

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21119

研究課題名(和文)人工細胞法を用いた新規膜融合型プロテオリポソームの創製とDDS応用

研究課題名(英文) Design and preparation of the fusogenic proteoliposomes by cell-free protein synthesis / liposome system

研究代表者

安藤 満 (Ando, Mitsuru)

京都大学・工学研究科・特定研究員

研究者番号：70737460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プロテオリポソームを基盤とした新規薬物内封方法、薬物送達技術の開発を目的として、膜融合活性を示す種々の膜融合性膜タンパク質をデザインした。リポソーム存在下、無細胞膜タンパク質合成を行うことで、膜融合性膜タンパク質を組み込んだ膜融合型プロテオリポソームを調製し、その膜融合活性を評価した。しかしながら、目的とする膜融合活性を有する膜融合型プロテオリポソームを得ることはできず、膜融合活性を得るには、さらなる分子シャペロンの添加、あるいは、糖鎖修飾などの翻訳後により膜融合性膜タンパク質の高次構造の保持が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We designed the fusogenic membrane protein-expressing plasmid DNAs to achieve the development of newly encapsulation methods and drug delivery systems based on membrane proteins reconstituted liposomes, proteoliposome. The cell-free fusogenic membrane protein synthesis was performed in the presence of liposomes. The fusogenic membrane proteins were successfully integrated into liposomal membrane, and we then evaluated their fusion activities. Unfortunately, we failed to obtain the fusogenic proteoliposome in the present study. These findings indicated that it is necessary to add other molecular chaperons or regulate the post-translational modification to form the correct conformation of fusogenic membrane proteins in the present system.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：膜融合性膜タンパク質 無細胞タンパク質合成 プロテオリポソーム 膜融合

1. 研究開始当初の背景

リン脂質を用いて調製した人工脂質小胞膜、リポソームは、内水相に水溶性薬物を、また、脂質膜面に脂溶性薬物を封入することができる薬物キャリアとして臨床で用いられている。リポソームは、「治療薬物を必要なときに、必要な場所で、必要な量」機能させる薬物送達システム(DDS)において「薬効の持続化を目的とした放出制御性」、また、「薬物を疾患部に送達する標的指向性」の両者を兼ね備えることが可能な薬物キャリアであり、今後もその需要は拡大すると考えられる。現在、リポソームへの薬物封入効率が最も高い方法として、リポソーム内外の pH やイオン濃度の差を利用したリモートローディング法が挙げられる。しかしながら、この方法によるリポソームへ内封可能な薬物は一部の親水性低分子に限られ、次世代医薬品である親水性高分子である核酸やタンパク質をリモートローディング法でリポソームへ内封するのは困難である。また、リポソーム製剤は、エンドサイトーシスと呼ばれる小胞輸送経路で細胞内へ取込まれるが、取込まれた薬剤の大半が薬効を発揮することなく分解系へ輸送されることが知られている。

当研究室ではこれまでに、リポソーム存在下、あるいは、リポソーム内部で無細胞タンパク質合成を行うことで、新生膜タンパク質の不溶性凝集体形成を抑制し、脂質膜へ膜タンパク質を組み込んだリポソーム、プロテオリポソームの調製方法(人工細胞法)を開発してきた。本手法では、脂質膜へ膜タンパク質を提示するだけでなく、リポソーム膜が提示された膜タンパク質の折り畳みやオリゴマー化による複合体形成を助けるシャペロン機能を有することを見出しており、提示した膜タンパク質そのものの機能を損なわず合成可能であることを明らかにしている。また、細胞間でギャップジャンクションと呼ばれるチャンネルを形成するコネキシン 43 を提示したプロテオリポソームを調製することで、チャンネル間腔を通過可能な低分子に限られるが、細胞質へ薬物を直接送達することに成功している。したがって、人工細胞法を用いて新規プロテオリポソームを調製することで、組み込んだ膜タンパク質の活性を利用した薬物内封、薬物送達に対する課題を克服できるのではないかと考えられる。

