

研究助成報告書（中間・終了）

No.1

整理番号	2023-J-068	報告者氏名	水野 稔久
------	------------	-------	-------

研究課題名

カプセル形成能を有する両親媒性蛋白質の開発と薬剤蛋白質に対する細胞膜透過キャリアとしての機能評価

＜代表研究者＞ 機関名：名古屋工業大学 職名：准教授 氏名：水野 稔久

＜共同研究者＞ 機関名：名古屋市立大学 職名：教授 氏名：井上 靖道
機関名：名古屋工業大学 職名：修士卒 氏名：高橋 孝介
機関名：名古屋工業大学 職名：修士卒 氏名：山崎 穂波
機関名：名古屋工業大学 職名：学部4年 氏名：梅元 雅

＜研究内容・成果等の要約＞

これまでに我々は、植物の種子中で油体（oil body）の分散安定化に寄与する天然の両親媒性蛋白質として知られるオレオシンを元に、選択的に安定な二分子膜カプセル形成を可能とする両親媒性蛋白質 OLE-ZIP の開発に成功し報告している (*Colloid and Interface Sci Comm.* (2019))。オレオシンは分子全体で two helix bundle 構造をとり、two helix bundle の片側表面が疎水性、もう片側表面が親水性を持つことで、全体として巨大な両親媒性分子として機能し、結果、生成確率は低いものの水中で二分子膜カプセルを生成可能と報告されていた (*PNAS* (2014))。我々はこの親水部の構造安定性が高くないことが、選択的な二分子膜カプセル形成に不利であると考え、ここを 90 °C 以上に加熱しても崩壊しない two helix bundle 蛋白質であるデノボニ本鎖 coiled coil 蛋白質に置き換えることで、高い選択性を持って二分子膜カプセルが形成可能であることを見出した。またこのカプセルは、GFP のような外来タンパク質を 1 カプセルあたり 100 分子以上安定に内包可能であり、細胞膜抗原に対する抗体を表面修飾することで、充填蛋白質の細胞質への送達と、これを細胞質で働くことにも成功した。すなわち、バイオ医薬品に対する新たな蛋白質性の膜輸送キャリアとして利用可能であることも明らかとした。しかしこの二分子膜カプセルを形成可能な両親媒性蛋白質が、オレオシン由来の特異な疎水部アミノ酸配列に依ることが危惧され、これは両親媒性蛋白質を用いた蛋白質カプセル構築原理の可能性を制限するものであった。そこで本研究では、ヒトの赤血球膜にある 1 本鎖型膜タンパク質であるグリコホリン、エンドサイトシス過程で細胞内側からエドソーム膜を支持するカベオリン 1 の膜貫通領域を疎水部に用いた両親媒性蛋白質 GP-ZIP、Cav1-ZIP を新たに設計し、OLE-ZIP の場合と同様に、安定な二分子膜カプセル形成が可能か、さらに抗体修飾を通してバイオ医薬品に対する細胞膜透過キャリアとして利用可能か検証を行った。

その結果、いずれの両親媒性蛋白質 GP-ZIP、Cav1-ZIP についても OLE-ZIP と同様にエマルジョン法を適応させることで、粒子径 100 nm 前後の安定な蛋白質分子のみからなる蛋白質カプセル構築が可能であり、さらにこのカプセル内部に、細胞内に送達したい薬剤蛋白質など外来蛋白質を、1 カプセルあたり 100 分子以上安定に充填も可能であった。GP-ZIP については、疎水部を形成するアミノ酸配列を短くした変異体、GP-ZIP27、GP-ZIP20 などもさらに構築し（元の GP-ZIP は GP-ZIP41 と改めて命名。これらの数字は疎水部のアミノ酸残基数を示す）、これらのカプセル間での形成挙動、安定性などの比較を行ったが、疎水部を短くした方がより構造安定性の高いカプセル構築が可能であることが示唆された。GP-ZIP20 カプセルについては、VHH 抗体をカプセル表面に提示した GP-ZIP20 カプセルの調製も可能であり、カプセル内部に、細胞質に送達したときに毒性を示す RNaseA や Cytochrome C などを充填して細胞へ添加することで、これらの細胞質への輸送と送達された蛋白質に基づく細胞毒性も観測することができた。すなわち、Two-helix bundle 構造の片側表面に疎水性表面、もう片側の表面に親水性表面を固めて配置した安定な両親媒性蛋白質を設計することさえできれば、さまざまなアミノ酸配列を含む、蛋白質のみからなるカプセル構築が可能となり、様々な蛋白質医薬品に対する新たな細胞膜透過キャリアを、非ウィルス性の両親媒性蛋白質から構築可能であることを証明できたと言える。

