

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15643

研究課題名(和文)構造が規定された新規ポリマーベシクルの創製

研究課題名(英文)Construction of polymer vesicles with defined structure

研究代表者

藤田 聖矢(Fujita, Seiya)

京都大学・工学研究科・特定助教

研究者番号：30824007

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):これまでのポリマーベシクルのゲスト分子の内包率は数%と非常に低かった。そこで、内包率の高いポリマーベシクルの構築が求められている。本研究では内包率の高い新規PVの構築を目指して、オリゴサルコシンを有するアニオン性ペプチドMal-Sar4-Glu12と、種々のカチオン性ペプチド、すなわちLys12、Lys6、オルニチン(Orn12)、Arg12と混合させることで、親水性部位にオリゴサルコシンを用いた新規PICsomeを構築した。Mal-Sar4-Glu12とLys12の混合溶液中ではベシクル状集合体が形成した。またそのタンパク質の内包率を評価したところ、18%程度と高い内包率を有していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのポリマーベシクルのゲスト分子の内包率は数%と非常に低かった。本研究では内包率の高い新規PVの構築を目指して、Mal-Sar4-Glu12とLys12を合成し、これらを混合することでの18%程度と高い内包率を有するベシクルの調製に成功した。これまでにない内包率の高いベシクルを調製でき、今後のポリマーベシクルの設計の幅を大きく上昇することができたと考えられる。また、ナノリアクターへの応用が考えられるため非常に高い社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文):The encapsulation efficiency of guest molecules in polymer vesicles has been extremely low at a few percent. Therefore, there is required for the construction of polymer vesicles with a high encapsulation efficiency. In this study, we constructed novel vesicles with high encapsulation efficiency by the anionic peptide Mal-Sar4-Glu12 having oligosarcosine is mixed with various cationic peptides. Vesicular assemblies were formed in the mixture solution of Mal-Sar4-Glu12 and Lys12. Moreover, when the encapsulation efficiency of the protein was evaluated, it had a high encapsulation efficiency of about 18%.

研究分野：生体関連化学

キーワード：ペプチド ベシクル タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ユニークな内包挙動を有するポリマーベシクル(PV)が注目されている。中でも、ポリエチレングリコール(PEG)を有する PV は分子サイズ選択的な内包挙動(半透性)を有しており、ナノリアクターへの応用が期待されている。例えば、ポリエチレングリコールと荷電性ペプチドのブロック共重合体が静電相互作用によって集合することで形成されるポリイオンコンプレックスベシクル(PICsome)は、分子サイズ選択的な内包挙動を有しており、その内部にタンパク質のような高分子は保持できるが、基質のような低分子は内部に保持できない¹。この特性を有する PICsome は、生体内において内部に保持したタンパク質をタンパク質分解酵素から保護しつつ、長期的に酵素活性を発現できる。例えば、酵素 (β -galactosidase)を内包させた PICsome は、酵素活性を維持したままがん細胞へ送達されたことが報告されている²。しかし、PICsome に限らず、PV はゲスト分子の内包率が低い。上述のしたように PICsome の親水性部位には PEG が用いられてきた。一方で、サルコシン(Sar)を親水部位に用いた PICsome は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では内包率の高い新規 PV の構築を目指して、オリゴサルコシンを有するアニオン性ペプチド Mal-Sar₄-Glu₁₂ と、種々のカチオン性ペプチド、すなわち Lys₁₂、Lys₆、オルニチン(Orn₁₂)、Arg₁₂ と混合させることで、親水性部位にオリゴサルコシンを用いた新規 PICsome を構築した。

3. 研究の方法

ペプチドは固相合成で合成した。PICsome は、PEG の分子量が全分子量の 10% 以下でベシクル構造が形成することが報告されている。そこで、Sar の重量分率が 10% 以下となるように、Mal-Sar₄-Glu₁₂ を設計した。まず、Mal-Sar₄-Glu₁₂ 溶液と種々のカチオン性ペプチド(Lys₆, Lys₁₂, Orn₁₂, Arg₁₂)溶液を Negative / Positive (N/P) = 1:1 となるように混合させ、混合溶液中で形成した集合体の評価を動的光散乱(DLS)測定と電界放出型走査型顕微鏡(FE-SEM)観察により行った。また形成した球状の集合体がベシクル構造であるか Cross-section FE-SEM により評価した。Mal-Sar₄-Glu₁₂ と Lys₆, Lys₁₂, Orn₁₂ をそれぞれ混合した後、その混合溶液を樹脂に包埋させた。

次に、PICsome の内部へタンパク質を内包させた。モデルタンパク質としてローダミンラベルされたりボヌクレアーゼ A(RhB-RNase)を用いた。RhB-RNase 存在下でベシクル形成させ、ベシクルに取り込まれなかった RhB-RNase A を透析により除去した。透析後に RhB-RNase 内包 PICsome の蛍光相関分光(FCS)測定を行った。電気泳動後に銀染色を行い、バンドの濃さから RhB-RNase の内包率を算出した。

4. 研究成果

DLS 測定より種々の濃度の Mal-Sar₄-Glu₁₂ と Lys₁₂ の混合溶液中で、300 μ M 以上の濃度で 100-200 nm 程度の集合体が形成した。次に混合溶液中で形成した集合体について FE-SEM 観察を行った。Lys₆, Lys₁₂, Orn₁₂ との混合溶液中では、球状の集合体が多数確認された。一方で、Arg₁₂ では非常に大きな凝集体が観察された。次に形成した球状の集合体がベシクル構造であるか Cross-section FE-SEM により評価した。Mal-Sar₄-Glu₁₂ と Lys₆, Lys₁₂, Orn₁₂ をそれぞれ混合した後、その混合溶液を樹脂に包埋させた。Lys₁₂ と Mal-Sar₄-Glu₁₂ の混合溶液中で形成した集合体は、中空構造であることが確認された(Fig. 1a)。一方で、Lys₆ または Orn₁₂ と Mal-Sar₄-Glu₁₂ の混合溶液中では、中実構造の球状集合体が形成していることが確認された(Figure 2b, c)。この結果から、両

荷電性ペプチドの側鎖やペプチド自身の長さが同一であることが膜構造の形成に重要であることが示唆された。

次に、PICsome の内部へ RhB-RNase を内包させた。透析後に RhB-RNase 内包 PICsome の FCS 測定を行った(Fig. 2)。得られた曲線は一成分であり透析後に内包されていない RhB-RNase が存

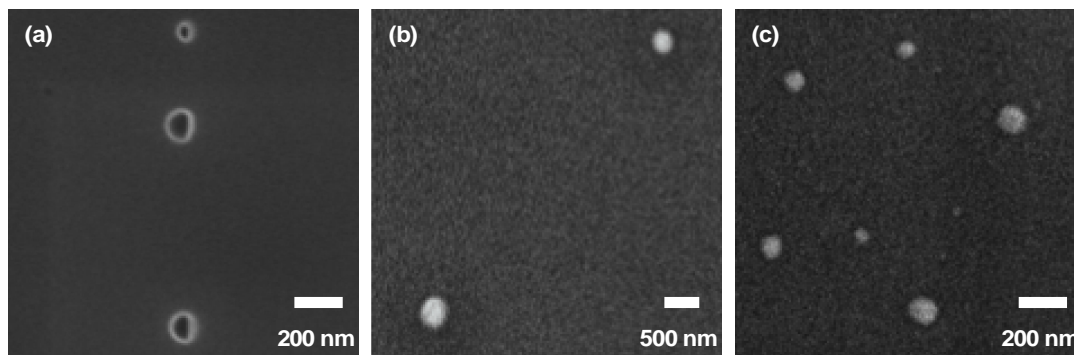


Figure 1. Mal-Sar₄-Glu₁₂ と種々のカチオン性ペプチドの混合溶液中で形成した集合体の Cross-section FE-SEM 像 (a)Lys₁₂ (b)Lys₆ (c)Orn₁₂

