

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19684015
 研究課題名（和文） 膜の相分離によるリポソームの変形機構を利用した新規薬剤送達システムの開発
 研究課題名（英文） Drug delivery by liposome membrane phase separation mechanism
 研究代表者
 野村 慎一郎（NOMURA SHINICHIRO）
 京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定研究員
 研究者番号：50372446

研究成果の概要：

本研究の目的は、環境条件による相分離を利用した新規リポソーム DDS（薬剤送達システム）の開発である。研究代表者はリポソーム内で無細胞タンパク質合成を行わせることにより、目的のタンパク質のみを発現させたリポソームが構築可能であることを示してきている。最近、細胞間で相互の物質輸送を担う膜タンパク質・コネクシンをリポソーム膜に発現・提示しうるとの実験結果を得た。この結果を利用し、細胞への DDS への利用可能性を求めた。サイズおよび組成の異なるリポソーム環境で膜タンパク質を組み込み、培養細胞に水溶性蛍光色素を非破壊的に輸送することに成功した。またペプチド薬剤をモデルとして細胞内に輸送し、細胞内の遺伝子発現の制御が可能であること、異なるタイプのコネクシンの発現により標的選択性が得られることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	6,800,000	2,040,000	8,840,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理

キーワード：リポソーム、無細胞タンパク質合成、DDS、膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

近年、実際の細胞機能を部分的に再現するための実空間モデルとして、細胞サイズリポソーム（直径 1～100 μ m）環境で *in vitro* タンパク質合成が可能であることが報告されてきている。特に膜タンパク質は細胞において物質輸送・情報変換等の重要な役割を担う一方、*in vitro* 合成では一般にその疎水性の高さから活性状態で抽出が困難であるとされている。研究代表者・野村らは、リポソーム共存下で膜タンパク質を無細胞発現、提示させる手法を提案し、リポソーム膜への発現後直

接構成および機能化に向けた研究を行っている(Fig.1)。一方でリポソームは、これまでに薬剤送達システム（DDS）として多岐にわたる研究が進められてきているが、DDS を実際に生体内で用いるための研究に本質的に重要となる要素は、高度な血中滞留性や免疫反応を惹起しない等のステルス性と、部位選択的な輸送性（ターゲティング）の両立である。これまでに、DDS 用キャリアとして研究されているリポソーム等のナノ微粒子に対し、その表面をポリエチレングリコール（PEG）等の生体適合性のよい高分子で被覆す

ることでステルス性を与えることが示されてきている。またターゲティングを実現するために、微粒子表面に選択性の高い抗体等の認識分子を付加する研究も進められている。しかしこれらの要素を共存させると、ステルス性高分子が最表面にある場合には認識分子が働かず、逆に認識分子が最表面にあるとステルス性が下がるというジレンマに陥る。そこで、滞留中はステルス性を、目的部位で選択性を示すキャリアが必要とされる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、環境条件による膜の相分離を利用して、ステルス性と標的選択性とを両立させる新規リポソーム DDS(薬剤送達システム)の開発である。リポソーム表面は、種々の化学修飾によりステルス性および標的選択性の付加が可能であることが周知の事実である。本研究では、その両者を同時に実現するための分子装置として、膜タンパク質に着目している。(1)まず、モデル膜タンパク質をリポソーム環境で合成(発現)させ、膜への導入の有無を確認し(2)細胞への物質輸送に有効と考えられる膜タンパク質として、細胞間でギャップジャンクション(GJ)と呼ばれる物質輸送チャンネルを形成する膜タンパク質・コネクシンをリポソーム膜に発現・提示させ、(3)コネクシン分子の特異性を利用することで細胞への標的選択性を求めた。さらに(4)実際に培養細胞内への遺伝子発現経路を阻害する実験を行い、応用への可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 膜タンパク質のモデルとして、一回膜貫通領域を有する Cytochrome b5 (以下 b5) に着目した。リポソーム共存下で b5 を発現させることにより、膜への自発的な挿入の有無を求めた。無細胞翻訳系として、コムギ胚芽系無細胞タンパク質翻訳システムである PROTEIOS (TOYOBO, 和研薬) を用いた。リポソームは種々の脂質組成 (EggYolkPC, DOPC 等) から翻訳反応用バッファにより最終濃度 1mM に調製した。b5 および融合体

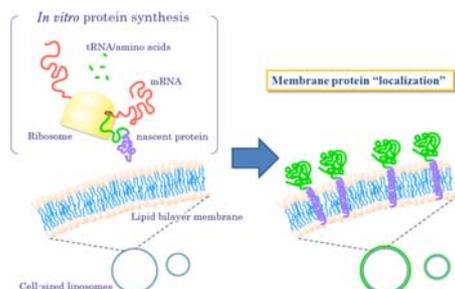


Fig. 1: Scheme on in vitro membrane-protein synthesis model.

(GFP) の mRNA をリポソーム溶液と混合しタンパク質合成反応を行い、GFP 融合体について蛍光強度の経時変化を追跡した。反応後溶液から遠心分離によりリポソーム画分を抽出し、SDS-PAGE およびレーザー共焦点蛍光顕微鏡観察を行った。またリポソームに水溶性色素 Calcein を内封し、多数の蛍光顕微鏡像よりリポソームのサイズ分布を求めた。

(2) 細胞間の物質輸送を司るチャンネル形成タンパク質であるコネクシン (Cx43・四回膜貫通領域を有する) をリポソーム環境にて発現させ、機能の測定を試みた。Cx43 のプラスミド DNA を混和したウサギ無細胞転写翻訳系溶液を EggYolkPC の乾燥フィルムに添加してリポソームを形成させ、同時にタンパク質合成をおこなった。得られたサンプルから Westernblot で Cx43 の発現を確認し、GFP 融合 Cx43 および抗体染色によりリポソーム膜への局在を確認した。Cx43 の活性測定のた

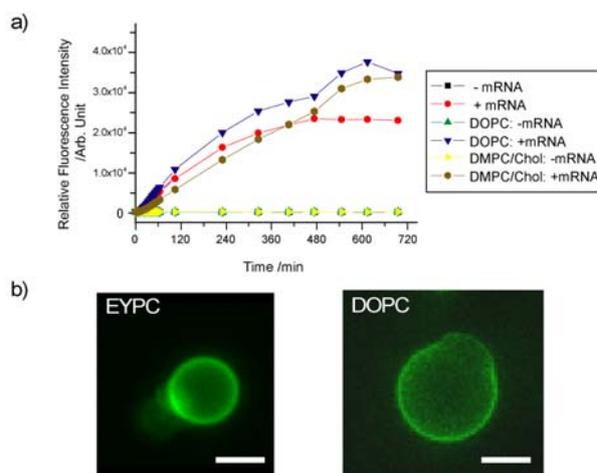


Fig. 2: a) Time course of the fluorescence intensity of the EGFP-b5 in vitro translation reaction in the presence of liposomes. b) Fluorescence microscopic images of EGFP-b5 displaying giant liposomes. Scale bar = 5µm.

め、蛍光色素 Calcein を内封したりポソームを、Cx43 を発現する培養細胞(U2OS)に添加して蛍光色素の細胞への移行を確認した。また、内封する蛍光分子として FITC-Dextran を用い、物質輸送の分子量依存性を検討した。GJ 形成阻害剤 (18β-glycyrrhetic acid) を用いた阻害確認実験を行った。

(3)この物質輸送の選択性を求めるために、GJ を形成するコネクシンのファミリーに着目した。その組み合わせによってチャンネル形成能が ON/OFF 的に生じることが知られている。そこで、互換性を有しない組み合わせとされる Cx43 と Cx32 をリポソームに組み込み、培養細胞への物質輸送能を調査した。

(4) Cx43 を発現したリポソームを用いて、DDS 試験を行った。培養細胞 (Cx43 発現) に誘発した NF- κ B 経路を阻害する親水性のペプチド (単体では細胞内への導入不可) を Cx43 発現リポソームに封入し、細胞培養液に添加することによって細胞に対する経路の阻害効果を確認した。

4. 研究成果

(1) 96wellplate での GFP 蛍光強度の経時変化より、30hour 前後で合成反応が終了し、顕微鏡観察よりリポソーム膜に GFP が局在することが分かった (Fig. 2)。また、SDS-PAGE により、遠心分離されたリポソーム画分から b5 の単一バンドが得られた (Fig. 3) ことから、合成された b5 がリポソーム膜へと集積していることが明らかになった。

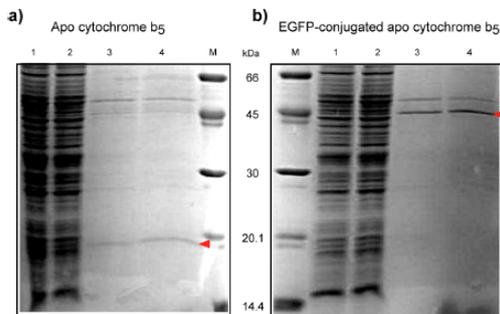


Fig. 3: SDS-PAGE analysis of *in vitro* translation of cytochrome b5 with liposomes. **a)** Synthesized apo cytochrome b5. lane 1 and 3, before and after purification by simplified density gradient centrifugation with DOPC liposomes. Lane 2 and 4, with Egg Yolk PC liposomes. **b)** Synthesized EGFP-conjugated apo cytochrome b5. lane 1 and 3, before and after purification with DOPC liposomes. Lane 2 and 4, with Egg Yolk PC liposomes.

(2) b5 同様に、発現した Cx43 のリポソーム膜への局在が確認された (Fig. 4)。また、培養細胞への蛍光色素移行実験より、Calcein (Mw.622) は細胞内へと高効率で輸送され、FITC-Dextran (Mw. 3000, 10000) は移行されないことが確認された。また Calcein の輸送は阻害剤存在下で明確に働かないことから、リポソーム膜に局在した Cx43 が GJ 形成能をもつことが示された (Fig. 5)。

(3) Cx43 と Cx32 をそれぞれ発現した培養細胞とリポソームとを調製し、蛍光色素輸送試験を行った結果、Cx43 同士、Cx32 同士の組み合わせに限り、輸送が確認された。異種の組み合わせ、また発現していないリポソームを用いた際に輸送は確認されなかった。

(4) 培養細胞に対する IL-1 β 刺激による

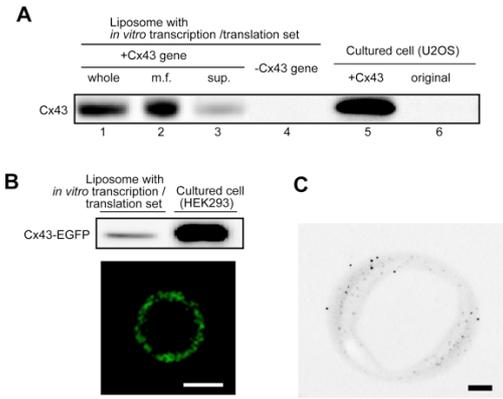


Fig. 4: **A,** Western blotting analysis of Cx43 protein expressed in liposomes. **B,** Confocal microscopic image of giant liposomes prepared with Cx43-EGFP fusion protein expression. Bar=5 μ m. **C,** Immunoelectron microscopic images of the Cx43-liposomes. Cx43s were identified by immunogold labeling (black dots). Bar=100 nm.

