

アカデミックプログラム [B講演] | 17. 生体機能関連化学・バイオテクノロジー：口頭B講演

📅 2025年3月27日(木) 15:55 ~ 17:15 🏢 [A]A304(第3学舎 1号館 [3階] A304)

[[A]A304-2vn] 17. 生体機能関連化学・バイオテクノロジー

座長：若林 里衣、神谷 厚輝

◆ 英語

15:55 ~ 16:15

[[A]A304-2vn-01]

鼻粘膜の防御機構向上によるアレルギーの根本治療を目指したリポソームDDSの開発

○李 佳月¹、森田 直樹²、三浦 理紗子¹、木村 祐¹、新蔵 礼子²、近藤 輝幸¹ (1. 京都大学、2. 東大定量生命科学研究所)

◆ 日本語

16:15 ~ 16:35

[[A]A304-2vn-02]

架電性アミノ酸導入によるペプチド超分子のワクチンアジュバント効果

○若林 里衣¹、難波江 友紀¹、樋口 亜也斗¹、神谷 典穂¹、後藤 雅宏¹ (1. 九州大学大学院工学研究院)

◆ 日本語

16:35 ~ 16:55

[[A]A304-2vn-03]

脂質-タンパク質非対称膜小胞内膜上でのタンパク質集積と酵素反応の効率化

○鈴木 允人¹、神谷 厚輝¹ (1. 群馬大学)

◆ 日本語

16:55 ~ 17:15

[[A]A304-2vn-04]

膜透過性ペプチドを介した効率的な脂質二重膜を横切るタンパク質の輸送条件の検討

○三輪 明星¹、樋口 祐次²、伊藤 弘明³、神谷 厚輝¹ (1. 群馬大、2. 九州大学情報基盤研究開発センター、3. 千葉大)

Development of Liposome-Based Nasal Drug Delivery Systems to Enhance Mucosal Defense for Radical Allergy Treatment

(¹Graduate School of Engineering, Kyoto University, ²Institute for Quantitative Biosciences., The Univ. of Tokyo) ○Jiayue Li, ¹ Naoki Morita, ² Risako Miura, ¹ Yu Kimura, ¹ Reiko Shinkura, ² Teruyuki Kondo¹

Keywords: Drug delivery system; Liposome; Class-switching

Allergic symptoms occur by the overproduction of IgE antibodies, and symptomatic treatments with antihistamines are provided.¹ For radical treatments, development of medicines with enhancement of IgA antibody production on nasal mucosa as well as deliver them to antigen-presenting cells (APCs) in the nasal mucosa are essential. Bryostatin-1 (Bryo-1) is expected to be an ideal drug for the radical treatment of allergies. Bryo-1 showed high activity for inhibition of IgE-related allergic reactions with enhancing the defense of nasal mucosa against antigens through the selective production of IgA antibody by nasal administration (Scheme 1).²

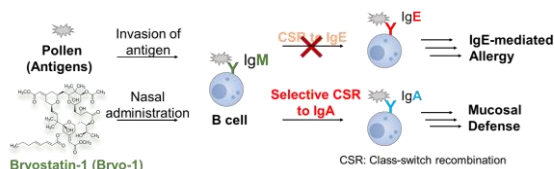
In this study, we have developed basic liposome carriers (LNPs) for the APCs-targeting nasal DDS. The

IgA class-switching drugs, Bryo-1, was incorporated into LNPs with different surface charges, neutral LNPs (DOPC), cationic LNPs (DOTAP/DOPC) and anionic LNPs (DOPS/DOPC), to enhance interaction with both the nasal mucosa and APCs through electrostatic and receptor-mediated interactions, as well as resist mucociliary clearance.

