

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01312

研究課題名(和文)核酸クリップナノゲルの構築とバイオマテリアル応用

研究課題名(英文) Design and biomaterial application of nucleic acid-clipping nanogel

研究代表者

澤田 晋一 (Sawada, Shin-ichi)

京都大学・工学研究科・助教

研究者番号：50444104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ・医用マテリアルとしてその有用性が明らかとなりつつあるナノサイズの高分子微粒子において、自己会合性分子による架橋点を有するゲル微粒子が近年注目されている。本研究では自己組織化ゲル微粒子のゲル構造を制御する会合性因子としてオリゴ核酸による二重鎖形成力を利用することで、会合体形成やそのゲル構造を制御した新規会合性ゲル微粒子(核酸クリップナノゲル)の構築を目的とした。水溶性多糖であるプルランにアジド基を導入したアジド基置換プルランと末端にアルキンを導入したオリゴ核酸から合成したオリゴ核酸置換プルランが緩衝液中でオリゴ核酸の二重鎖形成とともに100nm程度の微粒子を形成することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Polymer gel nanoparticles having physically cross-linking points by self-associating molecules have attracted attention as bio/medical material in recent years. In this study, we constructed novel self-assemble gel particles (nucleic acid-clipping nanogel) by the duplex formation of complementary oligonucleic acids as an associative factor controlling the gel structure. Oligonucleic acid substituted pullulan was synthesized by click chemistry from azido group modified pullulan that is a water-soluble polysaccharide and alkyne modified oligonucleic acid. The oligonucleic acid substituted pullulan formed nanosize gel particles (about 100 nm) by duplex formation of oligonucleic acid in buffer.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ナノゲル 多糖 オリゴ核酸 架橋化核酸 二重鎖形成 自己組織化

1. 研究開始当初の背景

生物、医学、工学など様々な分野においてポリマーゲルが幅広く利用されており、その中でも近年、ナノサイズの微粒子でありゲルの特性も合わせもつナノゲル微粒子は、医療や生命科学分野での利用が期待されている。しかしながら、ナノサイズのゲル微粒子の場合、ナノスケール領域でゲルの構造・機能を自在に制御する技術が不可欠であり、さらには用途に合わせた特異な機能を付与する必要も求められている。

これまでに申請者らは、生体高分子の一つである多糖を基盤とした自己組織化材料の研究を進めてきた。特に、会合性因子として疎水性分子を導入した疎水化多糖が自己組織化により、内部にナノ空間を有するナノサイズのゲル(ナノゲル)を構築(自己組織化ナノゲル法)し得ることを明らかとさせている(Nishikawa, T. et al., *Macromolecules*, 27, 7654, 1994; Akiyoshi, K. et al., *Macromolecules*, 30, 857, 1997)。また、この疎水化多糖ナノゲルはその内部にタンパク質を取り込むことができ、さらにはシクロデキストリンによりナノゲルの疎水性会合を解離させ、タンパク質を放出させることができるため、人工分子シャペロンとして機能することが報告されている(Akiyoshi, K. et al., *Bioconjugate Chem.*, 10, 321, 1999; Nomura, Y. et al., *FEBS Lett*, 553, 271, 2003)。このナノゲルのタンパク質複合化能を利用したタンパク質デリバリー担体への応用も展開されている。

一方、生体高分子や生体適合性高分子を架橋させたポリマーゲルは、薬学・医療分野から分離テクノロジーや化粧品、食品分野まで幅広く利用されており、機能性高分子をゲル材料として用いた機能化ゲルも開発されてきている。

このようなナノサイズの微粒子への機能付与分子の一つとしてオリゴ核酸が挙げられる。オリゴ核酸はその塩基配列に相補的なポリ・オリゴ核酸と二重鎖を形成することから、微粒子に相補的な核酸を修飾することで、微粒子の集合制御による精密構造制御材料の調製や遺伝子キャリア、遺伝子診断への応用が進められている。しかしながら、これらの研究で用いられる微粒子の多くは磁性微粒子やシリカ、金微粒子のような無機微粒子であり、架橋点としてオリゴ核酸を用い、尚かつ温度応答性をもつ微粒子の研究例は見られない。

また、これまでに我々が報告してきた疎水化多糖ナノゲルでは、その構造制御は導入した疎水性分子の会合・解離に依存している。そこで、新たな会合性因子として、また、温度刺激による構造制御因子としてオリゴ核酸に着目し、オリゴ核酸の相補的配列結合性と温度刺激による二重鎖形成制御を利用することを考えた。オリゴ核酸を会合性因子として利用する(核酸クリップ)ことで、外部

からの温度刺激に応答して動的に構造変換しえる高分子ナノ組織体(核酸クリップナノゲル)を開発しえると考えた。また、会合分子であるオリゴ核酸の種類・配列・鎖長を変えることで異なる複数の温度刺激によって多段階的に会合挙動を制御しえるゲルマテリアルの創製が期待される。このような温度応答性の会合性因子を有する微粒子は、従来型の疎水化多糖ナノゲルでは困難であった、ナノゲルからの薬物・タンパク質など内包物の放出速度の制御を温度という単純な外部刺激により制御し得ると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、バイオ・医用材料としてその有用性が明らかとなりつつあるナノサイズの高分子微粒子において、特に微粒子内に自己会合性分子による架橋点を有するゲル微粒子に着目した。自己組織化ゲル微粒子のゲル構造を自在に制御する会合性因子としてオリゴ核酸による二重鎖形成力を利用(核酸クリップ)することで、会合体形成およびそのゲル構造を制御した新規会合性ゲル微粒子(核酸クリップナノゲル)(図1)を構築するとともに、二重鎖オリゴ核酸の特性である温度応答性を付与した新しい動的高分子ナノ組織体を開発し、医用・バイオ材料としての特性について検討する。

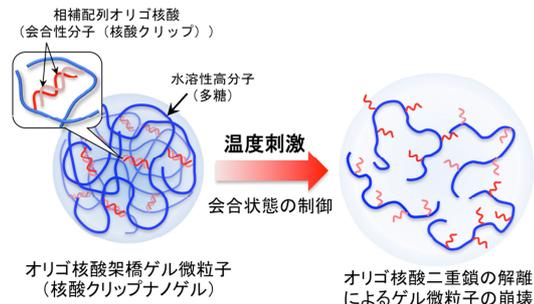


図1. オリゴ核酸架橋ゲル微粒子(核酸クリップナノゲル)の概念図

3. 研究の方法

(1) オリゴ核酸およびオリゴ核酸誘導体の設計と合成

まず、本研究に用いるオリゴ核酸の設計と合成を進めた。水溶性多糖に導入するオリゴ核酸としては、まず天然型DNAと、人工核酸である架橋化核酸(Bridged Nucleic Acid)(BNA)からなるオリゴ核酸を設計した。その配列設計としては生理条件下に近い40前後にオリゴDNA二重鎖の融点(T_m 、解離温度)を有する配列を予測し、会合点となるオリゴ核酸の鎖長がより短い配列を検討した。次に、候補配列のうち、4-6merのオリゴ核酸を固相合成法により合成し、温度制御UV測定装置によりその T_m を測定することで、会合性分子として水溶性多糖に導入するオリゴ核酸を決定した。また、オリゴ核酸の5'末端には水溶性多糖への導入のためのアルキンを付与した。

(2) オリゴ核酸置換多糖の設計と合成

得られたオリゴ核酸誘導体を導入する水溶性高分子としては、これまでに申請者が会合性微粒子形成研究に用いてきた水溶性多糖を用いた。具体的には、直鎖状水溶性多糖であるプルランにアジドプロピルアミンを導入し、アジド基置換プルランを合成した。次に、(1)で得られた、末端アルキン化オリゴ核酸とアジド基置換プルランを用い、クリック反応によりプルランにオリゴ核酸を導入したオリゴ核酸置換プルランを合成した。

(3) オリゴ核酸置換多糖による会合体ゲル微粒子形成評価

得られたオリゴ核酸置換プルランを種々の溶媒および条件で混合し、オリゴ核酸二重鎖形成を紫外・可視分光光度計 (UV-VIS) を用いて検討した。また、会合体微粒子の形成およびそのサイズ・分子量・会合数等の会合特性を流体場分離-多角度光散乱計 (FFF-MALS)、動的光散乱計 (DLS)、透過型電子顕微鏡 (TEM) により評価した。

(4) オリゴ核酸置換多糖ゲル微粒子の温度特性解析

オリゴ核酸置換プルランゲル微粒子内のオリゴ核酸二重鎖の温度特性および会合体ゲル微粒子形成における温度特性を紫外・可視分光光度計 (UV-VIS) および蛍光プローブ法により検討した。

4. 研究成果

(1) オリゴ核酸およびオリゴ核酸誘導体の設計と合成

4および6merの回文配列オリゴ核酸をホスホロアミダイト法により合成した。合成したオリゴ核酸の T_m 測定結果から、天然型のオリゴ核酸の T_m 値と比較して、グアニン部分を BNA に置換することで T_m が 10 以上上昇することが確認された。この T_m 上昇は BNA への置換数に依存的であった。BNA の置換により天然型と比較してより短鎖で安定な会合点 (二重鎖形成) を形成し得ることが確認され、得られた結果をもとに、末端アルキン修飾した 4mer の GCGC 配列オリゴ核酸 (G は BNA) を会合性分子として合成した。

(2) オリゴ核酸置換多糖の設計と合成

分子量約 10 万のプルランに 1,1'-カルボニルジイミダゾールを用いてアジドプロピルアミンを反応させた結果、プルラン 100 単糖あたりアジドプロピルアミンを 5 分子置換したアジド基置換プルランを得た。このアジド基置換プルランにクリック反応により 5'末端アルキン化オリゴ核酸 (GCGC) を置換し、¹H-NMR 測定によりオリゴ核酸導入量を算出した結果、100 単糖あたり 5 個のオリゴ核酸が導入されたオリゴ核酸置換多糖を得られた。

(3) オリゴ核酸置換多糖による会合体ゲル微粒子形成評価

BNA 導入オリゴ核酸置換プルラン (Pullulan-GCGC) を PBS に溶解させ、その溶液を 90 °C まで昇温させ、ゆっくりと降温させることでオリゴ核酸の二重鎖形成を行った。この溶液の動的光散乱測定より、オリゴ核酸置換プルランが 130 nm 程度の会合体を形成していることが確認された。また、FFF-MALS 測定から会合体微粒子の分子量が約 100 万であり、オリゴ核酸置換プルランが 10 分子程度会合して微粒子を形成していることが確認された。さらに、この会合体分散液を TEM 観察したところ、100nm 程度の球状構造体が確認された (図 2)。

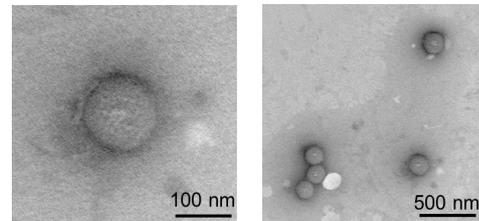


図 2 . オリゴ核酸置換プルラン会合体の TEM 像

(4) オリゴ核酸置換多糖ゲル微粒子の温度特性解析

核酸の二重鎖形成蛍光プローブである Eva Green を用いてオリゴ核酸置換プルランの PBS 溶液内での T_m を測定した結果、オリゴ核酸 (GCGC) 単独では T_m が 45 °C であるのに対し、オリゴ核酸置換プルランでは 35 °C 程度であることが確認された。そこでナノ粒子トラッキング粒径分析装置を用い、20 °C と 35 °C でのオリゴ核酸置換多糖ゲル微粒子の粒径解析を行ったところ、20 °C では約 130nm であった粒径が、35 °C では 200nm に増大していた。これは架橋点のオリゴ核酸二重鎖の解離によるものと考えられる。

以上の結果から本研究では、架橋化核酸 (BNA) を配列に組み込んだ極めて短いオリゴ核酸が 30 °C 以上の T_m を有し、会合性分子として機能することを初めて明らかとした。また、このオリゴ核酸を水溶性多糖であるプルランに導入する手法を確立するとともに、このオリゴ核酸置換多糖が会合体微粒子を形成することや温度に応じて粒径変化を示すことも明らかとした。本研究成果は、多糖と核酸という生体分子から成る新しい温度応答性会合体微粒子の構築手法とその特性を明らかとしただけでなく、数 mer のオリゴ核酸をタンパク質や核酸医薬に修飾することでこれらを本会合体微粒子に担持し得ることも示唆しており、オリゴ核酸置換多糖から成るゲル微粒子のバイオ、医用マテリアルとしての展開が期待できる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 11 件)

澤田晋一, 崎山瑞姫, 竹田茂生, 佐々木善浩, 秋吉一成、ヒドロキシプロピルセルロース自己組織化ナノゲルの熱応答性とバイオ機能、第 64 回高分子学会年次大会、2015 年 5 月 28 日、札幌コンベンションセンター

澤田晋一, 湯川寛子, 竹田茂生, 佐々木善浩, 秋吉一成、多分岐ガラクトキシログルカン自己組織化ナノゲルの特性とバイオ機能、第 64 回高分子学会年次大会、2015 年 5 月 28 日、札幌コンベンションセンター

澤田晋一, 湯川寛子, 竹田茂生, 佐々木善浩, 秋吉一成、多分岐ガラクトキシログルカンナノゲルの特性とバイオマテリアル機能、第 37 回日本バイオマテリアル学会大会、2015 年 11 月 10 日、京都テルサ

澤田晋一, 沖田圭司, 竹田茂生, 向井貞篤, 佐々木善浩, 秋吉一成、超分岐多糖ナノボール集積ゲルマテリアルの特性とバイオ機能、第 65 回高分子学会年次大会、2016 年 5 月 26 日、神戸国際会議場

竹田茂生, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成、機能性グルカンデンドリマーを用いた核酸デリバリー、第 65 回高分子学会年次大会、2016 年 5 月 26 日、神戸国際会議場

澤田晋一, 梅崎香織, 佐藤祐子, 下田麻子, 向井貞篤, 佐々木善浩, 秋吉一成、エクソソーム工学によるハイブリッド材料の設計、第 65 回高分子討論会、2016 年 9 月 15 日、神奈川県横浜キャンパス

張若詩, 竹田茂生, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成、核酸ナノキャリアとしての機能性グルカンナノスフェアの設計と機能評価、第 65 回高分子討論会、2016 年 9 月 16 日、神奈川県横浜キャンパス

岩本大和, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成、核酸クリップナノゲルの設計と特性評価、第 66 回高分子学会年次大会、2017 年 5 月 29 日、幕張メッセ

澤田晋一, 田原義朗, 向井貞篤, 佐々木善浩, 秋吉一成、機能性自己組織化多糖ナノゲルの設計とバイオメディカル応用、第 66 回高分子討論会、2017 年 9 月 21 日、愛媛大学城北キャンパス

岩本大和, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成、核酸クリップナノゲルの設計と機能解析、第 66 回高分子討論会、2017 年 9 月 21 日、愛媛大学城北キャンパス

澤田晋一, 岩本大和, 佐々木善浩, 秋吉一成、オリゴ核酸架橋多糖ナノゲルの設計と機能、第 39 回日本バイオマテリアル学会、2017 年 11 月 21 日、タワーホール船堀

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 晋一 (SAWADA, Shin-ichi)
京都大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号： 50444104

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()