そこで、脂質膜と融合活性をもつ機能改変膜融合性膜タンパク質をデザインし、リポソーム存在下、無細胞タンパク合成システムを用いて膜融合型プロテオリポソームを構築することで、脂質膜間の融合を利用した薬物内封方法の開発、また、リポソームと生体膜との融合によって直接細胞質に薬物送達可能なプロテオリポソームの構築が実現可能であると考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では、プロテオリポソームを基盤と

した新規薬物内封方法、薬物送達技術の開発を目指した。生体膜とプロテオリポソームとの膜融合形態を考えた場合、細胞表面で作用することで細胞膜に融合可能であり、また、一度細胞内部へ取り込まれた後、エンドソーム膜と融合可能であると考えられる。そこで、様々な条件で膜融合活性を示す種々の膜融合性膜タンパク質をデザインした。リポソーム存在下、無細胞膜タンパク質合成を行うことで、膜融合型プロテオリポソームを調製し、その機能を評価した。

3. 研究の方法

(1) 膜融合性膜タンパク質のデザイン

トリプシンに反応して成熟化することで膜融合活性を示すセンダイウイルスの F タンパク質の N 末端にヒスチジンタグを融合した His-F と、エンドソーム内の酸性条件下で作用するインフルエンザウイルスのヘマグルチニン HA をコードした遺伝子を T7 プロモータによって遺伝子発現可能なプラスミドベクターに組み込むことで遺伝子発現ベクターを構築した。

(2) プロテオリポソームの調製

再構成型無細胞タンパク質合成試薬である PURESYSYSTEM に DOPC リポソーム、あるいは、DOPC/DMPE-RhoB/DMPE-NBD(200:1:1) リポソームを添加した。さらに膜融合性膜タンパク質発現プラスミドを添加することで反応溶液を調製した。反応溶液を 37℃、4 時間静置することで無細胞タンパク質合成を行った。

(3) プロテオリポソームの精製

プロテオリポソームの精製は以降の実験に合わせ二通りの実験条件で超遠心分離を行った後、分画回収した。膜融合性膜タンパク質の組み込み評価には、31%スクロース溶液に等量の無細胞タンパク質合成反応溶液を積層し、163,000g、4 時間、超遠心分離を行った。上層をリポソーム分画、下層を沈殿分画として上層:下層=3:1 となるように分画回収した。また、膜融合評価には、多用途密度勾配遠心分離媒体 OptiPrep™ を用いて超遠心分離を行った。無細胞タンパク質合成反応溶液を含む 42% OptiPrep 溶液に 25% OptiPrep 溶液を積層し、さらに 50mM HEPES 溶液を積層した後、197,000g、4 時間、超遠心分離を行い、上部から 600μL をリポソーム分画として回収した。

(4) 膜融合性膜タンパク質のリポソームへの組み込み評価

分画回収した各サンプルを SDS-PAGE を行った後、PVDF 膜に転写することで western blot を行った。センダイウイルス His-F の検出には His タグ特異抗体を用い、インフルエンザ HA の検出には HA 特異抗体を用いた。それぞれの特異抗体に対する HRP 標識二次抗体と反応させた後、HRP と基質との反応により

生じる化学発光量を指標として半定量的に膜融合性膜タンパク質のリポソームへの組み込み効率を評価した。

(5) 膜融合性膜タンパク質の成熟化

リポソームへ組み込まれた各膜融合性膜タンパク質を、トリプシン、あるいは、プラズミンを用いて、37 °C で反応することで成熟化した。

(6) 膜融合活性評価

膜融合活性の評価には、NBD と Rhodamine B により生じる Fluorescence resonance energy transfer (FRET) の解消率を経時的に測定することで評価した。すなわち、FRET が生じている DOPC/DMPE-RhoB/DMPE-NBD(200:1:1) リポソーム存在下、無細胞タンパク質合成を行うことで調製した膜融合性膜タンパク質プロテオリポソームを用いて、DOPC リポソームを混合し、37 °C で反応させた。経時的に 460nm の励起光を照射し、540nm と 590nm の蛍光強度を測定した。インフルエンザ HA については、成熟化を行った後、pH 4、pH 5、pH 6、pH 7 の溶液中で反応を行った。また、His-F については、pH 7 の溶液中で反応を行った。

4. 研究成果

(1) 膜融合性膜タンパク質の発現確認

酵素応答型膜融合性膜タンパク質としてセンダイウイルスの F タンパク質の N 末端にヒスチジンタグを融合した His-F と、pH 応答型膜融合性膜タンパク質としてインフルエンザウイルスのヘマグルチニン HA を発現するプラスミドを構築した (図 1)。

リポソーム非存在下、無細胞タンパク質合成を行った後、発現溶液中の膜融合性膜タンパク質を western blot で評価したところ、約 60 kDa の位置にバンドが認められたことから、目的の膜融合性膜タンパク質発現プラスミドの構築に成功した。

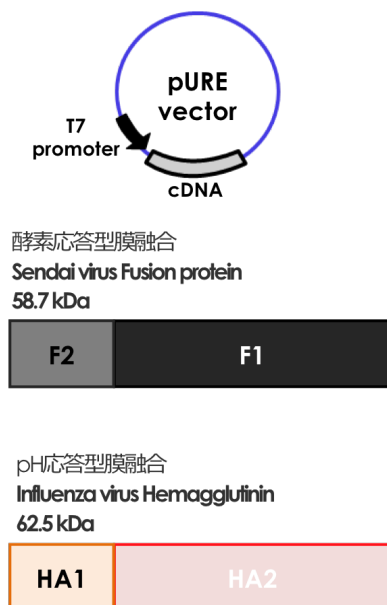


図 1. 膜融合性膜タンパク質発現プラスミドの模式図

(2) 膜融合性膜タンパク質組み込みプロテオリポソームの調製

DOPC リポソーム存在下、各膜融合性膜タンパク質を無細胞タンパク質合成することで膜融合性膜タンパク質のリポソーム膜への組み込みを評価した。その結果、インフルエンザ HA は DOPC リポソームへ組み込みが認められたものの、センダイウイルス His-F の DOPC リポソームへの組み込みはほとんど認められなかった。これまでの検討から、無細胞発現膜タンパク質は、反応時の脂質濃度に依存した組み込み効率の増大を示すことが明らかとなっている。そこで無細胞タンパク質合成反応時に添加する DOPC リポソームの量を増加したところ、最終的に発現した約 30% のセンダイウイルス His-F を DOPC リポソームに組み込むことに成功した。しかしながら同時に、翻訳が完全に行われていないセンダイウイルス His-F 由来と思われるバンドが多数リポソーム分画に存在することも明らかとなった。DOPC/DMPE-RhoB/DMPE-NBD(200:1:1) リポソームを用いて同様に組み込み効率を評価したところ、インフルエンザ HA、センダイウイルス His-F とともに DOPC/DMPE-RhoB/DMPE-NBD(200:1:1) リポソームへの組み込みが認められた。

(3) 膜融合性膜タンパク質の成熟化

インフルエンザ HA 組み込みプロテオリポソームを、トリプシン、あるいは、プラズミンを用いて切断したところ、約 36kDa に切断断片である HA1 由来のバンドが認められたことから (図 2)、構築したインフルエンザ HA 組み込みプロテオリポソームは、ある程度立体構造を保持したインフルエンザ HA がリポソーム膜に再構成されており、成熟化プロセスを受け得ることが可能であることが明らかとなった。

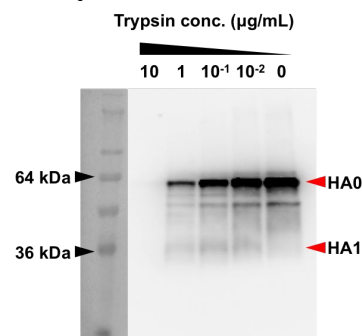


図 2. トリプシン処理(30分)による HA の成熟化

(4) 膜融合活性評価

DOPC/DMPE-RhoB/DMPE-NBD(200:1:1) リポソームに各膜融合性膜タンパク質を組み込むことでプロテオリポソームを調製した。インフルエンザ HA については、トリプシン、あるいは、プラズミンを用いて成熟化を行った後、pH 4、pH 5、pH 6、pH 7 の溶液中で

lipid mixing を指標に膜融合活性を評価した。その結果、いずれの pH 環境下においてもインフルエンザ HA の膜融合活性は認められなかった。また、センダイウイルス His-F についても、pH7 の環境下で膜融合活性を評価したところ、インフルエンザ HA と同様に膜融合活性は認められなかった。どちらの膜融合性膜タンパク質においても、膜融合活性には、プロテアーゼによる成熟化の後に、分子間のジスルフィド結合により F2 と F1、あるいは、HA1 と HA2 が架橋されていることが必要であることが知られている。すなわち、単にリポソームを無細胞タンパク質合成反応溶液に添加しただけでは、ジスルフィド結合が正確に形成されていない可能性が考えられる。そこで、ジスルフィドイソメラーゼを新たに添加し、無細胞タンパク質合成を行うことで調製したプロテオリポソームを用いて、膜融合活性を評価した。しかしながら、ジスルフィドイソメラーゼを添加した場合においても膜融合活性は認められなかった。以上の結果は、膜融合活性を得るには、さらなる分子シャペロンの添加、あるいは、糖鎖修飾などの翻訳後により膜融合性膜タンパク質の高次構造の保持が必要であることが示唆された。

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)

[学会発表](計 6 件)

安藤 満、三浦理紗子、向井貞篤、赤堀 泰、澤田晋一、珠玖 洋、佐々木善浩、秋吉一成、膜貫通型一本鎖抗体の設計と人工細胞法を用いた新規イムノリポソームの開発、第 37 回 日本バイオマテリアル学会大会、2015 年 11 月

Mitsuru Ando, Risako Miura, Sada-atsu Mukai, Yasushi Akahori, Shin-ichi Sawada, Hiroshi Shiku, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi, Design and functions of new immunoliposomes by in vitro protein synthesis / artificial cell system、2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies、2015 年 12 月

安藤 満、三浦理紗子、向井貞篤、赤堀 泰、澤田晋一、珠玖 洋、佐々木善浩、秋吉一成、人工細胞法による膜型一本鎖抗体組込みリポソームの機能特性の最適化、第 32 回 日本 DDS 学会学術集会、2016 年 6 月

Mitsuru Ando, Risako Miura, Sada-atsu Mukai, Yasushi Akahori, Shin-ichi Sawada, Hiroshi Shiku, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi, Direct preparation of immunoliposomes with single chain Fv by cell-free membrane protein synthesis / liposome system、10th World Biomaterials

Congress、2016 年 5 月

安藤 満、佐々木善浩、秋吉一成、ヒスチジン-Ni キレート形成を用いた in vitro 合成膜タンパク質のリポソームへのソーティング制御、第 66 回高分子討論会、2017 年 9 月

安藤 満、佐々木善浩、秋吉一成、無細胞膜タンパク質合成 / リポソームシステムを用いた機能性プロテオリポソーム構築とその利用、第 12 回無細胞生命科学研究会、2017 年 11 月

[その他]
ホームページ等

JST-ERATO 秋吉バイオナノトランスポータープロジェクトホームページ
<http://www.jst.go.jp/erato/akiyoshi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 満 (ANDO, Mitsuru)
京都大学・大学院工学研究科・
特定研究員
研究者番号：7 0 7 3 7 4 6 0

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし