

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 22 日現在

機関番号：82108

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22760615

研究課題名（和文） 分子認識により内包物質の徐放を行う蛋白質マイクロ粒子の構築

研究課題名（英文） Construction of self-assembled protein-based microsphere having molecular recognition ability.

研究代表者

山崎 智彦 (YAMAZAKI TOMOHIKO)

独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・MANA 研究者

研究者番号：50419264

研究成果の概要（和文）：本研究では、両親媒性蛋白質から構築される自己組織化膜・粒子を作成し、粒子表面に分子認識能を有する DNA アプタマー、蛋白質、ペプチドを酵素反応により表面修飾させる技術を確認した。本研究成果を利用することにより、分子認識能を有する蛋白質マイクロ粒子の構築が可能となる。さらには疾患マーカー物質を認識するペプチドやタンパク質をマイクロ粒子に導入することにより利用することにより、体内の疾患マーカー物質の濃度を判断し疾患マーカー物質が多く存在する疾患部位において薬剤を放出する薬剤輸送が可能となる。

研究成果の概要（英文）：We constructed self-assembled membranes and particles using amphipathic protein, hydrophobins. We, then, established the enzyme based anchoring methods to connect biological molecules, such as DNA aptamer, peptide and protein, with amphipathic protein-based self-assembly membrane and particle. The system can be utilized for construction protein microsphere having molecular recognition ability. Furthermore, this protein based microsphere can be applied for an active drug release system induced by biomarker molecule in human body.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：分子認識、酵素、両親媒性蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

(1)背景：薬剤を内包した粒子は、マイクロカプセルの一種として従来より様々な用途で検討されてきたが、単に内包するだけでは水中では速やかに拡散され、持続性に欠けるものであった。そのため粒子への徐放制御機

能の付与については、医薬のみならず農薬開発、バイオリクターなどの分野において盛んに開発が行われている。現在まで、リポソームやポリマー等の有機化合物や高分子を中心として成果が報告されているが、生体内での利用を考えた場合は生体適合性や安全

性的問題から、利用できる有機化合物や高分子の種類が限定される。また、徐放制御については pH や温度など物理化学的な変化をトリガーとして制御する方法については多くの報告があるが、疾患マーカーや疾患により濃度の変化する物質、また疾患部位に局在している蛋白質や糖の存在がトリガーとなる徐放制御は未だ困難である。一方、生体由来分子である蛋白質や DNA 分子を粒子の構成材料として用いることで、生体適合性が高く、また生体分子の持つ多様な分子認識能を付加させることができる。粒子に付加した分子認識能により生体内の疾患関連物質や標的組織・細胞上にあるターゲット分子を認識させ、さらには蛋白質や DNA 分子の分子認識に伴う構造変化を利用することで薬剤の徐放制御を行うことができる。しかしながら生体由来分子を利用した粒子についてはいくつかの報告があるが、強度や生体分解性、安定性、また薬剤を内包した粒子を作成する複雑な過程等、有機化合物や高分子と比較して生体由来分子特有の解決すべき問題があった。

(2) 動機：申請者は今までに機能の異なる蛋白質を蛋白質工学的手法を用いて融合発現させたり、また化学修飾により融合させることにより、生体分子の機能を利用した新規蛋白質分子の開発を行ってきた。また DNA 結合蛋白質を用いて DNA と蛋白質を融合させた DNA-蛋白質ナノ構造体を構築する技術を開発した。これらの研究背景から、両親媒性蛋白質に分子認識能を有する蛋白質を融合させることにより自己組織化能と分子認識能を有する新たな機能性分子の構築、ならびに薬剤徐放制御が可能なマイクロ粒子の構築を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、標的分子認識による内包分子の徐放制御を可能とする蛋白質ベースのマイクロ粒子の構築技術の開発を目的とした。

(1) マイクロ粒子を形成する骨格蛋白質として両親媒性蛋白質であるハイドロフォビン (Hydrophobin, HFB) に着目し、両親媒性蛋白質である HFB を組換え生産し、水中で自己組織化的に HFB を外殻とする粒子を構築する方法を確立する。

(2) ソルターゼを利用して HFB ナノスフェア表面に分子認識能を有する蛋白質を修飾する方法を確立する。

(3) マイクロ粒子表面に導入した結合蛋白質の標的分子認識に伴う構造変化を HFB 外殻に伝達し、HFB ナノスフェア構造にひずみを生じさせるための HFB と結合蛋白質間のリンク

一の種類や鎖長の検討を行い、徐放制御マイクロ粒子の構築方法を確立する。

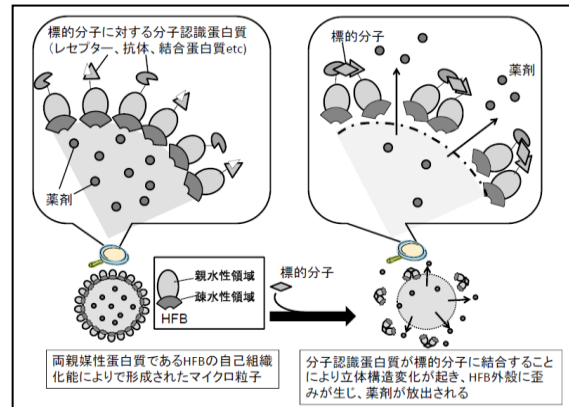


図1 親媒性蛋白質と分子認識蛋白質を融合させた薬剤徐放制御技術の概要

## 3. 研究の方法

(1) HFB の大腸菌での組み換え生産：HFB はその疎水性と溶解性の違いからクラス I (HFBI) とクラス II (HFBII) に大別される。糸状菌 *Trichoderma reesei* 由来の HFBI と HFBII の大腸菌での組み換え生産を行った。HFB については、大腸菌で組み換え生産した場合、発現量が非常に低いことが報告されている。申請者は大腸菌と糸状菌のコドン頻度の差に着目し、*Trichoderma reesei* 由来の HFBI と HFBII の構造遺伝子を大腸菌のコドン頻度に最適化させた構造遺伝子をデザインし、オリゴヌクレオチドを人工合成することで HFBI と HFBII の構造遺伝子を作成した。構造遺伝子は、pET30a ベクター (ノバジェン社) に導入し、N 末端にヒスチジンタグを融合した状態で発現するようにした。発現には Overnight expression system (ノバジェン社) を用いた。

(2) HFB の自己組織化によるマイクロ粒子の構築・機能評価：HFBI と HFBII を大腸菌を用いて組み換え生産し、Ni-NTA カラム、イオン交換カラム、ゲル濾過カラムにより精製を行った。精製した HFB について、疎水性ガラス基板上で自己組織化を評価した。

(3) ソルターゼを用いた蛋白質ライゲーション反応：ソルターゼはグラム陽性病原細菌に広く分布し、C 末端領域に共通して LPETG 配列をもつ表層蛋白質前駆体と細胞壁のペプチドグリカンのアミノ基とアミド結合を触媒する酵素である。ソルターゼ A を用いて HFBII の C 末端に導入した LPETG 配列に FITC 標識ポリグリシンを加えることで、ソルター

ぜによる置換反応により HFBI の C 末端に FITC の導入を検討した。

(4) HFB マイクロ粒子に導入する分子認識ペプチドの構築：HFB マイクロ粒子表面に導入する分子認識素子を新規に構築した。申請者はファージディスプレイによる生体材料に結合するペプチドのスクリーニングを進めており、本研究ではヒドロキシアパタイトに特異的に結合するペプチドのスクリーニングならび特性を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) HFB の大腸菌での組み換え生産：HFBI と HFBI の構造遺伝子を大腸菌のコドン頻度に最適化した構造遺伝子をデザインし、pET30a ベクター（ノバジェン社）に導入することで、HFBI と HFBI の発現ベクターを構築した。その際に、Sortase 認識配列の LPETG 配列をリンカー配列 GSGGSGG を挟んで HFBI と HFBI の C 末端に導入した。ソルターゼ認識配列融合 HFBI と HFBI の発現条件について検討したところ、Overnight expression system にて 25℃、48 時間の培養条件が最適であることが示された。

(2) HFB の自己組織化によるマイクロ粒子の構築・機能評価：大腸菌の破碎画分から Ni-NTA カラム、イオン交換カラム、ゲル濾過カラムにより HFBI と HFBI の精製を行った。精製した HFB の特性評価をシランカップリング剤を用いて表面を疎水性としたガラス基板上で Drop Stamp 法を用いて行った。蛍光色素を用いて、疎水性ガラス基板上の HFB を観察したところ、HFB の疎水性領域と疎水性ガラス基板との疎水性相互作用により HFB のレイヤーが形成できていることが観察された。

