

令和 2 年 10 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14664

研究課題名(和文)人工脂質ラフトを用いた膜透過性ペプチドの流入点発生機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism underlying the influx point of cell-penetrating peptides using artificial lipid domains

研究代表者

河野 健一 (Kawano, Kenichi)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：70732874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膜透過性ペプチドR8の直接膜透過機構を明らかにする事は、薬物送達技術の向上において重要な課題である。本研究では、R8が脂質ラフトを足場として利用し、ラフト-非ラフト間の境界領域から細胞内に流入する仮説を立てた。まず、錯体脂質を用いて細胞膜上に安定した人工脂質ラフトの構築に成功した。次に、ラフト形成によって細胞膜上で局所的に脂質パッキング度合いが上昇していることがわかった。R8の細胞内流入の観察により、R8の膜透過は複合的な要因によって支配されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

革新的な新薬の創生には、細胞の膜表面分子だけでなく細胞内分子を標的とした薬物送達技術の向上が極めて重要である。細胞膜透過性ペプチドは直接膜透過によって効率的に細胞内へ分子を送達できる反面、送達可能な積荷分子にサイズ制限がある。膜透過機序が解明されれば、細胞内送達可能な化合物の幅が広がるだけでなく、膜透過しやすい薬物の性質に関する知見が得られる。また、効率的な薬物の送達支援ツール開発においてもその根底にある機序解明に関する基礎研究が必要不可欠である。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of the mechanism underlying the direct membrane permeation of a cell-permeating peptide, R8, is an important issue in improving drug delivery technologies. The applicant hypothesized that R8 utilizes lipid rafts as a scaffold to flow into cells from the boundary region between rafts and non-rafts. First, the applicant succeeded in constructing a stable raft on the cell membrane using a complex lipid. Then, it was found that the lipid packing at local regions on the cell membrane was tightened due to the raft construction. The observation of intracellular influx of R8 revealed that the membrane permeation of R8 might be governed by multiple factors.

研究分野：ペプチド化学、生物物理化学

キーワード：人工脂質ラフト 錯体脂質 細胞膜 境界領域

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

革新的な新薬の創生には、細胞の膜表面分子だけでなく細胞内分子を標的とした薬物送達技術の向上が極めて重要である。細胞膜透過性ペプチドは直接膜透過によって効率的に細胞内へ分子を送達できる反面、送達可能な積荷分子にサイズ制限がある。膜透過機序が解明されれば、細胞内送達が可能な化合物の幅が広がるだけでなく、膜透過しやすい薬物の性質に関する知見が得られる。効率的な薬物の送達支援ツール開発においてもその根底にある機序解明に関する基礎研究が必要不可欠である。

近年、申請者らは、薬物送達ツールとして汎用されている膜透過性ペプチド R8 (アルギニン残基 8 個連続) の直接膜透過現象に脂質パッキングが重要であることを報告した (*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2017, 56, 7644)。R8 が細胞内に入る瞬間、細胞膜上で幾つかの流入点的形成されるのが観察された。流入点となる領域は元々脂質パッキングが緩い領域であり、脂質間の隙間から R8 が透過することで膜が押し広げられ、さらに脂質パッキングが緩和することが示唆された。しかしながら、なぜ生体膜に隙間構造のある特別な領域が不均一に存在するかは分かっていない。

直接膜透過現象はペプチドと膜の物理化学的要因で決まるため、この現象を明らかにするためには膜の物性を知る必要がある。申請者が注目したのは生体膜に不均一性をもたらす脂質ラフトの存在であり、その境界領域に出来た隙間構造が、R8 が形質膜を直接透過するのに必要な突破口になる可能性があると考えた。一般的に、異なる性質の二相が互いに交わる時、その境界面は、安定した両相の内部に比べて不安定であるため余剰エネルギーをもつことが多い。脂質ラフトの境界領域もこの原理に当てはまるのであれば、境界領域の持つ高エネルギー状態を緩和する物質が R8 であり、両相の脂質分子を抱き込みながら、ラフト相と非ラフト相の境界領域を通過するのではないかと考えた。しかしながら、脂質ラフトは直径 10–200 nm 程度と提唱されており、その寿命が数十 ms と極めて短いため、通常の光学顕微鏡では時空間分解能の観点から生細胞膜上のラフト全体像、特に境界領域を正確に捉えられないという難しさがあった。そこで、生細胞膜上に安定な人工モデルラフトを構築し、仮説を立証しようと思いついた。

### 2. 研究の目的

脂質間の隙間から R8 が透過する過程において、なぜ生体膜に隙間構造のある特別な領域が不均一に存在するかは分かっていない。申請者は「R8 が直接膜透過する際に脂質ラフトを足場として利用し、ラフト相–非ラフト相の境界領域 (隙間構造) から細胞内に流入する」仮説を立てた。脂質ラフトは飽和脂肪酸同士が密接にパッキングしているのに対して、その境界領域は相対的に過疎であるため、膜の隙間構造が存在する。そこから R8 が集中的に流入し、両相の脂質分子の頭部と相互作用しながらラフト相と非ラフト相の境界領域を通過するのではないかと予想した。本研究の目的は、仮説を検証しながら膜透過性ペプチドの直接膜透過機構を調査する事である。

### 3. 研究の方法

これまでの研究でラフトの測定技術が向上して様々なラフト説が提唱されてきたが、既存手法では動的なラフトの全体像、特に生体膜上のラフト–非ラフト相の境界領域を捉える事は依然として困難である。これは、直径 10–200 nm 程度のサイズで、寿命が数十 ms と極めて短い動的なラフトの持つ性質に起因するためだと考えられる。そこで申請者は、リポソーム上で既に確立された錯体化学に基づく人工脂質ラフト構築技術 (図 1) (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 1139) を生細胞膜上に展開することにした。人工脂質ラフトは錯体脂質と金属イオンから成る二次元ネットワーク形成により細胞膜上で安定して存在する性質がある。実験の結果、少なくとも室温で 60 分以上安定して存在することが分かった。また、細胞に添加する錯体脂質の量を調整することで、サイズの異なる人工脂質ラフト (数百 nm~数  $\mu\text{m}$ ) を形成できるため、蛍光顕微鏡で安定なラフト–非ラフト相の境界領域を観察できる。以上の理由から人工脂質ラフトは本研究の目的に適合しているため、モデルラフトとして採用した。

人工脂質ラフト形成には金属錯体脂質 Mn-dabco-C<sub>16</sub> (Mn-C<sub>16</sub>) を用いた。Mn-C<sub>16</sub> は尾部に 2 つのアルキル鎖と、頭部に配位子テトラシアノメタレートをもつ (図 1A)。Mn-C<sub>16</sub> は分子間相互作用により単独でも弱いながら二次元ネットワークを形成することができるが、ニッケル金属イオン (Ni<sup>2+</sup>) 存在下では錯体脂質の頭部基との配位結合形成によりネットワークが安定化して、より強固な人工脂質ラフトを形成する (図 1B)。チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞膜を液体無秩序 (Ld) 相マーカーである蛍光脂質  $\beta$ -BODIPY FL C<sub>12</sub>-HPC ( $\beta$ -C<sub>12</sub>) (図 1A) で染色した後、Mn-C<sub>16</sub> や NiCl<sub>2</sub> を加えてラフト形成の観察を共焦点顕微鏡で行った。

R8 の膜透過実験には、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) で蛍光標識した R8 ペプチド (FITC-R8) を用いた。細胞内総取込み量はフローサイトメトリーで測定した。直接膜透過を示す細胞の割合は共焦点顕微鏡で観察して算出を行なった。

脂質パッキングは、細胞膜を環境感受性蛍光プローブ (di-4-ANEPPDHQ) で染色し、Generalized Poralization (GP 値) を算出する事で相対的に評価した。

