

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：14303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750157

研究課題名(和文) 超分子重合制御に基づく膜透過性ペプチドナノニードルの精密作製と免疫制御への応用

研究課題名(英文) Precise preparation of membrane-penetrating peptide nano-needle based on the control of supramolecular polymerization

研究代表者

和久 友則 (Waku, Tomonori)

京都工芸繊維大学・その他部局等・助教

研究者番号：30548699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ベータシートペプチドが形成するナノ線維状会合体(ペプチドナノニードル)に着目し、これをワクチン抗原キャリアへと応用する研究をこれまでに進めてきた。ナノ線維の『長さ』分布の単分散化を可能とする精密作製技術を開発し、ペプチドナノ線維の『長さ』と機能の相関を明確にすることができれば、ナノ線維のデリバリーキャリアとしての有用性を広げることができると期待される。そこで本研究では、ベータシートペプチドナノ線維は、ペプチドが水素結合により一軸方向に連なった構造を持つ超分子ポリマーであることに着目し、超分子ポリマーの重合制御に基づく単分散性ペプチドナノ線維の精密作製法について検討した。

研究成果の概要(英文)：In previous work, we have developed beta-sheet peptide nanofibers (peptide nano-needle) loading peptide antigen for vaccine delivery system. Beta-sheet peptide nanofibers are supramolecular polymers, which are formed by self-assembly of beta-sheet peptides. If the technique to control the length of nanofibers would be established, the utility of nanofibers as delivery carrier is expected to be broaden. In this study, we addressed the development of the precise preparation method of mono-disperse peptide nanofibers based on the control of the supramolecular polymerization.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ペプチド 自己組織化 超分子 ドラッグデリバリーシステム ナノ材料

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ナノチューブやナノファイバーなどの『一次元ナノ材料』がドラッグデリバリーキャリアとして注目されている。異方性形態に由来したキャリアの性質や機能が明らかになれば、従来用いられている球状ナノキャリアでは困難であった新たな DDS が切り拓かれると期待される。ゆえに、異方性キャリアの性質・機能の理解は DDS 材料開発における重要課題のひとつといえるが、十分な知見は集積されていないのが現状である。その最大の要因の一つとして、キャリアの性質や機能が、『長さ』の揃っていない多分散試料を用いて調べられているということが挙げられる。数 nm から数十 nm の『長さ』の違いは、一次元ナノ材料の体内動態、細胞内取り込み挙動、細胞内動態などに大きく影響を与えるため、多分散試料を用いた実験からは性質・機能を明確にすることはできない。従って、一次元ナノ材料の形態に由来した DDS 機能を明らかにして医療へと応用するためには、『長さ』と性質・機能との相関を理解する必要があり、そのためには『長さ』分布の極めて狭い単分散性一次元ナノ材料を得るための精密作製技術が必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

最近、研究代表者は、一次元ナノ材料としてβ-シートペプチドが形成するナノ線維状集合体に着目し、これをワクチン抗原キャリアへと応用する研究を進めてきた。具体的には、β-シート形成能をもつ配列に抗原配列とポリエチレングリコール (PEG) を導入したハイブリッドペプチドを合成し、このペプチドの自己組織化を利用することで、数ナノメートルの直径をもつ抗原集積化デバイス (ペプチドナノニードル) の作製に成功した。さらに、このナノニードルは、通常のエンドサイトーシス経路に加えて直接膜透過経路で細胞に

取り込まれることを見出した。この結果は、ペプチドナノニードルが球状ナノ粒子にはない新規なキャリア機能 (例; 細胞質への直接デリバリー機能、エンドソーム脱出能など) を持っていることを強く示唆している。ナノニードルの『長さ』分布の単分散化を可能とする精密作製技術を開発し、ペプチドナノニードルの形態に由来した性質・機能の詳細を明確にすることができれば、ペプチドナノニードルの DDS キャリアとしての機能を押し広げることができると期待される。そこで本研究では、超分子ポリマーの重合制御に基づく単分散性ペプチドナノニードルの精密作製技術を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

β-シートペプチドナノニードル (ナノ線維) は、β-シートペプチドが水素結合により一軸方向に連なった構造を持つ超分子ポリマーであり、核形成と線維伸長の二段階で形成することが知られている。様々な長さをもつ線維が形成する一つの要因として、核形成と線維伸長のプロセスが同時に起こる、言い換えると、線維伸長の開始のタイミングが揃わないことが挙げられる。研究代表者は、線維形成後に除去することが可能な『リムーバブル核』を設計し、これを伸長の開始点として外部より添加すれば、『伸長開始のタイミング』を揃えることが可能となり、長さの揃った単分散性ペプチドナノニードルを作製できると考えた。

## 4. 研究成果

(1) ThT 蛍光測定による臨界ニードル (ファイバー) 化濃度の決定

本研究では、線維伸長後に除去することが可能な『リムーバブル核』を超分子重合の開始剤として用いることを戦略とする。その準備としてペプチドナノニードルを超音波照

射により断片化することでシード (種) を作製し、このシードを開始剤としたビルディングブロックペプチド(EG24 ペプチド：線維形成配列に抗原配列と 24 mer のオリゴエチレングリコールを付加したペプチド)の超分子重合 (線維伸長) が可能であるかどうかを検討した。ここで、開始剤シードを起点とする線維伸長のほかに、EG24 ペプチド単独による自発的な線維形成・伸長が起こった場合には、単分散なナノニードルを得ることはできないと考えられる。そこで、まず EG24 ペプチド単独では線維伸長が起こらない濃度領域をチオフラビン T (ThT) 蛍光アッセイにより決定した。ThT は $\beta$ -シートペプチドナノファイバーに結合すると蛍光を発することより、線維形成およびその過程を評価・解析するために広く用いられる手法である。種々の濃度の EG24 ペプチド(25  $\mu$ M - 300  $\mu$ M)と ThT を溶解したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を 37°C でインキュベートし、ThT 由来の蛍光を経時的に観察した。その結果、ペプチド濃度が 50  $\mu$ M 以下では蛍光強度の増加は認められず、この濃度領域において EG24 ペプチドは自発的にナノニードルを形成しないことが分かった。

## (2) シードからの線維伸長

あらかじめ作製した EG24 ナノニードルを超音波照射 (20 分間) することでシードを作製し、シード (50  $\mu$ M) 共存下での EG24 ペプチド (25, 50  $\mu$ M) の会合を透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により評価した。シード非存在下ではいずれの濃度においてもペプチドのナノニードル形成は認められなかった。一方、シード共存下では、シードに用いたナノニードルよりも長い線維長をもつナノニードルの形成が認められ (図 1)、その線維長は仕込みのペプチド濃度がより高いときにより増加することが確認された (図 2)。このこ

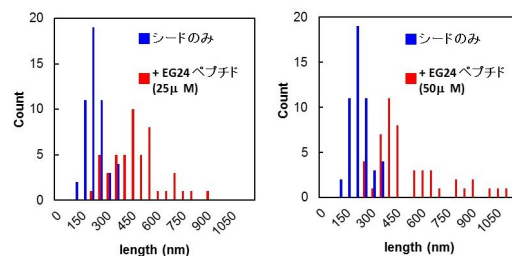


図 1. シード存在下で EG24 ペプチドの線維を作製した場合の線維長分布 (EG24 ペプチド濃度; 左: 25  $\mu$ M, 右: 50  $\mu$ M)