Bryo-1@LNPs were prepared using the thin-film method, with surface charges varied depending on the ionic lipids and an incorporation ratio of about 85%. The interaction between LNPs and RAW264.7 cells were determined by FACS analysis *in vitro*. The result showed that charged LNPs increased uptake efficiency, demonstrating the stronger interaction between cells and charged LNPs. Additionally, the class-switch recombination (CSR) activity of Bryo-1@LNPs was evaluated according to the germline transcript (GLT) levels of IgA and IgE using real-time PCR. As the result, all Bryo-1@LNPs exhibited CSR activity towards B cells by increasing GLT α expression and reducing GLT ϵ expression. Finally, the effect of Bryo-1@LNPs on OVA-allergy model mice was investigated. The OVA-specific IgA and IgE level in mouse saliva and serum were determined using ELISA. As a result, the efficiency of intranasal administration of Bryo-1 in promoting IgA production and reducing IgE level can be enhanced by incorporating it with cationic and anionic LNPs. The increased IgA production indicates a strengthening of mucosal defense.

Consequently, the present study highlighted that charged LNPs are highly efficient DDS carriers of Bryo-1 for the radical treatment of allergies.

1) Frew, A. J. *J. Allergy Clin Immunol.* **2010**, 125, S306-313. 2) Shinkura, R.; Yamamoto, K. PCT Int. Appl., WO 2018/034318 A1 (2017).



Scheme 1. Strategy to enhance the mucosal defense through selective class-switching to IgA.

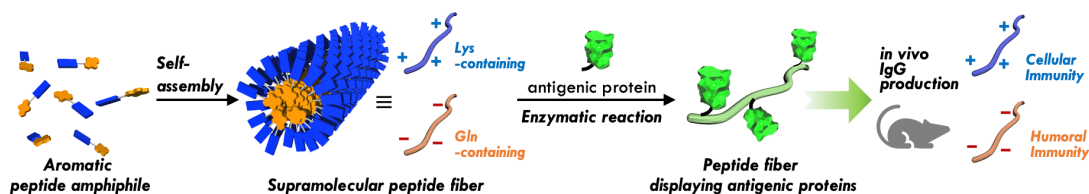
架電性アミノ酸導入によるペプチド超分子のワクチンアジュバント効果

(九大院工¹⁾) ○若林里衣¹・樋口亜也斗¹・難波江友紀¹・神谷典穂¹・後藤雅宏¹
 Vaccine Adjuvant Effect of Peptide Supramolecules Introduced with Charged Amino Acids
 (¹*Graduate School of Engineering, Kyushu University*) ○Rie Wakabayashi,¹ Ayato Higuchi,¹
 Yuki Nabae,¹ Noriho Kamiya,¹ Masahiro Goto¹

We herein attached antigenic proteins to peptide supramolecules introduced with charged amino acids. Antigenic proteins loading on Lys-containing supramolecules showed better internalization into immune cells *in vitro*, while those on Glu-containing supramolecules decreased. However, *in vivo* study demonstrated that both supramolecules enabled the high production of immunoglobulin G. Subclass analysis suggested that cellular immunity was dominantly induced by Lys-containing supramolecules, and humoral immunity was induced by Glu-containing ones, suggesting the controllability of immune responses by these supramolecular system as a vaccine adjuvant.