在しないことを示した。また PICsome 存在下での RhB-RNase の拡散時間は 4.80 ms であった。この拡散時間から RhB-RNase の見かけの粒径を算出したところ、220 nm 程度の粒径であることが確認された。この粒径は、DLS より得られた集合体のサイズと一致する。これらの結果から、RhB-RNase が PICsome に内包されたと考えられる。

透析により除去した。電気泳動後に銀染色を行い、バンドの濃さから RhB-RNase の内包率を算出したところ 17.7%であった(Fig. 3)。この PICsome は非常に内包率が高いことが明らかと

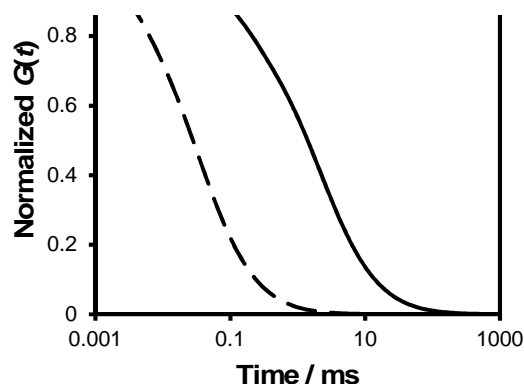


Figure 2. FCS 法によって得られた RhB-RNase の自己相関曲線 PICsome 非存在下(破線)、存在化(実線)

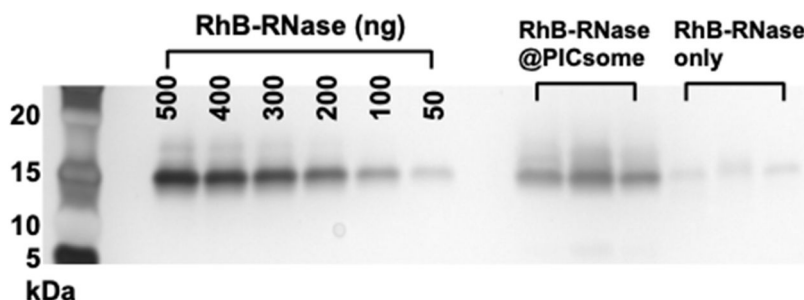


Figure 3. RhB-RNase、透析後の RhB-RNase@PICsome、RhB-RNase の銀染色後の SDS-PAGE

参考文献

- (1) A. Koide et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 5988-5989, 2006
- (2) S. Chuanoi et al., *Biomacromolecules*, **15**, 2389-2397, 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujita Seiya, Motoda Yoko, Kigawa Takanori, Tsuchiya Kousuke, Numata Keiji	4. 巻 22
2. 論文標題 Peptide-Based Polyion Complex Vesicles That Deliver Enzymes into Intact Plants To Provide Antibiotic Resistance without Genetic Modification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 1080 ~ 1090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.0c01380	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 -

1. 著者名 Fujita Seiya, Tsuchiya Kousuke, Numata Keiji	4. 巻 -
2. 論文標題 All-Peptide-Based Polyion Complex Vesicles: Facile Preparation and Encapsulation of the Protein in Active Form	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Polymers Au	6. 最初と最後の頁 -
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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田聖矢・土屋康佑・沼田圭司
2. 発表標題 酵素を内包した PICsome の送達による 植物へのカナマイシン耐性の付与
3. 学会等名 第30回バイオ高分子シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田聖矢・土屋康佑・沼田圭司
2. 発表標題 酵素含有PICsomeの導入による植物への抗生物 質耐性の付加
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田 聖矢・土屋 康佑・沼田 圭司
2. 発表標題 細胞膜透過性ペプチドを表面修飾した PICsome の開発およびタンパク質の内包
3. 学会等名 第29回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujita Seiya, Tsuchiya Kousuke, Numata Keiji
2. 発表標題 Development of all peptide-based PICsome and application to an enzyme delivery carrier
3. 学会等名 70th SPSJ Annual Meeting
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Vesicle, composition comprising the same, and use thereof	発明者 沼田圭司・土屋康佑・藤田聖矢	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、US62/892775	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------