

研究課題別評価書

1. 研究課題名

ペプチド分子の自己集合によるナノ空間の創製

2. 氏名

松浦和則

3. 研究のねらい

本研究課題では、球状ウイルスやクラスリンなどの天然のタンパク質ナノカプセルの自己集合戦略に学び、そのエッセンスを単純化した自己集合性分子を設計・合成し、人工ナノカプセルを構築するための方法論を開拓することに挑戦した。つまり、三回もしくは五回対称性のコア分子に、自己集合性ユニットとして β シート形成ペプチドやグルタチオンなどを結合させたコンジュゲート分子を合成し、その水中での自己集合により人工ナノカプセルを構築する。また、構築したカプセル内部のナノ空間を利用して、遺伝子やタンパク質といったナノサイズの生体分子を取り込ませることを検討し、新しい遺伝子デリバリー材料や、タンパク質保護材料(Protein armer)としての応用を目指す。

4. 研究成果

自然界では、生体分子のプログラムされた自己集合により様々なナノ構造体が自発的に構築されている。例えば、球状ウイルスの多くやクラスリンというタンパク質集合体は、三回対称性のタンパク質ユニットが自己集合してその骨格を形成している。このような生物の自己集合は、ボトムアップによる新規なナノ構造体構築の良いお手本となると思われるが、生体高分子の自己集合を合理的に設計し、数十 nm スケールの超分子構造体の人工的な構築の研究は未発達である。本さがけ研究では、天然のタンパク質ナノカプセルの構築原理に学び、合成化学的アプローチによる新しい生体分子ナノ空間の創製にチャレンジした。

1) 三回対称性 β -シート形成ペプチドの自己集合

球状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)の内部骨格の形成機構を参考に、 β -シート形成ペプチドCFKFEFKFEを三回対称性コア分子に放射状に結合させたコンジュゲート Trigonal-(FKFE)₂を設計・合成した(図 1A)。Trigonal-(FKFE)₂は、酸性水溶液中で逆平行 β -シートを形成して自己集合し、約 20nmのペプチドナノカプセル構造を形成することが明らかとなった^{1,2)}。一方、 β -シート構造形成ペプチドFKFECKFEを三回対称コアに対して周回状に配置した Wheel-FKFEの水中での自己集合では、ナノカプセルは得られず、均一な幅(約 3nm)のナノファイバーを形成した(図 1B)³⁾。つまり、 β -シート形成ペプチドの配置様式によって、得られる集合構造が大きく異なることがわかった。また、トリプトファンジッパー(TrpZip)ペプチドCKTWTWTEを三回対称コアに放射状に結合させたコンジュゲート Trigonal-TrpZipの自己集合では、ナノファイバーとナ

ノカプセル構造形成をpHによって制御できることを示した⁴⁾。

2) 三回対称性グルタチオンコンジュゲートの自己集合

より単純なペプチドでも球状集合体を構築できれば、本研究の分子設計の適用範囲を拡張できると思われる。そこで、天然トリペプチドであるグルタチオンの三回対称性コンジュゲート

