初の背景

薬物や化学物質、生理活性ペプチドやタンパク質などの生体膜への輸送機構(ドラッグデリバリー)は、種々の薬理作用、機能や毒性の発現に密接に関連している。薬物の多くは血液中を移動して細胞膜に取込まれ、膜中を透過した後、標的とする受容体に結合する。従って、薬物の細胞膜への取込みや膜内における輸送過程を明らかにすることができれば、活性の発現や毒性を制御し、薬効や副作用を予測する上で有効な情報が得られるものと期待される。一方、生体膜はソフトな空間であり、生理的条件下で絶えず揺らいでいる。このような膜のなかの分子の運動や揺らぎが、薬物輸送に重要な役割を果たすと考えられる。

しかしながら、膜系の運動・揺らぎを研究する手段は、蛍光プローブ法や試料を高速で回転する固体 NMR 法などに限られており、薬物輸送や膜のなかの分子を「自然のまま」の状態で定量解析する方法は、ほとんど確立されていなかった。このような状況の下で、研究代表者の岡村は、膜の自然な熱揺らぎと関係した薬物の運動状態や輸送のプロセスをそのままの状態を観測するために、高分解能溶液 NMR による膜研究を開始した。これまでに、科学研究費基盤研究(C)(2)「リン脂質二分子膜中の内分泌攪乱物質の輸送解析」(平成 14-15 年度)、萌芽研究「熱揺らぎに基づくリン脂質二分子膜中のイオンの輸送機構」(平成 16 年度)、基盤研究(C)「高感度高分解能 NMR による脂質ラフトの動態解析」(平成 17-18 年度)、基盤研究(C)「膜の熱揺らぎとドラッグデリバリーに関する動的多核 NMR 解析」(平成 20-22 年度)、新学術領域研究「揺らぎが機能を決める生命分子の科学」(公募研究)「生体膜の揺らぎによる薬物の輸送機構の動的多核 NMR 解析」(平成 21-22 年度)の交付を受け、溶液 NMR とパルス磁場勾配スピンエコー法を組み合わせ、膜のなかの遅い運動を検出し(*Phys. Rev. Lett.* **93**, 248101 (2004))、膜の熱揺らぎによる低分子薬物の輸送過程(図 1)について、薬物の結合量、結合・解離速度、膜のなかの拡散速度を定量化することに成功した(*J. Chem. Phys.* **129**, 215102 (2008); *Chem. Phys. Lett.*, **474**, 357 (2009); *J. Phys. Chem. B.*, **115**, 11074 (2011); *Biophysics*, **7**, 105 (2011))。

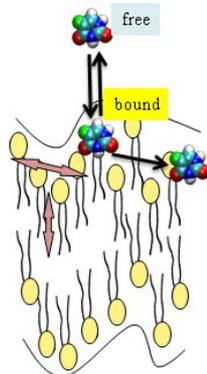


図 1. 膜の揺らぎと薬物輸送の模式図。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに確立した高分解能溶液 NMR とパルス磁場勾配スピンエコー法を組み合わせ、薬物輸送過程の定量解析の方法論を「ポリペプチドの運動と膜透過の解析」に拡張することを目的とした。高分解能溶液 NMR、動的多核 NMR を用いて、以下を行うこととした。

- (1) まず、ペプチドの拡散や膜透過の場となる“生体膜”の熱的な揺らぎに焦点を当て、実際の細胞膜に近いモデルとして期待される直径 10~20 μm の巨大ベシクル膜中のリン脂質の動的な構造を明らかにする。その上で、膜の揺らぎが疎水性物質によっていかに制御されるかを探る。
- (2) 膜の揺らぎを制御するコレステロール(図 2)によって、物質の拡散・膜透過がどのような影響を受けるかを明らかにする。

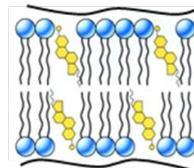


図 2. コレステロール(黄色)と膜構造。

- (3) ソフトな膜のなかの「ポリペプチド」の運動を直接観測し、脂質二分子膜の熱的な揺らぎにもとづくポリペプチドの輸送過程を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞サイズベシクル膜の熱揺らぎ

細胞サイズベシクルは、卵黄ホスファチジルコリン (EPC) と卵黄ホスファチジルグリセロール (EPG) (モル比 4:1) を構成成分とする薄膜を作成後、37 °C で静置水和法により調製した。比較のために、直径 100, 400, 800 nm の一枚膜ベシクルを通常のエクストルージョン法により調製した。必要に応じて、疎水性物質をリン脂質に対して 10 mol% 添加した。

ベシクルの動的な構造は、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>31</sup>P-NMR によって観測した。リン脂質 <sup>1</sup>H シグナルの化学シフト、半値幅、緩和時間、<sup>31</sup>P シグナルの化学シフト異方性を評価した。膜の揺らぎは、リン脂質の親水部コリンメチル基のプロトンと、疎水部アルキル鎖のメチレン基・メチル基のプロトン間の距離情報を与える 1 次元過渡的 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 核オーバーハウザー効果 (nuclear Overhauser effect, NOE) を観測して、シグナル強度から定量的に評価した。

(2) コレステロールによる揺らぎと物質輸送

フッ素原子を含む麻酔剤・セボフレン (CH<sub>2</sub>F-O-CH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) を用いて、膜輸送の動的多核 NMR による検討を行った。50 mM NaCl/D<sub>2</sub>O 中に過剰のセボフレンを滴下し、約 24 時間攪拌し、溶液部分をセボフレン水溶液として使用した。溶液濃度は 300 μM であり、臨床で用いられるセボフレンの血中濃度に対

応した。一方、モデル膜として、EPC、EPG、コレステロールを構成成分とする直径 100 nm のベシクルを用いた。ベシクルは、50 mM NaCl/D<sub>2</sub>O を溶媒としてエクストルージョン法により調製した。EPC、EPG の組成は、モル比 4 : 1 に固定した。総脂質量 (EPC+EPG+コレステロール) を一定 (40 mM) とし、コレステロール含量を 0-40 mol% の間で変化させた。ベシクル懸濁液とセボフレン水溶液を体積比 1:1 で混合した後、NMR 計測を行った。

**NMR 計測** セボフレンは、<sup>1</sup>H および <sup>19</sup>F NMR で同時計測した。また、縦緩和時間は、<sup>19</sup>F NMR を用いて反転回復法により算出した。拡散係数は、パルス磁場勾配スピンエコー<sup>19</sup>F NMR 法により見積もった。一方、膜脂質は、<sup>1</sup>H NMR を用いて評価した。計測はすべて 30 °C で行った。

### (3) アルギニンペプチドの膜透過

フッ素標識した膜透過ペプチド・オクタアルギニンをヒト白血病細胞株 HL60 に添加後、分単位の時間分解で <sup>19</sup>F NMR スペクトル測定を行った。温度はエンドサイトーシスがなない 4 °C で実施した。膜透過の各過程を一次の反応速度論でモデル化し、それぞれ、反応の速度定数・平衡定数・ギブズエネルギー変化を求めた。さらに、NMR 計測後に、細胞生存をトリパンプルー染色で確認した。平衡後のオクタアルギニンの細胞内分布は、可溶化・遠心分離操作により得られた各々の細胞画分について、<sup>19</sup>F NMR で定量した。

### (4) ペプチド結合切断の時間分解計測

ペプチド中のアスパラギン酸残基(Asp)で選択的に見られるペプチド鎖の切断反応に焦点を当てた。水晶体タンパク質αA クリスタリンの 51—60 断片 (S<sup>51</sup>LFRTVLD<sup>58</sup>SG<sup>60</sup>. L-α-および D-β-Asp<sup>58</sup>)、αB クリスタリンの 61—67 断片 (F<sup>61</sup>D<sup>62</sup>TGLSG<sup>67</sup>. L-α-および D-β-Asp<sup>62</sup>) を合成し、酢酸バッファー(pD4)に溶解させた。所定の温度に到達後、ペプチドのシグナル変化を、<sup>1</sup>H NMR を用いて in situ で計測した。ペプチド鎖の切断によって生じる C 末端 Asp<sup>58</sup> および 62、N 末端 Ser<sup>59</sup>、Thr<sup>63</sup> の濃度変化をリアルタイムで同時計測した。この変化を一次反応の速度式

$$C_{ter} = C_{non0}(1 - e^{-kt})$$

(ただし、 $C_{ter}$  は切断によって生じたペプチド断片濃度、 $C_{non0}$  は切断前のペプチドの初濃度、 $t$  は時間、 $k$  は速度定数) にフィッティングすることにより反応の速度定数を算出し、比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞サイズベシクル膜の熱揺らぎの解明

実際の細胞膜に近いモデルとして期待される直径 10 ~ 20 μm の巨大ベシクルを対象として、膜中のリン脂質のダイナミクスを高分解能溶液 NMR で初めて観測した。細胞サイズのベシクルでは、膜のモデルとして汎用される

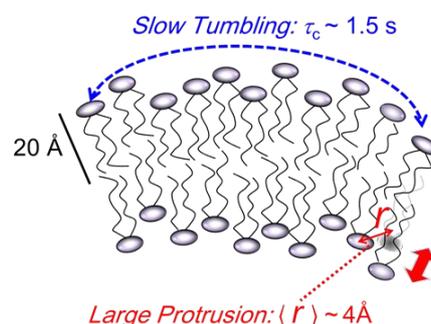


図 3. 細胞サイズベシクル中の膜の揺らぎ。(Chem. Phys. Lett., 2013 より)

ナノサイズのベシクル (直径 100 ~ 800 nm) と動的な構造が著しく異なることを見出した。

細胞サイズベシクル中の脂質分子の環境や局所的な運動状態は、曲率の大きなナノサイズのベシクル中とほぼ同じであった。しかし、リン脂質分子全体の回転運動 (tumbling) は、細胞サイズベシクル中で遅くなること分かった。回転運動に起因する分子回転相関時間  $\tau_c$  は、細胞サイズベシクル中でサブ秒 ~ 秒と計算され、ナノサイズベシクル中の相関時間 (ピコ秒 ~ ナノ秒) よりも著しく大きかった。原子核間の距離情報から膜表面の凹凸を見積もることが可能な NMR 核オーバーハウザー効果 (NOE) を利用して、リン脂質の垂直方向の揺らぎ (突出運動 Protrusion) が細胞サイズの膜中においても依然として頻繁に起こっていることを見出した (図 3)。この結果は、細胞サイズベシクルのような曲率が小さい膜中においても、リン脂質が膜面に垂直に揺らいでいることを示すものである。さらに、膜のこのような揺らぎが、疎水性物質によって、制御されることも明らかにした (図 4)。

リン脂質の突出運動は、水中から膜中への物質の取り込みや膜透過のメカニズムと密接に関係するものと考えられ、この意味で非常に重要である。成果は、Chem. Phys. Lett. 誌 (2013 年) および Membrane 誌 (2015 年) に掲載され、後者は論文賞を受賞した。

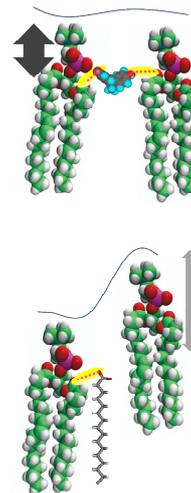


図 4. 疎水性物質による揺らぎの制御。(Membrane, 2015 より)

### (2) コレステロールによる膜の揺らぎ制御と拡散・膜透過の相関解析

生体膜に存在するコレステロールが、物質輸送をいかに制御するかを明らかにするために、フッ素原子を含む麻酔剤・セボフレン (CH<sub>2</sub>F-O-CH(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) の膜輸送に関する多核

