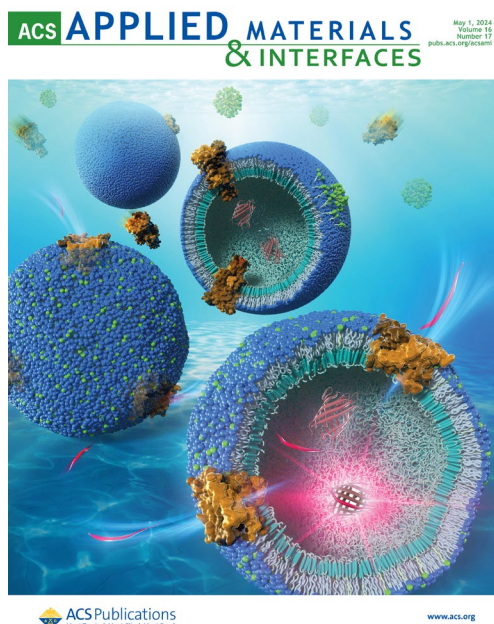


2024年5月8日

報道関係者 各位

外部環境変化を小胞内のタンパク質機能へ変換できる マイクロ生体分子ロボットの構築に成功！

群馬大学大学院理工学府（群馬県桐生市）分子科学部門 神谷厚輝助教、群馬大学大学院理工学府物質・生命理工学教育プログラム博士前期課程2年 馬場康太郎は、脂質-オレオシン非対称膜小胞に再構成した機械刺激依存性チャンネルを介したペプチド輸送を利用し、外部刺激による膜張力変化を小胞内へのタンパク質機能に変換可能なマイクロ生体分子ロボットの構築に成功しました。この成果は、米国化学会誌のACS Applied Materials & Interfacesに掲載され、その号の表紙に採択されました。



細胞サイズの脂質-タンパク質非対称膜小胞(外膜:リン脂質、内膜:両親媒性タンパク質オレオシン)に再構成した α ヘリックス構造をもつ機械刺激依存性チャンネルMechanosensitive channel of large conductance (MscL)が小胞外分子によって引き起こされる膜張力変化を認識し、物質輸送能を有することを明らかにしました。さらに、活性化したMscLを介した小胞内への生体分子輸送、およびそれに起因するタンパク質機能の発現への変換に成功しました。本研究成果は、膜環境変化の情報をMscLによって小胞内へ伝達し、小胞内で酵素などによる薬剤産生等の有用な反応に変換できるマイクロ生体分子ロボットの構築が期待されます。

1. 本件のポイント

- 脂質-タンパク質非対称膜といった完全人工膜における膜タンパク質機能の発現に成功
- 機械刺激依存性チャネルが膜張力変化を認識し小胞内のタンパク質機能へ変換

2. 本件の概要

脂質-オレオシン非対称膜小胞は、外膜がリン脂質、内膜が両親媒性タンパク質オレオシンから構成されるマイクロスケール小胞であり、βバレル型ナノポア膜タンパク質の機能化や、リポソーム(注1)と比較した高い堅牢性といった利点をもっています。それ故に、リン脂質膜とタンパク質の双方の膜の利点を併せ持つ新しい細胞模倣モデルとして期待されています。本研究では、二回膜貫通αヘリックスをもつ機械刺激依存性チャネルMechanosensitive channel of large conductance (MscL)を、この脂質-オレオシン非対称膜への再構成に成功しました。そして、外部刺激にตอบสนองした生体分子の輸送を実現するため、小胞の外膜にリゾリン脂質(注2)を挿入することで膜張力変化を感知して開いたMscLナノポアを介した物質輸送の検討を行いました。MscLの活性化には負電荷脂質が必要ですが、脂質-オレオシン非対称膜小胞では負電荷脂質の代わりにオレオシンが担いMscLの活性化が引き起こされました。さらに、小胞内の不活性型タンパク質が、膜張力を感じたMscLを介して輸送されたペプチドと相互作用することで活性を回復できることを明らかにしました。本研究の成果から、MscLを用いて外部刺激による膜張力変化を小胞内へ伝達する機能を付与した脂質-オレオシン非対称膜小胞は、膜環境変化を起点とした小胞内酵素反応の起動などの複雑な細胞機能を模倣することで、バイオリアクターとして薬物等の有用産物の産生が期待されます。

本成果は、2024年5月1日に、ACS Applied Materials & Interfaces誌に掲載されました。

用語

(注1) リポソーム: 細胞膜の構成成分であるリン脂質からなる脂質二重膜小胞。複雑な膜構造の模倣や内部酵素反応等の人工細胞モデルや、薬剤や化粧品を内包する担体に利用される。

(注2) リゾリン脂質: アシル基を1本もつリン脂質。脂質二重膜への非対称な挿入により膜の粗密変化を生じる。

3. 発表雑誌

雑誌名:ACS Applied Materials & Interfaces

論文題名: Molecular transportation conversion of Membrane tension using mechanosensitive channel in asymmetric lipid-protein vesicles

著者: Kotaro Baba, Koki Kamiya

DOI番号 : <https://doi.org/10.1021/acsami.4c02370>

4. 謝辞

本研究は、日本学術振興会(JSPS) 科研費 基盤研究(B) JP22H01874、学術変革領域研究(A) JP23H04398、および卓越研究員事業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

【研究に関すること】

群馬大学 大学院理工学府分子科学部門 生命分子機能化学研究室

助教 神谷 厚輝 (かみや こうき)

Tel:0277-30-1342

E-mail:kamiya@gunma-u.ac.jp

神谷研究室のホームページ:<http://kamiya.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/index.html>

【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: 0277-30-1014 Fax: 0277-30-1020

E-mail:rikou-pr@ml.gunma-u.ac.jp

研究の詳細

我々は、人工細胞モデル構築に多く利用されているリポソームとは異なる細胞模倣系として、外膜がリン脂質、内膜が両親媒性タンパク質オレオシンから構成されるリン脂質-タンパク質非対称膜小胞を形成し、現在までに、 β バレル型ナノポア膜タンパク質OmpGを用いた小胞内外物質輸送に成功していますが、OmpGは恒常的にポアを形成するため、ポアの開閉による物質輸送の制御は困難です。そこで我々は、細菌由来の機械刺激依存性チャネルMechanosensitive channel of large conductance (MscL)を脂質-オレオシン非対称膜小胞に再構成し、外部環境変化によって生じる膜張力変化を機械刺激依存性チャネルが認識し、小胞内のタンパク質機能へ変換できる人工細胞モデルの構築を目指しました。

MscLは2回膜貫通 α ヘリックスからなるサブユニットが五量体としてナノポアを形成し、細胞膜の物理的応力を感じて10 kDa以下の分子を非選択的に輸送します。まず、大腸菌から発現・精製を行い界面活性剤で可溶化したMscLを、脂質-オレオシン非対称膜小胞と混合することで再構成しました。小胞外液へのリゾリン脂質(LysoPC)の添加による、小胞内カルセインの漏出観察を行ったところ、膜へのLysoPC挿入量、すなわち膜張力変化に依存した物質輸送量の上昇が確認されました(図1)。同様に、小胞外FITC-dextran (10 kDa)の流入も観察され、脂質-オレオシン非対称膜小胞上のMscLが、細胞膜やリポソーム膜上と同程度のサイズのナノポアを形成することが示されました。さらに、脂質-オレオシン非対称膜小胞は、膜タンパク質の再構成とLysoPCの挿入に対して、リポソームよりも高い物理的安定性を持っていました。また、脂質-オレオシン非対称膜小胞上のMscLの配向性観察により、C末端ヘリックスを小胞内側に向けた配向性の優位性が示され、細胞膜におけるMscLの構造安定化・機能化のためにDOPGなどの負電荷リン脂質頭部と相互作用するMscLの膜貫通ヘリックス内膜側の正電荷アミノ酸領域とオレオシン親水性末端の負電荷アミノ酸領域の静電的な相互作用によって、MscLの機能が活性化されたことが示唆されました。さらに、内水相にsfCherry₁₋₁₀を含むMscL脂質-オレオシン非対称膜小胞の外液にsfCherry₁₁ペプチドとLysoPCを添加したところ、膜張力変化によるsfCherry₁₁のMscLを介した流入に起因したsplit-sfCherryの自己会合が生じ、小胞内にsfCherryの蛍光が観察されました(図2)。したがって、MscLを利用した脂質-オレオシン非対称膜小胞の膜張力変化を、小胞内タンパク質機能への変換に成功しました。

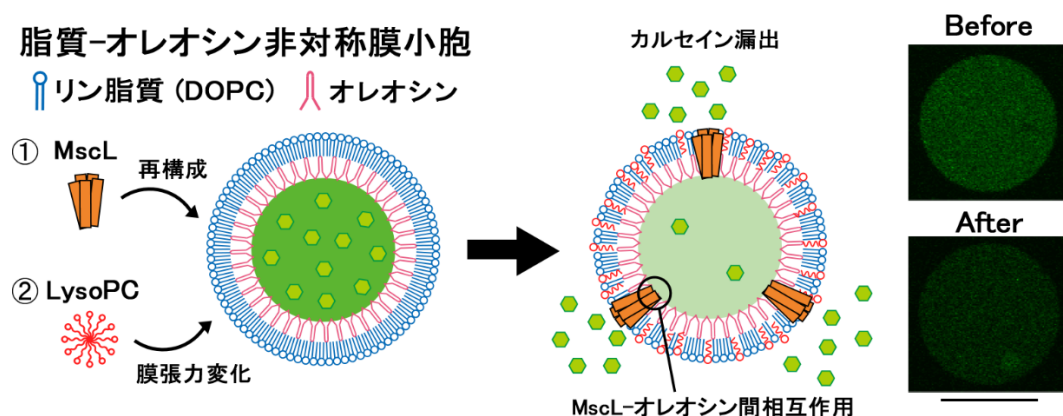


図1. 脂質-オレオシン非対称膜小胞に対するMscLの再構成と膜張力変化による小胞内カルセイン漏出

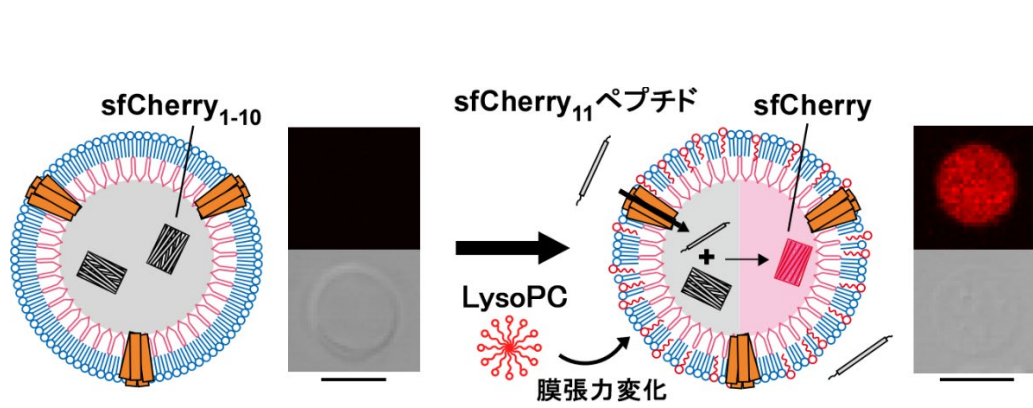


図2. MscLを介した小胞内へのペプチド輸送による小胞内タンパク質機能回復

社会に対する成果の還元、今後の展望

本研究では、膜張力変化を感知できるMscLを利用して、脂質-オレオシン非対称膜小胞に対する外部環境変化を、小胞内のタンパク質機能への変換に成功しました。この研究成果は、脂質-オレオシン非対称膜小胞に、βバレル型やαヘリックス型の膜タンパク質が再構成可能であることを示しています。また、膜張力変化を生じさせる種々の化学分子によってMscLを活性化させることで、小胞内でタンパク質を利用した薬剤産生等の有用な反応に変換できるマイクロ生体分子ロボットの構築が期待されます。さらに、細胞から分泌される膜張力変化物質を小胞のMscLが感知し小胞内で別の反応へ変換できる、細胞と人工細胞間の分子通信システムの構築も期待されます。