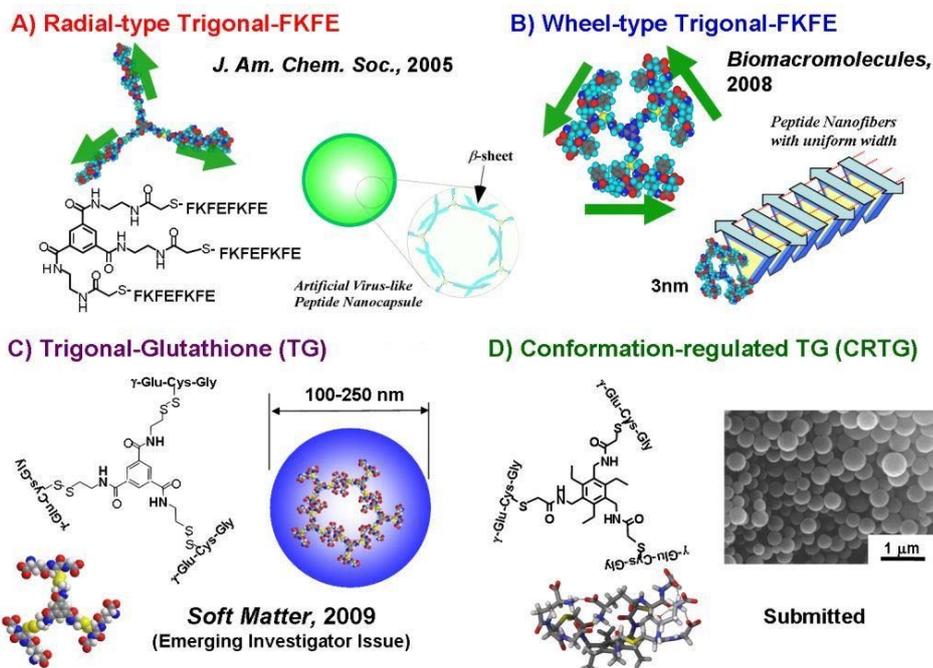


図 1. 本研究で開発した自己集合性三回対称ペプチドコンジュゲートの例

(Trigonal-glutathione, TG) を設計・合成し、水中で 100-250nm程度の球状集合体を自発的に形成することを明らかにした(図 1C)⁵⁾。興味深いことに、TGの粒径は濃度にほぼ依存しないが、内部構造が濃度により変化した。つまり、低濃度(1mM)では中空構造で、ウランなどのゲスト分子を内包するが、高濃度(10mM)では中実構造となり、ゲストを内包できないことがわかった。また、三回対称性グルタチオンの自己集合挙動に対するコア部分のコンホメーションの規則性の効果を調べるために、ベンゼン環の置換基が交互となったConformation-regulated Trigonal-Glutathione (CRTG)を設計・合成し、自己集合挙動を検討したところ、CRTGは同条件のTGよりも固く、粒径分布の狭い球状構造を形成することがわかった(図 1D)⁶⁾。

3) 三回対称 DNA の自己集合と界面活性剤による構造転移

自己相補性の粘着端を有する三叉路状DNAを設計・合成し、水中での自己集合挙動を検討したところ、DNA濃度に依存して数 10nm～数mmのDNA球状集合体(Nucleosphere)を構築することに成功した⁷⁾。つまり、全核酸濃度が $0.4 \mu\text{M}$ では無定形な構造しか観察されないが、 $5 \mu\text{M}$ では粒径 280 nm程度のNucleosphereが、 $20 \mu\text{M}$ では粒径 3-5 μm のNucleosphereが観察された。マイクロサイズのNucleosphereは、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (CLSM) により、水中でのその場観察が可能である。二重鎖選択的な蛍光色素YOYO-1 で染色した球状DNA集合体の断層像(z-軸スキャン)により、集合体の内部にまで蛍光強度が強く分布しており、この球状集合体は、内部にま

でDNAが存在している構造(中実構造)であることが示唆された。

また、この中実構造のNucleo-sphereにセチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB)のようなカチオン性界面活性剤を添加することにより、特異な中実-中空構造転移を示すことを明らかにし

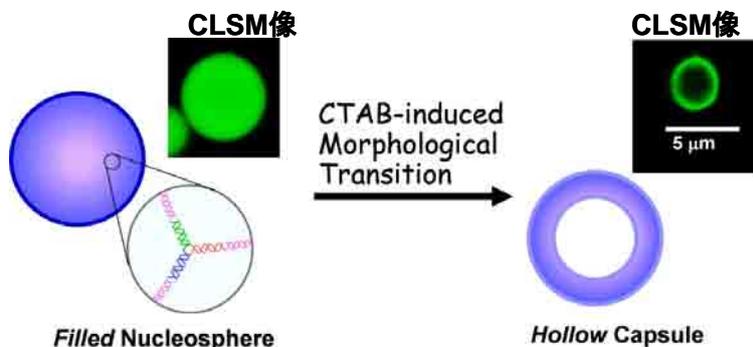


図 2. DNA 球状集合体のカチオン性界面活性剤による中実-中空転移

た(図 2)⁸⁾。CTAB添加前は、内部にまでDNAが存在している中実構造であるのに対し、CTAB添加後は直径 1.7–3.8 μm に収縮した中空構造が観察された。一方、Nucleosphereを調製する際に 1mM CTABを共存させた場合は、中空構造を形成しないことがわかった。また、生じたNucleosphereの中空構造の小角X線散乱(SAXS)測定から、二重鎖DNAとCTABの二分子層に相当する 5.7nm間隔の規則構造が存在していることがわかった。これらの結果から、Nucleosphereの表面に外部からCTABが吸着し、ポリイオンコンプレックスのラメラ層を速度論的に形成していく過程で、内側のDNA鎖が外側に向けて凝縮していったために中空構造に転移したことが考えられる。このようなDNA球状集合体の速度論的な中実-中空転移を利用することで、機能性分子の中空Nucleosphere への内包や放出制御が可能となると思われる。

4) ウイルス由来 β -環式ペプチドの自己集合によるナノカプセルの構築⁹⁾

より天然ウイルスに近い合成ウイルスキャプシドの構築を目指して、TBSVの内部骨格を形成している三回対称ペプチドモチーフである β -環式(β -Annulus)構造を構成している 24 残基ペプチド INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS(1)の水中自己集合を検討した(図 3)。ペプチド 1 は、TBSVのX線結晶構造解析から予測される二次構造とほぼ同様の二次構造(β -構造 42%、ランダム構造 58%)を形成し、40–50 nmのナノカプセルを自発的に形成することがわかった。1の水溶液の光散乱の濃度依存性から、臨界会合濃度は 25 μM 付近であることが示唆された。1からなるペプチドナノカプセルの粒径は、濃度(臨界会合濃度以上)やpHに関係なく、ほぼ一定の大きさであった。また、興味深いことに、1の集合体のゼータ電位のpH依存性から、ペプチド1のC末端が集合体表面に配向し、N末端が集合体内部に配向していることが明らかとなった。さらに、小角X線散乱(SAXS)測定により、慣性半径 25nm、厚さ 7nmの中空カプセルであることが明らかとなった。また、N末端をNi-NTA錯体で修飾したペプチドナノカプセルの会合数をサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により見積もったところ、会合数=63となり、TBSVの構造から予想される会合

数 60 と非常に近いことがわかった。

このペプチドナノカプセル内部には、選択的に分子を内包可能であることがわかった。例えば、サイズの比較的小さなアニオン性色素の ANS やウラニンが内包できるが、サイズの大きなアニオン性色素は内包されず、沈殿を生じた。また、N 末端を Ni-NTA 錯体で修飾したペプチドナノカプセルに対し、His タグラベルした緑色蛍光タンパク質(GFP)が選択的に内包されることが、SEC 測定などから明らかとなった。

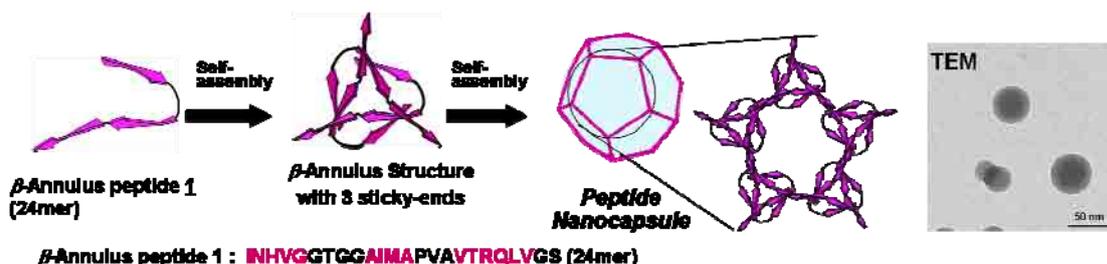


図 3. ウイルス由来 β -環式ペプチドの自己集合によるナノカプセルの構築

このように、トマトブッシュスタントウイルス(TBSV)が有する β -Annulus ペプチド(24 残基)が水中で自己集合することにより、ほぼ一義的な粒径(40-50nm)を有し、内側・外側の配向制御(ゼータ電位の pH 依存性より)された中空ナノカプセル(SAXS より)を創製することに成功した。

TBSV を構成しているタンパク質(388 残基)のわずか 24 残基のペプチド 1 が、一分子折り畳み構造や繊維構造を形成せず、球状集合体のみを形成することは、大変興味深いと思われる。本研究の 24 残基ペプチド 1 は、様々な化学修飾が可能であり、例えば、ペプチドの C 末端及び N 末端の化学修飾により、それぞれカプセルの外部及び内部に望みの機能を導入することも可能であると思われる。本系は、機能性ペプチドナノカプセルの新しいプラットフォームとして、今後様々な応用展開が可能であると思われる。

論文

1. K. Matsuura, K. Murasato, and N. Kimizuka, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10148 (2005).
2. K. Matsuura, K. Murasato, A. Kawaharada, and N. Kimizuka, *Peptide Science 2006*, 371 (2006).
3. K. Murasato, K. Matsuura, and N. Kimizuka, *Biomacromolecules*, **9**, 913 (2008).
4. K. Matsuura, H. Hayashi, K. Murasato and N. Kimizuka, in preparation.
5. K. Matsuura, H. Matsuyama, T. Fukuda, T. Teramoto, K. Watanabe, K. Murasato and N. Kimizuka, *Soft Matter*, **5**, 2463 (2009) (Emerging Investigator Issue) .
6. K. Matsuura, K. Fujino, T. Teramoto, K. Murasato and N. Kimizuka, submitted for publication.
7. K. Matsuura, K. Masumoto, Y. Igami, T. Fujioka and N. Kimizuka, *Biomacromolecules*, **8**, 2726 (2007).
8. K. Matsuura, K. Masumoto, Y. Igami, K. Kim and N. Kimizuka, *Mol. BioSyst.*, **5**, 921 (2009) (Emerging Investigator Issue).
9. K. Matsuura, K. Watanabe and N. Kimizuka, in preparation.

5. 自己評価

本さがけ研究では、 β -シート形成ペプチド、トリプトファンジッパーペプチド、自己相補性 DNA、グルタチオンなどの様々な自己集合性の生体分子を三回対称性に配置したコンジュゲートを合成

し、それらの特異な自己集合挙動を明らかとした。特に、 β -シート形成ペプチドでは、三回対称コアに対してペプチドを放射状に配置した場合と周回状に配置した場合では、全く異なる自己集合挙動を示すことを明らかとした。また、単純なトリペプチドであるグルタチオンを三回対称とすることで、球状のナノ構造が得られることを初めて見出した。しかし、これらの成果は、当初目標としていた「天然ウイルスのような一義的な構造を有するナノ構造体の構築」までは至っていなかった。

そこで、さきがけ研究の後半では、分子設計を見直し、トマトブッシースタントウイルス(TBSV)が有する 24 残基の骨格ペプチドが水中で自己集合を検討した。その結果、天然のウイルス構造に匹敵する人工の中空ナノカプセルを、合成ペプチドから創製することに世界で初めて成功した。特に、中空構造であることを小角 X 線散乱により証明したことは、高い評価に値すると思われる。

また、当初の目標の一つであったペプチドナノカプセルへのタンパク質の内包に関しては一定の成果を挙げることができたが、DNA の内包および遺伝子デリバリーへの応用に関しては現時点では成果を得ることができなかった。

6. 研究総括の見解

球状ウイルスやクラスリンなどの天然のタンパク質ナノカプセルの自己集合戦略に学び、人工ナノカプセルを構築するための方法論を開拓することを目指した研究である。三回対称性のコア分子に、自己集合性ユニットとして β シート形成ペプチドやグルタチオンなどを結合させたコンジュゲート分子を合成し、その結果、球状のナノ構造が得られることを見出した。また、トマトブッシースタントウイルス(TBSV)が有する 24 残基の骨格ペプチドを用いて、天然のウイルス構造に匹敵する人工の中空ナノカプセルを作成することに初めて成功した。独自のアイデアで研究を進めており、ナノカプセルの特性に興味を持たれる。さきがけにふさわしい研究である。

7. 研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. K. Matsuura, K. Masumoto, Y. Igami, T. Fujioka, and N. Kimizuka, In situ observation of spherical DNA assembly in water and the controlled release of bound dyes, *Biomacromolecules*, **8**(9), 2726-2732 (2007)
2. K. Matsuura, K. Murasato, A. Kawaharada, and N. Kimizuka, Trigonal β -sheet-forming peptides as building block of nanostructures, *Peptide Science* 2006, 371 (2006)
3. K. Murasato, K. Matsuura, and N. Kimizuka, Self-assembly of nanofiber with uniform width from wheel-type trigonal- β -sheet-forming peptide, *Biomacromolecules*, **9**(3), 913-918 (2008)
4. K. Matsuura, K. Masumoto, Y. Igami, K. Kim and N. Kimizuka, CTAB-induced Morphological Transition of DNA Micro-Assembly from Filled Spheres to Hollow Capsules, *Molecular BioSystems*, **5**(9), 921 – 923 (2009)
5. K. Matsuura, H. Matsuyama, T. Fukuda, T. Teramoto, K. Watanabe, K. Murasato and N. Kimizuka, Spontaneous Self-assembly of Nano-spheres from Trigonal Conjugate of Glutathione in Water, *Soft Matter*, **5**, (12), 2463-2470 (2009)

(2)【受賞】

- 2007 年 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞
- 2007 年 日本化学会コロイドおよび界面化学部会 科学奨励賞
- 2008 年 第 10 回花王研究奨励賞

(3)【著書】

1. 松浦和則、「ペプチドの自己集合によるナノ構造の構築」、山下一郎・芝 清隆 監修「バイオナノプロセス—溶液中でナノ構造を作るウェット・テクノロジーの薦め—」、シーエムシー出版、pp. 121-128 (2008)
2. 松浦和則、「DNA ナノスフィア」、国武豊喜監修、有賀克彦編集代表、「超分子サイエンス～基礎から材料への展開～」、エヌ・ティー・エス、pp. 251-255 (2009)
3. K. Matsuura, “Biomolecular Nanoassembly: Nanostructures from Nucleic Acids, Peptides, and Carbohydrates”, in "BOTTOM-UP NANO- FABRICATION: Supramolecules, Self-Assemblies, and Organized Films", Ed. by Katsuhiko Ariga, American Scientific Publishers, Volume 3 (Self-Assemblies-I), Chapter 4, pp. 99-117 (2009)

(4)【学会発表】

国際

1. K. Matsuura, T. Fukuda, H. Matsuyama, K. Murasato and N. Kimizuka, “Self-Assembly of Trigonal-Glutathiones in Water”, 12th IUPAC International Symposium on MacroMolecular Complexes (MMC-12), Fukuoka International Congress Center, Japan, Aug. 30. 2007
2. K. Matsuura, K. Murasato, A. Kawaharada, H. Matsuyama, T. Fukuda, and N. Kimizuka, “Self-assembly of Designed C3-Symmetric Peptides”, 2007 Japan-Australia Symposium (as a part of the 60th Divisional Meeting on Colloid and Interface Chemistry), Shinshu University, Japan, Sep. 21. 2007
3. Kazunori Matsuura, “Self-Assembly of C3-Symmetric Peptide Conjugates”, UK-Japan Frontiers of Science Symposium 2008, Shonan Village Center, Japan, Oct. 5. 2008
4. Kazunori Matsuura, Kenta Watanabe, Nobuo Kimizuka, “Peptide Nanocapsule Self-assembled from beta-Annulus Peptides in Water”, Gordon Research Conference: Chemistry of Supramolecules and Assemblies, Colby College, USA, June. 30. 2009
5. Kazunori Matsuura, Kenta Watanabe, and Nobuo Kimizuka, “Peptide Nanocapsule Self-assembled from Viral beta-Annulus Peptides”, 2nd Switzerland-Japan Biomolecular Chemistry Symposium (SJBCS09), The University of Tokyo, Japan, Oct. 26. 2009

国内

1. 藤野敬介・村里和也・君塚信夫・松浦和則、「事前組織化したコンホメーションを有する三回対称グルタチオンコンジュゲートの水中での自己集合」、日本化学会第 88 春季年会、立教大学、2008 年 3 月 28 日
2. 松浦 和則・林 寛貴・村里 和也・君塚 信夫、「三回および五回対称性トリプトファンジッパーペプチドの水中での自己集合」、第 57 回高分子討論会、大阪市立大学、2008 年 9 月 26 日
3. Kazunori Matsuura, Takeshi Teramoto, Keisuke Fujino, Kazuya Murasato, Nobuo Kimizuka, “TRIGONAL CONJUGATES OF GLUTATHIONE SPONTANEOUSLY SELF-ASSEMBLE INTO NANO-SPHERES IN WATER” 第 45 回ペプチド討論会、タワーホール船堀、2008 年 10 月 30 日
4. 松浦和則・村里和也・内田洋平・君塚信夫、「塩基性三回対称ペプチドコンジュゲートと DNA の相互作用」、日本化学会第 89 春季年会、日本大学、2009 年 3 月 27 日
5. 松浦和則・渡部健太・君塚信夫、「 β -Annulus ペプチドからのペプチドナノカプセルの自己集合」、第 24 回生体機能関連化学シンポジウム、九州大学、2009 年 9 月 14 日

(5)【招待講演】

国際

1. Kazunori Matsuura, “Self-assembly of C3-Symmetric Glutathione Conjugates in Water” Global COE Program: Prof. Jean-Marie Lehn Symposium III, Kyushu University, Japan, Oct. 17. 2008.
2. Kazunori Matsuura, “Self-assembly of C3-Symmetric Peptide Conjugates in Water” Japan-China Joint Symposium on Functional Supramolecular Architectures, China, Dec. 20. 2008

国内

1. 松浦和則、「生体分子の組織化によるナノ構造体の構築と機能」、第 60 回コロイドおよび界面化学討論会、信州大学、2007 年 9 月 20 日
2. 松浦和則、「生命分子の自己集合をデザインしてナノ構造を作る」、第 10 回 生命化学研究会シンポジウム『つくる生命化学 -未来への展望』、熊本大学、2008 年 1 月 11 日
3. 松浦和則、「生体分子のプログラム自己集合による新しいナノ構造体の構築」、日本化学会第 88 春季年会(第 22 回 若い世代の特別講演会)、立教大学、2008 年 3 月 29 日
4. 松浦和則、「生体分子のプログラム自己集合による新しいナノ構造体の構築」、花王研究奨励賞受賞記念講演会、花王(株)、2008 年 6 月 6 日
5. Kazunori Matsuura, “Nano-assemblies from C3-Symmetric Peptide Conjugates” 日本化学会第 89 春季年会 (アジア国際シンポジウム)、日本大学、2009 年 3 月 29 日

総説

1. 松浦和則、「生体分子組織化によるナノ構造体の構築と機能」、コロイドおよび界面化学部会ニュースレター, Vol.32, No.4, p.7-12 (2007)
2. 松浦和則、「三回対称生体分子の自己集合によるナノ～マイクロ構造体の構築」、超分子研究会アニュアルレビュー, No.28, pp. 8-9 (2007) 2008年3月発行
3. 松浦和則、「三回対称生体分子の自己集合を利用したナノ～マイクロ構造体の構築」、生体機能関連化学部会ニュースレター, Vol. 23, No.1, p.9-12 (2008)
4. 松浦和則、「生体分子のプログラム自己集合によるナノ～マイクロ構造体の構築」、表面, vol.47, No.7, pp. 22-35 (2009)
5. 松浦和則、「生体分子の自己集合によるナノ構造体の構築」未来材料, 第10巻, 第2号, pp.36-41 (2010)
6. 松浦和則、「DNAやペプチドの自己集合を利用したナノバイオ分子システムの構築」、有機合成化学協会誌, (印刷中).