

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05160

研究課題名(和文)人工リン脂質を利用した直交型リポソーム融合法の開発とその応用

研究課題名(英文)Development of orthogonal liposomal fusion method using artificial phospholipids and its application

研究代表者

岩崎 雄吾 (IWASAKI, YUGO)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：50273214

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)：異種間リポソーム融合法の確立を目指し、以下の成果を得た。
(1) 極性頭部にアジド基、アルキン基を導入した人工リン脂質を合成し、クリック反応が進行することを確認した。この脂質を含有するリポソームを用いてクリック反応を行ったが、リポソーム融合を確認することはできなかった。(2) リポソーム表面へのタンパク質結合のため、極性部にチオエステル基を結合させた人工リン脂質を合成し、N末端Cys型GFPを反応させることで、リポソーム表面に共有結合させることに成功した。(3) リン脂質変換であるPLDを改変し、自己触媒的にリン脂質を共有結合する改変体候補を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の最終目的である直交型リポソーム融合は達成できなかったが、種々の人工リン脂質の簡便合成法やチオエステル型リン脂質によるリポソーム表面へのタンパク質結合法を確立したことは学術的に意義がある。さらに、タンパク工学改変により自己触媒的にリン脂質に結合する改変型PLDの候補を取得できた。この改変酵素をさらに改良すれば、リポソームのみならず生細胞の表面に任意のタンパクを結合させることも可能になり、細胞工学において有用なツールとなる。

研究成果の概要(英文)：The following results were obtained with the aim of establishing a heterologous liposome fusion method.

(1) Artificial phospholipids with azido and alkyne groups at the polar heads were synthesized, and the click reaction was confirmed to proceed. The click reaction was performed using liposomes containing this lipids, but liposome fusion could not be confirmed. (2) For protein conjugation to the liposome surface, we synthesized an artificial phospholipid with a thioester group attached to the polar part and successfully covalently bound it to the liposome surface by reacting it with N-terminal Cys-type GFP. (3) We obtained a promising candidate that covalently binds phospholipids to the enzyme molecule itself in an autocatalytic manner, by engineering a phospholipase D, a phospholipid converting enzyme.

研究分野：酵素工学

キーワード：リン脂質

1. 研究開始当初の背景

リポソームなどの脂質小胞の膜融合はリポソーム工学や細胞工学において重要な技術である。従来の PEG 融合法や電気融合法は直交性がないため、目的とする異種小胞間での融合に加え、同種小胞間での融合も起きる。異種小胞間での融合を優先的に達成することができれば、リポソーム工学や細胞工学において強力なツールとなるが、簡便な方法は知られていなかった。

2. 研究の目的

本課題では直交性のある異種間膜融合系の確立を目的とした。その原理は、リポソーム表面を直交性のある結合分子のペアで別個に修飾し、相互作用を介して融合させることである (図 1)。このため、極性頭部に種々の構造

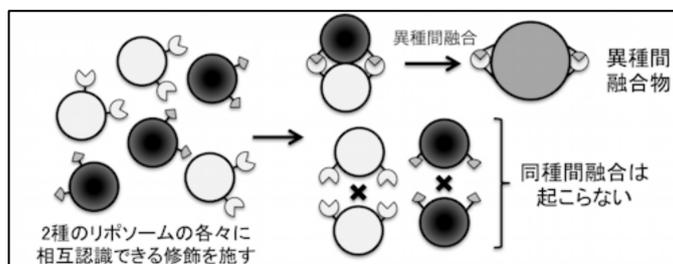


図 1 異種間膜融合の原理

(官能基やタンパク質)を導入した人工リン脂質の合成を行なうこと、およびそれを用いてリポソームを融合を達成することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) クリック反応によるリポソーム融合

① 脂質の合成

クリック反応でリポソームを融合させるため、極性頭部にアルキニル基およびアジド基を導入した人工リン脂質を合成を試みた。アルキン型リン脂質 (ホスファチジルプロパルギルアルコール) は、市販のジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) にプロパルギルアルコール存在下で酵素ホスホリパーゼ D (PLD) を作用させた。

アジド型リン脂質、ホスファチジリアジドエタノールは、DOPC とエチレングリコールからホスファチジリエチレングリコールを酵素合成した後、2-azido-1,3-dimethylimidazolium hexafluorophosphate を作用させ水酸基をアジド基に変換することで合成した。

