

1. 緒言

細胞間における物質や情報の伝達手段として膜融合反応が知られている。一般的に生体膜融合は、2つの膜表面の認識、接触、および膜脂質の混合など複数の過程を経て起こる。膜融合現象は受精やウイルスの細胞への侵入などに代表される多くの生物・細胞の営みに中心的な役割を果たしていることから、このような膜融合機構を人工的な系で模倣できれば、天然系の機構解明だけでなく、生理水環境における有用物質や情報の伝達などの新規送達系構築に大いに貢献できると考えられ、医薬基材創成への発展が期待される。

一般に細胞膜表面における静電反発や立体因子などのエネルギー障壁により、自発的な膜融合現象は起こらない。そのため、生体内における膜融合反応では融合ポリペプチドなどの介在分子が重要な役割を果たしている。その例としてインフルエンザヘマグルチニンタンパク質(HA)が挙げられる。HAはシアル酸結合部位を有するHA1と膜融合部位であるHA2からなり、膜融合はpH変化に伴うHA(特にHA2)の構造変化に起因して誘発する^{1,2)}。すなわち、酸性pHにおいてHA2鎖が三本鎖coiled coil構造を形成することをきっかけにHA1のシアル酸結合部位が露出し、標的(細胞)膜との相互作用を経て融合が進行する。このような膜融合ポリペプチドの構造と融合挙動との関係について知見を得るために、われわれは本プロジェクトにおいて、pHに応答して構造変化を示すcoiled coilポリペプチドの合成、および細胞膜モデルとしてのリポソーム系における膜融合挙動の検討を行った。一方、膜融合モデル研究として膜界面における担体-標的間の選択的分子認識を利用した膜融合系の構築例がいくつか報告されている³⁻⁷⁾。そこで、細胞表面に広く存在する糖およびその類縁体に注目し、糖同様に環状ジオール構造(cys-ジオール構造)を有するホスファチジルイノシトール(PI)を含むリポソームを標的とし、担体にはジオール構造の配向の違いを認識することが知られているボロン酸誘導体を用い、水系における選択的分子認識を駆動力とした新規膜融合系の設計も行った。

2. 実験

2.1 ポリペプチド合成

本研究で使用したポリペプチドはRink amide樹脂を用いたFmoc固相法にて合成した。なお、精製はSephadex G-50を用いたゲルろ過クロマトグラフィーおよびYMC-Pack ODS-Aカラム(10 mm i.d.×250 mm, 5 μm, YMC Inc., Japan)を用いた高速液体クロマトグラフィーを用いて行った。

2.2 ボロン酸誘導体の合成

本研究で使用したボロン酸誘導体はRink amide樹脂を用いたFmoc固相法にてLysを出発アミノ酸として合成した。なお、精製はYMC-Pack ODS-Aカラム(10 mm i.d.×250 mm, 5 μm, YMC Inc., Japan)を用いた高速液体クロマトグラフィーを用いて行った。

2.3 リポソームの調製

本研究で調製したリポソームはいずれもEggPCを基本として混合脂質からなる。丸底フラスコ中で脂質混合物のクロロホルム溶液を調製し、溶媒留去により脂質薄膜を得た。その後、使用する緩衝液にて水和・懸濁後、凍結融解操作を施した。試料として用いる単層リポソームは上記の懸濁液をエクストルーダーにより100 nmにサイジングすることにより得た。

2.4 円二色性(CD)スペクトル測定

CDスペクトル測定はJASCO J-820分光計を使用して行った。すべての測定試料は10 mM Tris-HCl緩衝液に溶解したものを、セル長0.2 cmで測定を行った。

2.5 蛍光スペクトル測定

蛍光スペクトル測定はHITACHI F4500蛍光分光光度計を使用して行った。すべての測定試料は10 mM Tris-HCl緩衝液に溶解したものを、セル長1 cmで測定を行った。

2.6 動的光散乱(DLS)測定

DLS測定によるリポソームサイズの評価はBeckman-Coulter N5 Plus(632.8 nm He-Ne レーザ

一)を使用して行った。

3. 結果と考察

3.1 pH 応答型 coiled coil ポリペプチドを用いた膜融合モデル系の設計

本研究においてわれわれは膜アンカーとしてC-末端に stearyl 基を、そして標的膜への融合因子としてN-末端に Trp 残基を有するポリペプチド W-IZ-E3-St を設計・合成した(Fig. 1)。モデル設計の基礎となる IZ は a,d 位に配した Ile 残基のジッパー効果により安定な疎水コアを形成し、三本鎖 coiled coil 構造をもたらすことが知られている⁸⁾。本検討で用いた W-IZ-E3-St は 2a,3a,4a 位の Ile を Glu に置換したものである。この置換により、中性条件においては Glu 側鎖の負電荷により疎水コアを崩壊するが、酸性条件下で Glu 側鎖の解離が抑制されると疎水コア形成による三本鎖 coiled coil 構造への構造変化が予想される⁹⁾。

はじめに水溶液中における W-IZ-E3-St の pH 応答型構造変化を確認するために CD スペクトル測定を行った。その結果、pH 7.3 において W-IZ-E3-St はランダム構造であったが、pH 4.3 においてはヘリカル構造特有の 222 および 208 nm に負の極大を示すシグナルが観測された(Fig. 2)。また、人工膜融合系構築のために EggPC リポソーム膜へ導入した W-IZ-E3-St についても同様の CD 挙動が観測された。これらの結果は疎水コアに配した Glu 側鎖が pH 変化に伴うポリペプチドの構造変化を支配してことを示しており、W-IZ-E3-St は HA2 モデルとして有効であることがわかった。

pH 応答型膜融合挙動を検討するために標的膜に封入したカルセインの漏出実験を以下のように行った。W-IZ-E3-St 含有リポソームを自己消光濃度(75 mM)のカルセインを封入したり

	defgabc defgabc defgabc defgabc				
IZ	YGG	IEKKIEA	IEKKIEA	IEKKIEA	IEKKIEA
W-IZ-E3-St	W	---	---	---	GGK*
W ₁₃ -IZ-E3-St	W	---	---	---	GGK*

Only amino acids different from IZ sequence are indicated. Bar indicates the same amino acid as used in IZ. The heptad repeats are preceded by the YGG sequence for the peptide quantitation. K* indicates lysine incorporated with stearic acid at the side chain amino group.

Fig. 1 Amino acid sequences used for pH induced trimeric coiled coil. Only amino acids different from IZ sequence are indicated. Bar indicates the same amino acid as used in IZ. The heptad repeats are preceded by the YGG sequence for the peptide quantitation. K* indicates lysine incorporated with stearic acid at the side chain amino group.

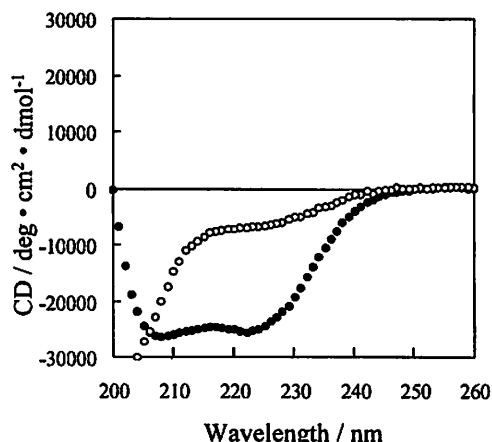


Fig. 2 Circular dichroism spectra IZ-E3-St peptide at pH 7.3 (open circles) and 4.3 (closed circles). The measurements were performed in 10 mM Citric acid / Phosphoric acid buffer containing 0.1 M NaCl at various pH conditions. The peptide concentrations were 40 μ M.

ポソームと混在させ、pH 7.3 および 4.3 の緩衝液中におけるカルセイン漏出の時間変化を蛍光発光スペクトルにより追跡した。膜融合に伴う膜界面の流動性増大は標的膜からのカルセイン漏出を促進させることから、外水相カルセインの 520 nm の蛍光強度変化を測定することで膜融合挙動を考察できる。Fig. 3 にはカルセイン漏出実験の結果を示した。コントロール実験としてポリペプチドを含まないリポソームを用いた系においては pH 変化におけるカルセイン蛍光強度の時間変化において大きな差は認められなかった。一方、W-IZ-E3-St 含有リポソームを用いた系では pH 4.3 において顕著な

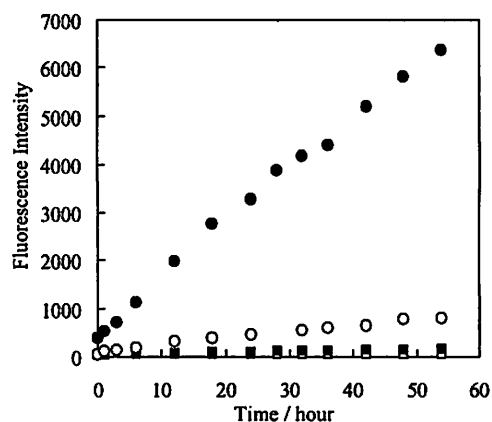


Fig. 3 Time course of the calcein release from EggPC liposome in the absence (squares) and presence (circles) of W-IZ-E3-St in 10 mM buffer solution at pH 7.3 (open symbols) and 4.3 (close symbols).

