

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16086

研究課題名(和文)細胞膜脂質フリップフロップ促進ペプチドの開発

研究課題名(英文)Development of transmembrane peptide promoting lipid flip-flop in the plasma membrane

研究代表者

中尾 裕之(Nakao, Hiroyuki)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：00805020

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):真核生物の細胞膜において脂質スクランブリング(内外層の脂質混合)が起きると、内層に局在しているホスファチジルセリンが表面に露出する。露出したホスファチジルセリンは血小板凝集やアポトーシスなど様々な生理的過程において重要な役割を果たす。本研究では、独自に開発したペプチドを用いて、培養細胞の細胞膜において脂質スクランブリングを起こし、人工的にホスファチジルセリンを露出させることが可能であることを実証した。さらに、この人工的な脂質スクランブリングによってマクロファージによる細胞貪食を誘導することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホスファチジルセリンの露出はマクロファージによる貪食だけでなく、血小板凝集、骨ミネラル化、筋細胞の融合など様々な生命現象に関わる。すなわち、本研究で開発した脂質スクランブリングペプチドを用いれば、これらの生命現象を制御することが可能になる。また、部位特異的に送達することができれば、がんや脂質スクランブリングに関わる疾患の治療薬にもなりうる。

研究成果の概要(英文):Phosphatidylserine is localized in the inner leaflet of the plasma membrane in eukaryotic cells. Lipid scrambling (lipid mixing of inner and outer layers) causes the exposure of phosphatidylserine on the cell surface. Exposed phosphatidylserine plays important roles in various physiological processes such as platelet aggregation and apoptosis. In this study, we demonstrated that addition of a de novo designed peptide to the cultured cells exposed phosphatidylserine on the outer leaflet in the plasma membrane. Furthermore, we succeeded in inducing phagocytosis by macrophages through the artificial lipid scrambling.

研究分野：生物物理化学

キーワード：脂質スクランブリング フリップフロップ ホスファチジルセリン 細胞貪食 マクロファージ 膜貫通ペプチド

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

リン脂質は親水基と炭化水素鎖からなる両親媒性の構造を持つため、水中では自己会合し脂質二重層構造を形成する。リン脂質のフリップフロップとは、リン脂質が二重層を横切って移動する現象である。真核生物の細胞膜では、通常、ホスファチジルセリン (PS)・ホスファチジルエタノールアミン (PE) が細胞質側に局在し、ホスファチジルコリン (PC)・スフィンゴミエリン (SM) が細胞外側に局在するという非対称な脂質分布が維持されている。いくつかの生理的過程では、フリップフロップを双方向に促進するタンパク質(スクランブラーゼ)が活性化され、非対称性が崩壊する。非対称性崩壊の役割としては、細胞表面に露出した PS が、血液凝固、アポトーシス細胞の貪食などの過程で細胞の認識に関与することが報告されている。

最近、PS を細胞質側に輸送するタンパク質を欠損させ、PS を恒常的に露出した細胞は、アポトーシスを起こしていない場合でも、貪食細胞により消化されることが明らかになった。細胞に添加するだけでフリップフロップを促進できる物質があれば、がんなどに対して部位特異的に送達することで、PS を露出したがん細胞が周囲の貪食細胞によって消化されるという新たな治療法の開発に繋がる可能性がある。これまでも脂質膜に添加してフリップフロップを促進する物質はいくつか開発されているものの、細胞に添加した際の毒性や活性、細胞内局在などについて包括的な検討はなされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、脂質膜形成後に膜挿入可能なフリップフロップ促進ペプチドを開発し、それを用いて、人工的なフリップフロップ促進による細胞貪食の誘導を実現することを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

(1)人工脂質ベシクルを用いて、添加したペプチドの膜貫通構造、および、フリップフロップ促進活性を評価した。(2)培養細胞 HEK293 を用いて、添加したペプチドの局在・結含量、および、PS 露出を評価した。(3)ペプチドを添加した HEK293 とマクロファージを共培養することで、貪食評価を行った。

### 4. 研究成果

(1) Leu、Ala 残基の繰り返しからなる膜貫通配列の中央に Gln 残基を配置し、膜貫通配列の N 末端に Arg、Lys、Glu、Ser を 4 残基ずつ配置したペプチド(それぞれ、4RQ、4KQ、4EQ、4SQ)を合成した。生体膜主要構成リン脂質 POPC とアシル鎖に臭素を付加した PC からなる脂質ベシクルを調製した。合成したペプチドは膜貫通領域の中央に Trp 残基をもつため、膜貫通構造をとっていれば Trp 残基の蛍光が臭素によって効率的に消光される。ポジティブコントロールである POPC 膜での膜貫通を確認している TMP25Q の消光率と比較したところ、4RQ、4KQ、4EQ は膜貫通していること、4SQ は定量的には膜貫通していないことを確認した。

POPC のフリップフロップを時分割中性子小角散乱、蛍光脂質 C<sub>6</sub>NBD-PC、-PS のフリップフロップを消光剤を用いた手法により測定した。時分割中性子小角散乱測定により、いずれのペプチドも POPC のフリップフロップを促進することが明らかになった。また、ペプチドの濃度依存的に速度が線形に上昇していたことから、ペプチドは単量体で活性を發揮することが示唆された。蛍光脂質を用いた測定から、PS に対する活性は PC よりも少し低いものの、脂質非選択的にフリップフロップを促進することを確認した(図 1)。

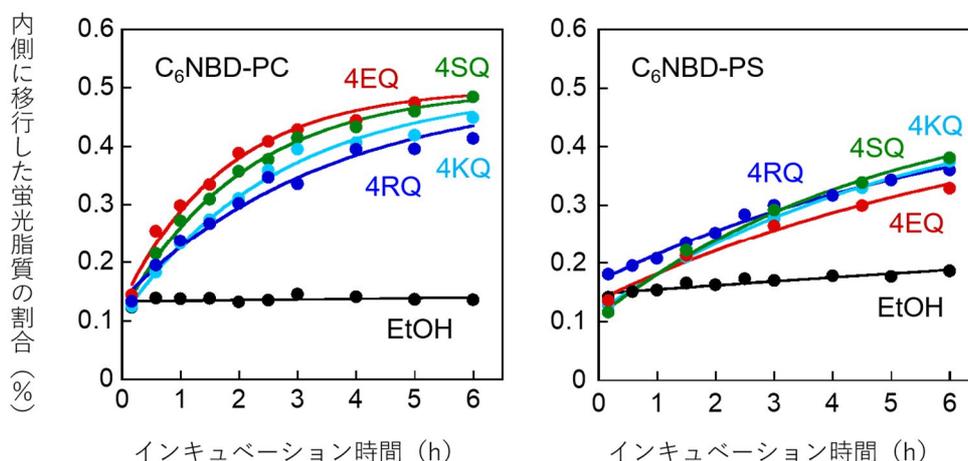


図 1. 蛍光脂質を用いたフリップフロップ評価

(2) N末端に fluorescein を付加したペプチドを用いて、HEK293 細胞に添加したペプチドの局在・結合量を評価した。いずれのペプチドも細胞膜に結合していた一方、結合量はペプチドによって大きく異なり、4RQ が最も強く HEK293 に結合することが明らかになった(図2)。

Annexin V というタンパク質の PS に対する特異的な結合を用いて、PS 露出細胞の検出を行った。その結果、4RQ を添加した細胞のみ PS を露出することが示された。4RQ の高い PS 露出活性は結合量によるものだと考えられる。また、4RQ がアポトーシスを誘導していないことから、4RQ は直接フリップフロップを促進することで PS を露出させたと考えられる。

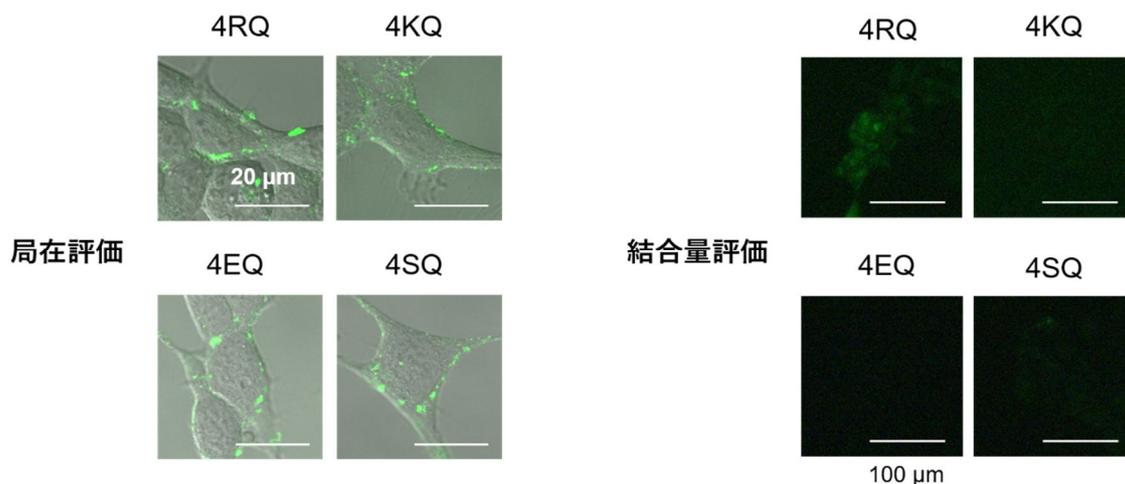


図 2. ペプチドの局在・結合量評価

(3) pH 依存性の蛍光物質 pHrodo で HEK293 細胞の表面を標識した後、4RQ を加えて PS を露出させ、J774 マクロファージと共培養した。HEK293 が貪食されて、リソソームに移行すると pHrodo が pH の低い環境にさらされるため、蛍光強度が上昇する。マクロファージ特異的な蛍光標識抗体を添加して、蛍光観察すると、マクロファージの内部に pHrodo の蛍光が見られた(図3)。フローサイトメトリーから、HEK293 を貪食したマクロファージの割合が 4RQ の添加により上昇しており、4RQ が細胞貪食を誘導することが示された。

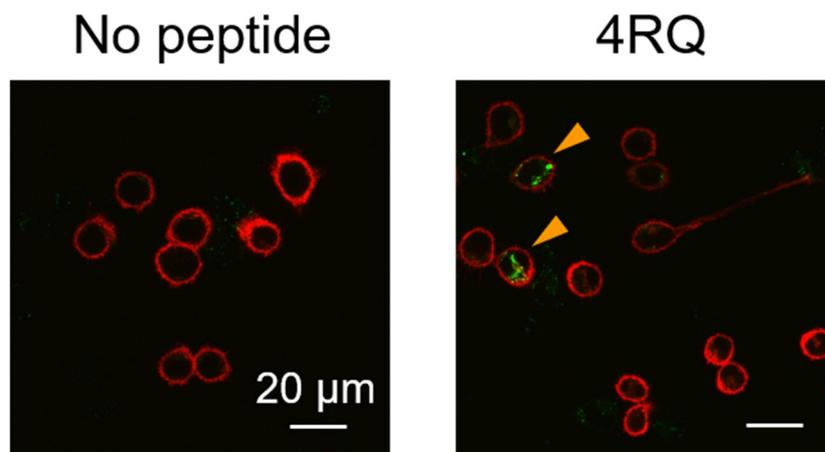


図 3. 細胞貪食評価

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakao Hiroyuki, Kimura Yusuke, Sakai Ami, Ikeda Keisuke, Nakano Minoru	4. 巻 8
2. 論文標題 Development of membrane-insertable lipid scrambling peptides: A time-resolved small-angle neutron scattering study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Structural Dynamics	6. 最初と最後の頁 024301 ~ 024301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/4.0000045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ikeda Keisuke, Horiuchi Ayame, Yoshino Misa, Shimizu Chinatsu, Nakao Hiroyuki, Nakano Minoru	4. 巻 37
2. 論文標題 Amphipathic Peptide?Phospholipid Nanofibers: Phospholipid Specificity and Dependence on Concentration and Temperature	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 713 ~ 721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.0c02819	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 Anada Chiharu, Ikeda Keisuke, Egawa Ayako, Fujiwara Toshimichi, Nakao Hiroyuki, Nakano Minoru	4. 巻 588
2. 論文標題 Temperature- and composition-dependent conformational transitions of amphipathic peptide?phospholipid nanodiscs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Colloid and Interface Science	6. 最初と最後の頁 522 ~ 530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcis.2020.12.090	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 Sugiura Taichi, Nakao Hiroyuki, Ikeda Keisuke, Khan Danish, Nile Aaron H., Bankaitis Vytas A., Nakano Minoru	4. 巻 1863
2. 論文標題 Biophysical parameters of the Sec14 phospholipid exchange cycle ? Effect of lipid packing in membranes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183450 ~ 183450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2020.183450	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 Nakao Hiroyuki, Sugimoto Yuta, Ikeda Keisuke, Saito Hiroaki, Nakano Minoru	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural Feature of Lipid Scrambling Model Transmembrane Peptides: Same-Side Positioning of Hydrophilic Residues and Their Deeper Position	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1662 ~ 1667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.0c00175	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31件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 眞榮城 佑、中尾 裕之、池田 恵介、中野 実
2. 発表標題 蛍光自己消光を用いたリン脂質フリップフロップ新規測定法の確立
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 達也、中尾 裕之、池田 恵介、中野 実
2. 発表標題 アミノ酸変異がリン脂質 - 両親媒性ペプチドナノファイバー形成に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村 優介、中尾 裕之、池田 恵介、中野 実
2. 発表標題 膜貫通ペプチドによる細胞膜リン脂質のフリップフロップ促進と貪食誘導
3. 学会等名 膜シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 穴田 千晴、中尾 裕之、池田 恵介、中野 実
2. 発表標題 ジスルフィド結合形成を用いた熱力学的に安定なリン脂質-ペプチドナノディスクの開発
3. 学会等名 膜シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西川 優太、中尾 裕之、池田 恵介、中野 実
2. 発表標題 ラメラ-キュービック相転移を利用したリン脂質自発曲率の評価
3. 学会等名 膜シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中尾 裕之、杉本 佑太、池田 恵介、斎藤 大明、中野 実
2. 発表標題 モデル脂質スクランプリングペプチドの構造的特徴の解明
3. 学会等名 日本膜学会第42年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西川 優太、中尾 裕之、池田 恵介、中野 実
2. 発表標題 ラメラ - キュービック相転移の観測によるリン脂質自発曲率の評価
3. 学会等名 日本膜学会第42年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 愛, 池田恵介, 中尾裕之, 中野 実
2. 発表標題 脂質修飾アミロイドペプチドを用いたリポソームの高機能化
