

脂質-オレオシン非対称膜小胞内膜上における外部刺激応答型の多酵素複合体形成機構の構築

群馬大学大学院理工学府理工学専攻物質・生命理工学領域

博士後期課程1年(助成時)

博士後期課程2年(現在)

馬場 康太郎

研究背景と目的

リポソームや生体分子(膜タンパク質など)を用いて外部刺激を内部に伝達し、自身が設計したエネルギー代謝などの酵素反応系を任意のタイミングで起動させる人工細胞の構築に向けた研究が盛んに行われている。しかし、細胞内では酵素などの生体高分子が高濃度(300-400 g/L)で密集して存在することにより効率的な酵素カスケード反応を実現しているのに対し、人工小胞系では、生細胞のような高濃度の生体高分子の封入が困難である。そこで我々の研究室では、新しい細胞模倣モデルとして外層がリン脂質、内層が両親媒性タンパク質オレオシンから構成される脂質-オレオシン非対称膜小胞を報告した(M. Suzuki and K. Kamiya, *iScience*, 2023)。内層を構成するオレオシンは2つの末端にそれぞれ親水性領域をもつU字型のタンパク質であり、遺伝子組換えなどによる構造・性質改変が容易であるという利点をもつ。近年、DNA やタンパク質を足場とした酵素並列による触媒効率の上昇が報告されている。したがって、オレオシンに対して結合性タンパク質などを介して酵素タンパク質を集積させることで、小胞内膜上における高効率酵素反応のための局所的な酵素近接状態の再現が可能となる。また、物理的・化学的な外部刺激を伝達する膜タンパク質として大腸菌由来の機械刺激依存性チャネル MscL がある。MscL は 10 kDa 以下の分子を透過する大きな孔(直径 3 nm)をもち、浸透圧による膜張力変化によりポアを開口する。加えて、乳がんなどで過剰発現される分泌型ホスホリパーゼ A2 (sPLA2) によるリポソーム膜上での非対称なリゾリン脂質産生は、膜側圧変化を生じさせて MscL を活性化することが報告されており、MscL は疾病診断・治療におけるバイオセンサやドラッグデリバリーへの応用が期待される。私はこれまでに、脂質-オレオシン非対称膜小胞における脂質層へのリゾリン脂質挿入による MscL の機能化を報告した(K. Baba and K. Kamiya, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2024)。そこで本研究では、結合性タンパク質を融合したオレオシンを用いた脂質-オレオシン非対称膜小胞に、がん細胞由来の生体分子存在下で起動する人工遺伝子回路を封入することで、sPLA2 で活性化した MscL による生体分子流入を起点として、薬剤産生のための酵素群の発現および小胞内層上への集積制御機構の構築を目指す(図1)。

