

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25年5月31日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22350075

研究課題名（和文） ウイルスキャプシドの骨格構造を構造基盤とした機能性人工ペプチドナノカプセルの創成

研究課題名（英文） Creation of Functional Artificial Peptide Nanocapsules based on Internal Skeleton of Viral Capsids

研究代表者

松浦 和則（MATSUURA KAZUNORI）

鳥取大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：60283389

研究成果の概要（和文）：最近、決まったサイズのナノ空間を有する植物ウイルスの殻（キャプシド）をナノテクノロジーに応用する研究が注目を集めている。しかし、人工的なウイルスキャプシドを合理的に設計するのは、未発達である。本研究で我々は、ウイルス由来の β -アニュラスペプチド（24 残基）を合成し、それが水中で自己集合することで 30-50 nm の中空ナノカプセル（合成ウイルスキャプシド）を形成することを見出した。さらに、その内部での酸化鉄合成や、DNA の内包にも成功した。

研究成果の概要（英文）：Recently, application of plant viruses to nanotechnology have attracted much attention due to their fascinating nanostructures with discrete nano-space. However, it remains difficult to rationally design artificial viral capsid. In this project, we found that a synthesized viral β -annulus peptide (24 residues) showed spontaneous self-assembly into hollow nanocapsules (synthetic viral capsid) with the size of 30-50 nm in water. Moreover, we have succeeded in synthesizing magnetite and encapsulating M13 phage DNA into the artificial capsids.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	11,300,000	3,390,000	14,690,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ペプチド・自己集合・ウイルスキャプシド・ナノカプセル

1. 研究開始当初の背景

（1）天然のウイルスは、非常に美しい構造をもった有機分子の集合体であり、これらを人工的に合成することは、科学者にとっての夢の一つである。有機合成化学、高分子合成化学の発達により数 nm 領域の有機化合物を精密合成することは、ある程度可能になってきている。しかしながら、天然のウイルスの

ような数十 nm にも及ぶナノ構造体を、精密に分子設計・合成する方法論は、未発達であった。

（2）これまで、球状ウイルスの外殻タンパク質（キャプシド）の自己集合原理に学び、様々な化学者によって、「ウイルス模倣超分子」が構築されてきた。例えば、Rebek Jr. らは、クロロホルム中の水素結合形成自己集

合により、約 1 nm の分子テニスボールを形成することに成功している (*Chem. Soc. Rev.* **1996**, 255)。また、Fujita らは二官能性ピリジン系配位子の Pd イオンへの配位結合により、約 3 nm のナノカプセルを構築することに成功している (*Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 757)。しかし、これらの例は、ウイルスキャプシドの自己集合を模倣したものではあるが、その大きさはウイルスのサイズよりも一桁小さい。

(3) 我々は、球状ウイルスキャプシドの自己集合を模倣し、トリメシジン酸をコアとした三回対称性の逆平行 β -シート形成ペプチドコンジュゲートを合成し、天然のウイルスサイズ (約 20nm) のペプチドナノカプセルの構築に成功している (*J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10148)。しかし、この分子設計では、コア-アームの立体角が制御できていないために、粒径が一義的に決まった構造とはならない。また、カプセルの表と裏を化学的に異なる官能基で修飾することが困難なため、天然ウイルスのようなカプセル内部への選択的取り込みや、ターゲティング能を付与することが難しいという問題点があった。

2. 研究の目的

本研究では、人工のウイルスキャプシド様のペプチドナノカプセル構築のための新たな分子設計として、植物ウイルスの一種であるトマトブッシュスタントウイルス (TBSV) の正十二面体内部骨格を形成に関与していると思われる β -Annulus ペプチドに着目した。この 24 残基 β -Annulus ペプチド (INHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVGS) を固相法により合成し、以下の事項を明らかにすることを目的とした。

- (1) 24 残基 β -Annulus ペプチドの自己集合特性
- (2) β -Annulus ペプチドの自己集合に対する配列依存性
- (3) ペプチドナノカプセルの構造
- (4) ペプチドナノカプセル内部へのゲスト分子 (色素、DNA、タンパク質) の内包挙動

3. 研究の方法

24 残基 β -Annulus ペプチドおよびその類縁体は、Fmoc 固相合成法により合成し、逆相 HPLC により精製、MALDI-TOF-MS および MS/MS 解析により同定した。 β -Annulus ペプチドの自己集合挙動は、動的分散 (DLS) 測定、走査型電子顕微鏡 (SEM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察、蛍光相関分光 (FCS, 本予算での購入備品) 測定により行った。ペプチドナノカプセルの構造解析は、円偏光二色性 (CD) スペクトル測定、SPring-8 の放射光を用いた小角 X 線散乱 (SAXS) 測定、 ζ -電位の pH 依存性測定により行った。ペプチドナノカプセル

内部へのゲスト分子の内包は、平衡透析実験、ゲル透過クロマトグラフィー (GPC) 測定、TEM 観察などにより行った。

4. 研究成果

(1) Fmoc 固相法により合成・精製した 24 残基 β -Annulus ペプチドを水に 0.1 mM となるように溶解させたところ、平均粒径約 48 nm の構造体が自発的に形成することが DLS 測定により確認された。また、SEM および TEM により、30-50 nm の球状集合体が多数観察された (図 1)。全長 388 残基の TBSV キャプシドタンパク質の僅か 24 残基のウイルス由来の β -Annulus ペプチドフラグメントが、一分子折り畳み構造や繊維構造を形成することなく、球状構造体のみを形成したことは大変興味深いと思われる。また、このナノカプセルは臨界会合濃度 (CAC = 25 μ M) が存在し、その濃度以上では、粒径は濃度にあまり依存しないことがわかった。つまり、このカプセル構造が熱力学的に安定構造であると言える。

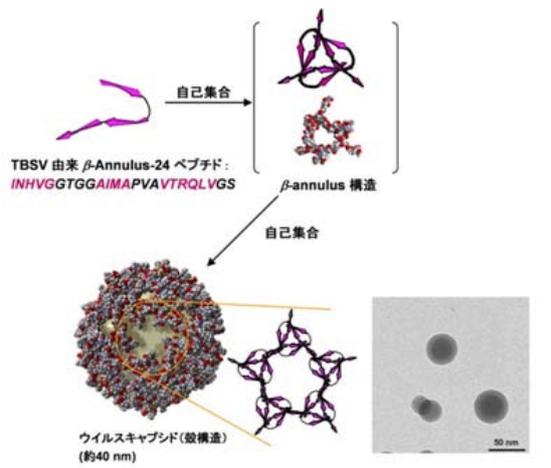


図 1. ウイルス由来 β -Annulus ペプチドの自己集合によるペプチドナノカプセル (合成ウイルス殻) の構築

(2) TBSV の X 線結晶構造解析から、 β -Annulus ペプチドの C 末端側 8 残基は、 β -Annulus 構造同志を繋ぐ Sticky-end である予想される。そこで、 β -Annulus ペプチドの C 末端側から 2 残基ずつアミノ酸欠損させたペプチドを合成し、水中での自己集合挙動を検討した。その結果、C 末端側のアミノ酸を欠損させるに従い、臨界会合濃度 (CAC) が増大、つまりナノカプセルを形成しにくくなることがわかった。また、C 末端側 8 残基を欠損させたペプチド (INHVGTTGGAIMAPVA) では、1.0 mM においても分子分散した動的分散 (DLS) の結果を与えたことから、 β -Annulus ペプチドの C 末端側 8 残基がナノカプセル形成に必須であることがわかった。

また、 β -Annulus の Pro14 を Ala に変異

させたペプチド (INHVGTTGGAIMAAVAVTRQLVGS: β -Annulus-P14A) を合成し、水中での自己集合挙動を検討した。興味深いことに、 β -Annulus-P16A は、 α -ヘリックス構造 (0.1 mM) や β -シート構造 (3 mM) を形成し、繊維状の集合体を形成することがわかった (図 2)。つまり、 β -Annulus 構造という特徴的な立体構造およびナノカプセル形成において、Pro 残基は重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

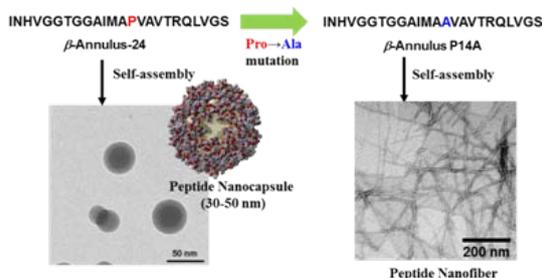


図 2. β -Annulus ペプチドの自己集合における Pro 残基の効果

(3) β -Annulus ペプチドの自己集合による球状構造体が中空カプセルであることは、放射光を用いた小角 X 線散乱 (SAXS) 測定により確認された。 β -Annulus ペプチド水溶液の SAXS プロファイルは、散乱強度と散乱ベクトル (q) のべき乗傾きが、 q^{-1} と q^{-4} を示した。これは、剛体球やコアシェル粒子モデルではフィッティングできなかったが、慣性半径 25 nm、厚さ 7 nm の中空カプセルモデルでフィッティングできたことから、中空構造が形成されていることが証明された。

また、BODIPY で蛍光ラベルした β -Annulus ペプチドを合成し、蛍光ラベルペプチドとラベルしていないペプチド集合体との交換速度を、蛍光相関分光 (FCS) 測定により評価したところ、数分のオーダーでペプチドが交換していることがわかった。つまり、このペプチドナノカプセルは、動的平衡状態にあると思われる。

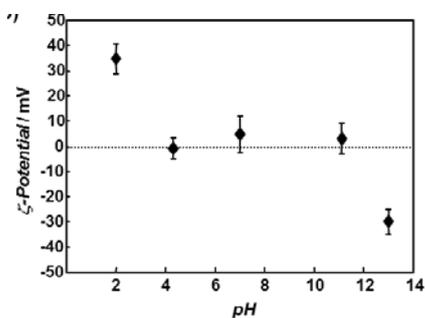


図 3. ペプチドナノカプセルの ζ -電位の pH 依存性

さらに、ペプチドナノカプセルの ζ -電位の pH 依存性を測定したところ、アミノ酸の

pKa 値から予想される各 pH での正味電荷とは異なる挙動が得られた (図 3)。これは、ペプチドの C 末端がカプセル表面に、N 末端がカプセル内部に配向していることを示唆している。つまり、中性~弱酸性 pH においては、ペプチドナノカプセルの外側は両性イオン性であり、内側はカチオン性であることを意味する。

(4) β -Annulus ペプチドの自己集合により形成したナノカプセルへの様々な色素分子の内包を平衡透析実験により検討したところ、ウラニン や ANS のようなアニオン性の色素が、カプセル構造に影響を与えることなく内包されることがわかった。これは、前述のように、中性~弱酸性 pH においてカプセル内部がカチオン性であることに起因すると思われる。一方、カチオン性色素では、カプセルの崩壊や凝集を引き起こすものもあった。

次に、M13 ファージ DNA (7249 塩基) のペプチドナノカプセルへの内包を検討した (図 4)。未集合の β -Annulus ペプチドに対して DNA を電荷比 1:1 となるように加えたところ、平均粒径 82 nm の集合体が形成することが DLS 測定からわかった。これをシスプラチン染色 (DNA のみを染色) により TEM 観察すると、20-45 nm の球状構造が観察され、これを酢酸ウラニル染色して TEM 観察するとコアシェルのコントラストを有する 75-120 nm の球状構造体が観察された。これは、ペプチド集合体内部に DNA が凝縮・内包されていることを示唆している。

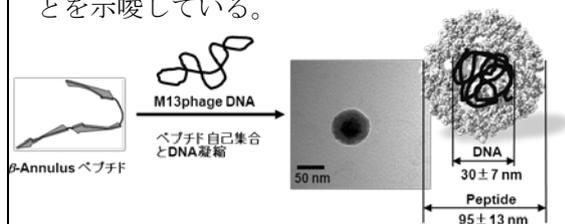


図 4. ペプチドナノカプセルへの DNA の内包

次に、ペプチドナノカプセル内部に His-tag タンパク質を内包させるために、N 末端を Ni-NTA 修飾した β -Annulus ペプチドを設計・合成した。Ni-NTA- β -Annulus ペプチドの GPC チャートでは、見かけの数平均分子量が約 185 kDa の単一のピークを与えた。これは、約 63 個のペプチドが自己集合してナノカプセルを形成していることに相当する。Ni-NTA- β -Annulus と His-tag GFP を等モル (0.1 mM) となるように混合したところ、His-tag GFP 由来のピークがペプチド集合体由来のピークと重なった GPC チャートが得られた (図 5)。一方、Ni-NTA を有さないペプ

チドナノカプセルに対しては、His-tag GFP は 10%程度しか結合しなかった。これらの結果から、Ni-NTA- β -Annulus ペプチドからなるペプチドナノカプセルに His-tag GFP が選択的に複合化されたことがわかった。

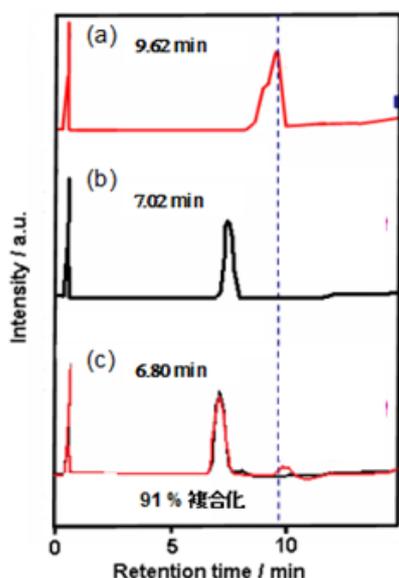


図 5 . (a) His-tag GFP, (b) Ni-NTA- β -Annulus, (c) Ni-NTA- β -Annulus + His-tag GFP の GPC チャート (赤線: 440 nm, 黒線: 220 nm)。

