

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840051

研究課題名(和文)人工エキソ/エンドサイトーシス系の界面解析と標的特異的分泌/取り込み系への展開

研究課題名(英文) Interfacial analysis using artificial exo/endocytotic systems and development of target-specific secretion/uptake systems

研究代表者

田所 哲 (TADOKORO, SATOSHI)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：20389109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、巨大リボソーム内に微小リボソームを含有させ、GUV内にCa<sup>2+</sup>を流入させることで、微小リボソーム内の物質を外部に分泌できる人工エキソサイトーシス系を構築した。本研究では、構築した人工系を用いて、巨大リボソーム内外の浸透圧差や、リボソームの脂質組成がエキソサイトーシス活性に及ぼす影響を明らかにした。またアミロイド $\beta$ に対して特異的な人工エキソサイトーシス系の開発に向けて、アミロイド $\beta$ 刺激によって巨大リボソーム内部にCa<sup>2+</sup>流入が引き起こされることを確認した。これらの研究成果は、アミロイド $\beta$ を認識して、これに対してアミロイド $\beta$ の分解酵素を分泌・分解する系の開発に繋がるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Previously, we developed an artificial exocytotic system that secretes intravesicular contents upon Ca<sup>2+</sup> influx in GUV. In this study, we cleared the effect of osmolality gap between the inside and the outside of GUV and lipid composition of GUV on exocytotic release. We also found that Ca<sup>2+</sup> influx into GUVs was induced by amyloid beta, suggesting that our artificial exocytotic system could induce exocytosis-like secretion by Ca<sup>2+</sup> elevation in GUV. These results will lead to the development of artificial exocytotic systems which release amyloid-degrading enzymes by recognizing amyloid beta.

研究分野：生物物理学

キーワード：人工細胞 開口放出 リボソーム

### 1. 研究開始当初の背景

エキソサイトーシス（開口放出）とは、細胞内の分泌小胞が細胞膜と融合して内容物を細胞外に分泌する現象である。我々は、人工膜小胞であるリポソームを用いてエキソサイトーシス様の分泌を引き起こす細胞サイズの人工系の開発に成功した。この人工エキソサイトーシス系は、細胞サイズの巨大リポソーム内に、分泌小胞に相当する微小リポソームを内包させた系で、巨大リポソーム内に  $Ca^{2+}$  を流入させることで、エキソサイトーシス様に微小リポソーム内の物質を外部に分泌することができる。一方、エンドサイトーシスは、細胞外の物質を細胞膜が取り囲んで細胞内に取り込む現象である。我々は同様に、巨大リポソームを用いて外部のナノ粒子をエンドサイトーシス様にリポソーム内に取り込む人工系の開発にも成功した。

### 2. 研究の目的

本研究では、これらの人工エキソ/エンドサイトーシス系を用いて、脂質組成や系の物理化学的性質とエキソ/エンドサイトーシス活性との相関を明らかにする。また、特定の標的に対してエキソ/エンドサイトーシスを行う系へと発展させることを目的とする。

### 3. 研究の方法

脂質組成や系の物理化学的性質とエキソサイトーシス活性相関

巨大リポソームおよび内包する微小リポソームを構成する脂質の組成や、巨大リポソーム内外の浸透圧差がエキソサイトーシス活性に及ぼす影響を検討した。

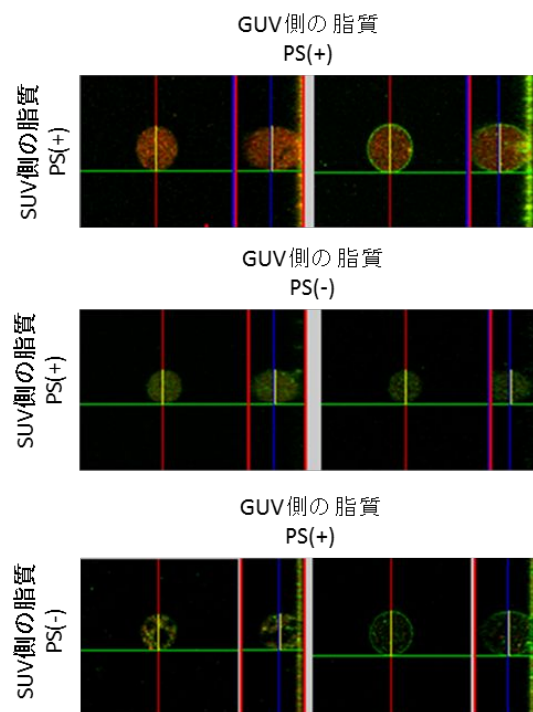
標的特異的人工エキソサイトーシス系の開発

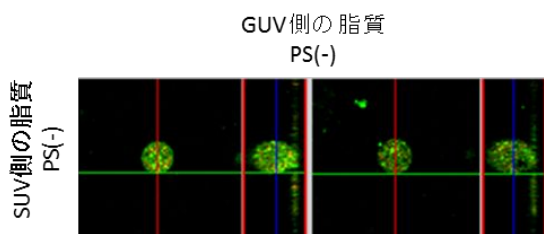
人工エキソサイトーシス系は、外液から巨大リポソーム内に  $Ca^{2+}$  が流入することでエキソサイトーシス活性を示す。アルツハイマー症の原因タンパク質であるアミロイドは、 $Ca^{2+}$  透過性のチャネルを形成することが明らかにされている。アミロイドに特異的な

人工エキソサイトーシス系の開発に向けて、アミロイドを用いて巨大リポソームを刺激することで、巨大リポソーム内に  $Ca^{2+}$  流入が引き起こされるかどうかを、 $Ca^{2+}$  感受性の蛍光色素である fluo-3 を用いて確認を行った。

### 4. 研究成果

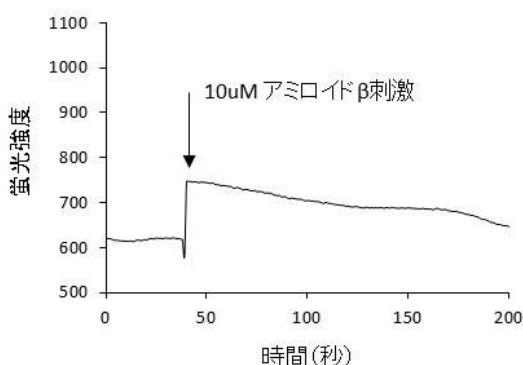
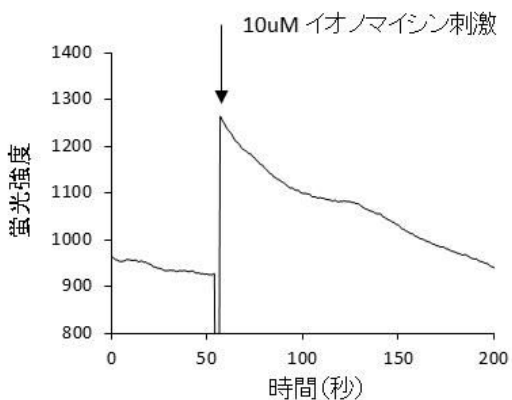
巨大リポソーム内外の浸透圧比（巨大リポソーム外液の浸透圧/巨大リポソーム内液の浸透圧）として、2.8、3.2、3.6、4.0 で検討を行ったところ、4.0 の時に最も融合効率が高く、2.8 と 3.2 の時には膜融合が引き起こされなかった。次に、巨大リポソーム側と微小リポソーム側で、どちらのホスファチジルセリン（PS）がエキソサイトーシス活性に重要であるか検討を行った。膜の成分として PS を含む巨大リポソームを用いた時には、微小リポソーム側の PS の有無に関わらず、エキソサイトーシス様の膜融合が観察された。その一方で、膜の成分として PS を含まない巨大リポソームを用いた時には観察されなかった（下図）。





これらの結果は、エキソサイトーシス様の膜融合において、巨大リポソーム側の PS が重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

次に、アミロイド に特異的な人工エキソサイトーシス系の開発に向けて、巨大リポソームをアミロイド で刺激することで、Ca<sup>2+</sup>流入が引き起こされるかどうか検討を行った。その結果、10 $\mu$ M のアミロイド で刺激を行うことで、巨大リポソーム内に Ca<sup>2+</sup>流入が引き起こされることを確認することができた(下図)。



今後は、分泌小胞に相当する微小リポソームを内包した巨大リポソームに対してアミロイド 刺激を行うことで、エキソサイトーシス活性を確認する予定である。

## 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2件)

Miho Ikeya, Kiyoshi Yamanoue, Yuji Mochizuki, Hirofumi Konishi, Satoshi Tadokoro, Masahiko Tanaka, Ryo Suzuki, Naohide Hirashima

Orai-2 is localized on secretory granules and regulates antigen-evoked Ca<sup>2+</sup> mobilization and exocytosis in mast cells

*Biochemical and Biophysical Research Communications* **451** 62-67 (2014)

Yoshikazu Inoh, Satoshi Tadokoro, Hiroki Tanabe, Makoto Inoue, Naohide Hirashima, Mamoru Nakanishi, and Tadahide Furuno

Inhibitory effects of a cationic liposome on allergic reaction mediated by mast cell activation.

*Biochemical Pharmacology* **86**, 1731-8 (2013)

[学会発表](計13件)

大嶽修一、宮地克真、児玉卓也、田所 哲、鈴木 亮、田中正彦、平嶋尚英  
改変好塩基球を用いた腫瘍特異的 DDS への展開

日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月 28 日(神戸);28PB-pm101S

猪飼千春、田所 哲、平嶋尚英

Chediak-Higashi 症候群原因タンパク質 LYST のマスト細胞における機能解析

日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月 28 日(神戸);28PB-am096

望月雄司、池谷美穂、山之上潔、小西尋文、田所 哲、田中正彦、鈴木 亮、平嶋尚英

分泌顆粒に局在する Ca チャネル Orai-2 によるマスト細胞の機能制御

日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月 28 日(神戸);28PB-am092

田所 哲、柴田哲大、天野稔朗、伊納義和、中西 守、平嶋尚英、楯 直子

マスト細胞の脱顆粒における syntaxin3 のリン酸化の役割

日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月 27

日(神戸)27PA-pm043

伊納義和、田所 哲、平嶋尚英、古野忠秀、中西 守

正電荷リポソームの物性がマスト細胞の活性化に及ぼす影響

日本薬学会第135年会 2015年3月27日(神戸)27PA-pm040

田所 哲、尾関祐哉、加来岳飛、楯 直子、平嶋尚英

マスト細胞の開口放出における synaptotagmin2 の役割とその機能領域  
第87回日本生化学会大会 2014年10月18日(京都); 4P-243

伊納義和、田所 哲、田邊宏樹、井上 誠、平嶋尚英、古野忠秀、中西 守

正電荷リポソームがマスト細胞の活性化による即時型アレルギー反応に及ぼす影響

日本薬学会第134年会 2013年3月29日(熊本); 29pML-051

田所 哲、笹井雅夫、平嶋尚英

人工開口放出系を用いた開口放出様膜融合の脂質依存性

日本薬学会第134年会 2013年3月29日(熊本); 29pML-024

Satoshi Tadokoro, Yoshikazu Inoh, Mamoru Nakanishi, Naohide Hirashima  
Synaptotagmin 2 promotes

SNARE-mediated membrane fusion between liposomes that mimic mast cell exocytosis depending on Ca<sup>2+</sup> and phosphatidylinositol

4,5-bisphosphate

The 2013 ascb annual meeting 2013年12月15日(New Orleans); B523

伊納義和、田所 哲、田邊宏樹、井上 誠、平嶋尚英、古野忠秀、中西 守

正電荷リポソームがマスト細胞の活性化に及ぼす影響

第35回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2013年11月22日(東京); A-10

田所 哲、伊納義和、中西 守、平嶋尚英

PIP2はsynaptotagmin 2によるSNAREを介した膜融合の促進に参与する

第50回日本生物物理学会 2013年10月30日(京都); 3P-223

宮地克真、児玉卓也、田所 哲、平嶋尚英

改変好塩基球を用いたがん細胞を標的とするDDSの構築

第86回日本生化学会大会 2013年9月13日(横浜); 3P-378

田所 哲、平嶋尚英

マスト細胞の開口放出様の膜融合におけるPIP2の役割

第86回日本生化学会大会 2013年9月11日(横浜); 1P-198

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田所 哲(TADOKORO Satoshi)  
帝京大学・薬学部・講師  
研究者番号: 20389109

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし