

# 研究終了報告書

## 「(研究課題名)」

研究期間: 2019年10月~2023年3月

研究者: 佐藤 雄介

### 1. 研究のねらい

直径 50-150 nm のエクソソームは細胞の恒常性維持やガンなどの疾患発症など多様な生命現象に深く関与しており、従来の生命現象の理解を補完する新たなプレイヤーとして、また疾患診断におけるリソースとして注目されている。エクソソームは親細胞の種類や状態（正常、ガン化）に依存した固有の表面特性（膜タンパク質、脂質割合、サイズ）を持っており、これが多様な生命科学機能発現の源となっている。エクソソームが絡む生命現象の本質を理解し、これに基づいた医薬応用を進めていく上で、個々のエクソソーム性質を精密解析しうる分析技術が必要不可欠である。

現在行われているエクソソーム性質解析では、表面の膜タンパク質に対する抗体を活用するイムノアッセイが広く用いられている。しかし、エクソソームが極めて多様な表面特性を持つこと、さらに個々のエクソソームに対してそれを特徴付けるマーカーを一つ一つ開発することが極めて困難なことを考えると、現行法の有用性は限定的であると言わざるを得ない。また、本手法では化学的に不安定な抗体を複数利用する点、またアッセイが数時間以上かかる点は体液中エクソソームの解析に基づく非侵襲的な診断の実現に向けて、改良すべき課題である。

こうした現状に対して、本研究ではエクソソーム全般に共通する高曲率性脂質膜という構造的特徴を捉える分子プローブを新たに設計・合成し、あらゆる種類のエクソソーム解析に適用可能であり、その性質を簡便かつ迅速に精密解析する分析技術の創出を目的とした。具体的には高曲率性膜において特異的に発現する脂質パッキング欠損を結合反応場とする両親媒性 $\alpha$ -helix (Amphipathic  $\alpha$ -Helix: AH) ペプチドをベースとして、その末端に環境感受性色素を連結したプローブを開発し、その結合反応に伴う蛍光応答に基づくエクソソーム解析技術を開拓することを目指した。本研究では AH ペプチド型蛍光プローブを用いるエクソソーム検出法の基礎と有用性を実証するとともに、複数の蛍光プローブを用いたエクソソーム性質解析法の確立を目指し、研究を遂行した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では大きく分けると(1)エクソソームの脂質膜を標的としたプローブ開発、(2)プローブ併用に基づくエクソソーム性質解析という2つの項目に関して研究を進めた。

(1)に関して、高曲率性脂質膜に対して選択的な結合能を有する両親媒性 $\alpha$ -helix(AH)ペプチド(Apolipoprotein A-IのC末端22残基: ApoC)に対して疎水性が高い環境感受性蛍光色素 Nile Red(NR)が優れた結合力・結合選択性(vs.低曲率性脂質膜)ならびに高い蛍光応答能を示すことを見出し、これを用いた簡便かつ迅速なエクソソーム蛍光検出法を提

案した。開発した ApoC-NR（第一世代プローブ）の機能評価研究で得られた知見を活かして、AH ペプチド配列スクリーニングおよび、ApoC への分子内架橋により $\alpha$ -helix 構造事前組織化に基づく体系的なプローブ評価により構造-機能相関を明らかにすることができた。さらに蛍光部位の検討により、長鎖アルキル鎖を連結したシアニン色素を連結することで、自己会合-解離メカニズムに基づく高感度エクソソーム検出プローブの開発（第二世代プローブ）に成功した。

(2)に関して、第一世代プローブ設計指針に基づき開発した2種類の蛍光プローブを併用し、これらの結合に伴う蛍光変化を解析することで、異なる親細胞から得られたエクソソームを明瞭に識別することに成功した。また、AH ペプチドをエクソソーム捕捉剤として用いるサブクラス分離法やエクソソームと類似した構造的特徴を有する生体関連粒子解析など、新たな研究展開・応用の可能性を見出すことができた。