② アジド型およびアルキン型リン脂質を含有するリポソームの融合

アジド型あるいはアルキン型リン脂質を含有する細胞サイズリポソームを既報の界面通過方により調製した。蛍光観察のため、内水層には GFP あるいは RFP を加えた。このリポソームを混合し、Cu (I) を添加してクリック反応を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

(2) リポソーム表面のタンパク質修飾

リポソーム表面をタンパク質 (抗体など) で修飾し、そのリガンド (抗原など) で修飾した別のリポソームをタンパク-タンパク相互作用を利用して融合させることも選択肢の一つである。このためには、リポソーム表面にタンパク質を活性を維持したまま、正しい配向で共有結合させる必要がある。ネイティブケミカルライゲーション (NCL) はチオエテルと β -アミノチオール間でアミド結合を形成する反応で、温和な条件で進行する。この反応を利用してチオエステル型リン脂質と N 末端にシステインをもつタンパク質を混合することで、リン脂質の頭部にタンパク質共有結合できないかを検討した。

チオエステル型リン脂質は、PC にグリコール酸存在下で酵素 PLD を作用させ、ホスファチジルグリコール酸を合成し、ついで遊離カルボキシル基にデカンチオールを導入して所望のチオエステル型リン脂質を得た。一方、結合させるモデルタンパク質として GFP を選択した。開始コドン直下にシステイン残基を導入した N-Cys 型 GFP を組換ええ大腸菌で発現させ調製した。

チオエステル型リン脂質、N-Cys 型 GFP をメルカプトフェニル酢酸存在下トリス緩衝液中でインキュベートした。反応混合物をボイルしてタンパク質を変性した後、プロテナーゼ K で分解し、脂質を溶媒抽出し、LC-MS で分析した。また、チオエステル型リン脂質を含む細胞サイズリポソームを調製し、N-Cys 型 GFP の結合反応を行ない蛍光顕微鏡で観察した。

(3) 新規リン脂質修飾タンパク質タグの開発

PLD はリン脂質の加水分解活性と系内に存在する水酸基化合物にリン脂質を転移する活性を有する。この転移反応が酵素分子自身の水酸基 (Ser 残基) に対して作用すれば、酵素は自己触媒的にリン脂質で修飾されることになる。タンパク工学的改変によってこのような自己修

飾反応可能な酵素を作り出すことができれば、リポソーム修飾ダグとしての利用が可能になる。そこで、微生物 PLD をタンパク工学的に改変して自己触媒型リン脂質修飾可能な酵素の開発を試みた。

自己触媒反応部位(リン脂質が結合する部位)となる部位を酵素分子内のループ上の Ser の水酸基と設定し、ループ長を適宜増減させた複数の改変体候補を構造解析ソフト Yasara Structure を用いて作成した。本酵素の反応機構を勘案し、改変後の Ser 水酸基と活性中心の距離や配向を吟味し、見込みのあるものについて MD シミュレーションを行なった。その結果から候補をさらに絞り込み、実際に発現させて酵素活性や自己修飾反応活性を解析した。

4. 研究成果

(1) クリック反応によるリポソーム融合

クリック反応に使用するための人工リン脂質であるホスファチジルプロパルギルアルコールとホスファチジルアジドエタノールは酵素法、および酵素・化学法で効率よく合成することができた。この人工リン脂質を緩衝液に分散し、Cu(I)を加えてクリック反応を行い LC-MS で分析したところ、予想されるクリック生成物である $m/z = 1507 (M-H)^-$ と $m/z = 753 (M-2H)^-$ が検出された。このことから合成した人工リン脂質間でのクリック反応が進行することが確認できた(図2)。

この人工リン脂質を含有する細胞サイズリポソームを作成し、クリック反応を試みた。蛍光顕微鏡観察のため片方のリポソームには GFP を他方には RFP を封入した。図3に示すように緑色、赤色のリポソームは観察されたが、それらが融合したと思われるものは観察できなかった。

また、リポソーム表面からの官能基の距離を考慮し、脂質部分とアジド・アルキニル基の間に PEG2000 リンカーを導入した人工リン脂質を別個調製して同様の実験を行なったが、膜融合を検出するには至らなかった。

