

論文審査報告書

氏名	のべ やま とも ひろ 延山 知弘
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博生第26号
学位授与日	令和2年9月29日
論文題目	Design, Preparation and Evaluation of Bioactive Nanomaterials Aiming at Control of Physical Properties of Plasma Membrane (脂質二重膜の物理的状態の制御を目的とした、生物活性ナノ材料の設計・開発並びに評価)
論文審査委員	(主査) 富山県立大学 教授 村上 達也 教授 中島 範行 教授 占部 大介 大阪大学 教授 松崎 典弥

内容の要旨

申請者は、高密度リポタンパク質(HDL)変異体並びにHDL変異体で被覆された細胞膜指向性金ナノロッド (plasma membrane-targeted gold nanorods, pm-AuNR) を用いることで、脂質二重膜上の脂質組成の偏りを操作する手法を確立した。具体的には、細胞サイズリポソーム (学位論文中ではgiant unilamellar vesicle (GUV)とも記載) 上に構成した、脂質ラフト (細胞内外の情報伝達にかかわる組成領域でコレステロールを多く含む液体秩序(Lo)相ドメイン) のモデルの生成消滅や、リポソーム、並びに細胞膜を対象としたpH選択的な脂質供給を可能とした。

脂質膜の膜物性に関する研究は古くから行われてきた。最も古い研究はC.E.Overtonによる、細胞膜が脂質二重膜からなるという発見である。その後多くの物理学的研究がなされた結果、脂質膜の相転移に関する知見が得られてきた。1980年代にはコレステロールの多い膜が特殊な相状態を持つことが示された。一方生物学の観点からも脂質膜の物性は注目を集めており、脂質膜の膜組成によって免疫応答やエンドサイトーシス等の、細胞の外部物質応答が影響を受けることが示されてきた。1997年にはKai Simon によって、コレステロールの多い領域に脂質や膜タンパク質が集合し安定な複合体を形成するという「脂質ラフト仮説」が提唱された。これと前述のコレステロールの多い相状態(Lo相)との関連が示唆されて以来、ソフトマター物理学と細胞生物学双方の観点から、脂質膜の膜物性とそれが細胞のふるまいに与える影響が調べられ、2000年代を通じて、広範な生命現象の基盤となることが示された。すなわち、膜物性や脂質ラフトが膜の物性・すなわち膜組成それ自体や膜ドメインの生成消滅の制御を行

えるナノテクノロジーを開発できれば、次世代の細胞工学へと繋がることが予想される。

公聴会で発表された研究内容は、以下に示す3つの項目からなる。

- (1) 細胞膜に高い親和性を示すよう表面修飾された金ナノ粒子(plasma membrane-targeted gold nanorod, pm-AuNR)は、細胞サイズリポソーム(giant unilamellar vesicle, GUV)の観測に広く使われるスクロース溶液中で安定して分散することを見出した。この分散化メカニズムを分子レベルで調べたところ、pm-AuNRに含まれるカチオン性脂質とスクロースとの静電相互作用(カチオン-双極子相互作用)が重要な役割を果たすことを明らかにした。この発見により、pm-AuNRとGUV両者の分散性を保持したままそれらの相互作用を解析することが可能となった。
- (2) pm-AuNRを液体秩序(Lo)相含有GUVに加えたところ、pm-AuNRはGUV上のLo相領域(脂質ラフトのモデル)特異的に吸着し、その後Lo相の消失と共に固体秩序(So)相が出現した。Lo相領域が小ドメインへ一旦崩壊し、膜上で再集合して、So相領域へ変化することがわかった。逆に、コレステロール内包pm-AuNRをSo相含有GUVに投与し、さらに熱刺激を加えたところ、Lo相が出現した。以上の結果から、pm-AuNRはGUVにおいてLo相ドメインの生成・消滅を制御できることがわかった。金ナノ粒子の表面修飾剤として用いた高密度リポタンパク質(high-density lipoprotein, HDL)が脂質膜からコレステロールを引き抜く生物活性を持つことを考慮すると、この生成・消滅制御はpm-AuNRのHDL成分が脂質膜との間でコレステロールをやり取りしたためだと考察された。
- (3) HDLが円盤状脂質二重膜を有することを利用して、リポソーム並びに生細胞の脂質膜に吸着し脂質を供給する膜融合性HDLを作製した。HDL構成脂質として、膜融合に有利な高流動性脂質二重膜を形成する3種類の脂質を用いた。それらの成分比を種々検討した結果、既存の膜融合リポソームよりも高い膜融合活性を示すHDL変異体を作製することに成功した。この結果はHDLから脂質膜側に脂質を直接供給できることを示している。生細胞へ投与した結果、同様に脂質を供給できることが示唆された。

以上の結果により、生体適合性ナノ材料であるHDLとその変異体、及びHDL被覆金ナノロッド(pm-AuNR)を用いて、脂質膜の膜物性を制御できる手法を提案できた。本手法は生体膜側の分子によらない汎用性のある手法であり、広範な生命現象への適応が期待できる。近年の細胞生物学では脂質ラフトに代表されるように、特定のタンパク質1つに着目した従来の考え方から、むしろ連続した反応を生じさせる反応場の生成消滅を基本単位として生命を捉える考え方が受け入れられつつある。細胞は脂質二重膜で囲まれ、また細胞内には小胞体ネットワークやミトコンドリアなどの多くの脂質二重膜で出来た構造が高い密度で存在することから、脂質膜内・脂質膜上の空間は反応場の第一候補であると考えられる。本研究は脂質膜物性を外部から精密に制御するための方法に関する基礎的な知見を与えるものであり、勃興しつつある反応場を基盤とした考え方を細胞工学に適応するための架け橋として、将来的には捉えられると考えられる。

審査の結果の要旨

延山知弘氏の博士論文は、以下のリストに示すとおり、原著論文3報（うち第一筆者2報）で発表した内容を元にして作成された。

1. Nobeyama, T., Mori, M., Shigyoyu, K., Takata, K., Pandian, G.N., Sugiyama, H., and Murakami, T.*, Colloidal Stability of Lipid/Protein-Coated Nanomaterials in Salt and Sucrose Solutions, *ChemistrySelect* 2018, 3, 8325–8331.
2. Kim, H., Nobeyama, T., Honda, S., Yasuda, K., Morone, N., and Murakami, T.*, Membrane Fusogenic High-Density Lipoprotein nanoparticles, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2019, 1861, 183008.
3. Nobeyama, T., Shigyoyu, K., Nakatsuji, H., Sugiyama, H., Komura, N., Ando, H., Hamada, T., and Murakami, T.*, Control of Lipid Bilayer Phases of Cell-Sized Liposomes by Surface-Engineered Plasmonic Nanoparticles, *Langmuir* 2020, 36, 7741–7746.

延山氏の博士論文研究の中心課題は、細胞に含まれるナノ構造体、より具体的には細胞膜のドメイン構造を、生物活性を有するナノ材料を用いて制御することである。上記の3つの文献の中で、最初はリポタンパク質で被覆された金ナノ粒子(pm-AuNR)のコロイド安定化のメカニズム解析に関する原著論文、2つ目は文献1で用いたナノ粒子による脂質膜相状態の光制御に関する原著論文、3つ目はリポタンパク質変異体による物質の細胞膜輸送に関する原著論文、である。

文献1（第2章）の研究成果は、文献2の研究の準備となるものである。細胞膜のモデルとして、細胞サイズリポソーム(GUV)が知られており、ナノ材料と細胞膜との相互作用を分子レベルで調べるために頻用されている。ただし、細胞サイズリポソームとナノ材料（ここでは pm-AuNR）の相互作用を外乱なく調べるためには、両者共に溶液中で単分散することが必要である。延山氏は、pm-AuNR が GUV の溶液条件(200 mM sucrose)で単分散することを発見し、さらにその濃度が重要なファクターであることも突き止めた。このファクターの発見により、タンパク質溶液に対する塩溶・塩析効果と類似した効果が、スクロースと pm-AuNR の間にも働くことを提唱した。この結果は、ナノ材料に対する、そしてスクロースによる、塩溶・塩析効果、という2つの点で世界初の知見である。

文献3（第3章）では、pm-AuNR が細胞サイズリポソームのドメイン構造の生成消滅をその生物活性を利用して制御する、というオリジナリティの高い研究成果である。脂質膜の相状態は3種類存在し、流動性の高い方から順に、液体無秩序(Ld)相、Lo相、So相がある。pm-AuNR の表面に存在するリポタンパク質は細胞膜からコレステロールを引き抜く生物活性を持つこと、金ナノロッド(AuNR)は光線温熱効果を示すこと、の2点を巧妙に利用することで、細胞サイズリポソームに生成させたLo相ドメインの生成を光により制御し、その消滅を pm-AuNR のLo相ドメイン吸着を介して制御した。Lo相ドメインは生細胞の脂質ラフトのモデルと認識されており、細胞膜を介したシグナル伝達の主要な拠点である。従って pm-AuNR は脂質ラフトに対する新しい細胞工学ツールとなる可能性がある。

文献2（第4章）の研究成果は、リポタンパク質のタンパク質と脂質膜の構造を同時に工学改変した世界で初めての例であり、結果として、薬物送達システム上の重要な機能、すなわち細胞膜との膜融合活性、をリポタンパク質に付与することに成功している。リポタンパク質のようなナノ粒子製剤の原料には、細胞取込（エンドサイトーシス）の後、特定の細胞内小器官（エンドソームとリソソーム）に蓄積し、結果として搭載薬物は分解・排出される、という課題がある。一方、膜融合を介した細胞取込は、エンドサイトーシス経路とは独立しているため、この課題をクリアできる。従ってこのリポタンパク質

変異体は、ナノ粒子製剤原料としても魅力的である。

公聴会では、副査だけでなく、学科内外の教員から多数の質問があり、定刻時間を越えて質疑が行われた。質問は批判的な立場からなされたものが多く、質問の内容も、熱力学、生化学、高分子化学など多岐に渡っていたが、延山氏はいずれに対しても適切に対応していた。

予備検討委員会を2019年12月2日に開催し、博士論文の審査および最終試験を2020年8月26日に行った結果、申請者は学術研究に相応しい討論ができ、当該分野に関して博士としての十分な学識と研究遂行能力を有するものと判定し、博士（工学）の学位論文として合格であると認められた。