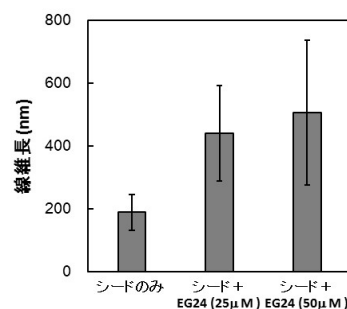


図 2. シード存在下で EG24 ペプチドの線維を作製した場合の平均線維長

とより、シード共存下で形成が確認されたナノニードルは、シードを起点として線維伸長していることが示唆された。以上より、本研究のストラテジーで提案しているリムーバブル核を作製できれば線維伸長プロセス制御により単分散性ペプチドナノニードルを作製することができる可能性が示唆された。

## (3) リムーバブル核の設計

本研究の戦略に基づき線維長制御を達成するには、『リムーバブル核』を構成するペプチド A と伸長反応に供するペプチド B の分子設計が重要である。ペプチド B には従来用いていた EG24 ペプチドを用いることにした。A 部分のみを選択的に除去するために、線維 A と線維 B とが異なる安定性を持つように、ペプチド A の親水性鎖として荷電性のオリゴグルタミン酸を選択した。線維 A は高塩濃度条件下では安定であるが、塩濃度を下げるとオリゴグルタミン酸の静電反発により崩壊すると期待される。一方、線維 B は塩濃度

に依らずに安定であると期待される。従って、高い塩濃度条件下で『リムーバル核 A』を起点とした B の伸長反応を行い、その後、系より塩を除くことによって核 A を選択的に除去できると考えた。そこで、親水性鎖として 3 残基、5 残基、7 残基のオリゴグルタミン酸をもつ E3、E5、E7 ペプチド（線維形成配列に抗原配列とオリゴグルタミン酸を付加したペプチド）をそれぞれ合成し、その自己組織化挙動を調べた。まずは、E3、E5、E7 ペプチドを 150 mM NaCl を含む 12.5 mM リン酸緩衝液（低塩濃度条件；リン酸緩生理食塩衝液）及び 600 mM NaCl を含む 50 mM リン酸緩衝液（高塩濃度条件；4 倍濃縮リン酸緩生理食塩衝液）中で 60°C、24 h インキュベートし、このときに形成するナノ会合体の形態を TEM により観察した。その結果、低塩濃度条件下においては E3 ペプチドのみがナノニードルを形成したのに対して、高塩濃度条件下においては 3 種類のいずれのペプチドもナノニードルを形成することが認められた。次に、あらかじめ高塩濃度条件下で作製したこれらのナノニードル分散液を希釈したとき（塩濃度を下げた場合）に、会合体にどのような影響がみられるかを円偏光二色性（CD）スペクトル測定により評価した。いずれのペプチドもナノニードル形成時には 217 nm に負のコットン効果に由来するピークが観察され、 $\beta$ -シート構造をもつことが認められた。この分散液をイオン交換水で 4 倍希釈したのち、CD スペクトルを経時的に測定した。その結果、E3 ペプチドでは変化が認められなかったのに対して、E5 ペプチドおよび E7 ペプチドでは、 $\beta$ -シート構造由来のピークの減少がみられ  $\beta$ -シート構造からランダム構造へと転移することが認められた。この構造転移はナノニードルの崩壊を意味していると考えられる。以上のことより E5 および E7 ペプチドが形成するナノニードルは塩濃度によりその安定性が大きく異なっていることが確

認され、リムーバル核の構成要素として適していることが示された。今後、リムーバル核を開始剤とする線維伸長について検討し、単分散性ペプチドナノニードルの作製法を確立する予定である。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tomonori Waku, Naoki Tanaka  
Recent Advances in Nanofibrous Assemblies Based on  $\beta$ -sheet-forming Peptides for Biomedical Applications、*Polymer International*、査読有、in press

〔学会発表〕(計 1 件)

和久友則・西垣早希・笠井彩音・功刀滋・田中直毅『**異方性形態を有するペプチドナノキャリアによる細胞内抗原デリバリー**』第 64 回 高分子学会年次大会 (2015 年 5 月 27 日 - 29 日、札幌コンベンションセンター)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

和久 友則 (WAKU, Tomonori)  
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・助教  
研究者番号：30548699

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし