

2018 年度年度採択研究代表者

二木 史朗

京都大学化学研究所
教授

細胞外微粒子の細胞内運命の解析と制御

§ 1. 研究成果の概要

「マクロピノサイトーシス」は細胞外微粒子の細胞内取込に中心的役割を担う経路の一つである。本研究では、細胞外からの微粒子が細胞にどのように取り込まれ、どのような運命をたどるのかを、様々な性質を持つ微粒子と新しい細胞環境検出系を用いて明らかにし、細胞外微粒子が生命現象に与える影響を化学・生物・薬学的見地から理解する「細胞動態工学」を樹立することを目指している。

2019 年度の成果として、研究代表者(二木史朗)は、抗体のみならず核酸誘導体の細胞内への効率的導入を可能とする新規ペプチド SN21-LK15 を開発するとともに、この効率的細胞内導入がペプチドによるマクロピノサイトーシスの誘起によるものであることを確認した(Arafiles ら, Bioconjug. Chem. 31, 547 (2020))。また、これに関わる特許を出願した(特願 2019-139068)。研究代表者は、酸性アミノ酸(グルタミン酸)により細胞表面では膜傷害性を抑制し、エンドサイトーシス(マクロピノサイトーシス)で細胞内に取り込まれた際、エンドソームを選択的に傷害し、細胞内送達を促進するアプローチを報告しているが、ペプチド中におけるグルタミン酸の導入位置の最適条件に関して検討を行い、疎水面と親水面の境界に導入することで良好な結果が得られることを確認した(Tamemoto ら, Mol. Pharm. 17, 2175 (2020))。また、同様のペプチドと生理活性ペプチドとの連結によっても、細胞内送達が可能であることを確認した(Yu ら, Peptide Sci. 112, e24144 (2020))。種々の金属やポリマー粒子がどのようにして生細胞に取り込まれるかに関して、新留グループと連携し、詳細に検討を行うとともに、森井グループと連携し、エンドソーム環境センサーの設計に関する情報を収集した。

森井グループでは、エンドソーム内 pH 変化をレシオ検出できるエンドソーム内環境センサーを構築した。DNA 基板上に pH 応答性色素を配置したセンサーを、より幅広い pH が検出できるように改良した。さらに、DNA 基板への配置および SN21-LK15 ペプチドとの複合体形成による蛍光色

素の pH 応答性の変化を試験管内で詳細に評価して校正曲線を作成した。また、タンパク質受容体をもとに作製したバイオセンサーを、DNA 基板上に複数種類配置するための手法を開発した (Nguyen ら, Chem. Sci. 10, 9315 (2019))。

新留グループでは、100 nm 程度の修飾金ナノ粒子が細胞内へ取り込まれる際のエンドサイトーシス経路や、細胞種による異同に関して阻害剤を用いての予備検討を行った。マクロファージ由来培養細胞である RAW264.7 では、金ナノ粒子の表面電荷にかかわらず、マクロピノサイトーシス阻害剤により細胞取込が減少した。一方、がん由来培養細胞である HeLa 細胞では、この効果は現れにくかった。この結果は、100 nm 程度の金ナノ粒子に関しては、マクロファージと非マクロファージ細胞で取り込み経路に異同があることを示唆する。また、ポリ乳酸系ナノ粒子をマクロファージの小胞体まで輸送する技術を開発した。

【代表的な原著論文】

Jan Vincent V. Arafiles, Hisaaki Hirose, Misao Akishiba, Shogo Tsuji, Miki Imanishi, Shiroh Futaki, “Stimulating Macropinocytosis for Intracellular Nucleic Acid and Protein Delivery: A Combined Strategy with Membrane-Lytic Peptides To Facilitate Endosomal Escape”, Bioconjug. Chem. Vol. 31, No. 3, pp.547-553, 2020

§ 2. 研究実施体制

(1) 二木グループ

- ① 研究代表者: 二木 史朗 (京都大学化学研究所 教授)
- ② 研究項目
 - ・細胞外微粒子の細胞移行ゲートとしてのマクロピノサイトーシスの理解の深化
 - ・微粒子の細胞内(サイトゾル)への送達指針の樹立
 - ・エクソソームを介した細胞間情報伝達経路へのマクロピノサイトーシス関与の検討

(2) 森井グループ

- ① 主たる共同研究者: 森井 孝 (京都大学エネルギー理工学研究所 教授)
- ② 研究項目
 - ・エンドソーム内環境センサーの開発
 - ・バイオセンサー素子の開発
 - ・マクロピノサイトーシス関連細胞環境変化多元同時センサーの開発

(3) 新留グループ

- ① 主たる共同研究者: 新留 琢郎 (熊本大学大学院先端科学研究部 教授)
- ② 研究項目
 - ・様々な素材、形状、表面電荷をもつナノ粒子の作製
 - ・各種細胞へのナノ粒子の取り込みと取り込み経路の評価実験系構築
 - ・マクロファージと非マクロファージにおけるマクロピノサイトーシスの異同の検討