

奨励金No.1515

## 細胞膜に作用する超分子の創製と機構解明

若林 里衣  
九州大学 准教授

### Fabrication of supramolecules interacting with cell membranes and mechanistic investigation

Rie Wakabayashi,  
Kyushu University, Associate Professor



本研究では、両親媒性ペプチドが自己組織化により形成する超分子を用い、超分子の物性が細胞への作用、すなわち接着や取り込みにもたらす影響を解明することを目的とした。相補的水素結合部位を持つ両親媒性ペプチドと蛍光小分子を共集合させ、かたちやサイズの異なる超分子を複数種類形成し、がん細胞への作用を評価した。結果、超分子形成および超分子のサイズに依存した細胞内移行性の向上が確認され、細胞膜への親和性と透過性が影響している可能性が示唆された。

In this study, supramolecules formed by self-assembled peptide amphiphiles were used to investigate the influence of the physical properties of materials on their impact on cells, i.e., contactability and internalization. Peptide amphiphiles and fluorescent small molecules bearing complementary hydrogen-bonding units were co-assembled to form several types of supramolecules of different shapes and sizes. Supramolecular formation enhanced the intracellular delivery of these supramolecules to cancer cells in a size-dependent manner, suggesting the influence of the affinity and permeability to cell membranes.

## 1. 研究内容

### 1.1 研究目的

生体内外で細胞は、様々な種類の材料に接し、接着や取り込みを行い、それに付随する応答を示す。このような材料の細胞への作用は、材料表面に導入したりガンド分子への細胞膜受容体の結合といった特異的認識以外にも、材料のかたちやサイズ等の様々な物性が影響することが知られており、これらの影響を明らかにすることは医用材料開発における重要な課題である。本研究では、生体適合性やデザイン性から医用材料への応用が期待される両親媒性ペプチド (peptide amphiphiles, PAs) が水中で自己組織化することで形成する超分子を用い、超分子の物性を変化させた際の細胞への作用を解析した。

### 1.2 研究内容

#### 1.2.1 超分子の設計と物性評価

超分子の物性としてかたちとサイズに着目し、これを制御するために相補的相互作用による共集合化戦略を用いた。PAおよび蛍光小分子ニトロベンゾフラザン (NBD) に相補的な水素結合部位としてシアヌル酸 (Cya) とメラニン (Mel) 誘導体をそれぞれ導入した Cya-PA と Mel-NBD を合成した (図 1)。これらの分子は単独では明確な自己組織化を示さないが、両者を 1:1 のモル比で混合すると、相補的水素結合を起点として自己組織化した。また、Cya-PA に導入したアルキル基の数に応じて、数十ナノメートル程度の球状 ( $n=0$ )、数百ナノメートル程度の長さのロッド状 ( $n=1$ )、および数マイクロメートル以上の長さのファイバー

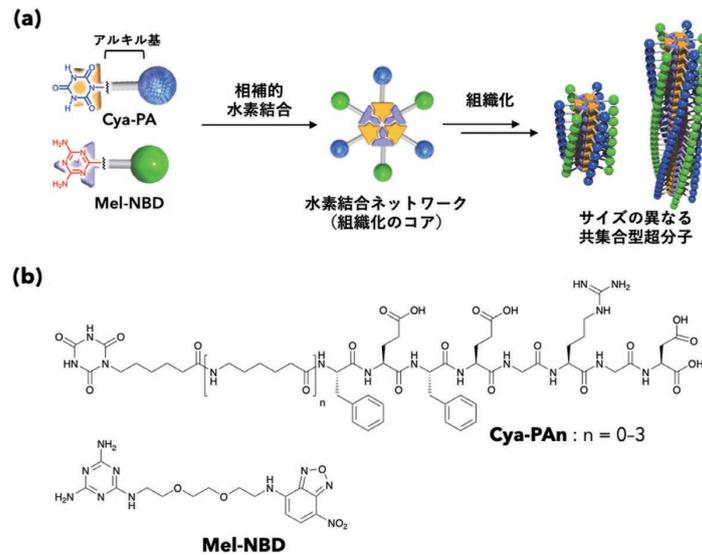


図1. 本研究で用いた共集合型超分子。(a) 超分子形成のスキーム図と (b) 用いた分子構造。

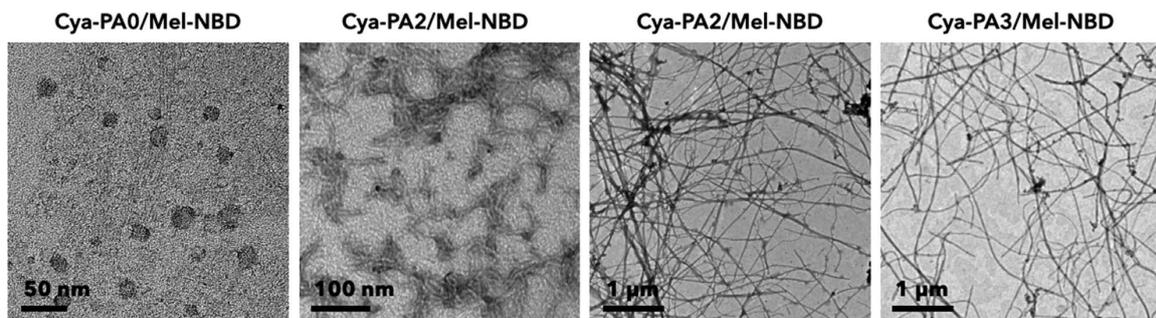


図2. 形成した超分子の電子顕微鏡写真。

状 ( $n=2, 3$ ) の超分子を形成した (図2)。このとき、アルキル基の数が多いものに関して、コアの相補的水素結合形成の他、ペプチドのアミド基間の水素結合が形成されていることを確認し、これらが協同的に働くことで次元方向の組織化が促進されていることがわかった。以上のように、共集合を用いることで、アルキル基の数という比較的シンプルな違いで超分子のかたちとサイズを段階的に制御可能であることが示された。

### 1.2.2 超分子の細胞への作用評価

超分子を子宮頸がん由来細胞である HeLa 細胞に添加した際の作用について、NBD 由来の緑色蛍光を用いて評価を行った。蛍光顕微鏡観察より、Mel-NBD 単独を作用させた場合にも細胞内に緑色

蛍光が観察されたが、Cya-PA との共集合体 Cya-PA/Mel-NBD を作用させた場合には、細胞内に強い緑色蛍光が観察され、超分子形成により細胞内移行性が向上することが示唆された。一細胞あたりの蛍光量をフローサイトメトリを用いて定量すると、Mel-NBD 単独と比較して、超分子を作用させた細胞では 2-5 倍程度蛍光強度が高いことが明らかになった (図3a)。蛍光強度は超分子の種類に依存し、球状あるいはロッド状の Cya-PA0/Mel-NBD および Cya-PA1/Mel-NBD で高く、ファイバー状の Cya-PA2/Mel-NBD と Cya-PA3/Mel-NBD では低くなり、超分子のかたちやサイズが細胞内移行性に影響を与えることが示唆された。