NF- κ B 経路は、Cx43 発現リポソームに内蔵されたペプチドにより効果的に阻害されることが Luciferase assay および RT-PCR の結果より明らかになった。また、変異体ペプチドを用いた試験では同様の効果は得られなかった。

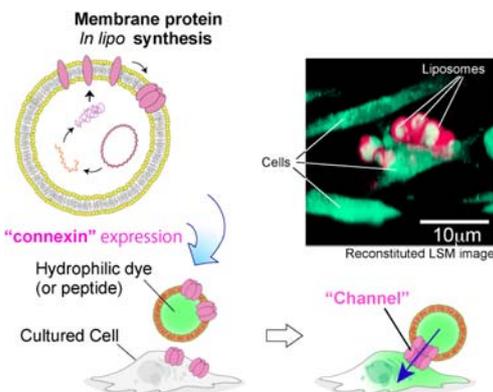


Fig. 5: Functional membrane protein "Connexin" synthesized on the liposomal membrane. Transport of the dye indicates the formation of channel between liposomes and cells.

以上の結果より、リポソーム環境下で無細胞合成された膜タンパク質は、リポソーム膜に局在して活性を示しうることが確認された。本手法は、プロテオリポソーム調製法として膜タンパク質に対するシャペロン機構や翻訳後修飾の効果などの分子細胞生物学研究

や、機能化リポソーム調製に有用であると考
えられるのみならず、Cx 導入リポソームは、
内封した小分子を選択的に細胞質に直接導
入できる薬剤キャリアとしての応用が期待
される。

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 4 件)

- ① M. Kaneda, S.-i. M. Nomura, S. Ichinose,
S. Kondo, K.-i. Nakahama, K. Akiyoshi, I.
Morita, Direct formation of
proteo-liposomes by in vitro synthesis and
cellular cytosolic delivery with
connexin-expressing liposomes,
Biomaterials, 2009, 印刷中, 査読有.
- ② S.-i.M. Nomura, T. Hamada,
Artificial-Cellular Computing, Int. J.
Unconventional Computing, 5, 87-102,
2008, 査読有.
- ③ 野村 M. 慎一郎, 山田彩子, 吉川研一,
細胞機能の実空間モデリング, 生物物
理, 48, 174-179, 2008, 査読有.
- ④ S.-i. M. Nomura, S. Kondoh, W. Asayama,
A. Asada, S. Nishikawa and K. Akiyoshi,
Direct preparation of giant
proteo-liposomes by in vitro membrane
protein synthesis, J. Biotechnology, 133,
190-195, 2008, 査読有.

[学会発表] (計 5 件)

- ① S.-i.M.Nomura, K. Akiyoshi,
Lipid-tubular network formation for
biochemical reaction, International
Symposium on
Micro-Nanomechatronics and Human
Science 2007, 2007.11.12, 名古屋大
学
- ② S.-i.M.Nomura, Y.Moritani, W. Asayama,
K. Akiyoshi, Protein synthesis liposome
equipped with cellular connection
mechanism. 6th International conference
of Biological Physics (ICBP2007),
2007.8.30, Montevideo, Uruguay.
- ③ 野村 M. 慎一郎, 森谷 優貴, 朝山 和
喜子, 秋吉 一成, 無細胞合成された
膜タンパク質のリポソーム上への集
積制御, 第 55 回高分子討論会,
2007. 9. 19, 名古屋国際会議場.
- ④ 野村 M. 慎一郎, 秋吉 一成, 無細胞
合成された膜タンパク質の相分離リ

ポソーム膜上への局在, 第 62 回日本
物理学会秋期年会, 2007. 9. 24, 北海
道大学.

- ⑤ 野村 M. 慎一郎, 森谷 優貴, 朝山 和
喜子, 森田 育男, 秋吉 一成, リポソ
ーム環境での膜タンパク質の合成と
機能化, 第 45 回日本生物物理学会年
会, 2007. 12. 21, パシフィコ横浜.

[図書] (計 1 件)

□野村慎一郎, 秋吉一成 (分担執筆), フロ
ンティア出版, フロンティアテクノシリー
ズ No.11— 有機・無機・金属ナノチューブ
— 非カーボンナノチューブ系の最新技術
と応用展開 —, 317, 2008.

6. 研究組織

(1)研究代表者

野村 慎一郎 (NOMURA SHINICHIRO)
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特
定研究員
研究者番号 : 50372446