(3) ソルターゼを用いた蛋白質ライゲーション反応

FITC 標識ポリグリシンを LPETG 配列を C 末端に持つ HFBI の自己組織膜に添加し、ソルターゼを加えることにより、ポリグリシンと LPETG 配列の置換反応により HFBI の C 末端に FITC が付加されることが示された。

(4) HFB マイクロ粒子に導入する分子認識ペプチドの構築：ファージディスプレイ法によりヒドロキシアパタイトに特異的に結合するペプチドを 5 種類検索した。得られたペプチドの配列を比較したところ、N 末端にプラスにチャージしているアミノ酸残基、C 末

端には疎水性アミノ酸残基のユニットが存在している共通点があった。これらのペプチドについて、N 末端にポリグリシン加えたペプチドを合成し、HFB にライゲーションさせることで HFB 膜上にヒドロキシアパタイト結合ペプチドを導入し、さらにはヒドロキシアパタイトに特異的に吸着、さらにはアパタイト層を HFB マイクロ粒子表面に形成させる条件を検討している。

(5) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクトならびに今後の展望

本研究は、従来の蛋白質工学的手法による蛋白質単体の改変ではなく、異なる機能を有する蛋白質同士を組み合わせるにより、それぞれの優れた機能を融合させハイブリットな機能を有する新規蛋白質分子を構築するという特色を有する独創的な研究である。薬剤徐放制御が可能なマイクロ粒子の構築のための方法を開発し、実際に両親媒性蛋白質から構成される自己組織化膜表面に酵素反応によりペプチドを導入できることを示した。このような研究は報告されておらず、本研究は人工蛋白質粒子による薬剤輸送を実現させるためのステップとしてインパクトが高い。今後は、生体内での薬剤輸送のために粒子形成制御、粒子径の制御ならびに分子量が高いかさの大きな蛋白質を導入するためのソルターゼ認識配列タグの量の制御を検討する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

① T. Yamazaki and A. Sakaguchi (2010). "Protein engineering approaches for constructing novel glucose sensing elements." Indonesian Nanoletter 3: 44-46. 査読有

掲載論文の DOI : なし

② K. Yoshimatsu, T. Yamazaki, I. Chronakis, L. Ye (2012). "Influence of template/functional monomer /cross-linking monomer ratio on particle size and binding properties of molecularly imprinted nanoparticles." Journal of Applied Polymer Science 124: 1249-1255. 査読有

掲載論文の DOI : 10.1002/app.35150

〔学会発表〕(計 6 件)

① 山崎智彦, 辰巳公平, 大橋一夫, 谷口彰良, 岡野光夫

“遺伝性肝疾患治療を目指した肝臓細胞への遺伝子導入”

第 21 回インテリジェント材料・システムシンポジウム

2012 年 1 月 10 日, 東京 (日本)

②山崎智彦, 辰巳公平, 吉松啓一, Wang Dan, 大橋一夫, 谷口彰良, 岡野光夫

“遺伝子銃を用いた肝臓細胞への遺伝子導入”

第 33 回日本バイオマテリアル学会大会

2011 年 11 月 22 日, 京都 (日本)

③T. Yamazaki, A. Mikami, K. Sode, A. Taniguchi, N. Hanagata “Engineered transcriptional regulators for intracellular sensing and gene regulation”

Japan-China International Forum of Advanced Research on Biotechnology 2011

2011 年 11 月 10 日, 東京 (日本)

④T. Yamazaki, W. Meng, N. Hanagata

“Novel CpG phosphodiester oligodeoxynucleotides as human toll-like receptor 9 agonists”

Infection & Immunity,

2011 年 9 月 11 日, Suzhou (中国)

⑤T. Yamazaki, N. Hanagata

“Identification of Hydroxyapatite-Binding Peptides”, Joint Conference of The Fifth International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC-5) and The 2nd International Conference on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials (AMDI2)

2011 年 6 月 22 日, 横浜 (日本)

⑥T. Yamazaki, Y. Nisida, A. Taniguchi, T. Ikoma

“Screening of Hydroxyapatite-Binding Peptides using Phage Display Library”, Fourth International Conference on Science and Technology of Advanced Ceramics

2010 年 6 月 21 日, 横浜 (日本)

[その他]

ホームページ:

<http://www.nims.go.jp/bmc/group/control/GBSCUM/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山崎 智彦 (YAMAZAKI TOMOHIKO)

独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナ

ノアーキテクトニクス研究拠点・MANA 研究者

研究者番号 : 50419264

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし