

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14735

研究課題名（和文）高アスペクト比を有するポリオンコンプレックスベシクルの創製

研究課題名（英文）Development of Polyion Complex Vesicles with High Aspect Ratio

研究代表者

藤田 聖矢 (Fujita, Seiya)

京都大学・工学研究科・特定助教

研究者番号：30824007

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：酵素を内包した半透性を有するチューブ状集合体を用いれば、植物に高効率で酵素を導入可能であると考えられる。本研究課題では、植物への酵素の導入を指向した高アスペクト比を有する新規ポリオンコンプレックスベシクル(PICsome)の構築を目指した。そこで、PICsome多数の形成配列に α -Sheet形成多数を付与を検討した。多数のペプチドを固相合成し、二次構造の評価を行い、付与するペプチド配列の最適化を行った。その結果、 α -Sheet形成することがあきらかとなったセリンの繰り返し配列が、 α -Sheetの強さや溶解性の面から最適であると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素の直接導入は、遺伝子組み換え技術を使用しない植物の形質付与法として非常に高い関心がもたれている。一方で、酵素の導入効率が低いという問題があり、実用化に至っていない。今回、得られた知見から今後酵素を内包した高アスペクト比を有する新規ポリオンコンプレックスベシクル(PICsome)の構築できれば、現在より高い効率で酵素を植物に導入できるようになると考えられる。したがって、本研究課題の結果により、遺伝子組み換え技術を使用しない植物の形質付与法の実用化に一步近づいたと考え、今後の技術発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：Tubular assemblies with semipermeability containing enzymes can be efficiently introduce enzymes into plants. In this research, we aimed to construct novel polyion complex vesicles (PICsomes) with a high aspect ratio, directed towards the introduction of enzymes into plants. Therefore, we explored the incorporation of multiple α -sheet-forming sequences into the PICsome structure. Various peptides were synthesized using solid-phase synthesis, and their secondary structures were evaluated to optimize the peptide sequences to be incorporated. As a result, it was suggested that repeating sequences of serine, which were found to form α -sheets, were optimal in terms of α -sheet strength and solubility.

研究分野：生体関連化学

キーワード：ペプチド ベシクル タンパク質

1. 研究開始当初の背景

ポリマーベシクルは内水相を有し、タンパク質のような親水性物質を内包できるため効率的な分子輸送キャリアのための有望な材料である。そのポリマーベシクルのひとつである PICsome は、正と負のアミノ酸とポリエチレングリコール(PEG)のブロック共重合体の自己集合からなるカプセル状集合体として調製される¹⁾。また、PICsome は半透性を有し、内包された酵素は外部環境から保護されたまま機能発現できるという利点を有する。例えば、酵素 (β -galactosidase) を内包させた PICsome は、酵素活性を維持したままがん細胞へ送達されたことが報告されている。

一方で、遺伝子組み換え植物は作物の生産性向上のために開発されてきた。しかし、近年遺伝子組み換え技術は遺伝子汚染の懸念からその利用が制限されている。そこで、植物への遺伝子組み換えによらない新規形質付与が求められており、酵素の直接送達法が注目されている。我々は、酵素を内包させた PICsome を調製し、その表面に細胞膜透過性ペプチド(CPP)を提示することで、植物への長期的な抗生物質耐性の付加に成功した²⁾。応用実現に向けてさらなる酵素の導入効率の向上が求められている。最近、球状集合体よりもアスペクト比の高いロッドやチューブの方が植物への輸送効率に優れていることが報告された。例えば、カーボンナノチューブを用いた遺伝子の植物内への輸送は効率が高い^{3,4)}。そこで、酵素を内包した半透性を有するチューブ状集合体を用いれば、植物に高効率で酵素を導入可能であると考えられる。しかし、これまでチューブ状集合体で半透性を有するものは存在しない。

2. 研究の目的

本研究課題では、植物への酵素の導入を指向した高アスペクト比を有する新規ポリイオンコンプレックスベシクル(PICsome)の構築を目指した。トリグリシンを含有するくさび形の両親媒性の分子は、トリグリシンが集合体の内側に配向したチューブ状集合体を形成する(Kameta et al., *Chem. Commun.*, **52**, 1346 2016)。これはトリグリシンによるポリグリシン II 型として知られる多重の水素結合ネットワーク構造が分子間で形成しチューブ形成が促進されるためである。そこで、PIC 形成ペプチドに β -Sheet 形成配列を導入し、PIC 間で水素結合を形成させることでチューブ状の PIC 集合体の構築を目的とした。

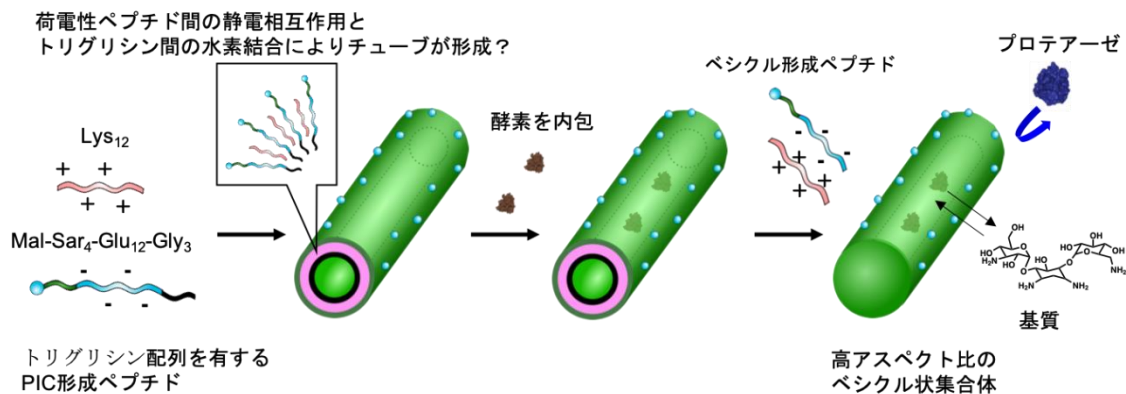


図 1 アスペクト比の高いポリイオンコンプレックスベシクル(PICsome)の創製

3. 研究の方法

ベシクル形成ペプチドには当研究室で開発した PICsome を形成する Lys₁₂ と Mal-Sar₄-Lys₁₂ を用いた。アニオン性ペプチドは機能性ペプチドを修飾するためのマレイミド基を有する。また、チューブ形成ペプチドとしてベシクル形成配列に成 β シート形成配列(XXX)を付与した Mal-Sar₄-Lys₁₂-XXX₃を用いた。これらのペプチドは固相合成法によって合成し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により精製を行った。CD スペクトルにより、ペプチドの二次構造を確認した。

4. 研究成果

これまで、種々のペプチドをベシクル形成に用いて来た。最近、オリゴサルコシン鎖を有する 12 残基のリジンの側鎖をカルボキシル化すると、低濃度で 100nm 程度のベシクルを形成することを見出している。そこで、PICsome を形成することを見出したペプチド配列 Mal-Sar₄-K(COOH)₁₂ に Gly₃ を付与したペプチド Mal-Sar₄-K(COOH)₁₂GGG の合成に取り組んだ。ペプチドの N 末端側には種々の機能性ペプチドを修飾できるように、これまで通りチオールと反応することが知られているマレイミド基を付与した。そのため、トリグリシン配列はペプチドの C 末端に付与した。このペプチドを固相合成法によって合成した。その後、MALDI-TOF-MS によって、目的のペプチドが合成できていることを確認した。これを逆相 HPLC によって、精製した。ペプチドは 2 級アミノ酸であるサルコシンを繰り返し合成するため、不純物が形成しやすく、収率が低くなることが考えられた。そのため、サルコシンをダブルカップリングすることで、収率の低下を防げた。その結果、設計したペプチド配列 Mal-Sar₄-K(COOH)₁₂ に Gly₃ を付与したペプチド Mal-Sar₄-K(COOH)₁₂GGG の前駆体 Mal-Sar₄-K₁₂GGG は良好な収率で得られた。次に、このペプチドの二次構造を調べるために、ペプチド水溶液を調製し、円二色性スペクトルを測定した。その結果、ペプチドは水中でランダムコイル構造を形成していることを確認した。期待通りに β-Sheet 形成しなかったため、ペプチドの設計を変更した。β-Sheet 形成配列を有するペプチドは、そのオリゴマー化のために精製が困難になることが知られているが、K₁₂ 配列を用いることで、側鎖間の静電反発のためにオリゴマー化が防止され、容易に精製可能だと考えられる。Mal-Sar₄-K(COOH)₁₂ に付与する β-Sheet 形成ペプチドを最適化した。22 を種類の アミノ酸からなるホモペプチドを固相合成法によって合成した。その後、MALDI-TOF-MS によって、目的のペプチドが合成できていることを確認した。これを逆相 HPLC によって、精製した。次に、これらのペプチドの二次構造を調べるために、ペプチド水溶液を調製し、円二色性スペクトルを測定した。その結果、多数のペプチドで β-Sheet 形成することがあきらかとなり、特にセリンの繰り返し配列が、最適であると示唆された

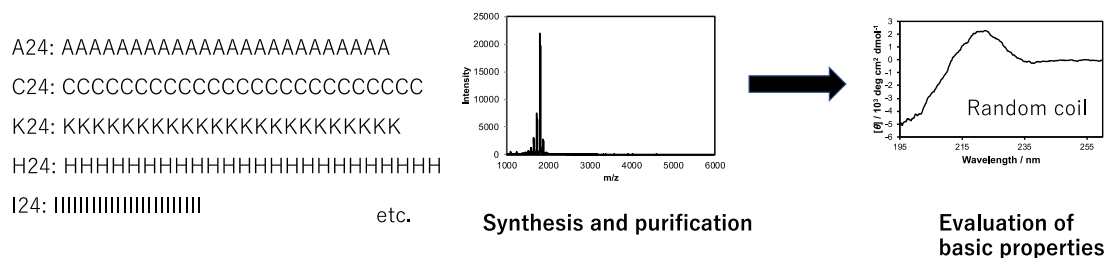


図 2 ペプチドの二次構造の確認

参考文献

- (1) Anraku et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 1631, 2010
- (2) Fujita et al., *Biomacromolecules*, 2021, 22, 1080, 2021
- (3) Demier et al., *Nat. Nanotech.*, 14, 456, 2019
- (4) Kwak et al., *Nat. Nanotech.*, 14, 447, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------