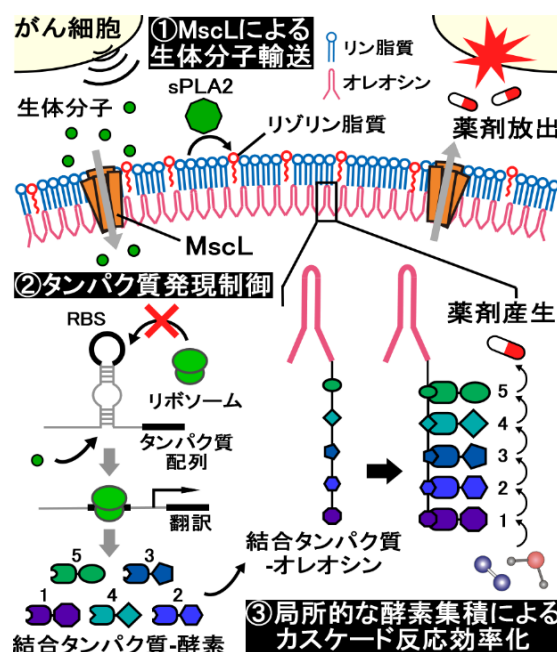


図1. 本研究の概念図

実施内容

小胞膜上への酵素などの生体高分子の融合は、かさ高さにより湾曲や流動性などの膜状態の変化をもたらすと考えられる。MscL は局所的な膜曲率の変化による活性化も報告されており、したがって、オレオシンへの結合性タンパク質および酵素の付加は膜透過性や MscL 機能に影響を及ぼすことが予測される。また、MscL は活性化のために、正電荷アミノ酸領域を介して細胞膜やリポソーム膜に存在する負電荷リン脂質との静電相互作用を要することが報告されている (A. M. Powl et al., *Biochemistry*, 2008)。私はこれまでに、負電荷脂質を含まない脂質-オレオシン非対称膜小胞における MscL の活性化に成功した。そこで、オレオシンの親水性領域がもつ負電荷アミノ酸の寄与による MscL の活性化として仮説を立て(図2)、荷電アミノ酸変異による MscL の機能制御が可能であると考えた。そこで今回は、上記システムの構築に向けた前段階として、(1) 異種タンパク質融合オレオシンを内膜に含む小胞におけるナノポア膜タンパク質の機能基盤としての膜透過性検証、および(2) オレオシンの親水性領域の荷電アミノ酸変異による MscL の機能向上に取り組んだ。

研究成果

(1) オレオシンの N 末端親水性部に蛍光タンパク質 sfCherry を融合した sfCherry-oleosin を用いて、外層がリン脂質 DOPC、内層が DOPC と sfCherry-oleosin の混合膜から構成される非対称膜小胞を作製した。小胞の外液に蛍光小分子カルセインを添加し、共焦点レーザー顕微鏡観察および ImageJ による小胞内のカルセイン蛍光強度の測定を行うことで、小胞内層上への異種タンパク質融合による膜透過性を評価した。その結果、膜上に sfCherry 蛍光を有する小胞の 19% (8/42) がカルセインの膜透過性を示したのに対し、sfCherry-oleosin の代わりに oleosin を使用した小胞では膜透過性は観察されなかった。したがって、小胞内膜上に異種タンパク質が集積することでナノポア膜タンパク質を介さない小胞内外の物質輸送が生じることが示された。このことから、結合性タンパク質を融合したオレオシンを用いた脂質-オレオシン非対称膜小胞において MscL による外部刺激応答性の物質輸送を実現するためには、小胞内膜上への異種タンパク質の集積量の改善が今後の課題であると結論付ける。

(2) これまでに使用しているオレオシンの両末端親水性領域は、荷電アミノ酸により -1 の総電荷をもつ (以下 Original)。そこで、遺伝子組換えにより両末端親水性領域の荷電アミノ酸が負電荷のみ (Both Negatively、以下 BN) あるいは正電荷のみ (Both Positively、以下 BP) のオレオシン変異体を作製した。それぞれが単独で内膜を構成する脂質-オレオシン非対称膜小胞に MscL を挿入し、外液にカルセインと LysoPC を添加することで、MscL を介した小胞内へのカルセイン流入観察を行った。その結果、BN では Original と比較してカルセイン流入小胞数の大幅な増加が観察され、一方で BP ではほとんど観察されなかった。したがって、これらの結果からオレオシンの親水性領域の負電荷アミノ酸改変による MscL の機能向上に成功した。

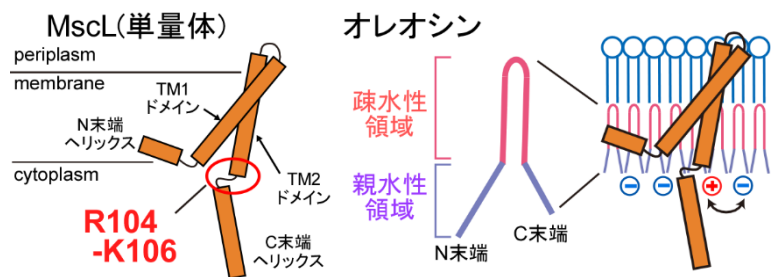


図2. 脂質-オレオシン小胞上の MscL 活性化の考察