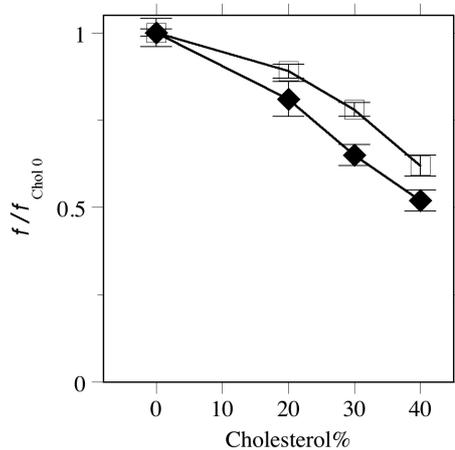


図 5. 膜中のコレステロールによるセボフレンの取り込み抑制. 縦軸はセボフレンの取り込み量を規格化したもの.  $t$ , は、緩和時間, 拡散係数から算出した結果を示す. (*J. Oleo Sci.*, 2014 より)

NMR解析を行った。セボフレンの膜への取り込みが、コレステロールによって抑制されることを、セボフレンの $^1\text{H}$ および $^{19}\text{F}$  NMR化学シフト、緩和時間、拡散係数から定量的に明らかにした(図5)。コレステロールによる膜の流動性・揺らぎの低下がセボフレンの取り込み効率を下げることを、膜脂質の拡散測定から見出した。成果は *J. Oleo Sci.* 誌 (2014年) に掲載された。

### (3) 細胞膜の揺らぎによるアルギニンペプチドの輸送過程の計測と速度論

親水性でありながら、疎水性の細胞膜を透過するといわれているオクタアルギニンについて、膜の熱揺らぎにともなうヒト白血病細胞株への輸送過程を、NMRを用いて分単位の時間分解で計測した。細胞内のペプチドを識別するために、フッ素標識したペプチドを合成して使用した。ペプチドが細胞膜表面の糖鎖に結合した後、膜を透過して細胞質に入る過程について、 $^{19}\text{F}$  NMRシグナルの化学シフト・強度の変化をリアルタイムで計測した。各々の過程のペプチド濃度の推移を明らかにし、これをもとに、定量的な速度論解析を試みた。細胞分画とNMRを組み合わせ、アルギニンペプチドが細胞膜を透過して、細胞質に入ることを確認した。揺らぎによる生きた細胞へのペプチドの輸送を理解するためには、信頼性の高いモデルと解析法を構築することが重要である。細胞系のリアルタイム計測にもとづく信頼性の高い解析法の確立を目指して、平成27年度より新たにスタートした基盤研究(C)「In-Cell NMRによる生きた細胞へのリアルタイム定量解析」において、さらに検討を行う予定である。

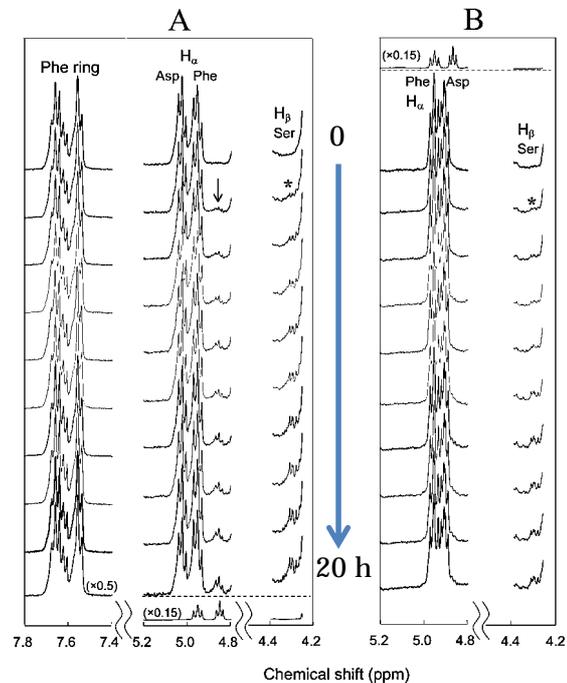


図 6. (A) L- $\alpha$ -および (B) D- $\beta$ -Asp58 を含む $\alpha$ A クリスタリン 51—60 断片のペプチド鎖切断にともなう  $^1\text{H}$  NMR スペクトル変化. 矢印とアスタリスク\*は、それぞれ切断後に生じた C 末 Asp58, N 末 Ser59 を示す. D- $\beta$ -Asp(B) の方が反応の進行が遅いことが分る. (*Sci. Rep.*, 2016 より)

