

細胞外微粒子に起因する生命現象の解明とその制御に向けた基盤技術の  
創出

2018年度採択研究代表者

2020年度 年次報告書
-----------------

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、新しい細胞環境検出系を用いて種々の細胞外微粒子の細胞への移行様式を明らかにしつつ、効果的な細胞内送達系を樹立することを目指し検討を進めた。

2020 年度の主な成果として、研究代表者(二木史朗)は、マクロピノサイトーシスによる細胞内微粒子送達ペプチドの高活性化を図り、研究開始時と較べて1/10~1/20 濃度で同等の送達能を発揮するペプチドを得た。細胞間コミュニケーション因子として注目される細胞外小胞・エクソソームの細胞内送達促進ペプチドを開発すると同時に、内在化・膜融合効率の定量評価法を樹立した。機械刺激チャネル活性化により、従来知られていなかった様式でのマクロピノサイトーシス阻害やがん細胞増殖抑制が可能であることを見出した。

森井グループでは、昨年度まで開発してきたエンドソーム内 pH 変化をレシオメトリックに蛍光検出するエンドソーム内環境センサーを細胞内で利用した。二木グループが開発した送達ペプチドを用いて環境センサーを細胞内に導入し、マクロピノサイトーシスに連動した細胞内特定位置での pH 変化をリアルタイムに計測した。環境センサーを改良し、幅広い pH 領域で応答することを試験管内で確認した。さらに、エンドソーム内の酵素を検出する蛍光プローブを設計・合成し、機能を試験管内で確認した。また、酵素を DNA 基板上に配置した際に活性が変化する要因を報告した。

新留グループでは、マクロファージ選択的薬物送達担体として有望な金ナノロッドの表面構造により細胞内取込様式が大きく異なりうることを見出したが、生体内状態に近いと推測される初代培養マクロファージへの送達にはマクロピノサイトーシスが主経路となる可能性を示した。また、細菌毒素を使ったマクロファージ選択的な送達システムも構築した。

## § 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
  - ・ナノ粒子のマクロピノサイトーシスによる取込様式の細胞間での異同の検討
  - ・エクソソーム内包物放出(膜融合)過程の可視化・定量評価系の立ちあげ
  - ・マクロピノサイトーシス活性化ペプチド(SN21 等)の分子機構の検討と細胞内送達への応用

### (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
- ・ナノ粒子の表面構造と各種細胞への取り込み経路の異同の解析
- ・マクロファージ選択的デリバリーシステムの構築と抗炎症作用の評価

【代表的な原著論文情報】

1) “Discovery of a Macropinocytosis-Inducing Peptide Potentiated by Medium-Mediated Intramolecular Disulfide Formation”

Arafiles JVV, Hirose H, Hirai Y, Kuriyama M, Sakyiamah MM, Nomura W, Sonomura K, Imanishi M, Otaka A, Tamamura H, Futaki S.

*Angew. Chem. Int. Ed.* 60(21), 11928–11936 (2021)

2) “Optimizing Charge Switching in Membrane Lytic Peptides for Endosomal Release of Biomacromolecules”

Sakamoto K, Akishiba M, Iwata T, Murata K, Mizuno S, Kawano K, Imanishi M, Sugiyama F, Futaki S.

*Angew. Chem. Int. Ed.* 59(45), 19990–19998 (2020)

3) “Potentiating the Membrane Interaction of an Attenuated Cationic Amphiphilic Lytic Peptide for Intracellular Protein Delivery by Anchoring with Pyrene Moiety”

Sakamoto K, Michibata J, Hirai Y, Ide A, Ikitoh A, Takatani-Nakase T, Futaki S.

*Bioconjug Chem.* 32(5), 950–957 (2021)

4) “A Facile Combinatorial Approach to Construct a Ratiometric Fluorescent Sensor: Application for the Real-Time Sensing of Cellular pH Changes”

Nakata E, Hirose H, Gerelbaatar K, Arafiles JVV, Zhang Z, Futaki S, Morii T.

*Chem. Sci.* 12(23), 8231–8240 (2021)

5) “Effect of Surface Modifications on Cellular Uptake of Gold Nanorods in Human Primary Cells and Established Cell Lines”

Xiao Y, Xu W, Komohara Y, Fujiwara Y, Hirose H, Futaki S, Niidome T.

*ACS Omega* 5(50), 32744–32752 (2020)