

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K05939

研究課題名(和文) 指定時間配送先ラベル付きタンパク質性ナノキャリアの開発

研究課題名(英文) Development of Proteinaceous Nanocarrier with the set time delivery address

研究代表者

小池 あゆみ (KOIKE, Ayumi)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・教授

研究者番号：20454176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：シャペロニンGroEL/GroESが複合体内部に変性タンパク質以外の物質(金属ナノ粒子、化合物、核酸)を閉じ込め、GroESに結合した核移行シグナル配列によって5～7時間後には内包物ごと核に送達できることを示した。また、フラーレンをシャペロニンに内包して細胞投与することで、フラーレンによる核酸損傷に起因する小核発生率を向上させる効果を示した。GroELの2つの空洞にGroESを結合する際にヌクレオチドを使い分けることにより、2種の金属粒子を順に閉じ込めた四者複合体を形成できたことから、異なる薬剤を閉じ込めて運ぶキャリアとしての応用の可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物の薬理効果は、特定の標的部位に薬物分子が結合し、作用することによって発現される。不安定なゲスト分子を分解から保護しながら、特定の標的部位に運び、必要なときに放出することができるナノキャリアの開発は、薬物の十分な薬理効果の発揮のために重要である。本研究では、すべての生物がもつカプセル型タンパク質のシャペロニンが、ATP加水分解時間と細胞内局所送達のためのシグナル配列付与を遺伝子工学的に改変することで、望みの時間に標的部位に薬剤を送達する(時間的・空間的制御)キャリアとして応用できる可能性を、細胞に対する投与実験で示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that the chaperonin GroEL / GroES trapped a substance different from the denatured protein, which is the original substrate, inside the complex, and the nuclear localization signal sequence bound to GroES resulted in the nucleus together with the inclusions after 5 to 7 hours. In addition, by encapsulating fullerenes in chaperones and administering them to cells, the effect of improving the incidence of micronuclei caused by nucleic acid damage caused the fullerene derivative was shown. By properly using different types of nucleotides when binding GroES to each of the two cavities of GroEL, a quaternary complex in which two types of metal particles were confined in order could be formed. Therefore, we were able to show that chaperonin can be applied as a carrier that separates and simultaneously traps and carries two drugs.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：シャペロニン GroEL ナノカプセル ドラッグデリバリー

### 1. 研究開始当初の背景

薬の薬理効果を十分に発揮するためには、必要な量を望みの時間に標的部位に送達すること(時間的・空間的制御)が重要である。薬物自身にそれらの性質を持たせることは難しく、脂質や高分子を用いたキャリアに放出制御性や標的指向性を付与する手法が従来は試みられていた。

薬物送達システム(DDS)の担体としては、薬剤を封入したリポソームをエンドサイトーシス機能を利用して細胞に取り込ませる研究例が先行する。リポソームをDDS担体として使用するためには、膜受容体へ結合するリガンド、細胞表面に露呈するタンパク質を認識する抗体を備えるなど、細胞に認識させる部分はタンパク質に担わせる手段が挙げられる。薬物送達キャリアは、毛細血管を通過できるサイズであり且つ均一な大きさであることが望ましいところ、リポソームは粒径を均一に調整することが困難であるという課題がある。また、受容体を認識担体として結合すると粒径が大きくなり毛細血管の通過等の点で問題が生じる可能性がある。更に、効率的な受容体結合も簡単ではない。また、リポソームに内包させた薬物の放出は、リポソーム自体の構造上の工夫及び超音波発生機等の特定装置を使用した開閉制御手段が必要となり、容易な開閉制御が困難であるため、リポソームに代わるDDS担体の技術開発は意義がある。

### 2. 研究の目的

シャペロニン(GroEL/GroES)を、①不安定なゲスト分子を分解から保護しながら、②特定の標的部位に運び、③必要なときに放出することができるナノサイズの薬剤キャリアとして利用することを目的とした。

GroELは、14量体ダブルリング構造をしており、リング内部に直径約5nmの空洞を持つタンパク質性ナノカプセルである(図1)。細胞内では、空洞に変性タンパク質を閉じ込めて構造形成させ、ATPの加水分解が終了すると蓋(GroES)が開いてゲストタンパク質を放出する。ATP加水分解に関わる変異体は蓋の開閉時間を野生型よりも遅延させるため、加水分解時間をカプセル開閉のタイマーとして利用できる。また、シグナル配列を遺伝子工学的に結合することで細胞内局所送達が可能になるため、シャペロニンの本来の基質である変性タンパク質の代わりに薬剤を閉じ込めて標的部位に送達する担体としての応用を検討する。

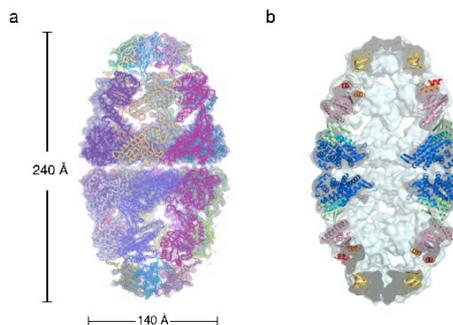


図1 シャペロニン複合体の立体構造

### 3. 研究の方法

研究開始当初までに、予備実験として、Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) 核送達シグナルを融合したGroESと野生型GroELで作製した複合体の空洞内にGFPタンパク質を閉じ込めて、動物細胞外から投与した三者複体内のGFPが核に到達したことを確認した。GFPはGroEL/GroESの基質タンパク質であるが、より一般的なナノキャリアとしての有効性を確認するために、タンパク質以外の物質を閉じ込めて細胞内局所へ運び、運んだ薬剤による薬理活性効果の検証することで、内包物の汎用性を検討した。また、1分子のGroELの2つの空洞に異なる2種の物質を閉じ込め四者複合体を作製する方法の開発を行うために、2つの空洞を制御して蓋をする方法も検証した。さらに、細胞内への安定な導入が望まれている核酸の担体としての有効性を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 2種の内包物を閉じ込めたシャペロニン複合体の形成

GroELの2つの空洞は、1つめの空洞にADPを用いてGroESを結合させ、後からもう片方の空洞にATPを用いてGroESを結合させると、異なる物質をそれぞれの空間に順番に閉じ込めることが可能であるとこれまでの研究から予想した。そこで、内包物に金属ナノ粒子(NP)を用い、電子顕微鏡で複合体形成を解析した。

GroELを、Pt NPsまたはAu NPsと混合後、GroESとADP・BeFxを結合させて弾丸型複合体を調製した(Pt NP/EL/ES/ADP・BeFx、Au NP/EL/ES/ADP・BeFx)。さらに、FePt NPを混合後、GroESとATPを混合してフットボール型複合体を形成した(Pt NP/EL/ES/ADP・BeFx\_FePt NP/ES/ATPまたはAu NP/EL/ES/ATP)をリンモリブデン酸でネガティブ染色し、STEM-EDSを行ったところ、Au NPの輝度からNPを内包したEL/ES/ATPのチャンバーを区別でき、EDS分析ではNPが存在する場所のみAu M<sub>α</sub>(2.120 keV)、Au L<sub>α</sub>(9.712 keV)のピークを示した(図2b)。一方、NPを含まない場所ではこのようなピークが観察されなかった。したがってTEM画像でシャペロニン複合体の中央に観察されるNPが、複体内に閉じ込められた金属ナノ粒子であることを示した。次に、図3aのスキームで2種類の粒子をGroEL/GroESに順番に内包し、TEM観察したところ、金属NPのコントラストや粒径の違いから、FePt NP存在下でPt NP/EL/ES/ADP・BeFx(図3e)またはAu NP/EL/ES/ADP・BeFxを用いてフットボール型複

合体を形成した試料には、Pt NP と FePt NP または Au NP と FePt NP を同時に内包したフットボール型EL/ES複合体が観察できた(図3 fg)。この結果から、GroEL/GroES複合体は金属の種類によらず直径~8 nmの金属ナノ粒子を内包することができ、Pt NP または Au NP と FePt NP を同時に内包したEL/ES複合体は、GroELの反応機序に従って粒子を順番に内包したことが示された。

## (2) 局所送達シグナル付与型シャペロニンの作製と局所送達の検証

GroESに核輸送シグナル配列を遺伝子工学的に融合し、GroEL/GroES複合体の細胞内局所送達カプセルとしての機能を検証した。Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)の amino acid sequenceの12~38に存在する核移行シグナル配列をGroES<sup>WT</sup>のN末端に融合したGroES<sup>N-AhR</sup>、GroES<sup>N-AhR</sup>のN末端またはC末端にPTD配列(RKKRR、RRRRR)を付加した膜透過ペプチド融合GroESを作製し、精製した。各種GroES変異体は、いずれも単独では凝集性が高く、7量体構造が不安定であることがHPLCゲル濾過クロマトグラフィーでわかった。そこで、GroES<sup>WT</sup>と混合し4°Cで一晩静置後にゲル濾過クロマトグラフィーで分析したところ、GroES<sup>WT</sup>の混合比が4/7以上で安定なヘテロ7量体を形成し、ATP存在下でGroEL<sup>D52/398A</sup>と複合体を形成した。そこで、Cy3で蛍光標識したGroES<sup>WT</sup>と1:6で混合し、FITCで蛍光標識したGroEL<sup>D52/398A</sup>(ATP加水分解を遅くした変異体)と各々のCy3-GroES変異体を、1 mM ATP存在下で複合体形成後、限外濾過によりシャペロニン複合体を精製した。FITC-GroEL<sup>D52/398A</sup>/Cy3-GroES変異体の複合体をチャイニーズハムスター肺由来腺維芽細胞(CHL細胞)に添加したところ、GroES<sup>N-PTD/AhR</sup>は、細胞添加後5時間以内に細胞質に、4~7時間で核に到達したことが顕微鏡観察で確認できた。また、GroES<sup>N-AhR</sup>も細胞添加後7時間以内に細胞質に、7~10時間で核に到達した。以上より、輸送シグナル配列とPTDを組み合わせることで、簡便に効率的局所送達が可能になると示された。また、異なる修飾を施したGroESを混合して静置するだけで、複数の機能を付与できることが示されたことは、DDS担体としての応用に大変有利であると考えられる。

## (3) GroEL/GroES内包物の核輸送

フラーレン(C<sub>60</sub>)をGroEL/GroES複合体に内包し、細胞投与した。C<sub>60</sub>の生理活性測定は、C<sub>60</sub>内包GroES<sup>N-AhR</sup>/GroEL<sup>D52A/D398A</sup>またはGroES<sup>N-PTD/AhR</sup>/GroEL<sup>D52A/D398A</sup>複合体をCHL細胞に添加し、24時間の培養後に45 mJ/cm<sup>2</sup>のUVAを細胞に照射し、細胞固定と蛍光染色を経て小核発生率を算出した。その結果、C<sub>60</sub>/GroES<sup>N-AhR</sup>/GroEL<sup>D52A/D398A</sup>複合体はC<sub>60</sub>単独で細胞投与したものと比較して小核発生率が1.5倍に増加し、

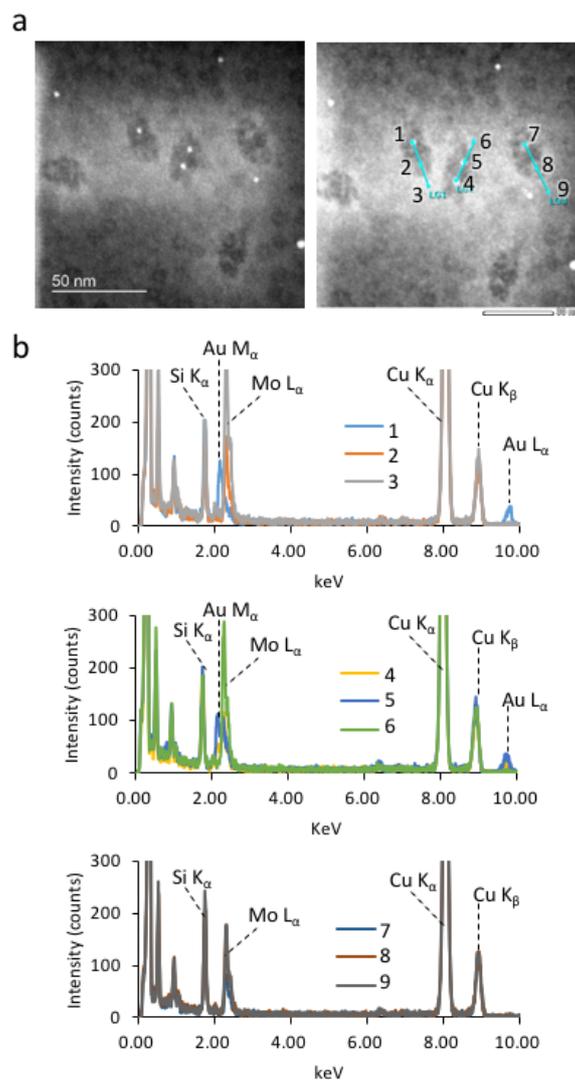


図2 Auナノ粒子を内包したGroEL/GroES複合体のSTEM-EDS解析  
(a) STEM dark-field images (b) 1-9のEDS spectrum

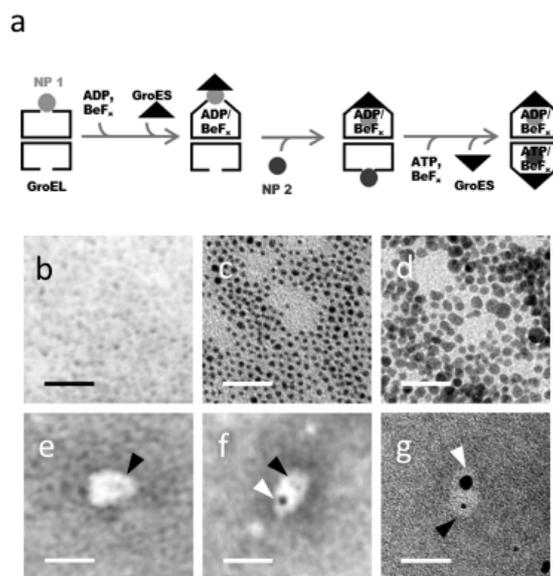


図3 2種の金属ナノ粒子の複体内包  
(a) The reaction scheme. TEM images of (b) Pt, (c) Au, (d) FePt NPs, (e) Pt NP/GroEL/GroES/ADP·BeFx, (f) Pt NP/EL/ES/ADP·BeFx\_FePt/ES/ATP and (g) Au NP/EL/ES/ADP·BeFx\_FePt/ES/ATP. All scale bars are 20 nm.

C60/GroES<sup>N-PTD/AhR</sup>/GroEL<sup>D52A/D398A</sup> 複合体は 1.4 倍に増加した。この結果より、C<sub>60</sub> はシャペロニン複合体に内包することで細胞核近傍まで到達可能になり、DNA 損傷効率が上昇した可能性が考えられた。

次に、細胞核への核酸輸送への応用を検証するために、Alexa488 標識 DNA を粒径 2.2 nm の金ナノ粒子に吸着させ、GroEL (D52, 398A)/GroES に内包させ細胞投与した。蛍光顕微鏡観察の結果、核酸結合金ナノ粒子/GroEL/GroES 複合体は添加後 8 時間の細胞内に蛍光シグナルが見られ、14 時間後も形態の変化無く蛍光シグナルを維持した。核酸結合金ナノ粒子のみを投与した場合は、試料が培地中で凝集し細胞内到達はなかったことから、GroEL/GroES 複合体が細胞内移行に寄与することが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 増田恵, 依田ひろみ, 小池あゆみ	4. 巻 B-43
2. 論文標題 様々な反応サイクル時間をもつGroEL変異体のデザイン	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 神奈川工科大学研究報告.B, 理工学編	6. 最初と最後の頁 21-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 増田 恵、 依田 ひろみ、 小池 あゆみ	4. 巻 43
2. 論文標題 様々な反応サイクル時間をもつGroEL 変異体のデザイン--材料分析室利用研究成果、そのXXIX(3)--	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 神奈川工科大学研究報告.B, 理工学編	6. 最初と最後の頁 21-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 増田恵, 村越のどか, 依田ひろみ, 小池あゆみ	4. 巻 45
2. 論文標題 Asp73とAsp420は酵母ミトコンドリアHsp60のATP加水分解に重要な役割を果たす	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 神奈川工科大学研究報告.B, 理工学編	6. 最初と最後の頁 27-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoda Hiromi, Koike-Takeshita Ayumi	4. 巻 70(3)
2. 論文標題 TEM and STEM-EDS evaluation of metal nanoparticle encapsulation in GroEL/GroES complexes according to the reaction mechanism of chaperonin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 289-296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfaa064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 依田ひろみ, 小池あゆみ
2. 発表標題 シャペロン複合体を利用した金属ナノ粒子の平面上への配置
3. 学会等名 第75回学術講演会日本顕微鏡学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加賀美奈音, 岩田 友佑, 丹羽 達也, 田口 英樹, 小池 あゆみ
2. 発表標題 Thermus thermophilus GroELのリン酸化とオリゴマー安定性の関係
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根木麻耶加, 依田ひろみ, 小池あゆみ
2. 発表標題 GroEL/GroES複合体を利用した生細胞へのナノ粒子薬剤局所送達システムの検討
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田 恵, 野村 弥南, 小池 あゆみ
2. 発表標題 GroESの違いによるGroELのシャペロン活性への影響
3. 学会等名 極限環境生物学会第20回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田 恵, 野村 弥南, 小池 あゆみ
2. 発表標題 GroESの違いによるGroELのシャペロニン活性への影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 依田ひろみ, 小池あゆみ
2. 発表標題 シャペロニンタンパク質の形状と性質を利用した金属ナノ粒子の配置制御への取り組み
3. 学会等名 電気化学会第87回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林耕太, 西嶋政樹, 小池あゆみ
2. 発表標題 シャペロニンを反応場とした2-アントラセンカルボン酸のエナンチオ区別光環化二量化反応の検討
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い 夏のセミナー-2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 根木麻耶加, 依田ひろみ, 小池あゆみ
2. 発表標題 DDSキャリアを目指したシャペロニンGroEL/GroES複合体の改変
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い 夏のセミナー-2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村弥南, 小池あゆみ
2. 発表標題 GroES様タンパク質であるGp31とTMA_044のGroELへの結合強度の解析
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田理帆グミラルル, 増田恵, 小池あゆみ
2. 発表標題 等温滴定型熱量測定を用いたGroEL/GroES複合体の解析
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加賀美奈音, 小池あゆみ
2. 発表標題 シャペロニンGroEL/GroESのリン酸化による反応調節機構の解析
3. 学会等名 日本生物工学会東日本支部第13回学生発表討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 根木麻耶加, 依田ひろみ, 小池あゆみ
2. 発表標題 DDSキャリアを目指したシャペロニンGroEL/GroES複合体の改変
3. 学会等名 第7回日本生物工学会東日本支部コロキウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 耕太, 西嶋 政樹, 荒木 保幸, 和田 健彦, 小池あゆみ
2. 発表標題 シャペロニンによる 2 アントラセンカルボン酸のエナンチオ区別光環化二量化反応の制御
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田 恵, 依田 ひろみ, 前田 理帆グミラルル, 小池 あゆみ
2. 発表標題 GroEL 自己重合によるタンパク質性ナノチューブ
3. 学会等名 電気化学会第86回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三枝桃子, 野村弥南, 小池あゆみ
2. 発表標題 GroESのモバイルループがGroESの機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 増田恵, 鈴木のぞみ, 高橋淳聞, 小池あゆみ
2. 発表標題 GroELのATP加水分解に関わる新規変異体の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ComBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前田理帆グミラルル, 依田ひろみ, 増田恵, 小池あゆみ
2. 発表標題 高濃度ATP条件で形成されるGroELチューブ
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ComBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野村弥南, 三枝桃子, 小池あゆみ
2. 発表標題 GroESのモバイルループがシャペロニン機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第6回日本生物工学会東日本支部コロキウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 依田ひろみ, 小池あゆみ
2. 発表標題 金属ナノ粒子の機能的配置を目指したシャペロニンタンパク質の利用
3. 学会等名 電気化学会第85回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加賀美 奈音, 増田 恵, 丹羽 達也, 田口 英樹, 小池 あゆみ
2. 発表標題 Thermus thermophilus GroELの熱ストレスにより誘導されるリン酸化部位の同定
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 依田ひろみ, 安倍和弥, 武尾英哉, 高村岳樹, 小池あゆみ
2. 発表標題 画像認識技術を利用した小核計測アプリケーションの開発
3. 学会等名 日本環境変異原学会第49回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 GroEL含有液、その製造方法及びその使用方法	発明者 小池あゆみ, 前田理帆, 帆ゲミラル, 依田ひろみ	権利者 学校法人幾徳学園 神奈川工科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-210088	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	高村 岳樹  (TAKAMURA TAKEJI)  (50342910)	神奈川工科大学・404・20    (32714)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------