

57. 膜透過性を示す超分子の構造因子の解明

九州大学大学院工学研究院応用化学部門 准教授 若林 里衣

概要

標的細胞への物質の取り込みは、ドラッグデリバリーシステムにおいて重要な過程の一つであり、細胞膜を直接介した非エンドサイトーシス経路による取り込みが、高効率な物質輸送を可能にするものとして注目を集めている。本研究は、分子の設計で多様な構造を形成できる超分子を用いて、様々な構造改変を行うことで、膜透過性を示すために重要となる材料の構造因子および内在化のメカニズムを明らかにし、細胞膜を標的としたドラッグデリバリーシステムの開拓につなげることを目的とした。特にサイズ、分子配列、および動的性質に着目した超分子設計を行い、異種分子の交互配列やサイズが非エンドサイトーシスによる内在化を可能にする重要な因子であることを示唆する結果を得た。

背景および目的

生体内で細胞は、様々な物質に接し、接着や取り込み、それに付随する細胞内応答を示す。中でも細胞への物質の取り込みは、細胞が生存する上で必要な栄養素を取り入れ、恒常性を保つために持つ生化学的機能であるが、特定の部位・細胞に人為的に医薬品やプローブ分子等を導入するためのドラッグデリバリーシステム (DDS) においても重要な過程の一つであり、いかに標的細胞に対して高効率に分子・材料を内在化させるかの戦略が必要となる。細胞の取り込み経路は、小胞形成を経るエンドサイトーシス経路と、細胞膜を直接介する非エンドサイトーシス経路の二つに大別される[1]。このうちエンドサイトーシス経路は細胞取り込みの主要な経路として知られ、これまで DDS 材料として報告されてきた材料の多くは、この経路を辿る。しかし、エンドサイトーシス経路で輸送された物質を細胞質に運搬されるためには、小胞からの脱出が必要である。これに対し非エンドサイトーシス経路は、直接細胞膜を介して細胞内へ取り込む経路であり、高効率な内在化が可能である。しかしながら、元来、細胞膜は細胞の恒常性を保つためのバリア機能を担っていることから、細胞膜を直接透過する際に一時的、部分的に膜構造が破壊されることで、細胞傷害性を示す可能性があることが課題である。また、この経路で取り込まれる物質は、細胞透過性ペプチドや両親媒性分子等、一部の分子や材料に限定されている。

以上の背景から、細胞傷害性を示さず、非エンドサイトーシス経路で細胞内に取り込まれる材料を設計できれば、標的細胞に高効率に薬物やイメージング分子を送達可能な、治療や診断に役立つ DDS 材料開発に繋がると考え、本研究では、細胞膜に直接作用し透過する材料の設計指針を得ること、および内在化のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

方法

材料を創る基盤分子として、両親媒性ペプチド (Peptide Amphiphile; PA) を構造基体とした超分子の利用を提案した。超分子は、複数の分子が分子間相互作用により自己組織化することで形成される。分子の設計で多様な構造を形成できる点、リガンドとなるペプチド配列を容易に導入できる点から、本研究で材料設計指針を得るのに適していると考えた。材料設計のパラメータとして、サイズ、分子配列、動的性質に着目し、それぞれ、PA の

疎水性基、相補的相互作用ユニット、水素結合形成基による制御を試みた。Fmoc 固相合成法により PA を合成、精製し、各種緩衝液中における自己組織化挙動を分光学的手法、顕微鏡観察により解析した。細胞への作用については、蛍光修飾を行った PA 超分子を用いて、子宮頸がん細胞 HeLa 細胞や樹状細胞 DC2.4 細胞への内在化効率および局在をそれぞれフローサイトメトリーと蛍光顕微鏡観察により評価した。また、阻害剤存在下で同様の実験を行うことで、内在化経路を評価した。

結果および考察

まずサイズと分子配列の影響を調べることを目的として、相補的相互作用ユニットとしてシアヌル酸誘導体 (Cya) とメラミン誘導体 (Mel) を PA と緑色蛍光分子 NBD に導入した Cya-PA と Mel-NBD を合成した [2]。Cya と Mel 間の相補的相互作用により Cya-PA と Mel-NBD が交互に配置した超分子を形成することを期待した。また、Cya-PA のペプチドと Cya の間に導入したアルキル基の数を変更し (Cya-PAn, $n = 0-3$)、超分子のサイズ制御を試みた。Cya-PA と Mel-NBD はいずれも単独では特定の構造体を形成しないが、両者を 1:1 のモル比で混合すると Cya と Mel 間の相補的相互作用により組織化し、超分子が形成された。さらに、アルキル基の数に従いサイズが変化し、数十 nm 程度のナノ粒子状から数百 nm 程度のロッド状、マイクロメートル以上の長さのファイバー状の超分子の形成が確認され、アルキル基の数に応じて長軸方向の成長に差異が生じ、サイズの制御につながる事が示唆された [3]。

続いて超分子の細胞内移行性に関して、HeLa 細胞を用いて評価した。HeLa 細胞に各超分子を作用させた結果、サイズの小さなナノ粒子やロッド状超分子が高い細胞内移行性を示すことが確認された。エンドサイトーシス経路を阻害した際に超分子の細胞内取り込みが全く阻害されず、これらすべての超分子が非エンドサイトーシス経路で細胞内に取り込まれていることが示された。超分子の膜透過性について、人工二分子膜であるリポソームを用いた評価を行った。細胞サイズの多孔質シリカ粒子をリン脂質 DOPC で被覆した DOPC 被覆シリカ粒子に超分子を作用させると、シリカ粒子内部から NBD 由来の緑色蛍光が検出され、超分子が脂質膜を透過することが確認された。Mel-NBD 単独では殆ど蛍光が検出されないことから、Cya-PA と Mel-NBD の異種分子からなる超分子形成が膜の透過性の発現に必須であることが示唆された。

最後に、超分子の動的性質の影響を調べるため、疎水性置換基とペプチド鎖の間の水素結合性置換基を改変した単独分子からなる超分子を調製し、DC2.4 細胞への作用を解析した。水素結合性置換基間の水素結合の強さと超分子の動的性質、細胞内移行性には相関関係があり、強い水素結合を形成する置換基を導入した場合に、超分子のダイナミクスが低下し、細胞内移行性が向上することが確認された。しかしながら、細胞内移行経路はいずれもエンドサイトーシス経路であった。

以上から、異種分子からなる超分子が脂質膜透過性を発現し、非エンドサイトーシス経路で細胞内に移行すること、サイズの小さな超分子が高い細胞内移行性を示すことが確認できた。非エンドサイトーシス経路を辿る材料の物性として、異種分子の交互配列やサイズが重要な因子であることが示唆された。

(完)

発表論文

- 1) Ayato Higuchi, Rie Wakabayashi, Izuru Kawamura, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, Influence of self-assembling nonsubstrates on the enzymatic postmodification of peptide supramolecules, Chem. Lett., 2025, upae241.
- 2) Ayato Higuchi, Arka Som, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, Noriho Kamiya, Pol Besenius, The Impact of Single Amino Acid Insertion on the Supramolecular Assembly Pathway of Aromatic Peptide Amphiphiles, Chem. Eur. J., 2025, e202404233.

引用文献

- 1) W. He, X. Xing, X. Wang, D. Wu, W. Wu, J. Guo, S. Mitragotri, *Adv. Funct. Mater.*, 30, 1910566 (2020)
- 2) Rie Wakabayashi, Hiroki Obayashi, Ryuichiro Hashimoto, Noriho Kamiya, Masahiro Goto, *Chem. Commun.*, 55, 6997–7000 (2019)
- 3) Hiroki Obayashi, Rie Wakabayashi, Noriho Kamiya, Masahiro Goto, *Chem. Commun.*, 59, 414–417 (2023).