

令和元年6月6日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05854

研究課題名(和文) フォトサーマル療法を指向したペプチド集合体内部を鋳型とする金ナノ粒子合成法の開発

研究課題名(英文) Development of gold nanorod synthesis directed by peptide self-assembled nanostructures

研究代表者

富崎 欣也 (Tomizaki, Kin-ya)

龍谷大学・理工学部・教授

研究者番号：90397026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：金ナノロッドは近赤外光を熱に変換する特性をもつことから、ガン細胞等に対するフォトサーマル療法への応用が期待されている。従来の金ナノロッドの合成法としては、細胞毒性をもつ界面活性剤CTABを用いる方法が一般的であるが、金ナノロッドを医療分野に応用するためにはCTABの除去等、多段階の合成工程を経る必要がある。そこで本研究では、CTABの代替物としてCTAB分子構造を模倣したペプチドを用いる金ナノロッド合成法の検討を重ねて、CTABの濃度を従来の10%程度低減できることを明らかにした。本研究成果は、将来的にガン細胞等に対するフォトサーマル療法への応用へと繋げることができると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、我々の体内にも存在するペプチドを用いて金ナノロッドの合成を行い、得られた金ナノロッドが示す近赤外光を熱に変換する特性を利用するガン治療法の拡大へと繋ぐことができるものである。具体的には、金ナノ結晶合成において、特殊な製造装置を必要とせず、低エネルギー、低毒性にて試薬合成が可能となる、皮膚透過性の高い近赤外光を利用することで、皮膚組織近傍のガン治療等におけるフォトサーマル療法への応用が期待できる、生物が行うバイオミネラリゼーションメカニズム解明のための生物学的モデル構築を行うことができる、に大きく寄与する。

研究成果の概要(英文)：Gold nanorods are potential for absorbing near-IR light of a specific wavelength derived from surface plasmon resonance and efficiently converting light into heat. Thus, it is promised to apply to photothermal cancer treatment. Currently, CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) is used as a template molecule in the conventional synthetic methods of gold nanorods. However, CTAB itself is cytotoxic, it is necessary to remove CTAB for biological use. In this study, peptides having a fatty acid mimicking CTAB were synthesized (C11-R : undecanoyl-Arg-NH₂ and C8-GR : octanoyl-Gly-Arg-NH₂), and employed to synthesize gold nanorods. It was found that gold nanorods were synthesized by mixing the peptides and CTAB at ratios of 1%, 5%, and 10% peptide to CTAB. With increasing peptide concentration, the aspect ratio of the gold nano rods decreased. These results suggest that the 10% of CTAB could be replaced with such peptides in the present method and contribute to reduce cytotoxicity.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：金ナノロッド ペプチド フォトサーマル療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

貴金属の「金 (gold)」はナノ粒子化することでバルク (塊) とは異なる特性を示す。例えば、径がナノメートルサイズの球状金ナノ粒子は有機物の水素化反応等を触媒することが知られている (Gao et al, *Nanoscale Res. Lett.*, 2014, 9, 404 など)。また、短軸、長軸共にナノメートルサイズの金ナノロッドは、生体色素群と水の吸収帯の間の近赤外領域 (~ 1000 nm) に吸収帯を有し、光吸収を熱へと変換することが知られており、この特性を利用して、金ナノロッドを血流に乗せてガン細胞・組織等へ蓄積させ、皮膚透過性の高い近赤外光を照射することによって標的細胞・組織を加熱除去する「フォトサーマル療法」への応用が期待されている (Fourkal et al, *IFMBE Proceedings* 2009, 25/7, 761)。しかし、従来法では細胞毒性を有する界面活性剤 (セチルトリメチルアンモニウムブロミド、CTAB) を使用するため (Xiao and Limin, *Nanoscale*, 2011, 3, 1383)、金ナノロッド合成の後、金表面から CTAB を剥離し、次いで標的細胞・組織ターゲティングのためのシグナル分子による再被覆が必須となり、CTAB を使用する従来法を産業応用するためには、毒性および工程数共に減じる必要がある。

一方、近年、ボトムアップ型の材料合成法として、生物機能、特に生物鉱物化 (バイオミネラル化、Schaffer et al, *Chem. Mater.* 1997, Boyan *Anat. Res.* 1989, など) に倣い、金やシリカ、酸化亜鉛といった金属 (金属化合物) 結晶形態制御に関する研究が世界的に活発に実施されている。そこでは、生物が用いるタンパク質とは異なり、安価で大量調製可能なペプチドやアミノ酸、脂質といった生体関連分子が用いられている (Tan et al, *JACS*, 2010, 132, 5677, Kessel et al, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 9023, Liang et al, *J. Mater. Chem.* 2011, 21, 80)。申請者も、独自に β シート性短鎖ペプチドを設計・合成し、ペプチド集合体の形成とその外表面を選択的に酸化亜鉛 (Tomizaki et al, *Langmuir*, 2012, 28, 13459) やシリカ (Tomizaki et al, *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, 2012, 37, 541) で被覆する研究を行ってきた。しかし、これまで分子集合体外表面に鉱物を生成させる研究例は多数報告されているが、分子集合体内部を鑄型とする生物様コンパートメント内鉱物化法については、ほとんど報告例がない。

そのような状況下で、申請者は、生物様コンパートメント内 (集合体内部を鑄型とする) 鉱物化法の開発を指向し、金ナノ結晶を題材として、 β シート性の 9 アミノ酸残基からなるペプチド (RU006: Ac-AIAKAXKIA-NH₂, X = L-2-naphthylalanine) を設計・合成し、ペプチドが集合体を形成する過程で塩化金酸を集合体内部に取り込み、鑄型に沿った還元鉱物化によって、異方的な金ナノ結晶 (金ナノリボン) が生成することを見だし (Tomizaki et al, *Langmuir* 2014, 30, 846)、そのメカニズムの解明に取り組んだ (Tomizaki et al, *Bioorg. Med. Chem.*, submitted)。しかし、そのような合目的的な金ナノ結晶合成法開発の端緒について、異方的な金ナノ結晶が生成するメカニズムについては、①ペプチド配列中の芳香族アミノ酸側鎖、特にナフタレン環が金ナノ粒子形態の異方性発現に不可欠であること、②ナフタレン環近傍のリシン側鎖が静電的に塩化金酸を取り込むこと、③金イオンへの電子移動においてナフタレン環同士の酸化的カップリングが駆動力となることが分かったが、未だ不明な点が多い。また、CTAB の代替物としてのペプチドの有有用性についても評価する必要がある。

2. 研究の目的

上述の学術的背景のもと、形態制御されたナノ材料の合目的的且つ低エネルギー合成法の確立を長期目標として掲げ、本研究提案では、「産業応用可能な短鎖ペプチドを設計・合成し、それらの分子集合体内部を金ナノ結晶成長制御のための鑄型とするワンポット金ナノロッド合成法の開発」を行い、本研究成果をフォトサーマル療法への応用へと繋げることを目的とした。

本研究課題の骨子である、産業応用可能で、近赤外光を吸収する金ナノロッドのワンポット合成法に関する技術基盤の構築を目的として、

「ペプチドの自己組織化能を利用したペプチドナノ集合体の構築技術」

「ナノスケールの物質・材料の構造解析技術」

「細胞を用いる物質の細胞内局在性の評価技術」

の 3 つ独自技術を融合することで、革新的ナノ医療材料合成プロセス開発へ大きく貢献する。

これまでの研究成果を基に、研究開発期間を通じての具体的な達成目標を技術開発のステップ毎に以下に示す。

- ① 異方的な金ナノ結晶生成メカニズムの理解。
- ② 多様な異方的金ナノ結晶を与える短鎖ペプチドの探索。
- ③ 鑄型構造と金ナノ結晶形態との関連性の抽出。
- ④ 近赤外光 (~ 1000 nm) を吸収する金ナノロッド合成法の開発。
- ⑤ 将来的には、細胞毒性評価を行うことでフォトサーマル療法への応用可能性を探る。

3. 研究の方法

塩化金酸と混合することで近ナノリボンを与える RU006 (Ac-AIAKAXKIA-NH₂, X = L-2-naphthylalanine) は、水溶液中で β シート構造を形成するように、親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸を交互に配列した両親媒性ペプチドであり、金ナノ結晶成長のための鑄型を形成する際、ペプチド鎖間の疎水性相互作用に加えて、 π - π 相互作用及びカチオン- π 相互作用が寄与すると考えられるため、疎水性面に 2-ナフチルアラニン (2-Naphthylalanine) をリシンの $i+2$ の位置に配置してある。疎水性面に配置したリシンは、水溶性及び塩化金酸との相互作用向上、また、2-ナフチルアラ

ニンは、金イオン還元の際の電子供与基として機能することを期待した。本研究課題では、異方性金ナノ結晶を与える RU006 のアミノ酸配列をもとに、金ナノ結晶合成のためのペプチド性鑄型物質として、4 種類の新規ペプチドを設計した。まず、ペプチド集合体形成の駆動力となる水素結合形成を阻害することで金ナノ粒子形態の制御が可能であるかを検証するため、RU006 に N-メチルアミノ酸を導入することを試みた。N-メチルアミノ酸は水素結合のためのアミドプロトンをもたないため、水素結合のブレイカーとなり、金ナノ粒子のアスペクト比に強く影響を与えると思われる。そこで、RU006 の 1、3、5、9 残基目のアラニンの代わりに N-メチルアラニンを配置した [MeA¹]-RU006、[MeA³]-RU006、[MeA⁵]-RU006 および [MeA⁹]-RU006 をそれぞれ設計した。

また、金ナノロッド合成の鑄型として一般的に使用されているセチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) を模倣した脂肪鎖を有するペプチド C11-R: undecanoyl-Arg-NH₂ および、C8-GR: octanoyl-Gly-Arg-NH₂ を合わせて設計した。CTAB は第 4 級アンモニウムカチオン由来の親水性部分と 16 の炭素鎖からなる疎水部分をもつ両親媒性の物質である。そのため設計した C11-R は、カチオンと親水性を得るためアルギニンを配置し、疎水性部とカチオン部の原子数を合わせるためにアルギニンの N 末端側にウンデカン酸を配置した。また、C8-GR は、ウンデカン酸よりも炭素数の短いオクタン酸とし、不足分をグリシンで補うことで、CTAB および C11-R と同等の分子数とした。ペプチドは、Fmoc 固相法により合成し、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製、MALDI-TOFMS にて目的物であることを同定した。ペプチドの二次構造は円二色性スペクトル (CD) および赤外分光スペクトル (ATR-FTIR) にて評価した。ペプチド集合体の形態評価は透過型電子顕微鏡 (TEM) または原子間力顕微鏡 (AFM) にて評価した。金ナノ粒子の形態評価は透過型電子顕微鏡 (TEM) および吸収スペクトル (UV-VIS-NIR) にて評価した。

4. 研究成果

【ペプチドの二次構造評価】

まず、RU006 に N-メチルアミノ酸を導入した 4 種のペプチドについて水溶液中にて二次構造評価を行ったところ、すべてのペプチドの CD スペクトル (100 μM) において 196 nm 付近に負の極大ピークが確認されたことからランダムコイル性が高いことが分かった。一方、ATR-FTIR スペクトルにより、RU006、[MeAla¹]-RU006 および [MeAla⁹]-RU006 で β シート性がみられたが、[MeAla³]-RU006 および [MeAla⁵]-RU006 へではランダムコイル性が支配的であった。これらのことから、ペプチド配列中央付近への N-メチルアミノ酸導入によって水素結合形成が阻害されたのではないかと考えられる。

次に、CTAB を模した C11-R および C8-GR について水溶液中にて二次構造評価を行ったところ、いずれのペプチドの CD スペクトル (10 mM) においても、210 nm 付近にわずかに負のピークがみられるものの、196 nm 付近に負の極大ピークが確認されたこと、また、ATR-FTIR スペクトルからは 1620 cm⁻¹ 付近に小さなピークが確認されたものの 1655 cm⁻¹ 付近に明瞭なピークがみられたことから、水素結合によりわずかに β-シート性を示すもののランダムコイル構造が支配的であると思われる。

【ペプチドの自己集合体形態評価】

RU006 に N-メチルアミノ酸を導入した 4 種のペプチドについて水溶液中のペプチド自己集合体形態評価を行ったところ、AFM 観察より高さ 2.5~4 nm、TEM 観察より径が約 50 nm であるディスク状集合体を形成していると思われる。

一方、CTAB を模した C11-R および C8-GR について水溶液中の自己集合体形態評価を行ったところ、TEM 測定の結果より C11-R は 0.1 mM~1.0 mM の範囲では空洞のある集合体を形成し、5.0 mM~10 mM ではディスク状の集合体が凝集した厚みのある集合体になった。そのサイズは 0.1 mM~5.0 mM では約 200 nm~600 nm であり、10 mM では 1 μm 以上あることが分かった。これは界面活性剤を模倣した両親媒性のペプチドであるため、低濃度では疎水性相互作用と水素結合により集合体内に水分が存在する集合体を形成し、乾燥することで空洞のある集合体が得られたと考えられる。また、高濃度では空洞のある集合体が重なることで厚さのある比較的大きな集合体が得られたと考えられる。

C8-GR では 0.1 mM でディスク状の集合体となり、0.5 mM ではそれらがさらに凝集した集合体であると考えられる。1.0 mM は小さな粒状の集合体が凝集した形態をとり、5.0 mM~10 mM はアマーバ状の集合体が得られた。そのサイズは 0.1 mM~0.5 mM、5.0 mM~10 mM は 200 nm~1 μm と比較的大きな集合体で 1.0 mM では 50 nm と径が小さな集合体が得られた。これは C8 ペプチドが C11 ペプチドと比べグリシンを持つため水素結合しやすく、濃度依存的に集合体が凝集し、ディスク状の薄い集合体から粒状やアマーバ状の凝集した厚い集合体に変化したと考えられる。

【ペプチドを鑄型とする金ナノ粒子合成】

まず、RU006 に N-メチルアミノ酸を導入した 4 種のペプチドを鑄型とする金ナノ粒子合成について検討した。ペプチド水溶液 (100 μM) と塩化金酸水溶液 (100 μM) を 1:1 で混合し、40 °C で 1 日、25 °C で 6 日間インキュベーションを行い、金ナノ粒子合成を行った。RU006 は

再現性よく金ナノリボンを生成し、520 nm 付近に金ナノ結晶特有の表面プラズモン共鳴に由来する吸収ピーク (SPR バンド) が見られた。N-メチルアミノ酸を導入したペプチドについて、吸収スペクトル測定の結果、[MeA¹]-RU006 および [MeA⁹]-RU006 は、520 nm 付近から 800 nm にかけてブロードした SPR バンドがみられた。[MeA³]-RU006 および [MeA⁵]-RU006 については、RU006 に比べて弱い SPR バンドがみられた。TEM 観察の結果、[MeA¹]-RU006 および [MeA⁹]-RU006 はリボン状金ナノ結晶を生成し、[MeA³]-RU006 および [MeA⁵]-RU006、異方性の低い金ナノ粒子が得られた。これらより、ペプチド配列中央付近に N-メチルアミノ酸を配置することで金ナノ結晶成長のための鑄型形成に影響を与えることがわかった。残念ながら、RU006 を基に設計した 9 残基からなる N-メチルアミノ酸含有ペプチドはリボン状の異方性金ナノ粒子合成の鑄型となりうるということがわかったが、金ナノロッド合成には至らなかった。

次に、CTAB を模した C11-R および C8-GR を鑄型とする金ナノ粒子合成を検討した。分散したペプチド水溶液 (0.2 mM, 1.0 mM, 2.0 mM, 10 mM, 20 mM) と塩化金酸水溶液 (100 μM) を 1 : 1 で混合し、還元剤としてアスコルビン酸 (1.0 mM) を加え、25 °C で 1 日間インキュベーションを行うことで金ナノ粒子合成を行った。また、銀イオン添加効果を調べるために、硝酸銀 10 μM を含む水溶液中にて金ナノ粒子合成を行った。さらに、硝酸銀 10 μM を含む水溶液にペプチド濃度と等しい濃度の臭化ナトリウムを含む水溶液中においても金ナノ粒子合成を行った。

まず、C11-R または C8-GR と塩化金酸、アスコルビン酸を含む水溶液中にて金ナノ粒子合成を行ったところ、いずれのペプチド濃度においても異方性金ナノ粒子の存在を示す吸収スペクトルが得られた。TEM 観察より、C11-R では円形で外側に行くにつれ細かく枝分かれしたような金ナノ粒子が得られ、C8-GR では長い結晶が折れたような形状の金ナノ粒子が得られた。

硝酸銀を 10 mM 含む反応では、C11-R の場合、異方性のある金ナノ粒子と比較的小さな粒状の金ナノ粒子が得られ、C8-GR の場合、無添加と比べて大きな変化は見られなかった。これは硝酸銀が金ナノ粒子合成の際に使用する界面活性剤のヘッド間の反発を防ぐ効果が知られており、その効果によって比較的小さな粒状の金ナノ粒子が得られたと考えられる。一方、C8-GR ではペプチド間の水素結合が強いため、金ナノ粒子生成に影響が少なかったと考えられる。

臭化物イオンを添加すると、いずれのペプチドも生成する金ナノ粒子の数が減少していることが分かった。また、ペプチド濃度および臭化物イオン濃度が増加するにつれて多角形状やプレート状の金ナノ粒子が観察された。これは、臭化物イオンが生成した金ナノ粒子表面に作用することで、臭化物イオン非存在下では粒状の結晶が、存在下では多角形状の結晶やプレート状の金ナノ粒子が合成されたと考えられる。上述のように、ペプチドのみ使用する条件では、金ナノロッドの合成には至らなかったが、ペプチドの構造や濃度、添加物により金ナノ粒子の形状を制御できる可能性が示唆された。

最後に、CTAB を用いる一般的な金ナノロッド合成法をもとに、細胞毒性の CTAB をペプチドで置換する合成法を検討した。まず、金の種結晶を CTAB 溶液 (0.20 M, 50 mL) と塩化金酸溶液 (0.050 mM, 0.50 mL) を混合し NaBH₄ (0.010 M, 0.060 mL) を添加し激しく攪拌することで調製した。金ナノロッド成長溶液として CTAB 溶液 (0.10 M, 0.20 mL) に対して必要に応じてペプチド溶液 (0.10 M) を混合し、50 °C で 10 分間攪拌し室温まで冷却した。その後、塩化金酸溶液 (0.50 mM, 0.20 mL) および硝酸銀 (2.0 mM, 10 μL) を混合し、アスコルビン酸 (15.76 mM, 7.0 μL) を加えて攪拌し、直ちに種結晶溶液 (2.4 μL) を添加し攪拌後、25 °C で 1 日間静置した。

従来の金ナノロッド合成法をもとに CTAB に対してペプチドを 1%, 5%, 10% の割合で置換して金ナノ粒子の合成を行った場合、吸収スペクトルの測定および TEM 形態観察の結果より、いずれのペプチドもペプチド濃度の増大に伴い金ナノロッドのアスペクト比が減少する傾向にあった。アスペクト比減少率は、C8-GR より C11-R の方が大きい傾向にあった。以上の結果より、ペプチドを混合するとアスペクト比が減少したことから、各ペプチドが成長過程の金ナノ粒子の長軸先端に吸着することによって長軸方向への成長を制限するか、またはペプチドが成長過程の金ナノ粒子への CTAB の結合を阻害し、CTAB の異方的なミセル構造が影響を受けたのではないかと考えられる。

【まとめ】

金ナノロッド合成を合成する方法として細胞毒性の CTAB を用いる方法が一般的である。しかし、金ナノロッドを合成後、金表面から CTAB を剥離し、次いで標的細胞・組織ターゲティングのためのシグナル分子を結合することが必須であり、CTAB を使用する従来法を医療分野にて応用するためには、毒性および工程数共に減じる必要がある。本研究では、細胞毒性の CTAB の代替物としてペプチドを利用することを提案した。本研究により、ペプチドを金ナノ粒子合成における鑄型として用いることは可能であるが、ペプチド単独では金ナノロッド合成は困難であることが分かった。しかし、高濃度の CTAB を必要とした従来法から、CTAB をペプチドに置換することで CTAB の濃度 (使用量) を減じながらも金ナノロッドの合成が可能であったことから、ターゲティング配列を付加したペプチドを金ナノロッド合成の鑄型として用いることで、薬剤調製における工程数の削減に寄与すると思われる。以上より、本研究成果は、ガン等に対するフォトサーマル療法への応用へと繋げることが可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 3 件、査読有）

1. Tomizaki, K.-Y.; Yamaguchi, Y.; Tsukamoto, N.; Imai, T. “ α -Helical Peptide–Gold Nanoparticle Hybrids: Synthesis, Characterization, and Catalytic Activity” *Protein & Peptide Letters*, **2018**, *25(1)*, 56–63, doi: 10.2174/0929866525666171214113324.
2. Tomizaki, K.-Y.; Nanbu, R.; Kasuga, M.; Imai, T. “Incorporation of an *N*-Methyl Amino Acid into a Template Peptide Alters Anisotropy in the Crystal Growth of Gold Nanoparticles Synthesized by the Peptide Template Method” *Protein & Peptide Letters*, **2018**, *25(1)*, 48–55, doi: 10.2174/0929866525666171214105611.
3. Tomizaki, K.-Y.; Kishioka, K.; Kataoka, S.; Miyatani, M.; Ikeda, T.; Komada, M.; Imai, T.; Usui, K. “Non-Covalent Loading of Anti-Cancer Doxorubicin by Modularizable Peptide Self-Assemblies for a Nanoscale Drug Carrier” *Molecules* **2017**, *22*, 1916–1923, doi: 10.3390/molecules22111916.

〔学会発表〕（計 4 件）

1. 塚本直幸・今井崇人・富崎欣也「脂肪鎖含有ペプチドの合成と金ナノ粒子合成におけるペプチド濃度の影響（1P-065）」第 12 回バイオ関連シンポジウム、2018 年 9 月、大阪大学（吹田市）
2. Tsukamoto, N.; Imai, T.; Tomizaki, K.-Y. “Effect of surfactant-like peptides on gold nanoparticle synthesis (2PB-116)” 日本化学会第 98 春季年会、2018 年 3 月、日本大学（船橋市）
3. Tsukamoto, N.; Imai, T.; Tomizaki, K.-Y. “Synthesis of Fatty Acid Containing Peptides and Their Use for Gold Nanocrystal Synthesis as Templates” The 54th Japanese Peptide Symposium, Osaka, Japan, November, 2017 (P-125).
4. 塚本直幸・今井崇人・富崎欣也「脂肪鎖含有ペプチドの合成と金ナノ粒子合成における鑄型効果（2PB-60）」第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017 年 9 月、東京大学（東京都）

〔図書〕（計 0 件）

特になし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

特になし

○取得状況（計 0 件）

特になし

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究分担者

特になし

(2)研究協力者

特になし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。