

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06998

研究課題名(和文) 脂質-ペプチドナノ粒子を用いた標的細胞膜への膜タンパク質デリバリー技術の開発

研究課題名(英文) Development of lipid-peptide nanoparticles for membrane protein delivery

研究代表者

池田 恵介 (Ikeda, Keisuke)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・准教授

研究者番号：00553281

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)：本研究の目的は、外部から投与した膜タンパク質分子を細胞膜へ導入する方法を確立することである。このために我々がこれまで研究をおこなってきた脂質-ペプチドナノ粒子系を活用した。ナノ粒子とりボソーム膜との融合を様々な手法を用いて評価したところ、粒子中の脂質二重層の相転移に伴う構造的不安定化によって、粒子中の脂質分子がリボソーム膜へ移動することを確認した。さらに、このナノ粒子を培養細胞へ投与し、ナノ粒子中に含まれる分子の細胞膜への移行することを確認した。以上から、ナノ粒子を用いた細胞膜への分子送達技術を開発できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質は、生命機能にとって必須の役割を担う重要な分子であり、主要な創薬ターゲットでもある。生命におけるその役割を理解するため、遺伝子導入によって興味ある膜タンパク質分子を細胞膜に発現させ、その構造や機能を解析する方法が確立している。しかし、任意の細胞膜上へ興味ある膜タンパク質を発現させることが困難な場合も多い。そこで、本研究では、膜タンパク質の直接投与による細胞膜への導入が可能なナノ粒子の開発をおこなった。本技術は、膜タンパク質の生細胞膜上での機能・構造解析のみならず、膜タンパク質それ自体の製剤化などの幅広い利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to establish a method for introducing externally administered membrane protein molecules into the cell membrane. For this purpose, we utilized our previously studied lipid-peptide nanoparticles. The fusion of the nanoparticles with liposome membranes was evaluated using various techniques, and it was revealed that the lipid molecules in the particles were transferred to the liposome membranes due to structural destabilization caused by the phase transition of the lipid bilayer in the particles. Furthermore, the nanoparticles were administered to cultured cells and it was confirmed that the molecules in the nanoparticles migrated to the cell membrane. Thus, a nanoparticle-based molecular delivery technique to cell membranes could be developed.

研究分野：生物物理化学

キーワード：ナノディスク 脂質 ペプチド 膜タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は、物質輸送や情報伝達、エネルギー変換、細胞分化など生命機能にとって必須の役割を担う重要な分子であり、主要な創薬ターゲットでもある。生命におけるその役割を理解するため、遺伝子導入によって興味ある膜タンパク質分子を細胞膜に発現させ、その構造や機能を解析する方法が確立している。しかし、導入遺伝子の転写・翻訳、ポリペプチド鎖の膜挿入とフォールディング、翻訳後修飾、細胞内輸送といった多段階の細胞内反応に依存するため、任意の細胞膜上へ興味ある膜タンパク質を発現させることが困難な場合も多い。また、非天然アミノ酸の導入や安定同位体標識、蛍光色素標識などの選択的な化学修飾も難しい。そこで遺伝子導入に依存しない別のアプローチとして、無細胞合成系等で別途合成・精製した膜タンパク質を、細胞の外部から添加することで細胞膜へ導入する方法が望まれる。しかし、膜タンパク質の細胞への直接投与による細胞膜への導入は、その必要性にも関わらず十分に確立された方法は存在しない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、外部から投与した膜タンパク質分子を細胞膜へ導入する方法を確立し、生きた細胞上での膜タンパク質の機能と構造を解析することである。このために我々がこれまで研究をおこなってきた脂質-ペプチドナノ粒子系の物性に関する知見を活用する。アポリポタンパク質 A-I の両親媒性ヘリックスを模倣した人工ペプチド 18A は、リン脂質二重層に結合したのち膜を可溶化し、ヘリックスの疎水面を脂質側に向ける形で二重層の周囲を取り囲んだディスク状のナノ粒子を自発的に形成する。これまでに 18A およびその変異体について粒子形成が起こる濃度や粒子の形態、安定性について解析をおこなった。その結果、アミノ酸変異、粒子の脂質/ペプチドモル比、温度などの特定の条件下でナノ粒子が不安定化し、脂質二重層と融合するという新たな知見を得た。そこで、このような膜融合活性を持つナノ粒子に膜タンパク質を組み込むことで、膜融合によって細胞膜へ導入するための媒体を創造できると考えた。

3. 研究の方法

(1) ナノ粒子の調製

18A ペプチドとリポソームを緩衝液中で混合し、脂質-ペプチドナノ粒子を作製した。粒子の形成は透過型電子顕微鏡観察および動的光散乱法により確認した。モデル膜タンパク質である 1 回膜貫通ペプチドを含んだナノ粒子の作製は、予めこのペプチドを埋め込んだリポソームと 18A ペプチドを混合することで、自発的にナノ粒子を形成させた。

(2) ナノ粒子膜融合の測定

ナノ粒子の温度を上昇させることで、ナノ粒子中の脂質二重層の相転移を誘導した。相転移は脂質膜中に埋め込んだ蛍光色素 DPH の蛍光異方性測定や示差走査熱量測定に基づいて評価した。また、粒子の融合や形態変化を透過型電子顕微鏡観察、動的光散乱法、³¹P-NMR 測定、円二色性分光法により評価した。

(3) ナノ粒子とリポソーム膜との融合

ナノ粒子とリポソームを混合し、ナノ粒子中の蛍光分子がリポソームへ移行するかを蛍光法等により評価した。膜融合の定量的評価として、蛍光標識脂質をナノ粒子とリポソームにそれぞれ少量添加し、膜融合に伴う蛍光色素間の蛍光励起エネルギー移動 (FRET) シグナルの増大を測定した。また、密度勾配遠心法により、ナノ粒子とリポソームを分離し、それぞれの蛍光シグナルの測定による移行量の定量もおこなった。さらに別の方法として、光学顕微鏡下で観察可能なサイズ (~10 μm) の巨大リポソームにナノ粒子を投与し、ナノ粒子からリポソーム膜への蛍光分子の移行を蛍光顕微鏡で観察した。

(4) ナノ粒子と細胞膜との融合

ナノ粒子を培養細胞へ投与し、ナノ粒子中の蛍光分子が細胞膜へ移行するかを共焦点レーザー顕微鏡観察等により評価した。また、ナノ粒子の細胞毒性についても合わせて評価した。

4. 研究成果

(1) ナノ粒子の調製と融合による形態変化

18A ペプチド-リン脂質ナノ粒子を作製し、温度を上昇させることで、ナノ粒子中の脂質二重層の相転移を誘導した。この際のナノ粒子どうしの融合について評価した。その結果、脂質二重

膜のゲル-液晶相転移温度以上でナノ粒子どうしが融合し、ナノ粒子中の脂質二重層の直径が増大することが明らかとなった。さらに高温では融合の進行に伴いラメラ相が形成され、脂質膜が磁場に沿って配向することが確認された。さらに温度を上げると、ペプチドの二次構造の変性によって脂質ベシクルが形成された。これらの変化は、ナノ粒子の脂質二重層の縁から膜表面へのペプチドの移動に基づく構造転移モデルで説明できることが示された。以上から、ナノ粒子中のゲル-液晶相転移によってナノ粒子が不安定化し、粒子どうしの融合が起こることが明らかとなった。

(2) ナノ粒子の膜融合に影響する因子の探索と膜融合活性の制御

上記の研究成果(1)で明らかとなったナノ粒子の不安定化と膜融合に関する知見や評価法を用いて、ナノ粒子の膜融合に影響を与える因子について解析をおこなった。ナノ粒子中のリン脂質/ペプチドモル比が高い程、相転移に伴う粒径の増大が著しく、高い膜融合活性を示す可能性が示された。また、相転移温度の異なるリン脂質をナノ粒子の構成成分として用いることで、ナノ粒子の融合が生じる温度を調節可能であることが明らかとなった。これに加えて、ナノ粒子の融合活性に影響を与えるペプチドの化学構造について評価した。プロリン残基で架橋した 18A 二量体 37pA (Ac-18A-P-18A-CONH₂) も 18A と同様にナノ粒子の熱不安定化を示した。しかし、システイン置換したアナログ 37pA-C2 の 2 つの α -ヘリックスの側面をジスルフィド結合で架橋すると、脂質二重層の相転移を伴う温度変化に対してもナノ粒子どうしの融合は起こらず、より安定なナノ粒子が形成されることが示された。この安定化効果は、主に分子内ジスルフィド架橋による環状 37pA-C2 の形成に起因するものであった。これらの結果から、ナノ粒子中の脂質二重層の縁に結合したペプチドの 2 つの α -ヘリックス領域が横方向に会合することが、安定なナノ粒子の形成に重要な因子であると示唆された。

(3) ナノ粒子とモデル脂質膜との融合

ナノ粒子と細胞膜のモデルであるリン脂質リポソームを緩衝液中で混合し、両者の膜融合について評価した。その結果、ナノ粒子とリポソーム膜双方が液晶相となる条件において、これらの間での融合が観察され、ナノ粒子中の蛍光脂質および蛍光ラベル膜貫通ペプチドがリポソーム膜へ移行することが明らかとなった。

(4) ナノ粒子と細胞膜との融合

上記の研究成果(3)で得られた知見に基づき、ナノ粒子を培養哺乳動物細胞に投与し、ナノ粒子と細胞膜との融合について評価した。その結果、ナノ粒子を構成する脂質の相転移温度以上で、細胞膜へナノ粒子中の分子を送達できることが明らかとなった。なお、上記の投与条件においては、ナノ粒子は培養細胞に対して有意な毒性を示さなかった。

(5) 本研究成果の位置づけと展望

上記の研究成果は、本研究で開発したナノ粒子系が、細胞膜への膜タンパク質送達の手法としての利用可能性を示している。Sligar らが開発したリン脂質二重層と Membrane Scaffold Protein (MSP) が形成するディスク状ナノ粒子はナノディスクと呼ばれている。ナノディスクは界面活性剤ミセルとは異なり、膜タンパク質を脂質二重層に埋め込んだ状態で可溶化できる。既に研究試薬として市販され、近年これを利用した膜タンパク質の機能・構造研究が盛んに報告されている。タンパク質よりも分子量の小さい両親媒性ペプチドもリン脂質とディスク状ナノ粒子を形成することが知られているが、コストが低く作製が容易な反面、不安定であることが応用への問題となっていた。しかし本研究では、この不安定性の知見を逆に生かすことで、膜タンパク質の細胞膜導入という新しい利用の道を拓いたと考えられる。

一方、近年の構造生物学研究では生きた細胞の内部にタンパク質を導入し、タンパク質の構造やダイナミクスを実際に機能する環境(in situ)で解析することが可能となってきた。このための細胞内へのタンパク質導入法として、毒素タンパク質による細胞膜ポア形成、電気穿孔法、膜透過ペプチドを利用した手法などがある。しかし、これらはすべてサイトゾルへの移行を目的としており、生体膜上の膜タンパク質導入への適用は困難である。本研究で開発した方法は、膜タンパク質を標的とした構造生物学研究や薬学的応用への進展に繋がる技術革新になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

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 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 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 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 該当する

1. 著者名 Anada Chiharu, Ikeda Keisuke, Nakao Hiroyuki, Nakano Minoru	4. 巻 38
2. 論文標題 Improvement of Thermal Stability of Amphipathic Peptide-Phospholipid Nanodiscs via Lateral Association of α -Helices by Disulfide Cross-Linking	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 6977 ~ 6983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.2c00533	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 Yamazaki Moe, Ikeda Keisuke, Kameda Tomoshi, Nakao Hiroyuki, Nakano Minoru	4. 巻 13
2. 論文標題 Kinetic Mechanism of Amyloid- β -(16-22) Peptide Fibrillation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 6031 ~ 6036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.2c01065	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 Nakano Minoru, Nakao Hiroyuki, Yoshida Shigeharu, Fukuda Masakazu, Imai Manjiro, Ikeda Keisuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Energetic and Structural Insights into Phospholipid Transfer from Membranes with Different Curvatures by Time-Resolved Neutron Scattering	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 6024 ~ 6030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.2c01080	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 Sato Ai, Ikeda Keisuke, Nakao Hiroyuki, Nakano Minoru	4. 巻 38
2. 論文標題 Thermodynamics for the Self-Assembly of Alkylated Peptides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 11801 ~ 11809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.2c02179	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 Shimizu Chinatsu, Ikeda Keisuke, Nakao Hiroyuki, Nakano Minoru	4. 巻 296
2. 論文標題 Amphipathic peptide?phospholipid nanofibers: Kinetics of fiber formation and molecular transfer between assemblies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysical Chemistry	6. 最初と最後の頁 106985 ~ 106985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpc.2023.106985	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17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

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 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 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 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 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 による脂質のリボ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 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 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 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 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 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 大門美菜、池田恵介、中尾裕之、中野実
2. 発表標題 カチオン性ペプチド-ATP混合系の液-液相分離挙動の解析
3. 学会等名 第73回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平原康裕、池田恵介、中尾裕之、中野実
2. 発表標題 異なるアミロイドペプチド間の相互作用が凝集に与える影響
3. 学会等名 第73回コロナイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2022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 Control of pH-dependent membrane permeation of cyclic peptides by adjusting side chain length of acidic amino acids
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 特殊アミノ酸の導入による環状ペプチドの pH 依存的な膜透過活性の制御
2. 発表標題 松田幹望、池田恵介、中尾裕之、中野実
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第134回例会
4. 発表年 2022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 近接したリポソーム間で促進される リン脂質移動のメカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第134回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 筏井佳奈子、池田恵介、中尾裕之、中野実
2. 発表標題 ペプチドナノディスクを用いた 膜タンパク質送達技術の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本泰直、中尾裕之、池田恵介、中野実
2. 発表標題 多量体化によるフリップフロップ 促進ペプチドの活性制御
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔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	中尾 裕之 (Hiroyuki Nakao) (00805020)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教 (13201)	

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