## (2)詳細

研究テーマ「エクソソームの脂質膜を標的としたプローブ開発」

直径 100 nm 程度のエクソソームでは表面の脂質膜が高曲率性であり、これがエクソソーム全般に共通する構造であることに着目し、高曲率性脂質膜を結合反応場とする蛍光応答性プローブの開発を試みた。高曲率性脂質膜選択的な結合能がある ApoC ペプチド(PVLES FKVSF LSALE EYTKK LN)をエクソソーム脂質膜結合性部位として選択し、その末端に脂質膜に近接・分配されることで蛍光強度が増加する NR を連結したプローブを合成し、リポソームに対するプローブ機能を評価した結果、リポソームの直径すなわち脂質膜の曲率が高いほど高い結合能と大きな発蛍光応答を示すことを見出した(図 1)。

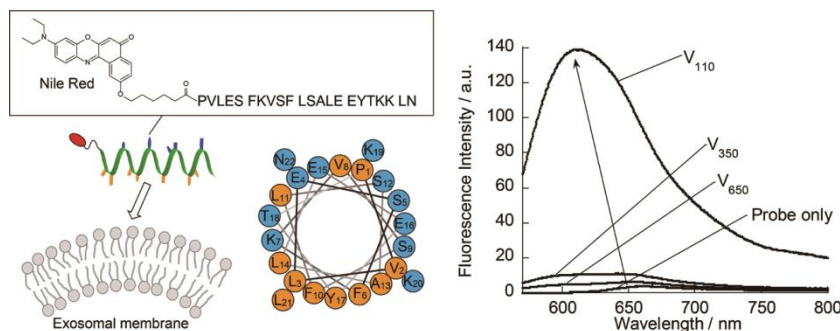


図 1 (左) ApoC-NR によるエクソソーム脂質膜結合に基づくエクソソーム検出の概念図. (右) ApoC-NR のリポソームサイズ(直径 110 nm ( $V_{110}$ ), 350 nm ( $V_{350}$ ), 650 nm ( $V_{650}$ ))に依存した発蛍光応答

リポソーム組成変化および分光学的解析から、ApoC-NR は高曲率性膜表面に特異的に現れる脂質パッキング欠損という局所的な構造に選択的に結合することが分かった。加えて、本プローブは先行研究で開発されたカチオン性ペプチドをベースとする高曲率性膜結合性プローブと比較して、極めて高い曲率感知能を有することが分かり、AH ペプチドがエクソソーム検出プローブにおける有用な結合素子であることを明らかにした。ApoC-NR を用いて、K562 細胞由来エクソソーム検出に適用した結果、本法は既往法(ELISA)に匹敵する検出感度( $\sim 10^5$  個

( $\mu\text{L}$ )を持つことが分かった。本法では解析対象となるエクソソームに加えるだけで迅速に(5分以内)検出できる点に加えて、異なる親細胞(BPH-1, U87MG, A549)から回収したエクソソームに対しても同程度の検出感度を示すことから、表面タンパク質プロファイルに依存しない汎用的な検出が可能であることを実証した。

ApoC-NR 機能評価において ApoC 部位が脂質パッキング欠損結合において $\alpha$ -helix 構造形成を伴うことが分かったため、ペプチド側鎖間で分子内架橋による $\alpha$ -helix 構造事前組織化を試み、これによるプローブ結合能向上を目指した。異なる架橋位置を架橋した一連のペプチド構造を用いた検討の結果、ApoC 中央および C 末端領域を架橋することで、高曲率性膜に対する結合能が 2 倍以上も強化できることを見出した。この結果は、 $\alpha$ -helix 構造事前組織化が AH ペプチドプローブの機能向上に有用であることを示唆するものである。また様々な AH ペプチド配列を用いたスクリーニングの結果、プローブの結合能および蛍光応答能はペプチド配列に大きく影響を受けることを見出した。ここでは脂質パッキング欠損へのペプチド結合深度が異なることで、結合容量が大きくなる配列を見出すなど、ペプチド配列-結合能相関における興味深い知見が得られた。