Keywords : Peptide; Self-assembly; Vaccine; Intracellular delivery

我々はこれまでに酵素反応を用いてペプチド超分子ファイバー上にタンパク質を修飾する技術を開発した¹⁾。超分子に結合したタンパク質は、タンパク質単体と比較して免疫細胞への細胞内移行効率が高いことも見出している。今回、このタンパク質修飾ペプチド超分子を用いたワクチン創製を志向し、超分子を形成するペプチドに様々なアミノ酸を導入した際のワクチンアジュバント効果を検証した。具体的には、ペプチド超分子の架電状態に着目して、生理条件下で正電荷を持つ Lys 残基と負電荷を持つ Glu 残基をそれぞれ一残基ずつ導入した両親媒性ペプチド (PA) と酵素反応性 PA を 1:1 のモル比で混合したペプチド超分子を形成させ、酵素反応で抗原タンパク質を結合した。架電性アミノ酸を導入した PA を混合していない場合と比較して、正電荷を持つ超分子上に結合すると免疫細胞への内在化効率は向上し、負電荷を持つ超分子上では効率が低下することが確認され、超分子の架電状態が細胞内移行効率に大きく影響を与えることが示された。一方、これらをマウスに皮下投与した際の血清中の抗体産生量を定量すると、負電荷を持つ超分子を用いた場合にも高い抗体産生が認められた。免疫グロブリンのサブクラス解析より、正電荷を持つ超分子を用いると細胞性免疫が、負電荷を持つ超分子では液性免疫が誘導されることを示唆する結果が得られ、超分子の架電を改変することで免疫の調節が可能である可能性が示された。



1) R. Wakabayashi *et al.*, *Chem. Commun.*, **2019**, 55, 640; *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, 22, 3459.

脂質-タンパク質非対称膜小胞内膜上でのタンパク質集積と酵素反応の効率化

(群大院理工¹) ○鈴木 允人¹・神谷 厚輝¹

Efficient enzymatic reactions and protein accumulation on the inner leaflet of lipid-protein asymmetric vesicles (¹*Graduate School of Science and Technology, Gunma University*)
○Masato Suzuki,¹ Koki Kamiya,¹

Liposomes composed of a phospholipid bilayer have been used for the studies of artificial cell models. Recently, vesicles formed by amphiphilic proteins have been reported. In this study, we formed asymmetric vesicles composed of phospholipids on the outer leaflet and amphiphilic proteins and phospholipids on the inner leaflet. First, we observed the conjugation of two types of proteins to the inner leaflet of the asymmetric vesicles responding to the external stimuli (Figure 1). Finally, we demonstrated that the accumulation of enzymes on the inner leaflet of the asymmetric vesicles enhanced the enzymatic activity.

Keywords : *Liposomes; Amphiphilic proteins; Protein accumulation; Enzyme reactions; Asymmetric vesicles*

リン脂質二重膜からなるリボソームは人工細胞モデルとして広く利用されている。また、近年、両親媒性タンパク質で二重膜を形成したタンパク質小胞が報告されている。我々は、これまでに、外膜をリン脂質、内膜を両親媒性タンパク質のオレオシンで構成した脂質-オレオシン非対称膜小胞を形成し、小胞分裂モデルの構築に成功している^[1]。今回、ラパマイシン応答性結合タンパク質(FKBP, FRB)を導入し、まず、両末端に FKBP を結合したオレオシンと、FRB を結合した蛍光タンパク質(mCherry, EGFP)を作製した。次に、外膜をリン脂質膜、内膜を FKBP-オレオシンとリン脂質の混合膜で構成した非対称膜小胞を形成した。この非対称膜小胞外水相にラパマイシンを添加し、小胞内水相に封入した mCherry-FRB と EGFP-FRB の小胞内膜への結合を観察した(Figure 1)。最後に、オレオシン膜上に酵素を集積させ、酵素同士を物理的に近接させることで、酵素反応の効率上昇につながることを実証した。

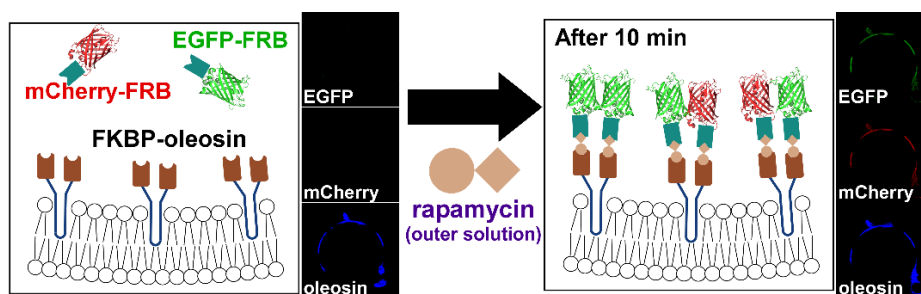


Figure 1. ラパマイシン添加に応答したオレオシン膜への2種類の蛍光タンパク質結合

[1] M. Suzuki, K. Kamiya, *iScience* **2023**, 26, 106086.

膜透過性ペプチドを介した効率的な脂質二重膜を横切るタンパク質輸送条件の検討

(群馬大¹・千葉大²・九州大³) ○三輪 明星¹・伊藤 弘明²・樋口 佑次³・神谷 厚輝¹
 Investigation of the cell penetrating peptide-mediated protein transportation through lipid bilayer (¹ Graduate School of Science and Technology, Gunma University, ²Graduate School of Science, Chiba University, ³Research institute for information technology, Kyushu University) ○Akari Miwa,¹ Hiroaki Ito,² Yuji Higuchi,³ Koki Kamiya¹

Cell-penetrating peptides (CPPs) can transport proteins into living cells by mixing or conjugating with the target protein¹. In this study, we investigated the conditions for the transportation of water-soluble proteins through liposome membranes (simple lipid bilayer) and cell membranes (containing sugar chains and membrane proteins). In transportation into liposomes, we examined transportation efficiency using coarse-grained molecular dynamics simulation² and wet experiments. We identified the conditions of the high-efficiency protein transportation inside the liposome. In addition, we demonstrated cytoplasmic transportation by changing the fusion site and combination of two types of CPP sequences conjugated to proteins. We obtained both the combination and topology of fusion sites of the two CPPs affecting the cytoplasm transportation efficiency. Finally, we explain the mechanism of a generic protein delivery system through the cell membrane using CPPs.

Keywords : Cell penetrating peptide; liposomes; membrane transport; cell membrane

膜透過性ペプチド(CPP)は、生体高分子を複合化または結合させることで細胞内に輸送する能力を持つ¹。本研究では、単純な脂質二重膜を有するリポソームと糖鎖等が存在する脂質二重膜を有する細胞へのタンパク質の高効率な輸送条件を検討した。リポソーム内への輸送において、粗視化シミュレーション²とウェット実験の両面から考察した。粗視化シミュレーションでは電荷非対称膜リポソーム内へのナノ粒子透過の輸送の観察を行った。ウェット実験では、リポソームを形成する脂質の組成(電荷や非対称性)と、タンパク質と CPP の複合形成比を変えて輸送条件の検討を行った。その結果、シミュレーションとウェット実験のいずれも複合体形成比が高く、さらに内膜の負電荷脂質が多いほどタンパク質がリポソーム内部に輸送されることが分かった(図 1a)。次に、CPP の融合位置と組み合わせを変えた融合タンパク質を発現し、効率的に細胞内にタンパク質を輸送させる CPP 融合位置と組み合わせを明らかにした(図 2b)。当日は、汎用的にタンパク質を細胞質に輸送するシステムの構築を報告する予定である。

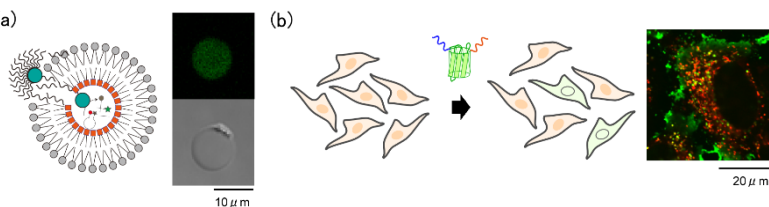


図 1 概略図 (a)リポソーム内への輸送 (b)細胞内への GFP の輸送

- 1) Justin M. Horn and Allie C. Obermeyer, (2021) *Biomacromolecules*, 22, 12, 4883–4904
- 2) Naofumi Shimokawa, Hiroaki Ito and Yuji Higuchi, (2019) *Phys. Rev. E*, 100, 012407:1-14