＜研究発表（口頭、ポスター、誌上別）＞

＜口頭＞

1. 「両親媒性蛋白質 GP-ZIP 変異体の蛋白質カプセル形成能評価」

山崎 穂波、高橋 孝介、水野 稔久

第73回高分子年次大会、仙台国際センター（宮城）、口頭発表、2024年6月7日

＜ポスター＞

1. “Design of the Amphiphilic Two-Helix Bundle Protein Mutant GP-ZIP20Cys for the Formation of Reduction-Responsive Protein Capsules”

Honami Yamazaki, Kousuke Takahashi, Taiki Nishiyama, Toshihisa Mizuno

4th Switzerland-Japan Biomolecular Chemistry Symposium (SJBCS2024)、京都大学宇治キャンパス（京都）、ポスター発表、2024年11月8日

2. 「HER2 親和性抗体を提示した蛋白質カプセルによるガン細胞への外来蛋白質の細胞内送達」

細田 瑞貴、高橋 孝介、水野 稔久

第74回高分子討論会、関西大学（大阪）、日本語ポスター、2025年9月17日

＜論文発表＞

1. "Delivery of external proteins into the cytoplasm using protein capsules modified with IgG on the surface, created from the amphiphilic two helix-bundle protein OLE-ZIP"

Kousuke Takahashi, Taiki Nishiyama, Naoki Umezawa, Yasumichi Inoue, Isamu Akiba, Takehisa Dewa, Atsushi Ikeda, Toshihisa Mizuno*

Chem. Commun. **60**, 968-971 (2024).

2. "Target-selective cytosolic delivery of cargo proteins using the VHH-presented OLE-ZIP capsules"

Kousuke Takahashi, Yasumichi Inoue, Shigeaki Hida, Ryuki Hosoda, Naoki Umezawa, Isamu Akiba, Mitsuo Umetsu, Toshihisa Mizuno*

RSC Pharmaceutics **1**, 786 – 796 (2024).

3. "Construction of protein capsules from novel amphiphilic two-helix bundle proteins (GP-ZiPs), designed by fusing the transmembrane region of glycophorin A with coiled-coil peptides"

Honami Yamazaki, Gaku Umemoto, Toshihisa Mizuno*

Org. Biomol. Chem., **23**, 9356-9360 (2025).

<研究の目的、経過、結果、考察 (5000 字程度、中間報告は 2000 字程度) >

1. 研究目的

これまでに我々は、植物の種子中で油体 (oil body) の分散安定化に寄与する天然の両親媒性蛋白質として知られるオレオシンを元に、選択的に安定な二分子膜カプセル形成を可能とする両親媒性蛋白質 OLE-ZIP の開発に成功し報告している (*Colloid and Interface Sci Comm.* (2019))。オレオシンは分子全体で two helix bundle 構造をとり、two helix bundle の片側表面が疎水性、もう片側表面が親水性を持つことで、全体として巨大な両親媒性分子として機能し、結果、生成確率は低いものの水中で二分子膜カプセルを生成可能と報告されていた (*PNAS* (2014))。我々はこの親水部の構造安定性が高くないことが、選択的な二分子膜カプセル形成に不利であると考え、ここを 90°C 以上に加熱しても崩壊しない two helix bundle 蛋白質であるデノボ二本鎖 coiled coil 蛋白質に置き換えることで、高い選択性を持つ二分子膜カプセルが形成可能であることを見出した。またこのカプセルは、GFP のような外来タンパク質を 1 カプセルあたり 100 分子以上安定に内包可能であり、細胞膜抗原に対する抗体を表面修飾することで、充填蛋白質の細胞質への送達と、これを細胞質で働くことにも成功した。すなわち、バイオ医薬品に対する新たな蛋白質性の膜輸送キャリアとして利用可能であることも明らかとした。しかしこの二分子膜カプセルを形成可能な両親媒性蛋白質が、オレオシン由来の特異な疎水部アミノ酸配列に依ることが危惧され、これは両親媒性蛋白質を用いた蛋白質カプセル構築原理の可能性を制限するものであった。そこで本研究では、ヒトの赤血球膜にある 1 本鎖型膜タンパク質であるグリコホリン、エンドサイトス過程で細胞内側からエドソーム膜を支持するカベオリン 1 の膜貫通領域を疎水部に用いた両親媒性蛋白質を新たに設計し、OLE-ZIP の場合と同様に、安定な二分子膜カプセル形成が可能か、さらに抗体修飾を通してバイオ医薬品に対する細胞膜透過キャリアとして利用可能か検証を行った。