3. 学会等名 日本膜学会第41年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 穴田千晴, 池田恵介, 江川文子, 藤原敏道, 中尾裕之, 中野実
2. 発表標題 リン脂質 - ペプチドナノディスク構造の温度・組成依存性に基づく集合体形成原理の理解
3. 学会等名 日本膜学会第41年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野 実, 杉浦 太一, 中尾 裕之, 池田 恵介
2. 発表標題 中性子散乱を用いた酵母脂質輸送タンパク質Sec14 の機能評価
3. 学会等名 生理研研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田右京, 中尾裕之, 池田恵介, 中野実
2. 発表標題 Sfh1のリン脂質輸送能評価
3. 学会等名 第17回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村優介、中尾裕之、池田恵介、中野実
2. 発表標題 膜挿入可能なリン脂質フリップフロップ促進ペプチドの開発
3. 学会等名 第17回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾裕之、杉本佑太、池田恵介、齋藤大明、中野実
2. 発表標題 モデル膜貫通ペプチドを用いた脂質スクランプリングメカニズムの解明
3. 学会等名 第17回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 穴田 千晴、池田 恵介、江川 文子、藤原 敏道、中尾 裕之、中野 実
2. 発表標題 リン脂質 - ペプチドナノディスク構造の熱安定性と集合体形成メカニズムの解明
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村優介、中尾裕之、池田恵介、中野 実
2. 発表標題 膜貫通ペプチドの脂質膜への挿入とフリップフロップ促進能評価
3. 学会等名 膜シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田右京, 中尾裕之, 池田恵介, 中野 実
2. 発表標題 Sfh1脂質輸送におけるリン脂質依存性
3. 学会等名 膜シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田右京, 中尾裕之, 池田恵介, 中野 実
2. 発表標題 Sfh1のリン脂質輸送能の評価とその脂質組成依存性
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤愛, 池田恵介, 中尾裕之, 中野実
2. 発表標題 自己集合性ペプチドのN末端アシル化が集合体の熱力学的安定性および構造に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻井俊樹, 中尾裕之, 池田恵介, 中野実
2. 発表標題 膜貫通ペプチドの二量体化によるリン脂質フリップフロップの促進
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中尾 裕之、木村 優介、池田 恵介、中野 実
2. 発表標題 脂質フリップフロップ促進ペプチドによる細胞貪食誘導
3. 学会等名 日本膜学会第43年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮島 綾梨、中尾 裕之、池田 恵介、中野 実
2. 発表標題 Polyethylene glycolによる脂質膜間移動促進メカニズムの解析
3. 学会等名 日本膜学会第43年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田 幹望、池田 恵介、中尾 裕之、中野 実
2. 発表標題 酸性アミノ酸の側鎖長が環状ペプチドのpH依存的な脂質膜結合・挿入・透過に与える影響
3. 学会等名 日本膜学会第43年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中尾 裕之、長尾 道弘、山田 武、今村 虹輝、野崎 浩一、池田 恵介、中野 実
2. 発表標題 脂質二重層のミクロ及びマクロなダイナミクスに対する膜貫通ペプチドの影響
3. 学会等名 第72回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞栄城 佑、中尾 裕之、池田 恵介、中野 実
2. 発表標題 蛍光自己消光を用いた新規測定法による抗菌性ペプチドのフリップフロップ促進能評価
3. 学会等名 第72回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮島 綾梨、中尾 裕之、池田 恵介、中野 実
2. 発表標題 中性子小角散乱を用いたpolyethylene glycolによる脂質のリポソーム間移動促進メカニズムの解析
3. 学会等名 第72回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 達也、池田 恵介、中尾 裕之、中野 実
2. 発表標題 アミノ酸変異がリン脂質-ペプチド集合体形成に与える影響
3. 学会等名 第72回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田 幹望、池田 恵介、中尾 裕之、中野 実
2. 発表標題 キャリア分子としての応用を目指した環状ペプチドのpH依存的な膜透過活性の制御
3. 学会等名 第42回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮島 綾梨、中尾 裕之、池田 恵介、中野 実
2. 発表標題 ポリエチレングリコールによる脂質の膜間移動促進の速度論的解析
3. 学会等名 膜シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroyuki Nakao, Yusuke Kimura, Keisuke Ikeda, Minoru Nakano
2. 発表標題 Induction of phagocytosis by phospholipid scrambling peptides
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎 萌、池田恵介、中尾裕之、中野実
2. 発表標題 アミロイド (16-22)ペプチドのアミロイド線維形成メカニズムの解明
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第132回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水 裕道、中尾 裕之、池田 恵介、中野 実
2. 発表標題 膜貫通ペプチドによる細胞膜内層のホスファチジルセリン露出誘導
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 木曾良明	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 265
3. 書名 ペプチド創薬の最前線 (分担執筆: 第14章 膜脂質を動かすペプチドのデザイン)	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------