### (4) ポリペプチドの反応の時間分解計測

本研究課題で用いた動的NMR解析の方法論が、ポリペプチド自体の生化学反応のリアルタイム計測に応用できることを新たに見出した。ポリペプチドの特定の残基で自発的に進行するペプチド結合の切断の様子を高分解能溶液 $^1\text{H}$  NMRで初めてリアルタイム計測し(図6)、反応の速度論解析を実施した。その結果、通常のL- $\alpha$ アミノ酸に比べて、異常なD- $\beta$ アミノ酸を含む配列では、ペプチド鎖の切断が起こりにくいことを量的に明らかにした。得られた知見は、目の水晶体タンパク質・クリスタリン中で、加齢にともなって異常型D- $\beta$ -Aspの蓄積が促進されるメカニズムの解明につながるものと期待される。また、異常型アミノ酸の蓄積によってタンパク質の構造や機能が変化し、白内障など加齢による疾患を引き起こす仕組みの解明とその予防に向けて、本研究の果たす役割は大きいと考えられる。成果は、英科学誌サイエンティフィック・リポーツ電子版 (2016年) で公開された。

以上、本研究では、膜揺らぎにともなう分子の運動を動的な多核NMRで*in situ*計測し、定量化した。これによって、従来観測することが困難であった“細胞サイズベシクル(直径10~20  $\mu\text{m}$ )”中の脂質分子の環境や局所的な運動状態を明らかにすることができた。さらに、膜の揺らぎをコレステロールで制御して、物質輸送に与える揺らぎの影響を定量的に評

価することが可能となった。また、本研究で用いた動的多核NMRによる速度論解析は、ポリペプチドの反応の時間分解計測に適用可能であることを見出した。今後、アミロイドベータなど種々のペプチドについて、構造や凝集状態の変化をリアルタイムで解析することが可能となる。前処理やプローブを使用することなく、自然な状態での観測が可能な優れた解析法として、NMR計測が幅広く展開されることを期待したい。さらに、本研究において、アルギニンペプチドに代表される膜透過ペプチドの細胞への物質輸送の*in situ* 計測が可能となったことから、今後、生きた細胞における膜の熱揺らぎと輸送の相関解析に向けて、研究を継続する。すでに述べた通り、平成27~29年度に科学研究費（基盤研究C）「In-Cell NMRによる生きた細胞へのリアルタイム定量解析」（課題番号15K05401）の交付を受け、生きた細胞系における信頼性の高いドラッグデリバリー研究の確立を目指す。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

##### 〔雑誌論文〕（計8件）

Kenzo Aki, Emiko Okamura, D- -aspartyl residue exhibiting uncommon high resistance to spontaneous peptide bond cleavage, *Sci. Rep.*, **6**, 21594; doi: 10.1038/srep21594 (2016) 査読有

Kenzo Aki, Emiko Okamura, Staggered side-chain conformers of aspartyl residues prerequisite to transformation from L- - to D- -aspartate 58 in human-lens A-crystallin fragment, *Biophys. Chem.*, **196**, 10-15 (2015) 査読有; doi: 10.1016/j.bpc.2014.09.001

Yuki Takechi, Yuto Shintani, Daiki Kimoto, Emiko Okamura, Regulation of Phospholipid Protrusion in the Cell Sized Vesicle by Hydrophobic Bisphenol A, *Membrane*, **40**, 38-45 (2015) 査読有; [https://www.jstage.jst.go.jp/browse/membrane/40/1/\\_contents/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/membrane/40/1/_contents/-char/ja/) 日本膜学会「膜誌論文賞」受賞論文

Emiko Okamura, Yuki Takechi, Kenzo Aki, Uptake of Sevoflurane Limited by the Presence of Cholesterol in the Lipid Bilayer Membrane: A Multinuclear Nuclear Magnetic Resonance Study, *J. Oleo Sci.*, **63**, 1149-1157 (2014) 査読有; doi: 10.5650/jos.ess14120

Yuki Takechi, Hiroyuki Saito, Emiko Okamura, Slow Tumbling but Large Protrusion of Phospholipids in the Cell Sized Giant Vesicle, *Chem. Phys. Lett.*, **570**, 136-140 (2013) 査読有; doi: 10.1016/j.cpllett.2013.03.048

Noriyuki Yoshii, Tomomi Emoto, Emiko Okamura, Lateral Diffusion of Lipids Separated from Rotational and Translational Diffusion of a Fluid Large Unilamellar Vesicle, *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, **106**, 22-27 (2013) 査読有; doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.01.017

##### 〔学会発表〕（計33件）

安岐 健三, 岡村 恵美子, アスパラギン酸異性体の異性化とペプチド鎖分解の速度論解析, 日本化学会第96年会, 2016年3月24日~27日, 同志社大学京田辺キャンパス(京都)

安岐 健三, 岡村 恵美子, L- -およびD- -アスパラギン酸含有ペプチドの分解と異性化反応の速度論: リアルタイム NMR と HPLC による解析 (招待講演), 第8回「タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会」, 2015年11月19日~20日, 京都大学原子炉実験所(大阪)

Emiko Okamura, Mobility, location, and kinetics of membrane binding and delivery of drugs by solution-state  $^{19}\text{F}$  and  $^1\text{H}$  NMR (Invited), 6<sup>th</sup> Asian Conference on Colloid and Interface Science, November 24-27, 2015, Arkas Sasebo, Nagasaki, Japan

岡村 恵美子, 水晶体タンパク質模擬ペプチド中の Asp 異性化に関わる側鎖の立体配座の NMR 研究 (招待講演), 第15回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「蛋白質とアミノ酸のキラリティサイエンス」, 2015年6月24日~26日, あわぎんホール(徳島)

Yuki Takechi, Kenzo Aki, Yumi Tohyama, Toru Kawakami, Hiroyuki Saito, Emiko Okamura, Real Time in-Cell  $^{19}\text{F}$  NMR Spectroscopy on the Cell Membrane Permeation of Octaarginine, The XXVI<sup>th</sup> International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, August 24-29, 2014, Dallas (USA)

Emiko Okamura, Yuki Takechi, Delivery of Sevoflurane Limited by the Presence of Cholesterol in Lipid Bilayer Membranes: Multinuclear, Dynamic NMR *in Situ*, 105<sup>th</sup> AOCs Annual Meeting & Expo, May 4-7, 2014, San Antonio (USA)

Emiko Okamura, Yuki Takechi, Hiroyuki Saito, Noriyuki Yoshii, Motions and Fluctuations of Phospholipid Molecules in Large and Cell Sized Vesicles by NMR, 33<sup>rd</sup> International Conference on Solution Chemistry, July 7-12, 2013, Kyoto Terrsa, Kyoto, Japan

Emiko Okamura, Noriyuki Yoshii, Static and Dynamic Behaviors of Drug Delivery to Lipid Bilayer Membrane by NMR and Molecular Dynamics Simulation, World Congress on Oleo Science & 29<sup>th</sup> ISF

Congress, September 30-October 4, 2012,  
Arkas Sasebo, Nagasaki, Japan  
Noriyuki Yoshii, Tomomi Emoto, Emiko Okamura, Kinetics of Membrane Binding and Mobility of Drugs by Multinuclear Dynamic NMR in Situ, 14th International Association of Colloid and Interface Scientists Conference, May 13-18, 2012, Sendai International Center, Sendai, Japan

[図書](計1件)

岡村 恵美子、『揺らぎ・ダイナミクスと生体機能-物理化学的視点から見た生体分子』(共著):化学同人(2013)第14章 pp.212-222

[その他]

ホームページ等

[http://www.himeji-du.ac.jp/faculty/dp\\_pharm/pharm/ph/](http://www.himeji-du.ac.jp/faculty/dp_pharm/pharm/ph/)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

岡村 恵美子 (OKAMURA EMIKO)  
姫路獨協大学・薬学部・教授  
研究者番号:00160705

### (2)研究分担者

安岐 健三 (AKI KENZO)  
姫路獨協大学・薬学部・助手  
研究者番号:50714945 (平成25年7月～)

武知(原矢)佑樹 (TAKECHI-HARAYA YUKI)  
姫路獨協大学・薬学部・助教  
研究者番号:30634604 (~平成26年3月)