(5) 本研究では、球状ウイルスの自己集合戦略に学び、 β -Annulus ペプチドを設計・合成し、それらの水中での自己集合により、ウイルスキャプシド様のペプチドナノ構造体を構築できること、および様々な応用の可能性を示した。化学合成でウイルスの殻構造を作ることのメリットは、その分子設計の多用さにある。このような人工ウイルスキャプシドは、内部にゲスト分子を内包し、ドラッグデリバリーシステム、遺伝子デリバリー材料、無機ナノクラスター合成の鋳型として応用できる可能性を有している。また、ペプチドの C 末端側を選択的に化学修飾することにより、表面が選択的に修飾されたナノカプセルの構築が可能になると思われる。表面を抗原で修飾したナノカプセルは、人工ワクチンとして応用できるかもしれない。今後、本研究の設計を基本とした様々な人工ウイルスキャプシドが開発されることが期待される。

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 2 件)

- ① K. Matsuura, K. Watanabe, Y. Matsushita and N. Kimizuka, *Polymer J.*, 査読有, **45**, 529-534 (2013)

DOI: 10.1038/pj.2012.235

- ② K. Matsuura, *Polymer J.*, 査読有, **44**, 469-474 (2012)

DOI: 10.1038/pj.2012.16

- ③ K. Matsuura, K. Tochio, K. Watanabe, and N. Kimizuka, *Chem. Lett.*, 査読有, **7**, 711-713 (2011)

DOI: 10.1246/cl.2011.711

- ④ K. Matsuura, H. Hayashi, K. Murasato, and N. Kimizuka, *Chem. Commun.*, 査読有, **47**, 265-267 (2011)

DOI: 10.1039/C0CC01324B

- ⑤ K. Matsuura, K. Watanabe, K. Sakurai, T. Matsuzaki, and N. Kimizuka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有, **49**, 9662-9665 (2010)

DOI: 10.1002/anie.201004606

[学会発表] (計 4 1 件)

- ① K. Matsuura, "Synthetic Viral Capsids Self-assembled from Viral Peptide Fragments", Nanopeptide 2012: Peptides as Nanomaterials & Biomaterials, 2012 年 11 月 14 日, University of Manchester (英国)

- ② K. Matsuura 他 3 名, "Peptide Nanocapsule Self-assembled from Viral β -Annulus Peptide", The 3rd Asian Symposium on Advanced Materials, 2011 年 9 月 22 日, 九州大学

- ③ 松浦和則, 「ウイルス由来ペプチドの自己集合によるナノカプセルの創製」, 第 27 回日本 DDS 学会学術集会, 2011 年 6 月 9 日, 東京大学

- ④ K. Matsuura, "Creation of Peptide Nanocapsules based on Viral Self-assembly", PACIFICHEM 2010, 2010 年 12 月 18 日, Hawaii Convention Center (米国)

- ⑤ 松浦和則, 「ウイルスの構築原理に基づくペプチドナノカプセルの創成」, 第 59 回高分子学会年次大会, 2010 年 5 月 28 日, パシフィコ横浜

[図書] (計 1 件)

- ① 松浦和則 他, シーエムシー出版, ドラッグデリバリーシステムの新展開 II—核酸医薬・抗体医薬・ワクチン医療を支える DDS 技術—, 2012, pp. 231-234.

[その他]

ホームページ (Nature Japan 特集記事, 2011 年 1 月 13 日)

<http://www.natureasia.com/ja-jp/jobs/okushu/detail/223>

研究成果が以下のメディアに掲載された。

科研費 NEWS レター (2013 年, Vol.1)
山陰中央新報(2013/3/26)
産経新聞夕刊(2013/3/25)
日本経済新聞夕刊(2013/3/25)
日本海新聞(2013/2/6)
Yahoo ニュース(2013/1/25)
マイナビニュース(2013/1/25)
日経産業新聞(2010/11/17)
産経新聞(2010/11/14)
西日本新聞夕刊(2010/11/13)
Yahoo ニュース(2010/11/13)など

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 和則 (MATSUURA KAZUNORI)
鳥取大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：60283389

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：