次に、蛍光応答部位の検討を進め、長鎖アルキル鎖(C12)を連結したシアニン色素を活用することで、エクソソーム検出感度が飛躍的に向上することを見出した。詳細な結合反応解析の結果、プローブが自己会合-解消に

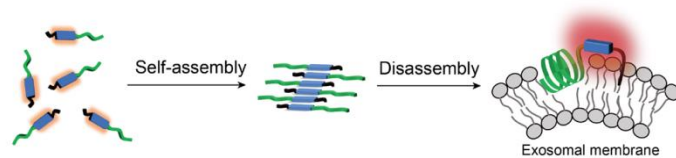


図 2. 自己会合-解消に基づくエクソソーム検出プローブの開発

基づく特徴的な蛍光センシング機能を示すことに起因するが分かった(図 2)。これはエクソソーム脂質膜を狙った分子プローブとして世界で初めての例であり、高感度エクソソーム検出を実現する上で有用なプローブ設計方法論となると期待できる。

#### 研究テーマ「蛍光プローブの併用にに基づくエクソソーム性質解析」

AH ペプチドに疎水場応答性色素を連結したプローブを複数活用し、得られる多様な蛍光応答に基づくエクソソーム性質解析を試みた。AH ペプチドとして先述した ApoC、ならびに ApoC とは異なる特性(疎水面・総電荷数)を持つペプチド配列を選定した。これら 2 種類のペプチドに対して、その N 末端に疎水場感受性色素である NBD もしくは NR を連結した、計 4 種類のプローブを合成し、NBD プローブおよび NR プローブを併用した。本実験ではエクソソーム種類識別のために、4 種類の異なる培養細胞に起因するエクソソームを用いた。その結果、NBD プローブおよび NR プローブの蛍光応答がエクソソームの種類に依存して異なる蛍光応答を示し、その蛍光応答がプローブのペプチド配列にも大きく影響されることを見出した。さらに、このうち、特定の 2 種類のペアを用いることで、エクソソーム種類を明瞭に識別できることが分かった。これは各プローブの結合反応および蛍光応答に加えて、NBD プローブ/NR プローブ間の FRET 応答が反映されたものであると考えられる。

#### 研究テーマ「AH ペプチドを用いた分析技術の応用」

ApoC が優れた高曲率性脂質膜結合性分子として機能することから、ApoC をエクソソーム捕

捉剤として活用するエクソソーム分離を試みた。ApoC を連結した磁性ビーズを用いた分離系を構築し、その分離能を評価した結果、小サイズの集団を選択的に回収できることを見出した。またこの分離法では共存するタンパク質の影響を受けず、回収されたエクソソームには ApoC ペプチドが残存しないことが分かり、特定の性質を持つエクソソーム集団を獲得できる技術として有用であることが分かった。さらに、本分離法により回収された集団は、未分離のものと比較して高い生物活性を有するという興味深い結果を得た。本技術は異なる特性を持つ集団から構成される不均一なエクソソームから、生物活性の高い集団を回収する方法論となりうると期待できる。また、ApoC をイムノアッセイにおける検出プローブとして活用する検出系を構築した。ここでは、抗体と比べて高い結合容量を持つことに起因し、優れた検出感度を示すことを実証した。

近年の COVID-19 に対する感染対策として開発された mRNA ワクチンがエクソソームと同程度のサイズ(脂質膜曲率)を有することに着目し、ApoC-NR を基盤とした蛍光プローブを用いて mRNA ワクチン評価に応用した。mRNA ワクチンを模倣したモデル系(一本鎖 RNA 内包型脂質ナノ粒子)を用いた結果、蛍光プローブが脂質ナノ粒子の品質劣化に伴う脂質膜特性変化を精密に検知できることが分かり、mRNA ワクチン品質管理法に展開できる可能性を見出した。

### 3. 今後の展開

本さきがけ研究により、脂質パッキング欠損を標的とする AH ペプチドを基盤とした蛍光プローブを創製し、これが汎用的なエクソソーム検出に有用であることを実証した。加えて、このような新しいタイプの蛍光プローブを用いることで、脂質膜特性の違いに基づくエクソソーム種類識別が可能であることを見出した。本研究で得られた知見は 1 粒子レベルでの脂質膜特性解析など基礎研究のみならず体液中エクソソーム解析に基づく疾患診断などの応用研究にも適用しうる重要な技術基盤になると期待できる。

### 4. 自己評価

研究開始当初の大きな目標は脂質パッキング欠損を認識しうる AH ペプチドを基盤とした蛍光プローブを開発し(テーマ A)、分子構造改良によるプローブ機能向上・多様化(テーマ B)を経て、エクソソーム性質識別に適用(テーマ C)することであった。本研究において、テーマ A に関しては実際に ApoC 配列に NR を連結するシンプルな分子設計が有用であることを見出し、モデル系としてリポソームを用いた結合反応解明および培養細胞由来エクソソーム検出が実証できた点において、十分に目標を達成したと考えている。一方、テーマ B においては蛍光応答性部位の最適化において新たな蛍光センシング系を構築できたが、配列スクリーニングおよび事前組織化に基づくペプチド部位の機能向上に資する分子改良指針の確立にはまだハードルがあることも分かってきた。これにより、テーマ C においては、体液中エクソソーム解析など診断を見据えた応用研究まで進めなかった点は残念であるが、今後この研究で得た知見をもとに、実現を目指してきたいと考えている。

本研究の遂行に当たっては、適切な研究実施体制および研究費の執行ができたと考

えている。本研究を進めるうえで、ペプチド配列および蛍光色素などの機能性分子との連結を効率的に進めることが必須であったため、本「さきがけ」の支援がなければ、不可能であった。さらに、本研究で開発を進めてきた分子プローブは本研究目的の遂行のみならず、領域内の研究者との交流によって大きな応用・展開が進んできた。私自身が化学をベースとした分子設計・合成を専門としてきたため、これらがどのように生物学や医学・薬学に実際に役立つのか、そのためにどのような分子プローブが必要になるのか、について領域会議等での交流から学んで実行できた点は非常に有意義であったと考えている。本さきがけ研究で得られた知見やネットワークをベースとした共同研究も多数進めることができおり、将来的な科学イノベーションを見据えたシーズ創出というさきがけ研究の趣旨にかなった研究を十分に遂行できたと考えている。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:1件

1. Y. Sato, K. Kuwahara, K. Mogami, K. Takahashi, S. Nishizawa, “Amphipathic helical peptide-based fluorogenic probes for a marker-free analysis of exosomes based on membrane-curvature sensing”, RSC. Adv. (2020), 10, 38323-38327.

エクソソーム表面性質解析には表面タンパク質をマーカーとしてこれに対する抗体を用いたイムノアッセイが用いられているが、その検出機能は表面タンパク質プロファイルによるバイアスに大きく影響される。これに対して、本論文ではエクソソームの脂質膜を標的とした AH ペプチドを基盤とした新しいタイプの蛍光プローブを開発し、マーカーフリーで検出する分析技術を確立した。

### (2) 特許出願

研究期間全出願件数:1件(特許公開前のものも含む)

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 佐藤雄介, Amphipathic helical peptide-based fluorescent probes for exosomes by membrane curvature recognition, 第 58 回日本生物物理学会年会, 2020.9.17.
2. Yusuke Sato, Amphipathic helical peptide-based fluorescent probes for analysis of extracellular vesicles, Pittcon 2021, 2021.3.9.
3. 佐藤雄介, 細胞外微粒子の曲率に着目した分子プローブの設計と応用, 日本化学会第 102 春季年会, 2022.3.24.
4. 佐藤雄介, 蛍光プローブの結合反応に基づくエクソソーム性質解析, 第 95 回日本生化学会大会, 2022.11.10.
5. Yusuke Sato, Membrane curvature sensing by amphipathic helical peptide-based probes for the analysis of extracellular vesicles, Mechano-X BIO&CHEM, 2022.11.16.

## 受賞

1. 科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞, 2021 年 4 月.