

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14013

研究課題名(和文) 高曲率膜を識別するペプチドプローブの開発とエクソソーム解析への応用

研究課題名(英文) Design of peptide probes capable of recognizing highly-curved membranes for exosome analysis

研究代表者

佐藤 雄介 (Sato, yusuke)

東北大学・理学研究科・助教

研究者番号：90583039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は細胞間コミュニケーションのキャリアであるエクソソームの機能解明に貢献する新たなエクソソーム結合性蛍光ペプチドプローブ (ApoA-1-NBD)を開発した。ApoA-1-NBD は高曲率性膜に対して選択的に結合し発蛍光応答を示すことを見出した。ApoA-1-NBD を検出プローブとして MCF-7 細胞から単離したエクソソーム検出に適用したところ、検出限界は 8.2×10^5 個/ μL と算出された。本手法により簡便かつ迅速にエクソソーム検出・定量することが可能である。

研究成果の概要(英文)：We developed fluorescent probes based on amphipathic helix peptide (22 residues from C-terminal of ApoA-1) that can selectively recognize highly-curved membranes found in exosomes. Our method allows easier, simpler and more rapid detection of exosomes.

研究分野：生命分析科学

キーワード：蛍光プローブ 両親媒性 ヘリックス エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

エクソソームはほぼ全ての細胞から放出される細胞外小胞(直径 30-120 nm)であり、細胞間コミュニケーションツールとしての役割が明らかになりつつある。エクソソームは DNA, microRNA などの遺伝情報物質を内包しており、親細胞から放出されたのちに、輸送され、受容細胞に取り込まれることで、様々な遺伝情報を伝達するキャリアとして機能する(図1)。近年、エクソソームが絡む生命現象の発見が相次ぎ、エクソソームは重要な研究対象となっている。エクソソームの機能や役割を解明するためには、エクソソームを検出・定量するための分析法が重要である。現在、エクソソーム解析にはナノ粒子解析で用いられている手法(透過型電子顕微鏡・ナノ粒子トラッキング法など)やエクソソーム表面の膜たんぱく質を解析する手法(ELISA, Western blotting など)が広く用いられている。しかし、これら既存の技術では、熟練した技術が必要であり、また検出までに3時間以上要するといった課題が指摘されている。

2. 研究の目的

本研究では、エクソソームに対して高選択的に結合しうる蛍光性ペプチドプローブを合成し、これを検出プローブとする新たなエクソソーム解析法の開発を目指す。

3. 研究の方法

ナノサイズのリポソームではその表面に脂質パッキング欠損が生じることが知られている。エクソソーム表面においてもこのような脂質パッキング欠損があるため、これをプローブの結合反応場として用いることに着想した。脂質パッキング欠損に対する結合モチーフの一つである両親媒性 α ヘリックスペプチドを基盤とした蛍光性プローブを開発することで、エクソソーム検出に有用な分析法を提供できるものと期待できる(図1)。

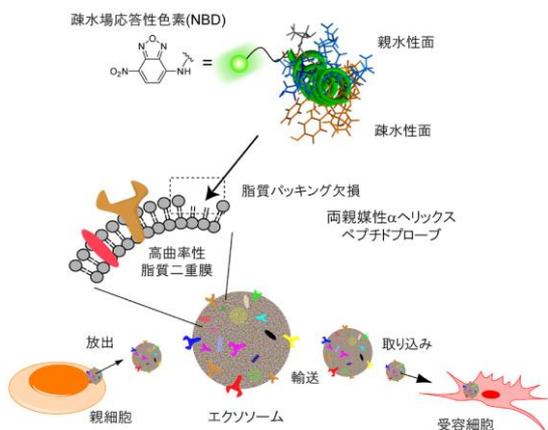


図1. 本研究概要: 両親媒性 α ヘリックスペプチドプローブによるエクソソーム検出

そこで、ナノサイズのリポソームに結合しうる Apo A-I の C 末端領域 22 残基の N 末端に疎水場感受性蛍光色素である NBD を連結したプローブ(Apo A-I-NBD)を合成し、エクソソームモデルである合成リポソームならびに MCF-7 細胞(ヒト乳がん細胞)から抽出したエクソソームに対する検出能を評価した。

4. 研究成果

ApoA-I-NBD は固相合成し、逆相 HPLC で単離精製した後に、MALDI-TOF-MS で構造同定した。一方、エクソソームモデルとして合成リポソーム(PC: PE: cholesterol = 70 : 15 : 15)を選択し、これは 30 nm, 100 nm 400 nm のフィルターを用いて Extrusion 法により調整した。まずは、合成リポソームに対する ApoA-I-NBD の結合能および蛍光応答能を評価した。その結果、Apo A-I-NBD は直径が小さく、高曲率性膜を有する合成リポソームに対して選択的に結合し、蛍光応答($\lambda_{em} = 545$ nm)を示すことを見出した(図2)。

