

令和元年6月12日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14517

研究課題名(和文) 微小管のらせん状内部骨格を鋳型とした金属ナノ粒子の周期的配列形成

研究課題名(英文) Creation of periodic pattern of metal nanoparticles on helical lattice of internal skeleton of microtubules

研究代表者

稲葉 央 (INABA, Hiroshi)

鳥取大学・工学研究科・助教

研究者番号：00778011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微小管内部表面に結合するTau由来ペプチドTPを開発し、TPを用いて微小管内部への金属ナノ粒子の導入とその周期的配列形成を目指した。4種類のTPを設計し、そのうちの1つが微小管内部に結合することを見出した。このペプチドを用いることで金ナノ粒子およびCoPtナノ粒子を微小管に内包することに成功した。これら金属ナノ粒子の内包によって微小管の構造や配向を制御できるという新たな知見を得た。本研究を通じ、TPを用いて金属ナノ粒子をはじめとする様々な分子を微小管に内包するための基盤技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、チューブ状タンパク質集合体である微小管の内部空間に着目し、その内部空間に分子を導入するためのペプチドの開発に成功した。このペプチドを用いることで様々な金属ナノ粒子の微小管への内包を達成し、これら内包により微小管の構造や配向を制御できることを見出した。微小管からなるナノマテリアル開発に新たな展開を示すと同時に、微小管を標的とした薬剤設計や、生体環境における微小管の理解につながる基盤技術を構築した。

研究成果の概要(英文)：Microtubules are major components of cytoskeleton, which are tubular architectures with 15 nm inner diameter consisting of tubulin protein dimers. In this work, we developed a Tau-derived peptide (TP) which binds to the inner surface of microtubules and encapsulated metal nanoparticles by using TP. We designed four peptides and showed that one of the peptides could bind to the inside of microtubules. By using the peptide, gold nanoparticles and CoPt nanoparticles were encapsulated inside microtubules. Notably, structures and orientation of microtubules were modulated by the encapsulation. In summary, we established a proof of concept for molecular encapsulation inside microtubules to create microtubule-based nanomaterials.

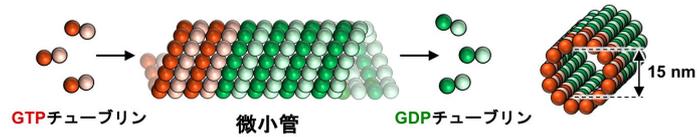
研究分野：生体機能関連化学

キーワード：微小管 チュープリン ペプチド Tau 分子内包 金属ナノ粒子 生体材料 ナノマテリアル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞骨格の一種である微小管 (Microtubule) は、チューブリンダイマーが重合して形成される内径 15 nm、長さ数 μm ~ 数十 μm のチューブ構造体であり、細胞の形態保持・運動・



物質輸送などに重要な役割を果たしている (図 1)。微小管を材料の観点から見ると、高い剛直性、可逆的な重合・脱重合、外部表面におけるモータータンパク質の運動性などから、ナノマテリアル開発のための魅力的なビルディングブロックであるといえる。微小管を用いることで、これまでに金属ナノ粒子の集積・解離や分子輸送システム、基板上における運動や集合体形成制御などが達成されている (総説 H. Hess, J. L. Ross, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 5570; A. M. R. Kabir, A. Kakugo, *Polym. J.* **2018**, *50*, 1139)。これら微小管の機能化は全て微小管の外部表面への分子修飾により行われており、微小管が有する内部空間に着目した材料開発は皆無であった。微小管に分子を内包できれば、内包分子の配列化や安定化、モータータンパク質を利用した分子輸送、脱重合による放出など、微小管を用いたナノマテリアル開発の新たな手法となりうる。

(2) 一方、金属ナノ粒子を鋳型物質上に配列させることで、単体では得られない光学・電気・磁性特性を示すことが明らかとなり、次世代のナノ材料として注目を集めている (総説 N. A. Kotov et al., *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 3114)。例えば、DNA 折り紙上にらせん状に配列した金ナノ粒子がキラルな表面プラズモン共鳴を示すことが報告され、負の屈折率など、従来の常識を覆す材料の開発が期待されている (T. Liedl et al., *Nature*, **2012**, *483*, 311)。しかし、従来の鋳型では金属ナノ粒子を精密かつ大量に配列化させることは困難であり、新たな鋳型分子が求められている。そこで、微小管の内部に金属ナノ粒子を導入できれば、そのらせん状内部骨格を鋳型として精密に金属ナノ粒子を配列化できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、天然に存在する微小管関連タンパク質 Tau に着目し、その部分配列を用いることで、微小管内部表面に選択的に結合するペプチドを開発した。このペプチドを用いることで、微小管内部空間を利用した金属ナノ粒子の配列化と新たな機能の創出を目指した。具体的には、(1) 微小管内部に結合する Tau 由来ペプチド (TP) の開発、(2) TP を用いた微小管内部への金ナノ粒子の導入、(3) TP を用いた磁性 CoPt ナノ粒子内包微小管の構築と磁場による配向制御を目指した。

3. 研究の方法

TP の設計は分子力場計算 (MacroModel) によって Tau の部分配列とチューブリンとの相互作用を解析することで行った。TP およびその類縁ペプチドは、COMU を縮合剤とした Fmoc 固相法により合成し、逆相 HPLC により精製、MALDI-TOF-MS によって同定を行った。TP の蛍光ラベルはマレイミド化された tetramethylrhodamine (TMR) と TP のシステインとの反応により行った。チューブリンは研究協力者である角五准教授により提供された。TP を複合化した微小管は共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (CLSM) によって観察した。金ナノ粒子、CoPt ナノ粒子の微小管への内包は透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察によって確認した。

4. 研究成果

(1) Tau 由来ペプチド TP の設計と微小管への結合評価

これまでに、Tau の繰り返し配列の一部が微小管内部のポケットに結合すると示唆されていた (L. A. Amos et al., *EMBO J.*, **2003**, *22*, 70; M. Zweckstetter et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 10347)。そこで、これら繰り返し配列をもとに 4 種類のペプチド

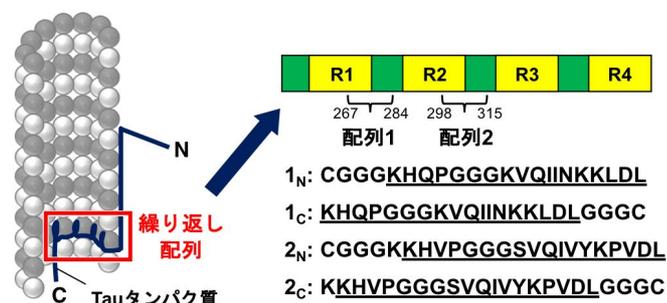


図 2. Tau 由来ペプチド (TP) の設計。下線部が Tau 由来の繰り返し配列 (1 および 2) を示している。

を設計した(図2)。Tauの配列1または2を用い、そのN末端またはC末端にリンカーを介して反応点としてシステインを導入した。これらペプチドに赤色蛍光色素であるTMRを修飾したTP-TMRを合成し、緑色蛍光色素 Alexa Fluor 430 (AF) でラベルしたAFチューブリンと複合させた後にGTPアナログであるGMPCPPを添加して重合することで、微小管への内包を試みた(図3a)。CLSMにより

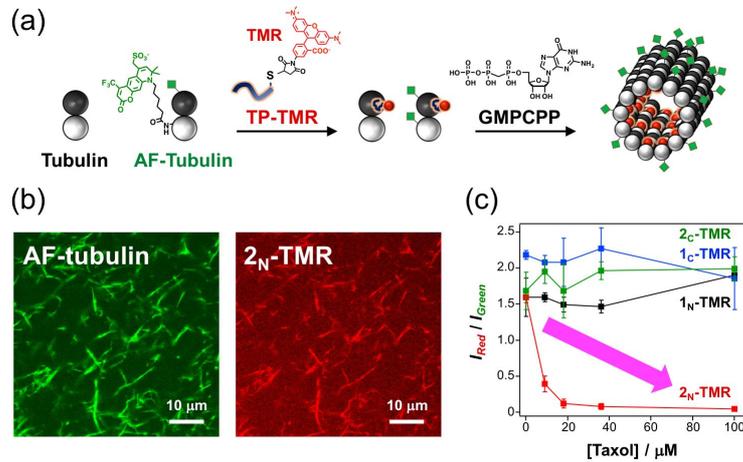


図3. (a) TMR ラベル TP (TP-TMR) の微小管への内包 (b) 2_N-TMR を導入した微小管の CLSM 像 (c) 微小管あたりの TP-TMR 蛍光強度の Taxol 濃度依存性

TP-TMR と AF ラベル微小管の共局在が確認され、全てのペプチドの微小管への結合が明らかとなった(図3b)。一方、微小管に結合した TMR 修飾 2_N (2_N-TMR) 由来の赤色蛍光は、微小管内側のポケットに結合することが知られている Taxol 濃度依存的に減少した(図3c)。したがって、2_N-TMR が微小管内側の Taxol 結合部位に結合していることが示唆された。一方、2_N以外のペプチドは Taxol による結合阻害を受けず、微小管外部表面に結合する抗チューブリン抗体によって結合が阻害されたことから、微小管の内部ではなく外部表面に結合していると考えられる。以上より、設計した4種類のペプチドのうち、2_Nのみが微小管内部に結合することが明らかとなった。したがって、以降の実験では2_Nを微小管内部表面結合ペプチドとして用いることとした。

(2) TPを用いた金ナノ粒子の微小管内部への導入

2_Nを用いることで、金ナノ粒子 (AuNP) の微小管内部への導入を試みた。2_N末端のシステインと AuNP (5 nm) との反応により 2_N修飾金ナノ粒子 (2_N-AuNP) を作製し、チューブリンと複合化後に重合することで微小管への内包を試みた(図4a)。抗チューブリン抗体を添加して微小管外部表面に結合した金ナノ粒子を除去することで、微小管内部への選択的な金ナノ粒子の導入が TEM で観察された(図4b)。一方、2_Nを修飾していない金ナノ粒子を用いた場合は金ナノ粒子の内包は確認されなかった。したがって、2_Nを用いることで金ナノ粒子を微小管に内包することに成功したといえる。現状では 2_N-AuNP

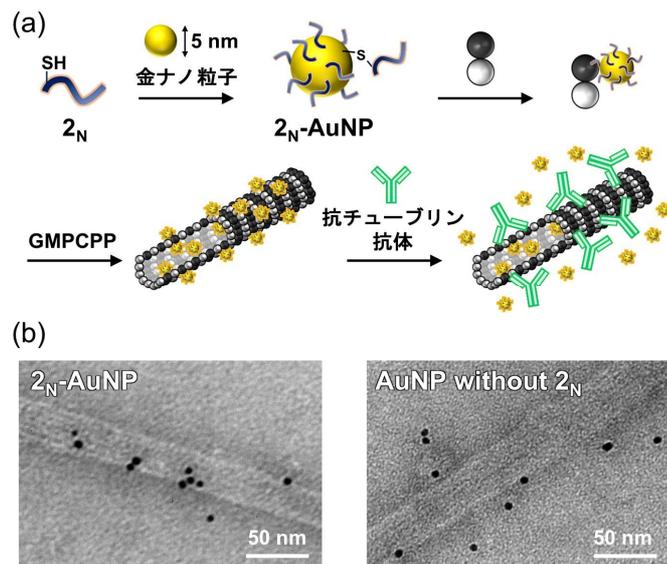


図4. (a) 2_N修飾 AuNP (2_N-AuNP) の微小管への内包 (b) 2_N-AuNP 内包微小管および 2_N未修飾の AuNP を添加した微小管の TEM 像

の微小管内部への導入率はそれほど高くなく、ナノ粒子が微小管内部で配列化している様子は確認されなかった。今後 AuNP に対する 2_Nの修飾率や、チューブリンへの当量を最適化することで、内包率が改善できると期待される。2_N-AuNP を内包した微小管の全長および剛直性の指標となる持続長を蛍光顕微鏡観察により測定したところ、通常の微小管に比べ長さが短く、剛直となっていることが明らかとなった。興味深いことに、キネシン固定基板上における 2_N-AuNP 内包微小管の運動速度は通常の微小管の約2倍に増加しており、微小管への 2_N-AuNP の内包が微小管の構造や物性に大きく影響することが明らかとなった。

(3) TP を用いた磁性 CoPt ナノ粒子内包微小管の構築と磁場による配向制御

2_N を用いて微小管内部に磁性 CoPt ナノ粒子を導入することで、磁場による微小管の配向制御を試みた。CoPt 結合ペプチド (HYPTLPLGSSTY; M. O. Stone et al., *Adv. Funct. Mater.*, **2004**, *14*, 25) と 2_N を連結したペプチド (CoPt- 2_N) を Fmoc 固相法により合成し、逆相 HPLC により精製、MALDI-TOF-MS で目的物を確認した。CoPt- 2_N を抗チューブリン抗体と複合化チューブリンと複合化し、 $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{PtCl}_4$ を添加後に NaBH_4 で還元することで、CoPt ナノ粒子内包微小管の構築を行った(図 5a)。TEM により微小管内部

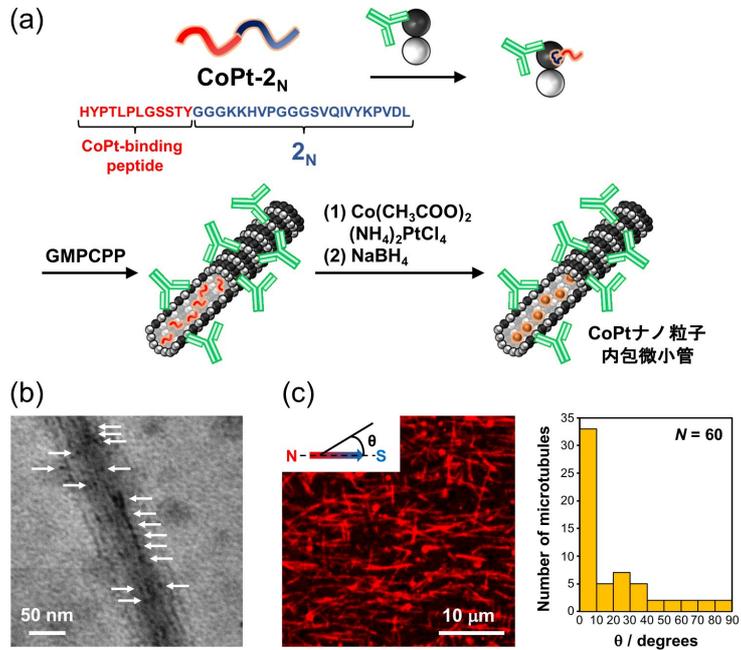


図 5. (a) CoPt 結合ペプチドと 2_N を連結した CoPt- 2_N による CoPt ナノ粒子内包微小管の構築 (b) CoPt ナノ粒子内包微小管の TEM 像および (c) 磁場による配向制御した CLSM 像

における CoPt ナノ粒子の集積が確認された(図 5b)。さらに、微小管固定化時にネオジウム磁石をプレートの下に配置することで、微小管が磁場に沿って配向した様子が CLSM により確認された(図 5c)。特に、磁場に対して $0-10^\circ$ の角度で配向している微小管が多く見られており、磁場による微小管の配向制御に成功した。

(4) TP の細胞内微小管への結合解析

2_N の応用展開の一つとして、このペプチドの細胞内微小管への結合解析を行った。GFP 融合チューブリン (Tubulin-GFP) を発現させたヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞に 2_N -TMR (10 μM) を添加し、6 時間培養したところ、 2_N -TMR の細胞内微小管への結合が CLSM により確認された(図 6)。薬剤や温度変化によって細胞内の微小管の重合および脱重合を誘起すると、 2_N -TMR が結合した微小管の重合および脱重合が確認されたことから、 2_N -TMR によって細胞内の微小管のダイナミクスを検出できることが示された。取り込みの温度依存性やエンドサイトーシスマーカーとの共局在を解析することで、 2_N -TMR がエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれ、その後一部がエンドソームから脱離して微小管に結合していることが示唆された。WST アッセイにより毒性評価を行ったところ、 2_N -TMR (10 μM) は HepG2 細胞に添加して 24 時間または 72 時間培養しても毒性を示さなかった。一方で細胞内の微小管結合骨格として用いられる Taxol や Colchicine は明確な毒性を示した。したがって、エンドソームからの脱離が課題であるものの、 2_N -TMR は細胞内の微小管を長時間モニタリングするためのツールとして有用であることが示された。今後は生細胞中の微小管を標的としたイメージングや細胞機能制御への応用が期待できる。

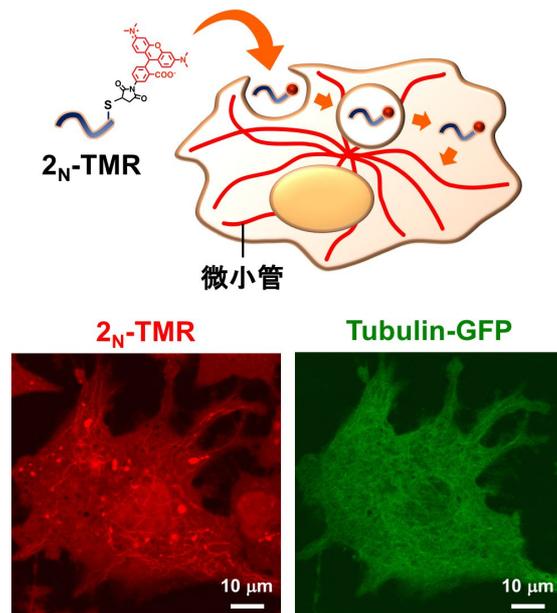


図 6. 2_N -TMR の細胞内取り込みおよび微小管への結合と CLSM 像

たところ、 2_N -TMR (10 μM) は HepG2 細胞に添加して 24 時間または 72 時間培養しても毒性を示さなかった。一方で細胞内の微小管結合骨格として用いられる Taxol や Colchicine は明確な毒性を示した。したがって、エンドソームからの脱離が課題であるものの、 2_N -TMR は細胞内の微小管を長時間モニタリングするためのツールとして有用であることが示された。今後は生細胞中の微小管を標的としたイメージングや細胞機能制御への応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- (1) Hiroshi Inaba, Kazunori Matsuura, Peptide Nanomaterials Designed from Natural Supramolecular Systems, *The Chemical Record*, 査読有, 19 巻, 2019, 843–858. DOI: 10.1002/tcr.201800149
- (2) Hiroshi Inaba, Takahisa Yamamoto, Arif Md. Rashedul Kabir, Akira Kakugo, Kazuki Sada, Kazunori Matsuura, Molecular Encapsulation Inside Microtubules Based on Tau-Derived Peptides, *Chemistry – A European Journal*, 査読有, 24 巻, 2018, 14958–14967 (**Hot Paper and Inside Cover**). DOI: 10.1002/chem.201802617

〔学会発表〕(計25件)

- (1) 山田菜由季, 山本昂久, 稲葉央, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, Tau 由来ペプチドを用いた磁性ナノ粒子内包微小管の創製, 日本化学会第 99 春季年会, 2019.
- (2) 山本昂久, 稲葉央, 岩崎崇, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, Tau 由来ペプチドを用いた緑色蛍光タンパク質内包微小管の創製, 日本化学会第 99 春季年会, 2019.
- (3) 稲葉央, ジュリアーノ三宅京美, 山本昂久, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, 環状 Tau 由来ペプチドの微小管への結合解析, 日本化学会第 99 春季年会, 2019.
- (4) 稲葉央, 山本昂久, 岩崎崇, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, ペプチドを用いた分子内包による微小管の機能改変, 第 2 回分子ロボティクス年次大会, 2019 (**若手研究奨励賞受賞**).
- (5) 稲葉央, 山本昂久, 岩崎崇, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, ペプチド設計に基づく微小管への分子内包と物性解析, 第 30 回高分子ゲル研究討論会, 2019.
- (6) 山田菜由季, 山本昂久, 稲葉央, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, Tau 由来ペプチドを用いた金属ナノ粒子内包微小管の創製, 2018 年日本化学会中国四国支部大会, 2018.
- (7) 山本昂久, 稲葉央, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, Tau 由来ペプチドを用いた微小管内部空間への緑色蛍光タンパク質の導入, 2018 年日本化学会中国四国支部大会, 2018.
- (8) 山田菜由季, 山本昂久, 稲葉央, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, Tau 由来ペプチドを用いた微小管内部空間への金属ナノ粒子導入, 第 67 回高分子討論会, 2018.
- (9) 山本昂久, 稲葉央, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, 機能分子内包微小管の構築を指向した Tau タンパク質由来ペプチドの開発, 第 67 回高分子討論会, 2018.
- (10) 稲葉央, 山本昂久, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, Tau 由来ペプチドの設計に基づく微小管への分子内包, 第 12 回バイオ関連化学シンポジウム, 2018.
- (11) Hiroshi Inaba, Takahisa Yamamoto, Arif Md. Rashedul Kabir, Akira Kakugo, Kazuki Sada, Kazunori Matsuura, Design of Tau-derived peptides for molecular encapsulation inside microtubules, The 79th Okazaki Conference, 2018.
- (12) 稲葉央, 山本昂久, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, 微小管内部に結合する Tau 由来ペプチドの創製と分子内包への応用, 第 28 回バイオ・高分子シンポジウム, 2018 (**若手研究者奨励講演賞受賞**).
- (13) 稲葉央, Tau 由来ペプチドを用いた微小管への分子内包, 第 11 回ナノバイオ若手ネットワークシンポジウム, 2018.
- (14) Hiroshi Inaba, Molecular encapsulation inside microtubules based on Tau-derived peptides, 1st Columbia “Molecules, Materials, Devices and Systems in Medicine” Workshop, 2018 (招待講演).
- (15) 山田菜由季, 山本昂久, 稲葉央, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, 微小管内部空間への酸化鉄ナノ粒子の導入, 第 67 回高分子学会年次大会, 2018.
- (16) 稲葉央, 小澤忠弘, 山本昂久, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, 蛍光ラベル化 Tau 由来ペプチドの微小管への結合解析, 日本化学会第 98 春季年会, 2018.
- (17) 山本昂久, 稲葉央, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, 微小管内部への分子導入を指向した Tau タンパク質由来のペプチド開発, 日本化学会第 98 春季年会, 2018.
- (18) 稲葉央, 山本昂久, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, Design of microtubule-binding peptides toward molecular alignment inside microtubule, 第 54 回ペプチド討論会, 2017 (**若手口頭発表優秀賞 (Good Stone Award) 受賞**).
- (19) 山本昂久, 稲葉央, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, Tau 由来ペプチドを用いた微小管内部空間への分子導入, 第 66 回高分子討論会, 2017.

- (20) 稲葉央, 山本昂久, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, 微小管内部への分子導入を指向した Tau タンパク質由来ペプチドの開発, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム, 2017.
- (21) 稲葉央, ペプチド設計に基づく微小管ナノ空間への分子配列, 第 33 回若手化学者のための化学道, 2017 (招待講演).
- (22) 稲葉央, 山本昂久, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, ペプチド分子設計に基づく微小管内部への分子配列化, 第 27 回バイオ・高分子シンポジウム, 2017.
- (23) 稲葉央, ペプチド設計に基づく微小管内部への分子導入, 第 10 回ナノバイオ若手ネットワークシンポジウム, 2017.
- (24) 稲葉央, 山本昂久, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, Tau タンパク質の部分配列を利用した微小管内部への分子導入, 第 15 回ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム, 2017.
- (25) 稲葉央, 山本昂久, Arif Md. Rashedul Kabir, 角五彰, 佐田和己, 松浦和則, Molecular alignment inside microtubules based on peptide design, 第 66 回高分子学会年次大会, 2017.

6 . 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名 : 松浦 和則

ローマ字氏名 : (MATSUURA, kazunori)

研究協力者氏名 : 角五 彰

ローマ字氏名 : (KAKUGO, akira)

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。