超分子の細胞内移行のメカニズムを解析するため、エンドサイトーシス阻害実験を行った。通常、

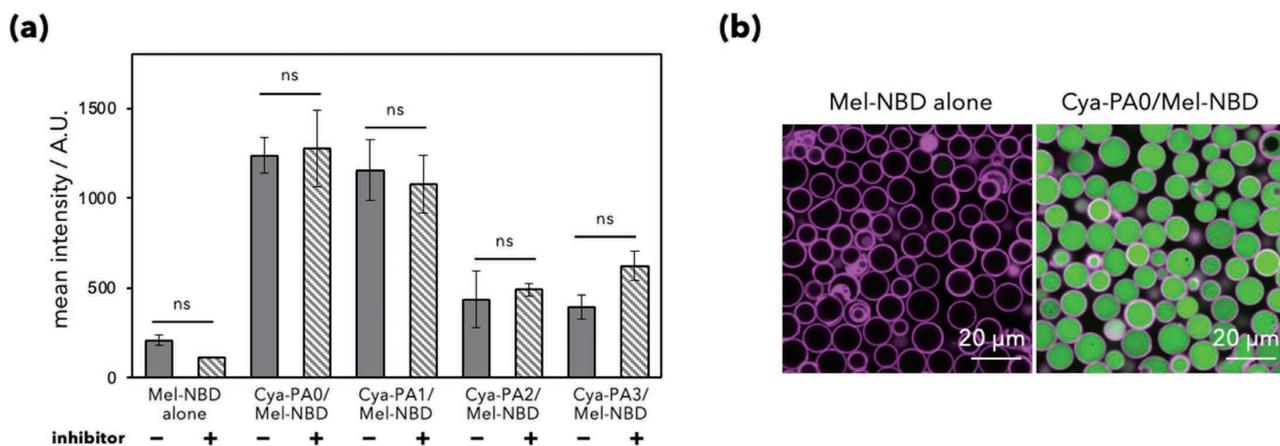


図3. 共集合型超分子の細胞および膜への作用。(a) 細胞内取り込みの定量評価。N = 3, mean ± SD, ns: not significant。(b) シリカ粒子担持リポソーム膜を用いた膜透過性評価。Green: NBD、Magenta: リポソーム膜を染色した DiD 色素。

(ナノ)材料はエンドサイトーシスと呼ばれる小胞形成を介した能動輸送により細胞内へ取り込まれる。これはエネルギー依存的な経路であるため、エネルギー枯渇条件下での細胞内移行性を評価したところ、エネルギー供給条件と同等の移行性を示した(図3a、inhibitor+条件)。つまり、本超分子はエネルギー非依存的な受動経路、すなわち細胞膜を直接透過する経路で細胞内に移行していることが示唆された。この結果は、リアルタイム観察により、超分子の細胞内移行が速やかに生じることとも矛盾しない。また、細胞内移行後は、ミトコンドリアや小胞体といった膜成分を持つオルガネラに局在することも確かめられた。

### 1.2.3 超分子の膜への作用評価

前項の結果は、本研究で用いている超分子が膜透過性を持つことを示唆している。この性質が生体膜に限定されたものなのかを確かめるため、人工膜であるリポソームを用いた評価を行った。本研究では、マイクロメートルサイズのシリカ粒子に担持させたりポソーム膜を評価に用いた。Mel-NBD 単独ではリポソーム膜で被覆されたシリカ粒子は緑色蛍光を示さなかったが、Cya-PA/Mel-NBD 超分子を作用させるとシリカ粒子が強い緑色蛍光を示し、リポソーム膜を透過し超分子がシリ

カ粒子へ到達したことが示された(図3b)。このときの蛍光強度は、細胞に作用させたときと同様に超分子の種類に応じて変化し、サイズの小さな球状である Cya-PA0/Mel-NBD で高く、サイズとともに減少し、Cya-PA3/Mel-NBD で一番低くなった。つまり、本超分子の膜透過性は生体膜に限らず、脂質膜に対して持つ性質であることが示唆された。膜に対する親和性を評価すると、Cya-PA や Mel-NBD 単独と比較して超分子において高い親和性を示したが、透過性とは逆に、サイズの大きな超分子が高い親和性を示したことから、膜への親和性とサイズのバランスによって膜透過性を示すことが示唆された。

### 1.3 まとめ

本研究では、相補的な相互作用を組織化の起点として用いた共集合型超分子の設計と細胞への作用評価を行った。二種類の分子を混合した際のみ超分子が形成される特徴を利用し、超分子形成、および超分子のかたちやサイズの違いに応じた細胞への作用についての解析を行うことができた。本超分子は脂質膜透過性を示すという特徴を持ち、エネルギー非依存的に細胞内移行することが示された。

## 2. 発表（研究成果の発表）

### 学会誌における発表

若林里衣、両親媒性ペプチドを構成要素として用いた共集合型超分子の創製と細胞内移行、Drug Delivery System, Vol. 38, No. 1, 80–81 (2023).

### 学会等における発表

（依頼講演）Rie Wakabayashi, “Supramolecular architectures based on peptides and their interaction with cells”, International Mini-Symposium on Peptide Design and Functional Extension (Kyoto University, 2023).

（依頼講演）Rie Wakabayashi, “Design and interfacial functions of hybrid supramolecules based on peptide amphiphiles”, IPR & iCeMS Joint Seminar, Biological Chemistry on Membranes – Understanding and Engineering- (Kyoto University, 2023).