2. 研究経過、結果

2. 1. 新規両親媒性蛋白質 (GP-ZIP、Cav1-GP) の設計

ヒトのグリコホリン、カベオリン 1 の細胞膜貫通領域から、新たな両親媒性蛋白質の疎水部に採用するペプチド配列を採用した。一方親水部には、OLE-ZIP と同様にデノボ設計二本鎖 coiled coil を採用し、これらをリンカーペプチドで繋ぐことで GP-ZIP、Cav-GP を設計した。構造予測プログラム AlphaFold3 を駆使し、さらに分子全体で安定な二本鎖 coiled coil 構造を形成できるようアミノ酸変異を加え、配列の最適化は行った (図 1)。Thioredoxin-1 (Trx) との融合蛋白質 (Trx-GP-ZIP、Trx-Cav-ZIP) として大腸菌発現系にて生産を行ったところ十分な発現量で得られ、大腸菌を破碎後に単離精製を行った (図 1)。以下の実験では、こちらを用いた。

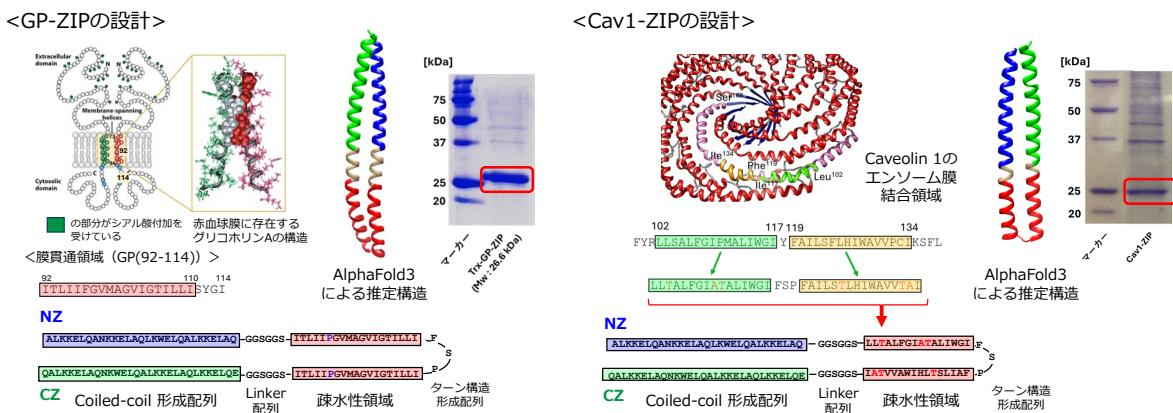


図 1 AlphaFold3 で構造推定された GP-ZIP、Cav1-ZIP の立体構造とアミノ酸配列、SDS-PAGE

2. 2. 新規両親媒性蛋白質の蛋白質カプセル形成挙動の比較

OLE-ZIP と同様にエマルジョン法を用いることで、新規両親媒性蛋白質 (GP-ZIP、Cav-GP) からの蛋白質カプセル作製に取り組んだ。なお水溶性の向上のため、GP-ZIP、Cav-GP は Trx との融合蛋白質 (Trx-GP-ZIP、Trx-Cav1-ZIP) として用いた。まず内水相の前駆体溶液として 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) 40 μL に両親媒性蛋白質 (終濃度: 1 μM) とスクロース (150 mM) を添加して用い、これを流動パラフィン 500 μL に添加し超音波照射で分散させることにより、エマルジョン溶液を得た。次にこれを外水相溶液 (50 mM リン酸緩衝液 (pH 7)) 500 μL に載せて、遠心分離により外水相溶液へエマルジョン中の内水相ナノ液滴を移動させることにより、蛋白質カプセルを外水相液中に作製した。得られたカプセル溶液の DLS 分析から、100 nm 前後に粒子径の揃った会合体形成が示唆され、TEM による直接観測から、実際に二分子膜蛋白質カプセルが OLE-ZIP の場合と同様に、形成されていることが確認でき、OLE-ZIP と同様に GP-ZIP、Cav-GP からも蛋白質カプセルの作成が可能であることが分かった。

また、それぞれのカプセルの熱安定についても評価を行った。各々の蛋白質カプセル溶液を、50, 60, 70, 80, 90, 90 °C で 5 分加熱処理し氷上で 15 分冷却後、DLS 測定によりカプセルが形態を保ったまま分散しているか評価した。その結果、GP-ZIP カプセルと比較し Cav-GP カプセルでは、より低温側 (60°C 以下の処理) からカプセルの凝集沈殿

化がみられ、GP-ZIPの方がより安定性が高いことが分かった。カプセル形成性の高さという観点から、その後の実験ではGP-ZIPから形成される蛋白質カプセルを用いた検討に集中することとした。

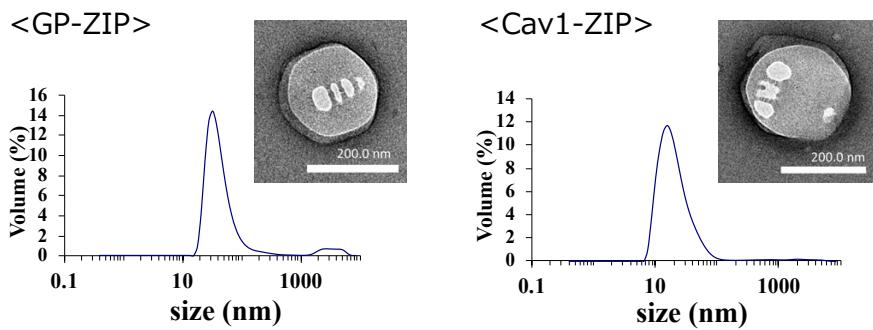


図2 GP-ZIP、Cav1-GP から形成された蛋白質カプセルの DLS、TEM 画像

2. 3. 両親媒性蛋白質 GP-ZIP の疎水部長さを短縮した場合のカプセル形成性への影響評価:GP-ZIP41、GP-ZIP27、GP-ZIP20 の設計とカプセル形成挙動の比較

今まで扱っていた GP-ZIP を GP-ZIP41 と新たに命名し、疎水部長さを短くしつつ、two-helix bundle 構造を安定的に取れるよう AlphaFold 3 により配列最適化を起こった変異体を、GP-ZIP27、GP-ZIP20 として設計した。これらも Trx との融合蛋白質としてカプセル形成性の評価を行ったが、GP-ZIP41 の場合と同様に、エマルジョン法によって 100 nm 程度の粒径を持った二分子膜カプセルが形成可能であった (DLS や TEM 測定による評価) 疎水部長さと得られるカプセル粒径との相関性を評価したが、こちらは明確な相関性は見られなかった。次にそれぞれのカプセルの熱安定についても評価を行った。同様に 50, 60, 70, 80, 90, 90 °C で 5 分加熱処理し氷上で 15 分冷却後、DLS 測定によりカプセルが形態を保ったまま分散しているか評価したところ、より疎水部長さの短い GP-ZIP20 において 80°C 以上の熱処理でもカプセルの分散性が保てることが分かり、より安定なカプセル作製を行う面においては、疎水部長さは短い方が優位性を得られやすいことが分かった。

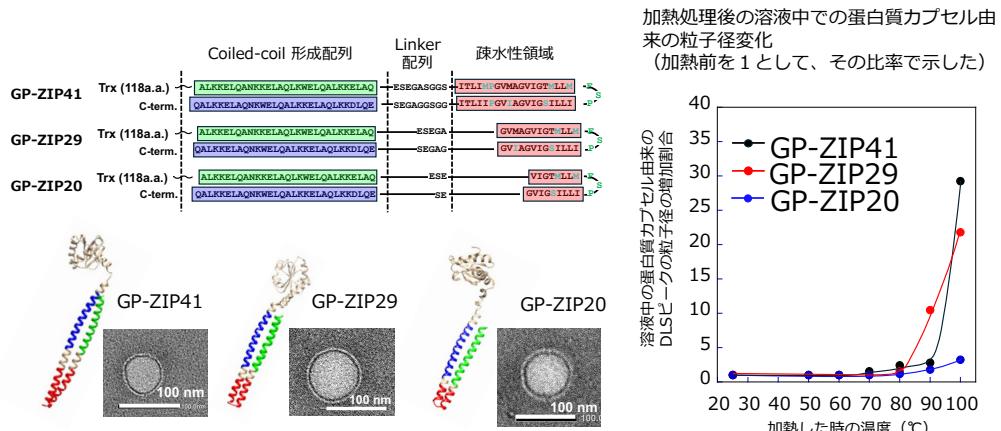


図3 Trx-GP-ZIP41、Trx-GP-ZIP27、Trx-GP-ZIP20 の構造比較

2. 4. GP-ZIP41、GP-ZIP27、GP-ZIP20 から形成される蛋白質カプセルへの外来蛋白質の充填挙動の評価

エマルジョン法における内水相の前駆体溶液に、カプセル内部に充填させる蛋白質として GFP を添加し (終濃度 10 μM)、GP-ZIP41、GP-ZIP27、GP-ZIP20 (終濃度 1 μM) から蛋白質カプセル作製を行った。DLS や TEM 測定により評価を行ったところ (図4)、いずれの変異体についても GFP の安定な内包は見られた。1 カプセルあたりに内包できる蛋白質量の計算を行ったところ 100 分子以上とわかり、非常に高濃度であるためか、空のカプセルと異なり、GFP 充填カプセルではカプセル内部に明瞭な黒いコントラストが得られるようになった。

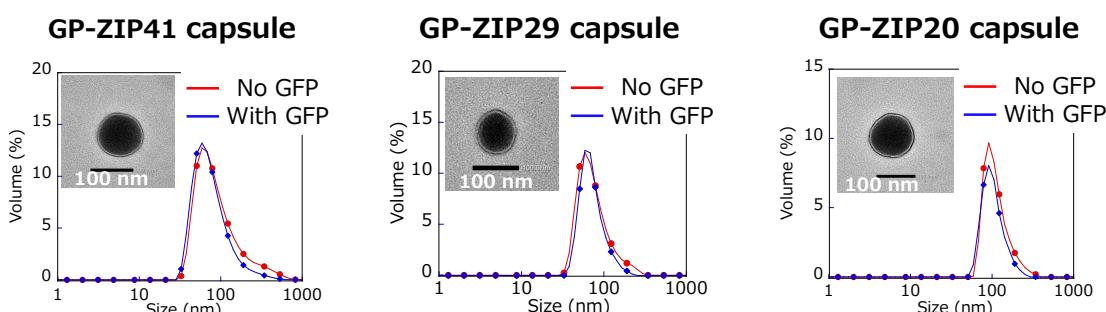


図4 GFP を内包した GP-ZIP41、GP-ZIP27、GP-ZIP20 カプセルの DLS、TEM データ

2. 5. EGFR に結合する VHH 抗体 (VHH-Ia1) を表面提示した GP-ZIP20 カプセル調製と蛋白質医薬品の細胞内輸送キャリアとしての機能評価

OLE-ZIP カプセルでの検討から、両親媒性蛋白質から作製された蛋白質カプセルは、細胞表面抗原に結合する抗体をカプセル表面に提示し受容体依存エンドサイトシスを誘導することで、細胞内へ取り込ませることが可能となっている。さらに細胞質内で働く蛋白質をカプセル内部に充填して用いた場合には、細胞内への外来蛋白質の輸送と、これを細胞質で働くことも可能であった。同様な機能が GP-ZIP20 カプセルでも可能か検討を行った。VHH-Ia1 を N-末端側に導入した GP-ZIP20 との融合蛋白質 (VHH-GP-ZIP20) を大腸菌発現系によって得て、Trx-GP-ZIP20 と 9:1 の比で混合しカプセル化することで、VHH を提示した GP-ZIP20 カプセルを作製した。内水相の前駆体溶液に、細胞質に導入されたときに毒性を示す薬剤蛋白質 (RNaseA や Cytochrome C) を添加することで、これらをカプセル内部に充填した VHH 抗体を提示した GP-ZIP20 カプセルの調製も可能であった (図 4)。

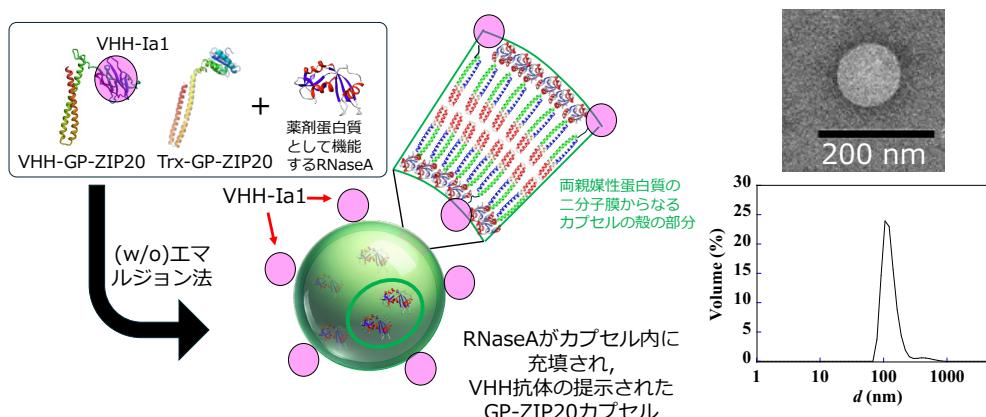


図4 RNaseA がカプセル内部に充填され、VHH 抗体が表面提示された GP-ZIP20 カプセルの調製

VHH-Ia1 は EGFR に選択的に結合可能な VHH 抗体であり、OLE-ZIP カプセルへ提示した場合には EGFR 高発現細胞株の 1 つである A431 細胞への効率良い取り込みが誘導された。VHH-Ia1 を提示された GP-ZIP20 カプセルについても A431 細胞への添加実験を試みたところ、12、24、48 時間培養後の CLSM 測定から、添加 24 時間以降から、細胞質への取り込みが確認できた (図 5)。さらに VHH-Ia1 を提示した GP-ZIP20 カプセルの中に、RNaseA、Cytochrome C などの細胞質に取り込まれた時に細胞毒性を誘導する蛋白質を充填し、A431 細胞へ添加した時の影響を評価した。その結果、どちらの蛋白質についても、添加 24 時間後から細胞毒性が見られ、GP-ZIP20 カプセルは VHH 抗体の提示により、外来蛋白質の細胞内輸送キャリアとして利用可能であることが分かった。

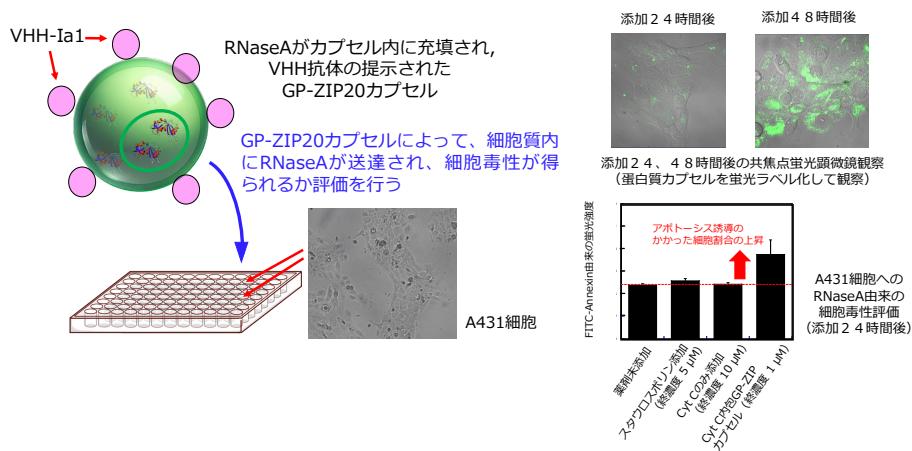


図5 GP-ZIP20 カプセルの A431 細胞への取り込みと、Cytochrome C (Cyt C) の GP-ZIP20 カプセルを介した細胞内送達によるアポトーシス誘導

3. 考察

本研究では、天然の両親媒性蛋白質オレオシン由来のアミノ酸配列を全く含まない両親媒性蛋白質として、GP-ZIP と Cav1-ZIP を新たに開発し、カプセル形成挙動、外来蛋白質の内包挙動、GP-ZIP については疎水部長さを最適化した GP-ZIP20 を用いて、外来蛋白質の細胞内への送達挙動などまで評価した。結論として、Two-helix bundle 構造の片側表面に疎水性表面、もう片側の表面に親水性表面を固めて配置した安定な両親媒性蛋白質を設計することができれば、さまざまなアミノ酸配列を含む、蛋白質のみからなるカプセル構築が可能となり、様々な蛋白質医薬品に対する新たな細胞膜透過キャリアを、非ウィルス性の両親媒性蛋白質から構築可能であることを証明できたと言える。ぜひ引き続き研究を継続していくことで、実際に生体内で利用可能な、新たなバイオ医薬品に対する DDS キャリアとしての実用化を目指していきたい。