

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

2021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の中心的経路の一つである。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。研究代表者二木は、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、研究開始時の 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。また、細胞内送達ペプチドと抗体により形成される液滴を介して、抗体を細胞内に注入できることを見出した。研究分担者新留が調製した種々の微粒子の細胞内取込様式を二木・新留両チームで検討するとともに、細胞外小胞の受容細胞への情報伝播評価系を構築した。機械刺激チャネル活性化による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。研究分担者森井は多元同時センサーのプロトタイプとして蛍光 pH センサーを調製し、二木チームと共同してエンドソーム内環境測定への適用性の評価を行った。新留は含硫黄化合物に注目し、高分子ナノ粒子に内包させ、これをヒト単球由来マクロファージ(初代培養細胞)に取り込ませることにより抗炎症性を確認した。

## § 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
  - ・L17E 誘導体による抗体・細胞外微粒子の細胞内送達促進
  - ・SN21/P4A ペプチドのマクロピノサイトーシス活性化様式の検討と細胞外小胞取込促進への展開
  - ・細胞外小胞(エクソソーム)の細胞内への取込と膜融合の検出系の樹立
  - ・500 nm pHrodo-beads の細胞内取込様式の検証

### (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
  - ・pH 感受性の蛍光色素を配置した DNA 基板を用いた細胞内取り込みに伴う pH 変化のリアルタイム検出
  - ・カテプシンセンサーの試験管内および細胞内での機能評価
  - ・脂質(リゾビスフォスファチジン酸)のバイオセンサー開発

### (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
  - ・種々のサイズ、形状、表面化学構造を有するナノ粒子作製とマクロファージおよびそれ以外の細胞内への取込経路の解析
  - ・マクロファージにおける微粒子の取込機構解析と選択的送達系の開発

## 【代表的な原著論文情報】

1. Sakamoto K, Michibata J, Hirai Y, Ide A, Ikitoh A, Takatani-Nakase T, Futaki S: Potentiating the Membrane Interaction of an Attenuated Cationic Amphiphilic Lytic Peptide for Intracellular Protein Delivery by Anchoring with Pyrene Moiety. *Bioconjug Chem*, **32**, 950–957 (2021).
2. Sakamoto K, Furukawa H, Arafiles JVV, Imanishi M, Matsuura K, Futaki S: Artificial Nanocage Formed via Self-Assembly of  $\beta$ -Annulus Peptide for Delivering Biofunctional Proteins into Cell Interiors. *Bioconjug Chem*, **33**, 311–320 (2022).
3. Iwata T, Hirose H, Sakamoto K, Hirai Y, Arafiles JVV, Akishiba M, Imanishi M, Futaki S: Liquid Droplet Formation and Facile Cytosolic Translocation of IgG in the Presence of Attenuated Cationic Amphiphilic Lytic Peptides. *Angew Chem Int Ed Engl*, **60**, 19804–19812 (2021).
4. Arafiles JVV, Hirose H, Hirai Y, Kuriyama M, Sakyamah MM, Nomura W, Sonomura K,

Imanishi M, Otake A, Tamamura H, Futaki S: Discovery of a Macropinocytosis-Inducing Peptide Potentiated by Medium-Mediated Intramolecular Disulfide Formation. *Angew Chem Int Ed Engl*, **60**, 11928–11936 (2021).

5. Nakata E, Hirose H, Gerelbaatar K, Arafles JVV, Zhang Z, Futaki S, Morii T: A facile combinatorial approach to construct a ratiometric fluorescent sensor: application for the real-time sensing of cellular pH changes. *Chem Sci*, **12**, 8231–8240 (2021).