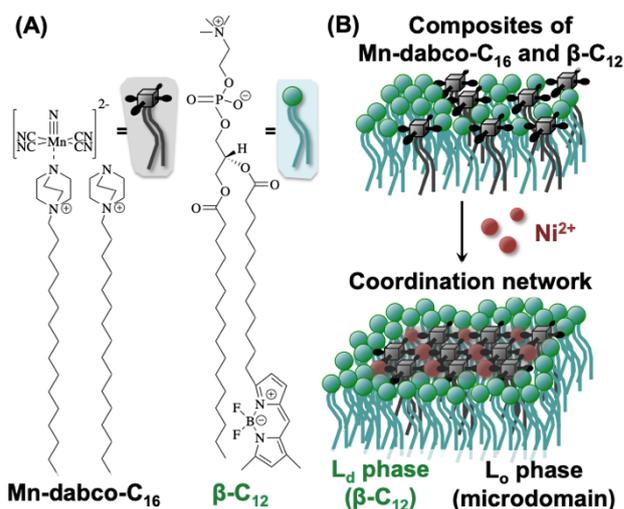


図 1

- (A) 錯体脂質 Mn-dabco-C<sub>16</sub> (Mn-C<sub>16</sub>) と Ld 相マーカーである蛍光脂質 β-BODIPY FL C<sub>12</sub>-HPC (β-C<sub>12</sub>) の構造。
- (B) 人工脂質ラフト形成の模式図。生細胞に Mn-C<sub>16</sub> を添加することで膜中に取り込まれる。Ni<sup>2+</sup> 存在下で細胞膜中の Mn-C<sub>16</sub> が集積して人工脂質ラフトを形成する。

#### 4. 研究成果

##### 細胞膜上における人工脂質ラフトの構築

生細胞膜上で人工脂質ラフトの構築を試みた。まず、細胞毒性を示さない濃度の錯体脂質 Mn-C<sub>16</sub> (5 μM) と金属塩 NiCl<sub>2</sub> (40 μM) を用いて細胞膜上でのラフト形成を共焦点顕微鏡で観察した。液体無秩序 (Ld) 相に分配しやすい蛍光脂質 β-C<sub>12</sub> で細胞膜を染色すると、ラフトは液体秩序 (Lo) 相の性質を持つため、ラフト形成と共に β-C<sub>12</sub> がラフト外に排除されて黒い領域が出現する。

Mn-C<sub>16</sub> を添加する前の細胞では β-C<sub>12</sub> が均一に分布するのに対して、Mn-C<sub>16</sub> を添加後には黒い点が見られた。さらに NiCl<sub>2</sub> を添加すると黒い点が互いに融合して直径約 1–3 μm のラフトへと成長する様子が見られた。これは、Ni<sup>2+</sup> によって Mn-C<sub>16</sub> 同士が強固に繋ぎ止められ巨大なネットワークが形成されたためだと考えられる。一方で、コントロールとして Mn-C<sub>16</sub> を添加せずに NiCl<sub>2</sub> だけを添加した条件では、黒い領域は見られなかった。ラフトの成長は、ラフト–非ラフト相の境界領域がエネルギー的に不安定であるため自発的に界面の表面積が減る方向に働くことで、相分離の粗大化プロセスが進行した結果であると考えられる。

また、生細胞膜上で構築した人工脂質ラフトはリポソーム膜上では見られなかった特有の性質を有している事が分かった。リポソーム膜上では Mn-C<sub>16</sub> 分子同士を繋ぎ止める為に金属イオンが脂質間ネットワーク構築 (ラフト形成) に必要不可欠だが、興味深い事に、生細胞膜上では Ni<sup>2+</sup> が無くても Mn-C<sub>16</sub> だけで小さなラフト領域が形成され、ゆっくりと自己集積化していく様子が見られた (10–20 分程度必要)。この現象には生細胞の持つアクチン膜骨格の関与が示唆されている。アクチン膜骨格の作り出す膜上の微小領域に錯体脂質が閉じ込められ、行動範囲に制限を受ける。局所濃度の高まりによって錯体脂質は金属イオンが無くてもラフトを形成できるが、アクチン膜骨格が崩壊すると錯体脂質が分散してラフトが消失する。実際に細胞のアクチン膜骨格を壊す試薬を処理するとラフトが消滅していく様子が観察された。Ni<sup>2+</sup> 存在下では Mn-C<sub>16</sub> 分子同士が強固に繋ぎ止める為、アクチン膜骨格が壊れていてもラフトは維持されていた。

