

2022年11月21日

報道関係者 各位

細胞膜の脂質非対称組成が鍵 複雑な細胞内反応をもった人工細胞バイオリクタ構築の足掛かりに

群馬大学（群馬県前橋市）大学院理工学府分子科学部門 神谷厚輝助教と同大学物質・生命理工学教育プログラム博士前期課程1年 三輪 明星は、膜透過性ペプチドを介して酵素などの水溶性タンパク質を人工細胞膜のリポソーム内へ輸送し機能化することに成功しました。この成果は、米国化学会のACS Synthetic Biologyに掲載され、表紙に採択されました。



膜透過性ペプチド(Cell penetrating peptide; CPP)は水溶性タンパク質と複合体を形成することで、そのタンパク質を細胞質へ輸送する能力を持ちます。このペプチドによる細胞サイズリポソーム内へのタンパク質輸送は、真核細胞膜組成を模倣した内膜に負電荷の脂質が存在するリン脂質組成非対称膜で促進されることを明らかにしました。これは、真核細胞の細胞膜組成が非対称である重要性を示唆する結果です。

さらに、CPPを介して表面電荷、大きさや機能の異なる水溶性タンパク質をリポソーム内へ輸送することに成功しました。したがって、この水溶性タンパク質輸送法の汎用性の高さを実証しました。

1. 本件のポイント

- 膜透過性ペプチドを用いて細胞サイズリポソーム内に機能を保持した水溶性タンパク質を輸送
- 細胞膜のようにリポソームの内膜に負電荷脂質の存在がタンパク質輸送に重要

2. 本件の概要

近年、リポソーム(注1)内で細胞機能を再現し、生命現象を理解しようとする研究が盛んに行われています。多くの細胞機能は、タンパク質が担っています。タンパク質をリポソーム内に供給することは困難であり、リポソーム形成時にタンパク質を加える必要があります。したがって、タンパク質の反応がリポソーム形成中に始まり、任意のタイミングでタンパク質の反応を開始させることが困難です。そこで、リポソーム形成後にタンパク質をリポソーム内へ輸送する手段が必要です。膜透過性ペプチド(CPP)(注2)は、タンパク質等と複合体を形成することでそれらを細胞内に輸送する能力を持つことからドラッグデリバリーシステム研究が行われています。本研究では、この能力を活用して、細胞に近い形状を持つ細胞サイズリポソーム内へのタンパク質輸送が実現できないか考えました。輸送させたいタンパク質とCPPで複合体を形成させたのち、その複合体を様々な膜組成の細胞サイズリポソームに加え、リポソーム内へのタンパク質輸送を検討しました。外膜に電荷をもたない脂質、内膜に負電荷をもつ脂質で構成された非対称な膜組成のリポソームにおいて、タンパク質がリポソーム内に輸送されタンパク質の機能も有していました。また、このリポソーム膜条件において、サイズ、表面電荷や機能の異なるタンパク質がリポソーム内へ輸送され機能も観察されました。したがって、CPPを用いたリポソーム内へのタンパク質の輸送は高い汎用性を有しています。

本研究でCPPによるタンパク質輸送には膜の非対称性が重要であることが明らかになり、真核細胞の細胞膜組成が非対称である重要性を示唆する結果です。本研究は、今後非対称膜リポソームによって輸送能を最大化するCPPの創出や、リポソーム内へ様々なタンパク質を任意のタイミングで輸送できるため細胞内の代謝経路を搭載した複雑な人工細胞バイオリクタ(注3)の構築や反応制御に活用されることが期待されます。また、他の種類のCPPや人工CPPを設計し非対称膜組成リポソーム内への輸送に関わる原理を解明することで、CPPによる効率的なドラッグデリバリーシステムの構築も期待されます。

本成果は、2022年11月18日に、ACS Synthetic Biology誌に掲載されました。

用語

(注1) リポソーム: 細胞膜の構成成分のリン脂質が二分子膜を形成した小胞。細胞膜と同じ構造を持つため、ドラッグデリバリーシステムに活用されている。

(注2) CPP: Cell penetrating peptide; 膜透過性ペプチド。輸送したいタンパク質、RNAなどと複合体を形成または共有結合させることによって、目的の物質を細胞内に輸送する能力を持つ。

(注3) 人工細胞バイリアクタ:リポソームを小型の反応容器として、リポソーム内で生化学反応を行い有用物質を産生する。

3. 発表雑誌

雑誌名:ACS Synthetic Biology

論文題名: Control of Enzyme Reaction Initiation inside Giant Unilamellar Vesicles by the Cell-Penetrating Peptide-Mediated Translocation of Cargo Proteins

著者: Akari Miwa, Koki Kamiya

DOI番号: <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00413>

4. 謝辞

本研究は、日本学術振興会(JSPS)科研費 基盤研究(B) JP22H01874、卓越研究員事業、武田科学振興財団からの支援を受けて行われました。

5. 本件に関するお問い合わせ先

【報道に関すること】

群馬大学理工学部事務部庶務係（広報担当） Tel: 0277-30-1011 FAX:
0277-30-1020 E-mail:k-dayori@jimu.gunma-u.ac.jp

研究の詳細

近年、細胞内環境を模倣しリポソーム内に酵素反応を封入し、生命現象を理解しようとする研究が盛んに行われています。しかし、リポソーム内への物質の供給はナノポアやチャネルを通過できる小分子に限定され、タンパク質などの大きな分子は供給することが困難です。そのため、そのような大きな分子はリポソーム作製段階から溶液中加入する手段しかありませんでした。そこで、リポソーム調製後の任意のタイミングでタンパク質を輸送できる方法があればリポソーム内での反応を外から制御する手段となると考えました。そのための輸送手段として膜透過性ペプチド(CPP)用いました。CPPは、タンパク質やRNA等と複合化し細胞質に生体分子を輸送する手段として、ドラッグデリバリーシステムなどで用いられています。本研究では、構造の異なるCPPであるpep-1とpenetratinの二種類を使用しました。輸送するタンパク質にはサイズや電荷の異なる2種類のタンパク質のDNAを分解するDNase Iと、ビオチンと相互作用するストレプトアビジンを選択しました。まず、タンパク質を蛍光修飾した各CPPとインキュベートすることによって複合体を形成しました。複合体の形成はnative-PAGEによって確認しました。電気的に中性なリン脂質DOPCと負の電荷をもつリン脂質DOPG, DOPSを組み合わせた非対称膜リポソームと形成した複合体をインキュベートし顕微鏡で観察しました。その結果、リポソームの外膜に電気的に中性なリン脂質DOPC、内膜にDOPSまたはDOPGの負電荷の脂質が存在する非対称膜組成であると、リポソーム膜上にペプチド由来の蛍光が観察され、相互作用しやすいということが分かりました(図1)。また、リポソームの内水相に基質となるDNA probeを封入したリポソームとCPP-DNase I複合体をインキュベートすると、内膜にDOPSまたはDOPGを含む非対称組成のリポソーム内でprobeが分解されたことを示す蛍光が観察されました(図2右)。この結果から、CPPによるリポソーム内へのタンパク質輸送には、内膜に負電荷の脂質(特にDOPSが内膜の場合)をもった非対称組成が重要であることが分かりました。この非対称膜組成は真核細胞の細胞膜の膜組成と一致しており、真核細胞がなぜ非対称膜であるかの答えの一つになると考えます。さらに、ストレプトアビジンも同様の非対称組成膜の条件で輸送されることが明らかとなり(図2左)、本手法を用いたタンパク質輸送の高い汎用性が示されました。

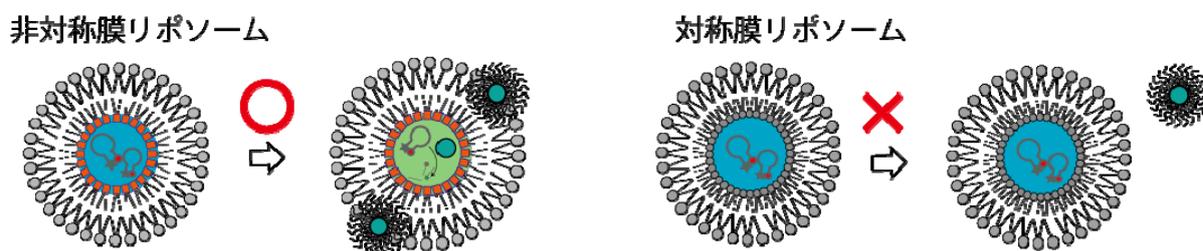


図1. 内膜に負電荷の脂質を含む膜の非対称性によるタンパク質輸送の促進

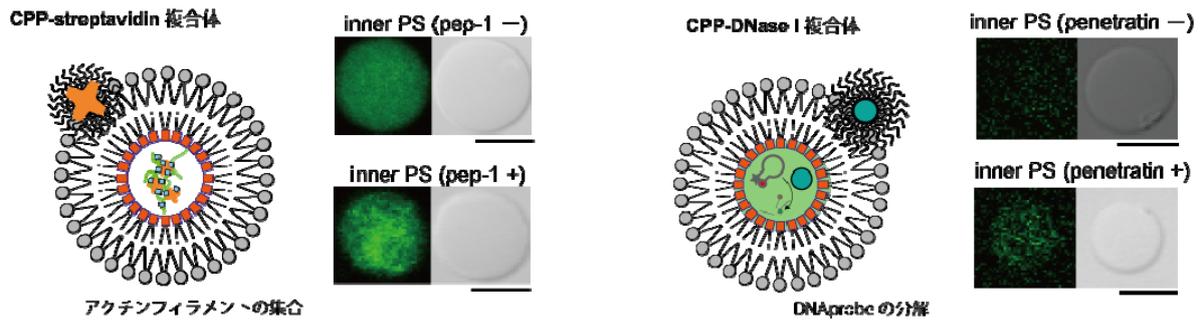


図2. 複合体添加によるリポソーム内での水溶性タンパク質の機能化

社会に対する成果の還元、今後の展望

本研究で、膜透過性ペプチドを介することで非対称膜組成のリポソームの内に水溶性タンパク質を輸送できるようになりました。この成果により、任意のタイミングでリポソーム内へ水溶性タンパク質を輸送できるようになるため、多段階のタンパク質反応を制御可能なリポソームリアクタの構築に貢献し、生命現象の詳細な理解に繋がります。また、他の種類のCPPや人工CPPを設計し非対称膜組成リポソーム内への輸送に関わる原理を解明することで、CPPによる効率的なドラッグデリバリーシステムの構築も期待されます。