

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：63903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650054

研究課題名(和文) 時限機能付き薬剤輸送システムの開発

研究課題名(英文) Development of a drug delivery system equipped with timer

研究代表者

秋山 修志 (AKIYAMA, Shuji)

分子科学研究所・協奏分子システム研究センター・教授

研究者番号：50391842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は生物時計の時間情報を付与したドラッグデリバリーシステムの開発を目指したものである。時計タンパク質のリポソーム封入を試みたところ、膜への吸着により計時機能の一部が損なわれていることがわかった。これまでに得られた結果を踏まえ、今後はミクロンサイズのリポソームの作成方法および封入方法の検討を行っていく。

研究成果の概要(英文)：This research project aims at developing a drug delivery system with biological clock. We found that encapsulation of the clock proteins from cyanobacteria into ready-made liposome resulted in loss of their function, possibly due to unfavorable adsorption with membrane of the liposome. We are trying to establish the protocol to encapsulate as intact clock proteins by using micro-meter-sized giant liposomes.

研究分野：生物物理学

キーワード：物質輸送

1. 研究開始当初の背景

現在、医薬品開発の分野では、薬剤による治療効果を最大限に発揮するための輸送システム(ドラッグデリバリーシステム; DDS)の開発が注目されている。これまでの DDS 開発においてしばしば問題となっているのが、薬剤が目的の部位に到達するまでに、拡散、分解、排出などによる濃度低下を受けた結果、薬剤が持つ本来の効能が発揮されない点が挙げられる。薬剤を効率よく輸送することが開発の成功の鍵となることから、多くの研究において、薬剤を何らかの容器で保護して輸送するという考えに基づき設計が行われている(図1)。

仮に薬剤の濃度が低下しないよう、安定に保護する手法の開発に成功したとしても、目的の部位で薬剤が依然として保護されたままでは意味をなさない。すなわち、「目的の部位までの薬剤の保護」と「目的部位での薬剤の放出」の二つの機能が求められ、両者を時間的に分業することが要求される。これを達成するためには、自律的に薬剤を放出するタイミングを制御できる DDS の開発が望まれる。

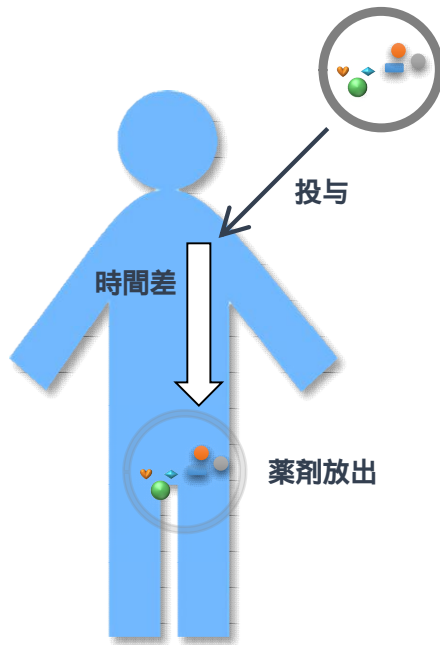


図1 ドラッグデリバリーシステムの概念図。薬剤が標的部位へ効率的に到達できるよう分解・排出を妨げる機能(保護能)そして標的部位付近で効率よく薬剤を放出する機能(放出能)これら2機能の時間的・空間的分業が要求される。

生物が自律的に時間情報を生み出すシステムの1つに生物時計が挙げられる。生物時計とは地球の自転周期に対応する約24時間周期のリズムを生み出す内因性の発振装置であり、ヒトなどの哺乳類から細菌に至るまで多くの生物に備わる計時システム

である。

光合成細菌であるシアノバクテリアも生物時計を持つ生物の一種で、3種の時計タンパク質(KaiA、KaiB、KaiC)から構成されている。その最大の特徴は、これら3種のタンパク質とアデノシン三リン酸(ATP)を混合すると、細胞内で見られるような生物時計のリズムが試験管内に再現される点である。Kaiタンパク質時計のリズムは極めて頑強で、溶液中にATPが一定量残存している限り安定に保持される。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえて本研究課題では、シアノバクテリアのKaiタンパク質時計が生み出す生物時計の時間情報をリポソームに組み込むことで、時限機能を付与したDDSの開発を目指す。

3. 研究の方法

大腸菌発現系を用いて精製したKaiタンパク質を、市販の凍結乾燥リポソームに封入することを試みた。リポソーム内部への封入は、Kaiタンパク質を含む溶液と凍結乾燥リポソームとを緩やかに混和することで行った。SDS電気泳動によりKaiCのリン酸化状態を定量することで、封入されたKaiタンパク質時計の機能を評価した。

一方、ミクロンサイズの巨大リポソームを調製するために、静置水和法、界面通過法、エレクトロフォーメーション法について比較検討を行った。

4. 研究成果

KaiCを含む溶液と凍結乾燥リポソームを混和し、KaiCが封入されたリポソームを調製した。未封入のKaiCを除去するために遠心分離を行い、リポソームを沈殿物として回収した後、KaiCを含まない溶液で再度懸濁した。この操作を複数回繰り返して、未封入KaiCの濃度を低下させた。

リポソーム内部のKaiCの機能を評価するために、リポソーム溶液を30℃で一晩インキュベートした後、界面活性剤を用いて破壊し、内部のKaiCのリン酸化状態をSDS電気泳動で定量した(図2)。水溶液中であればKaiCはリン酸化状態から脱リン酸化された状態へと自発的に反応が進行するのだが、リポソーム内部のKaiCのリン酸化状態はインキュベーション期間中殆ど変化していないことが明らかとなった。

リポソーム内部への封入が十分でない可能性を検証するため、幾つかのタンパク質においてリポソーム内部への封入効率の上昇が報告されている凍結融解を施し、同様の実験を行った。SDS電気泳動の結果から封入率のわずかな増加が認められたものの、上記の結果と同じく、リン酸化状態の変化がほとんど観察されなかった。この結果は、リポソームに封入されたKaiCの機能が一部損なわれ

ている可能性を示唆している。

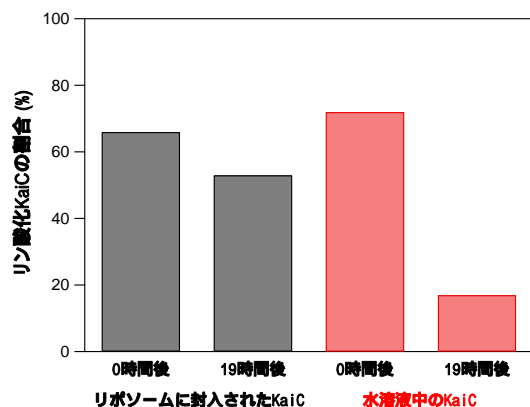


図2 リポソーム中（灰色）と水溶液中（朱色）における KaiC の自己脱リン酸化反応の効率

その要因を探るべく、膜を構成するリン脂質成分の検討を行った。構成するリン脂質が電荷を持たないリポソームに加えて、電荷脂質である DPPG の存在比が異なるアニオン性、カチオン性リポソームでも同様の実験を行った。しかしながら、いずれの系においても KaiC のリン酸化状態の変化がほとんど観察されなかった。

未封入のリポソームと KaiC を混合した後上記の洗浄作業を行い、回収したリポソーム画分を SDS 電気泳動に供したところ、KaiC に由来するバンドが確認された。考えられる要因として、KaiC と膜を構成するリン脂質との好ましくない相互作用により KaiC が膜に吸着している可能性が挙げられる。今後は、他のリン脂質成分について検討を行うとともに、予めリポソーム内部表面を他の生体分子で覆うことで、KaiC との相互作用を阻害した上で封入させるなどの工夫を検討する予定である。

また、上記で使用した市販のリポソームはその粒子径が 100~300 nm 程度とそれほど大きくない。そこでミクロンサイズの巨大なリポソームの作成方法を検討した。一般的には静置水和法、界面通過法、そしてリン脂質を導電性のガラス方面に塗布し、水溶液中で交流電圧を印可して作成するエレクトロフォーメーション法が広く用いられている。これらの作成方法について検証し、現在までのところエレクトロフォーメーション法を用いて、粒子径が数ミクロン程度のリポソームの調製に成功している。この方法では Kai タンパク質を常に水溶液中で取り扱うことが可能であり、かつ比較的粒子径の揃ったリポソームが得られる利点があるため、今後はこの巨大リポソームを用いて Kai タンパク質の封入条件の検討および、リポソーム内部での Kai タンパク質の機能評価に取り組んでいきたいと考え

ている。

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 11 件)

秋山 修志, “ 藍藻生物時計システムにおける分子動態と貫階層性 ”, 次ステージ機能生命科学の展望, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市) (Mar 10, 2016).

Atsushi Mukaiyama, Jun Abe, and Shuji Akiyama Circadian Periodicity encoded in KaiC ATPase. Winter School of ASIA CORE Program, Beijing, China (Feb 26, 2016)

秋山 修志, “ 藍藻の時計タンパク質に内包された概日周期と遅さの根源 ”, 藍藻の分子生物学 2015, かずさアカデミアホール (千葉県木更津市) (Nov 17, 2015).

Akiyama S., “ KaiC as Circadian Pacemaker of Cyanobacterial Circadian Clock ”, Grand Design of Molecular Systems, 分子科学研究所 (愛知県岡崎市) (Oct 8, 2015).

向山厚, 阿部淳, 檜山卓也, 孫世泳, Wolanin Julie, 山下栄樹, 近藤孝男, 秋山修志 時計タンパク質 KaiC に書き込まれた生物時計の発振周期 第 22 回日本時間生物学会学術大会, 東京大学本郷キャンパス (東京都文京区) 2015 年 11 月 21 日

Atsushi Mukaiyama, Masato Osako, Takaaki Hikima, Takao Kondo, Shuji Akiyama Hexamerization process of cyanobacterial clock protein KaiC monitored with SAXS and fluorescence spectroscopy. 16th International conference on small-angle scattering, Berlin, Germany (Sep 16, 2015)

Atsushi Mukaiyama, Jun Abe, Takuya B. Hiyama, Seyoung Son, Toshifumi Mori, Shinji Saito, Masato Osako, Julie Wolanin, Eiki Yamashita, Takao Kondo, Shuji Akiyama Circadian timing governed by cyanobacterial KaiC ATPase. 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢大学角間キャンパス (石川県金沢市) 2015 年 9 月 14 日

向山厚, 秋山修志 蛍光プローブの挿入による時計タンパク質 KaiC の周期的構造変化の計測 第 42 回生体分子科学討論会, 高崎シティーギャラリー (群馬県高崎市) 2015 年 6 月 13 日

Atsushi Mukaiyama, Jun Abe, Takuya Hiyama, Masato Osako, Takaaki Hikima, Takao Kondo, Shuji Akiyama Negative feedback regulation of KaiC ATPase gives origin to the circadian periodicity of cyanobacteria. 第38回内藤コンファレンス「生物システムの物質的基盤」, シヤトレーゼ ガトーキングダム サッポロ(北海道札幌市) 2014年10月7-10日

Atsushi Mukaiyama, Shuji Akiyama Conformational transition of a cyanobacterial clock protein KaiC monitored with fluorescence spectroscopy. 第52回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) 2014年9月27日

向山厚, 秋山修志 蛍光分光法によるシアノバクテリア時計タンパク質 KaiC の構造変化の解析 第14回日本蛋白質科学会年会, ワークピア横浜(神奈川県横浜市) 2014年6月27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

秋山 修志 (AKIYAMA, Shuji)
分子科学研究所・協奏分子システム研究センター・教授
研究者番号: 50391842

(2) 研究分担者

向山 厚 (MUKAIYAMA, Atsushi)
分子科学研究所・協奏分子システム研究セ

ンター・助教
研究者番号: 80647446

(3) 連携研究者
()

研究者番号: