

環境応答性人工ウイルスキャプシドの創製

研究代表者

松浦和則 鳥取大学大学院工学研究科 教授



1. 研究の背景と達成目標

これまでに我々は、トマトブッシュスタントウイルスの内部骨格形成に関与しているとされる 24 残基 β -Annulus ペプチドの自己集合により、30-50 nm の人工ウイルスキャプシドの構築に成功している。本研究では、この人工ウイルスキャプシドに、還元環境や pH などの環境応答性を付与し、細胞内に薬物を送達し、環境に応じて放出する新しいドラッグキャリアーとして応用することを目的とした。具体的には、 β -Annulus ペプチドの N 末端もしくは C 末端に His-tag を導入したペプチドを設計・合成し、自己集合により pH 応答性人工ウイルスキャプシドを創製する。また、 β -Annulus ペプチドの粘着端部位に Cys 残基を導入し、架橋することにより、還元環境応答性人工ウイルスキャプシドを創製する。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- C 末端に His-tag を導入した β -Annulus ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドが、pH 応答性を示した。
- His-tag 修飾人工ウイルスキャプシドへの核酸の内包ならびに細胞内導入に成功した(実績 7)。
- FKFE で修飾したセスバニアモザイクウイルス由来の β -Annulus ペプチドが pH 応答性人工ウイルスキャプシドを形成した(実績 1)。
- β -Annulus ペプチドの粘着端間でジスルフィド結合させた人工ウイルスキャプシドが、還元応答性を示した。
- 人工ウイルスキャプシドへの量子ドットの内包を蛍光相関分光法で解析することに成功した(実績 2, 3)。

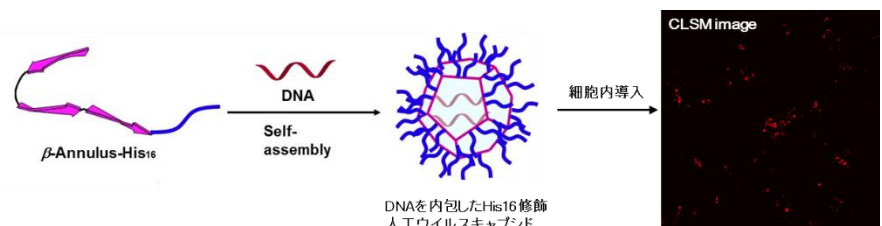
これらの研究成果は、ペプチドを基体とした新しいウイルス様ナノカプセル創製に資する学術的に意義のあるものであり、従来の新規ドラッグキャリアーとしての応用の可能性を示した。

3. 研究成果

β -Annulus ペプチドの N 末端に His-tag を導入したペプチドは、予想に反し、繊維状集合体を形成することがわかった。そこで、C 末端に His16 を導入した β -Annulus-His₁₆ ペプチド(INHVGGTGGAIMA PVAVTRQLVGS₁₆)を合成し、それを自己集合させることで、His₁₆ ペプチドを表面提示した人工ウイルスキャプシドが形成されたことを DLS 測定、TEM 観察から明らかにした。この His₁₆ 提示人工ウイルスキャプシドの粒径は、弱酸性 pH において 55nm 程度だ

が、中性・塩基性 pH において 150nm 程度に変化することがわかった。また、この His₁₆ 提示人工ウイルスキャプシドに蛍光ラベルオリゴ DNA が内包できることを蛍

光相関分光(FCS)測定により明らかにした。この蛍光ラベルオリゴ DNA を内包した His₁₆ 提示人工ウイルスキャプ



シドの HT1080 細胞への導入を共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)観察により検討したところ、His₁₆ 提示していないものに比べて高効率に導入できることがわかった(上図)。

また、FKFE で修飾したセスバニアモザイクウイルス由来の β -Annulus ペプチド(GISMAPSAQGMFKFE)を合成し、DLS、TEM により自己集合挙動を評価したところ、pH2.2 では集合体形成せず、pH3.8 で 30nm の球状構造、pH6.4 以上で大きな凝集体となることを見出した。このように、 β -Annulus ペプチドの粘着端部位にイオン性アミノ酸を導入することで、pH 応答性を付与できることがわかった。

次に、 β -Annulus ペプチドの粘着端部位に Cys を導入した β -Annulus-Q20C (INHVGGTGGAIMAPVAVTR CLVGS)を合成し、酸化還元によるジスルフィド形成・解離を確認した。酸化状態では、粒径 80-100 nm 程度の集合であるのに対し、還元状態では 30-60 nm に変化し、還元応答性を示すことがわかった。

さらに、 β -Annulus ペプチドへの蛍光性 CdTe ナノ粒子の静電相互作用による内包挙動を蛍光相関分光(FCS)法により解析した。その結果、臨界面合濃度(CAC)以下では CdTe ナノ粒子が内包されず、CAC 以上では 2 成分モデル式でフィッティングされ、人工ウイルスキャプシドに内包されている CdTe ナノ粒子の割合が増加することが明らかとなった。

4. 今後の展開

β -Annulus ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドへの siRNA や microRNA などの核酸医薬、サイトカインなどのタンパク質医薬の効率的内包、ならびに効率的に細胞内導入するための表面修飾法などを検討し、多機能性ドラッグキャリアーとして応用する。また、人工ウイルスキャプシド表面に抗原ペプチドや核酸系アジュバント(CpG など)を修飾し、人工ワクチンとしての応用も目指す。これらの研究により、天然ウイルスを用いないドラッグキャリアー・ワクチン・ナノリアクター創製のための新しい分子設計指針を提示でき、ナノバイオテクノロジー分野にブレークスルーをもたらすことが期待できる。

5. 発表実績

- 1) Kazunori Matsuura, Yusaku Mizuguchi, Nobuo Kimizuka, Peptide Nanospheres Self-Assembled from a Modified β -Annulus Peptide of Sesbania Mosaic Virus, *Biopolymer: Peptide Science*, Accepted Article, DOI: 10.1002/bip.22774.
- 2) Seiya Fujita, Kazunori Matsuura, Encapsulation of CdTe Quantum Dots into Synthetic Viral Capsids, submitted to *Chem. Lett.*
- 3) Kazunori Matsuura, Seiya Fujita, Encapsulation of Guest Materials into Artificial Viral Capsids self-assembled from Viral Peptide, *Peptide Science 2015*, H Hojo, T. Inazu, and H. Katayama (Eds), The Japanese Peptide Society, pp. 87-88 (2016).
- 4) 松浦和則, 人工ペプチドによる自己集合性材料—ウイルスキャプシドと光誘起ナノファイバー, *生物物理*, **56**(2), 94-97 (2016).
- 5) Kazunori Matsuura, Dressed up Artificial Viral Capsids Self-assembled from modified β -Annulus Peptides, *3rd International Supramolecular System Symposium (SSS) 2014*, Changchun, China, August 26, 2014.
- 6) Kazunori Matsuura, Takahide Honjo, Genki Ueno, Saki Yamada and Shoko Nishikawa, Dressed up Artificial Viral Capsids, *3rd Japan-Swiss Chemical Biology Symposium 2014*, Bern, Switzerland, October 2-3, 2014.
- 7) Tatsuhiko Sakata, Takashi Iwasaki, Kazunori Matsuura, Creation of Artificial Viral Capsid modified Oligohistidine Chain, *PACIFICHEM 2015*, Hawaii Convention Center, Honolulu, USA, December 18, 2015.