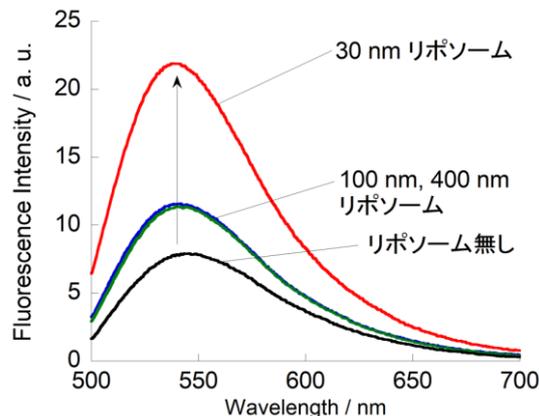


図2. 合成リポソームに対する蛍光応答

次に蛍光偏向による滴定実験から、リポソームに対する解離定数(K_d)を算出した。その結果、観測された選択性は高曲率性リポソームに対する強い結合力に起因することが分かった($K_d/\mu M$ ($n = 3$): 30 nm, 64 ± 4 ; 100 nm, 369 ± 28 ; 400 nm, > 1000)。ApoA-I-NBD の高曲率性リポソームに対する選択性は、静電相互作用をドライビングフォースとする既報のペプチドプローブ(MARCKS-ED; ACS Chem. Biol., 2013, 8, 218.)と比較して優れており、本研究で提案するプローブ設計が高曲率性膜に対する高選択性発現に有用であることがわかる。さらに、アニオン性脂質 PS を 20% 含むリポソーム(PC: PE: cholesterol : PS = 50 : 15 : 15: 20)を用いた場合でも、高曲率性リポソームに対する高い選択性を発現することが分かった。したがって、ApoA-I-NBD がリポソーム膜の表面電荷に関わらず高曲率性膜への高い結合選択性を有していることを見出した。これは、MARCKS-ED とは大きく異なる点であり、

ApoA-I-NBD が様々な種類のエクソソーム検出に適用しうる汎用性を有していると期待できる。

次に、CD 測定から、高曲率性リポソームとの結合に伴い、ApoA-I-NBD のペプチド部位由来の 208 nm, 222 nm ピークが増大することが分かり、 α ヘリックス含有率が増加していることを示唆された(図 3)。Baldwin らの式(*Biopolymers*, 1991, 31, 1463.)に基づき α ヘリックス含有率を算出すると、リポソーム非存在時では 23.9%であったが、30 nm リポソームとの結合に伴い、32.8%に増大することを見出した。これは両親媒性 α ヘリックス構造の疎水性領域が脂質パッキング欠損に挿入されている結合モード(疎水性挿入)であることを示唆している結果であると考えられる。また、DOPC/DG リポソーム(直径 100 nm)に対する Apo A-I-NBD の蛍光応答および CD スペクトル変化を評価したところ、脂質パッキング欠損が増加したりリポソーム(*Biophys. J.*, 2013, 104, 575.)に対して、より強い蛍光応答ならびに α ヘリックス含有率増加が観測された。この結果からも、合成したプローブが脂質パッキング欠損に対して疎水性挿入により効果的に結合していることが支持される。

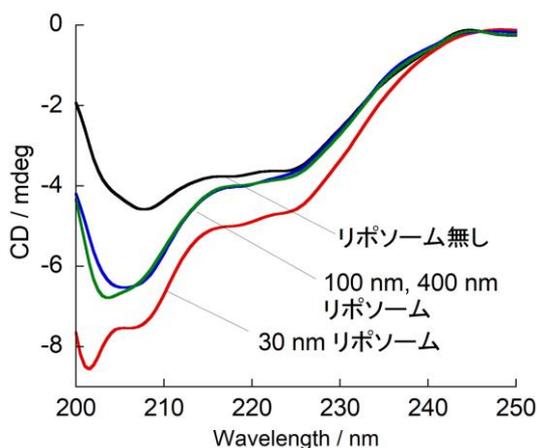


図 3. CD スペクトル：合成リポソームとの結合に伴うプローブ構造変化

最後に、ApoA-I を用いて細胞から単離したエクソソームの蛍光検出を試みた。ここでは、MCF-7 細胞(ヒト乳がん細胞)から MagCapture exosome isolation キットにより単離精製したエクソソームに対して、ApoA-I-NBD を添加し、Apo A-I-NBD のエクソソーム結合に伴う蛍光変化をモニターした。その結果、エクソソーム添加に伴い発蛍光応答が観測され、さらにこの蛍光応答はエクソソーム濃度が大きくなるにつれて増大することが分かった。観測された蛍光応答から検出限界(Limit of detection: LOD)を算出したところ、 8.2×10^5 個/ μL と算出され、この値は既存エクソソーム検出法である ELISA に

匹敵するものであった。ELISA 法では検出までに洗浄や固定化などのステップを含むため 3 時間以上要するのに対して、本手法では ApoA-I-NBD を加えるだけという簡便な操作で迅速に(5 分以内)エクソソーム検出が可能であり、実用性に優れた分析法であるといえる。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 両親媒性 α ヘリックス型ペプチドを基盤としたエクソソーム結合性蛍光プローブの開発、最上絢太、佐藤雄介、西澤精一、日本化学会第 98 春季年会、日本大学、2018 年 3 月 20-23 日
- (2) RNA・エクソソームを認識する分析プローブの開発、佐藤雄介、平成 29 年度日本分析化学会東北支部若手交流会(招待講演)、秋保ホテルクレセント、2017 年 7 月 14-15 日
- (3) エクソソーム解析を指向した蛍光性ペプチドプローブの開発：両親媒性 α ヘリックス構造の精密制御、高橋健太、豊岡壮太、佐藤雄介、西澤精一、日本分析化学会第 66 年会、東京理科大学、2017 年 9 月 9-12 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 雄介 (SATO YUSUKE)
東北大学大学院・理学研究科・助教
研究者番号：90583039

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()