##### 人工脂質ラフト形成における膜物性への影響

人工脂質ラフト構築によって境界領域の形成だけでなく膜物性にも影響を及ぼしていると考えた。ラフト形成に伴う膜の物性変化を調べる為に、環境応答性プローブ Di-4-ANNEPDHQ を用いて脂質パッキングを評価した。その結果、ラフト形成によって局所的に脂質パッキングが強固になっていることが分かった。

##### R8 の直接膜透過機構

R8 の膜透過実験には FITC-R8 を用いた。まず、コントロールとして無処理の CHO 細胞に 20 μM の FITC-R8 を添加して、細胞内の蛍光強度をフローサイトメトリーで測定し、その強度を 100% とした。次に、5 μM Mn-C<sub>16</sub> を細胞に添加して人工脂質ドメインを形成した条件では、無処理細胞と比べて 20 μM FITC-R8 の取込み量が 60–70% 低下したことが分かった。Ni<sup>2+</sup> の有無に拘らず R8 の取込み量の低下割合は同等だった。同じ条件で、共焦点顕微鏡を用いて 20 μM FITC-R8 の直接膜透過を観察したところ、直接膜透過を示す細胞の割合が人工脂質ラフト形成下で顕著に低下していることが明らかになった (直接膜透過を示す細胞割合: 無処理細胞群では 85%, 人工脂質ラフト形成条件下の細胞群では 18% だった)。上記の結果から、R8 の直接膜透過には複合的な要因が存在することが示唆された。今回得られた重要な知見を基に、今後は異なる角度で R8 の膜透過メカニズムの解明に迫る予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Sakai Takayuki, Kawano Kenichi, Iino Masatomo, Takeuchi Toshihide, Imanishi Miki, Futaki Shiroh	4. 巻 20
2. 論文標題 Loosening of Lipid Packing by Cell Surface Recruitment of Amphiphilic Peptides by Coiled Coil Tethering	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 2151-2159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.201900347	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 Ryo Ohtani, Kenichi Kawano, Masanao Kinoshita, Saeko Yanaka, Hikaru Watanabe, Kenji Hirai, Shiroh Futaki, Nobuaki Matsumori, Hiroshi Uji-i, Masaaki Ohba, Koichi Kato and Shinya Hayami	4. 巻 59
2. 論文標題 Pseudo-Membrane Jackets: Two-Dimensional Coordination Polymers Achieving Visible Phase Separation in Cell Membrane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed.	6. 最初と最後の頁 17931-17937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.202006600	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 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河野健一, 高橋康史, 大谷亮, 木下祥尚, 二木史朗
2. 発表標題 生細胞膜上における相分離の誘発と可逆的制御
3. 学会等名 第17回フィジカルファーマフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野 健一, 高橋 康史, 大谷 亮, 木下 祥尚
2. 発表標題 錯体脂質を用いた生細胞膜上における人工ドメイン構築
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenichi Kawano, Yasufumi Takahashi, Ryo Ohtani, Masanao Kinoshita, Shiroh Futaki
2. 発表標題 Induction and reversible control of phase separation on living cell membranes
3. 学会等名 第57回日本生物物理化学学会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野 健一, 高橋 康史, 大谷 亮, 木下 祥尚
2. 発表標題 人工ドメイン形成による膜物性および細胞形態の変化
3. 学会等名 膜シンポジウム2019
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