カルセイン漏出が観測された。この結果は pH 4.3 において三本鎖 coiled coil 構造に変化した W-IZ-E3-St が標的膜に対する融合促進に大きく寄与していることを示唆している。

また、膜融合に伴うリポソームのサイズ変化を動的散乱測定により追跡した。その結果、酸性条件で W-IZ-E3-St 含有リポソームを用いた系においてのみ、時間変化に伴う顕著なリポソームのサイズ変化が観測された。この結果は上記のカルセイン漏出実験に矛盾しないものである。さらに、標的膜として NBD および Rhodamine 標識リポソームを用いた膜融合挙動についての検討も行った。膜融合活性の評価は NBD と Rhodamine 間における FRET 効率により検討したが、本検討においても酸性条件下による W-IZ-E3-St の構造変化が膜融合に大きく寄与していることがわかった。なお、N-末端に疎水性配列を含む WI₃-IZ-E3-St を含有するリポソームを用いた系においてはより顕著な融合挙動が観測された。

3.2 水系における選択的分子認識を駆動力とした新規膜融合系構築

前項では生理水環境に近い系における pH 応答型 coiled coil ポリペプチドによるリポソーム膜融合促進系の構築を行ってきたが、明確な分子認識を駆動力としたモデルではないため、標的膜に対する選択性を考慮することができなかった。そこで、ボロン酸-cys-ジオールの選択的分子認識を駆動力とした膜融合促進系の構築を試みた。本研究では糖同様に環状 cys-ジオール構造を有するホスファチジルイノシトール(PI)を含むリポソームを標的とし、Fig. 4 に示すボロン酸誘導体を導入したリポソームを担体とした。

はじめに FRET 測定に基づく脂質混合実験によって膜融合挙動を検討した。すなわち、NBD および Rhodamine を標的ベシクルにそれぞれ 0.5 mol% 導入し、担体ベシクルを混合した際の NBD の蛍光強度変化(FRET 効率変化)をもとに脂質混合率(%)を見積り、膜融合の評価を行った。Fig. 5 には pH 10.5 および pH 7.5 にお

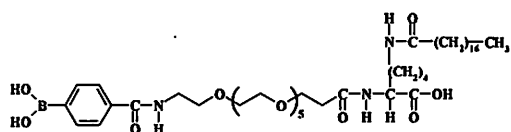


Fig. 4 Structure of the boronic acid derivative (BA-PEG5) with stearic acid moiety.

ける脂質混合実験の結果を示す。pH 10.5 で担体および標的ベシクルを混合した際の脂質混合率は混合直後から急激な増大を示し、15分後に約 32% となった。一方、pH 7.5 においては脂質混合率の顕著な変化は観測されなかった。

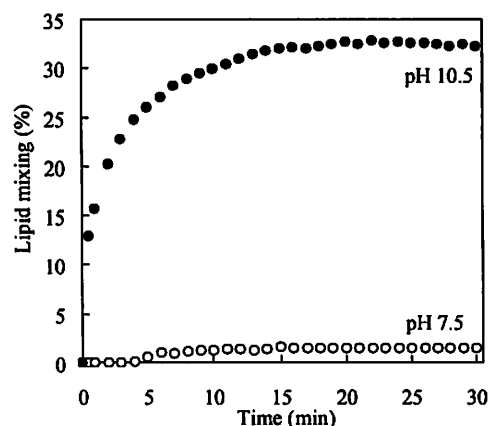


Fig. 5 pH dependence upon lipid mixing. The fluorophores containing target vesicles were mixed with the donor vesicles displaying BA-PEG5 at pH 10.5 (closed circle) and pH 7.5 (open circle). The measurements were performed in 10 mM sodium carbonate buffer (containing 100 mM NaCl, pH 10.5) or 10 mM tricine buffer (containing 100 mM NaCl, pH 7.5) at 30 °C.

また、ベシクル混合に伴う粒径の経時変化を追跡した。その結果、pH 10.5 においてのみ、急激なサイズの増加に引き続き、30分に渡り緩やかなサイズの減少を観測した。このDLSによるサイズ変化は脂質混合実験におけるFRET変化と同調しており、典型的な膜融合挙動を示すものである。

膜融合の際には担体-標的ベシクル間脂質混合に引き続き、空孔形成に伴う両ベシクルの内容物混合が起こる。そこで、脂質混合およびサイズ変化測定において顕著な結果が得られた塩基性条件下(pH 10.5)においてのみTb³⁺/DPA法による内容物混合に関する検討を行った。その結果、DLS測定および脂質混合実験とほぼ同じ時間スケールで内容物混合により生じるTb³⁺/DPA錯体の蛍光強度の増加が確認された(Fig. 6)。

以上、DLS測定、脂質混合実験、ベシクル内容物混合実験の結果から塩基性条件下においてBA-PEG5を導入した担体ベシクルはPIを導入した標的ベシクルに対し選択的に膜融合を引き起こすことがわかった。

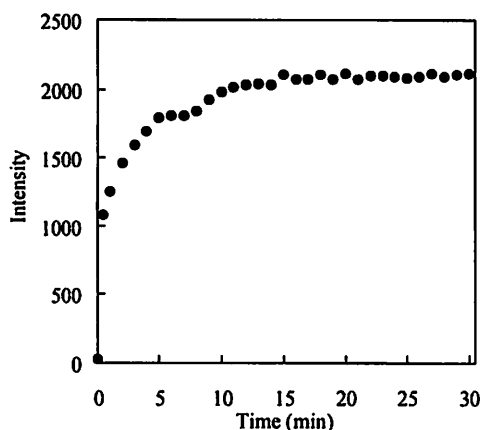


Fig. 6 Contents mixing assay. A population of donor vesicles composed of 5 mol% of BA-PEG5 in EggPC encapsulated DPA was added to an equal population of the target vesicles encapsulated Tb³⁺. The measurements were performed in 10 mM sodium carbonate buffer (containing 100 mM NaCl and 1 mM EDTA, pH 10.5) at 30 °C.

本研究における標的選択的膜融合系は担体側のボロン酸と標的側の *cys*-ジオール構造との分子認識を引き金に誘導される設計である。そこで、分子認識の膜融合挙動への寄与について検討するために、過剰量の *myo*-イノシトール存在下における担体ベシクルと標的ベシクルとの脂質混合実験を行った。その結果、脂質混合に起因する FRET 変化は抑制されたことから、本系において分子認識過程が重要な役割を果たしていることが示された。

4. 結言

本研究においてわれわれはインフルエンザ HA タンパク質により達成される pH 駆動型膜融合を模倣するために *de novo* 設計したポリペプチドを用いた新規モデル系について示した。設計した W-IZ-E3-St は酸性条件下で三本鎖 coiled coil 構造に変化することがきっかけで N-末端の Trp が表層に露出し、標的膜表面と相互作用すること膜融合を促進するものと考えられる¹⁰⁾。このように、pH 変化に応答して顕著な膜融合挙動を示すモデルポリペプチドはインフルエンザウィルス HA2 タンパク質領域と同様の機能を果たすものと期待され、ウィルス感染の機作についてモデル的検討に大きく貢献できるだけでなく、生理環境水下的における薬物や遺伝子などの細胞内導入への応用が期待される。さらに、本研究において実践した、標

的認識型膜融合系では水系においてボロン酸のイノシトール(環状 *cys*-ジオール構造)に対する選択的分子認識が引き金となり、接触および脂質混合の過程を経て達成されることが示された¹¹⁾。そして、現時点では塩基性条件に限定されるが、本系もまた細胞表面に存在する糖およびその類縁体を標的とした物質・情報伝達系の構築に大いに貢献できると考えられる。

これら、ポリペプチドを用いた膜融合モデル系ならびに分子認識駆動型膜融合系それぞれを組み合わせることにより、生理環境応答型の新規な系の構築へ展開可能となる。さらに、*in vivo* での実践が可能となれば医用利用を見据えた応用研究への発展が期待される。

5 参考文献

- 1) C. M. Carr, P. S. Kim, *Cell* **1993**, *73*, 823-832.
- 2) W. L. Lau, D. S. Ege, J. D. Lear, D. A. Hammer, W. F. DeGrado, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 272-284.
- 3) Y. Gong, Y. Luo, D. Bong, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14430-14431.
- 4) Y. Gong, M. Ma, Y. Luo, D. Bong, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6196-6205.
- 5) G. Stengel, R. Zahn, F. Höök, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9584-9585.
- 6) G. Stengel, L. Simonsson, R. A. Campbell, F. Höök, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 8264-8274.
- 7) Y. -H. M. Chan, B. van Lengerich, S. G. Boxer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 979-984.
- 8) K. Suzuki, H. Hiroaki, D. Kohda, T. Tanaka, *Protein Eng.* **1998**, *11*, 1051-1055.
- 9) K. Suzuki, T. Yamada, T. Tanaka, *Biochemistry* **1999**, *38*, 1751-1756.
- 10) A. Kashiwada, K. Matsuda, T. Mizuno and T. Tanaka, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7343-7350.
- 11) A. Kashiwada, M. Tsuboi, K. Matsuda, *Chem. Commun.* **2009**, 695-697.