

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K12077

研究課題名(和文)核酸クリップナノゲルのシャペロン機能

研究課題名(英文)The chaperone ability of nucleic acid clip nanogels

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：架橋型人工核酸であるBNAおよびLNAを部分的に置換した6mer程度のオリゴ核酸を導入した水溶性多糖(プルラン)が水中でオリゴ核酸の二重鎖形成により、100nm程度の会合体微粒子(核酸クリップナノゲル)を形成することを明らかとした。また、相補的な配列を有する二種類の蛍光分子修飾オリゴ核酸修飾プルランにおいては、ナノゲル形成に伴うFRET(蛍光共鳴エネルギー移動)が確認され、蛍光測定によりナノゲルの会合挙動を解析しえることが明らかとなった。この核酸クリップナノゲルが免疫賦活化分子として知られている20mer程度のDNAであるCpGと複合化し、細胞への送達とCpG活性を示すことも明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAを代表とする核酸同士の結合力を利用してナノサイズの微粒子を形成させることを考えた。プルランは糖が連なった紐状の構造をしており、食品の増粘剤などに利用されている。このプルランにごく短いDNAを結合させた分子を設計、合成した。DNA鎖が短い場合その結合は非常に弱い、DNA鎖の中に部分的に結合力を強める人工的に設計合成された核酸を加えることでナノサイズの微粒子を創り出すことに成功した。このような微粒子はほとんど報告例が無く、学術的な意義は高い。また、薬となりうる核酸を体内で運ぶための運搬体としての応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：It was found that water-soluble polysaccharides (pullulan) containing 6-mer oligonucleotides partially replaced with BNA and LNA, which are bridged (locked) nucleic acids, form assembled particles (nucleic acid clipping-nanogels) about 100 nm in water by double-strand formation of the oligonucleic acids. In addition, the FRET (fluorescence resonance energy transfer) associated with nanogel formation was observed in oligonucleic acid-substituted pullulans having complementary sequences modified with two types of fluorescent probes, and the assembling behavior of the nanogels could be analyzed by fluorescence measurement. It was also found that the nucleic acid clip nanogels can complex with CpG, a 20-mer DNA known as an immunostimulatory molecule, and that they showed cellular delivery and CpG activity.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：自己組織化 核酸 刺激応答性 ナノゲル DDS

### 1. 研究開始当初の背景

近年、高分子を基盤としたナノサイズの微粒子が生物、医学、工学など様々な分野において利用されており、その中でもゲルの特性を合わせもつナノゲル微粒子は、医療や生命科学分野においてその応用が活発に研究されている。

これまでに申請者の所属する研究室では、生体高分子の一つである多糖を基盤とした自己組織化マテリアル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)を構築し得ることを明らかとしてきている(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。さらには、このナノゲル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。

ナノサイズのゲルのみならず、様々な生体高分子や合成高分子を架橋させたポリマーゲルが薬学・医療分野から化粧品、食品分野まで幅広く利用されており、ゲルとしての特性だけでなく様々な機能を付与した機能化ゲルも開発されてきている。近年、申請者らの研究室において反応性基を導入したナノゲルを架橋点とした新規ヒドロゲルの開発も行っており、様々な分野への応用展開を行っているところである。

最近、申請者はナノサイズのゲル微粒子を形成する会合性因子としてオリゴ核酸に着目した新しい会合性微粒子(核酸クリップナノゲル、図1)の開発を進めている。水溶性多糖であるプルランに、天然及び人工核酸より合成したオリゴ核酸を付加したオリゴ核酸置換多糖が水中で100 nm程度の微粒子を形成することを明らかとしている。また、その微粒子は導入したオリゴ核酸の二重鎖形成により構築されており、形成した二重鎖が温度にตอบสนองして解離することも確認している。このような、生体高分子を基盤とし、物理的架橋点としてオリゴ核酸を用いたナノサイズのゲル微粒子の研究は世界的にも類を見ない。

本研究では、申請者が開発した核酸クリップナノゲルと核酸やタンパク質などとの相互作用について詳細に調べることで、核酸クリップナノゲルの核酸、タンパク質との複合化機能や変性したタンパク質の巻き戻し機能などの所謂シャペロンとしての機能を明らかとしたい。また、これらの知見を得ることにより、核酸やタンパク質との相互作用を制御し得る、核酸クリップナノゲルの開発とDDSなどへの応用が進むと考えられる。

### 2. 研究の目的

これまでに研究を進めてきたオリゴ核酸修飾多糖ナノゲルのさらなる機能化と、核酸やタンパク質との相互作用について明らかにするとともにその応用を目的とする。具体的には、オリゴ核酸による二重鎖形成力を利用した会合性ゲル微粒子(核酸クリップナノゲル)を基盤とし、その会合挙動などの基礎特性を詳細に調べるとともにタンパク質や核酸との複合化特性についての検討を進める。さらにはタンパク質や核酸との相互作用を促進する機能性分子やオリゴ核酸を付加した核酸クリップナノゲルを開発する。この新規核酸クリップナノゲルについて、バイオ医薬品の輸送・徐放マテリアルなどへの応用を目指す。

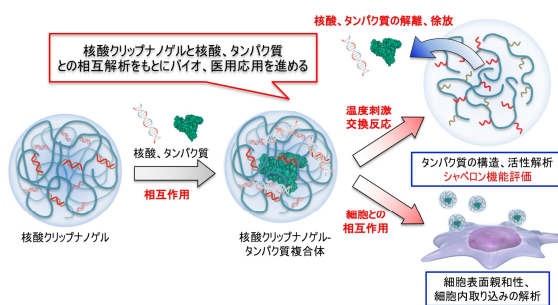


図1. 核酸クリップナノゲルと核酸・タンパク質との複合化および細胞との相互作用

### 3. 研究の方法

#### (1) 蛍光標識オリゴ核酸架橋多糖ナノゲルの合成と物性評価

Rhodamine B(Rh)および Fluorescein(FI)を修飾したプルラン(Mw = 100,000)と 3-Azidopropylamine を DMSO 中で N,N'-Carbonyldiimidazole (CDI) 活性化法により反応させ、蛍光修飾アジド化プルランの合成を行った。続いてホスホロアミダイト固相合成法により 5' 末端をアルキル化した、BNA または LNA (図2) を含む 6mer オリゴ核酸(Hexynyl-TCGGCT, Hexynyl-AGCCGA)を合成し、逆相クロマトグラフィーにより精製した(G:BNA or LNA)。蛍光標識アジド化プルランに末端アルキル化オリゴ核酸をクリックケミストリーにより導入し、二種類の蛍光標識オリゴ核酸置換プルラン(Pullulan-TCGGCT-Rh, Pullulan-AGCCGA-FI)を

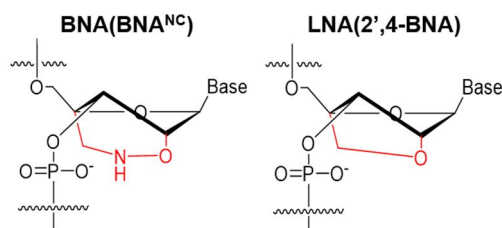
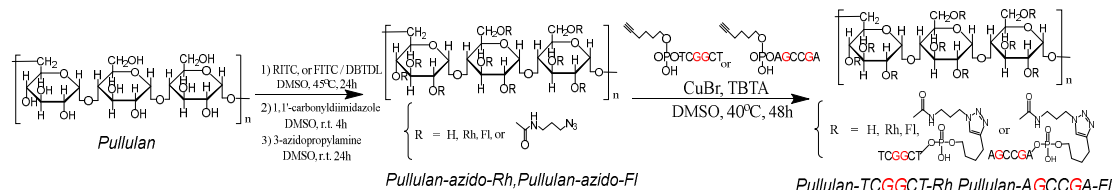


図2. BNA および LNA の構造

合成した（スキーム 1）。合成物の確認と導入率の算出は  $^1\text{H-NMR}$  および UV-VIS 測定により行なった。また、これら二種類の蛍光標識オリゴ核酸置換プルラン溶液を種々の条件で混合、超音波処理を行った後、ナノゲル形成挙動および蛍光特性について、DLS 測定および蛍光スペクトル測定により検討した。ナノゲルのオリゴ核酸二重鎖の  $T_m$  については、温度変化吸光度測定により、また蛍光標識オリゴ核酸置換プルランの会合挙動については、温度変化蛍光測定から検討した。（2）ナノゲルとタンパク質および CpG ODN との複合化評価

オリゴ核酸置換多糖ナノゲルに担持させるモデル薬剤分子として、牛血清アルブミン（BSA）お



スキーム 1 . 蛍光標識オリゴ核酸置換プルランの合成

よび免疫賦活性 1 本鎖 DNA アジュバントである CpG ODN の末端に相補配列付加したものをを用いた。まず、BSA とナノゲルを種々の条件で混合した後 HPLC 測定を行い、ナノゲルと BSA との複合化について検討した。次に、3' 末端に 6mer のオリゴ核酸（TCGGCT）を修飾した CpG-TCGGCT を、ナノゲルと種々の条件で混合した後 HPLC 測定を行うことで、ナノゲルと CpG ODN の複合化について検討した。また、付加したオリゴ核酸の LNA 置換数が異なる CpG ODN との複合化についても検討を行なった。

#### 4 . 研究成果

##### （1）蛍光標識オリゴ核酸架橋多糖ナノゲルの合成と物性評価

$^1\text{H-NMR}$  測定より、100 単糖あたり 10 個のアジド基が導入された蛍光標識アジド化プルランの合成を確認した。続くアルキン修飾オリゴ核酸の導入により、100 単糖あたり 3 個のオリゴ核酸が置換された蛍光標識オリゴ核酸置換プルランの合成が確認された。次に相補配列を有する蛍光標識オリゴ核酸置換プルラン同士を混合して TEM 観察を行った結果、球状粒子が観察され、DLS 測定より 20 において粒径 80-90 nm 程度の会合体（ナノゲル）を形成していること、さらには温度を 60 まで昇温させることでこのナノゲルの粒径が減少し、ナノゲルが崩壊することが示唆された。また蛍光スペクトル測定から、ナノゲル形成により FI から Rh への FRET が確認され、ナノゲル形成挙動が蛍光スペクトルにより追跡し得ることが明らかとなった（図 3）。温度変化吸光度測定及び蛍光測定による FRET 解消解析から、このナノゲルの解離温度が 62-63 程度であることが確認された（図 4）。

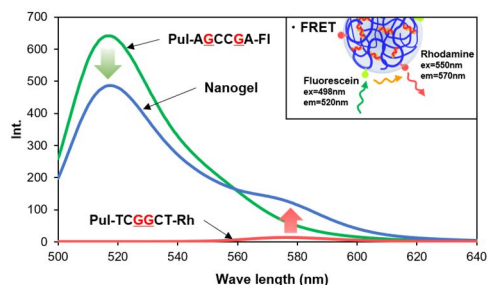


図 3 . 蛍光標識オリゴ核酸置換プルランのナノゲル形成による FRET 現象

##### （2）ナノゲルと CpG ODN との複合化評価

ナノゲルと BSA を種々の濃度比で混合し、所定時間静置後、HPLC 測定したところ、BSA とナノゲルとの複合化はほとんど確認できなかった。BSA の加熱変性によるナノゲルとの相互作用促進はナノゲルが加熱により解離するため検討できなかった。続いて、HPLC 測定によりナノゲルと CpG の複合化を検討した結果、CpG-TCGGCT がナノゲルと複合化していることが確認された（図 5）。また、CpG ODN に付加したオリゴ核酸の LNA 導入数を増やすことで、その複合化率が上昇したことから、LNA 導入数により複合化安定性を制御し得ることが明らかとなった。

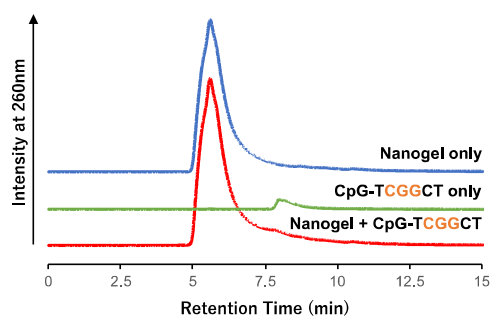


図 5 . ナノゲル/CpG-TCGGCT 複合体のサイズ排除クロマトグラム

以上の結果から、部分的に人工架橋化核酸に置換することで、従来不可能であった極めて短い鎖長のオリゴ核酸の二重鎖形成を駆動力としたナノゲルを構築できることが確認され、さらには複数種の蛍光分子をナノゲルに導入することで、それらの FRET からナノゲル形成挙動を追跡し得ることが明らかとなった。また、架橋型人工核酸として新たに LNA を用いたところ、BNA と同様にナノゲル形成が可能であることが明らかとなり、LNA を用いることで合成コストの削減とスケールアップが可能であることが確認できた。核酸やタンパク質に短鎖オリゴ核酸を修飾することでナノゲルとの複合化が可能となり、温度依存的に放出制御し得るオリゴ核酸架橋多糖ナノゲルはバイオ分子キャリアとしての応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒池友哉, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成
2. 発表標題 蛍光分子を導入したオリゴ核酸架橋多糖ナノゲルの設計と特性評価
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒池友哉, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成
2. 発表標題 蛍光標識オリゴ核酸置換プルランを用いたナノゲルの設計と機能評価
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤田晋一
2. 発表標題 エクソソームのハイブリッド化による機能制御
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田晋一, 岩本大和, 佐々木善浩, 秋吉一成
2. 発表標題 オリゴ核酸修飾多糖によるナノゲル構築とその機能評価
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本大和, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成
2. 発表標題 オリゴ核酸架橋多糖ナノゲルの構築とバイオ応用
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩本大和, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成
2. 発表標題 核酸二重鎖形成による新規ナノゲルの設計と機能
3. 学会等名 第28回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩本大和, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成
2. 発表標題 オリゴ核酸置換多糖ナノゲルの構築と機能評価
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018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
---------	---------