(2) リポソーム表面のタンパク質修飾

NCL に必要なリン脂質であるチオエステル型リン脂質は酵素法と化学法の併用により合成することができた。このリン脂質と N-Cys 型 GFP を緩衝液中で反応させ、変性、酵素分解後に脂質を LC-MS 分析したところ、期待通りの反応物に由来するリン脂質(ホスファチジルグリコールのシステイン付加物)を検出することができた(図4)。次にチオエステル型リン脂質を含有する細胞サイズリポソームに N-Cys 型 GFP を作用させ顕微鏡観察したところ、リポソーム周辺に GFP の蛍光が認められた。このことから NCL を用いたリポソームのタンパク質修飾に成功した(図5)。

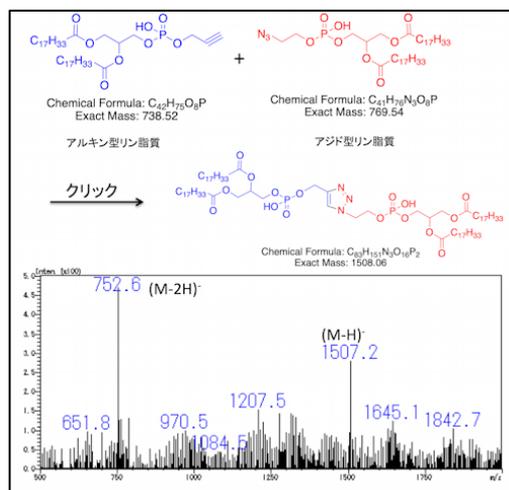


図2 人工リン脂質のクリック反応

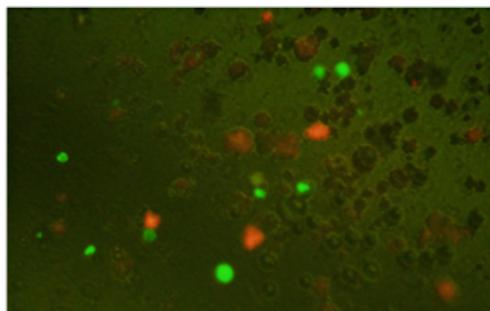


図3 アジド、アルキン型リポソームの蛍光顕微鏡像

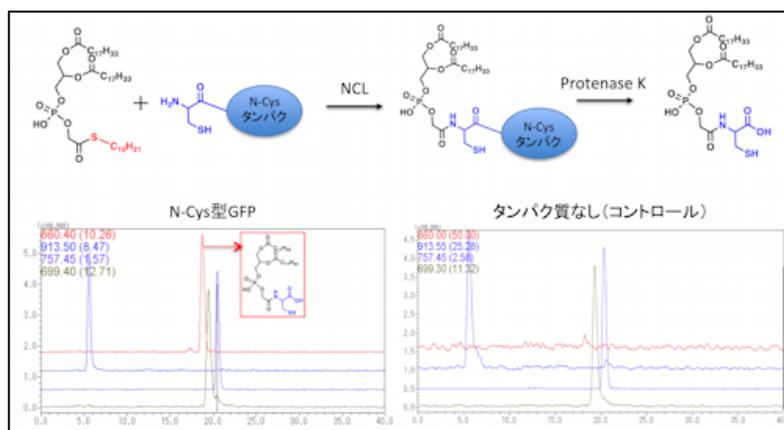


図4 チオエステル型リン脂質へのタンパク質の結合

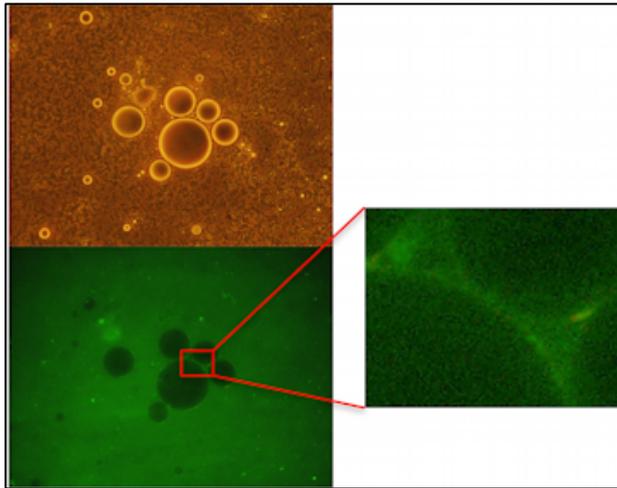


図 5 N-Cys 型 GFP のリポソームへの結合

(3) 新規リン脂質修飾タンパク質タグの開発

Ser 残基を含むループ長を変化させた 13 個の酵素・基質複合体モデルを MD 計算で解析し (図 6)、基質のリン原子と Ser の γ 酸素原子の距離が平均 5Å未満となるモデル(#1-#6)を選択した。

この 6 種の候補遺伝子を実際を作成し、無細胞タンパク合成系を用いて発現させ、酵素活性を調べた (図 7)。改変酵素 #1-#5 は野生型と同様に酵素活性を示した。TLC 上では残存基質の PC に加え、加水分解物であるホスファチジン酸 (PA) や転位反応物ホスファチジルグリセロール (PG) が観察された。PG は無細胞タンパク合成試薬に含まれるグリセロールとの反応によるものである。改変酵素 #6 は活性がやや低下した。

次に、無細胞合成した改変酵素に蛍光標識ホスファチジルコリンを作用させた後、SDS-PAGE で分析したところ、興味深いことに改変酵素 #6 は蛍光リン脂質で標識されることがわかった (図 8)。

上記のことから、改変酵素 #6 は自己触媒的にリン脂質を酵素分子内のセリン残基に転移する能力を獲得した可能性が高い。今後は改変酵素 #6 を「タグ」として任意の目的タンパク質を融合させリポソーム上に結合・提示するシステムが構築を目指す予定である。

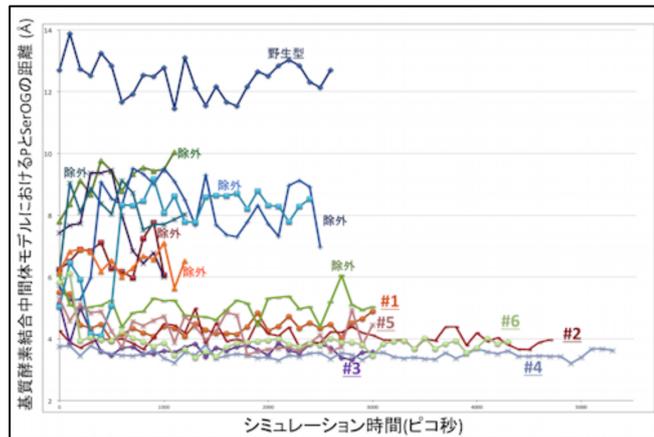


図 6 MD シミュレーションによる改変酵素解析

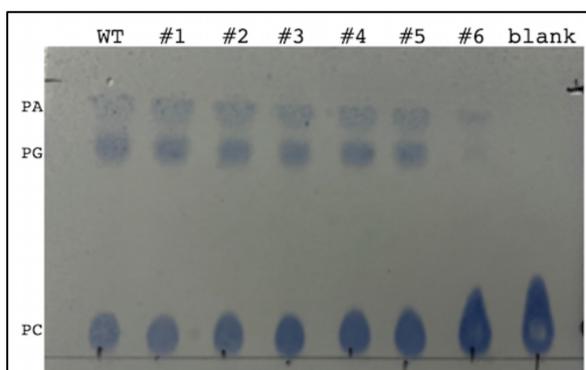


図 7 改変酵素の活性

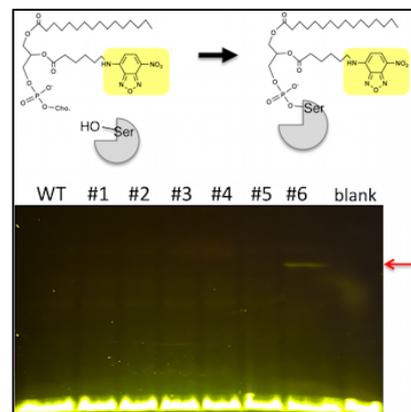


図 8 改変酵素の蛍光リン脂質によるラベリング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	中野 秀雄 (Hideo Nakano) (00237348)	名古屋大学・生命農学研究科・教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関