

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14797

研究課題名（和文）核酸輸送を加速させる一次元伸張ナノカーボン分子の創製

研究課題名（英文）Synthesis of one-dimensional molecular nanocarbons for nucleic acid delivery

研究代表者

天池 一真（Amaike, Kazuma）

名古屋大学・物質科学国際研究センター・助教

研究者番号：00866600

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：新たな核酸輸送剤として一次元伸長ナノカーボンに着目し、その合成をおこなった。分子設計としては、核酸と静電相互作用を促すためにカチオン性の置換基（アミノ基）を一次元に伸長したナノカーボン分子を導入することとした。また一次元に伸長したナノカーボン分子の合成に関しては、一次元に共有結合的に伸張させる方法と超分子化学の手法を用いる方法で合成を試みた。共有結合的に伸張させる方法においては、先端構造がアミノ基である dendrimer を担体とした芳香族ポリマーの合成に成功した。また超分子化学の手法を用いる方法においては、芳香族アミノアゾ化合物がアスペクト比の高い分子集合体を形成することが示唆される結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一次元に伸長したナノカーボンであるカーボンナノチューブは、植物においては細胞壁を透過することを可能にし、マウスにおいては腎臓選択的に核酸輸送をおこなうという魅力的な輸送剤である。しかしカーボンナノチューブは構造が精密に制御されておらず、その機能を最大限に発揮できていない。今回の成果により精密に制御された核酸輸送のための一次元伸長ナノカーボン分子を手にすることができたため、詳細な構造機能相関研究、さらには輸送効率向上のための新たな分子設計の提供が期待できる。

研究成果の概要（英文）：One-dimensional molecular nanocarbons were synthesized as new nucleic acid transporters. The molecular design of the nanocarbons involved the introduction of cationic substituents (amino groups) into the molecular nanocarbon to promote electrostatic interaction with nucleic acids. For the synthesis of one-dimensional molecular nanocarbons, we attempted to synthesize them by covalently elongating them in one dimension and by using supramolecular chemistry methods.

In the covalent bonding method, we succeeded in synthesizing aromatic polymers using dendrimers with amino groups at the tip structure as carriers. In the supramolecular chemistry method, aromatic aminoazo compounds were synthesized to form molecular assemblies with high aspect ratio.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：核酸輸送 分子ナノカーボン ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

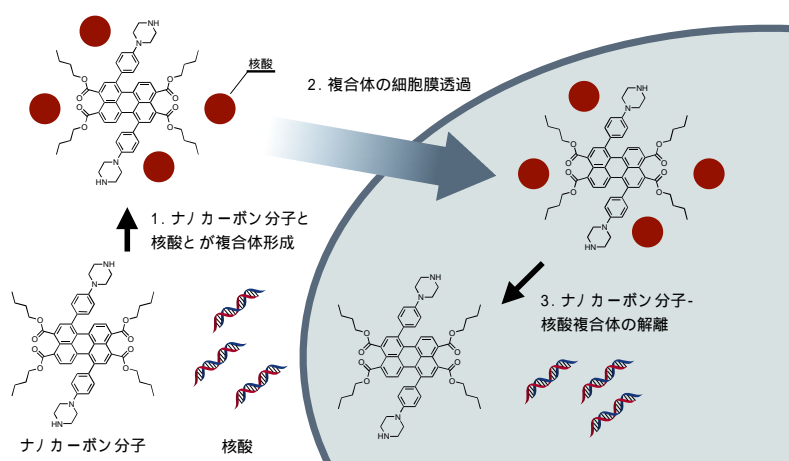
近年、核酸医薬やゲノム編集技術といった核酸を用いた技術の発展が目覚ましい。これらの技術は基本的に、核酸が核に到達することで機能が発揮されるため、効率的に外部から核酸を輸送することが求められる。しかし生物は細胞膜や細胞壁などの脂溶性の高い物理的な障壁を持つため、電荷を帯びた核酸を細胞内に輸送するのは一般的に困難である。そのため現在においても核酸輸送法の開発、改良が進められている。近年、カチオン性カーボンナノチューブをはじめとする炭素材料(ナノカーボン)が、新たな核酸輸送のための次世代キャリアとして期待が高まっている(*Nat. Nanotechnol.* 2019, 14, 456; *ChemBioChem* 2006, 7, 239)。しかしその詳細な作用機序、最適なナノカーボンの構造情報は不明のままである。なぜなら化学的な視点では、これらに用いられているナノカーボンは分子レベルで構造が精密に制御されたものではなく、多種多様な構造の混合物であるため理解を複雑にしているからである。すなわち、どのような構造が核酸輸送に効果的であるか、といった構造物性相関研究がおこなわれていないのが現状である。生物種によって細胞外に関しては細胞膜の構成分子、細胞壁の有無、さらには組織表層の分子(植物のワックス層など)が、細胞内に関してはpHやタンパク質をはじめとする生体内構成成分が異なるため、核酸輸送キャリアの最適構造は生物種によって異なることが容易に想像できる。そのため研究課題の革新をなす学問的問いとして「ナノカーボンの核酸輸送分子が細胞外で核酸と相互作用し、その複合体が細胞膜や細胞壁などを通過し、細胞内において核酸を解離するという段階において、それぞれの化学構造との相関関係はどのようなものか」を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究課題では、精密に構造が制御されたナノカーボン分子を合成し、哺乳、植物、昆虫を対象とした構造物性相関研究をおこない、それぞれの生物種に合わせたテーラーメイドなナノカーボン分子の創製をおこなう。分子設計に関しては、細胞外におけるナノカーボン分子と核酸との相互作用、細胞膜、細胞壁の透過能、そして細胞内における核酸の解離を念頭においておこなう。

3. 研究の方法

本研究課題で用いる分子の核酸輸送に関する想定作用機序に基づいた構造物性相関研究を行った。作用機序としては、ナノカーボン分子と核酸(アニオン性)とが静電的な相互作用で複合化し、その複合体が細胞内に導入後、ナノカーボン分子から核酸が解離されると考えている。そのため最初の段階において核酸と相互作用させるためにナノカーボン分子にはカチオン性を付与する。また細胞膜透過に関しては不明な点が多いものの、構造が剛直で脂溶性の高いものが透過に有利とされている。またこれまでの報告において一次元に伸張したナノカーボンであるカーボンナノチューブが、植物においては細胞壁を透過することを可能にし(*Nat. Nanotechnol.* 2019, 14, 456.) マウスにおいては腎臓選択的に核酸輸送をおこなうことがわかっている(*Sci. Transl. Med.*, 2016, 8, 331ra39.)。このように細胞壁を透過するという高い透過能、生体内における特異な組織選択性を示すことから、一次元伸張ナノカーボン分子に着目し課題を遂行した。



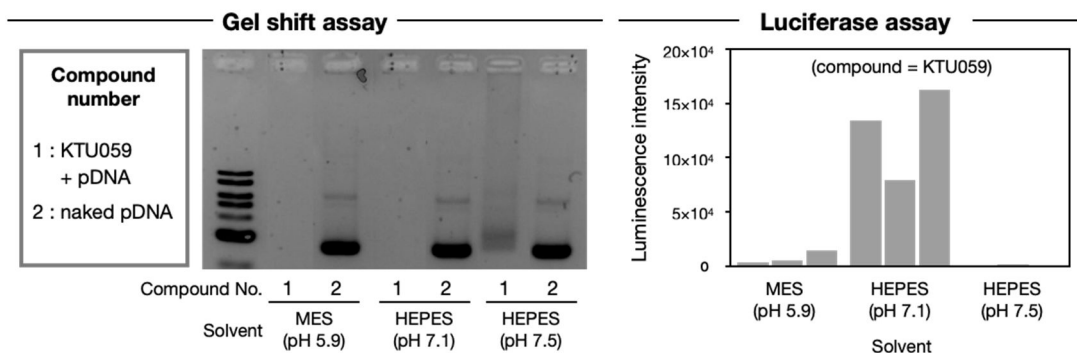
また細胞膜透過に関しては不明な点が多いものの、構造が剛直で脂溶性の高いものが透過に有利とされている。またこれまでの報告において一次元に伸張したナノカーボンであるカーボンナノチューブが、植物においては細胞壁を透過することを可能にし(*Nat. Nanotechnol.* 2019, 14, 456.) マウスにおいては腎臓選択的に核酸輸送をおこなうことがわかっている(*Sci. Transl. Med.*, 2016, 8, 331ra39.)。このように細胞壁を透過するという高い透過能、生体内における特異な組織選択性を示すことから、一次元伸張ナノカーボン分子に着目し課題を遂行した。

4. 研究成果

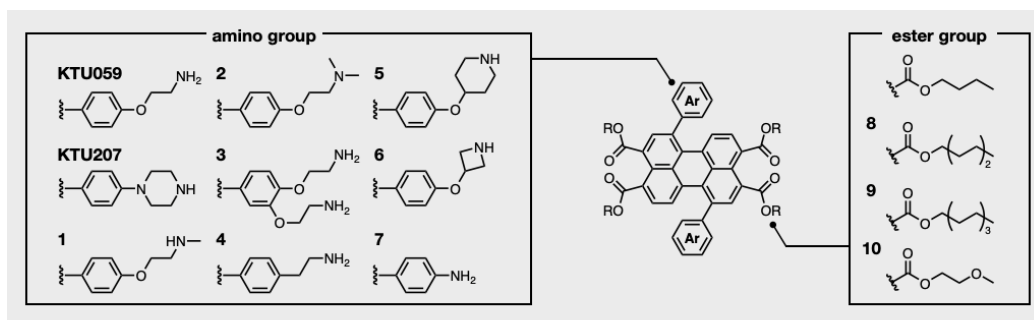
まずは輸送する核酸の種類、輸送箇所にあわせたナノカーボン分子を合成すべく、ナノカーボン分子の精密合成、核酸輸送に関する構造物性相関を試みた。これまでに、アミノ基を導入したペリレン分子 KTU059、KTU207 およびお椀型分子であるコラニユレン KTU205 が哺乳類細胞において核酸の輸送能を有していることをウエスタンブロッティング解析から見出していた。そのため KTU059、KTU207、KTU205 を出発点として、核酸輸送の想定作用機序に基づいた構造物性相関研究をおこなった。

核酸を細胞内に輸送するためには、輸送担体と核酸の複合体形成、複合体の細胞膜透過、細胞内での複合体の解離といった3つのステップが重要であると考えられた。そのため、各ステップ

における分子の構造と機能の相関研究を行うことでより核酸輸送効率の高い分子の設計に繋がると考え、まず KTU059 を用いて核酸との複合体形成能およびその物性評価をおこない、それらと核酸輸送効率との相関関係から輸送条件の最適化を検討した(図 1)。化合物と核酸の複合体形成時に用いる溶媒の種類や塩強度、pH、複合体形成にかかる時間が複合体の動態に及ぼす影響をゲルシフトアッセイや動的分散乱 (DLS) を用いた粒子径およびゼータ電位測定を用いて調査した。その結果、化合物/DNA 複合体形成には溶液の pH が大きく影響することが明らかとなり、pH 5.8 の MES 緩衝液および pH 7.1 の HEPES 緩衝液を用いた条件において複合体が 1000 nm オーダーの凝集体を形成することが示唆された。続いて、哺乳細胞に NanoLuc plasmid DNA を輸送し、発現した NanoLuc (ルシフェラーゼ) を定量することで DNA 輸送活性を評価した。その結果、化合物/DNA 複合体形成時に用いる溶媒は pH 7.1 の HEPES 緩衝液が最適であることや、複合体形成が 30 分間で終結することが示唆された。



詳細な構造機能相関研究を行うため、KTU059 および KTU207 を参考に種々のアミノ基およびエステル基を有する新たなペリレン誘導体を合成し、NanoLuc をコードしたプラスミドをモデル核酸として活性評価を行なった(図 2)。ゲルシフトアッセイを用いた複合体形成能の評価の結果、化合物/DNA の塩基対比 (R 値) や化合物の pKa 値、立体構造が複合体形成能に大きく影響することが明らかになった。また、ルシフェラーゼアッセイによる DNA 輸送効率の評価および MTT アッセイによる細胞毒性の評価を行った結果、R 値と DNA 輸送効率および細胞毒性に正の相関が確認され、多くの化合物は R 値が 5 以下の条件において低い細胞毒性を示した。第二級アミンをもつ LH017、KTU207、LH044 が KTU059 を上回る DNA 輸送効率を示し、第一級アミンよりも第二級アミンを有する化合物の方が高い DNA 輸送効率を有することが明らかとなった。化合物/DNA 複合体形成が確認されなかった化合物が DNA 輸送活性を示さなかったことから、複合体形成が DNA 輸送において非常に重要なステップであることが示唆された。また、エステル基上の置換基を調整することで脂溶性を増加させた化合物は化合物/DNA 複合体形成が確認されなかったのに対し、脂溶性を低下させた化合物は高い複合体形成能を示したが DNA 輸送活性が確認されなかった。これは脂溶性の低下による複合体の細胞膜透過能または細胞内での複合体解離能の低下が原因であると考えられる。このようにアミノ基の種類や化合物の脂溶性が DNA 輸送において非常に重要な要因であることが示唆された。今後はこれらの情報をもとに、一次元伸張ナノカーボン分子の分子設計、合成へ繋げていく。



Evaluation of DNA transport activity and cytotoxicity using high throughput screening

| | KTU059 | KTU207 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
|---------------|--------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| low activity | R = 2 | 2.75 | 3.84 | 4.01 | 2.74 | 2.57 | 2.40 | 4.26 | 3.08 | 2.64 | 2.74 | 2.65 | 2.61 |
| | R = 5 | 4.10 | 6.20 | 6.98 | 3.94 | 3.62 | 2.43 | 5.62 | 2.96 | 2.65 | 2.76 | 2.54 | 2.78 |
| | R = 10 | 5.30 | 7.19 | 7.54 | 4.51 | 5.47 | 2.40 | 6.54 | 3.40 | 2.87 | 2.53 | 2.61 | 3.02 |
| high activity | R = 20 | 5.88 | 7.03 | 7.57 | 4.94 | 6.36 | 2.47 | 6.83 | 4.15 | 2.86 | 2.56 | 2.63 | 3.19 |

$R = \frac{\text{compound (mol)}}{\text{base pair (mol)}}$

cell cytotoxicity

*DNA delivery activity is expressed as Log₁₀ (luminescence intensity) (RLU)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 天池一真、加藤江莉佳、深津美羽、Dominik Zetschok、宇佐見享嗣、山田 早人、伊丹健一郎 |
| 2. 発表標題 カチオン性ペリレンを用いた核酸輸送 |
| 3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 天池一真 |
| 2. 発表標題 分子ナノカーボンを用いたケミカルバイオロジー |
| 3. 学会等名 第448回触媒科学研究所コロキウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuma Amaike, Erika Kato, Miu Fukatsu, Dominik Zetschok, Luca Hagemeyer, Atsushi Usami, Hayato Yamada, Kenichiro Itami |
| 2. 発表標題 Nucleic acid delivery using cationic polycyclic aromatic hydrocarbons |
| 3. 学会等名 IKCOC-15（国際学会） |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|