

ペプチド自己集合による人工ウイルス
キャプシドの機能化に関する研究

2018年1月

藤田 聖矢

ペプチド自己集合による人工ウイルスキャプシドの機能化に関する研究

目次

第1章 緒言

- 1-1. 天然のタンパク質集合体
- 1-2. 天然ウイルスキャプシドを用いたナノテクノロジー
- 1-3. 人工タンパク質集合体の創製
- 1-4. ペプチドの自己集合による超分子集合体の創製
- 1-5. 人工ウイルスキャプシド
- 1-6. 本研究の概要

参考文献

第2章 人工ウイルスキャプシドの無機物との複合化

- 2-1. 序
- 2-2. ZnO-binding- β -annulus ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドへの ZnO ナノ粒子の内包
 - 2-2-1. ZnO-binding- β -annulus ペプチドの合成
 - 2-2-2. ZnO-binding ペプチドの固相合成
 - 2-2-2. ZnO-binding- β -annulus ペプチドの自己集合挙動
 - 2-2-3. ZnO ナノ粒子の合成と特性評価
 - 2-2-4. ZnO-binding- β -annulus ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドへの ZnO ナノ粒子の内包
 - 2-2-5. ZnO-binding- β -annulus ペプチド存在下で合成した ZnO 粒子の特性評価
 - 2-2-6. まとめ
- 2-3. β -annulus 24 ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドへの CdTe ナノ粒子の内包挙動の解析
 - 2-3-1. 人工ウイルスキャプシドへの CdTe ナノ粒子の内包
 - 2-3-2. 蛍光相関分光法(FCS)による解析
 - 2-3-3. TEM による内包挙動の評価
 - 2-3-4. 人工ウイルスキャプシドに内包された CdTe ナノ粒子の蛍光スペクトル
 - 2-3-5. まとめ
- 2-4. 金ナノ粒子で被覆された人工ウイルスキャプシドの創製
 - 2-4-1. β -annulus-GGGCG ペプチドの合成
 - 2-4-2. β -annulus-GGGCG ペプチドの自己集合挙動
 - 2-4-3. AuNP- β -annulus peptide conjugate の合成
 - 2-4-4. AuNP- β -annulus peptide conjugate の自己集合挙動
 - 2-4-5. AuNP- β -annulus peptide conjugate の特性評価

2-4-6. まとめ

参考文献

第3章 表面にコイルドコイルの突起を有する人工ウイルスキャプシドの創製

3-1. 序

3-2. β -annulus-Nbz ペプチドの合成

3-3. Coiled-coil-B ペプチドの固相合成

3-4. Coiled-coil-A ペプチドの固相合成

3-5. Native chemical ligation 法を用いたペプチドの連結

3-6. β -annulus-coiled-coil-B ペプチドの自己集合挙動

3-7. 表面にコイルドコイルの突起を有する人工ウイルスキャプシドの創製

3-8. まとめ

参考文献

第4章 光応答性人工ウイルスキャプシドの創製

4-1. 序

4-2. 分動力学計算(MacroModel)によるアゾベンゼン導入位置の検討

4-3. Fmoc-AMPP の合成

4-4. β -annulus-15V16A-azo ペプチドの合成

4-5. β -annulus-15V16A-azo ペプチドの光異性化挙動

4-6. β -annulus-15V16A-azo ペプチドの自己集合挙動

4-7. ペプチド水溶液への光照射による集合体形態の変化

4-8. まとめ

参考文献

第5章 結論

5-1. 本論文の統括

第1章 緒言

1-1. 天然のタンパク質集合体¹⁾

タンパク質は、アミノ酸がアミド結合を介して重合した直鎖状の分子(ポリペプチド)である。ポリペプチドは鎖内のアミノ酸同士の共有結合、van der Waals 相互作用、水素結合、静電相互作用などによって独特の立体構造へと折りたたまれ、様々な機能を発現している。

天然のアミロイド線維²⁾やコラーゲン³⁾といった繊維状集合体は、タンパク質の規則的な自己集合により形成していることが知られている。アミロイド線維はタンパク質のミスフォールドにより生じる β -シート構造からなる集合体であり、アルツハイマー病などの疾患に関連していると考えられている。一般に直径が数 nm、長さが μm オーダーの非分枝フィラメントであり、主に cross β -sheet 構造で構成された秩序ある緻密な構造を有している(図 1-1a)。一方、コラーゲンは哺乳類で最も豊富なタンパク質であり、三重らせん構造から構成されていることが知られている。コラーゲンの特徴は、左巻きの3つの平行なポリペプチド鎖が1残基ずらして巻きつくことによって、全体として右巻き三重らせんを形成していることである(図 1-1b)。構成するポリペプチドの配列は X-Y-Gly の繰り返し配列となっており、X、Y には任意のアミノ酸であるが、プロリン(Pro)や4(R)-ヒドロキシプロリン(Hyp)といったイミノ酸が占めることが多い。この互いに絡み合った三重らせん構造により、弾力性や高い強度を生み出している。

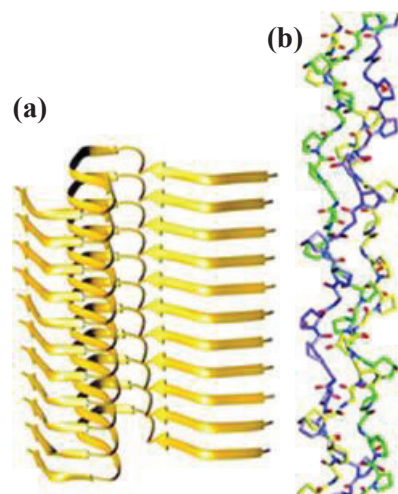


図 1-1. 天然の繊維状タンパク質集合体: (a)アミロイド線維, (b) コラーゲン¹⁾

また、生体内で遺伝子の保存や輸送するために、タンパク質がチューブ状集合体を形成することが知られている。チューブ状タンパク質集合体としてはよく知られているのは、黄色ブドウ球菌によって分泌される生体膜透過タンパク質 α -Hemolysin である⁴⁾。 α -Hemolysin は自己集合により、キャップ、リム、およびステム状構造からなるキノコ形の7量体集合体を形成する(図 1-2a)。14本の β -ストランドからなる β -バレル構造を有するステムの中央には 2.6 nm 程度の空洞が存在している。ステムの内部は、疎水性アミノ酸残基と荷電した残基からなる。一方、外側は疎水性アミノ酸残基が並んでおり、リン脂質二重層との相互作用が可能である。さらに、リムドメインもリン脂質の頭部基と相互作用することが分かっている。これらにより、 α -Hemolysin 集合体が細胞膜に結合することが可能であると考えられている。また、PhiX174 バクテリオファージは尾がチューブ構造となっており、これにより宿主の細胞膜を貫通し、遺伝物質を宿主に注入する⁵⁾。この尾のチューブ構造は α -ヘリックスバレル構造と呼ばれる 10本の α -ヘリックスからなるコイ



図 1-2. 天然のチューブ状タンパク質集合体(a) α -Hemolysin 7量体 (b) PhiX174 バクテリオファージの尾部¹⁾

ルドコイル構造から構成されている(図 1-2b)。各単量体は、Tyr193-Ala194-Gln195 でねじれており、左巻き螺旋であるドメイン A と右巻き螺旋のドメイン B が存在している。チューブの内部は主に負に帯電しているが、いくつかの Gln、Asn および Arg 残基も含んでおり、これらの残基により感染中に細菌膜を通過する DNA の輸送を促進するのではないかと考えられている。

また、タンパク質は繊維やチューブといった直線状の集合体だけでなく、リングやナノカプセルといった集合体も形成する。物質を貯蔵できるカプセル状タンパク質集合体の中でもよく知られているのが、鉄原子の貯蔵と無毒化の機能を担っているフェリチン⁶⁾。フェリチンは 4 本の α -ヘリックスバンドルを束ねた構造をしたサブユニットが 24 個自己集合して、12 nm の極めて精密で対称性の高いかご状構造体を形成している。また、内部に直径 8 nm の空間を有しており、生体内で反応性の高い Fe(II)イオンを酸化し、生体にとって後で利用し易いように酸化物コアとしてその内部空間に貯蔵している。フェリチンのチャンネルには、酸性アミノ酸である Glu と Asp によって構成されている 8 つの 3 回軸チャンネルと、疎水性アミノ酸である Leu が多く集まって形成している 6 つの 4 回軸チャンネルがあり、ここから Fe イオンを内部に取り込んでおり、約 4500 個もの鉄原子が内部空間に取り込まれることが知られている。また、運搬を担うカプセル状タンパク質集合体としてクラスリンが存在する⁷⁾。クラスリンケージは細胞内輸送の重要なキャリアであり、全ての真核細胞に見出されている。クラスリンは自己集合により triskelion と呼ばれる三叉のユニットを形成する(図 1-4a)。さらに、この triskelion が 28 個または 36 個集合し、mini-coats や hexagonal barrels と名付けられた構造を形成することができる(図 1-4b)。クラスリンケージのサイズはゲスト分子の直径によって変化し、hexagonal barrels(700Å×800Å)は輸送小胞を囲むことができる最小の多面体であると考えられている。

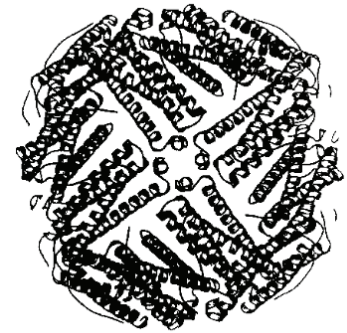


図 1-3. フェリチン⁶⁾

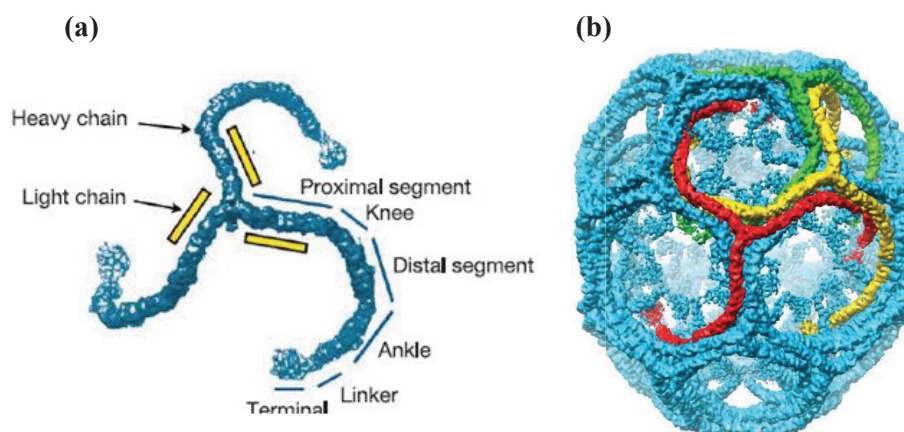


図 1.4. クラスリンの構造：(a)クラスリンの構成単位となるタンパク質の三脚構造、(b)クライオ電子顕微鏡法より決定されたクラスリン粒子の立体構造⁷⁾

ウイルスもまた、ロッド状・球状・エンベロープ状などの形態を有する天然のタンパク質集合体である^{8a)}。球状ウイルスは、一義的なサイズと会合数を有する 18~100 nm 程度の集合体であり、核酸の外側をキャプシドと呼ばれるタンパク質の殻で覆った構造をしている。このキャプシドは正二十面体対称性を有しており、1 種類または数種類のタンパク質が規則的に集合すること

によって形成されている。例えば、球状ウイルスであるトマトブッシースタントウイルス(TBSV)は、180個のタンパク質が集合することで正二十面体対称のキャプシドを構築している(図1-5)⁸⁾。このウイルス構造の特徴は、三量体サブユニットがキャプシドの内側で β ストランドを形成して絡み合い、正十二面体の内部骨格を形成していることである。

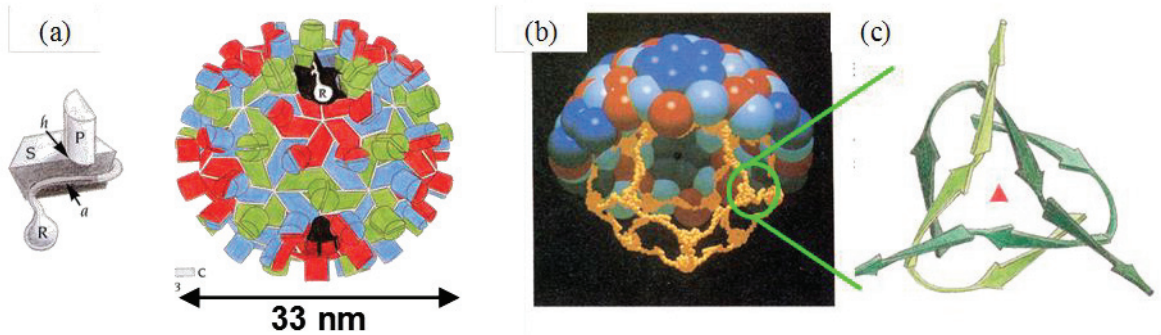


図1-5. トマトブッシースタントウイルスの内部骨格 β -annulus 構造の模式図⁸⁾

また、ウイルスにはその表面にタンパク質の突起を有するものが存在する。例えば、アデノウイルス⁹⁾やインフルエンザウイルス¹⁰⁾などである。アデノウイルスは単一のキャプシドタンパク質

が3量体を形成し、それがさらに集合することで正二十面体のキャプシドを構成している。キャプシドの各頂点の penton base に triple β -spiral 構造を有する fiber と呼ばれる突起を有している(図1-6)。アデノウイルスは、この長い突起により細胞表面上の受容体と選択的に結合することで細胞表面に付着し、エンドサイトーシスによってウイルスは細胞内へ侵入する。また、インフルエンザウイルスはその表面にヘマグルチニンと呼ばれるタンパク質の突起を有している(図1-7)。ヘマグルチニンは長さ

が13.5 nm程度であり、3量体のコイルドコイル構造から形成されている。また、先端に3つのシアル酸認識部位を有しており、細胞膜表面上の α 2,3 または α 2,6-sialyl lactose 糖鎖部分を認識し、細胞に感染する。

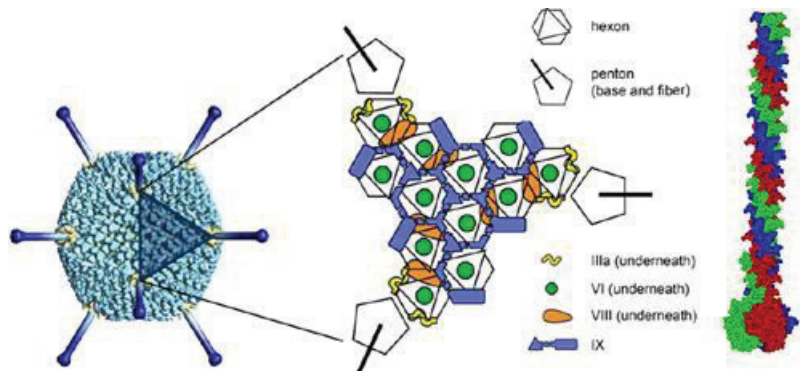


図1-6. アデノウイルスと突起の構造の模式図⁹⁾

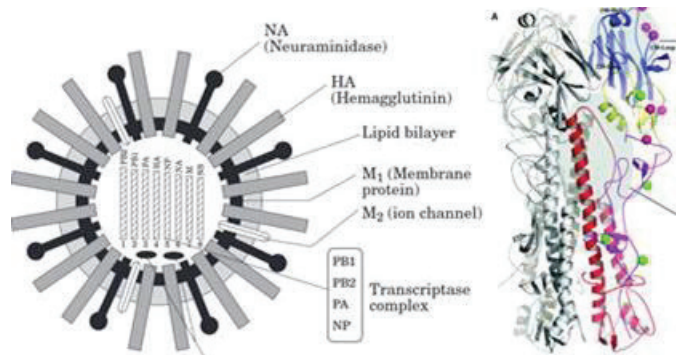


図1-7. インフルエンザウイルスと突起(ヘマグルチニン)の構造の模式図¹⁰⁾

1-2. 天然ウイルスキャプシドを用いたナノテクノロジー

ウイルスキャプシドは、一義的なサイズ・会合数・形態を有する大変魅力的な材料である。これらの集合体としての機能を、生命活動以外に応用する研究も行われている。例えば、ウイルスキャプシドの一義的なサイズと形に注目し、決まった大きさの化合物を合成するための反応場として用いられている。Douglas らは、Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) のキャプシドの核酸との相互作用部位がカチオン性アミノ酸残基に富んでいることに注目し、この部位のカチオン性残基をアニオン性残基へと改変した。改変後のキャプシドもウイルス粒子を形成し、内部には Fe^{2+} イオンが取り込まれた。このウイルス内部では、直径 6-30 nm の FeO ナノ粒子が形成された (図 1-8)¹¹⁾。

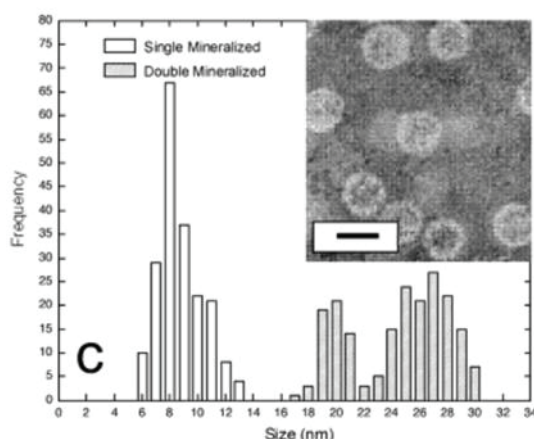


図 1-8. CCMV をテンプレートとして合成した FeO ナノ粒子の粒径分布¹¹⁾

先述の通り、ウイルスは内部に核酸を保持しているが、核酸以外の物質の内包も研究されている。例えば、Cornelissen らは、CCMV キャプシドへの緑色蛍光タンパク質 (GFP) の内包を報告している (図 1-9)¹²⁾。CCMV キャプシド内部が正に帯電しているため、無機塩および負に荷電したポリマーのようなゲスト分子を内包しやすい。しかし、負に帯電したタンパク質のウイルスキャプシドへの内包率は低かった。そこで、遺伝的改変によって、コイルドコイルペプチドをキャプシド内に導入し、それを介して負に帯電した GFP を内包させたところ、1 つのキャプシドに対して最大で 15 個の GFP が内包された。

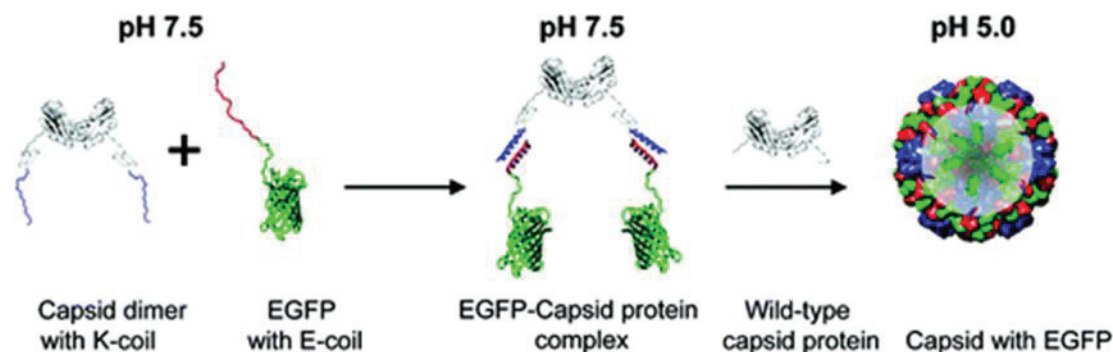


図 1-9. コイルドコイルを介したキャプシドへの GFP の内包¹²⁾

上記のように、ウイルスを用いたナノテクノロジーの多くは、キャプシド内部へのゲスト分子の内包や、内部空間を鋳型として応用するものであった。一方で、Dragnea らは無機粒子を核とし、ウイルスキャプシドを形成する逆のアプローチを報告している (図 1-10)¹³⁾。クエン酸で被覆された Au ナノ粒子と tetraethylene glycol (TEG) で被覆された Au ナノ粒子のプロモモザイクウイルス (BMV) への内包率を TEM 観察によって評価したところ、クエン酸で被覆された金ナノ粒子では約 1% しかキャプシドに内包されず、空のキャプシドが多数存在した。対して、TEG コーティングされた粒子は、内包率 $95 \pm 5\%$ であり、空のキャプシドはほとんど観察されなかった。これは、TEG コーティングされた粒子が核となってキャプシドを形成したためだと考えられている。このような戦略は、無機/ウイルスハイブリッド粒子を合成するための新しいアプローチであり、物理的および化学的性質の組み合わせの可能性を広げると考えられている。

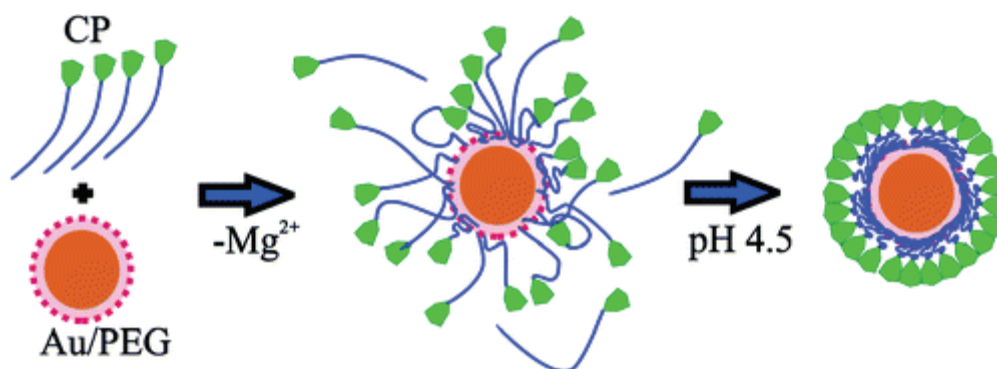


図 1-10. TEG 被覆された Au ナノ粒子をコアとしたキャプシドの構築¹³⁾

また、ウイルスキャプシドの規則正しい表面は機能性分子を提示するための足場材料として用いられている。例えば、Blum らはウイルスキャプシドを用いて金ナノ粒子の間隔や配列パターンが光学的特性に大きく影響することが知られている金ナノ粒子の配列制御を報告している¹⁴⁾。まず、ササゲモザイクウイルス(CPMV)のキャプシド表面に GGCGG というアミノ酸配列を遺伝子工学的に挿入し、金ナノ粒子に配位することが知られている Cys のチオール基をウイルス表面に提示した。このウイルスキャプシドと金ナノ粒子(5 nm)を混合することで、金ナノ粒子のウイルス表面への提示を行った。TEM 観察により、金ナノ粒子が球状に集まった集合体が確認され、金ナノ粒子修飾した CPMV の形成が確認された (図 1-11)。

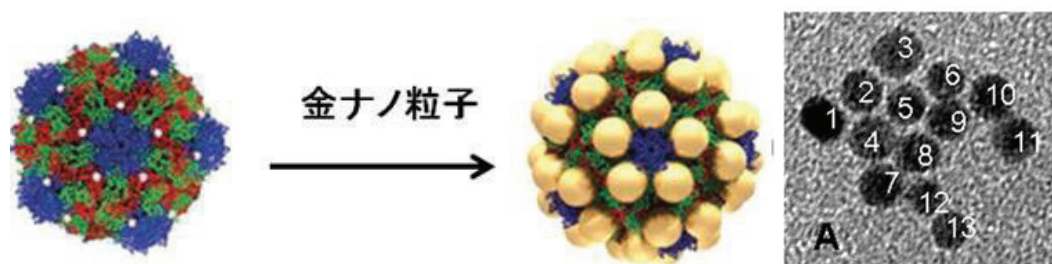


図 1-11. 金ナノ粒子修飾 CPMV の模式図と TEM 像¹⁴⁾

またウイルスを、細胞認識能を付与した DDS キャリアとして用いるために、抗体などの標的性を有する分子の表面提示が行われている。Hytönen らは、ノロウイルスキャプシド配列の C 末端に His-tag を付加したタンパク質を遺伝子工学的に作製した¹⁵⁾。これに His-tag と特異的に結合する trisNTA を修飾した蛍光色素 Alexa488(trisNTA-Alexa488)と混合することで、Alexa488 をウイルス表面上の His-tag の数依存的にウイルスに提示のできることを蛍光相関分光(FCS)測定により明らかにした。また細胞結合性を有するペプチド配列の N 末端に trisNTA を付与した trisNTA-VSV-G (NTA-SGGG-YTDDIEMNRLGK-NH₂) を合成した。trisNTA-Alexa488、trisNTA-VSV-G と His-tag を有するキャプシドを混合させ、ヒト培養細胞 HEK293T に添加した。共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)より、trisNTA-Alexa488 のみを提示したキャプシドでは細胞に取り込まれなかったのに対し、trisNTA-Alexa488 と trisNTA-VSV-G を提示したキャプシドは細胞内に取り込まれることが確認された (図 1-12)。

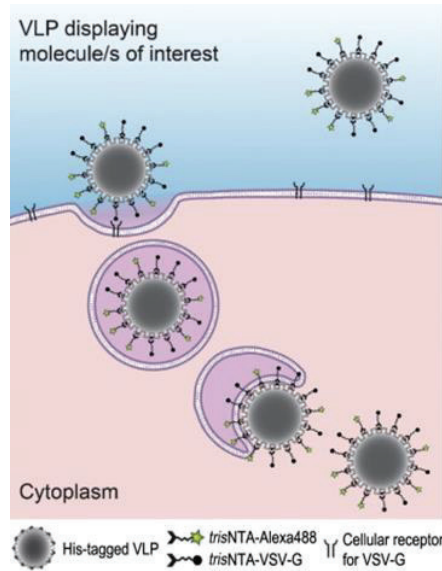
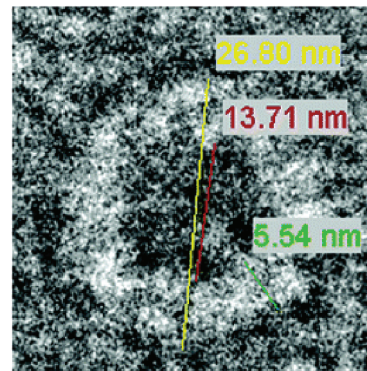
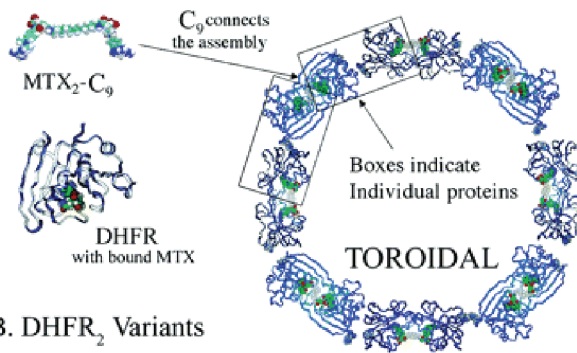


図 1-12. 細胞認識能を付与したウイルスキャプシドの創製¹⁵⁾

1-3. 人工タンパク質集合体の創製

近年、先述した天然のタンパク質集合体を参考に、人工的に設計したタンパク質をビルディングブロックとして用いてユニークな形態と機能を有するタンパク質集合体を作製する研究が行われている¹⁶⁾。Wagner らは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)を用いたタンパク質リング集合体の構築を報告している¹⁷⁾。DHFR をアミノ酸リンカーでつないだ DHFR 2 量体とリガンド二量体(MTX₂)を混合したところ、8~20 nm のリング状タンパク質集合体の形成を TEM 観察により明らかとした(図 1-13)。さらにアミノ酸リンカーの長さを調整することによって、ナノリングのサイズ分布を調整することができることを明らかにした。

A. Assembly Mechanisms



B. DHFR₂ Variants

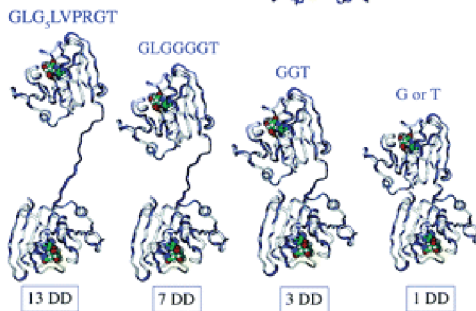


図 1-13. 酵素からなるタンパク質ナノリング集合体の設計とその TEM 像¹⁷⁾

また、二つのタンパク質ビルディングブロックを組み合わせることで、ユニークな形態を有するタンパク質集合体の構築が報告されている。Yamashita らは、bacterium *Listeria innocua* (LisDps) 由来の Dps protein と T4 bacteriophage 由来の cell punctuating needles (gp5C) を融合し、突起を表面に有する球状集合体を構築した¹⁸⁾。LisDps の N 末端および gp5C の C 末端はともに三回対称軸を有する。さらに、gp5C の 3 つの C 末端の間の距離は、LisDps の 3 つの N 末端の間のそれとかなり類似している。そこで、リンカーを介して gp5C の C 末端を LisDps の N 末端と結合した。透過型電子顕微鏡(TEM)、動的光散乱(DLS)で評価を行ったところ、融合タンパク質が自己集合し、直径 22.6 nm の分枝タンパク質ナノ構造の形成することが確認された(図 1-14)。

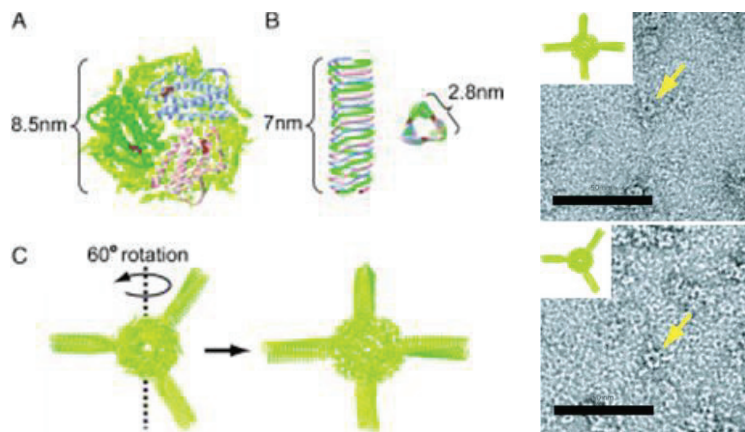


図 1-14. 表面に突起を有する球状集合体の設計と TEM 像¹⁸⁾

さらに、外部環境に応答した自己集合挙動を示すタンパク質集合体が報告されている。Aida らは光により集合状態の変化するタンパク質集合体を報告している(図 1-15)¹⁹⁾。フォトクロミック分子であるスピロピランは、紫外光を照射するとメロシアニンに異性化し、またメロシアニンに可視光照射するとスピロピランに戻ることが知られている。また、2 価金属イオンはメロシアニンと配位して 1:2 錯体を形成することが知られている。彼らは、シリンダー状のシャペロン GroEL タンパク質の頂端ドメインに部位特異的にフォトクロミックユニット分子であるメロシアニンを結合させた。メロシアニンで修飾された GroEL は、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} といった二価の金属イオンの配位により、長い円筒状集合体を形成することが確認

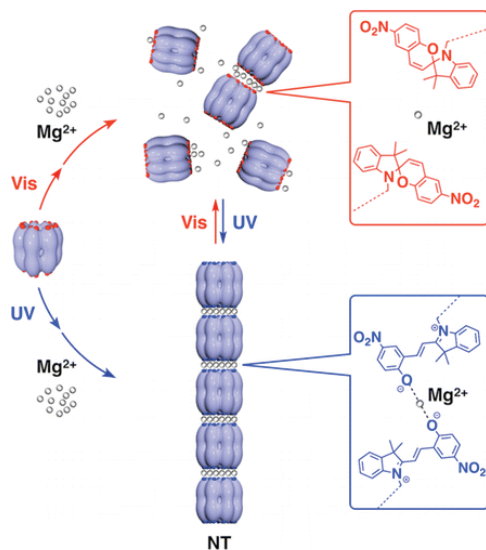


図 1-15. 光応答性タンパク質ナノチューブ¹⁹⁾

された。得られた集合体は中空であり、高い機械的安定性を示し、天然のシャペロンが変性タンパク質と結合する能力を維持していることが確認された。また UV 光照射すると、メロシアニンの構造がスピロピランに異性化し、金属イオンを結合する能力が失われ、ナノチューブが短いセグメントに切断された。このことから、光によりタンパク質の集合状態の変化することが示された。

1-4. ペプチドの自己集合による超分子集合体の創製

ペプチドは配列依存的に β -sheet, α -helix, β -turnなどの二次構造を形成する。このペプチド二次構造をビルディングブロックとして用いて人工的な超分子集合体の構築も行われている¹⁶⁾。近年、繊維²⁰⁾、チューブ²¹⁾といった集合体だけでなく、さらに複雑な集合体や機能性を有するペプチド集合体の構築が研究されている。例えば、Jeralaらは、一本のコイルドコイル形成ペプチドを折りたたませることにより四面体構造の構築を報告している(図1-16)²²⁾。12個のコイルドコイル形成セグメントをアミノ酸リンカーで繋げた一本のポリペプチドを合成した。12個のコイルドコイル形成セグメントは、平行ヘテロ二量体(2-8, 6-10, 9-12)、平行ホモ二量体(4-7)および逆平行ホモ二量体(1-5, 3-11)となるように設計している。フォールディングしていないポリペプチドの長さは 20 ± 2.9 nmにも関わらず、このペプチドを水に溶解させると、DLS測定より7 nm程度の粒径が観察された。また、TEM観察から、酢酸ウラニルにより頂点が染色された5 nm程度の四面体集合体が観察された。このことから、設計したポリペプチドが正しくフォールディングし、四面体を構築したと考えられる。一方、コイルドコイル形成セグメントの欠損や、セグメント順序を変更したポリペプチドは、このような四面体集合体を形成しなかった。

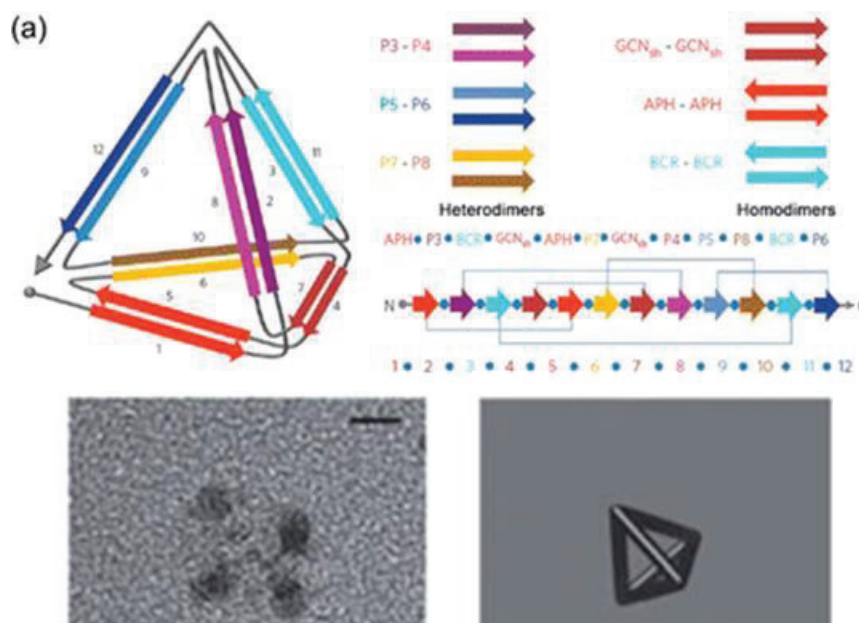


図1-16. 12個のコイルドコイル形成セグメントを有するポリペプチドの設計とその自己集合により形成した四面体集合体のTEM像²²⁾

また、ペプチドと金属イオンを組みわせて、特殊な形や性質を有する集合体の構築が報告されている。Granjaらは、金属配位可能な環状ペプチドを用いて表面に突起を有する集合体の構築を報告している²³⁾。側鎖にピリジンを導入した α -アミノ酸と γ -アミノ酸からなる6残基の環状ペプチドを合成し、これにクロロホルム中でPdイオンを添加すると、SEM観察より直径2-10 μ mの球状集合体の表面に1 μ m程度の突起を有する'molecular pom pom'が形成していることが確認された(図1-17)。この球状集合体のEDX測定よりPdイオンが配位していることが確認された。また、ピリジンを導入していない環状ペプチドではこのような集合体が形成しないことから、ピリジンへの金属イオンの配位により集合体を形成することが確認されている。

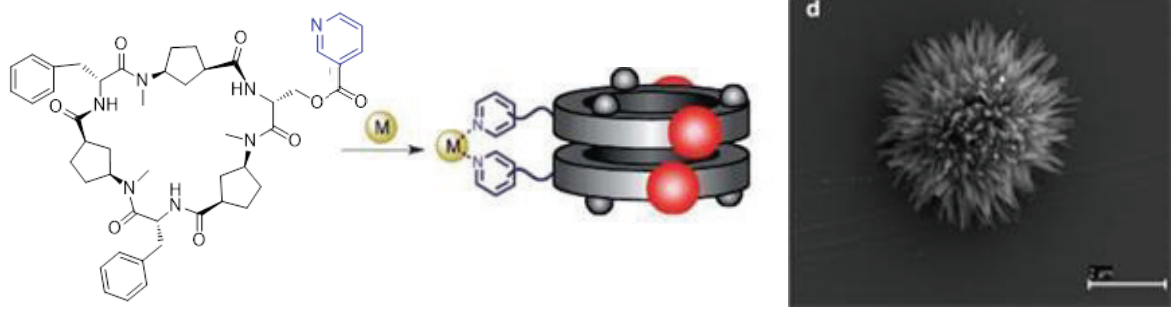


図 1-17. 金属配位能を有する環状ペプチドの設計とそのペプチドの自己集合により形成した集合体の SEM 像²³⁾

同様に Chmielewski らは、コイルドコイル形成ペプチドとリガンドを組み合わせ、三次元ペプチド結晶の構築を報告している(図 1-18)²⁴⁾。3 量体コイルドコイルペプチド GCN4-p2 の N 末端に NTA、C 末端に His-tag を付与したペプチドを合成し、このペプチド溶液に 2 価金属イオンを添加することにより三次元ペプチド結晶が形成することを TEM 観察により確認した。また、ペプチドと金属イオンの混合比や金属イオンの種類によって結晶の大きさを制御できることを示した。結晶形成中に His-tag タンパク質を混合させると、タンパク質を結晶中に内包でき、逆に、結晶が形成した後に His-tag タンパク質を混合させると結晶の表面にタンパク質を提示できることを示している。これらのことから、このペプチド結晶は 2 種類のゲスト分子を同時に取り込めることを報告している。

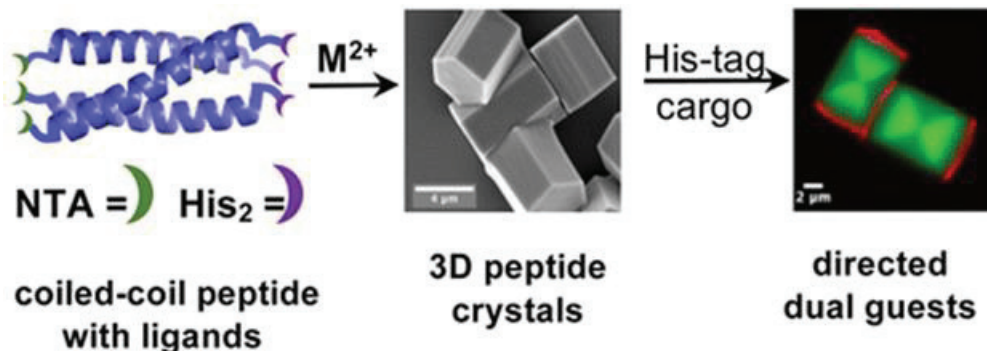


図 1-18. 金属配位能を有する 3 量体コイルドコイルペプチドが形成するペプチド結晶²⁴⁾

近年、1-1 で述べた天然の規則的なタンパク質集合体であるウイルスキャプシドを模倣したペプチド集合体が多数報告されている。Matsuura らは、球状ウイルスの自己集合戦略を模倣し、 β -シート形成ペプチド FKFEFKFE を有する三回対称性ペプチドコンジュゲート Trigonal(FKFE)₂ を設計・合成し、それが酸性水溶液中で逆平行 β -シート構造を経て自己集合し、約 19 nm 程度の構造体を形成することを見出している(図 1-19)²⁵⁾。得られた構造体のサイズは、Trigonal(FKFE)₂ が正 12 面体構造を形成したときに予想される直径(16 nm)に匹敵する。

また、Matsuura らは、細胞内の酸化還元環境を調節して

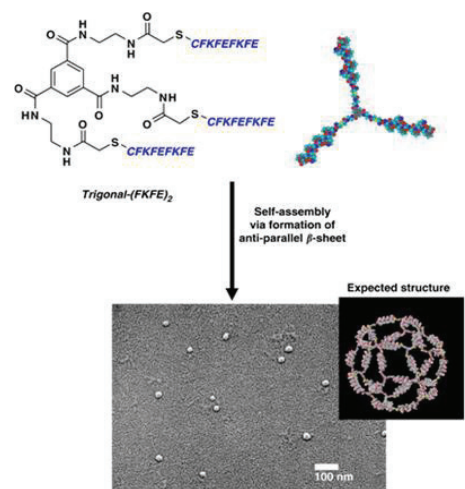


図 1-19. Trigonal-(FKFE)₂ の構造の模式図、及び球状構造体の SEM 像²⁵⁾

いるトリペプチドであるグルタチオンを三回対称に配置した Trigonal-glutathione (TG)を合成し、水中での自己集合により直径が数百 nm 程度の球状集合体を形成することも見出している²⁶⁾。TG は、濃度、pH に依存することなく、ほぼ一定の大きさの球状集合体を形成するが、濃度によって構造が変化することが SEM 観察よりわかっている。TG 濃度が 1 mM の SEM において、球がシワ状に潰れた構造体(図 1-20 A)が観察されているのに対して、10 mM では硬い球状構造体(図 1-20 B)が観察されている。

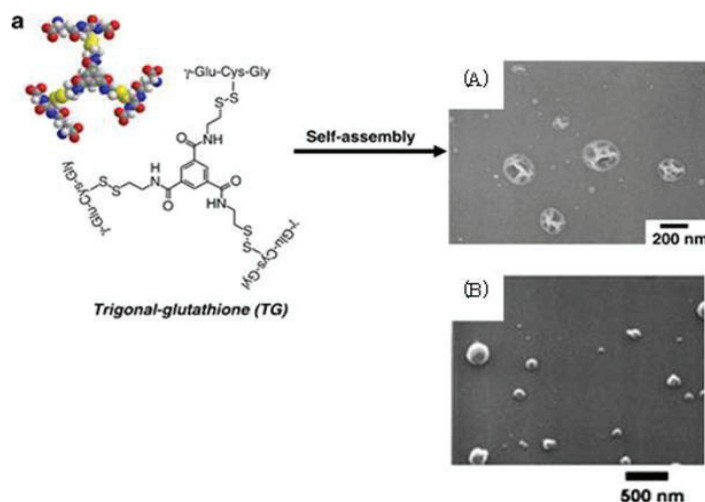


図 1-20. Trigonal-glutathione の構造の模式図、及び球状構造体の SEM 像 (A) [TG] = 1 mM, (B) [TG] = 10 mM²⁶⁾

濃度増加によって、中空構造が中実構造に変化するメカニズムはわかっていないが、濃度依存的に構造変化するナノ材料として興味深いと考えられている。

また、Woolfson らは、コイルドコイルペプチドからなる相補的なハブが 100 nm の球状構造体に自己集合することを報告している²⁷⁾。ホモ三量体コイルドコイル形成ペプチド (CC-Tri3) とヘテロダイマーコイルドコイル形成ペプチド (CC-Di-A および B) をジスルフィド結合により連結し、2つの相補的なハブを合成した(図 1-21)。この2つのハブを 1:1 で混合させると、直径 97 nm のペプチドケージが形成した。また、この球状構造体を還元するとハブの連結が切断され、直径 2-3 nm の小さな構造に変化したことも報告している。

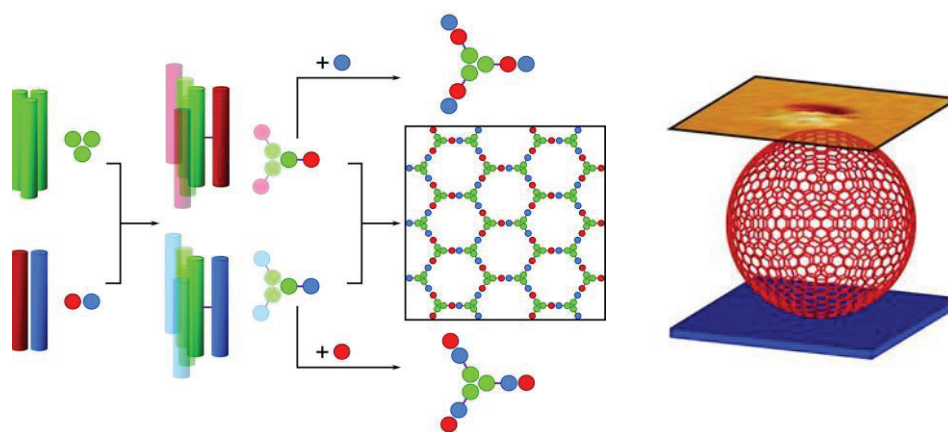


図 1-21. コイルドコイルペプチドの自己集合によるゲージの構築²⁶⁾

同様に、Ryadnov らも 30 残基のコイルドコイル形成ペプチドをジスルフィド結合により連結し、これが自己集合することでウイルス様のペプチド集合体が形成することを報告している²⁸⁾。動的な光散乱測定と Cryo-TEM 観察により、15 nm 程度の球状集合体が確認された(図 1-22)。また、小角 X 線散乱測定よりカプセル状集合体であることも確認され、siRNA を内包できることが Cryo-TEM 観察により確認された。

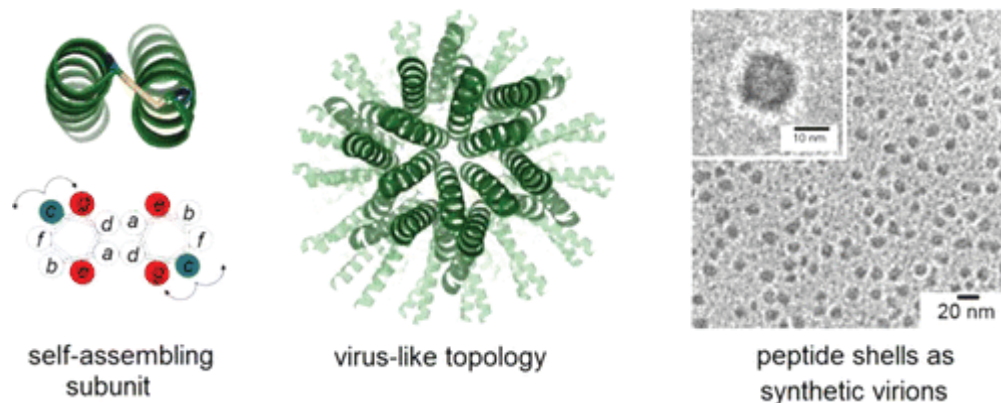


図 1-22. コイルドコイルペプチドの自己集合によるウイルス様カプセルの構築²⁷⁾

1-5. 人工ウイルスキャプシド

植物ウイルスの一種であるトマトブッシースタントウイルス(TBSV)は、388 残基のタンパク質が 180 個自己集合することで 33 nm のキャプシドを形成している。また、全長 388 残基のキャプシドタンパク質中の 69-92 残基が β -annulus 構造を形成することで、正十二面体の内部骨格を形成していることが知られている⁸⁾。Matsuura らは、TBSV キャプシドのトマトブッシースタントウイルスの正十二面体の内部骨格を形成している 24 残基 β -annulus ペプチド (INHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVGS) を合成し、それが水中で自己集合することで、30-50 nm の人工ウイルスキャプシドを構築することを見出している(図 1-23)²⁹⁾。この人工ウイルスキャプシドは小角 X 線散乱(SAXS)測定により中空構造であることがわかっている。わずか 24 残基のペプチドの自己集合により、一分子折り畳み構造や繊維構造を形成せず、中空の球状構造体のみを形成したことはとても興味深い。

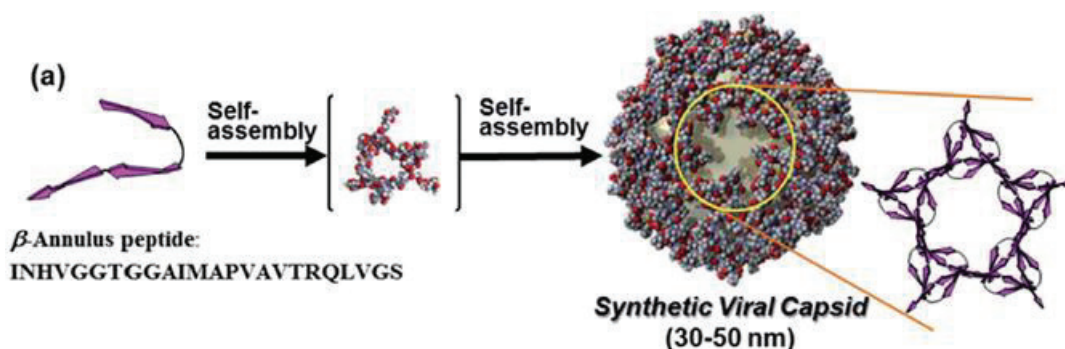


図 1-23. β -annulus-24 ペプチドの自己集合による人工ウイルスキャプシド形成の模式図

これまで、人工ウイルスキャプシドに対するアミノ酸配列の依存性が調べられている。C 末端側残基を欠損させていくと臨界会合濃度(CAC)が上昇し、形成する人工ウイルスキャプシドの粒径が大きくなっていった³⁰⁾。8 残基欠損させると、人工ウイルスキャプシドは形成しなかった。一方、N 末端側を欠損させた場合には、1 残基の違いで CAC が複雑に変化し、大きく形態も変化した³¹⁾。また、 β -annulus ペプチド配列の屈曲しているプロリン残基をアラニンに置換すると、二次構造が変化し球状構造ではなく繊維状構造に形態変化した³²⁾。さらに、C 末端をアミドにキップするだけでも CAC が減少することが分かっている³³⁾。

β -Annulus ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドは中空のナノカプセルであるため、その内部空間へのゲスト分子内包も行われている。 ζ -電位の pH 依存性より、C 末端側の電荷と ζ -電位に相関があり、C 末端が外側に配向し、N 末端が内側に配向していることが分かった。そのため、中性 pH において、人工ウイルスキャプシド内部はカチオン性であると予想される。実際、ANS やウラニンといったアニオン性色素が効率よく取り込まれたことから内部がカチオン性であると確認された。そこで、アニオン性である DNA の内包が行われた³⁴⁾。7249 塩基の M13 phage DNA と β -annulus 24 ペプチドを電荷比 1:1 で混合させると、動的光散乱測定より 82 nm 程度の集合体が確認された。この複合体中の DNA をシスプラチンで選択的に染色し TEM 観察を行ったところ 20-45 nm 程度の像が観察されたのに対し、酢酸ウラニルで染色すると 75-120 nm 程度の球状集合体が観察された(図 1-24)。これより、人工ウイルスキャプシドに DNA が内包されていると考えられている。

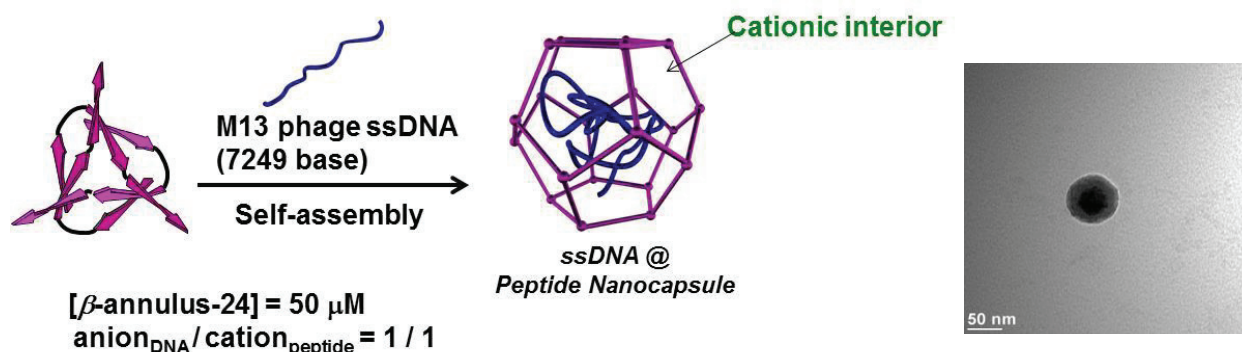


図 1-24. 人工ウイルスキャプシドへの DNA の内包の模式図及び球状構造体の TEM 像³⁴⁾

また、人工ウイルスキャプシド内部に配向する N 末端を化学修飾することにより、アニオン性でないゲスト分子 GFP の内包も行われている(図 1-25)³⁵⁾。 β -annulus ペプチドの N 末端に His-tag タンパク質と特異的に結合可能な Ni-NTA 錯体を導入した。これを His-tag 修飾緑色蛍光タンパク質 (His-tag GFP) と混合させると、動的光散乱測定より 47 nm 程度の集合体が確認され、SEM 観察から球状集合体が観察された。また、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)より GFP が人工ウイルスキャプシドと同じ時間に溶出したことから、GFP は人工ウイルスキャプシドに内包されていると考えられている。

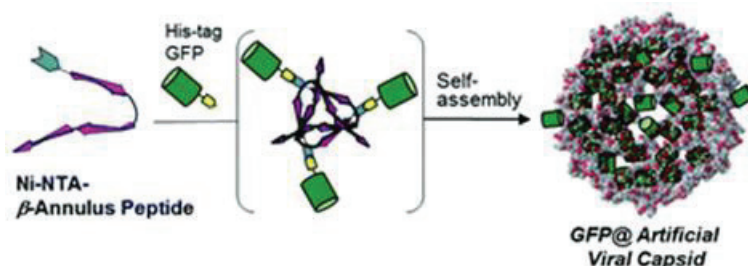


図 1-25 人工ウイルスキャプシドへの GFP の内包の模式図³⁵⁾

1-6. 本研究の概要

先述したように、これまでに24 残基の β -annulus ペプチド(INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS)が水中で自己集合することにより、30-50 nm の中空の人工ウイルスキャプシドを形成することを見出している。また、内部にN末端が配向し、外部表面にC末端側が配向することを利用して、キャプシド内部空間への核酸・タンパク質の内包や、外部表面への機能性分子修飾が可能となっている。本研究では β -annulus ペプチドの自己集合により構築される人工ウイルスキャプシドのさらなる機能化を目指して、無機微粒子との複合化、突起状構造の付与、光応答性の付与を検討した。

第2章では、人工ウイルスキャプシドの持つ特性と無機化合物の特性を組み合わせることによる新規材料創製について述べる。DouglasやBlumらの戦略を参考にして、人工ウイルスキャプシドへの蛍光性無機ナノ粒子ZnOの内包や、金ナノ粒子での表面被覆を行った。また、蛍光性ナノ粒子CdTeを用いて、人工ウイルスキャプシドへの内包挙動を、蛍光相関分光法(FCS)を用いてその場解析した。

第3章では、コイルドコイル突起を有する人工ウイルスキャプシドの創製について述べる。先述のように、インフルエンザウイルスは、ヘマグルチニン3量体コイルドコイルから形成される表面の突起により標的細胞の表面を認識している。人工ウイルスキャプシド表面にコイルドコイルを提示できれば、天然の突起を有するウイルスを模倣した人工ウイルスキャプシドが構築できるのではないかと考えた。そこで、人工ウイルスキャプシドの表面に配向するC末端にコイルドコイル形成ペプチドを連結させ、人工ウイルスキャプシド表面にコイルドコイル形成ペプチドを提示した。さらに表面のコイルドコイル形成ペプチドと相補的なペプチドを添加することにより、表面にコイルドコイルの突起を有する人工ウイルスキャプシドの創製を検討した。

第4章では、光応答性官能基を導入した人工ウイルスキャプシドの創製について述べる。近年、フォトクロミック分子と超分子集合体を組み合わせて、集合形態が外部刺激により変化するタンパク質集合体の形成が報告されている。そこで、人工ウイルスキャプシドにフォトクロミック分子を組みこめば、天然ウイルスには存在しない光応答性を付与した人工ウイルスキャプシドが構築できるのではないかと考えた。主鎖にフォトクロミック分子を組み込むことで、光による劇的な集合形態の変化が期待されるため、主鎖にアゾベンゼンを有する光応答性人工ウイルスキャプシドの創製を検討した。

本論文で使用した機器は以下の通りである。

- ・マトリクス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS):
Bruker autoflex-T2
- ・動的光散乱 (DLS) 測定: Malvern, Zetasizer Nano シリーズ Nano-ZS ZEN3600
- ・pH 測定: HOBIRA, twin pH meter B-212
- ・紫外可視 (UV-Vis) 分光光度計: JASCO, V-630 spectrophotometer
- ・蛍光分光光度計: JASCO, FP-8200 spectrophotometer
- ・透過型電子顕微鏡 (TEM): JEOL, JEM 1400 Plus
- ・蛍光相関分光ユニット: 浜松ホトニクス, FCS コンパクト BL
- ・核磁気共鳴装置(NMR): JEOL, JNM-ECX500

- ・ フーリエ変換質量分析計(ESI/DART FTMS): Thermo Fisher Scientific, Exactive
- ・ マイクロウェーブ合成装置: Biotage, Initiator+
- ・ 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

以下のコンポーネントから構築されるシステムを用いた。

①

システム制御: SHIMADZU SCL-10A VP
 オンラインデガッサ: SHIMADZU DGU-11A
 ポンプ: SHIMADZU LC-6AD (2 基)
 インジェクションバルブ: Rheodyne 7725i
 UV 検出器: SHIMADZU SPD-10AV VP
 フラクシオンコレクタ: SHIMADZU FRC-10A

②

システム制御: SHIMADZU CBM-20A
 オンラインデガッサ: SHIMADZU DGU-20A_{3R}
 ポンプ: SHIMADZU LC-6AD (2 基)
 インジェクションバルブ: Rheodyne 7725i
 UV 検出器: SHIMADZU SPD-20A
 フラクシオンコレクタ: SHIMADZU FRC-10A

参考文献

- 1) B. J. G. E. Pieters, M. B. Eldijk, R. J. M. Nolte, J. Mecinović, *Chem. Soc. Rev.*, **45**, 24 (2016)
- 2) T. P. J. Knowles, M. Vendruscolo and C. M. Dobson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 384 (2014)
- 3) M. D. Shoulders and R. T. Raines, *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 929 (2009)
- 4) L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley and J. E. Gouaux, *Science*, **274**, 1859 (1996)
- 5) L. Sun, L. N. Young, X. Zhang, S. P. Boudko, A. Fokine, E. Zbornik, A. P. Roznowski, I. J. Molineux, M. G. Rossmann and B. A. Fane, *Nature*, **505**, 432 (2014)
- 6) (a) P. M. Harrison, P. Arosio, *Biochim. Biophys. Acta*, **1275**, 161 (1996); (b) W. H. Massover, *Micron*, **24**, 389 (1993); (c) K. K. W. Wong, S. Mann, *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.*, **3**, 63 (1998)
- 7) (a) T. Kirchhausen, *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 699 (2000); (b) A. Fotin, Y. Cheng, P. Sliz, N. Grigorieff, S. C. Harrison, T. Kirchhausen, T. Walz, *Nature*, **432**, 573 (2004)
- 8) (a) C. Branden, and J. Tooze, ”タンパク質の構造入門 第2版,” Newton Press (2000); (b) S. C. Harrison, A.J. Olson, C. E. Schutt, and F. K. Winkler, *Nature.*, **276**, 368 (1978); (c) A. J. Olson, G. Bricogne, and S.C. Harrison, *J. Mol. Biol.* **171**, 61 (1983); (d) P. Hopper, S. C. Harrison, and R. T. Sauer, *J. Mol. Biol.* **177**, 701 (1984)
- 9) (a) C. S. Martín, *Viruses* , **4**, 847, (2012); (b) M. J. van Raaij, A. Mitraki, G. Lavigne and S. Cusack, *Nature*, **401**, 935 (1999); (c) G. R. Nemerow, P. L. Stewart and V. S. Reddy, *Curr. Opin. Virology*, **2**, 115 (2012)

- 10) (a) W. Weis, J. H. Brown, S. Cusack, J. C. Paulson, J. J. Skehel and D. C. Wiley, *Nature*, **333**, 426 (1988); (b) J. C. Jong, G. F. Rimmelzwaan, R. A. M. Fouchier, A. D. M. E. Osterhaus, *J. Infect.*, **40**, 218 (2000); (c) S. J. Gamblin, L. F. Haire, R. J. Russell, D. J. Stevens, B. Xiao, Y. Ha, N. Vasisht, D. A. Steinhauer, R. S. Daniels, A. Elliot, D. C. Wiley and J. J. Skehel, *Science*, **303**, 1838 (2004); (d) B. Szewczyk, K. Bienkowska-Szewczyk and E. Krol, *Acta Biochim. Pol.*, **61**, 397 (2014)
- 11) T. Douglas, E. Strable, D. Willits, A. Aitouchen, M. Libera, M. Young, *Adv. Mater.*, **14**, 415. (2002)
- 12) I. J. Minten, L. J. A. Hendriks, R. J. M. Nolte, J. J. L. M. Cornelissen, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 17771 (2009)
- 13) C. Chen, M. C. Daniel, Z. T. Quinkert, M. De, B. Stein, V. D. Bowman, P. R. Chipman, V. M. Rotello, C. C. Kao, B. Dragnea, *Nano Lett.*, **6**, 611 (2006)
- 14) (a) A. S. Blum, C. M. Soto, C. D. Wilson, J. D. Cole, M. Kim, B. Gnade, A. Chatterji, W. F. Ochoa, T. W. Lin, J. E. Johnson, B. R. Ratna, *Nano Lett.*, **4**, 867 (2004); (b) C. M. Soto, A. S. Blum, C. D. Wilson, J. Lazorcik, M. Kim, B. Gnade, B. R. Ratna, *Electrophoresis*, **25**, 2901 (2004); (c) A. S. Blum, C. M. Soto, C. D. Wilson, T. L. Brower, S. K. Pollack, T. L. Schull, A. Chatterji, T. Lin, J. E. Johnson, C. Amsinck, P. Franzon, R. Shashidhar, B. R. Ratna, *Small*, **1**, 702 (2005)
- 15) T. Koho, T. O. Ihalainen, M. Stark, H. U. Kerttula, R. Wieneke, R. Rahikainen, V. Blazevic, V. Marjomäki, R. Tampé, M. S. Kulomaa, V. P. Hytönen, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **96**, 22 (2015)
- 16) (a) K. Matsuura, *RSC Adv.*, **4**, 2942 (2014); (b) B. E. I. Ramakers, J. C. M. van Hest and D. Lowik, *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 2743 (2014); (c) E. D. Santis, M. G. Ryadnov, *Chem. Soc. Rev.*, **44**, 8288 (2015); (d) Q. Luo, C. X. Hou, Y. S. Bai, R. B. Wang and J. Q. Liu, *Chem. Rev.*, **116**, 13571 (2016)
- 17) J. C. T. Carlson, S. S. Jena, M. Flenniken, T. F. Chou, R. A. Siegel and C. R. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7630 (2006)
- 18) K. Sugimoto, S. Kanamaru, K. Iwasaki, F. Arisaka I. Yamashita, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 2725 (2006)
- 19) S. Biswas, K. Kinbara, T. Niwa, H. Taguchi, N. Ishii, S. Watanabe, K. Miyata, K. Kataoka, T. Aida, *Nat. Chem.*, **5**, 613 (2013)
- 20) (a) S. A. Potekhin, T. N. Melnik, V. Popov, N. F. Lanina, A. A. Vazina, P. Rigler, A. S. Verdini, G. Corradin and A. V. Kajava, *Chem. Biol.*, **8**, 1025 (2001); (b) N. L. Ogihara, G. Ghirlanda, J. W. Bryson, M. Gingery, W. F. DeGrado and D. Eisenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 1404 (2001); (c) M. Zhou, D. Bentley and I. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 734 (2004); (d) Y. Zimenkov, S. N. Dublin, R. Ni, R. S. Tu, V. Breedveld, R. P. Apkarian and V. P. Conticello, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6770 (2006); (e) T. H. Sharp, M. Bruning, J. Mantell, R. B. Sessions, A. R. Thomson, N. R. Zaccai, R. L. Brady, P. Verkade and D. N. Woolfson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 13266 (2012); (f) J. Hume, J. Sun, R. Jacquet, P. D. Renfrew, J. A. Martin, R. Bonneau, M. L. Gilchrist and J. K. Montclare, *Biomacromolecules*, **15**, 3503 (2014)
- 21) (a) D. T. Bong, T. D. Clark, J. R. Granja, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 988 (2001); (b) M. Reches, E. Gazit, *Science*, **300**, 625 (2003); (c) E. Gazit, *Chem. Soc. Rev.*, **36**, 1263 (2007); (d) I. Cherny, E. Gazit, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **47**, 4062 (2008); (e) S. Biswas, K. Kinbara, N. Oya, N. Ishii, H. Taguchi, T. Aida, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 7556 (2009); (f) C. F. Xu, R. Liu, A. K. Mehta, R. C. Guerrero-Ferreira, E. R. Wright, S. Dunin-Horkawicz, K. Morris, L. C. Serpell, X. B. Zuo, J. S. Wall and V.

- P. Conticello, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 15565 (2013); (g) N. C. Burgess, T. H. Sharp, F. Thomas, C. W. Wood, A. R. Thomson, N. R. Zaccai, R. L. Brady, L. C. Serpell and D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 10554 (2015); (h) F. Thomas, N. C. Burgess, A. R. Thomson, D. N. Woolfson, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 987 (2016)
- 22) H. Gradisar, S. Bozic, T. Doles, D. Vengust, I. Hafner-Bratkovic, A. Mertelj, B. Webb, A. Sali, S. Klavzar, R. Jerala, *Nat. Chem. Biol.*, **9**, 362 (2013)
- 23) M. Panciera, M. Amorn, J. R. Granja, *Chem. Eur. J.*, **20**, 10260 (2014)
- 24) M. Nepal, M. J. Sheedlo, C. Das, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 11051 (2016)
- 25) K. Matsuura, K. Murasato and N. Kimizuka, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10148 (2005)
- 26) K. Matsuura, H. Matsuyama, T. Fukuda, T. Teramoto, K. Watanabe, K. Murasato and N. Kimizuka, *Soft Matter*, **5**, 2463 (2009)
- 27) J. M. Fletcher, R. L. Harniman, Fr. R. H. Barnes, A. L. Boyle, A. Collins, J. Mantell, T. H. Sharp, M. ntognozzi, P. J. Booth, N. Linden, M. J. Miles, R. B. Sessions, P. Verkade and D. N. Woolfson, *Science*, **340**, 595 (2013)
- 28) J. E. Noble, E. Santis, J. Ravi, B. Lamarre, V. Castelletto, J. Mantell, S. Ray, M. G. Ryadnov, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 12202 (2016)
- 29) (a) K. Matsuura, K. Watanabe, T. Matsuzaki, K. Sakurai, N. Kimizuka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 9662 (2010); (b) K. Matsuura, *Polymer J.*, **44**, 469 (2012)
- 30) 渡部健太、九州大学大学院工学部物質創造工学専攻修士論文 (2010)
- 31) 植村明仁、鳥取大学工学部物質工学科卒業論文 (2014)
- 32) 水口勇作、九州大学工学部物質科学工学科卒業論文 (2012)
- 33) 藤田聖矢、鳥取大学工学部物質工学科卒業論文 (2013)
- 34) Matsuura, K.; Watanabe, K.; Matsushita, Y.; Kimizuka, N., *Polymer. J.*, **45**, 529(2013)
- 35) K. Matsuura, T. Nakamura, K. Watanabe, T. Noguchi, K. Minamihata, N. Kamiya, N. Kimizuka, *Org. Biomol. Chem.*, **14**, 7869 (2016)

第2章 人工ウイルスキャプシドの無機物との複合化

2-1. 序

金属や半導体あるいは金属酸化物などはナノサイズになると、バルクとは異なった物理的・化学的特性を示すようになることが知られている。例えば、金はナノサイズとなることで、表面プラズモン効果を示し、赤色に発色する。また、半導体ナノ粒子は蛍光を示すことが知られており量子ドットと呼ばれている¹⁾。量子ドットは輝度や安定性に優れており、バイオイメージングへの応用が期待されている。そのため、様々な機能を付与するために、ポリマー、リポソームやミセルに内包させた量子ドットが開発されている²⁾。

一方で、ウイルスキャプシドは、一義的な大きさの正二十面体対称性を有するタンパク質集合体である。このことから、ウイルスキャプシドは、無機化合物のキャリアーやナノリアクターのための新規材料として注目されている³⁾。例えば、Douglas らは、Cowpea chlorotic mottle virus(CCMV)のキャプシドの内部で直径 6-30 nm の FeO ナノ粒子を合成している。

また、ウイルスキャプシドの規則正しい表面を無機化合物の足場材料として用いた例も報告されている⁵⁾。金ナノ粒子の間隔や配列パターンが光学的特性に大きく影響することが一般的に知られている。そのため、近年、ウイルスキャプシドを用いた金ナノ粒子の配列制御が報告されている^{6,7)}。Blum らは、天然ウイルスであるササゲモザイクウイルス(CPMV)のキャプシド表面に金ナノ粒子を配位結合させ、配列化させている⁸⁾。

本章では、まず β -annulus 24 ペプチドの N 末端に Gly リンカーを介して ZnO 結合ペプチド HCVAHR⁹⁾を付加した ZnO-binding- β -annulus ペプチド (HCVAHRGGGINHVGGTGGAIMAPVATRQLVGS)を合成し、合成しておいた ZnO ナノ粒子分散液をペプチド粉末に加え、ZnO ナノ粒子を内包した人工ウイルスキャプシドの創製を検討した(図 2-1)。また、ZnO-binding- β -annulus ペプチド存在下で、ZnO のテンプレート合成を検討した。

次に、アニオン性の表面電荷を有する蛍光性 CdTe ナノ粒子の人工ウイルスキャプシドへの内包挙動を、蛍光相関分光法(FCS)を用いてその場解析した(図 2-2)。

さらに、C 末端に金結合部位として GGGCG 配列を導入した β -annulus ペプチドと金ナノ粒子のコンジュゲートの自己集合により、金ナノ粒子により被覆された人工ウイルスキャプシドを構築した(図 2-3)。

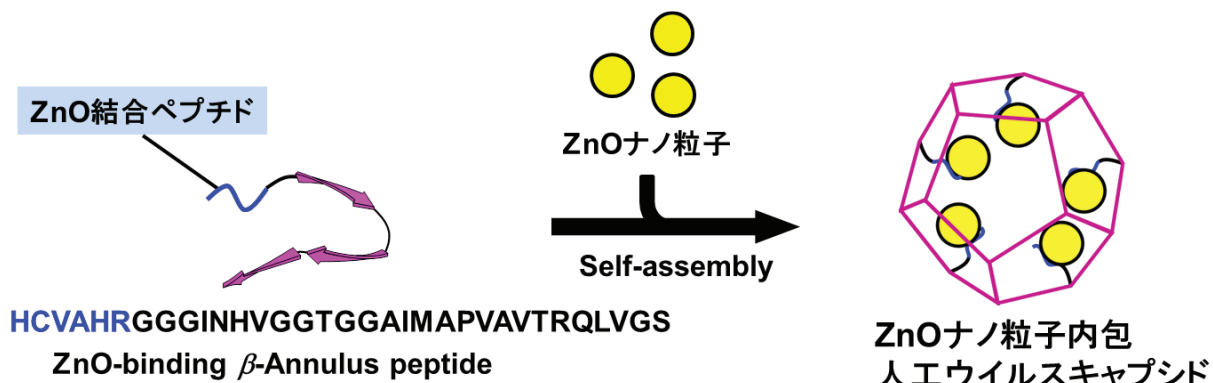


図 2-1. ZnO ナノ粒子を内包した人工ウイルスキャプシドの創製

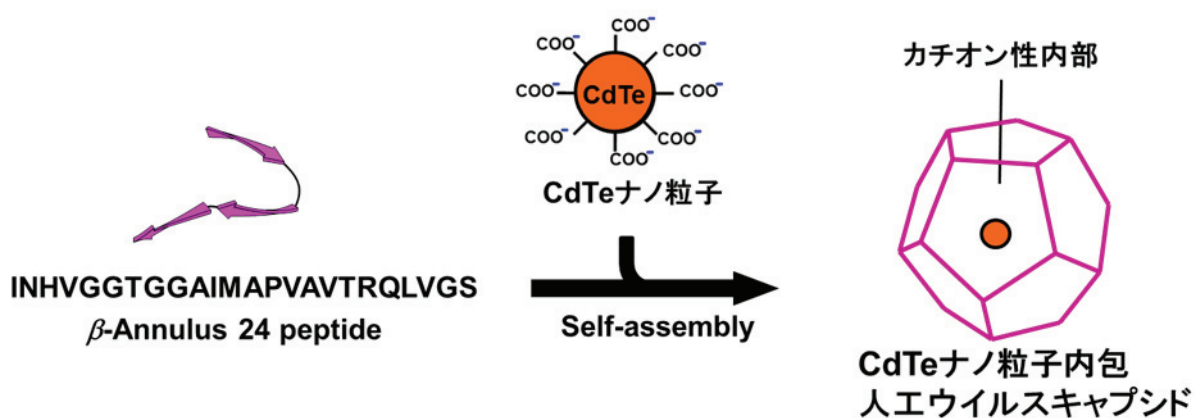


図 2-2. CdTe ナノ粒子を内包した人工ウイルスキャプシドの創製

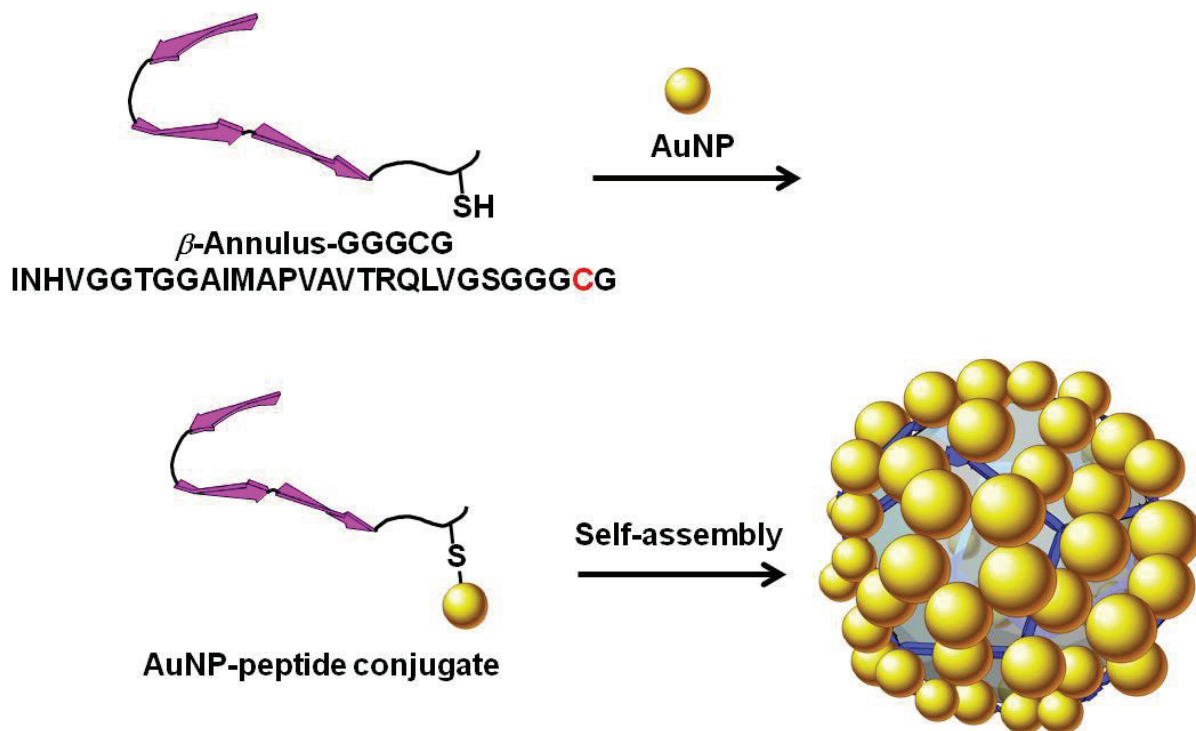


図 2-3. 金ナノ粒子修飾人工ウイルスキャプシドの創製

2-2. ZnO-binding- β -annulus ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドへの ZnO ナノ粒子の内包

近年、梅津らはファージディスプレイ法を用いて EAHVMHKVAPRP という ZnO 結合型ペプチド配列を発見している¹⁰⁾。また、このペプチドの C 末端に GGGSC という配列を追加し、水酸化亜鉛ゾルに追加すると 20 nm のフラワー状の ZnO が形成することを報告している。また、大河内らは、梅津らが発見した配列の特異的結合部位をさらにスクリーニングし、HCVAHR という配列が ZnO ナノ粒子に対する高い親和性($K_a = 9.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$)および特異性を示すことを見出している⁹⁾。

本章では、 β -annulus-24 ペプチドの N 末端に Gly リンカーを介して ZnO 結合ペプチド HCVAHR を付加した ZnO-binding- β -annulus ペプチド (HCVAHRGGG-INHVGTTGGAIMAPVATRQLVGS) を合成し、合成しておいた ZnO ナノ粒子分散液をペプチド粉末に加え、ZnO ナノ粒子を内包した人工ウイルスキャプシドの創製を検討した。また、ZnO-binding- β -annulus ペプチド存在下で、ZnO のテンプレート合成を検討した。

2-2-1. ZnO-binding- β -annulus ペプチドの合成

ペプチド HCVAHRGGGINHVGGTTGGAIMAPVAVTRQLVGS (ZnO-binding- β -annulus ペプチド) を、Fmoc 固相合成法により合成した。

【試薬】

(アミノ酸導入済み樹脂)

Fmoc-Ser(tBu)-Alko-PEG resin

【アミノ酸導入率 0.23 mmol/g, 渡辺化学工業】 130 mg (0.03125 mmol)

(Fmoc アミノ酸)

(樹脂上アミノ酸に対して 4 等量)

| | |
|-----------------------------------|--|
| Fmoc-Ile-OH | 【Mw 353.42, 渡辺化学工業】 44.1 mg (0.125 mmol)×2 |
| Fmoc-Asn(Trt)-OH | 【Mw 596.69, 渡辺化学工業】 71.2 mg (0.125 mmol) |
| Fmoc-His(Trt)-OH | 【Mw 619.73, 渡辺化学工業】 77.5 mg (0.125 mmol)×2 |
| Fmoc-Val-OH | 【Mw 339.39, 渡辺化学工業】 42.4 mg (0.125 mmol)×5 |
| Fmoc-Gly-OH | 【Mw 297.31, 渡辺化学工業】 37.2 mg (0.125 mmol)×8 |
| Fmoc-Thr(tBu)-OH | 【Mw 397.48, 渡辺化学工業】 49.7 mg (0.125 mmol)×2 |
| Fmoc-Ala-OH · H ₂ O | 【Mw 329.36, 渡辺化学工業】 41.2 mg (0.125 mmol)×4 |
| Fmoc-Met-OH | 【Mw 371.46, 渡辺化学工業】 46.4 mg (0.125 mmol) |
| Fmoc-Pro-OH · AcOEt | 【Mw 425.46, 渡辺化学工業】 53.2 mg (0.125 mmol) |
| Fmoc-Arg(Pbf)-OH · AcOEt · 0.2IPE | 【Mw 669.29, 渡辺化学工業】 83.7 mg (0.125 mmol)×2 |
| Fmoc-Gln(Trt)-OH | 【Mw 610.72, 渡辺化学工業】 76.3 mg (0.125 mmol) |
| Fmoc-Leu-OH | 【Mw 353.42, 渡辺化学工業】 44.2 mg (0.125 mmol) |
| Fmoc-Cys(Trt)-OH | 【Mw 585.72, 渡辺化学工業】 73.2 mg (0.125 mmol) |

N,N'-Diisopropylethylamine (DIPEA)

【Mw 129.25, 渡辺化学工業】

ピペリジン

【Mw 85.15, 渡辺化学工業】

TNBS テストキット (1% ピクリルスルホン酸 DMF 溶液、10% *N,N'*-ジイソプロピルエチルア

ミン DMF 溶液)

【東京化成】

クロラニルテストキット(2% アセトアルデヒド DMF 溶液, 2% クロラニル DMF 溶液)

【東京化成】

(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium (COMU)

【Mw 428.3, 渡辺化学工業】

[実験操作]

1. 樹脂の膨潤

プラスチック製のカラムに樹脂を入れ、NMP を 2 mL 加え、1 時間攪拌した。

2. Fmoc 基の除去

ピペリジン: DMF=20: 80 をカラムに 2 mL 加えて 15 分攪拌し、溶液を除去した。

この操作を 2 回繰り返し、NMP で 5 回洗浄した。

3. Fmoc 基除去の確認

少量の樹脂をサンプル瓶中の DMF に懸濁させ、1% ピクリルスルホン酸 DMF 溶液を 2 滴、10% *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン DMF 溶液を 2 滴加えた。室温で 5 分放置し、樹脂が赤色に呈色していることを確認した。赤に呈色しない場合、操作 2 をもう一度行った。

4. アミノ酸の導入

サンプル瓶に樹脂に対してアミノ酸、COMU を 4 等量、DIPEA を 8 等量、NMP 2 mL を加え溶解させた。それを樹脂の残ったカラムに加え、室温で 2 時間攪拌した。攪拌後、溶液を取り除き、残った樹脂を NMP で 5 回洗浄した。

5. アミノ酸の導入確認

少量の樹脂をサンプル瓶中の DMF に懸濁させ、1% ピクリルスルホン酸 DMF 溶液を 1 滴、10% *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン DMF 溶液を 1 滴加えた。室温で 5 分放置し、樹脂が赤色に呈色していないことを確認した。赤に呈色した場合、操作 4 をもう一度行った。

2-5 の操作を目的のアミノ酸配列となるまで繰り返した。その後、ペプチドの脱樹脂をクリーベージカクテルによって行った。

6. 脱樹脂、脱保護

氷浴中の 30 mL ナスフラスコに TFA [東京化成工業] 2.04 mL、チオアニソール [渡辺化学工業] 0.125 mL、H₂O 0.125 mL、EDT [渡辺化学工業] 0.0625 mL、TIPS [渡辺化学工業] 0.025 mL を混合した。そこに、アミノ酸導入済み樹脂を加え室温で 6 時間攪拌した。溶液を濾過し、溶媒留去した。これに *tert*-ブチルメチルエーテル [和光純薬工業] を 15 mL 加え、遠心分離 (2000 rpm, 10 min) により、ペプチドを沈殿させ、上澄み液を取り除いた。この操作を 3 回行った後、凍結乾燥により白色粉末を得た。Trt 基が脱保護されにくかったため、脱保護を再度行った。

理論収量: 99.4 mg 粗収量: 27.9 mg 粗収率: 28%

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: α -CHCA, Mode: Linear positive

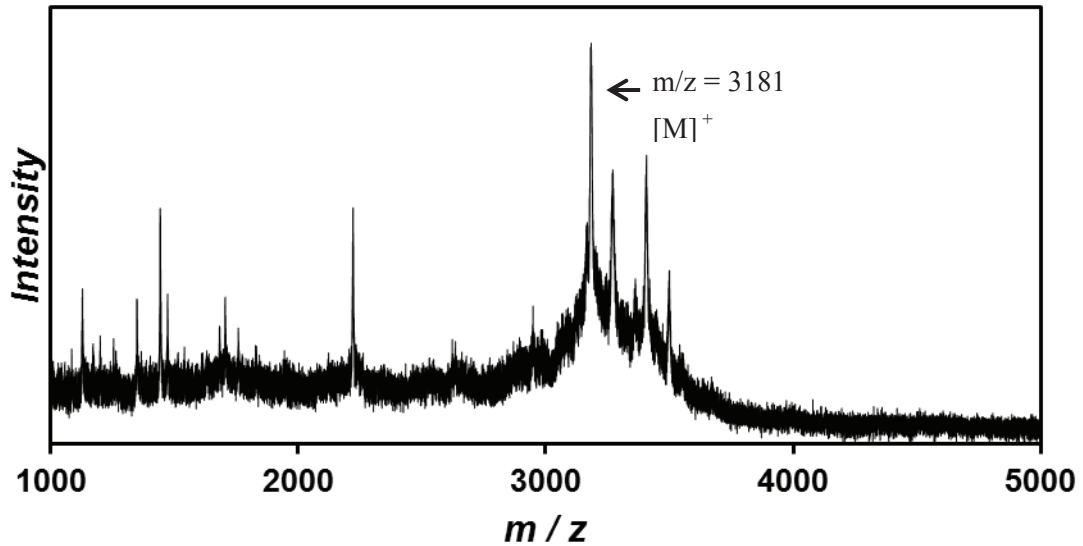


図 2-4. 粗ペプチドの MALDI-TOF-MS (matrix: α -CHCA)

図 2-4 より、目的物のピークである $m/z = 3181$ が確認された。目的物が確認できたため逆相 HPLC での精製を行った。

【分取条件】

試料: 0.1% TFA 入り水 1 mL に、粗ペプチドを 9 mg 溶かした溶液。

カラム: Inertsil WP300 C18 (5 μ m, 20 \times 250 mm)

試料注入量: 1 mL

移動相溶媒: 水 / CH₃CN (ともに 0.1% TFA を含む)

移動相組成: 水 / CH₃CN: 76.5 / 23.5 \rightarrow 74.5 / 25.5 (100 min)、リニアグラジエント

検出: UV-vis 220 nm

流量: 10 mL/min

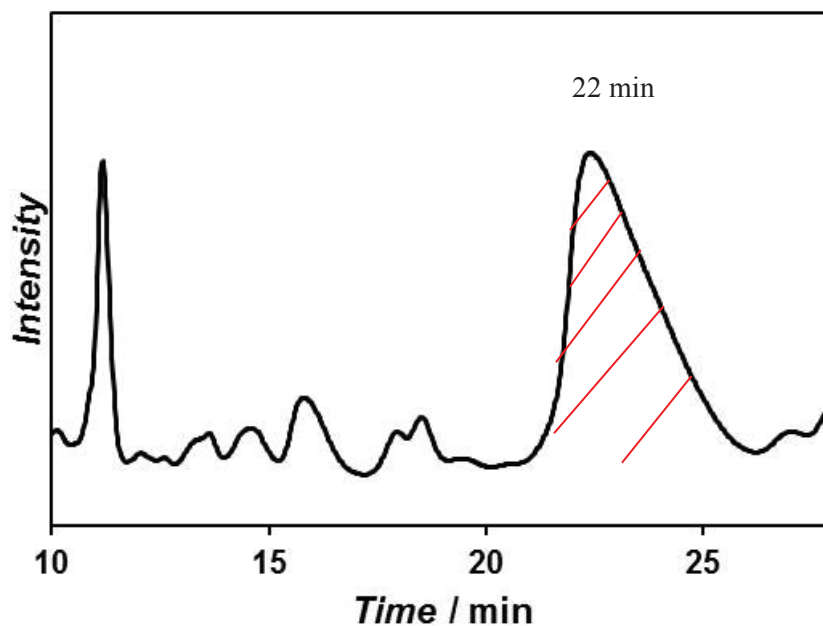


図 2-5. 分取時の逆相 HPLC チャート 水 76.5% (0 min)→74 .5% (100 min)

図 2-5 の 22 分頃のピークを分取した。これを複数回繰り返した。得られた溶液を凍結乾燥し白色粉末を得た。

【MALDI-TOF-MS 測定】

Matrix: α -CHCA, Mode: Linear positive

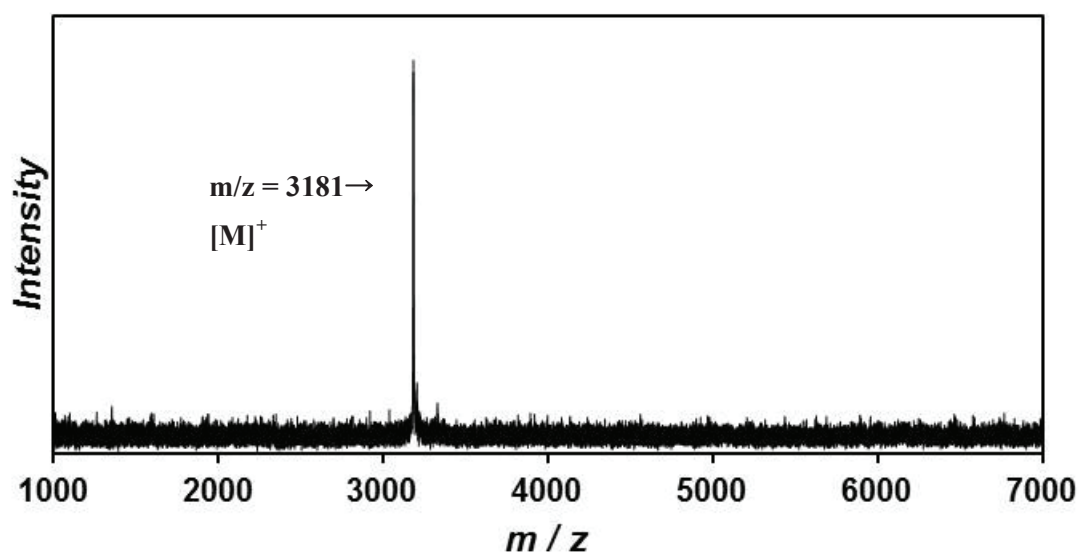


図 2-6. 精製後の ZnO-binding- β -annulus の MALDI-TOF-MS(matrix: α -CHCA)

図 2-6 より、目的ペプチドのピーク $m/z = 3181$ を確認した。また、それ以外のピークは matrix 由来のピークしか見られなかった。

理論収量: 99.4 mg 収量: 6.2 mg 収率: 6.23%

2-2-2. ZnO-binding ペプチドの固相合成

【試薬】

(アミノ酸導入済み樹脂)

| | |
|---|---|
| Fmoc-Gly-Alko-PEG resin 【アミノ酸導入率 0.23 mmol/g, 渡辺化学工業】 | 113.6 mg (0.025 mmol) |
| (Fmoc アミノ酸) | (樹脂上アミノ酸に対して 4 等量) |
| Fmoc-His(Trt)-OH | 【Mw 619.73, 渡辺化学工業】 44.1 mg (0.1 mmol)×2 |
| Fmoc-Val-OH | 【Mw 339.39, 渡辺化学工業】 33.9 mg (0.1 mmol) |
| Fmoc-Gly-OH | 【Mw 297.31, 渡辺化学工業】 29.7 mg (0.1 mmol) ×3 |
| Fmoc-Ala-OH · H ₂ O | 【Mw 329.36, 渡辺化学工業】 32.3 mg (0.1 mmol) |
| Fmoc-Arg(Pbf)-OH · AcOEt · 0.2IPE | 【Mw 669.29, 渡辺化学工業】 66.9 mg (0.1 mmol) |
| Fmoc-Cys(Trt)-OH | 【Mw 585.72, 渡辺化学工業】 58.6 mg (0.1 mmol) |

[実験操作]

1. 樹脂の膨潤

プラスチック製のカラムに樹脂を入れ、NMP を 2 mL 加え、1 時間攪拌した。

2. Fmoc 基の除去

ピペリジン: DMF=20: 80 をカラムに 2 mL 加えて 15 分攪拌し、溶液を除去した。

この操作を 2 回繰り返し、NMP で 5 回洗浄した。

3. Fmoc 基除去の確認

少量の樹脂をサンプル瓶中の DMF に懸濁させ、1% ピクリルスルホン酸 DMF 溶液を 2 滴、10% *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン DMF 溶液を 2 滴加えた。室温で 5 分放置し、樹脂が赤色に呈色していることを確認した。赤に呈色しない場合、操作 2 をもう一度行った。

4. アミノ酸の導入

サンプル瓶に樹脂に対してアミノ酸、COMU を 4 等量、DIPEA を 8 等量、NMP 2 mL を加え溶解させた。それを樹脂の残ったカラムに加え、室温で 2 時間攪拌した。攪拌後、溶液を取り除き、残った樹脂を NMP で 5 回洗浄した。

5. アミノ酸の導入確認

少量の樹脂をサンプル瓶中の DMF に懸濁させ、1% ピクリルスルホン酸 DMF 溶液を 1 滴、10% *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン DMF 溶液を 1 滴加えた。室温で 5 分放置し、樹脂が赤色に呈色していないことを確認した。赤に呈色した場合、操作 4 をもう一度行った。

2-5 の操作を目的のアミノ酸配列となるまで繰り返した。その後、ペプチドの脱樹脂をクリーベージカクテルによって行った。

6. 脱樹脂、脱保護

氷浴中の 30 mL ナスフラスコに TFA 2.04 mL、チオアニソール 0.125 mL、H₂O 0.125 mL、EDT 0.0625 mL、TIPS 0.025 mL を混合した。そこに、アミノ酸導入済み樹脂を加え室温で 6 時間攪拌した。溶液を濾過し、溶媒留去した。これに *tert*-ブチルメチルエーテルを 15 mL 加え、遠心分離(2000 rpm, 10 min)により、ペプチドを沈殿させ、上澄み液を取り除いた。この操作を 3 回行った後、凍結乾燥により白色粉末を得た。Trit 基が脱保護されにくかったため、脱保護を再度行った。

理論収量: 22.3 mg 粗収量: 16.2 mg 粗収率: 76%

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: Dithranol, Mode: Linear positive

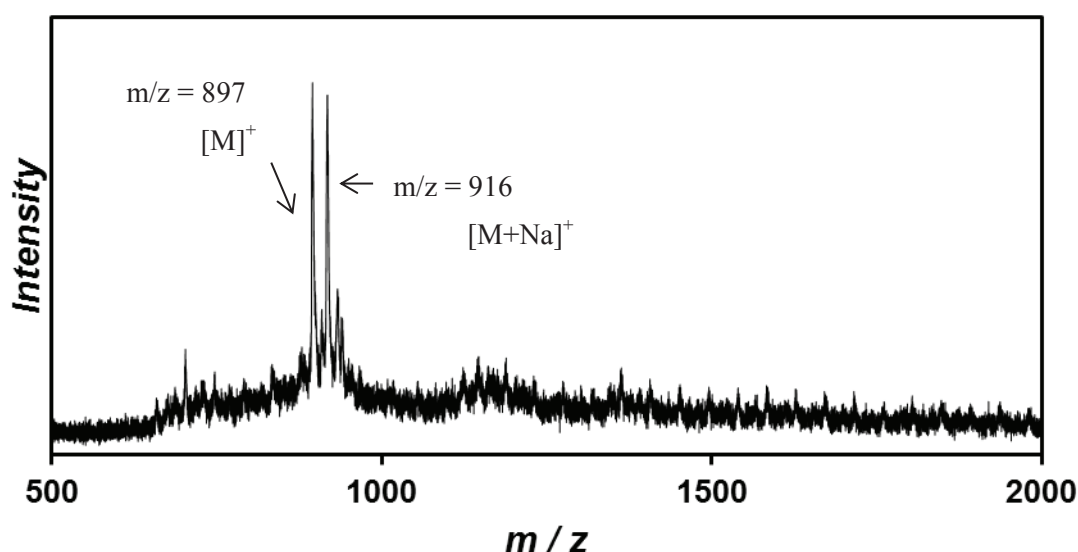


図 2-7. 粗ペプチドの MALDI-TOF-MS (matrix: Dithranol)

図 2-7 より、目的物のピークである $m/z = 897$ が確認された。目的物が確認できたため逆相 HPLC での精製を行った。

【分取条件】

試料: 0.1% TFA 入り水: DMF = 1: 1 混合液 2 mL に、粗ペプチドを 2 mg 溶かした溶液。

カラム: Inertsil WP300 C18 (5 μ m, 20 \times 250 mm)

試料注入量: 1.5 mL

移動相溶媒: 水 / CH₃CN (ともに 0.1 % TFA を含む)

移動相組成: 水 / CH₃CN: 99 / 1 \rightarrow 70 / 30 (100 min)、リニアグラジエント

検出: UV-vis 220 nm

流量: 10 mL/min

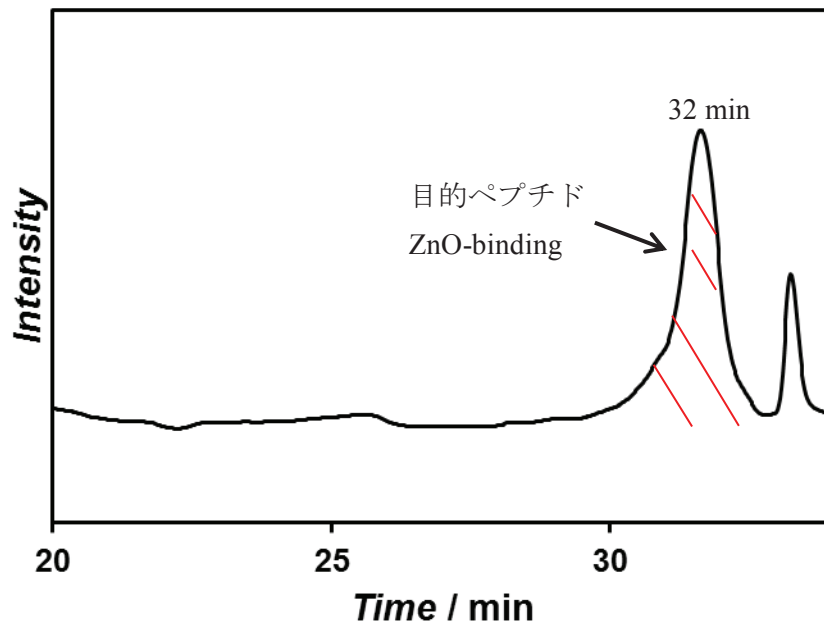


図 2-8. 分取時の HPLC チャート

図 2-8 の 32 分頃のピークを分取した。これを複数回繰り返した。得られた溶液を凍結乾燥し白色粉末を得た。

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: Dithranol, Mode: Linear positive

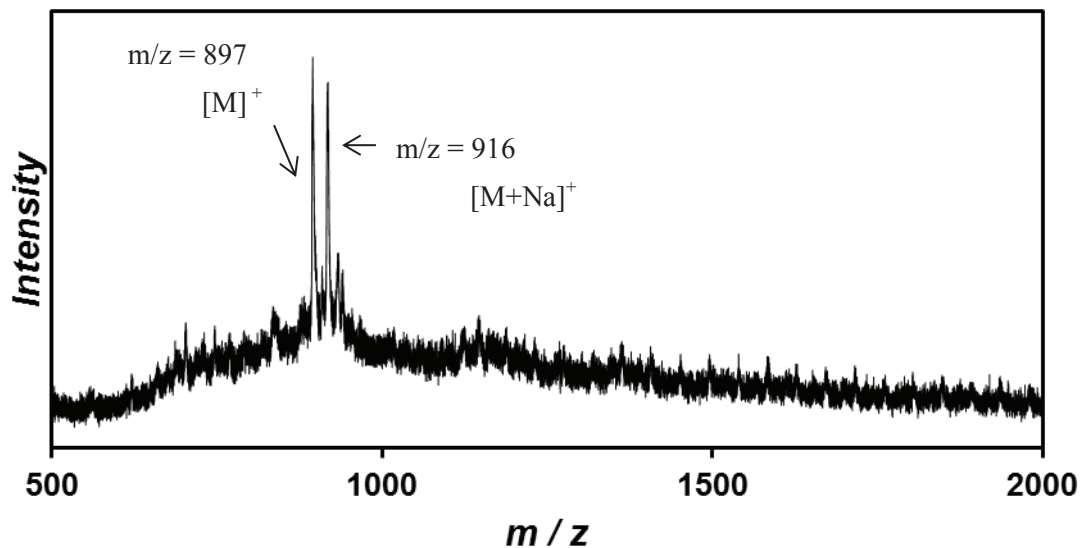


図 2-9. 精製後の ZnO-binding ペプチドの MALDI-TOF-MS(matrix: Dithranol)

理論収量: 22.3 mg 収量: 3.2 mg 収率: 14.3%

図 2-9 より、目的ペプチドのピーク $m/z = 897$ を確認した。また、それ以外のピークは matrix 由来のピークしか見られなかった。

2-2-2. ZnO-binding- β -annulus ペプチドの自己集合挙動

10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)中において ZnO-binding- β -annulus ペプチドがどのようなサイズの集合体を形成するのかを DLS 測定、TEM 観察によって評価した。

[実験操作]

ZnO-binding- β -annulus ペプチド 2 mg に 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)を 628 μ L 加え、1 mM ZnO-binding- β -annulus ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 溶液を調製した。それを希釈し、100 μ M ZnO-binding- β -annulus ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer を調製した。

【DLS 測定条件】

セル: ZEN2112 - Low volume glass cuvette (12 μ L)

温度: 25 $^{\circ}$ C

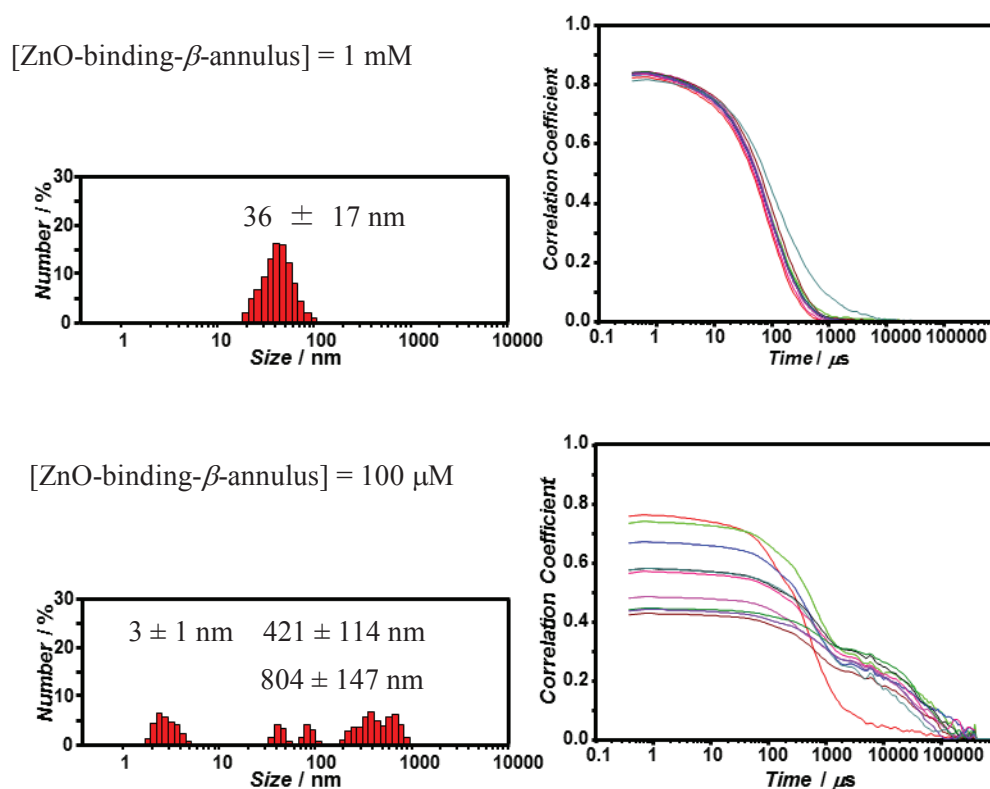


図 2-10. 各濃度における ZnO-binding- β -annulus ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 溶液の DLS 測定から得られた(左)個数換算分布、(右)自己相関関数

図 2-10 より、1 mM では人工ウイルスキャプシドと同程度の 50 nm の集合体が確認され、人工ウイルスキャプシド形成していると考えられる。一方、100 μ M では多分散の粒径分布が得られ、人工ウイルスキャプシドは形成していないと考えられる。

次に、TEM 観察により ZnO-binding- β -annulus ペプチド の 10 mM Tris-HCl buffer 中での形態を評価した。

【測定条件】

Grid: C-SMART Hydrophilic TEM grids, (ALLIANCE Biosystems)

加速電圧: 80 kV

染色: 2% $\text{Na}_3(\text{PW}_{12}\text{O}_{40}) \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 水溶液

[実験操作]

ZnO-binding- β -annulus ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 溶液を Grid 上に 5 μL 滴下した。1 分間静置した後、ろ紙で液滴をはじいた。次に、2% $\text{Na}_3(\text{PW}_{12}\text{O}_{40}) \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 水溶液を 5 μL 滴下した。1 分間静置した後、ろ紙で液滴をはじいた。その後、一晩減圧乾燥した。

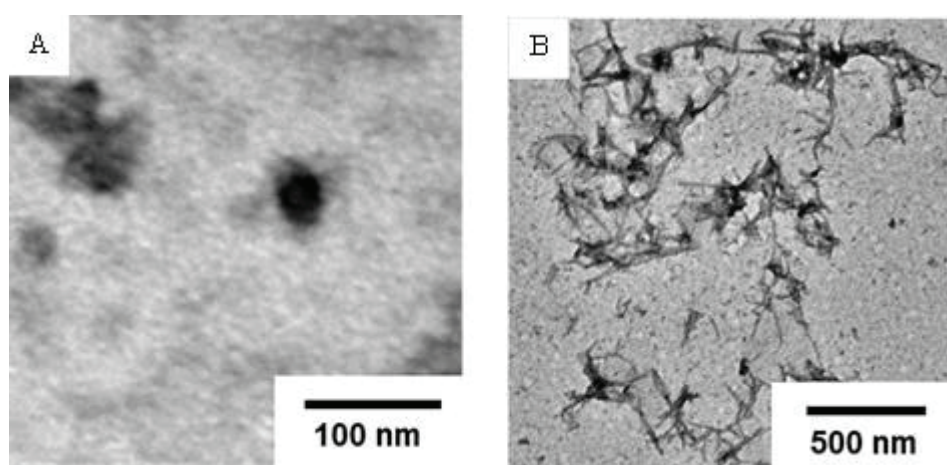


図 2-11. 各濃度の ZnO-binding- β -annulus ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 溶液から得られた TEM 像(A) [ZnO-binding- β -annulus] = 1 mM, (B) [ZnO-binding- β -annulus] = 100 μM

図 2-11 より、1 mM では 40 nm 程度の球状集合体が確認されたが、100 μM では繊維状集合体が形成していることが確認された。図 2-10 の DLS の結果と比較すると、個数換算分布で示された粒径とほぼ一致していると言える。これは、N 末端に HCVAHRGGG を導入したことにより、電荷の反発や立体障害といった要因で人工ウイルスキャプシドが形成しなかったのではないかと考えられる。

2-2-3. ZnO ナノ粒子の合成と特性評価

人工ウイルスキャプシドへ内包させる ZnO ナノ粒子を参考文献¹¹⁾の方法に従って合成した。また、合成した ZnO ナノ粒子の特性を UV-vis および蛍光スペクトル、DLS 測定、TEM 観察により評価した。

[実験操作]

0.1 M NH_3 水溶液 750 μL と 0.1 M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 750 μL を加えた。1 分間攪拌し、5 分間インキュベートした後、遠心分離(8000 rpm, 1 min)によって分離し、水で 2 回洗浄した。沈殿物を 0.05 mM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ エチレングリコール溶液 750 μL に分散させ、35°C で 1 時間加熱した。そこに、0.1 M NH_3 水溶液 750 μL を加え、遠心分離(8000 rpm, 1 min)を行い、沈殿物を回収した。水で 2 回洗浄後、減圧乾燥させた。

【UV-vis スペクトル】

[実験操作]

合成した ZnO ナノ粒子に 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)を加え、100 μM ZnO ナノ粒子 10 mM Tris-HCl buffer 分散液を調製した。

【UV-vis スペクトル測定条件】

| | | | |
|-------------|-------------------------------|-------|------------|
| 溶媒 | 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4) | 温度 | 25°C |
| セル光路長 | 1 mm | 測定範囲 | 200-800 nm |
| データ取込間隔 | 1 nm | レスポンス | Fast |
| UV/Vis バンド幅 | 1.5 nm | 走査速度 | 400 nm/min |

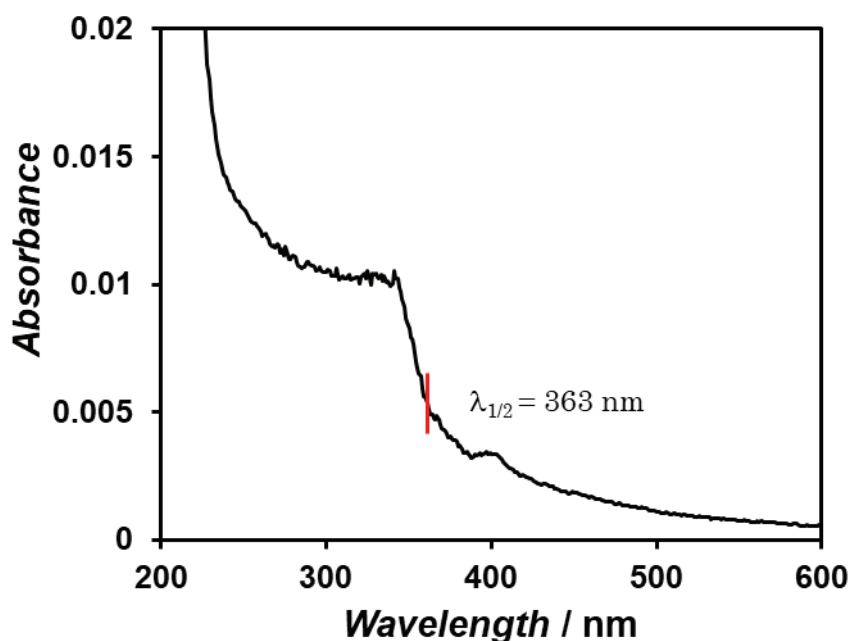


図 2-12. 100 μM ZnO ナノ粒子 10 mM Tris-HCl buffer 分散液の UV-vis スペクトル

図 2-12 より、340 nm に ZnO 由来の吸収が確認された。また、量子サイズ効果を示すナノ粒子に特徴的なスペクトルであるため、合成した ZnO ナノ粒子は量子サイズ効果を有すると考えられる。量子サイズ効果を示す ZnO ナノ粒子は以下の式でピークトップの半分の高さの時の吸収波長 $\lambda_{1/2}$ から粒径を算出できることが報告されている¹²⁾。

$$1240\lambda_{1/2} = 3.556 + 799.9/d^2 - 22.64/d$$

図2-12より $\lambda_{1/2} = 363 \text{ nm}$ であるため、上式より $d = 5.6 \text{ nm}$ であると算出された。

このことから、5.6 nm 程度の ZnO ナノ粒子が形成していると考えられる。しかしながら、390 nm 以上の波長のスペクトルは緩やかなカーブを描いており、算出された直径よりも大きな粒径の ZnO ナノ粒子も存在すると考えられる。

次に合成した ZnO ナノ粒子の 10 mM Tris-HCl buffer 中の粒径を DLS 測定により評価した。

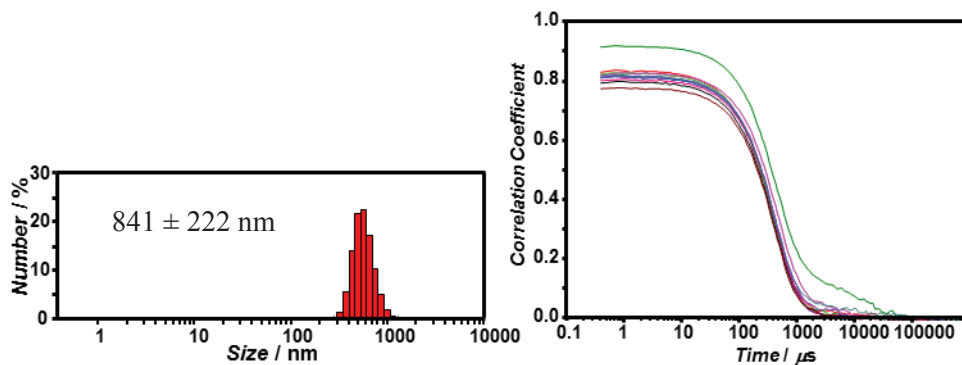


図2-13. 100 μM ZnO ナノ粒子 10 mM Tris-HCl buffer 分散液の DLS 測定から得られた(左)個数換算分布、(右)自己相関関数

100 μM ZnO ナノ粒子 10 mM Tris-HCl buffer 分散液の UV-vis スペクトルからは粒径が 5.6 nm 程度であると示唆されたが、DLS 測定から得られた個数換算分布(図 2-13 左)からは 800 nm 程度とかなり大きな粒径が確認された。これは、Tris-HCl buffer 中で ZnO ナノ粒子が凝集しているためであると考えられる。

また、合成した ZnO ナノ粒子の 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)中の粒径を TEM 観察により評価した。

[実験操作]

100 μM ZnO ナノ粒子 10 mM Tris-HCl buffer 分散液を Grid 上に 5 μL 滴下した。1 分間静置した後、ろ紙で液滴をはじいた。その後、一晚減圧乾燥した。

【測定条件】

Grid: C-SMART Hydrophilic TEM grids, (ALLIANCE Biosystems)

加速電圧: 80 kV

染色無し

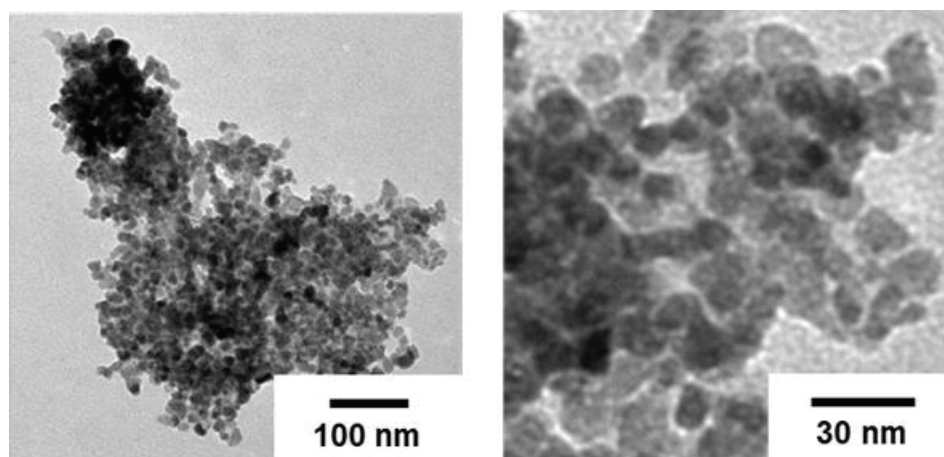


図 2-14. 100 μ M ZnO ナノ粒子 10 mM Tris-HCl buffer 分散液から得られた TEM 像

図 2-14 より、約 10 nm のナノ粒子が凝集し、500 nm 程度の凝集体の形成が確認された。これは、ZnO ナノ粒子が Tris-HCl buffer 中で不安定であり凝集してしまったためと考えられる。凝集体の大きさは図 2-13 の DLS の結果と一致していると言える。TEM 観察された ZnO ナノ粒子の粒径(約 10 nm)は UV-vis スペクトルで算出された粒径(5.6 nm)よりも大きなものであった。これは、UV-vis スペクトルの 390 nm 以上の波長のスペクトルは緩やかなカーブ描いていたため、正確な粒径が算出されなかったためではないかと考えられる。

2-2-4. ZnO-binding- β -annulus ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドへの ZnO ナノ粒子の内包

合成した ZnO ナノ粒子分散液を乾燥させたペプチドと混合させることにより、人工ウイルスキャプシドへの ZnO ナノ粒子の内包を検討した。また、コントロール実験として β -annulus 24 ペプチド、ZnO-binding ペプチドでも同様の実験を行った。それぞれの複合体の UV-vis、蛍光スペクトル、DLS 測定、TEM 観察により評価を行った。

[実験操作]

100 μ M ZnO ナノ粒子 Tris-HCl buffer 分散液を 20 μ L 取り、凍結乾燥させたペプチドに終濃度 100 μ M となるように加えた。それを 10 分間静置した。

【UV-vis スペクトル】

【UV-vis スペクトル測定条件】

| | | | |
|-------------|--------------------------------|-------|------------|
| 溶媒 | 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) | 温度 | 25°C |
| セル光路長 | 1 mm | 測定範囲 | 200-700 nm |
| データ取込間隔 | 1 nm | レスポンス | Fast |
| UV/Vis バンド幅 | 1.5 nm | 走査速度 | 400 nm/min |

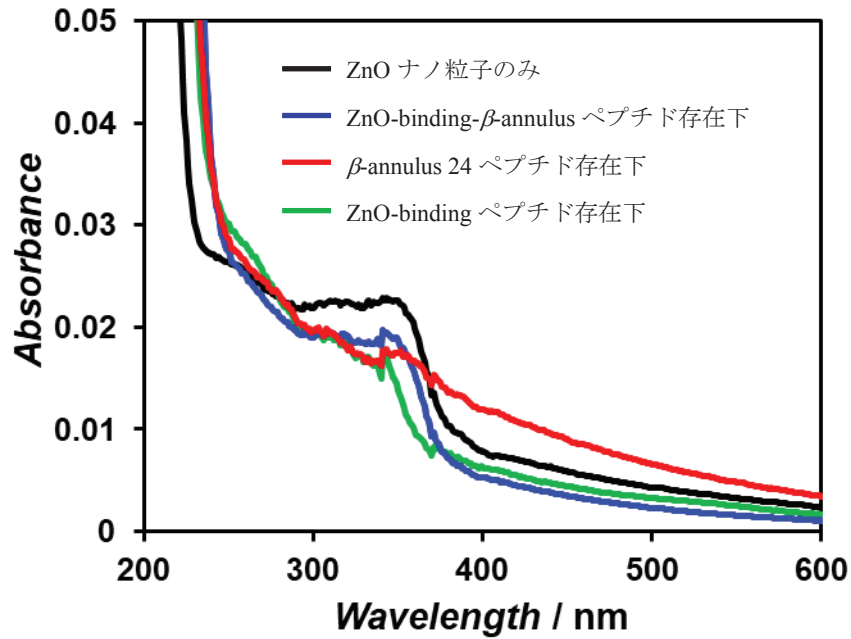


図 2-15. ZnO ナノ粒子と各ペプチドの混合液の UV-vis スペクトル
 (黒) [ZnO] = 100 μ M, (青) [ZnO] = 100 μ M, [ZnO-binding- β -annulus] =
 100 μ M, (赤) [ZnO] = 100 μ M, [β -annulus 24] = 100 μ M, (緑) [ZnO] =
 100 μ M, [ZnO-binding] = 100 μ M

図 2-15 より、ZnO-binding- β -annulus ペプチド、ZnO-binding ペプチドと混ぜた場合は、スペクトルはほとんど変化しなかった。しかし、 β -annulus 24 ペプチドと混合した場合は、UV-vis スペクトルのバンド端が上昇した。これは、 β -annulus 24 ペプチドにより凝集がさらに促進したためではないかと考えられる。

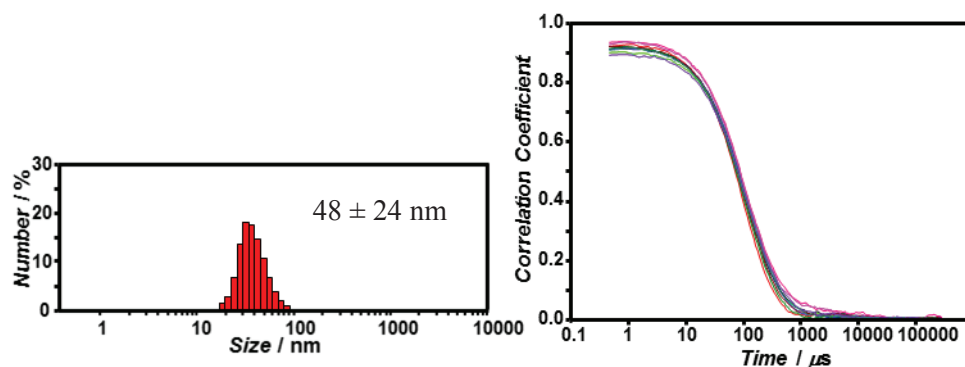
ZnO ナノ粒子と各ペプチドの混合液中に存在する集合体の粒径を DLS 測定により評価した。

【DLS 測定条件】

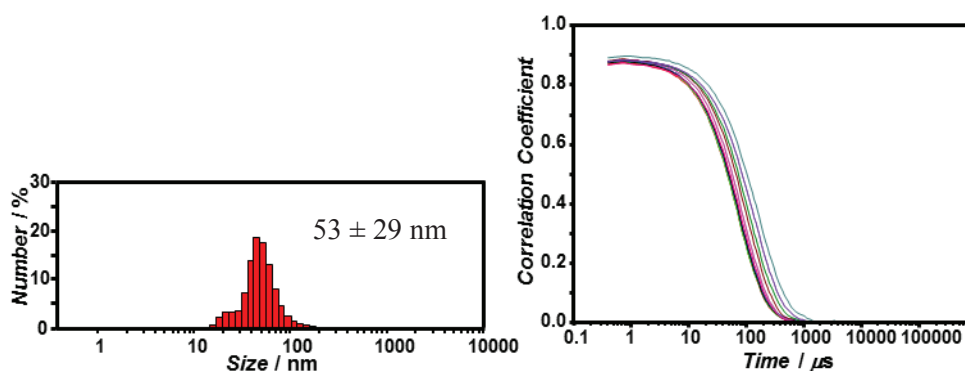
セル: ZEN2112 - Low volume glass cuvette (12 μ L)

温度: 25°C

[ZnO] = 100 μ M, [ZnO-binding- β -annulus] = 100 μ M



[ZnO] = 100 μ M, [β -annulus 24] = 100 μ M



[ZnO] = 100 μ M, [ZnO-binding] = 100 μ M

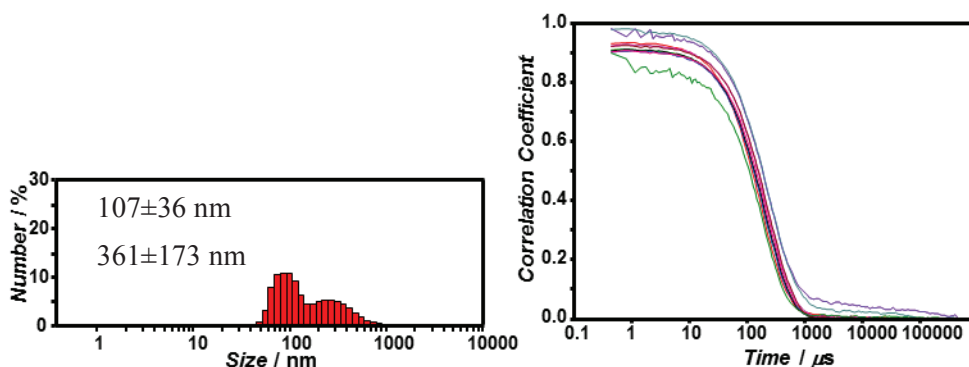


図 2-16. ZnO ナノ粒子と各ペプチドの混合液の DLS 測定から得られた
(左)個数換算分布、(右)自己相関関数

図 2-16 より、ZnO-binding- β -annulus ペプチド、 β -annulus 24 ペプチドとの混合液からは、人工ウイルスキャプシドと同程度の粒径が確認された。これは、ZnO ナノ粒子と混合しても人工ウイルスキャプシドが形成しているからだと考えられる。このことから、人工ウイルスキャプシドへの ZnO ナノ粒子の内包が示唆された。対して、ZnO-binding ペプチドと ZnO ナノ粒子を混合した場合、ZnO ナノ粒子のみよりも小さな粒径が確認された。これは、ZnO-binding ペプチドが ZnO ナノ粒子を分散させるからではないかと考えられる。

ZnO ナノ粒子と各ペプチドの混合液がどのような集合体を形成しているのかを TEM 観察によって評価した。

【測定条件】

Grid: C-SMART Hydrophilic TEM grids, (ALLIANCE Biosystems)

加速電圧: 80 kV

染色無し

[実験操作]

各ペプチドと ZnO ナノ粒子 10 mM Tris-HCl buffer 混合液を TEM グリッドに 5 μ L 滴下し、液滴を 1 分間保持した後はじいた。その後一晩、減圧乾燥させた。

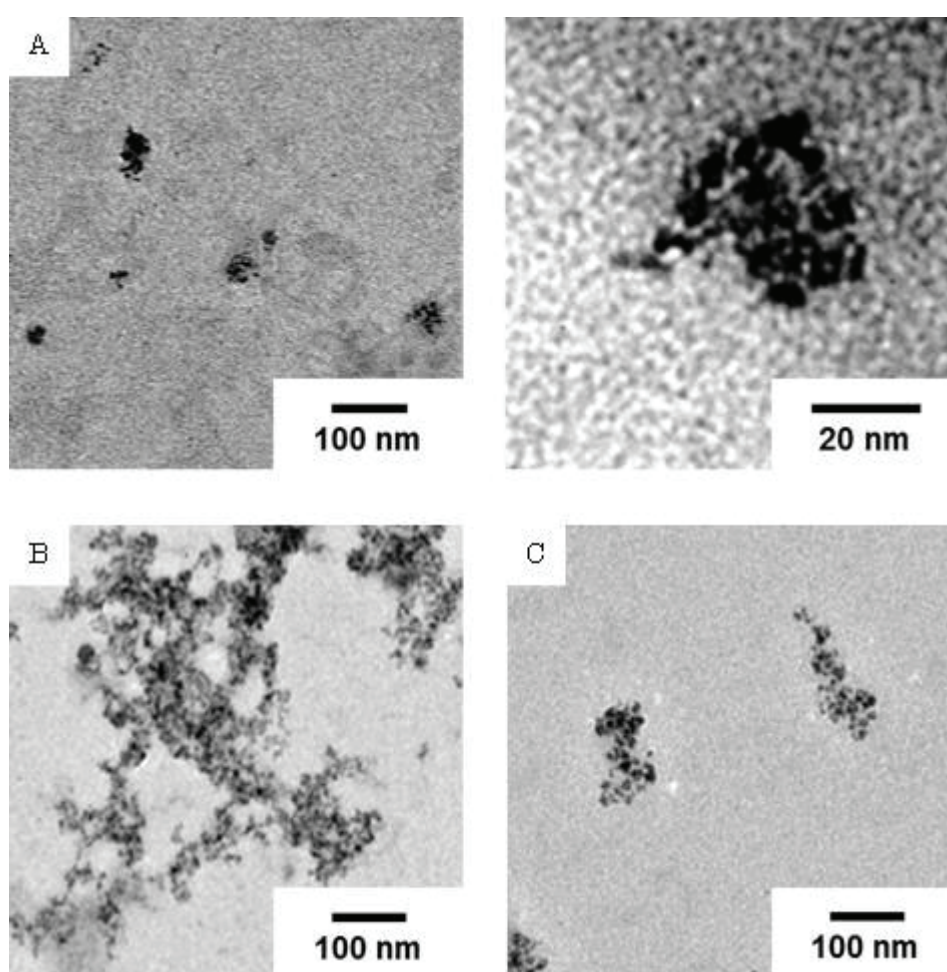


図 2-17. 各ペプチドと ZnO ナノ粒子 10 mM Tris-HCl buffer 混合液から得られた TEM 像 (A) $[ZnO] = 100 \mu M$, $[ZnO\text{-binding-}\beta\text{-annulus}] = 100 \mu M$, (B) $[ZnO] = 100 \mu M$, $[\beta\text{-annulus 24}] = 100 \mu M$, (C) $[ZnO] = 100 \mu M$, $[ZnO\text{-binding}] = 100 \mu M$

図 2-14 より ZnO ナノ粒子のみでは 800 nm 程度の大きな凝集体が形成していたが、図 2-17A より ZnO ナノ粒子と ZnO-binding- β -annulus ペプチドの混合液からは ZnO ナノ粒子が複数集合し、人工ウイルスキャプシドと同程度の大きさである 50 nm 程度の凝集体が確認された。図 2-16 の DLS の結果と比較すると、個数換算分布で示された粒径とはほぼ一致していると言える。これは、ZnO ナノ粒子が人工ウイルスキャプシドに内包されたためであると考えられる。対して、 β -annulus 24 ペプチド(図 2-17B)、ZnO-binding ペプチド(図 2-17C)と混合させた場合では、不定形の ZnO ナノ粒子凝集体しか確認されなかった。

蛍光スペクトルにより ZnO ナノ粒子、ペプチド混合溶液蛍光特性を評価した。

【蛍光スペクトル測定条件】

| | | | |
|---------|--------------------------------|---------|---------------|
| 溶媒 | 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) | 温度 | 25°C |
| セル光路長 | 1 mm | 測定範囲 | 380 nm-640 nm |
| 励起波長 | 340 nm | データ取込間隔 | 0.5 nm |
| 励起側バンド幅 | 5 nm | 蛍光側バンド幅 | 10 nm |
| レスポンス | 1 sec | 感度 | Medium |
| 走査速度 | 50 nm/min | 光源 | Xe |

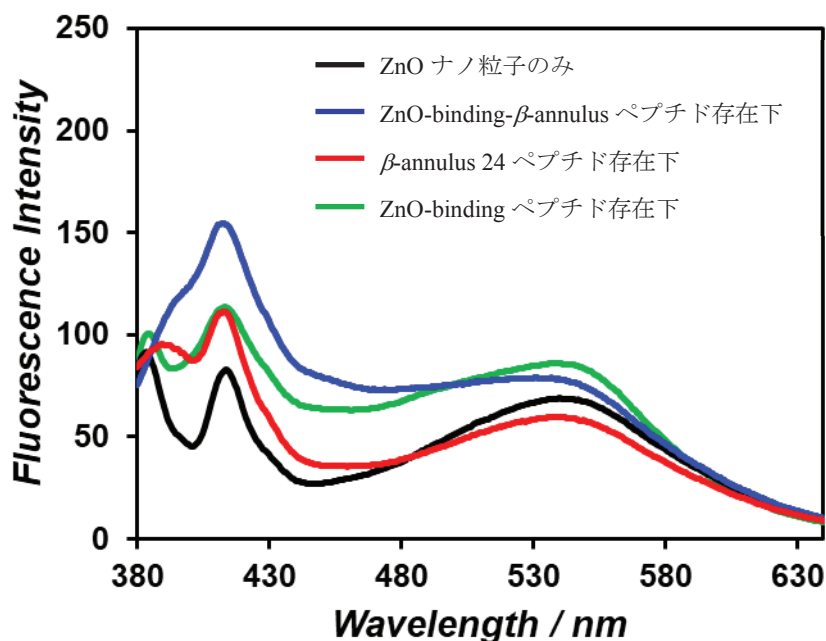


図 2-18. ZnO ナノ粒子と各ペプチドの混合液の蛍光スペクトル

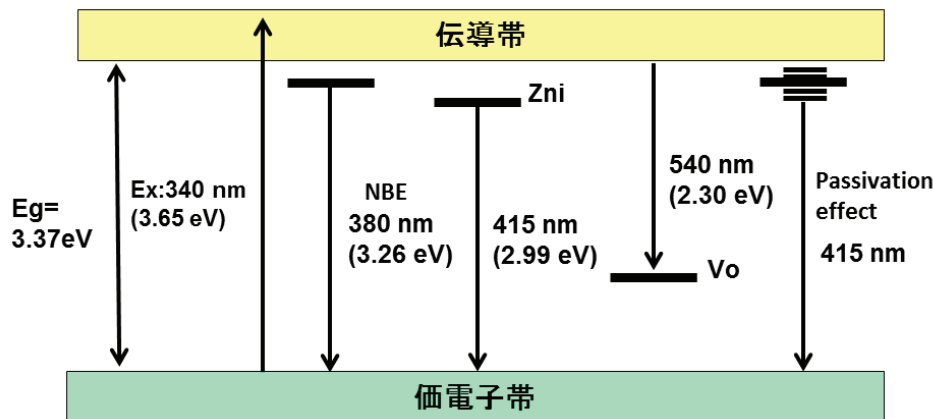


図 2-19. ZnO ナノ粒子の欠陥とそれに由来する蛍光発光

図 2-18 より、ZnO ナノ粒子分散液の蛍光スペクトルは、380 nm, 415 nm, 540 nm にピークを示した。図 2-19 より、380 nm はバンド端発光(NBE)、415 nm は格子間亜鉛欠陥¹³⁾、540 nm は酸素空孔欠陥¹⁴⁾に由来すると考えられる。ZnO ナノ粒子と ZnO-binding- β -annulus ペプチドの混合液の蛍光スペクトルでは、ZnO ナノ粒子のみのスペクトルと比較して 410 nm の蛍光が増大しているところがあった。過去に ZnO にポリアニリンを混合することで紫外線領域の蛍光が増大したことが報告されており、これは、electronic passivation 効果によるものであると説明されていた¹⁵⁾。よって、これは ZnO-binding β -annulus ペプチドと ZnO ナノ粒子間の相互作用により、新しいエネルギー準位が生じ、バンド端発光していた励起子がそこへトラップされることにより、長波長の蛍光を示したと考えられる。一方、 β -annulus 24, ZnO-binding ペプチドでも 410 nm 程度の紫外線発光が増大したが、増大量が少ないことから相互作用が弱いと考えられる。これらのことから、ZnO ナノ粒子の ZnO-binding- β -annulus ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドへの内包が示唆された。

2-2-5. ZnO-binding- β -annulus ペプチド存在下で合成した ZnO 粒子の特性評価

次に、ZnO-binding- β -annulus ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドをテンプレートした ZnO 合成を検討した。また、コントロール実験として β -annulus 24 ペプチド、ZnO-binding ペプチド、テンプレートなしでも同様の実験を行った。それらの複合体の DLS 測定、TEM 観察、UV-vis スペクトルにより評価を行った。

[実験操作]

1 mM ペプチド水溶液 750 μ L をエッペンドルフチューブに加えて、減圧乾燥した。別のエッペンドルフチューブに 0.1 M NH_3 水溶液 750 μ L と 0.1 M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 750 μ L を加えた。1 分間攪拌し、5 分間インキュベートした後、遠心分離(10000 rpm, 1 min)によって分離し、水で 2 回洗浄した。沈殿物を 0.05 mM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 7.5 mL に分散させ、ペプチド粉末にこれを 20 μ L 加えた。それを、35°C で 1 時間加熱した後、遠心分離(10000 rpm, 1 min)により沈殿物を回収した。水で 2 回洗浄後、減圧乾燥させた。

ペプチド存在下で合成した ZnO 粒子の粒径を DLS 測定によって評価した。

[実験操作]

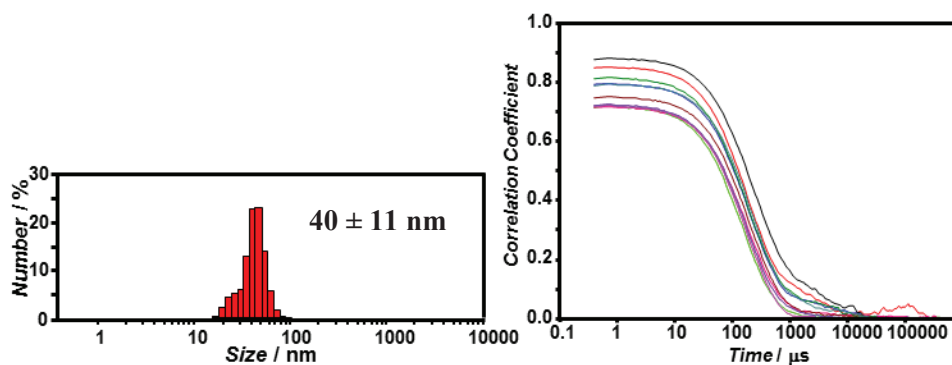
沈殿物を 200 μL の水に分散させた。

【DLS 測定条件】

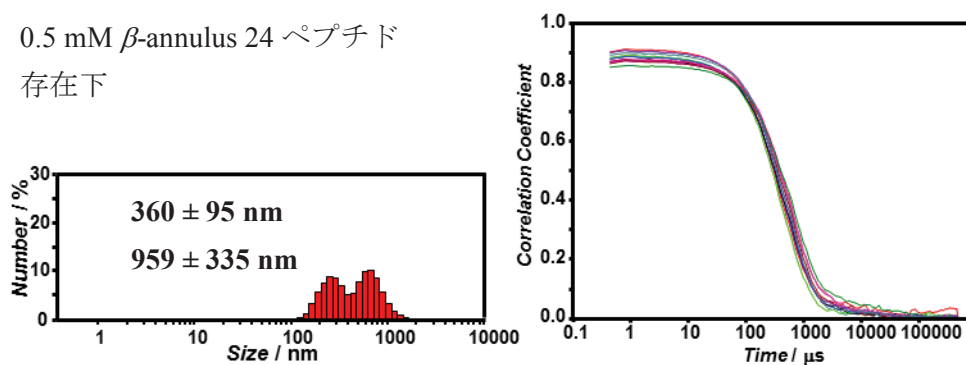
セル: ZEN2112 - Low volume glass cuvette (12 μL)

温度: 25°C

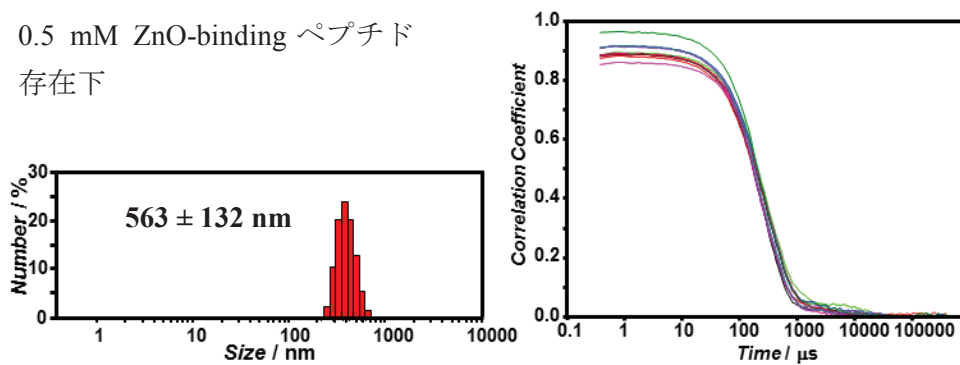
0.5 mM ZnO-binding- β -annulus ペプチド存在下



0.5 mM β -annulus 24 ペプチド
存在下



0.5 mM ZnO-binding ペプチド
存在下



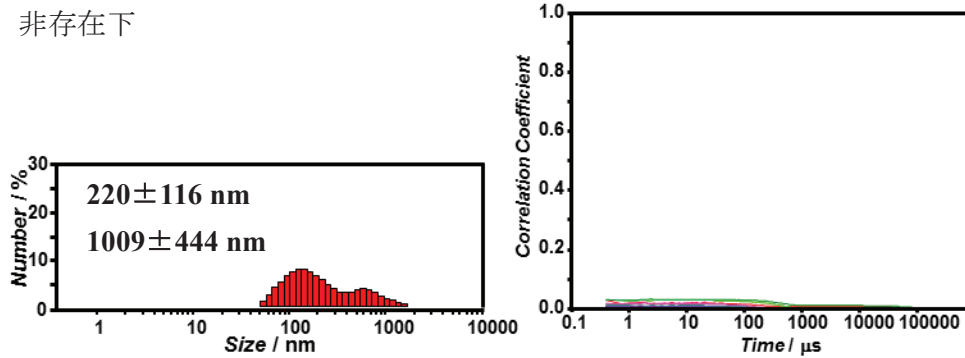


図 2-20. 各ペプチド存在下で合成した ZnO 分散液の DLS 測定から得られた (左)個数換算分布、(右)自己相関関数

図 2-20 より、ZnO-binding- β -annulus ペプチド存在下では、人工ウイルスキャプシドと同程度の 50 nm 程度という粒径が得られた。これは、ZnO が人工ウイルスキャプシドをテンプレートして合成されたからではないかと考えられる。一方、 β -annulus 24 ペプチドや ZnO-binding ペプチド存在下、またペプチドを添加しなかった場合には、大きな粒径しか得られなかった。

DLS 測定より得られた 50 nm 程度の粒径が ZnO 由来なのか確認するために無染色での TEM 観察を行った。

【TEM 観察条件】

Grid: C-SMART Hydrophilic TEM grids, (ALLIANCE Biosystems)

加速電圧: 80 kV

染色無し

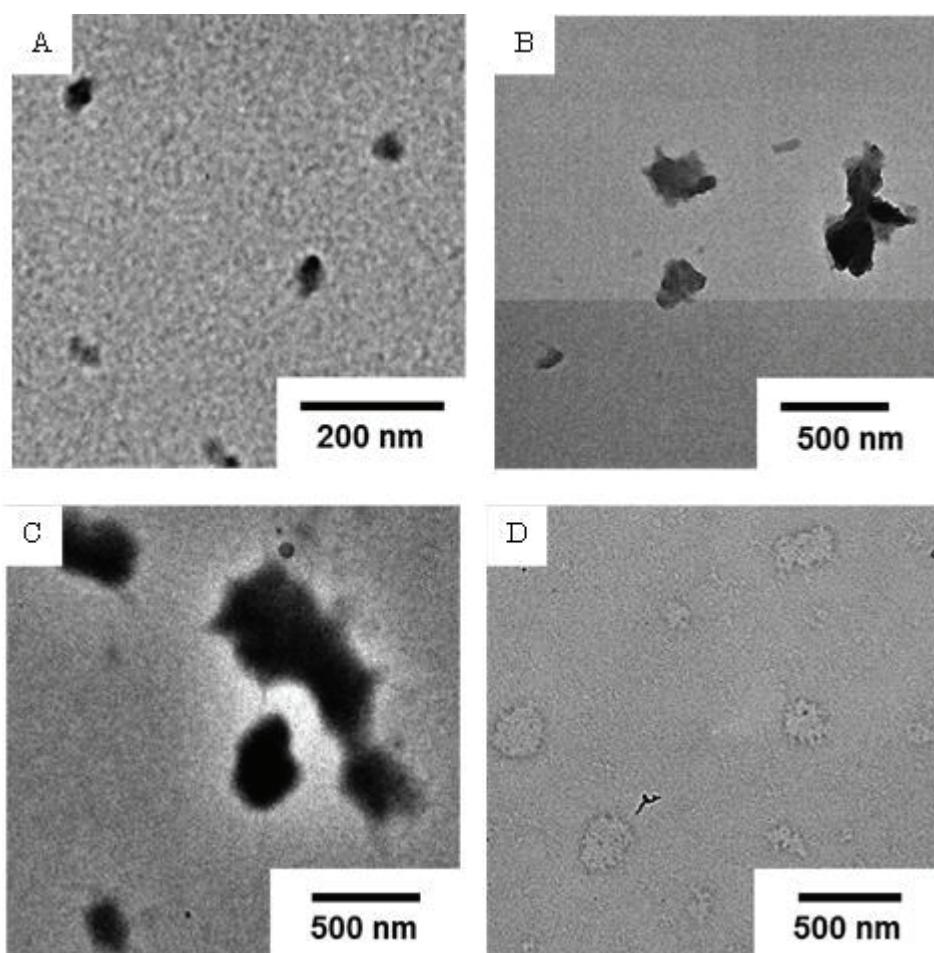


図 2-21. 各ペプチド存在下で合成した ZnO 分散液から得られた TEM 像
 (A) 0.5 mM ZnO-binding- β -annulus ペプチド存在下 (B) 0.5 mM β -annulus 24 ペプチド存在下 (C) 0.5 mM ZnO-binding ペプチド存在下 (D) 非存在下

図 2-21 より、ZnO-binding- β -annulus ペプチド存在下で合成した ZnO からは、人工ウイルスキャプシドと同程度の 50 nm 程度集合体が観測された。これは、ZnO が人工ウイルスキャプシドをテンプレートとして合成されたからではないかと考えられる。一方、 β -annulus 24 ペプチドや ZnO-binding ペプチド存在下、また ZnO-binding- β -annulus ペプチドを添加しなかった場合には、大きな不定形の集合体しか観察されなかった。

UV-vis スペクトルにより ZnO-binding- β -annulus ペプチド存在下で合成した ZnO が量子サイズ効果を示すのか評価した。

【UV-vis スペクトル】

【UV-vis スペクトル測定条件】

| | | | |
|-------------|--------------------------------|-------|------------|
| 溶媒 | 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) | 温度 | 25°C |
| セル光路長 | 1 mm | 測定範囲 | 200-600 nm |
| データ取込間隔 | 1 nm | レスポンス | Fast |
| UV/Vis バンド幅 | 1.5 nm | 走査速度 | 400 nm/min |

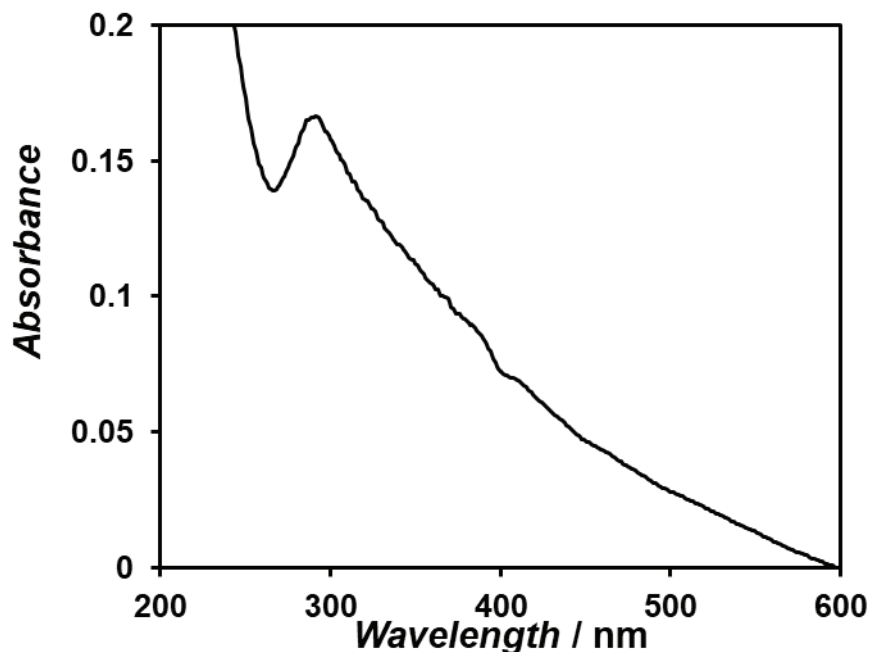


図 2- 22. 0.5 mM ZnO-binding- β -annulus ペプチド存在下で合成した ZnO 分散液から得られた UV-vis スペクトル

図 2-22 より、量子サイズ効果に特徴的な形をしておらず、バルク体の ZnO が形成されていると考えられる。

2-2-6. まとめ¹⁶⁾

Fmoc 固相合成により、 β -annulus 24 ペプチドの N 末端に Gly リンカーを介して ZnO 結合ペプチド HCVAHR を付加した ZnO-binding β -annulus ペプチド(HCVAHRGGGINHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS)を合成した。

ZnO-binding β -annulus ペプチド単独では、100 μ M において人工ウイルスキャプシドを形成しなかったのに対し、ZnO ナノ粒子との複合体では 50 nm 程度の集合体を形成していることが DLS 測定より確認された。また、TEM 観察より、10 nm 程度の ZnO ナノ粒子が複数集合し、50 nm 程度の凝集体を形成していることが確認された。ZnO-binding β -annulus ペプチドと ZnO ナノ粒子混合液の蛍光スペクトルは、ZnO ナノ粒子のみのスペクトルとは異なったため、ZnO ナノ粒子の表面状態の変化が示唆された。これらのことから、ZnO ナノ粒子を内包した人工ウイルスキャプシドが構築されたと考えられる。

ZnO-binding β -annulus ペプチド存在下で ZnO 合成すると、人工ウイルスキャプシドと同程度の粒径の ZnO が形成しテンプレート合成に成功した。

2-3. β -annulus 24 ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドへの CdTe ナノ粒子の内包挙動の解析

近年、蛍光相関分光法(FCS)を用いて分子集合体への蛍光性分子の内包挙動の解析が行われている。FCS とは、fL 程度の極微小な観察領域の中を出入りする蛍光分子の蛍光強度を測定し、分子の大きさ、数といった情報を得ることができる手法である。例えば、Durst らは量子ドットのリポソームへの内包挙動を FCS により解析している¹⁷⁾。また、Gelbart らは cowpea chlorotic mottle virus(CCMV)への蛍光ラベルした 500 塩基の RNA の内包挙動を FCS により解析している¹⁸⁾。

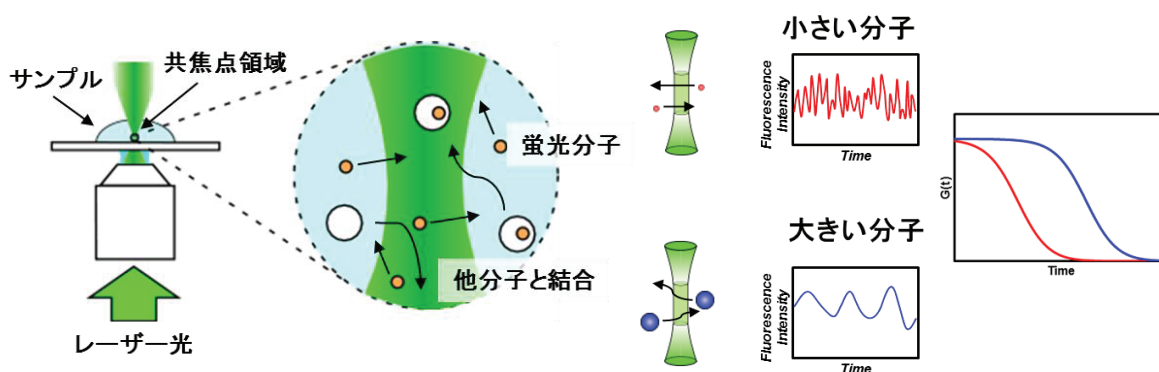


図 2-23. 蛍光相関分光法の原理

一方、当研究室では、人工ウイルスキャプシドへの DNA、GFP、色素などの内包を報告してきた¹⁹⁾。しかしながら、これらは透析後の定量や、TEM 観察によって内包を確認しており、内包挙動を水溶液中でその場解析することはできていない。本研究では、極微小の観察領域(fL)を出入りする蛍光分子のブラウン運動の自己相関関数から分子の大きさと数を求めることができる蛍光相関分光法(FCS)を用いて、表面電荷がアニオン性である蛍光性 CdTe ナノ粒子の人工ウイルスキャプシドへの内包挙動をその場解析した。1-5 で述べたように、 β -annulus 24 ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドの内部は、カチオン性であることが示唆されているので、アニオン性蛍光性ナノ粒子は静電相互作用により内包されると思われる。

2-3-1. 人工ウイルスキャプシドへの CdTe ナノ粒子の内包

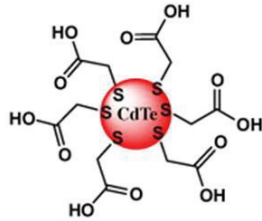
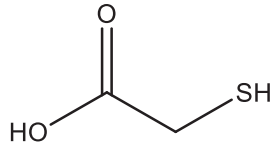
CdTe ナノ粒子と β -annulus 24 ペプチド(INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS)の粉末を混合し、蛍光スペクトル、FCS、TEM 観察によって内包挙動を評価した。

【試薬】

CdTe core-type quantum dots (COOH functionalized, fluorescence λ_{em} 570 nm, powder) 【Sigma Aldrich】

保護剤

Thioglycolic acid (TGA)



本研究で用いた CdTe ナノ粒子は表面が TGA により保護されているため水溶性である。また、表面に COOH 基を有するため中性条件下ではアニオン性に荷電していると考えられる。量子ドットは吸収波長より短波長側の波長であれば、蛍光を発すると言われており、FCS のランプの波長である 473 nm より、吸収が長波長側にあるものを使用した。

[実験操作]

乾燥させたペプチドに 0.1 μ M CdTe ナノ粒子 10 mM Tris-HCl buffer 分散液を、 $[\beta\text{-annulus 24}] = 500, 200, 100, 50, 25, 10, 5 \mu$ Mになるように加え、1 時間室温でインキュベートした。

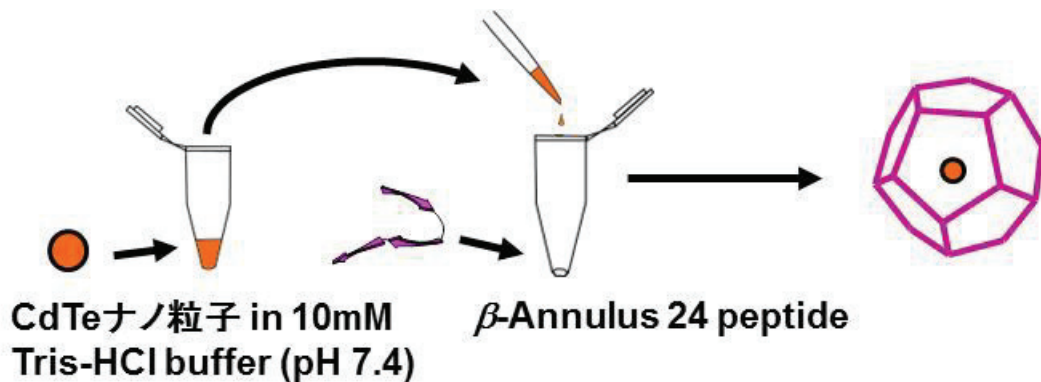


図 2-24. CdTe ナノ粒子を内包した人工ウイルスキャプシドの調製

2-3-2. 蛍光相関分光法(FCS)による解析

まず、標準サンプルとして Alexa 488 水溶液の FCS 測定を行った。

【FCS 測定条件】

カバーガラスの位置: 1.80 mm

X 軸: 6.89 mm Y 軸: 5.37 mm Z 軸: 5.00 mm

Period of single Measurement: 3 秒

Looptime: 20 回

励起光量(ch1 : pos2, ch2 : pos1, ch3 : pos1): 15 μ W

Fitting 演算領域(Triplet): 0.001 ms -1 ms

溶媒: 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)

フィッティングには下記の 1 成分の式を用いた。

$$G(t) = 1 + \frac{1}{N} \times \frac{y_1}{\left(1 + \frac{t}{\tau_1}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{k^2} \cdot \frac{t}{\tau_1}}} \times \left(\frac{1 + F \exp\left(\frac{t}{\tau_{trip}}\right)}{1 - F} \right)$$

t: 相関時間, τ_1 : 1 成分目の拡散時間, N: 観察領域内の平均分子数, k: 構造定数(本実験に用いた装置では 5), y_1 : 存在割合, F: triplet 成分の存在割合

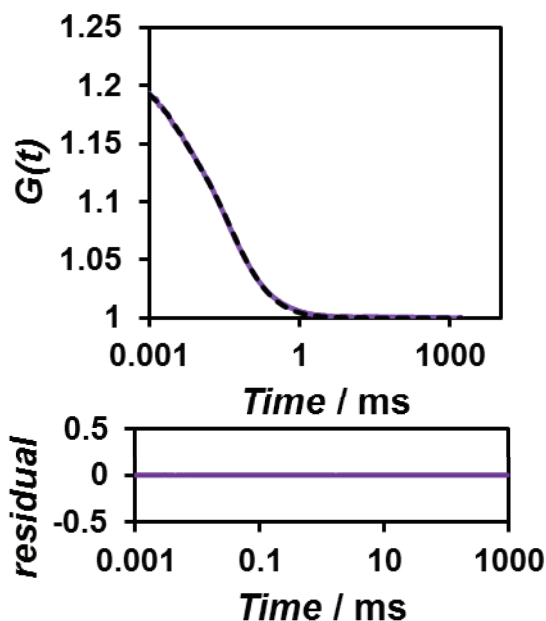


図 2-25. 1 成分の式で Fitting を行った Alexa 488 水溶液の FCS 測定結果

表 2-1. Alexa 488 水溶液の FCS から得られた分子数と拡散時間

| [Alexa 488] / μM | 分子数 | 拡散時間 / ms |
|-----------------------------|-----|-----------|
| 0 | 6.2 | 0.0405 |

図 2-25 に、1 成分の式で Fitting を行った Alexa 488 水溶液の FCS 測定結果を示す。表 2-1 に Alexa 488 水溶液の FCS から得られた分子数と拡散時間を示す。

次に、 β -annulus 24 ペプチドと CdTe ナノ粒子混合液の FCS 測定を行い、CdTe ナノ粒子の人工ウイルスキャプシドへの内包挙動を解析した。まず、1 成分の式でのフィッティングを行った。

【FCS 測定条件】

カバーガラスの位置: 1.80 mm

X 軸: 6.89 mm Y 軸: 5.37 mm Z 軸: 5.00 mm

Period of single Measurement: 3 秒

Looptime: 20 回

励起光量(ch1 : pos2, ch2 : pos1, ch3 : pos1): 15 μW

Fitting 演算領域(Triplet): 0.001 ms -1 ms

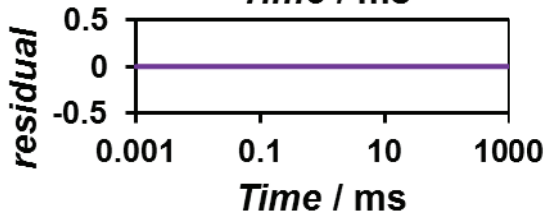
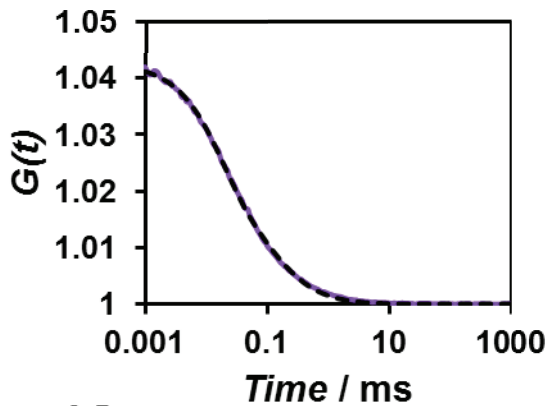
溶媒: 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)

フィッティングには下記の式を用いた²⁰⁾。

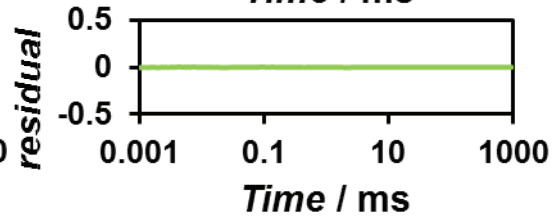
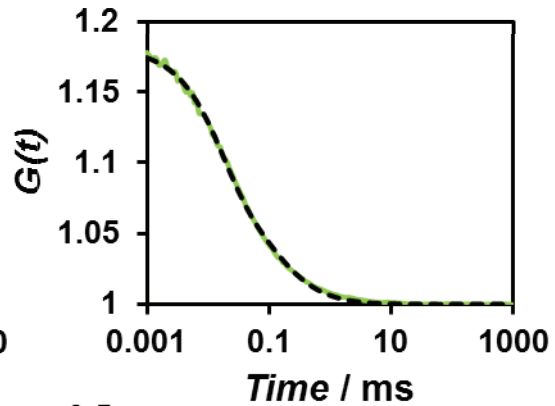
$$G(t) = 1 + \frac{1}{N} \times \frac{y_1}{\left(1 + \frac{t}{\tau_1}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{k^2} \cdot \frac{t}{\tau_1}}} \times \left(\frac{1 + F \exp\left(\frac{t}{\tau_{trip}}\right)}{1 - F} \right)$$

t: 相関時間, τ_1 : 1成分目の拡散時間, N: 観察領域内の平均分子数, k: 構造定数(本実験に用いた装置では 5), y_1 : 存在割合, F: triplet 成分の存在割合

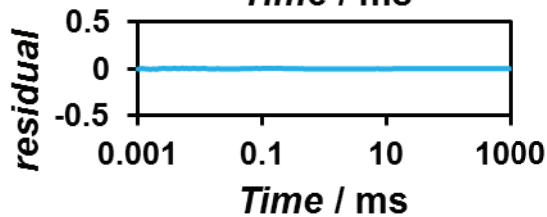
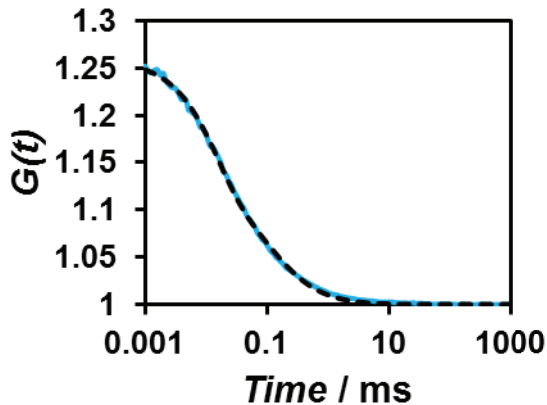
[CdTe NPs] = 0.1 μ M



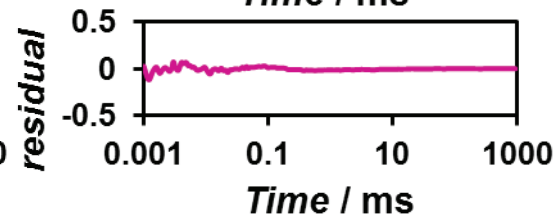
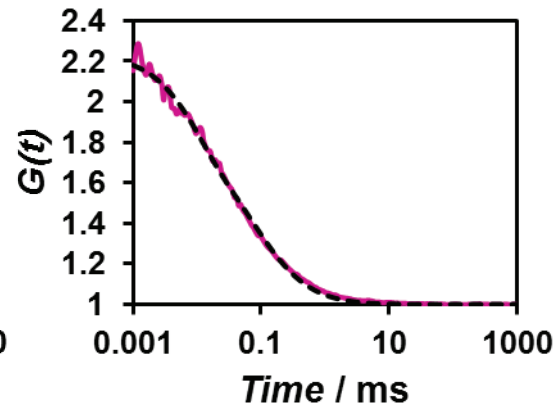
[CdTe NPs] = 0.1 μ M, [β -annulus 24] = 5 μ M



[CdTe NPs] = 0.1 μ M, [β -annulus 24] = 10 μ M

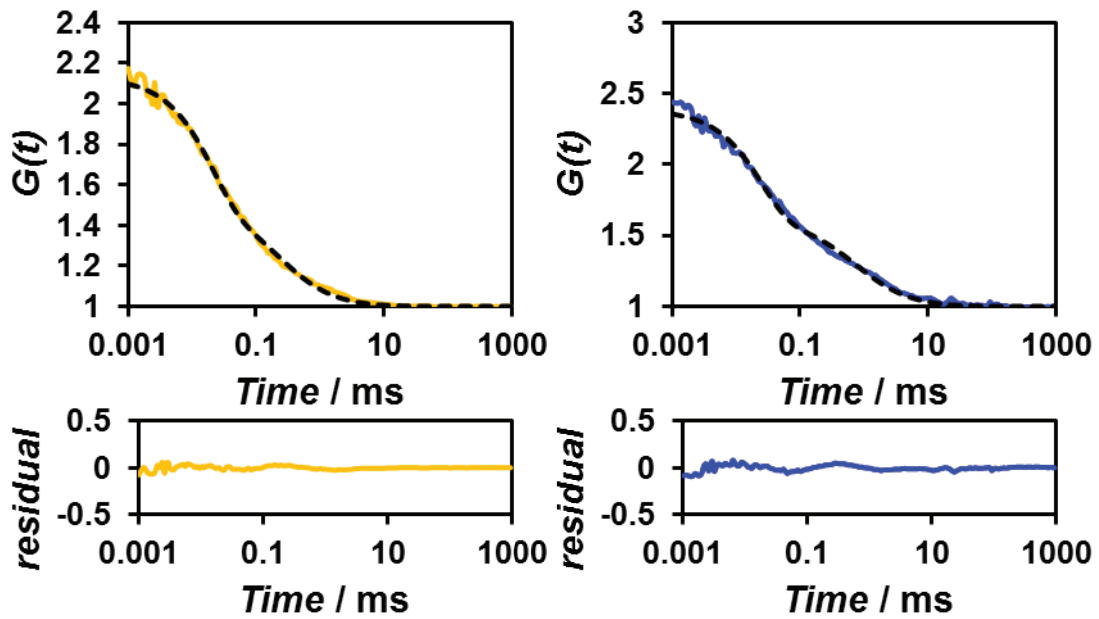


[CdTe NPs] = 0.1 μ M, [β -annulus 24] = 25 μ M



[CdTe NPs] = 0.1 μ M, [β -annulus 24] = 50 μ M

[CdTe NPs] = 0.1 μ M, [β -annulus 24] = 100 μ M



[CdTe NPs] = 0.1 μ M, [β -annulus 24] = 200 μ M

[CdTe NPs] = 0.1 μ M, [β -annulus 24] = 500 μ M

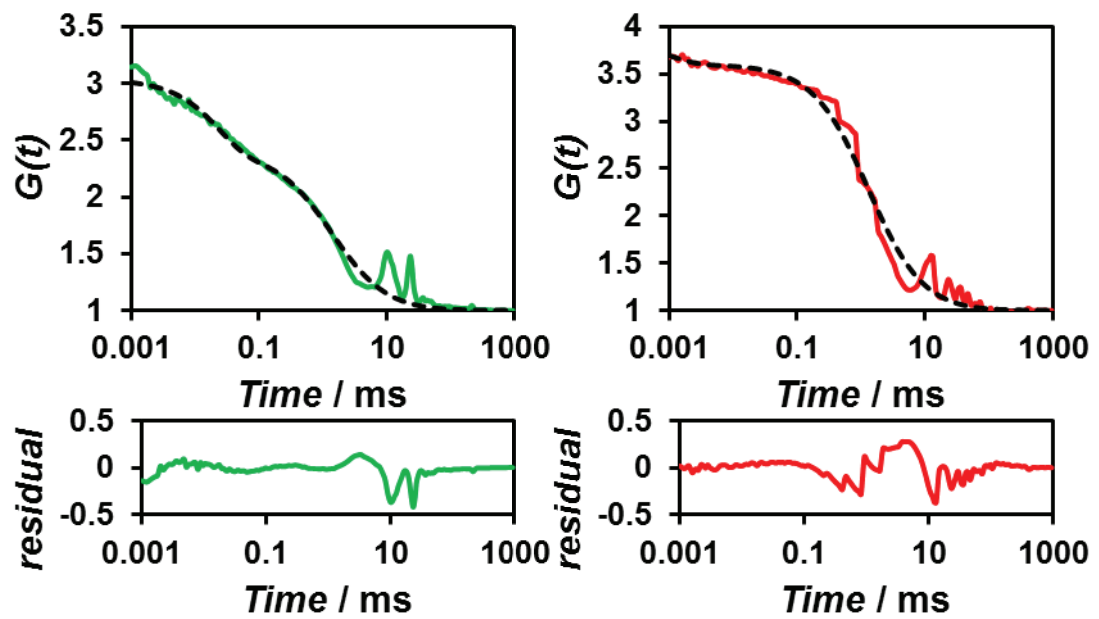


図 2-26. 1 成分の式で Fitting を行った各ペプチド濃度の混合液の FCS 測定結果

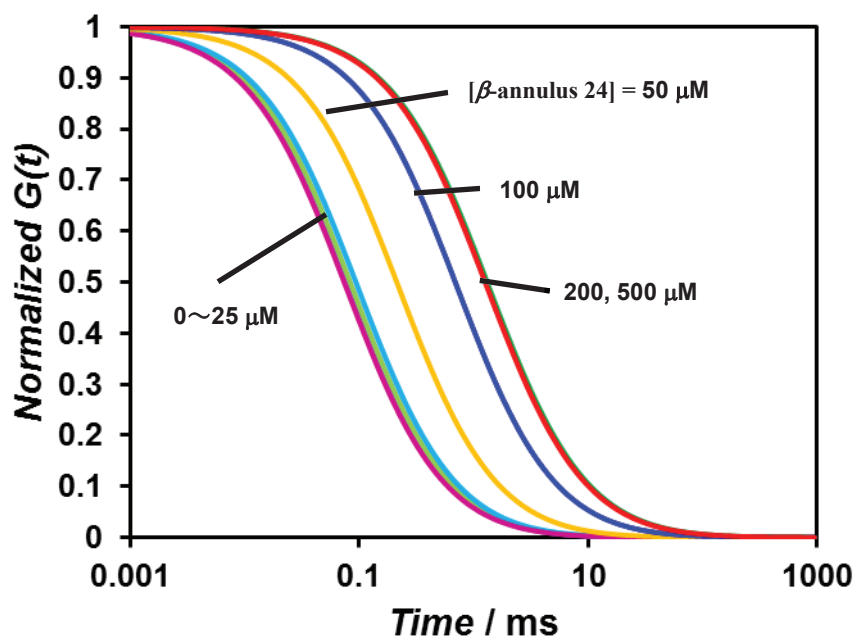


図 2-27. 1 成分の式で Fitting を行った時の規格化後の FCS 測定結果

表 2-2. 1 成分の式で Fitting を行ったときの添加したペプチド濃度とそのときの FCS から得られた分子数と拡散時間、直径

| $[\beta\text{-annulus 24}] / \mu\text{M}$ | 分子数 | 拡散時間 / ms | 直径 / nm |
|---|------|-----------|---------|
| 0 | 40.5 | 0.0798 | 2.32 |
| 5 | 10.5 | 0.0865 | 2.52 |
| 10 | 7.46 | 0.0973 | 2.83 |
| 25 | 1.23 | 0.0768 | 2.24 |
| 50 | 1.98 | 0.221 | 6.44 |
| 100 | 1.64 | 0.717 | 20.9 |
| 200 | 0.72 | 1.36 | 39.6 |
| 500 | 0.38 | 1.31 | 38.1 |

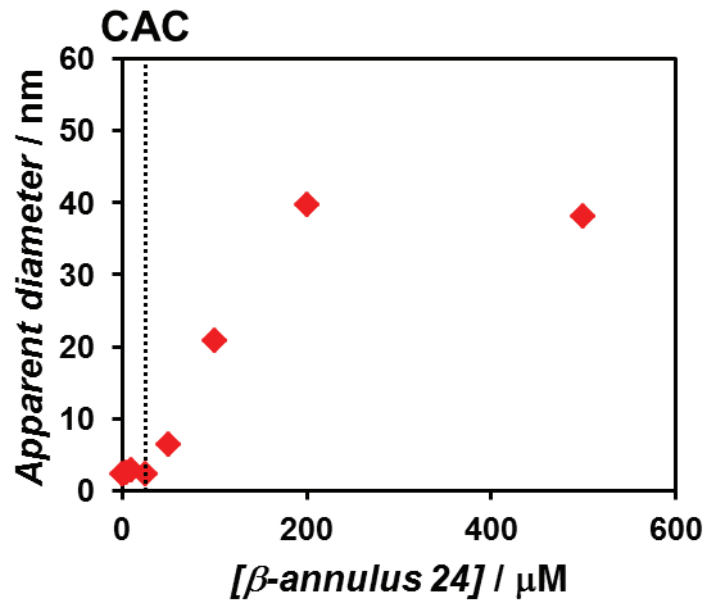


図 2-28. 1 成分で Fitting したときの CdTe ナノ粒子の見かけの粒径のペプチド濃度依存性

FCS の結果より CdTe と CdTe ナノ粒子内包カプセルの粒径を求めた。まず、Alexa 488 の 25°C での拡散係数 D は文献より、 $4.14 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ と分かっているので、以下の拡散時間 τ_D との関係より、測定領域の半径 ω を求めた。

$$\tau_D = \frac{\omega^2}{4D} \cdot \cdot \cdot (1)$$

測定より、Alexa 488 の拡散時間 τ_D は 0.0405 ms であったので、

$$0.0405 \times 10^{-3} \text{ s} = \frac{\omega^2}{4 \times 4.14 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}}$$

$$\omega = 2.59 \times 10^{-5} \text{ m}$$

測定より CdTe ナノ粒子の拡散時間は 0.0774 ms であったので、式(1)より CdTe ナノ粒子の拡散係数 D_{CdTe} を求めると、

$$0.0774 \times 10^{-3} \text{ s} = \frac{(2.59 \times 10^{-5} \text{ m})^2}{4D_{\text{CdTe}}}$$

$$D_{\text{CdTe}} = 2.10 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$$

次に、球と仮定すると、半径 r と拡散係数 D の関係は、Stokes-Einstein の式で次のように示される。

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \cdot \cdot \cdot (2)$$

式(2)より

$$2.10 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s} = \frac{(1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1} \times 298 \text{ K})}{6 \times \pi \times 8.94 \times 10^{-4} \text{ N s m}^{-2} \times r_{\text{CdTe}}}$$

$$r_{\text{CdTe}} = 1.16 \text{ nm}$$

次に、 $[\beta\text{-annulus 24}] = 500 \mu\text{M}$ と混合したときの CdTe ナノ粒子の見かけの粒径を算出した。

$$1.31 \times 10^{-3} \text{ s} = \frac{(2.59 \times 10^{-5} \text{ m})^2}{4D}$$

$$D = 1.28 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$$

$$1.28 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s} = \frac{(1.38 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1} \times 298 \text{ K})}{6 \times \pi \times 8.94 \times 10^{-4} \text{ Nsm}^{-2} \times r}$$

$$r = 19.1 \text{ nm}$$

このことから、 $[\beta\text{-annulus 24}] = 500 \mu\text{M}$ と混合したときの CdTe ナノ粒子の見かけの粒径は 38.2 nm 程度と算出された。同様に、 $[\beta\text{-annulus 24}] = 5\text{-}200 \mu\text{M}$ のときの粒径も算出した。表 2-2 に、1 成分の式で Fitting を行ったときの添加したペプチド濃度とそのときの FCS から得られた分子数と拡散時間、直径をまとめた。図 2-28 より、臨界会合濃度(CAC)である $[\beta\text{-annulus 24}] = 25 \mu\text{M}$ 以下では拡散時間は変化しなかったが、CAC 以上の濃度である $[\beta\text{-annulus 24}] = 50 \mu\text{M}$ 以上の時に拡散時間が増大した。これは、CdTe ナノ粒子が人工ウイルスキャプシドに内包されたからではないかと考えられる。また、 $[\beta\text{-annulus 24}] = 50, 100 \mu\text{M}$ で算出された直径は、飽和状態に達していると考えられる $[\beta\text{-annulus 24}] = 500 \mu\text{M}$ のものより小さくなった。これは、1 成分の式で Fitting を行ったため内包されていない CdTe ナノ粒子と内包されている CdTe ナノ粒子の拡散時間を区別できていないので、このような結果になったと考えられる。

次に、1 成分の式では内包されていない CdTe ナノ粒子と内包されている CdTe ナノ粒子の拡散時間を区別できなかったため、2 成分の Fitting 式を用いた FCS による解析を行った。

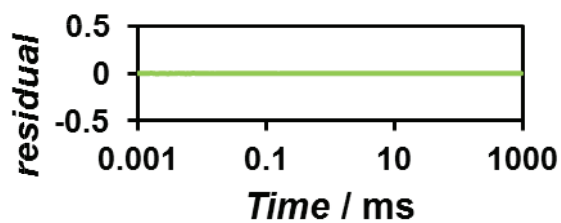
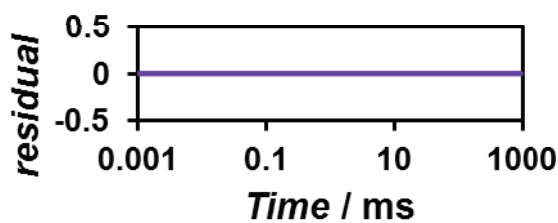
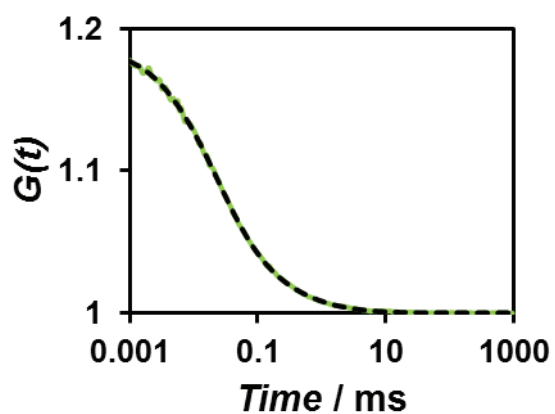
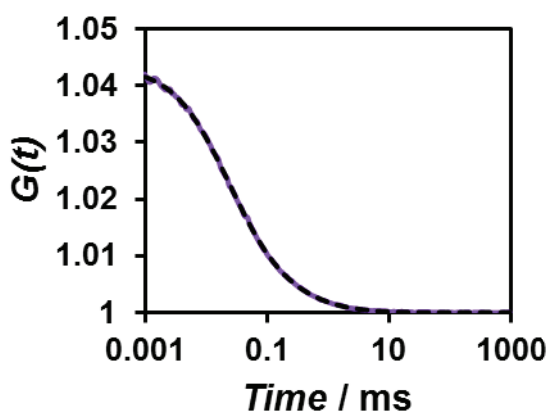
フィッティングには下記の式を用いた。

$$G(t) = 1 + \frac{1}{N} \times \left(\frac{y_1}{\left(1 + \frac{t}{\tau_1}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{k^2} \cdot \frac{t}{\tau_1}}} + \frac{y_2}{\left(1 + \frac{t}{\tau_2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{k^2} \cdot \frac{t}{\tau_2}}} \right) \times \left(\frac{1 + F \exp\left(\frac{t}{\tau_{trip}}\right)}{1 - F} \right)$$

t: 相関時間, τ_1 : 1 成分目の拡散時間, τ_2 : 2 成分目の拡散時間 N: 観察領域内の平均分子数, k: 構造定数(本実験に用いた装置では 5), y: 存在割合, F: triplet 成分の存在割合

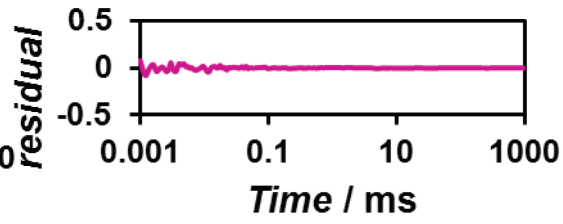
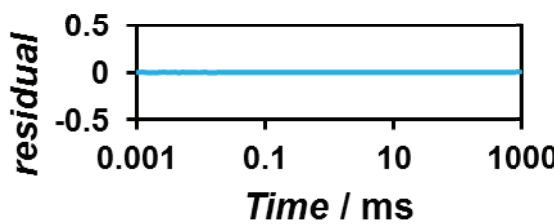
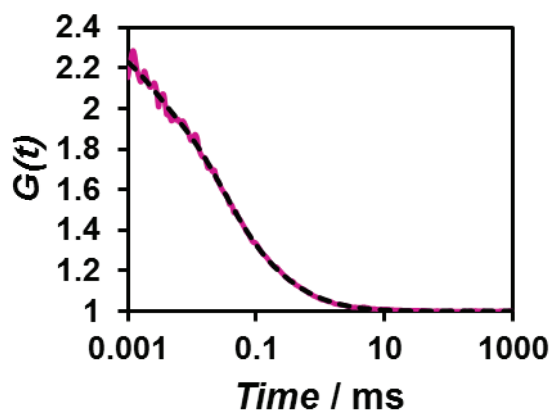
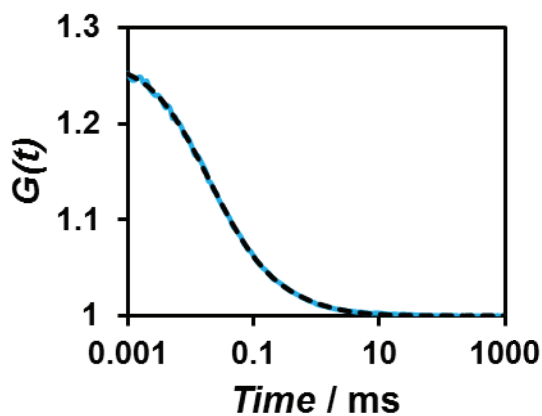
[CdTe NPs] = 0.1 μM

[CdTe NPs] = 0.1 μM , [β -annulus 24] = 5 μM

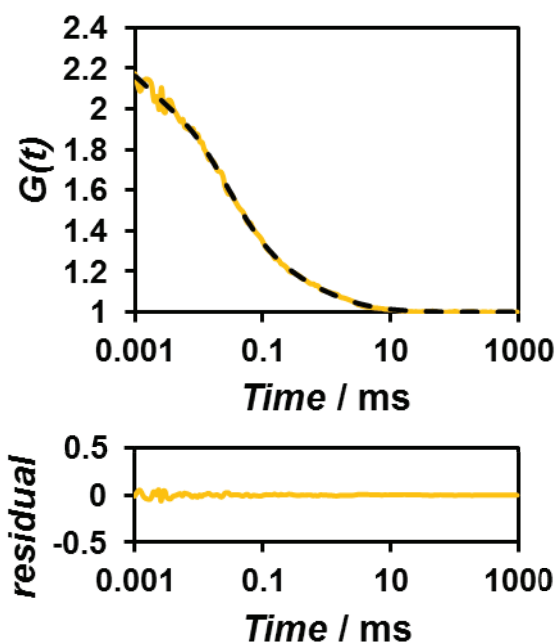


[CdTe NPs] = 0.1 μM , [β -annulus 24] = 50 μM

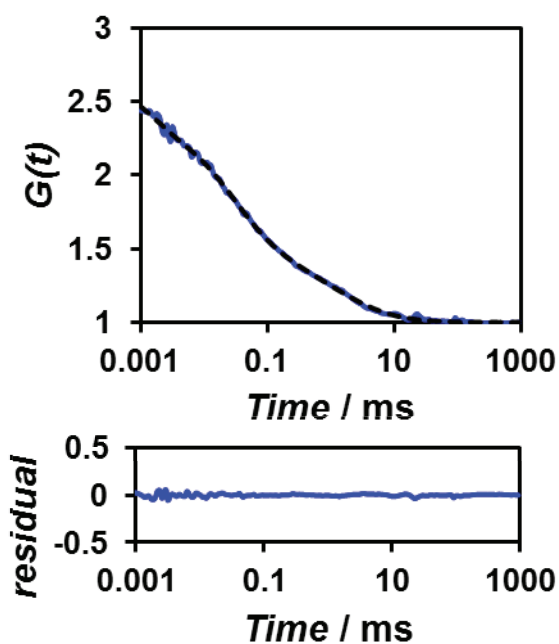
[CdTe NPs] = 0.1 μM , [β -annulus 24] = 100 μM



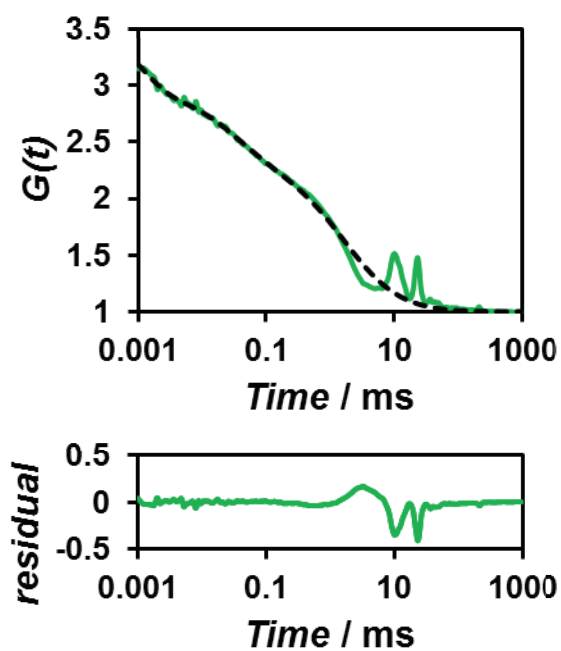
[CdTe NPs] = 0.1 μ M, [β -annulus 24] = 50 μ M



[CdTe NPs] = 0.1 μ M, [β -annulus 24] = 100 μ M



[CdTe NPs] = 0.1 μ M, [β -annulus 24] = 50 μ M



[CdTe NPs] = 0.1 μ M, [β -annulus 24] = 100 μ M

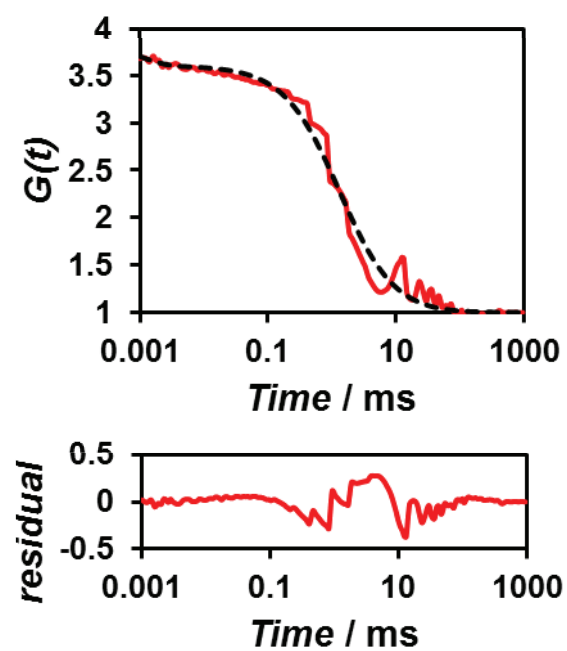


図 2-29. 2成分の式で Fitting を行った各ペプチド濃度の混合液の FCS 測定結果

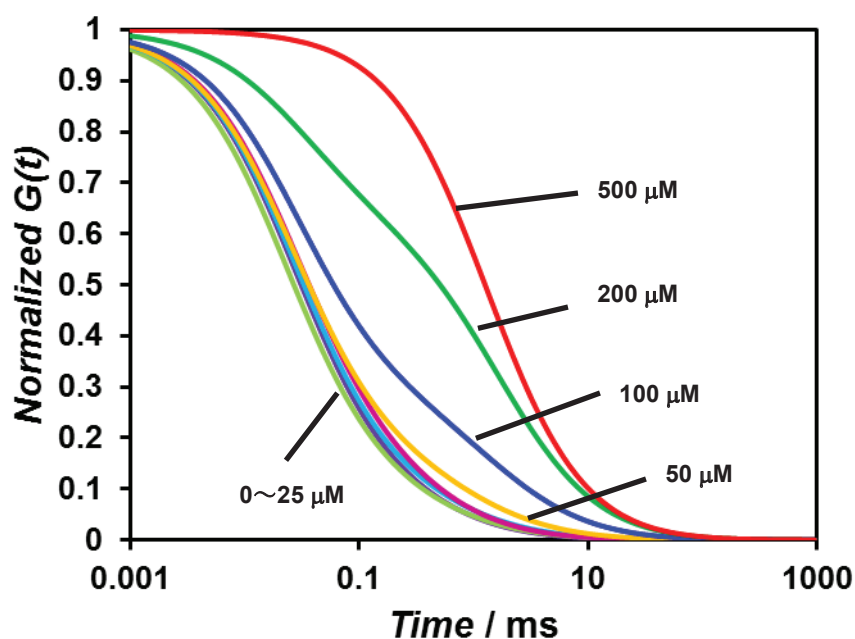


図 2-30. 2 成分の式で Fitting を行った時の規格化後の FCS 測定結果

表 2- 3. 2 成分の式で Fitting を行ったときの添加したペプチド濃度とそのときの FCS から得られた分子数と拡散時間、直径

| [β -annulus 24] / μM | 分子数 | 1 成分目の 拡散時間 / ms | 1 成分目の 存在割合 / % | 1 成分 目の 直径 / nm | 2 成分目の 拡散時間 / ms | 2 成分目の 存在割合 / % | 2 成分 目の 直径 / nm |
|--|-------|------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 0 | 24.8 | 0.0274 | 91.2 | 0.85 | 0.522 | 8.83 | 17.25 |
| 5 | 5.67 | 0.0235 | 91.1 | 0.73 | 0.650 | 8.86 | 20.2 |
| 10 | 4.40 | 0.0279 | 90.0 | 0.87 | 0.787 | 10.0 | 24.5 |
| 25 | 0.905 | 0.0289 | 86.0 | 0.90 | 0.475 | 14.0 | 14.8 |
| 50 | 0.905 | 0.0268 | 84.2 | 0.83 | 0.978 | 15.8 | 30.4 |
| 100 | 0.748 | 0.0292 | 71.6 | 0.91 | 1.63 | 28.4 | 50.8 |
| 200 | 0.513 | 0.0316 | 37.4 | 0.98 | 1.76 | 62.6 | 54.9 |
| 500 | 0.384 | 1.31 | 32.9 | 40.8 | 1.31 | 67.1 | 40.7 |

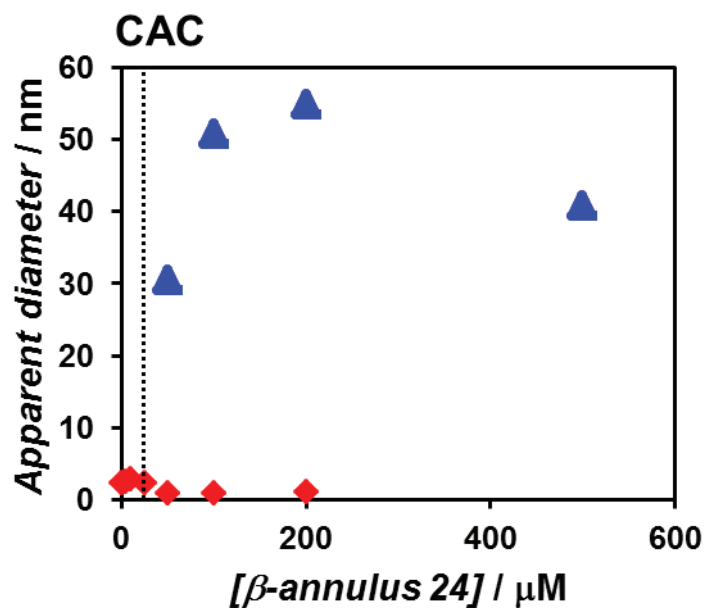


図 2-31. 2 成分で Fitting したときの CdTe ナノ粒子の見かけの粒径のペプチド濃度依存性

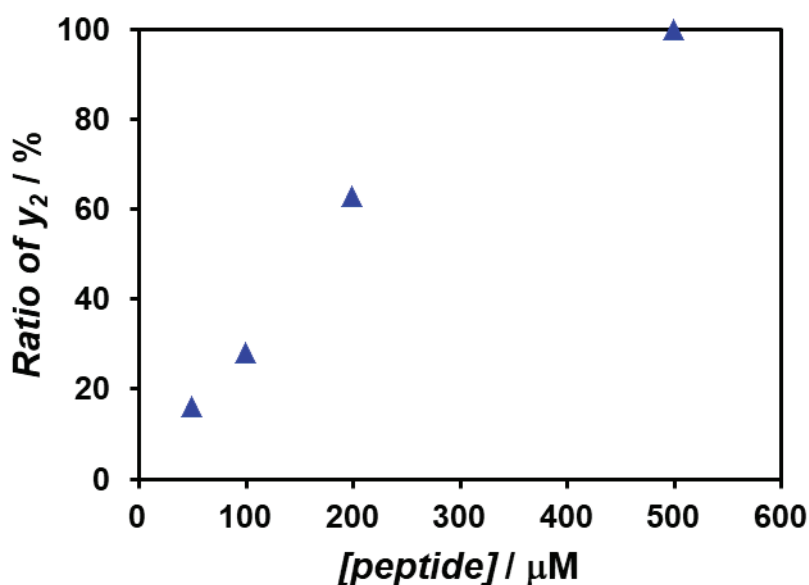


図 2-32. 2 成分目の存在割合のペプチド濃度依存性

図 2-29 より、 $[\beta\text{-annulus 24}] = 50\text{-}200 \mu\text{M}$ では、2 成分の式で Fitting を行った場合、1 成分の式で Fitting を行った場合よりも誤差が小さくなることから、2 成分での Fitting の方が正確であると考えられる。図 2-30、2-31 より、2 成分で Fitting を行った場合でも、臨界会合濃度(CAC)である $[\beta\text{-annulus 24}] = 25 \mu\text{M}$ 以下では拡散時間は変化しなかったが、CAC 以上の濃度である $[\beta\text{-annulus 24}] = 50 \mu\text{M}$ 以上において、拡散時間の遅い成分が確認され、見かけの粒径が人工ウイルスキャプシドと同程度の 30-50 nm と求められた。これは CdTe ナノ粒子が人工ウイルスキャプシドに内包されたため、見かけ上、大きな粒子としてブラウン運動しているものと考えられる。また、図 2-32 より、ペプチド濃度が高くなるにつれて、見かけ上の粒径が大きい成分の割合が増大し、内包率が増大していることが示された。

2-3-3. TEM による内包挙動の評価

β -annulus 24 ペプチドと CdTe ナノ粒子混合液の TEM 観察により CdTe ナノ粒子が人工ウイルスキャプシドへ内包されているのか評価した。混合液の TEM 観察を行う際には、人工ウイルスキャプシドの染色に用いられる 2% $\text{Na}_3(\text{PW}_{12}\text{O}_{40}) \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 水溶液では CdTe ナノ粒子がキャプシドの外に放出されてしまったので、0.5wt% RuO_4 水溶液を用いた蒸気染色を行った。

【TEM 観察条件】

Grid: C-SMART Hydrophilic TEM grids, (ALLIANCE Biosystems)

加速電圧: 80 kV

染色無し

[実験操作]

各液を TEM グリッドに 5 μL 滴下し、液滴を 1 分間保持した後はじいた。混合溶液の場合には、右図のように 0.5% RuO_4 水溶液を用いて 4°C で 1 時間蒸気による染色を行った。その後、水でグリッドを 1 回洗浄した。その後一晩、減圧乾燥させた。

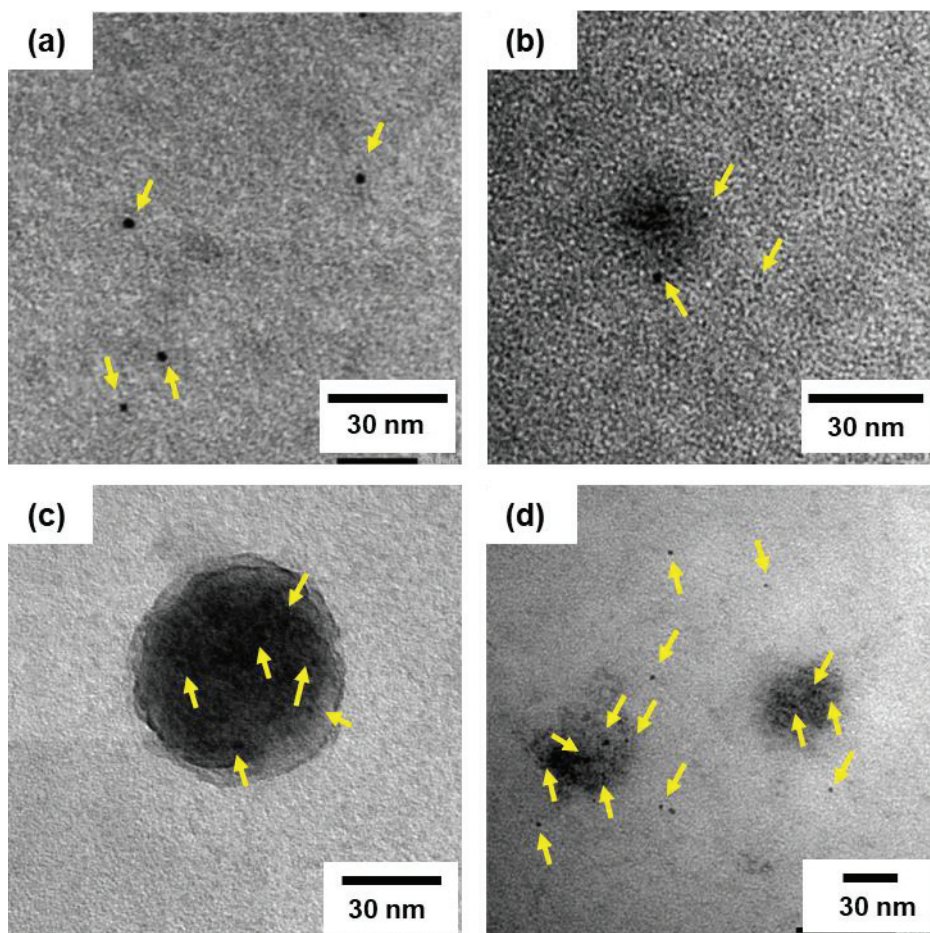
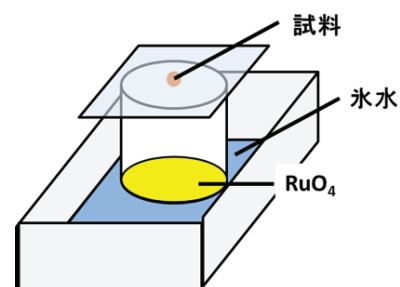


図 2-33. (a) 0.1 μM CdTe ナノ粒子 10 mM Tris-HCl 分散液無染色の TEM 像

100 μM β -annulus 24 ペプチドと CdTe ナノ粒子混合液の TEM 像(染色: RuO_4)

[CdTe NPs] = 0.1 μM (b), 10 μM (c), 20 μM (d)

図 2-33 (a)より、[CdTe NPs] = 0.1 μM の時は CdTe ナノ粒子だと考えられる 3 nm 程度の粒子が確認された。一方、ペプチド 100 μM 存在下では、人工ウイルスキャプシドと考えられる 30 nm 程度の球状集合体と CdTe ナノ粒子が重なった像が確認された (図 2-33b)。このことから CdTe ナノ粒子の人工ウイルスキャプシドへの内包が確認されたと考えられる。また、CdTe ナノ粒子濃度を増大させた 10 μM のときには、1つのキャプシド内に複数の粒子が確認された (図 2-33c)。またキャプシドの外にナノ粒子が確認されず、ほぼすべての粒子が内包されていることが示唆された。しかしながら、さらに CdTe ナノ粒子の濃度を高くした 20 μM では、人工ウイルスキャプシドの外にも粒子が確認された (図 2-33d)。このことから、CdTe ナノ粒子濃度が 10 μM 程度までであれば全ての粒子が内包されることが示唆された。

2-3-4. 人工ウイルスキャプシドに内包された CdTe ナノ粒子の蛍光スペクトル

ペプチドと CdTe ナノ粒子を混合液の蛍光挙動を蛍光スペクトルより評価した。

[実験操作]

乾燥させたペプチドに 10 μM CdTe ナノ粒子 10 mM Tris-HCl buffer 分散液を、 $[\beta\text{-annulus 24}] = 100 \mu\text{M}$ になるように加え、1 時間、25°C でインキュベートした。

【蛍光スペクトル測定条件】

| | | | |
|---------|--------------------------------|---------|---------------|
| 溶媒 | 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) | 温度 | 25°C |
| セル光路長 | 1 mm | 測定範囲 | 540 nm-640 nm |
| 励起波長 | 520 nm | データ取込間隔 | 0.5 nm |
| 励起側バンド幅 | 5 nm | 蛍光側バンド幅 | 10 nm |
| レスポンス | 1 sec | 感度 | Low |
| 走査速度 | 50 nm/min | 光源 | Xe |

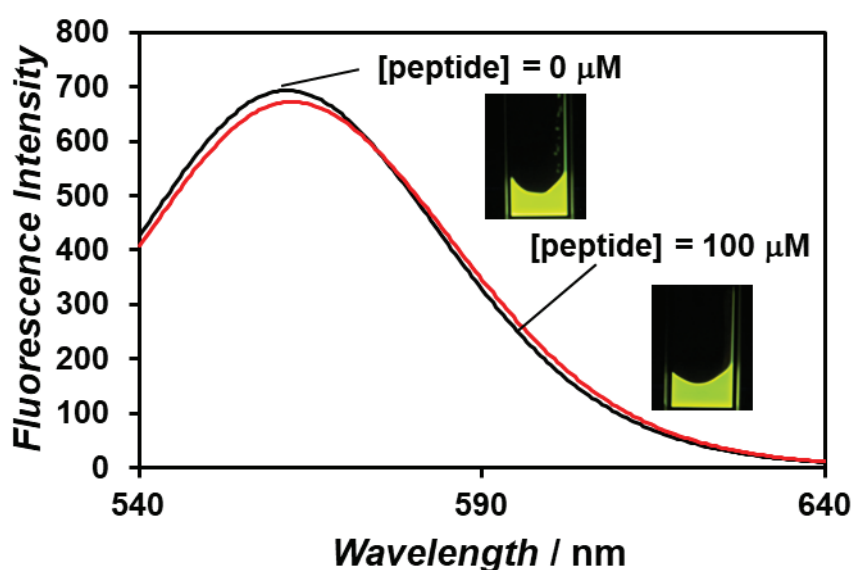


図 2-34. CdTe ナノ粒子、ペプチド混合溶液の蛍光スペクトル
 $[\beta\text{-annulus 24}] = 0 \mu\text{M}$ (黒), $100 \mu\text{M}$ (赤)

図 2-34 より、 β -annulus 24 の存在・非存在に関わらず蛍光スペクトルに変化はなかった。このことから、ペプチドと CdTe ナノ粒子を混合しても凝集が起こっていないことが確認された。

2-3-5. まとめ²¹⁾

β -annulus ペプチドと CdTe ナノ粒子の混合液の FCS 測定を行ったところ、臨界会合濃度(CAC)である $[\beta\text{-annulus 24}] = 25 \mu\text{M}$ 以下では拡散時間は変化しなかったが、 $[\beta\text{-annulus 24}] = 50 \mu\text{M}$ 以上では CdTe ナノ粒子の拡散時間が大きくなることが示された。得られた FCS 曲線を解析したところ、CdTe ナノ粒子単独および $[\beta\text{-annulus 24}] = 25 \mu\text{M}$ 以下では 1 成分モデルで、 $[\beta\text{-annulus 24}] = 50 \mu\text{M}$ 以上では 2 成分モデルでフィッティングできることが分かった。このことから、人工ウイルスキャプシドに内包されている CdTe ナノ粒子と内包されていない CdTe ナノ粒子の存在が明らかとなった。FCS から得られたカーブから粒径の算出を行ったところ、 $[\beta\text{-annulus 24}] = 50 \mu\text{M}$ 以上では蛍光分子の見かけの粒径が人工ウイルスキャプシドと同程度の 30-50 nm と求められた。これは、2.8 nm の CdTe ナノ粒子が人工ウイルスキャプシドに内包されたため、見かけ上、大きな粒子としてブラウン運動しているためと考えられる。また、ペプチド濃度に比例して内包率が增大することも確認された。

2-4.金ナノ粒子で被覆された人工ウイルスキャプシドの創製

金ナノ粒子の間隔や配列パターンが光学的特性に大きく影響することが一般的に知られている。そのため、近年、ウイルスキャプシドを用いた金ナノ粒子の配列制御が報告されている。Blum らは、天然ウイルスであるササゲモザイクウイルス(CPMV)のキャプシド表面に金ナノ粒子を配列化させている⁸⁾。また Niikura らは、JC ウイルスキャプシド表面上に金ナノ粒子を配列化することに成功している⁷⁾。

この節では、金ナノ粒子(AuNP)で修飾された人工ウイルスキャプシドの創製を検討した。金ナノ粒子を C 末端に結合させた β -annulus ペプチドが自己集合することで、表面に金ナノ粒子を提示した人工ウイルスキャプシドの創製が期待できる。C 末端に GGGCG 配列を導入した β -annulus ペプチド(β -annulus-GGGCG ペプチド)と金ナノ粒子を結合させ、AuNP-peptide conjugate を合成し、この自己集合により、金ナノ粒子で修飾された人工ウイルスキャプシドのを創製した。

2-4-1. β -annulus-GGGCG ペプチドの合成

ペプチド INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS GGCG (β -annulus-GGGCG ペプチド)を、Fmoc 固相合成法により合成した。

【試薬】

樹脂

| | |
|--------------------------------|--|
| Fmoc-Gly-Alko-PEG Resin | 【0.22 mmol/g, 渡辺化学工業】 568 mg(0.125 mmol) |
| Fmoc アミノ酸 | |
| Fmoc-Ile-OH | 【Mw 353.42, 渡辺化学工業】 177 mg(0.5 mmol)×2 |
| Fmoc-Asn(Trt)-OH | 【Mw 596.69, 渡辺化学工業】 299 mg(0.5 mmol) |
| Fmoc-His(Trt)-OH | 【Mw 619.73, 渡辺化学工業】 310 mg(0.5 mmol) |
| Fmoc-Val-OH | 【Mw 339.39, 渡辺化学工業】 170 mg(0.5 mmol)×4 |
| Fmoc-Gly-OH | 【Mw 297.31, 渡辺化学工業】 149 mg(0.5 mmol)×8 |
| Fmoc-Thr(tBu)-OH | 【Mw 397.48, 渡辺化学工業】 199 mg(0.5 mmol)×2 |
| Fmoc-Ala-OH · H ₂ O | 【Mw 329.36, 渡辺化学工業】 165 mg(0.5 mmol)×3 |
| Fmoc-Met-OH | 【Mw 371.46, 渡辺化学工業】 186 mg(0.5 mmol) |
| Fmoc-Pro-OH · AcOEt | 【Mw 425.46, 渡辺化学工業】 213 mg(0.5 mmol) |
| Fmoc-Arg(Pbf)-OH · 0.3IPE | 【Mw 669.29, 渡辺化学工業】 340 mg(0.5 mmol) |
| Fmoc-Gln(Trt)-OH | 【Mw 610.72, 渡辺化学工業】 306 mg(0.5 mmol) |
| Fmoc-Leu-OH | 【Mw 353.42, 渡辺化学工業】 177 mg(0.5 mmol) |
| Fmoc-Ser(tBu)-OH | 【Mw 383.45, 渡辺化学工業】 192 mg(0.5 mmol) |
| Fmoc-Cys(Trt)-OH | 【Mw 585.72, 渡辺化学工業】 293 mg(0.5 mmol) |

[実験操作]

1. 樹脂の膨潤

プラスチック製のカラムに Fmoc-Gly-Alko-PEG Resin 568 mg (0.125 mmol)を入れ、NMP を 5 mL 加えてよく振り混ぜ、1 時間攪拌した。

2. Fmoc基の除去

アミノ酸導入樹脂の入ったカラムに、ピペリジン: DMF=20: 80 (体積比)溶液2 mLを加えてよく振り混ぜ、15分間攪拌した。この操作を2回行った。次に、溶液を取り除き、樹脂をNMPで5回洗浄した。

3. Fmoc基除去の確認

少量の樹脂を DMF 中に懸濁させ、1%ピクリルスルホン酸 DMF 溶液を 1 滴加え、続いて、10% *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン DMF 溶液を 1 滴加えた。室温で 5 分間放置した後、樹脂を DMF で洗浄し、溶液を除去した。樹脂が赤色に呈色したことを確認した。なお、第 2 級アミンであるプロリンの Fmoc 基除去の確認は、TNBS キットの代わりにクロラニルテストキットを使用した。クロラニルテストキットの場合、少量の樹脂を DMF 中に懸濁させ、2%アセトアルデヒド DMF 溶液を 1 滴、2%クロラニル DMF 溶液を 1 滴加えた。室温で 5 分間放置し、樹脂が青色に呈色していることを確認した。

4. ペプチド鎖の伸長

樹脂の残ったカラムに、Fmoc-アミノ酸、COMU をそれぞれ樹脂上のアミノ酸に対して 4 等量、DIPEA を 8 等量加え、NMP 2.5 mL を加えて溶かし、よく振り混ぜ、室温で 90 分間攪拌した。攪拌後、溶液を取り除いて残った樹脂を NMP で 5 回洗浄した。

5. アミノ酸導入の確認

少量の樹脂を DMF 中に懸濁させ、1%ピクリルスルホン酸 DMF 溶液を 1 滴加え、続いて、10% *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン DMF 溶液を 1 滴加えた。室温で 5 分間放置した後、樹脂を DMF で洗浄し、溶液を除去した。樹脂が赤色に呈色していないことを確認した。プロリンの次のアラニンの導入確認は、クロラニルテストキットを用いた。少量の樹脂を DMF 中に懸濁させ、2%アセトアルデヒド DMF 溶液を 1 滴、2%クロラニル DMF 溶液を 1 滴加えた。室温で 5 分間放置し、樹脂が青色に呈色していないことを確認した。

2-5を目的のアミノ酸配列となるまで繰り返した。その後、ペプチドの脱樹脂をクリーンページカクテルによって行った。

6. 脱樹脂・脱保護

200 mL ナスフラスコに TFA 9.5 mL、H₂O 0.25 mL、EDT 0.25 mL、TIPS 0.1 mL を混合した。そこに、アミノ酸導入済み樹脂を加え室温で 3 時間攪拌した。溶液を濾過し、溶媒留去した。これに *tert*-ブチルメチルエーテルを 15 mL 加え、遠心分離(2000 rpm, 10 min)により、ペプチドを沈殿させた。この操作を 3 回行った。その後、凍結乾燥により白色固体を得た。

粗収量: 171.3 mg 粗収率: 52%

【MALDI-TOF-MS 測定】

Matrix: α -CHCA, Mode: Linear positive

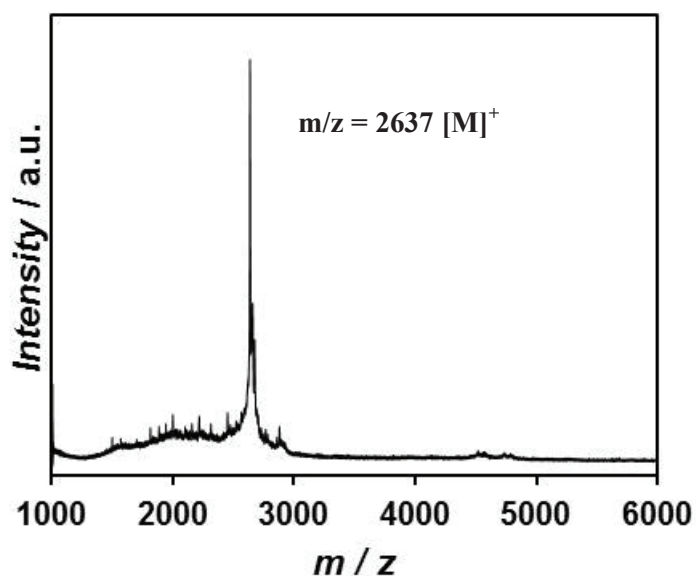


図 2-35. 粗ペプチドの MALDI-TOF-MS 測定結果 (matrix: α -CHCA)

図 2-35 より、目的ペプチドのピークである $m/z = 2637$ が確認されたため、逆相 HPLC による精製を行った。

【分離条件】

試料: 5 mg の β -annulus-GGGCG ペプチドにイオン交換水を 1.5 mL 加えて溶かした溶液

カラム: Inertsil WP300 C18 (5 μ m, 20 \times 250 mm)

試料注入量: 1.5 mL

移動相溶媒: 水 / CH₃CN (ともに 0.1 % TFA を含む)

移動相組成: 水 / CH₃CN: 74 / 26 \rightarrow 71 / 29 (120 min)、リニアグラジエント

検出: UV-vis 220 nm

流量: 10 mL/min

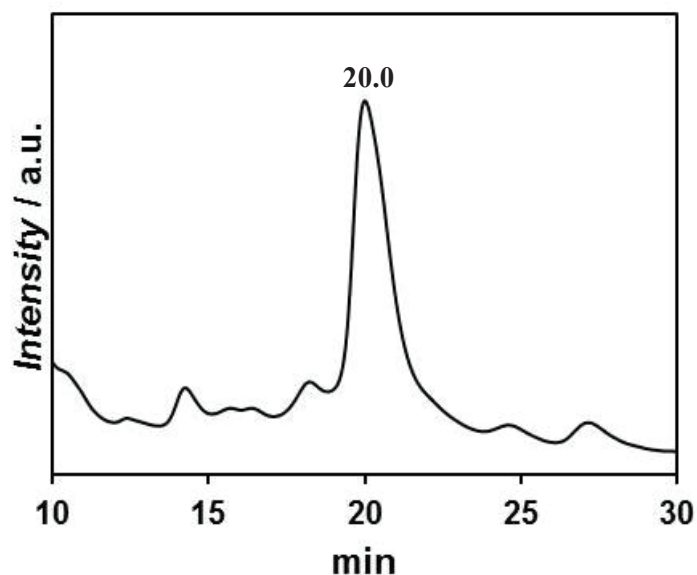


図 2-36. 粗ペプチドの分取時の逆相 HPLC チャート

図 2-36 の 20 分頃のピークを分取した。これを複数回繰り返した。得られた溶液を凍結乾燥し白色粉末を得た。

【MALDI-TOF-MS 測定】

Matrix: α -CHCA, Mode: Linear positive

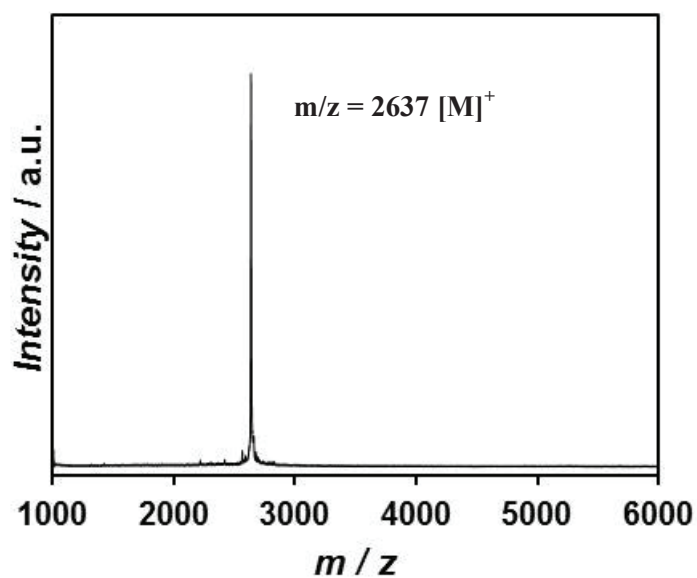


図 2-37. 精製後の β -annulus-GGGCG の MALDI-TOF-MS 測定結果(matrix: α -CHCA)

図 2-37 より、目的ペプチドのピーク $m/z = 2637$ が確認された。

理論収量: 317 mg 収量: 9.5 mg 収率: 3%

2-4-2. β -annulus-GGGCG ペプチドの自己集合挙動

C末端にGGGCG配列を付加したペプチド β -annulus-GGGCG (INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGSGGGCG)の水中での自己集合挙動について、DLS測定、CDスペクトル測定、TEM観察により評価した。

[実験操作]

100 μ M ペプチド水溶液(pH 4.6)に超音波を5分間照射し、DISPOSABLE SYRINGE FILTER UNIT(0.45 μ m)を通した。それをイオン交換水で希釈し、75, 50, 30, 25, 10, 5 μ M 水溶液を調製した。調製した各濃度のペプチド水溶液に塩酸を加え、pH 4.6に揃えた。

【測定条件】

セル: ZEN2112-Low volume glass cuvette (12 μ L)

温度: 25 $^{\circ}$ C

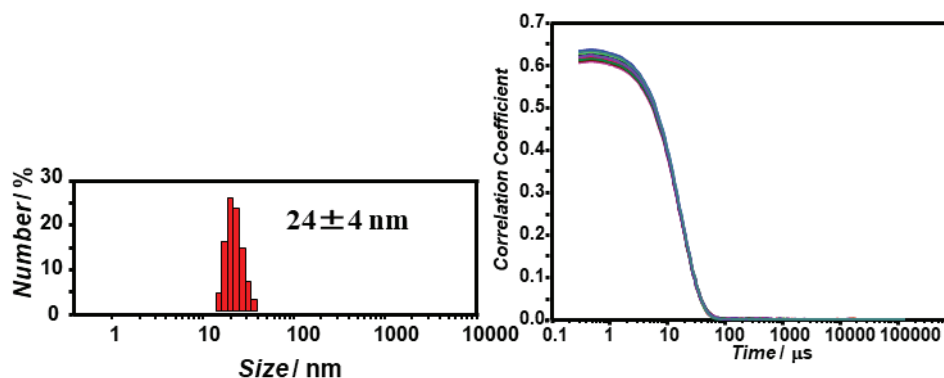


図 2-38. 100 μ M β -annulus-GGGCG 水溶液(pH 4.6)のDLS測定から得られた個数換算分布(左)、自己相関関数(右)

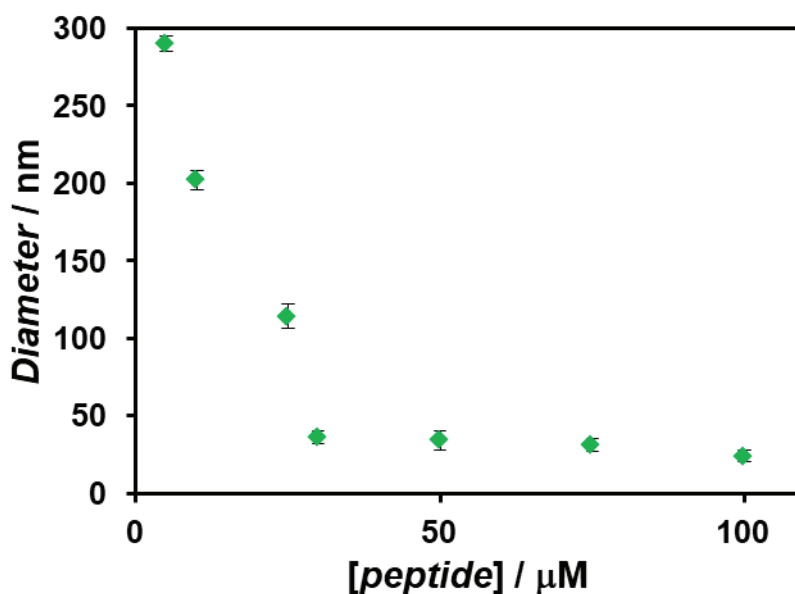


図 2-39. β -annulus-GGGCG 水溶液(pH 4.6)のDLS測定から得られた粒径分布(個数換算分布)の濃度依存性

図 2-39 より、30-100 μM の濃度範囲において、 β -annulus 24 ペプチドと同様に 30-50 nm 程度の大きさの集合体の形成が確認された。C 末端側に GGGCG 配列を付加しても、粒径にあまり影響を与えないことが示された。また、集合体の粒径は 30 μM 以上において濃度により依存しないことも示された。25 μM , 10 μM の 100-200 nm 程度の集合体は凝集体であると考えられる。

光散乱強度の増大は、散乱体の大きさ及び散乱体の数に依存する。したがって、形成する集合体の大きさが濃度に依存しないならば光散乱強度は粒子数の増加にのみ依存するはずである。よって、光散乱強度が増加し始める濃度が臨界会合濃度(CAC)であると考えられる。そこで、動的散乱(DLS)測定により、光散乱強度の濃度依存性を評価した。

【DLS 測定条件】

セル: ZEN2112 -Low volume glass cuvette (12 μL)

温度: 25°C

Attenuator: 11

Positioning method: Centre of the cell (water clear sample only)

なお、Count Rate を10回測定した平均をMean Count Rateとした。

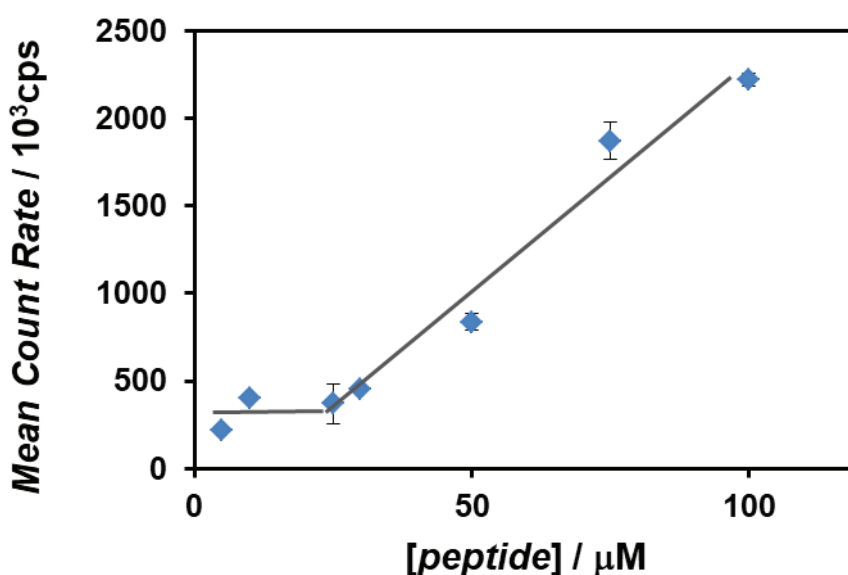


図 2-40. β -annulus-GGGCG 水溶液(pH 4.6)の DLS 測定から得られた光散乱強度の濃度依存性(25°C)

図 2-40 より、29 μM までは光散乱強度はほぼ一定であり、29 μM 以上の濃度から光散乱強度が濃度に依存して増加していく結果となった。この結果より、29 μM 以上で集合体を形成している。つまり CAC は 29 μM であることが示された。また、 β -annulus 24 ペプチドの CAC は 25 μM であるため、C 末端側に GGGCG 配列を付加しても、ほとんど CAC は変わらないことが確認された。

次に、C 末端側に GGGCG 配列を付加したことで、二次構造に影響をあたえるかを調べるため、CD スペクトル測定を行った。

[実験操作]

β -annulus-GGGCG ペプチドに水を加え、100 μ M β -annulus-GGGCG 水溶液(pH 4.6)を調製した。

【CD スペクトル測定条件】

セル: 光路長 1 mm 石英セル

温度: 25°C

なお、モル橢円率は β -annulus-GGGCG ペプチドのアミノ酸残基濃度に合わせて計算した。

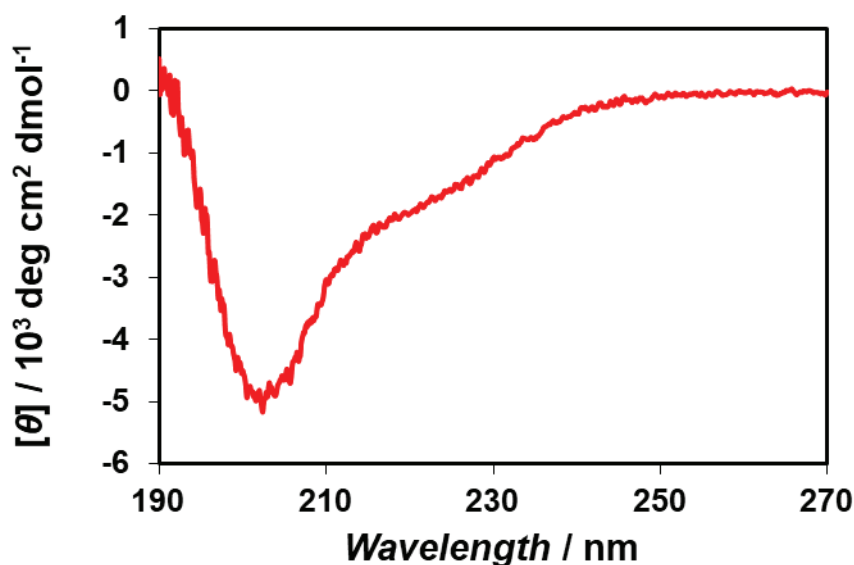


図 2-41. 100 μ M β -annulus-GGGCG 水溶液の CD スペクトル

図 2-41 より、202 nm に大きな負のピーク、220 nm 付近に負のショルダーピークが観測された。 β -annulus 24 ペプチドの CD スペクトルと比較すると負のピークの強度は小さいが、 β -annulus 構造に特徴的な CD スペクトルである。つまり、C 末端側に GGGCG 配列を付加しても、ほとんど二次構造に影響を与えないことが示された。

次に、TEM により自己集合形態を評価した。

[実験操作]

100 μ M β -annulus-GGGCG 水溶液を調製し、その水溶液を TEM グリッド上に 5 μ L 滴下した。1 分間静置した後、ろ紙を用いて液滴をはじいた。2% $\text{Na}_3(\text{PW}_{12}\text{O}_{40})(\text{H}_2\text{O})_n$ 水溶液を 5 μ L 滴下し、1 分間静置した後、ろ紙を用いて液滴をはじき、一晚減圧乾燥した。

【TEM 観察条件】

加速電圧: 80 kV

染色: 2% $\text{Na}_3(\text{PW}_{12}\text{O}_{40})(\text{H}_2\text{O})_n$ 水溶液

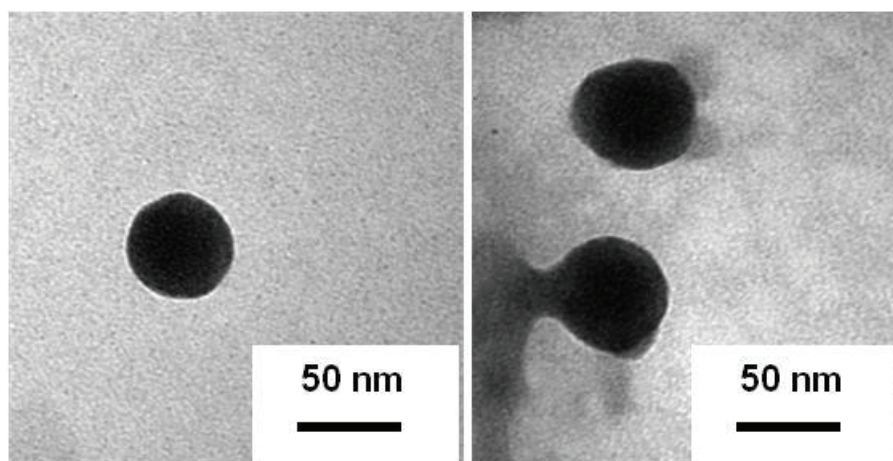


図 2-42. 100 μM β -annulus-GGGCG 水溶液から得られた TEM 像

図 2-42 より、100 μM の濃度では粒径約 50 nm の球状集合体が観察された。

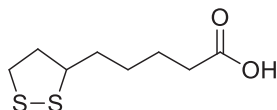
2-4-3. AuNP-peptide conjugate の合成

【試薬】

β -annulus-GGGCG ペプチド配列: INHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVGSGGGCG [Mw: 2637]

Gold nanoparticles, 5 nm diameter, OD 1, in citrate buffer [Sigma Aldrich]

DL- α -Lipoic Acid (チオクト酸) [Mw: 206.32, TCI]



[実験操作]

2 μM ペプチド水溶液 2 mL と 1 μM 金ナノ粒子懸濁液 2 mL を混合し、25°C で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、20 mM チオクト酸(エタノール: 水=80: 20 溶液中) 500 μL を加え、25°C で 10 分間インキュベートすることで、AuNP-peptide conjugate を得た。AuNP-peptide conjugate の濃度を臨界会合濃度(29 μM)以上にするために、ボルテックス式エバポレーターを用いて溶媒留去し、イオン交換水を 80 μL 加えた。調製した金ナノ粒子修飾人工ウイルスキャプシドを 48 時間透析(Spectra/Por, cut-off Mw: 50 kDa [Spectrum])により精製した。

透析後の金ナノ粒子懸濁液の濃度(UV-vis スペクトル測定により濃度決定した)

[AuNP] = 1.2 μM

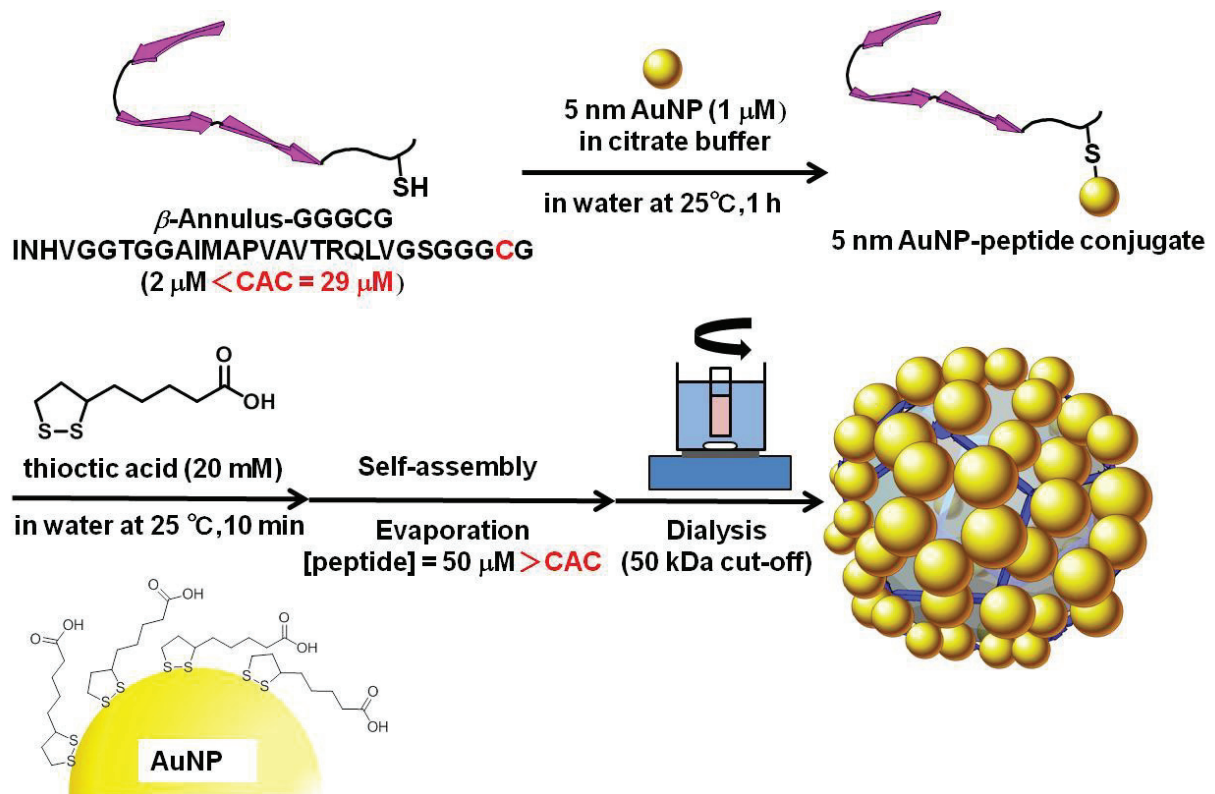


図 2-43. 5 nm AuNP-peptide conjugate の合成

2-4-4. AuNP-peptide conjugate の自己集合挙動

合成した AuNP-peptide conjugate の自己集合挙動を DLS 測定、TEM 観察により評価した。

【測定試料】

1 μM 金ナノ粒子懸濁液

透析前 5 nm AuNP-peptide conjugate 水溶液

[AuNP] = 25 μM , [peptide] = 50 μM

透析後 5 nm AuNP-peptide conjugate 水溶液

[AuNP] = 1.2 μM , [peptide] = 2.4 μM

(透析後の[peptide]は透析の際に、ペプチドがすべて残ったと仮定したときの濃度)

【測定条件】

セル: ZEN2112-Low volume glass cuvette (12 μL)

温度: 25°C

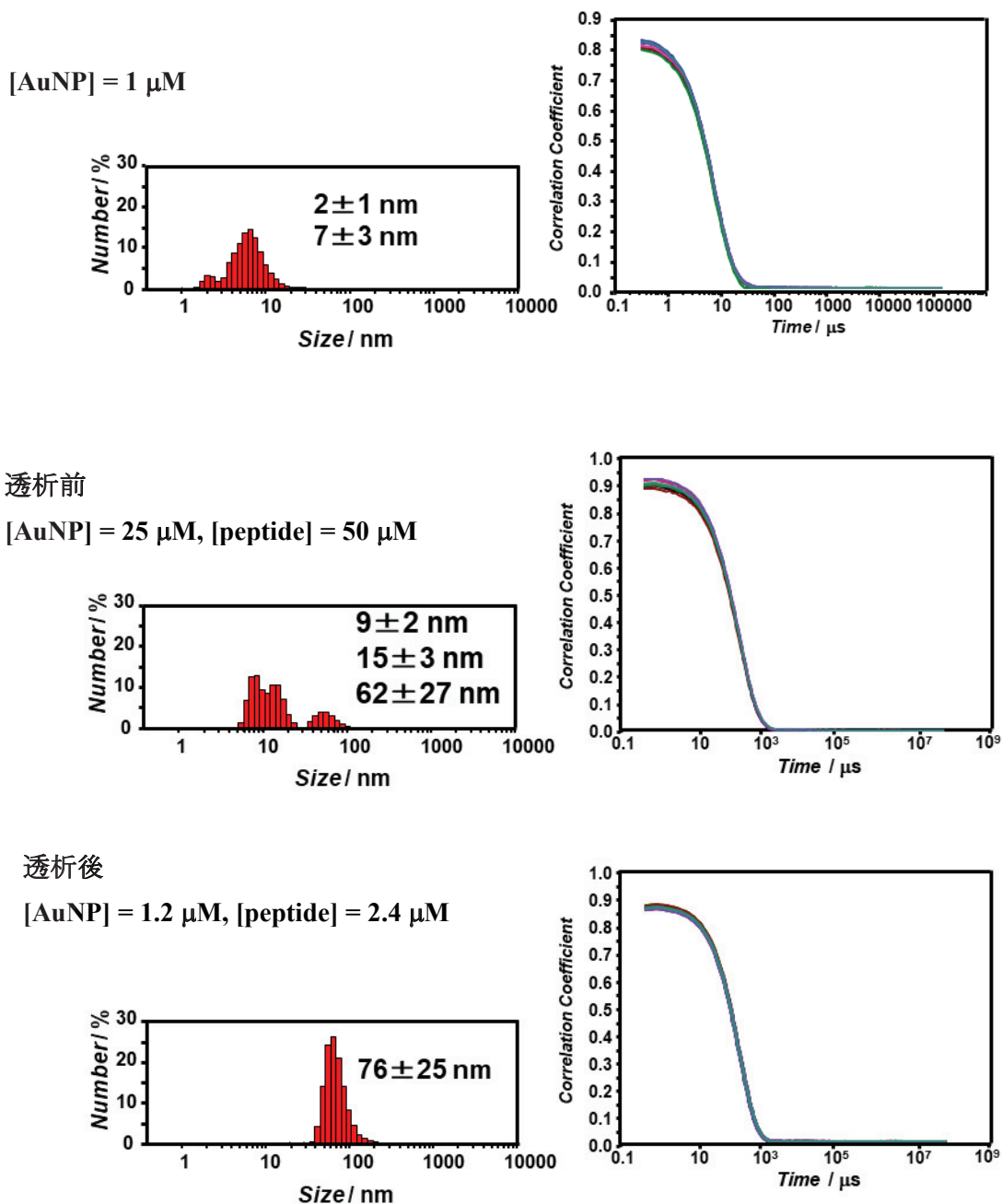


図 2-44. AuNP 水溶液, AuNP-peptide conjugate 水溶液の透析前後の DLS 測定から得られた自己相関関数(右)、個数換算分布(左)

図 2-44(右)より、自己相関関数の縦軸がそれなりに高く、信頼できるデータであると言える。AuNP 水溶液から得られた個数換算分布より、2-7 nm 程度の粒径が確認された。一方で、透析前の AuNP-peptide conjugate 水溶液の個数換算分布より、 β -annulus-GGCG と同様の 60 nm 程度の集合体を確認された。このことから、表面が金ナノ粒子で被覆された人工ウイルスキャプシドの構築が示唆された。しかし、10 nm 程度の未反応の金ナノ粒子と思われる小さな粒径も確認された。一方、透析後の個数換算分布からは、未反応の金ナノ粒子と思われる小さな粒径は確認されず、70 nm 程度の集合体のみが確認された。このことから、透析により未反応の金ナノ粒子が取り除くことができたことが確認された。

次に AuNP 水溶液、AuNP-peptide conjugate 水溶液の透析前後で TEM 観察を行い、どのような集合体が形成しているのか評価した。

【測定試料】

1 μM 金ナノ粒子懸濁液

透析前 5 nm AuNP-peptide conjugate 水溶液

[AuNP] = 25 μM , [peptide] = 50 μM

透析後 5 nm AuNP-peptide conjugate 水溶液

[AuNP] = 1.2 μM , [peptide] = 2.4 μM

(透析後の[peptide]は透析の際に、ペプチドがすべて残ったと仮定したときの濃度)

[実験操作]

各試料を TEM グリッド上に 5 μL 滴下した。1 分間静置した後、ろ紙を用いて液滴をはじき、一晚減圧乾燥した。

【TEM 観察条件】

Grid: C-SMART Hydrophilic TEM grids, (ALLIANCE Biosystems)

加速電圧: 80 kV

染色無し

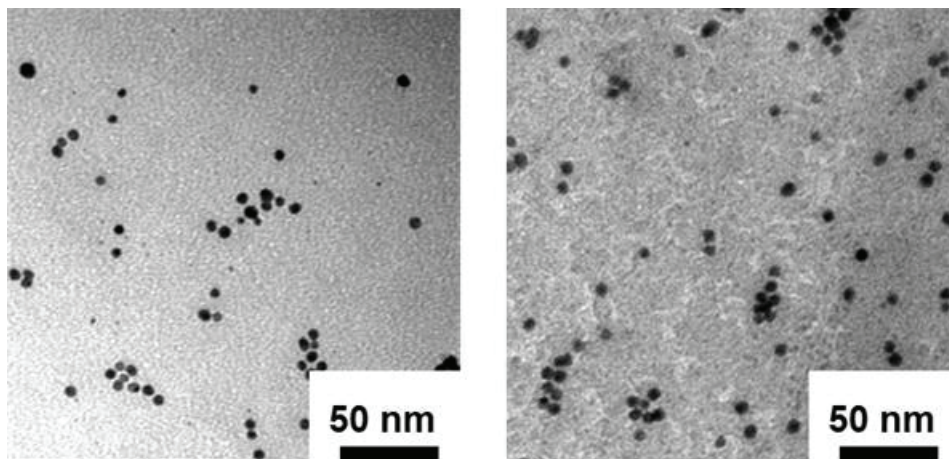


図 2-45. AuNP 水溶液の TEM 像

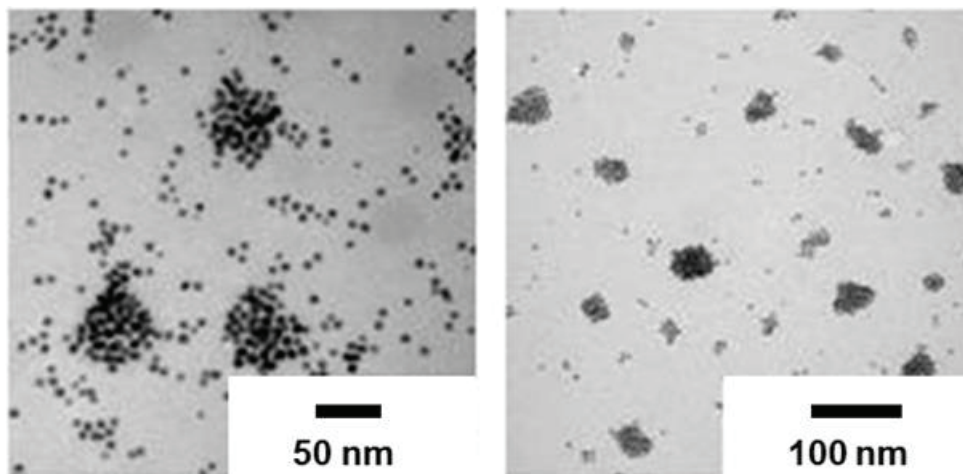


図 2-46. 透析前の AuNP-peptide conjugate 水溶液の TEM 像

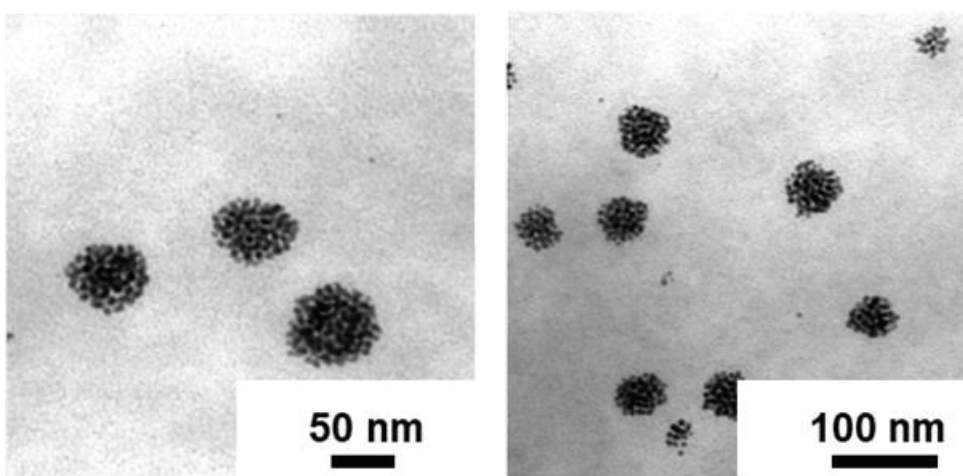


図 2-47. 透析後の AuNP-peptide conjugate 水溶液の TEM 像

図 2-45 より AuNP のみでは 5 nm 程度の粒子が分散しているのが確認された。一方で、図 2-46 よりペプチドと混合させた場合、50 nm 程度の金ナノ粒子集合体と未反応の金ナノ粒子と思われる像が得られた。また、図 2-47 より透析後の TEM 像からは未反応の金ナノ粒子は確認されず、50-70 nm 程度の金ナノ粒子球状集合体のみが確認された。このことから、透析により未反応の金ナノ粒子が除去できたことが確認された。

また、透析後の 5 nm AuNP-peptide conjugate 水溶液を希釈し、さらに低濃度での自己集合挙動も評価した。

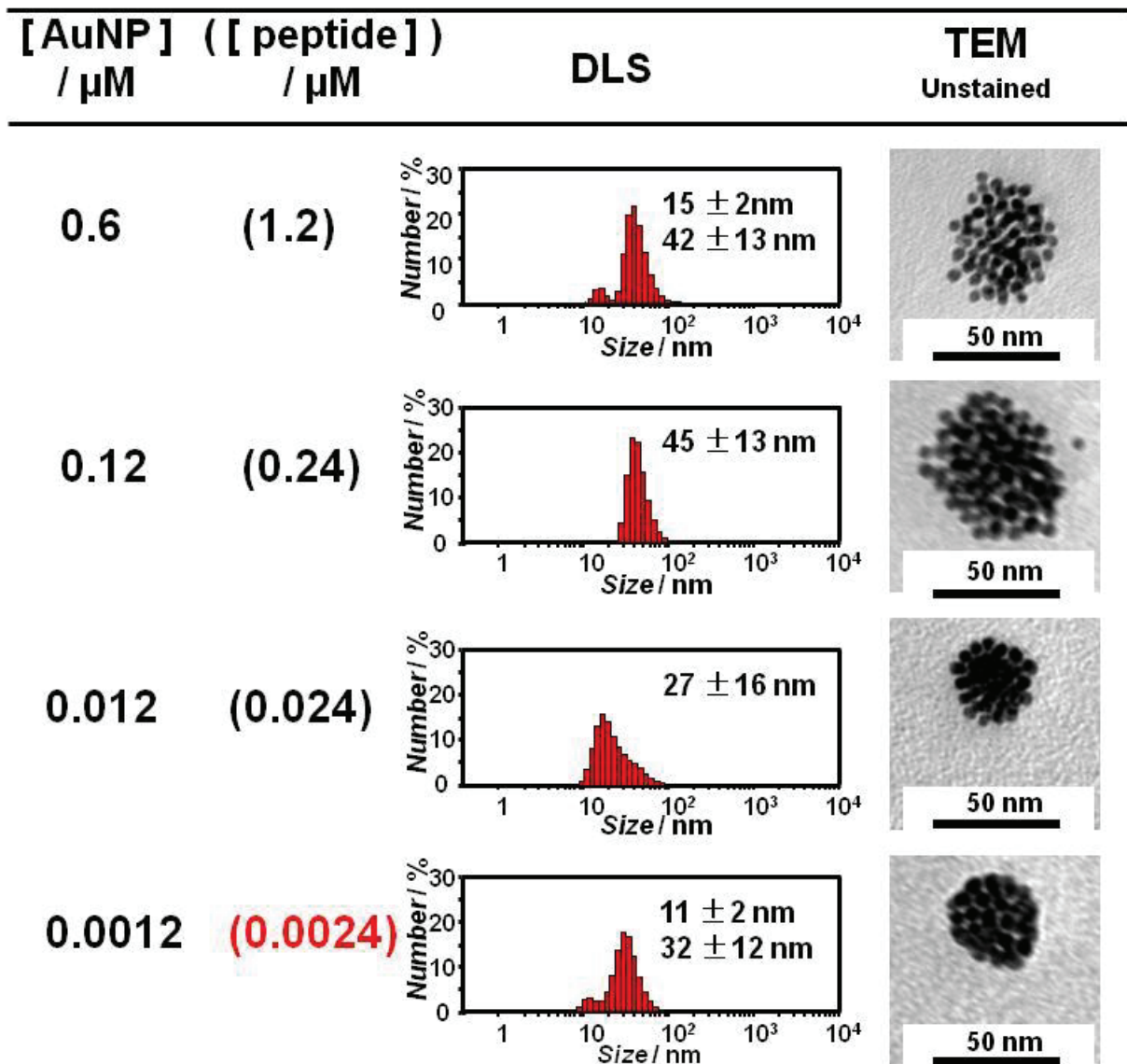


図 2-48. 各濃度の 5 nm AuNP-peptide conjugate 水溶液の自己集合挙動

各濃度の 5 nm AuNP-peptide conjugate 水溶液の DLS 測定結果、TEM 観察結果を図 2-48 にまとめた。1000 倍希釈しても、30 nm 程度の金ナノ粒子球状集合体が確認された。5 nm AuNP-peptide conjugate 水溶液のペプチド濃度が 0.0024 μM 以下というかなり低濃度でも球状集合体を形成した。 β -annulus- GGGCG ペプチドの臨界会合濃度は 29 μM であるため、約 1 万分の 1 の濃度でも集合体を形成したことがわかった。これらの結果から、金ナノ粒子を修飾することにより人工ウイルスキャプシドがかなり安定化されたことが示唆された。

2-4-5. AuNP-peptide conjugate の特性評価

DLS 測定と TEM 観察より、金ナノ粒子で表面が被覆された人工ウイルスキャプシドの構築が示唆された。次に、 ζ 電位測定により金ナノ粒子が人工ウイルスキャプシドの表面に存在するのを確認した。

【測定試料】

1 μM 金ナノ粒子懸濁液

透析後 5 nm AuNP-peptide conjugate 水溶液

[AuNP] = 1.2 μM , [peptide] = 2.4 μM

(透析後の[peptide]は透析の際に、ペプチドがすべて残ったと仮定したときの濃度)

【測定条件】

セル: DTS1061 Clear disposable zeta cell

温度: 25°C

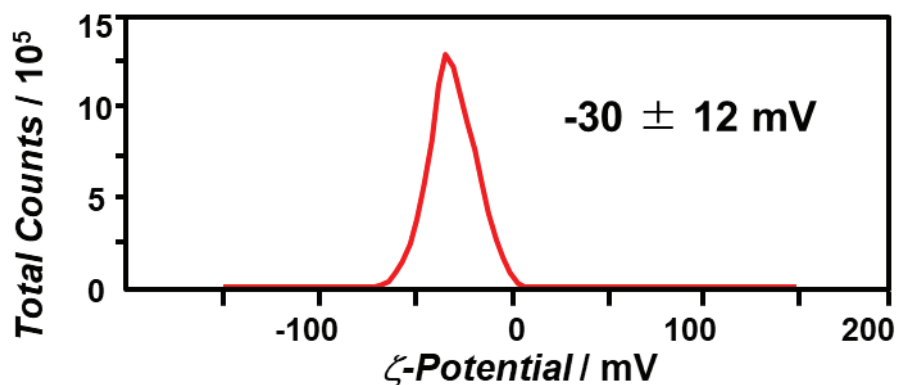


図 2-49. 1 μM 金ナノ粒子懸濁液の ζ -電位測定結果

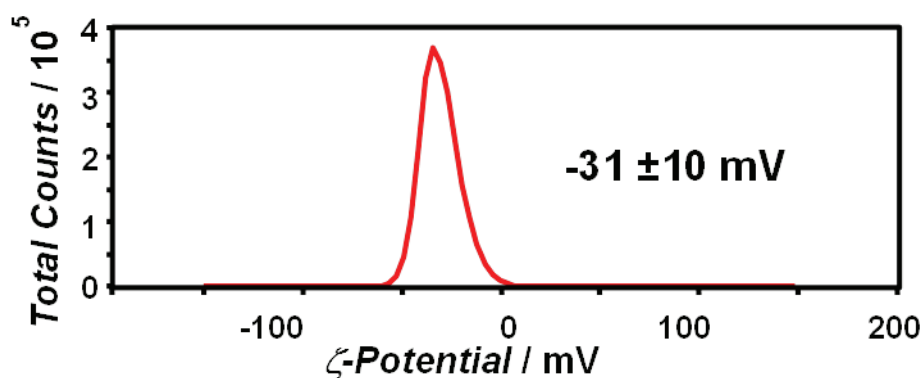


図 2-50. 透析後の 5 nm AuNP-peptide conjugate 水溶液の ζ -電位測定

図 2-49、図 2-50 より、5 nm 金ナノ粒子および 5 nm AuNP-peptide conjugate の表面電荷は、アニオン性を示すことが確認された。一方、同様の pH における β -annulus 24 ペプチドのみからなる人工ウイルスキャプシドは、ほぼ中性の ζ -電位を示すことがわかっている^{19(a)}。これらのことから、5 nm AuNP-peptide conjugate の表面電荷は 5 nm 金ナノ粒子の表面電荷を反映しており、金ナノ粒子がキャプシド表面に提示されていることが示唆された。

次に、AuNP-peptide conjugate の UV-vis スペクトル測定により、特性評価を行った。

【測定試料】

透析後 5 nm AuNP-peptide conjugate 水溶液

【測定条件】

セル: 光路長 1 mm 石英セル

測定範囲: 400 nm - 800 nm

温度: 25°C

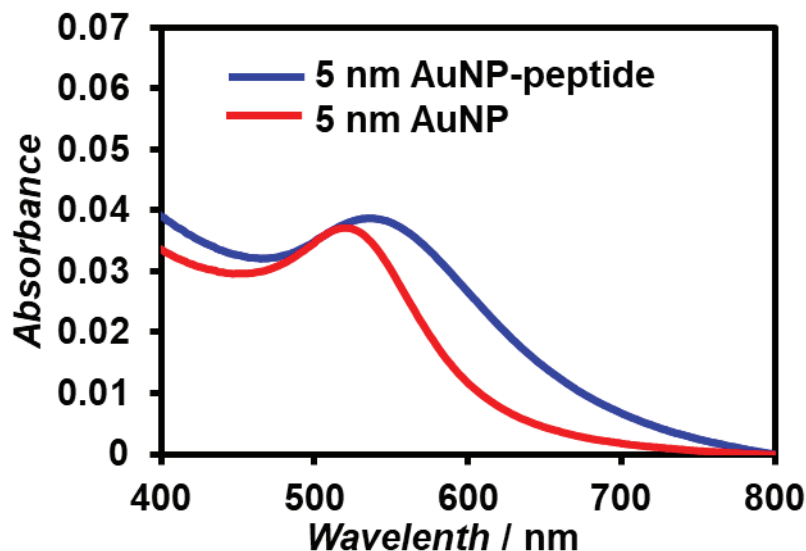


図 2-51. AuNP 水溶液, 透析後の AuNP-peptide conjugate 水溶液の UV-vis スペクトル

図 2-51 より 5 nm AuNP のみの UV-vis スペクトルと比較すると、5 nm AuNP-peptide conjugate の UV-vis スペクトルのピークトップが 10 nm 程長波長シフトしていることが確認された。このことから、金ナノ粒子間のプラズモンカップリングが示唆された。

2-4-6. まとめ²²⁾

Fmoc 固相合成法を利用して C 末端に GGGCG の 5 残基を導入した β -annulus-GGGCG peptide の合成に成功した。 β -annulus-GGGCG 水溶液の DLS 測定、CD スペクトル、TEM 観察より C 末端側に GGGCG 配列を付加しても、29 μ M 以上の濃度では β -annulus 24 と同様に水中では 30-50 nm 程度の球状集合体を形成していることが示された。

5 nm AuNP-peptide conjugate は水中で自己集合し、人工ウイルスキャプシドと思われる球状集合体を形成することがわかった。5 nm AuNP-peptide conjugate 水溶液のペプチド濃度が 0.0024 μ M 以下というかなり低濃度でも球状集合体を形成した。 β -annulus-GGGCG ペプチドの臨界面合濃度は 29 μ M であるため、約 1 万分の 1 の濃度以下でも集合体を形成したことになる。つまり、金ナノ粒子を修飾することにより人工ウイルスキャプシドがかなり安定化された。また、5 nm AuNP-peptide conjugate の ζ -電位測定により、人工ウイルスキャプシド表面に金ナノ粒子が提示されていることが示唆された。5 nm AuNP-peptide conjugate の UV-vis スペクトル測定から、金ナノ粒子のみの吸収波長より 10 nm 程長波長シフトしていることが確認された。このことから、金ナノ粒子間のプラズモンカップリングが示唆された。

参考文献

- 1) (a) A. P. Alivisatos, *J. Phys Chem.*, **100**, 13226 (1996); (b) T. Trindade, P. O'Brien, N. L. Pickett, *Chem. Mater.* **13**, 3843 (2001)
- 2) (a) C. E. Probst, P. Zrazhevskiy, V. Bagalkot, X. H. Gao, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 703 (2013); (b) K. D. Wegner, N. Hildebrandt, *Chem. Soc. Rev.*, **44**, 4792 (2015)
- 3) (a) T. Douglas, M. Young, *Science*, **312**, 873 (2006); (b) C. Chen, E. S. Kwak, B. Stein, C. C. Kao, B. Dragnea, *Journal of Nanosci. Nanotechnol.*, **5**, 2029 (2005); (c) S. K. Dixit, N. L. Goicochea, M. C. Daniel, A. Murali, L. Bronstein, M. De, B. Stein, V. M. Rotello, C. C. Kao, B. Dragnea, *Nano Lett.*, **6**, 1993 (2006); (d) X. L. Huang, L. M. Bronstein, J. Retrum, C. Dufort, I. Tsvetkova, S. Aniyagei, B. Stein, G. Stucky, B. McKenna, N. Remmes, D. Baxter, C. C. Kao, B. Dragnea, *Nano Lett.*, **7**, 2407 (2007); (e) A. A. Aljabali, F. Sainsbury, G. P. Lomonosoff, D. J. Evans, *Small*, **6**, 818 (2010); (f) L. M. Bronstein, *Small*, **7**, 1609 (2011); (g) D. Gao, Z. P. Zhang, F. Li, D. Men, J. Y. Deng, H. P. Wei, X. E. Zhang, Z. Q. Cui, *Int. J. Nanomedicine*, **8**, 2119 (2013)
- 4) T. Douglas, E. Strable, D. Willits, A. Aitouchen, M. Libera, M. Young, *Adv. Mater.*, **2002**, *14*, 415.
- 5) (a) N. F. Steinmetz, D. J. Evans, *Org. Biomol. Chem.* **5**, 2891 (2007) (b) L. S. Witus, M. B. Francis, *Acc. Chem. Res.*, **44**, 774 (2011)
- 6) Q. Wang, T. Lin, L. Tang, J. E. Johnson, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 459 (2002)
- 7) (a) K. Niikura, K. Nagakawa, N. Ohtake, T. Suzuki, Y. Matsuo, H. Sawa, K. Ijiri, *Bioconjugate Chem.*, **20**, 1848 (2009); (b) K. Nagakawa, K. Niikura, T. Suzuki, Y. Matsuo, Y. Igarashi, H. Sawa, K. Ijiri, *Chem. Lett.*, **41**, 113 (2012).
- 8) (a) A. S. Blum, C. M. Soto, C. D. Wilson, J. D. Cole, M. Kim, B. Gnade, A. Chatterji, W. F. Ochoa, T. W. Lin, J. E. Johnson, B. R. Ratna, *Nano Lett.*, **4**, 867 (2004); (b) C. M. Soto, A. S. Blum, C. D. Wilson, J. Lazorcik, M. Kim, B. Gnade, B. R. Ratna, *Electrophoresis*, **25**, 2901 (2004); (c) A. S. Blum, C. M. Soto, C. D. Wilson, T. L. Brower, S. K. Pollack, T. L. Schull, A. Chatterji, T. Lin, J. E. Johnson, C. Amsinck, P. Franzon, R. Shashidhar, B. R. Ratna, *Small*, **1**, 702 (2005)
- 9) M. Okochi, T. Sugita, S. Furusawa, M. Umetsu, T. Adschiri, H. Honda, *Biotechnol Bioeng*, **106**, 845 (2010)
- 10) M. Umetsu, M. Mizuta, K. Tsumoto, S. Ohara, S. Takami, H. Watanabe, I. Kumagai, T. Adschiri, *Adv. Matter.*, **17**, 2571 (2005)
- 11) N. Uekawa, A. Yamazaki, S. Ishii, T. Kojima, K. Kakegawa, *J. Ceram. Soc. Japan*, **118**, 96 (2010)
- 12) E. A. Meulenkaamp, *J. Phys. Chem. B*, **102**, 5566 (1998)
- 13) Z. W. Liang, X. A. Yu, B. F. Lei, P. Y. Liu, W. J. Mai, *J. Alloys Compounds*, **509**, 5437 (2011)
- 14) Y. Hu, H. J. Chen, *J. Nanopart. Res.*, **10**, 401 (2008)
- 15) M. Chang, X. L. Cao, H. Zeng, L. Zhang, *Chem. Phys. Lett.*, **446**, 370 (2007)
- 16) S. Fujita, K. Matsuura, *Nanomaterials*, **4**, 778 (2014)
- 17) C. Chen, J. Yao, R. A. Durst, *J. Nanopart. Res.*, **8**, 1033 (2006)
- 18) M. C. Garcia, R. F. Garman, S. W. Singaram, A. B. Shaul, C. M. Knobler, W. M. Gelbert, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 7510 (2014)
- 19) (a) K. Matsuura, K. Watanabe, K. Murasato, N. Kimizuka, *Polymer. J.*, **45**, 529 (2013); (b) K. Matsuura, T. Nakamura, K. Watanabe, T. Noguchi, K. Minamihata, N. Kamiya, N. Kimizuka, *Org.*

Biomol. Chem., **14**, 7869 (2016)

20) (a) 金城政孝, 生化学, 第 82 卷, 第 12 号, 1103-1116, (2010); (b) J. J. Chen, A. Miller, A. L.

Kirchmaier, J. M. K. Irudayaraj, *J. Cell Sci.*, **125**, 2954 (2012)

21) S. Fujita, K. Matsuura, *Chem. Lett.*, **45**, 922 (2016)

22) K. Matsuura, G. Ueno, S. Fujita, *Polymer J.*, **47**, 146 (2015)

第3章 表面にコイルドコイルの突起を有する人工ウイルスキャプシドの創製

3-1. 序

アデノウイルスやインフルエンザウイルスなどのある種の天然のウイルスは、キャプシド表面にタンパク質の突起を有しており、これにより細胞表面の受容体を選択的に認識することや、表面積が大きくなることで細胞内に取り込まれやすくなることが知られている。インフルエンザウイルスは3量体 α -ヘリックスコイルドコイルからなる突起状のヘマグルチニンを有しており、細胞表面上のガングリオシド認識により感染する¹⁾。アデノウイルスは、各キャプシド表面の各頂点に triple β -spiral 構造を有しており、これにより宿主細胞を認識する²⁾。近年、山下らは bacterium *Listeria innocua* (LisDps)由来の Dps protein と T4 bacteriophage 由来の cell punctuating needles (gp5C)を融合したタンパク質の自己集合により棘を有する球状構造体を人工的に構築した³⁾。

本研究では、突起を有するウイルスを模倣し、コイルドコイル状の突起を有する人工ウイルスキャプシドの創製を検討した(図 3-1)。まず、Native chemical ligation 法を用いて Woolfson によって開発された 2 量体ヘテロコイルドコイルを形成するペプチド⁴⁾を C 末端側に有する β -annulus ペプチド(β -annulus-coiled-coil-B)を合成し、コイルドコイル形成部位を有する人工ウイルスキャプシドを構築した。また、この人工ウイルスキャプシドに相補的なコイルドコイル形成ペプチド(coiled-coil-A)を加えることで、2 量体ヘテロコイルドコイルの突起を表面に有する人工ウイルスキャプシドを構築した。

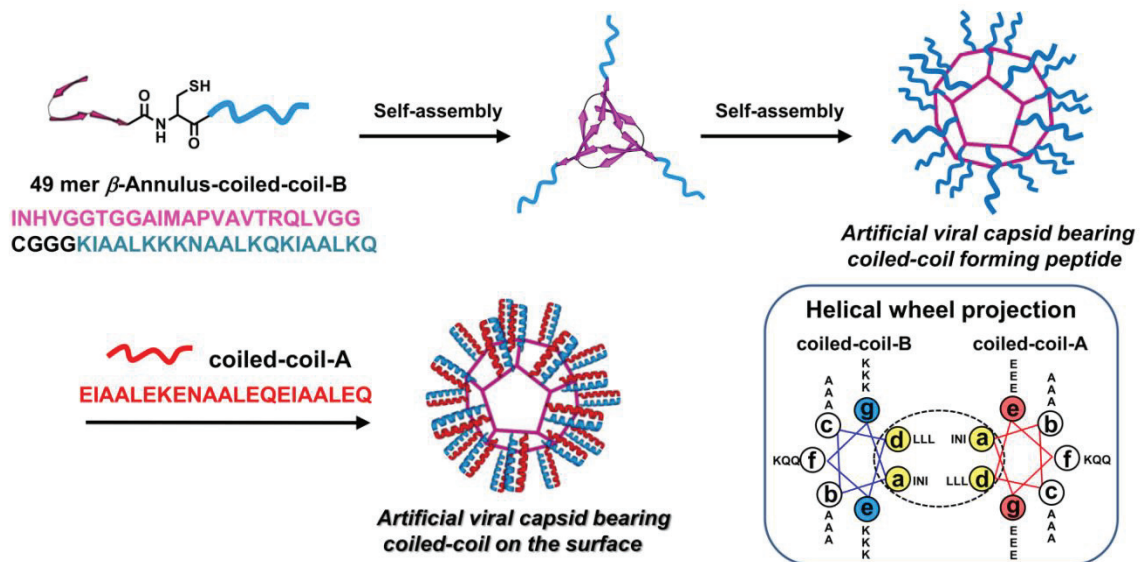


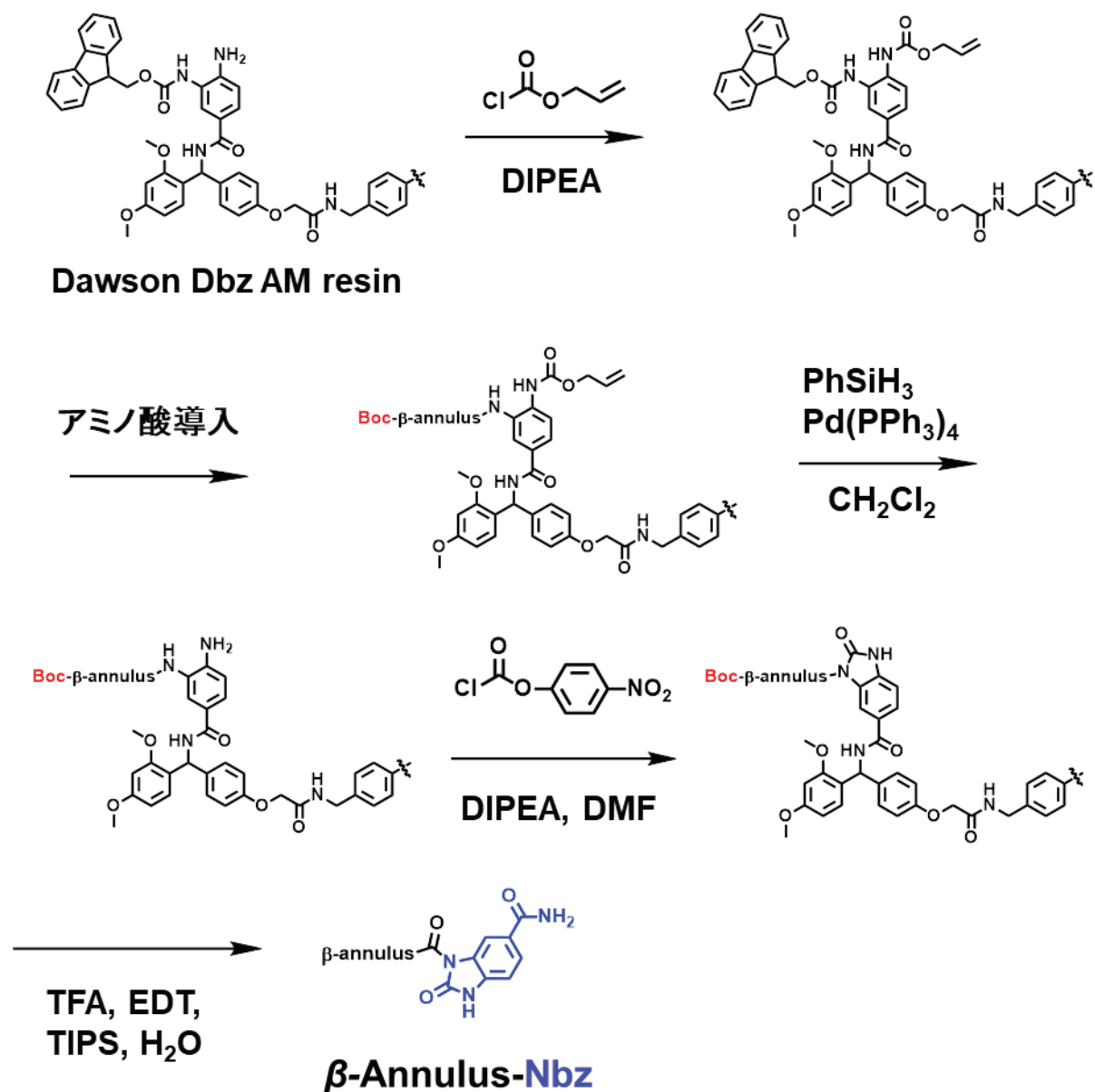
図 3-1. 表面にコイルドコイルの突起を有する人工ウイルスキャプシドの創製

β -annulus-coiled-coil-B ペプチド は残基数が 49 残基と多いため固相合成法では収率が著しく低くなると考えられる。そこで、Kent らによって報告されている中性水溶液中で混合させるだけでペプチド間を連結できる Native Chemical Ligation(NCL)法を用いて合成を行った⁵⁾。NCL 法とはC末端にチオエステルを持つペプチドと N末端に無保護システインを持つペプチドを S→N アシル基転位反応を伴って連結するという方法である。しかし、これまでの Native chemical ligation に用いるペプチドチオエステルの合成には、現在一般的な Fmoc 固相合成ではなく、Boc 固相合成が用いられていた。そこで、Dawson らによって報告されている Fmoc 固相合成法を用いて C末端に Nbz 基を有するペプチド活性エステル体を用いた NCL を用いた⁶⁾。脱樹脂と同時に活性エステルになることやライゲーシオンバッファー中でチオエステル化が進行し、one pot で NCL が進行するという利点を有するので、近年、この方法を用いた NCL が多数報告されている⁷⁾。

また、Woolfson らによって開発された coiled-coil-B ペプチドと coiled-coil-A ペプチドを一般的な Fmoc 固相合成により合成した。NCL に用いる coiled-coil-B ペプチドには N末端に Cys を付与した。また、Cys 残基と coiled-coil-B ペプチド配列の間に、NCL 反応中また人工ウイルスキャプシドに提示された後の立体障害を軽減させるために、リンカーである GGG を挿入している。

3-2. β -annulus-Nbz ペプチドの合成

ペプチド INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGG-Nbz 【Mw 2435】を、縮合剤に COMU を用いた Fmoc 固相合成法により Dawson resin 上に合成した。副反応をさけるため、アミノ酸を導入する前に Dawson resin 上の片方のアミンを Alloc 基で保護した⁸⁾。最後のアミノ酸に Boc-Ile を導入した後、ペプチド導入された樹脂に対して、フェニルシランとパラジウム触媒を加えて Alloc 基を除去した。その後、*p*-Nitrophenylchloroformate を加え活性エステル化した後、一般的なクリーベージカクテルにより脱樹脂することでペプチドの C 末端を Nbz 化したペプチドを得た。



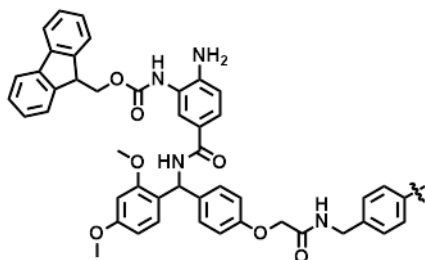
Scheme3-1. Dawson Dbz AM resin を用いた β -annulus-Nbz ペプチドの合成

【試薬】

樹脂

Dawson Dbz AM resin

【0.49 mmol/g, Novabiochem[®]】 102 mg (0.05 mmol)



アミノ酸

| | |
|-----------------------------------|--|
| Boc-Ile-OH | 【Mw 231.29, 渡辺化学工業】 46 mg (0.2 mmol) |
| Fmoc-Ile-OH | 【Mw 353.42, 渡辺化学工業】 71 mg (0.2 mmol) |
| Fmoc-Asn(Trt)-OH | 【Mw 596.69, 渡辺化学工業】 119 mg (0.2 mmol) |
| Fmoc-His(Trt)-OH | 【Mw 619.73, 渡辺化学工業】 124 mg (0.2 mmol) |
| Fmoc-Val-OH | 【Mw 339.39, 渡辺化学工業】 68 mg (0.2 mmol)×4 |
| Fmoc-Gly-OH | 【Mw 297.31, 渡辺化学工業】 59 mg (0.2 mmol)×5 |
| Fmoc-Thr(tBu)-OH | 【Mw 397.48, 渡辺化学工業】 79 mg (0.2 mmol)×2 |
| Fmoc-Ala-OH · H ₂ O | 【Mw 329.36, 渡辺化学工業】 66 mg (0.2 mmol)×3 |
| Fmoc-Met-OH | 【Mw 371.46, 渡辺化学工業】 74 mg (0.2 mmol) |
| Fmoc-Pro-OH · AcOEt | 【Mw 425.46, 渡辺化学工業】 85 mg (0.2 mmol) |
| Fmoc-Arg(Pbf)-OH · AcOEt · 0.21PE | 【Mw 669.29, 渡辺化学工業】 134 mg (0.2 mmol) |
| Fmoc-Gln(Trt)-OH | 【Mw 610.72, 渡辺化学工業】 122 mg (0.2 mmol) |
| Fmoc-Leu-OH | 【Mw 353.42, 渡辺化学工業】 71 mg (0.2 mmol) |

【実験操作】

1. 樹脂の膨潤

プラスチック製のカラムに Dawson resin を 102 mg (0.05 mmol)入れ、ジクロロメタンを 1 mL 加え、1 時間攪拌した。

2. Alloc 基保護

樹脂上のアミンに対して 7 当量のクロロギ酸アリル[東京化成工業]と 1 当量の DIPEA を無水ジクロロメタンに溶解させ、樹脂に加え 25°C で 24 時間反応させた。その後、ジクロロメタンにより洗浄を行った。クロラニルテストキットにより保護できていることを確認した。

3. 最初のアミノ酸の導入

樹脂状のアミンに対して 6 等量のアミノ酸、COMU [渡辺化学工業]、9 等量の DIPEA を NMP 1 mL に溶解させ樹脂に加え、90 分攪拌させた。その後、NMP で洗浄した。

4. Fmoc 基除去の確認

少量の樹脂をサンプル瓶中の DMF に懸濁させ、1% ピクリルスルホン酸 DMF 溶液を 2 滴、10% DIPEA DMF 溶液を 2 滴加えた。室温で 5 分放置し、樹脂が赤色に呈色していることを確認した。赤に呈色しない場合、操作 2 をもう一度行った。

5. アミノ酸の導入

樹脂状のペプチドに対して 4 等量のアミノ酸、COMU、8 等量の DIPEA、NMP 1 mL を加え溶解させた。それを樹脂の残ったカラムに加え、室温で 2 時間攪拌した。攪拌後、溶液を取り除き、残った樹脂を NMP で 5 回洗浄した。

6. アミノ酸の導入確認

少量の樹脂を DMF に懸濁させ、1% ピクリルスルホン酸 DMF 溶液を 1 滴、10% DIPEA DMF 溶液を 1 滴加えた。室温で 5 分放置し、樹脂が赤色に呈色していないことを確認した。赤に呈色した場合、操作 4 をもう一度行った。

4-6 の操作を INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGG というアミノ酸配列になるまで繰り返した。

7. 最後のアミノ酸(Boc-Ile-OH)の導入

樹脂上のペプチドに対して 4 等量の Boc-Ile-OH、COMU、8 等量の DIPEA、NMP 1 mL を加え溶解させた。それを樹脂の残ったカラムに加え、室温で 2 時間攪拌した。攪拌後、溶液を取り除き、残った樹脂を NMP で 5 回洗浄した。

8. 樹脂をジクロロメタンで洗浄した。樹脂上のペプチドに対して 20 当量の PhSiH_3 [東京化成工業]と 0.35 当量 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ [東京化成工業]をジクロロメタン 1 mL に溶解させ、樹脂に加え室温で 30 分間攪拌した。その後、ジクロロメタンで 5 回洗浄した。

9. 樹脂上のペプチドに対して 5 当量のクロロギ酸 4-ニトロフェニル[Sigma Aldrich]をジクロロメタン 500 μL に溶解、それを樹脂に加え、室温で 1 時間攪拌した。ジクロロメタンで樹脂を洗浄し、0.5 M DIPEA DMF 溶液 1 mL を加え 30 min 静置した。その後、DMF とジクロロメタンにより洗浄を行った。その後、ペプチドの脱保護・脱樹脂をクリーベージカクテルによって行った。

10. 脱樹脂・脱保護

50 mL ナスフラスコに TFA 1.175 mL、 H_2O 31.25 μL 、EDT 31.25 μL 、TIPS 12.5 μL を混合した。そこに、アミノ酸導入済み樹脂を全量の 49%を加え室温で 3 時間攪拌した。溶液を濾過し、溶媒留去した。これに *tert*-ブチルメチルエーテルを 15 mL 加え、遠心分離 (4000 rpm, 5 min)により、ペプチドを沈殿させた。この操作を 3 回行った。その後、凍結乾燥により白色粉末を得た。

理論収量: 59.7 mg 粗収量: 17.7 mg 粗収率: 30%

【MALDI-TOF-MS 測定】

Matrix: α -CHCA, Mode: Linear positive

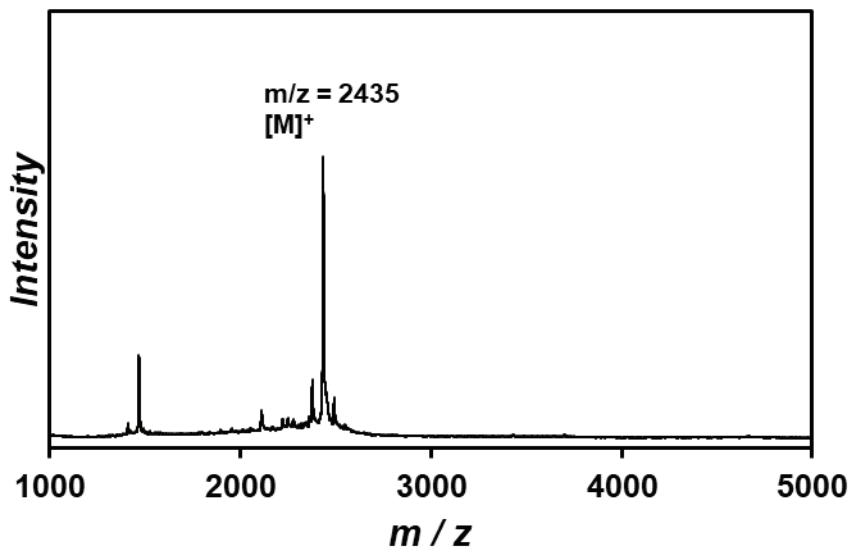


図 3-2. 粗 β -annulus-Nbz ペプチドの MALDI-TOF-MS (Matrix : α -CHCA)

図 3-2 より、目的ペプチドのピーク $m/z = 2435$ を確認した。目的物が確認できたため逆相 HPLC での精製を行った。

【分取条件】

試料: 粗ペプチド 5 mg を水 1 mL に溶かした溶液。

カラム: Inertsil ODS-3 (5 μ m, 20 \times 250 mm)

試料注入量: 5 mg/mL \times 1.5 mL

移動相溶媒: 水 / CH₃CN(ともに 0.1% TFA を含む)

移動相組成: 水 / CH₃CN: 77 / 23 \rightarrow 60 / 40 (100 min)、リニアグラジエント

検出: UV-vis 220 nm

流量: 10 mL/min

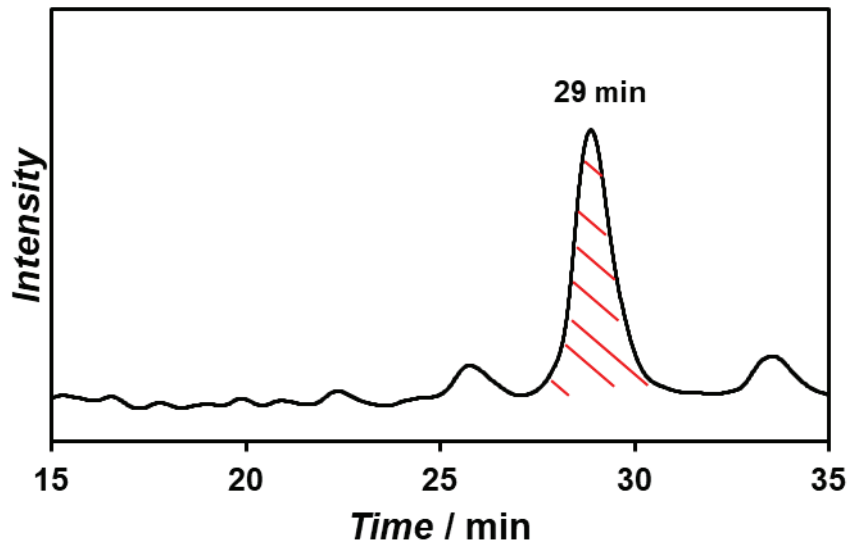


図 3-3. 分取時の HPLC チャート

図 3-3 の 29 分頃のピークを分取した。これを複数回繰り返した。得られた溶液を凍結乾燥し白色粉末を得た。

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: α -CHCA, Mode: Linear positive

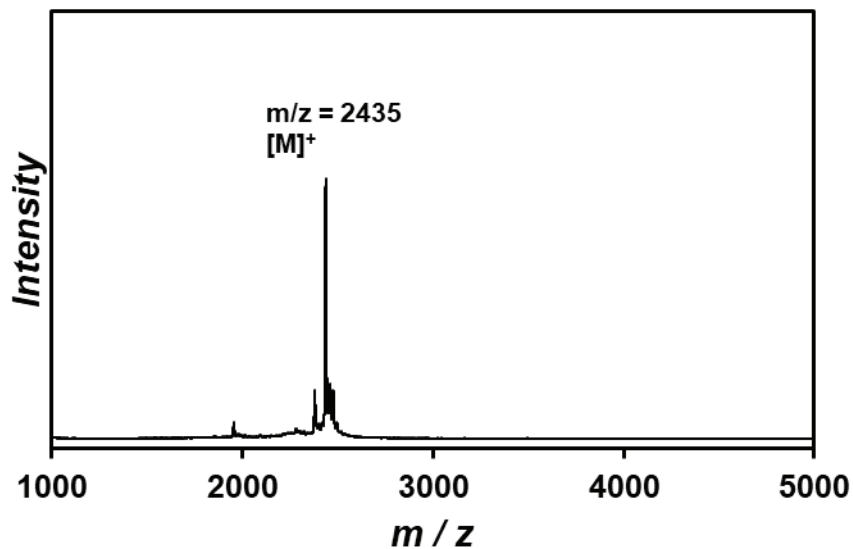


図 3-4. 精製した β -annulus-Nbz ペプチドの MALDI-TOF-MS (Matrix : α -CHCA)

図 3-4 より、目的ペプチドのピーク $m/z = 2435$ を確認した。

3-3. Coiled-coil-B ペプチドの合成

Native chemical ligation に使用するコイルドコイル形成ペプチド coiled-coil-B (H-CGGG KIAALKKKNAALKQKIAALKQ-NH₂)を、Fmoc 固相合成を用いて合成した。

【試薬】

樹脂

Rink amide resin 【0.55 mmol/g, 渡辺化学工業】 182 mg (0.1 mmol)

Fmoc アミノ酸

Fmoc-Ile-OH 【Mw 353.4, 渡辺化学工業】 142 mg (0.4 mmol)×2

Fmoc-Asn(Trt)-OH 【Mw 596.7, 渡辺化学工業】 238 mg (0.4 mmol)

Fmoc-Ala-OH · H₂O 【Mw 329.4, 渡辺化学工業】 132 mg (0.4 mmol)×6

Fmoc-Gln(Trt)-OH 【Mw 610.7, 渡辺化学工業】 244 mg (0.4 mmol) ×2

Fmoc-Leu-OH 【Mw 353.4, 渡辺化学工業】 142 mg (0.4 mmol) ×3

Fmoc-Lys(Boc)-OH 【Mw 468.6, 渡辺化学工業】 187 mg (0.4 mmol) ×7

Fmoc-Gly-OH 【Mw 297.3, 渡辺化学工業】 119 mg (0.4 mmol) ×3

Fmoc-Cys(Trt)-OH 【Mw 585.7, 渡辺化学工業】 234 mg (0.4 mmol)

【実験操作】

1. 樹脂の膨潤

プラスチック製のカラムに Rink amide resin を 182 mg (0.1 mmol)入れ、NMP を 2 mL 加え、90 分攪拌した。

2. Fmoc 基の除去

ピペリジン: DMF=20: 80 をカラムに 2 mL 加えて 15 分攪拌し、溶液を除去した。
この操作を 2 回繰り返す、NMP で 5 回洗浄した。

3. Fmoc 基除去の確認

少量の樹脂をサンプル瓶中の DMF に懸濁させ、1% ピクリルスルホン酸 DMF 溶液を 2 滴、10% DIPEA DMF 溶液を 2 滴加えた。室温で 5 分放置し、樹脂が赤色に呈色していることを確認した。赤に呈色しない場合、操作 2 をもう一度行った。

4. アミノ酸の導入

サンプル瓶に樹脂に対してアミノ酸、COMU を 4 等量、DIPEA を 8 等量、NMP 2 mL を加え溶解させた。それを樹脂の残ったカラムに加え、室温で 2 時間攪拌した。攪拌後、溶液を取り除き、残った樹脂を NMP で 5 回洗浄した。

5. アミノ酸の導入確認

少量の樹脂をサンプル瓶中の DMF に懸濁させ、1% ピクリルスルホン酸 DMF 溶液を 1 滴、10% DIPEA DMF 溶液を 1 滴加えた。室温で 5 分放置し、樹脂が赤色に呈色していないこと

を確認した。赤に呈色した場合、操作4をもう一度行った。

2-5の操作を目的のアミノ酸配列となるまで繰り返した。その後、ペプチドの脱保護・脱樹脂をクリーンページカクテルによって行った。

6. 脱樹脂・脱保護

50 mL ナスフラスコに TFA 1.175 mL、H₂O 31.25 μL、EDT 31.25 μL、TIPS 12.5 μL を混合した。そこに、アミノ酸導入済み樹脂を全量の 46.6% を加え室温で 3 時間攪拌した。溶液を濾過し、溶媒留去した。これに *tert*-ブチルメチルエーテルを 15 mL 加え、遠心分離 (4000 rpm, 5 min) により、ペプチドを沈殿させた。この操作を 3 回行った。その後、凍結乾燥により白色粉末を得た。

理論収量: 119 mg 粗収量: 46.8 mg 粗収率: 39.3%

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: α-CHCA, Mode: Linear positive

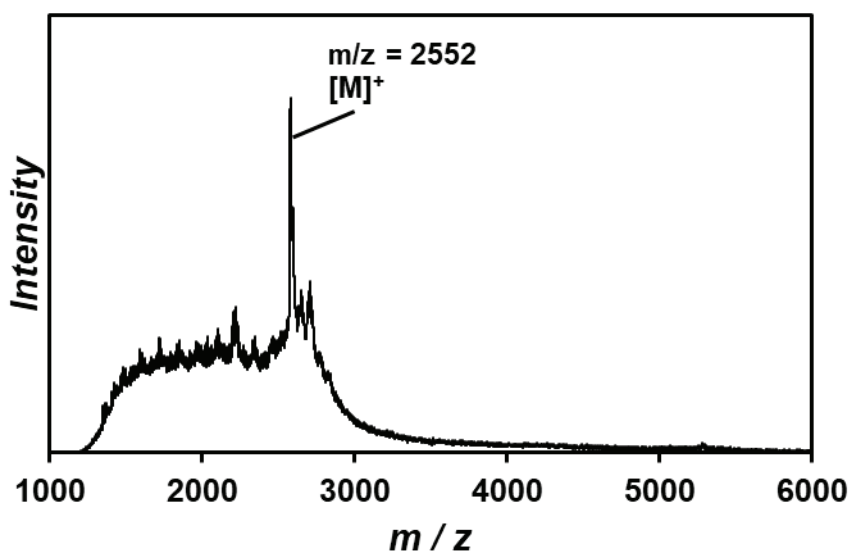


図 3-5. 粗 coiled-coil-B ペプチドの MALDI-TOF-MS (Matrix : α-CHCA)

図 3-5 より、目的ペプチドのピーク $m/z = 2552$ を確認した。目的物が確認できたため逆相 HPLC での精製を行った。

【分取条件】

試料: 粗ペプチド 5 mg を水 1 mL に溶かした溶液。

カラム: Inertsil ODS-3 (5 μ m, 20 \times 250 mm)

試料注入量: 1.5 mL

移動相溶媒: 水 / CH₃CN(ともに 0.1% TFA を含む)

移動相組成: 水 / CH₃CN: 85 / 15 \rightarrow 25 / 75 (100 min)、リニアグラジエント

検出: UV-vis 220 nm

流量: 10 mL/min

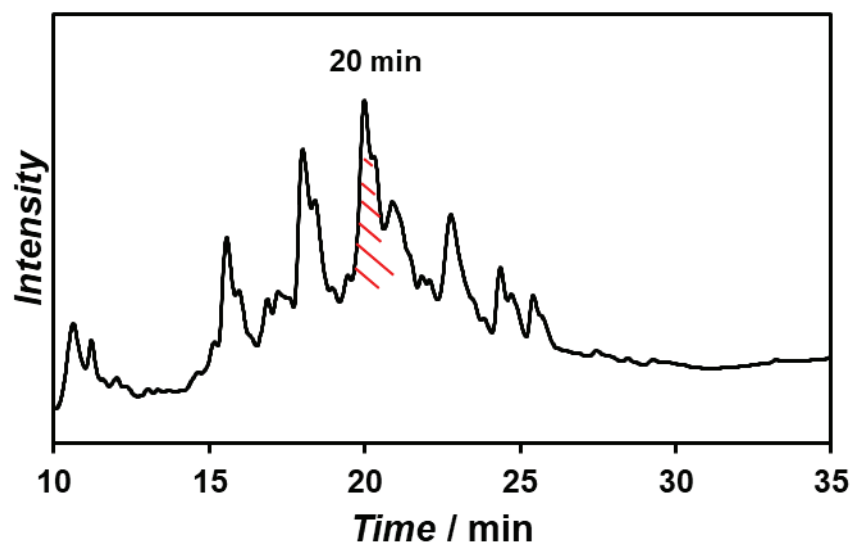


図 3-6. 分取時の HPLC チャート

図 3-6 の 20 分頃のピークを分取した。これを複数回繰り返した。得られた溶液を凍結乾燥し白色粉末を得た。

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: α -CHCA, Mode: Linear positive

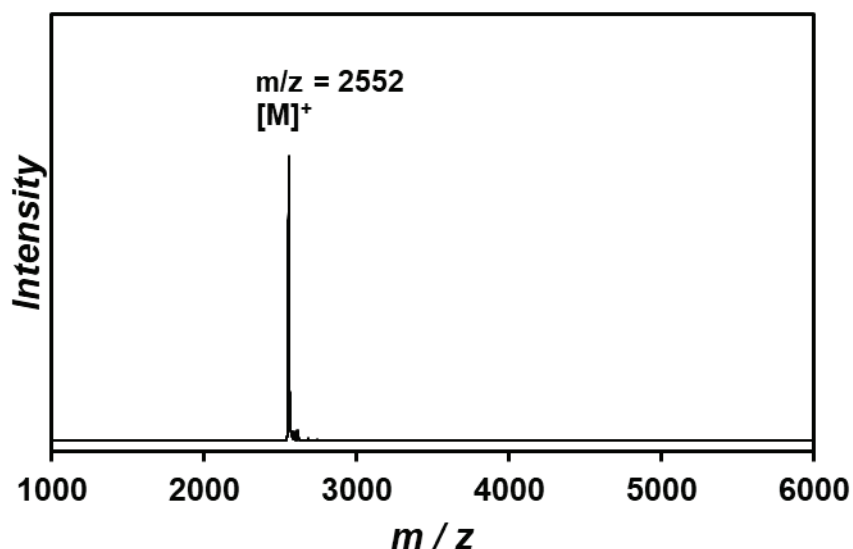


図 3-7. 精製後の coiled-coil-B ペプチドの MALDI-TOF-MS (Matrix : α -CHCA)

5. アミノ酸の導入確認

少量の樹脂をサンプル瓶中の DMF に懸濁させ、1% ピクリルスルホン酸 DMF 溶液を 1 滴、10% DIPEA DMF 溶液を 1 滴加えた。室温で 5 分放置し、樹脂が赤色に呈色していないことを確認した。赤に呈色した場合、操作 4 をもう一度行った。

2-5 の操作を目的のアミノ酸配列となるまで繰り返した。

6. アセチル化

樹脂上のペプチドに対して、無水酢酸を 3 当量、DIPEA 4.5 当量を DMF 2 mL に加えて溶解させた。それをカラムに加え、室温で 1 時間攪拌した。攪拌後、溶液を取り除き、残った樹脂を NMP で 5 回洗浄した。TNBS キットにより樹脂が赤色に呈色しないことを確認した。その後、ペプチドの脱樹脂をクリーンページカクテルによって行った。

7. 脱樹脂・脱保護

50 mL ナスフラスコに TFA 1.175 mL、H₂O 31.25 μ L、EDT 31.25 μ L、TIPS 12.5 μ L を混合した。そこに、アミノ酸導入済み樹脂を全量の 51% を加え室温で 3 時間攪拌した。溶液を濾過し、溶媒留去した。これに *tert*-ブチルメチルエーテルを 15 mL 加え、遠心分離 (4000 rpm, 5 min) により、ペプチドを沈殿させた。この操作を 3 回行った。その後、凍結乾燥により白色粉末を得た。

理論収量: 119 mg 粗収量: 54.4 mg 粗収率: 46%

【MALDI-TOF-MS 測定】

Matrix: α -CHCA, Mode: Linear positive

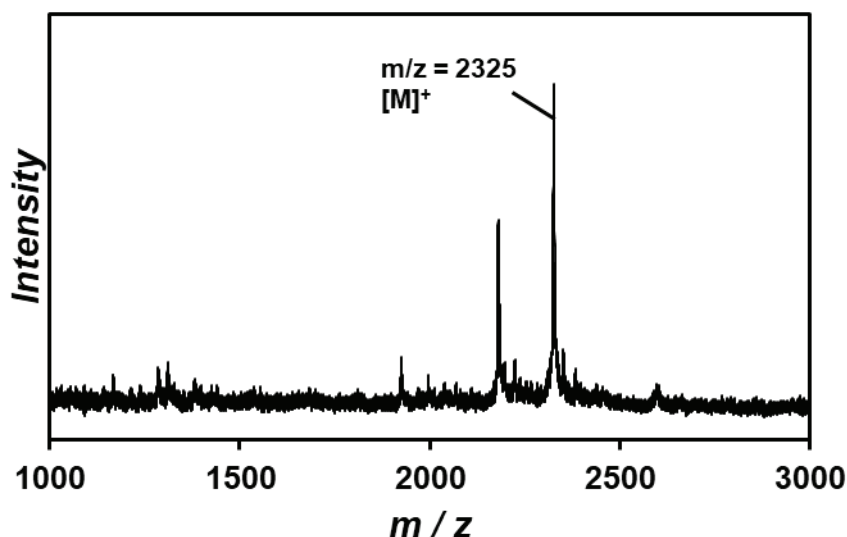


図 3-8. 粗 coiled-coil-A ペプチドの MALDI-TOF-MS (Matrix : α -CHCA)

図 3-8 より、目的ペプチドのピーク $m/z = 2325$ を確認した。一方で、 $m/z = 2179$ は目的物よりアミノ酸が抜けた不純物であると考えられる。粗 coiled-coil-A ペプチドを逆相 HPLC によって精製した。

【分取条件】

試料: 粗ペプチド 5 mg を水 1 mL に溶かした溶液。

カラム: Inertsil ODS-3 (5 μm , 20 \times 250 mm)

試料注入量: 5 mg/mL \times 1.5 mL

移動相溶媒: 水 / CH₃CN(ともに 0.1% TFA を含む)

移動相組成: 水 / CH₃CN: 65 / 35 \rightarrow 50 / 50 (100 min)、リニアグラジエント

検出: UV-vis 220 nm

流量: 10 mL/min

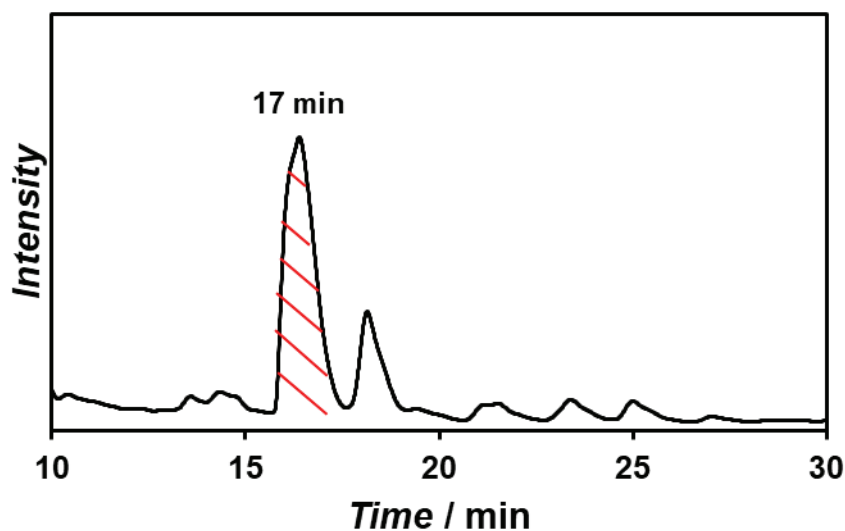


図 3-9 分取時の HPLC チャート

図 3-9 の 17 分頃のピークを分取した。これを複数回繰り返した。得られた溶液を凍結乾燥し白色粉末を得た。

【MALDI-TOF-MS 測定】

Matrix: α -CHCA, Mode: Linear positive

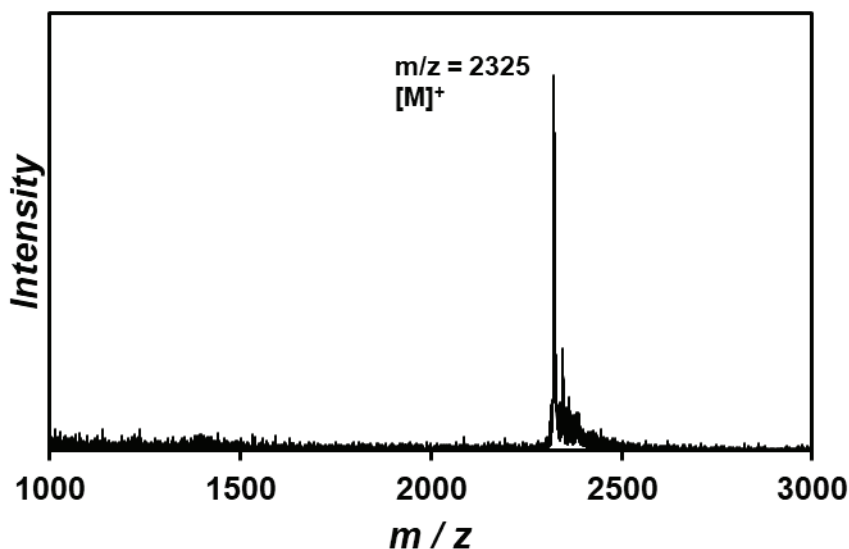


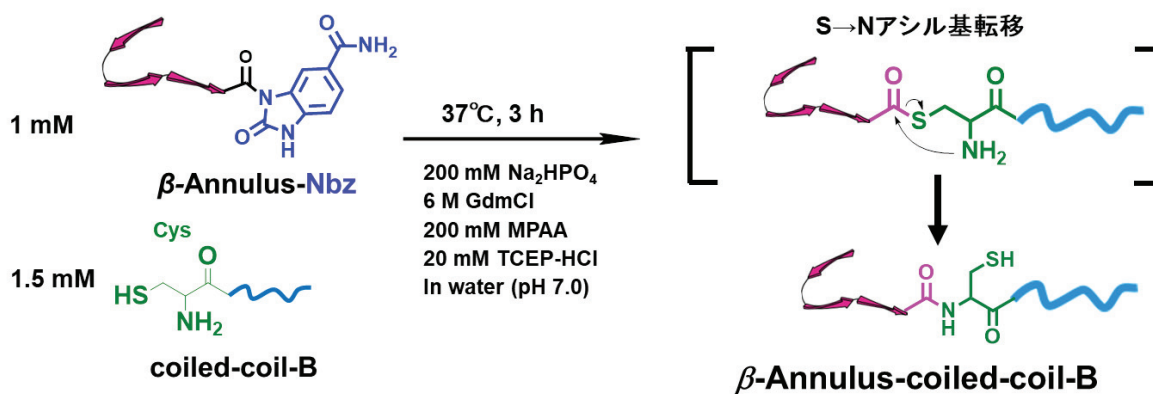
図 3-10. 分取時の MALDI-TOF-MS (Matrix : α -CHCA)

図 3-10 より、目的ペプチドのピーク $m/z = 2325$ を確認した。

理論収量: 119 mg 粗収量: 5.7 mg 粗収率: 6.8%

3-5. Native chemical ligation 法を用いたペプチドの連結

まず、Dawson の報告⁹⁾通りに、合成した β -annulus-Nbz ペプチドと N 末端に Cys を有する coiled-coil-B ペプチドを Native chemical ligation による連結を試みた(Scheme 3-2)。



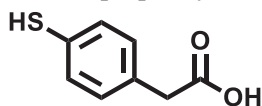
Scheme3-2. β -annulus-Nbz ペプチドを用いた NCL

【実験操作】

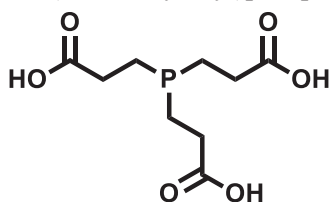
Guanidine hydrochloride [GdmCl] = 6 M、4-Mercaptophenylacetic acid [MPAA] = 200 mM、Tris(2-carboxyethyl)phosphine [TCEP] = 20 mM、 $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 200 \text{ mM}$ となるように各物質を脱気した水に溶解させ、混合液を調製した。この混合液に 10 M NaOH in 200 mM Na_2HPO_4 水溶液を加え pH を 7.0 に調整し、Ligation buffer (LB) を調製した。ペプチドをそれぞれ LB に溶解させ、2 mM β -annulus-Nbz in LB と 3 mM coiled-coil-B in LB を調製した。この溶液を 5 μL ずつ混合し、37°C で 3 時間インキュベートした。3 時間後、1% TFA 含有水: アセトニトリル=1:1 混合液を 10 μL 加えて反応を止めた。対照実験として、1.5 mM coiled-coil-B のみを LB 中で同条件下インキュベートした溶液、LB のみを同条件下インキュベートした溶液も調製した。これらの反応後の溶液を HPLC により分析を行った。

【試薬】

4-Mercaptophenylacetic acid (MPAA) [Sigma Aldrich]



Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) [和光純薬工業]



【分析条件】

試料: NCL 反応後の溶液

カラム: Inertsil ODS-3 (5 μm , 4.6 \times 250 mm)

試料注入量: 10 μL

移動相溶媒: 水 / CH_3CN (ともに 0.1% TFA を含む)

移動相組成: 水 / CH_3CN : 95 / 5 \rightarrow 0 / 100 (95 min)、リニアグラジエント

検出: UV-vis 220 nm

流量: 1 mL/min

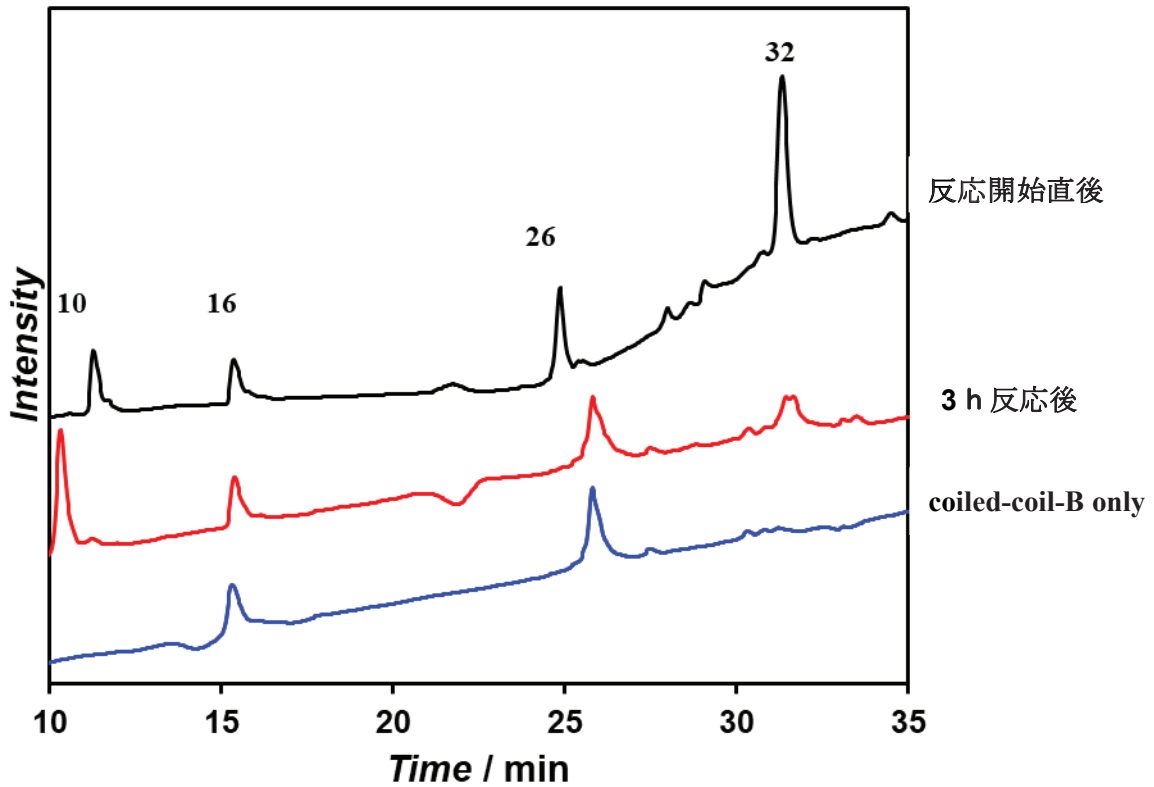


図 3- 11. NCL 反応開始直後(黒)、反応 3 時間後(赤)、coiled-coil-B ペプチドのみ(青)の HPLC チャート

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: α -CHCA, Mode: Linear positive

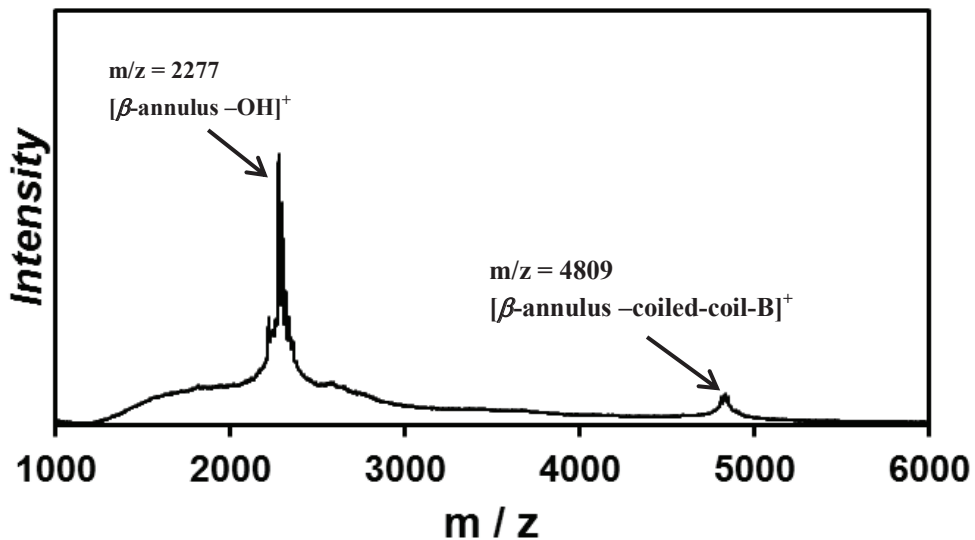
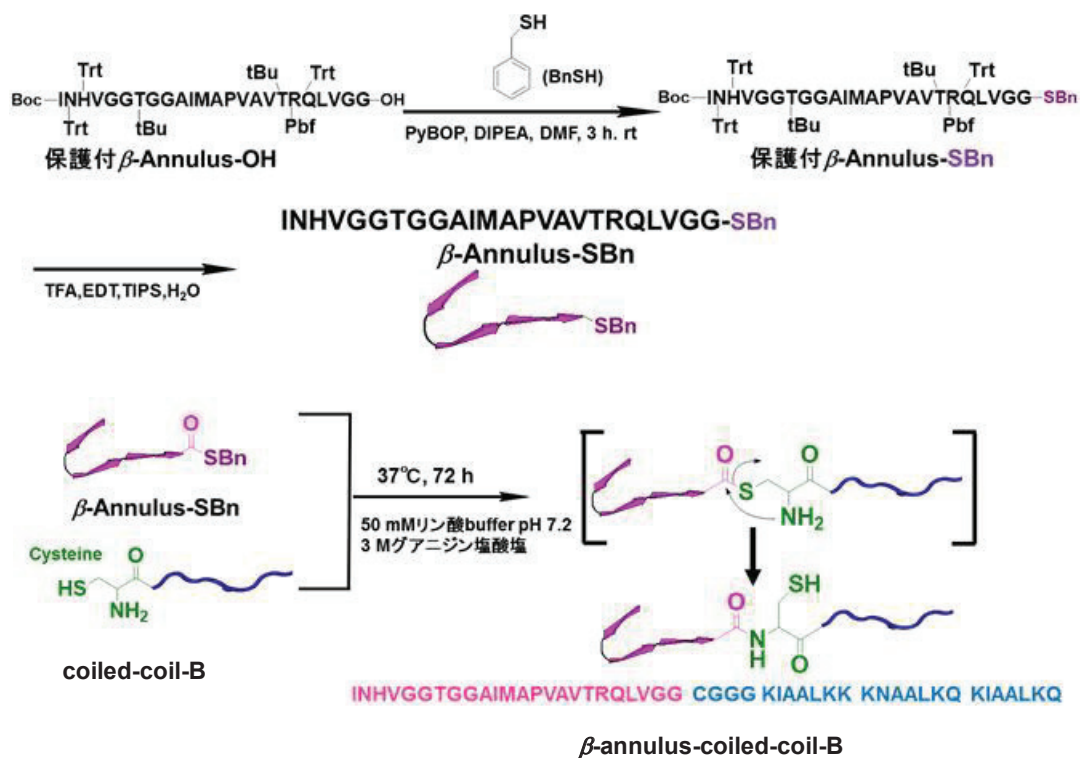


図 3- 12. 32分頃のピークの MALDI-TOF-MS (Matrix: α -CHCA)

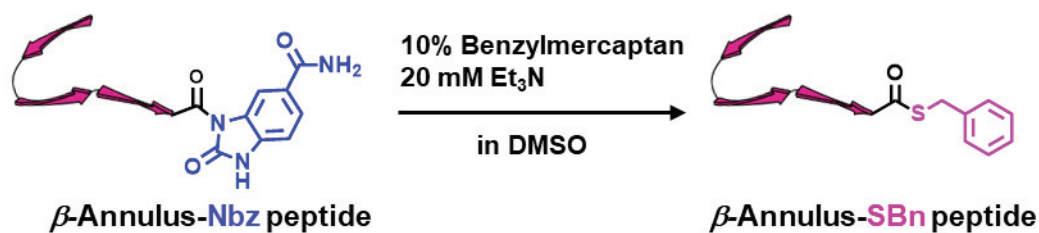
図 3-12 より、図 3-11 赤の 32 分のピークから目的物である $m/z = 4809$ が確認され、 β -annulus-coiled-coil-B ペプチドが生成していることが確認された。一方、 $m/z = 2277$ に、反応中間体 β -annulus-MPAA が加水分解されて生じたと考えられる副生成物 β -annulus-OH 由来のピークも確認された。coiled-coil-B ペプチドのみ(図 3-11 青)と NCL 反応 3 時間後(図 3-11 赤)の HPLC

チャートを比較したところ、26 min 頃の coiled-coil-B ペプチド由来のピークは、ほとんどピーク面積が変化していないことが確認された。これらより、多少目的物が形成していると思われるが、副反応である加水分解の方がより進行しており、 β -annulus-OH が主生成物として得られていると考えられる。そこで、触媒 MPAA の濃度を変化や、反応時間、温度、ペプチド濃度など種々の条件で合成を試みたが、加水分解物が主生成物として得られ、目的物である β -annulus-coiled-coil-B ペプチドを主生成物として得ることができなかった。

当研究室の山本は、樹脂から保護基付きの β -annulus-OH を切り出し、これと Benzylmercaptan を縮合させ保護基付きの β -annulus-SBn ペプチドを合成、その後脱保護を行い、HPLC 分取で精製、その後 NCL に用いていた(Scheme 3-3)⁹⁾。山本の HPLC からは加水分解物が見られなかったことから、 β -annulus-SBn ペプチドは加水分解しにくいと考えられる。この方法の欠点は、保護基付きの β -annulus-OH が溶媒 DMF に溶解せず、チオエステル化効率が悪いところであった。一方で、 β -annulus-Nbz ペプチドは有機溶媒によく溶け、また縮合剤なしにチオエステル化できるという利点を有する。また、水に不溶なペプチドチオエステルが塩基存在下で DMF や DMSO といった有機溶媒中で NCL が進行するという報告がされている¹⁰⁾。そこで、有機溶媒中で β -annulus-Nbz ペプチドと Benzylmercaptan を混合し β -annulus-SBn ペプチドを調製して反応に用いれば、加水分解物が減り、効率よく目的物が得られるのではないかと考えた。まず、塩基存在下の有機溶媒中での β -annulus-SBn ペプチドの合成を行った(Scheme 3-4)。



Scheme3-3. 山本が卒業研究で行った NCL のスキーム



Scheme3-4. β -annulus-Nbz ペプチドから β -annulus-SBn ペプチドへの変換

【実験操作】

乾燥させた粗 β -annulus-Nbz 粉末 5.0 mg に、20 mM Triethylamine, 10% Benzylmercaptan DMSO 溶液 1 mL を加え、15 分、37°C でインキュベートした。その後、酢酸エチルを 9 mL 加えて遠心分離(5000 rpm, 5 min)を行った。遠心分離後、上澄み液を除去した。この操作を 3 回繰り返した。得られた白色沈殿を減圧乾燥させた。そこに、水を 2 mL 加えて HPLC を行った。

理論収量: 4.9 mg 収量: 3.4 mg 収率: 70%

【分析条件】

試料: 反応後の溶液

カラム: Inertsil ODS-3 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm)

試料注入量: 10 μ L

移動相溶媒: 水 / CH₃CN(ともに 0.1% TFA を含む)

移動相組成: 水 / CH₃CN: 95 / 5 \rightarrow 0 / 100 (95 min)、リニアグラジエント

検出: UV-vis 220 nm

流量: 1 mL/min

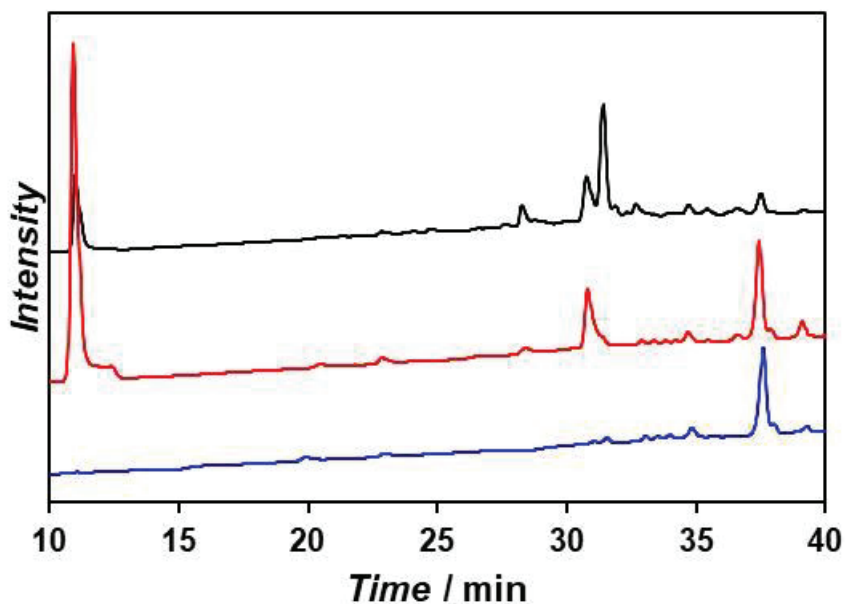


図3-13. チオエステル化反応直後(黒)、反応15分後(赤)、再沈殿操作後(青)のHPLCチャート

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: α -CHCA, Mode: Linear positive

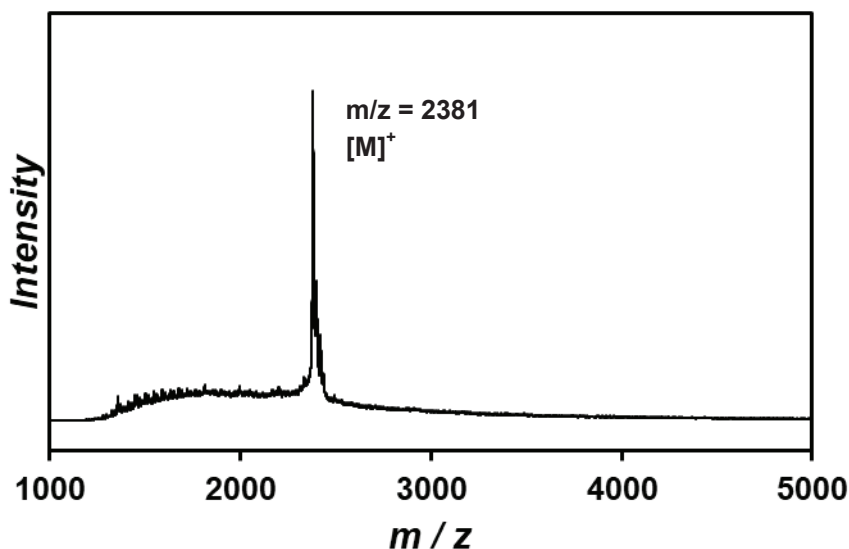
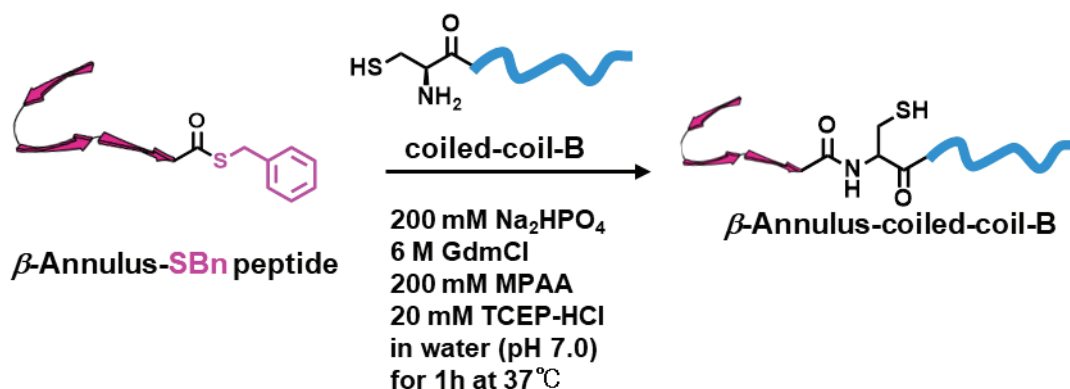


図 3-14. チオエステル化反応 15 分後の HPLC の 38 分頃のピークより得られた MALDI-TOF-MS

図 3-13 赤より 31 分ごろの β -annulus-Nbz ペプチドのピークが消失し、38 分ごろに新たなピークが生じた。図 3-14 より、38 分ごろのピークから β -annulus-SBn ペプチド由来の $m/z = 2381$ が確認されたため、チオエステル化反応が進行したことが確認された。また図(青)より、再沈殿操作後には 31 分ごろに確認された DMSO 由来のピークと脱離した Nbz 由来のピークが消失し、 β -annulus-SBn ペプチド由来のピークのみが確認された。そこで、この β -annulus-SBn ペプチドを用いて、NCL 反応を行った(Scheme 3-5)。



Scheme3-5. β -annulus-SBn ペプチドを用いた NCL

【実験操作】

Guanidine hydrochloride [GdmCl] = 6 M、4-Mercaptophenylacetic acid [MPAA] = 200 mM、Tris(2-carboxyethyl)phosphine [TCEP] = 20 mM、 $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 200$ mM となるように各物質を脱気した水に溶解させ、混合液を調製した。この混合液に 10 M NaOH in 200 mM Na_2HPO_4 水溶液を加え pH を 7.0 に調整し、Ligation buffer (LB) を調製した。ペプチドを LB にそれぞれ溶解させ、2 mM β -annulus-SBn in LB と 3 mM coiled-coil-B in LB を調製した。この溶液を 5 μL ずつ混合し、37°C

で1時間インキュベートした。3時間後、1% TFA 含有水: アセトニトリル=1:1 混合液を 10 μ L 加えて反応を止めた。

【分析条件】

試料: 反応後の溶液

カラム: Inertsil ODS-3 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm)

試料注入量: 10 μ L

移動相溶媒: 水 / CH₃CN(ともに 0.1% TFA を含む)

移動相組成: 水 / CH₃CN: 95 / 5 \rightarrow 0 / 100 (95 min)、リニアグラジエント

検出: UV-vis 220 nm

流量: 1 mL/min

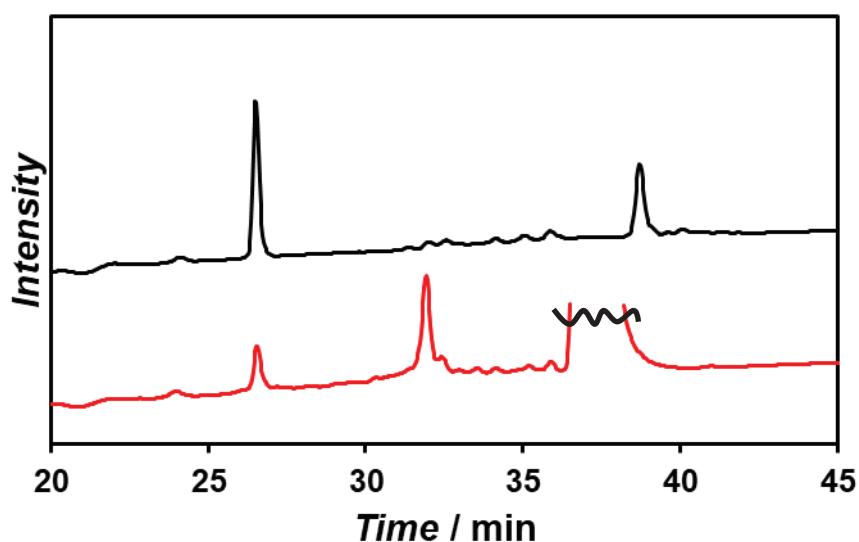


図 3- 15. coiled-coil-B ペプチドと β -annulus-SBn ペプチド混合溶液(黒)、NCL 反応 1 時間後(赤)

図 3-15 より、反応 1 時間後、HPLC チャートから 27 min の coiled-coil-B ペプチドと 38 min の β -annulus-SBn ペプチド由来のピークが消失し、32 min に新たなピークが確認された。このピーク成分の MALDI-TOF-MS を図 3-16 に示す。なお、36-39 min の大きなピークは、MPAA 由来である。

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: α -CHCA, Mode: Linear positive

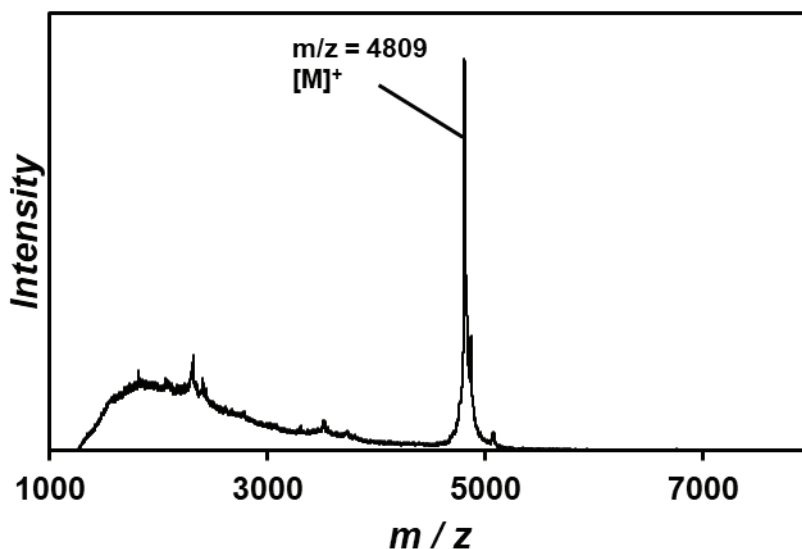


図 3-16. NCL 反応 1 時間後の HPLC の 32 分頃のピークより得られた MALDI-TOF-MS

図 3-16 より、目的物 β -annulus-coiled-coil-B ペプチドが生成していることが分かった。そこで、HPLC による分取により精製を行った。

【分取条件】

試料: NCL 反応後の溶液

カラム: Inertsil ODS-3 (5 μ m, 20 \times 250 mm)

試料注入量: 1 mL

移動相溶媒: 水 / CH₃CN(ともに 0.1% TFA を含む)

移動相組成: 水 / CH₃CN: 80 / 20 \rightarrow 60 / 40 (100 min)、リニアグラジエント

検出: UV-vis 220 nm

流量: 10 mL / min

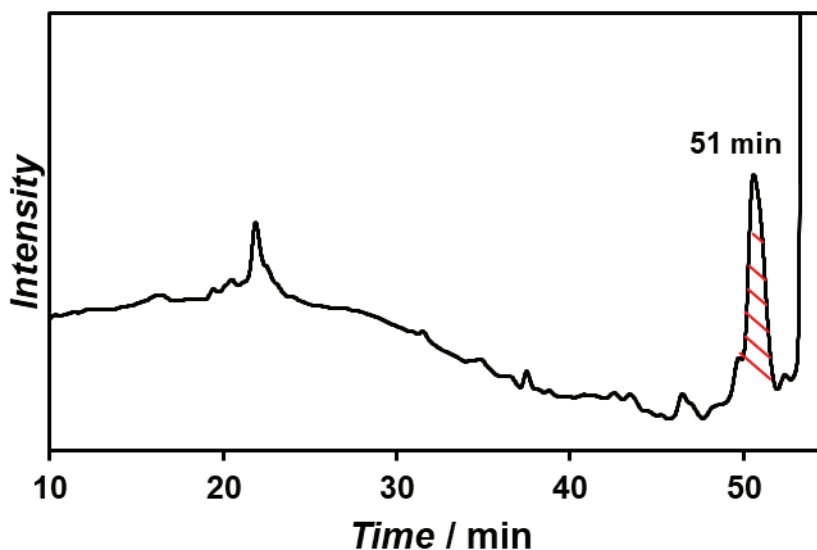


図 3-17. 分取時の HPLC チャート

図 3-17 の赤色で塗りつぶした保持時間 51 min のピークを採取した。

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: α -CHCA, Mode: Linear positive

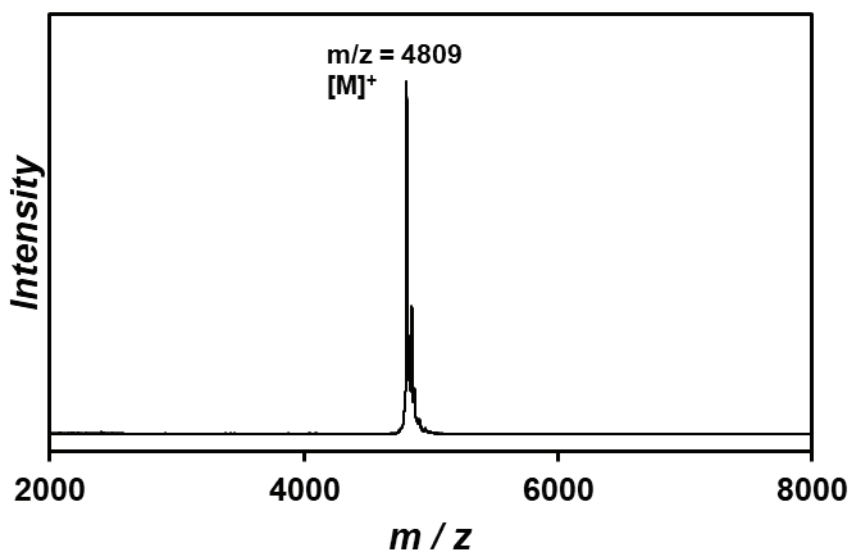


図 3-18. 精製後の MALDI-TOF-MS (Matrix: α -CHCA)

図 3-18 より、 β -annulus-coiled-coil-B ペプチドの分子量である $m/z=4809$ が確認された。副生成物、未反応物が見られなかったため、目的物を単離することができたと考えられる。

理論収量: 2.4 mg, 収量: 1.0 mg, 収率: 41.7%

3-6. β -annulus-coiled-coil-B ペプチドの自己集合挙動

10 mM Tris-HCl buffer 中において β -annulus-coiled-coil-B ペプチドがどのようなサイズの集合体を形成するのかを動的光散乱(DLS)測定によって評価した。また、集合体の大きさの濃度依存性についても調べた。

【実験操作】

凍結乾燥した β -annulus-coiled-coil-B ペプチド粉末に 10 mM Tris-HCl buffer を加え、50 μ M β -annulus-coiled-coil-B ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)を調製した。それを希釈し、75, 50, 25, 10, 5, 1 μ M β -annulus-coiled-coil-B ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)を調製した。調製後 25°C で 1 時間インキュベートし、DLS 測定を行った。

【DLS 測定条件】

セル: ZEN2112 - Low volume glass cuvette (12 μ L)

温度: 25°C

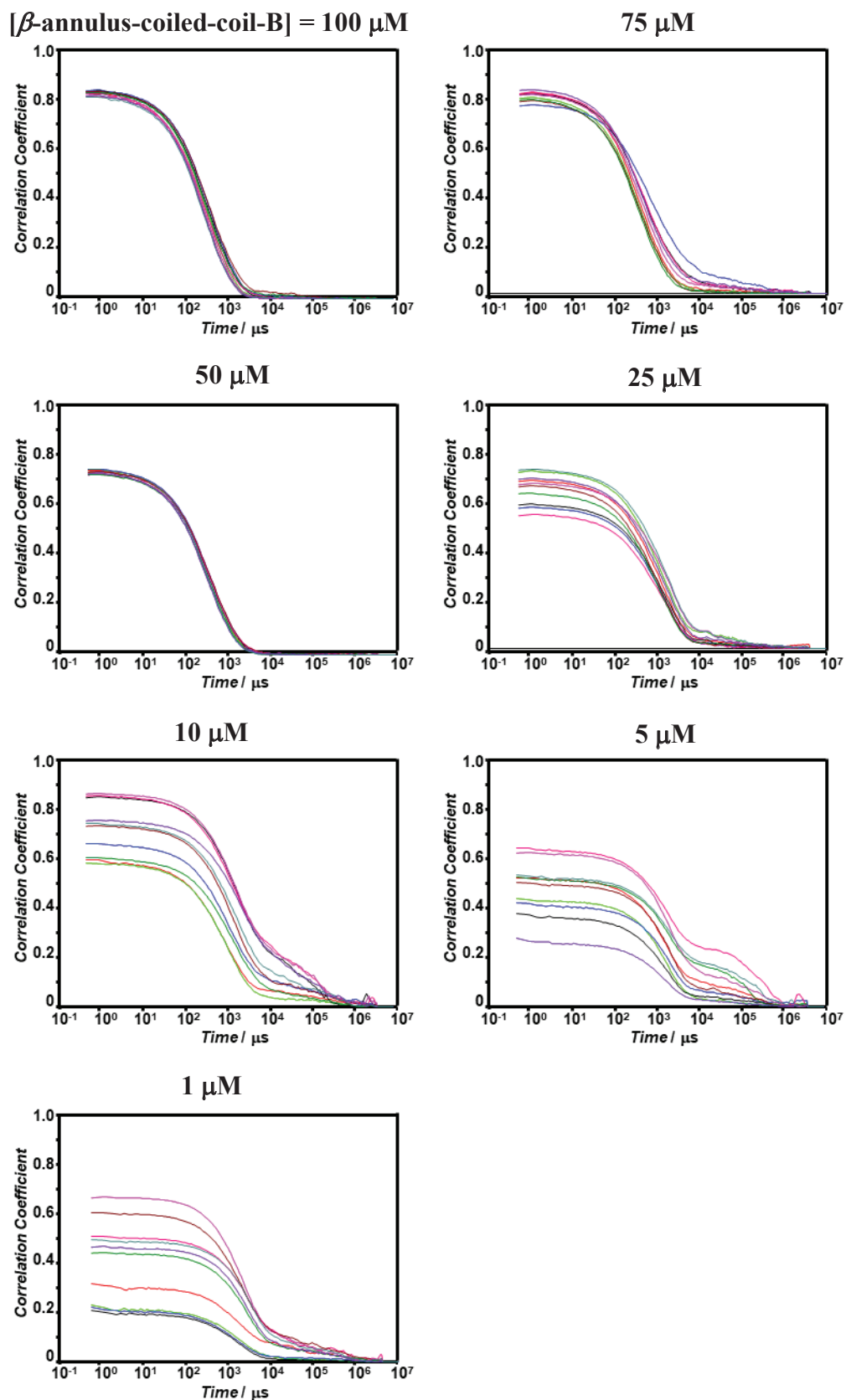


図3-19. 各濃度における β -annulus-coiled-coil-Bペプチド Tris-HCl buffer (pH 7.4)溶液の DLS 測定から得られた自己相関関数

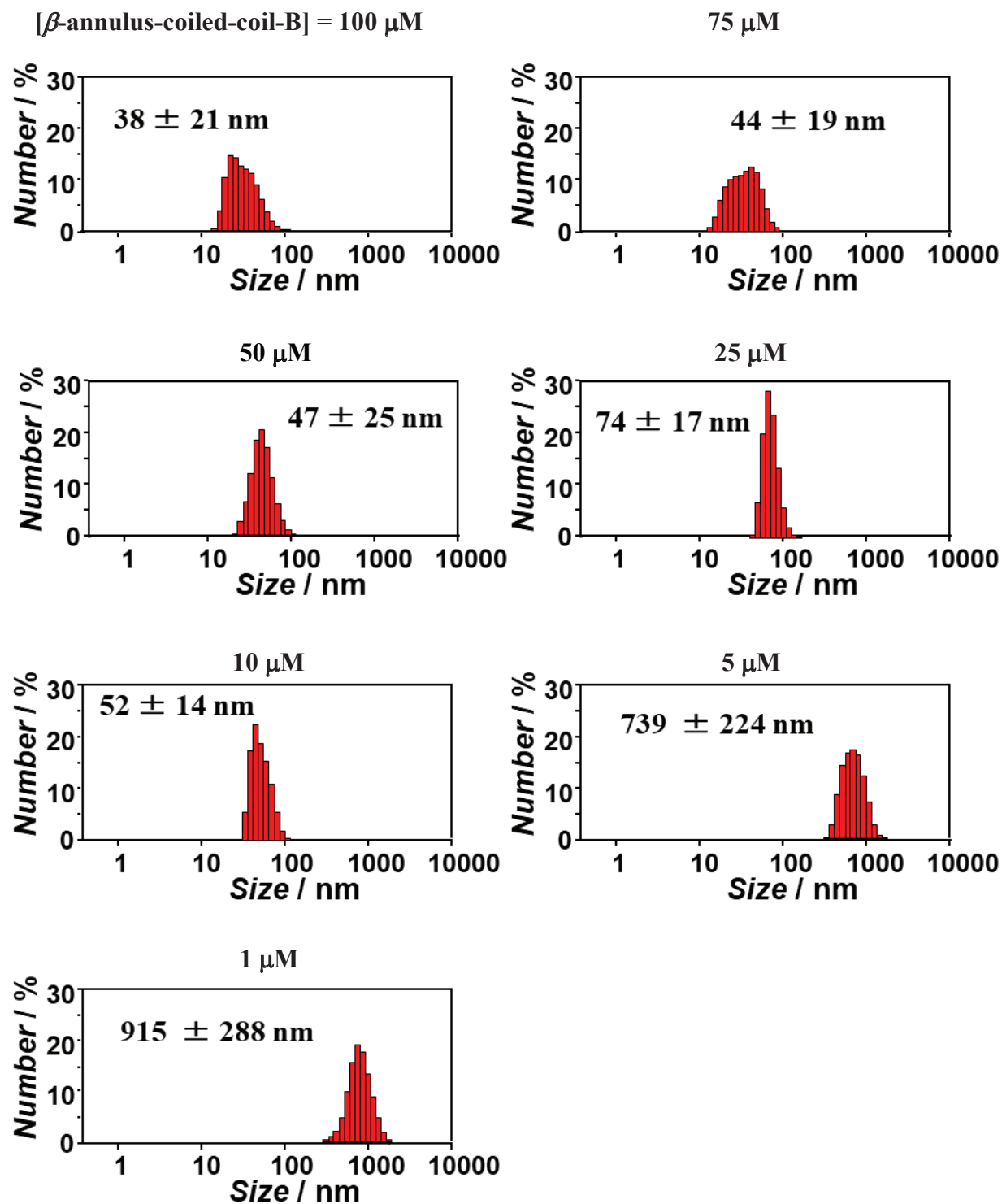


図3-20. 各濃度における β -annulus-coiled-coil-B ペプチド Tris-HCl buffer 溶液(pH 7.4)の DLS 測定から得られた個数換算分布

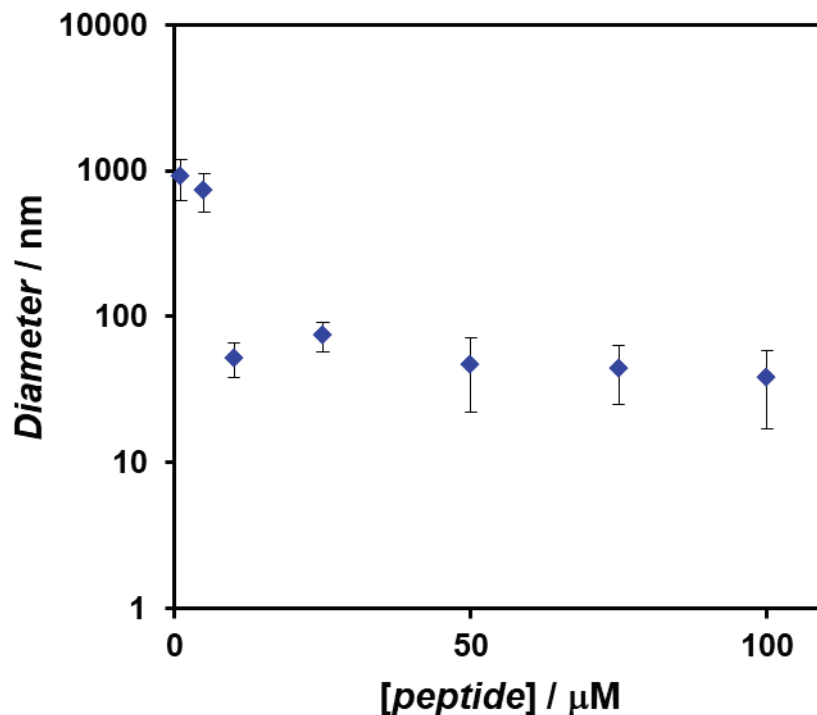


図 3-21. 各濃度における β -annulus-coiled-coil-B ペプチド Tris-HCl buffer (pH 7.4) 溶液の DLS 測定から得られた個数換算分布の濃度依存性

図 3-21 より、10-100 μM の濃度範囲において、 β -annulus 24 からなる人工ウイルスキャプシドと同様の 30-50 nm 程度の大きさの集合体の形成が確認された。つまり、C 末端に coiled-coil-B ペプチドを付与しても、形成する集合体に影響を与えないことが示された。また、集合体の粒径は 10 μM 以上において濃度にあまり依存しないことも示された。ペプチド濃度が 5 μM 以下の集合体は、図 3-19 に示すように、自己相関関数の縦軸の始まりが 1 から離れており、再現性も悪いため不安定な構造体なのではないかと考えられる。

次に、DLS 測定により光散乱強度の濃度依存性を評価した。

【DLS 測定条件】

セル: ZEN2112 - Low volume glass cuvette (12 μL)

温度: 25°C

Attenuator: 11

Positioning method: Centre of the cell (water clear sample only)

なお、Count Rate を 10 回測定した平均を Mean Count Rate とした。

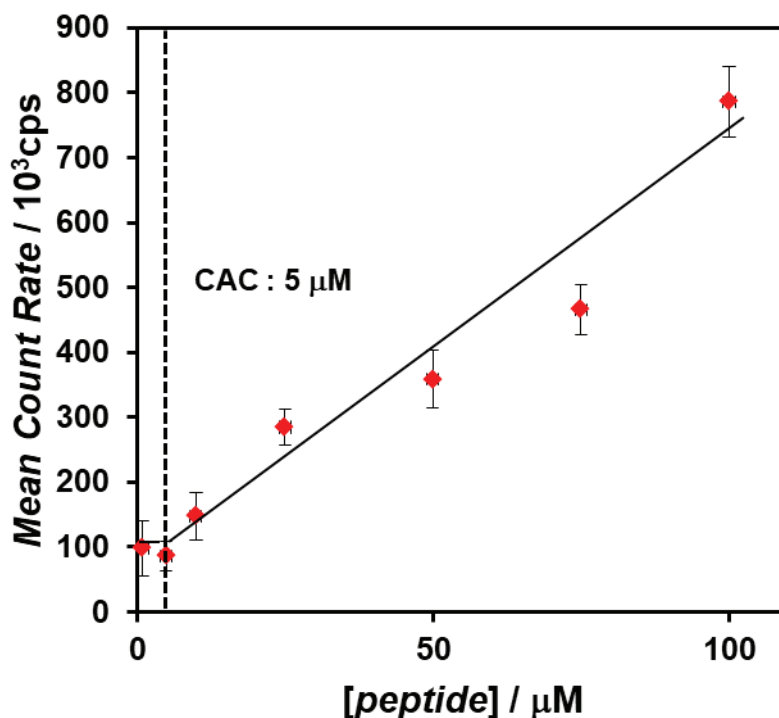


図 3-22. 各濃度の β -annulus-coiled-coil-B ペプチド Tris-HCl buffer (pH 7.4) 溶液の DLS 測定から得られた光散乱強度の濃度依存性(25 °C)

図 3-22 より、10-100 μM では散乱強度が濃度に比例して上昇したが、5 μM 以下の濃度では散乱強度は一定となった。このことから、臨海会合濃度(CAC)は 5 μM 付近であると考えられる。 β -annulus 24 の Tris-HCl buffer 中での CAC は 25 μM であるので、C 末端に coiled-coil-B を付与したにも関わらず CAC が減少したことになる。これは人工ウイルスキャプシド上の coiled-coil-B ペプチド同士が疎水性相互作用しているからではないかと考えられる。次に、人工ウイルスキャプシドが形成しているのかを TEM 観察により評価した。

3-4-3. TEM 観察による自己集合形態評価

β -annulus-coiled-coil-B ペプチド Tris-HCl buffer (pH 7.4) 溶液において、どのような集合体が形成しているか TEM 観察を行った。

【実験操作】

50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 溶液を TEM グリッドに 5 μL 滴下し、液滴を 1 分間保持した後ろ紙で吸い取った。その後、2% $\text{Na}_3(\text{PW}_{12}\text{O}_{40}) \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 水溶液を 5 μL 滴下した。1 分間静置した後、ろ紙で液滴を吸い取った。その後、一晩減圧乾燥した。

【TEM 観察条件】

Grid: C-SMART Hydrophilic TEM grids, (ALLIANCE Biosystems)

加速電圧: 80 kV

染色: 2% $\text{Na}_3(\text{PW}_{12}\text{O}_{40}) \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 水溶液

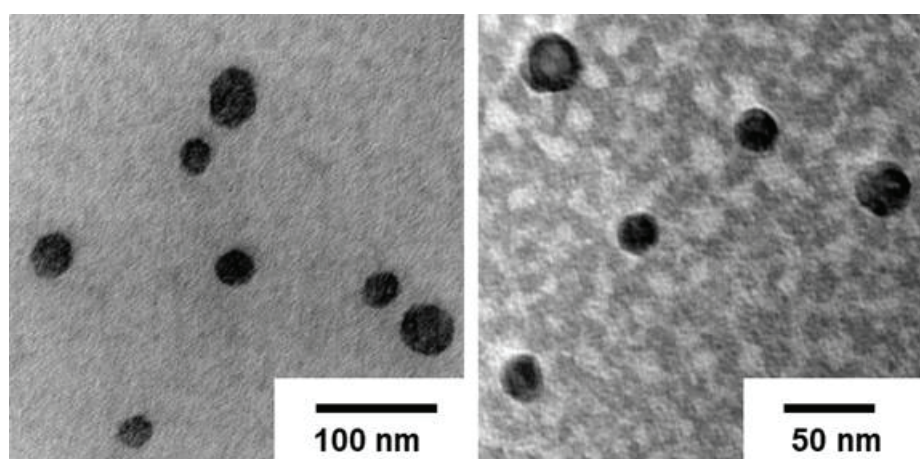


図 3-23. 50 μ M β -annulus-coiled-coil-B ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 溶液から得られた TEM 像

図 3-23 より、DLS から得られた個数換算分布とほぼ一致する 39 ± 9 nm ($n=12$) の球状集合体が多数確認された。このことから、 β -annulus 24 ペプチドと同様に人工ウイルスキャプシドを形成することが示唆された。

β -annulus ペプチドの C 末端に coiled-coil-B ペプチドを連結したことが、二次構造にどのような影響を与えるかを調べるため、CD スペクトル測定を行った。

【実験操作】

凍結乾燥した β -annulus-coiled-coil-B ペプチド粉末に 10 mM Tris-HCl buffer を加え、50 μ M β -annulus-coiled-coil-B ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 溶液を調製した。調製後 25°C で 1 時間インキュベートし、CD スペクトル測定を行った。

【CD スペクトル測定条件】

セル: 光路長 1 mm 石英セル

温度: 25°C

なお、モル橢円率は β -annulus-coiled-coil-B ペプチドのアミノ酸残基濃度に合わせて計算した。

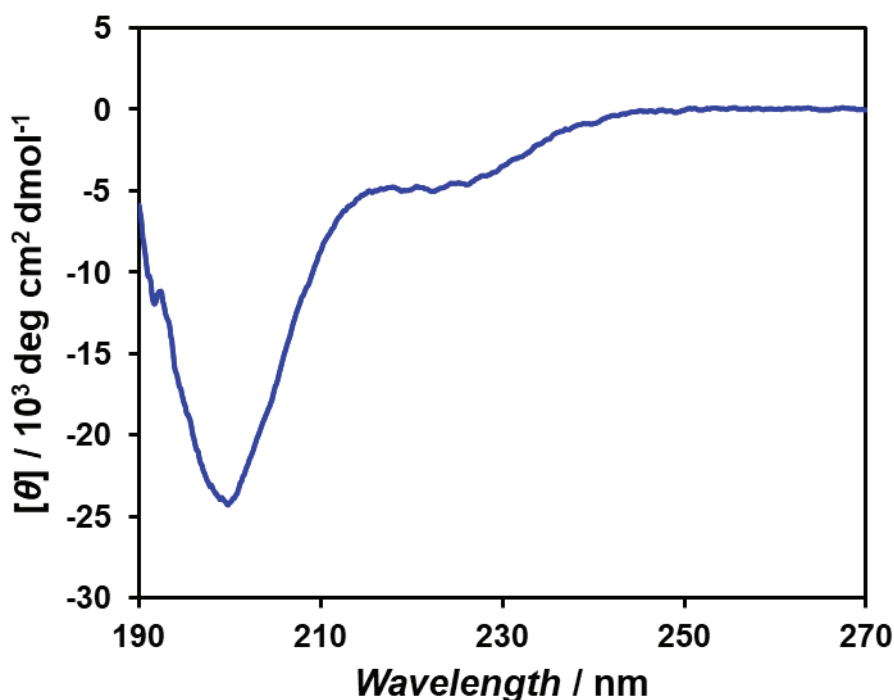


図 3-24. 50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 溶液(pH 7.4)の CD スペクトル

図 3-24 より、 β -annulus 24 ペプチドと同様の 199 nm に大きな負のピーク、225 nm 付近に小さな負のピークが観測された。これは、 β -構造とランダムコイルを含む β -annulus 構造に特徴的な CD スペクトルである。つまり C 末端に coiled-coil-B ペプチドを連結させても、二次構造に影響を与えないことが示された。

3-7. 表面にコイルドコイルの突起を有する人工ウイルスキャプシドの創製

β -annulus-coiled-coil-B ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドに coiled-coil-A ペプチドを添加することで、コイルドコイル構造を形成するのかどうかを CD スペクトルにより評価した。

【実験操作】

100 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 溶液と 25 μM coiled-coil-A ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 溶液を混合し、50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチド, 12.5 μM coiled-coil-A ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 混合液を調製した。この混合液を 1 時間、25°C でインキュベートし、CD スペクトルを測定した。同様に、12.5 μM coiled-coil-A ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 溶液、および、50 μM coiled-coil-B ペプチドと 12.5 μM coiled-coil-A ペプチドの 10 mM Tris-HCl buffer 混合溶液を調製し、CD スペクトル測定した。

【CD スペクトル測定条件】

セル: 光路長 1 mm 石英セル

温度: 25°C

なお、平均残基モル楕円率は 各ペプチドのアミノ酸残基濃度に合わせて計算した。

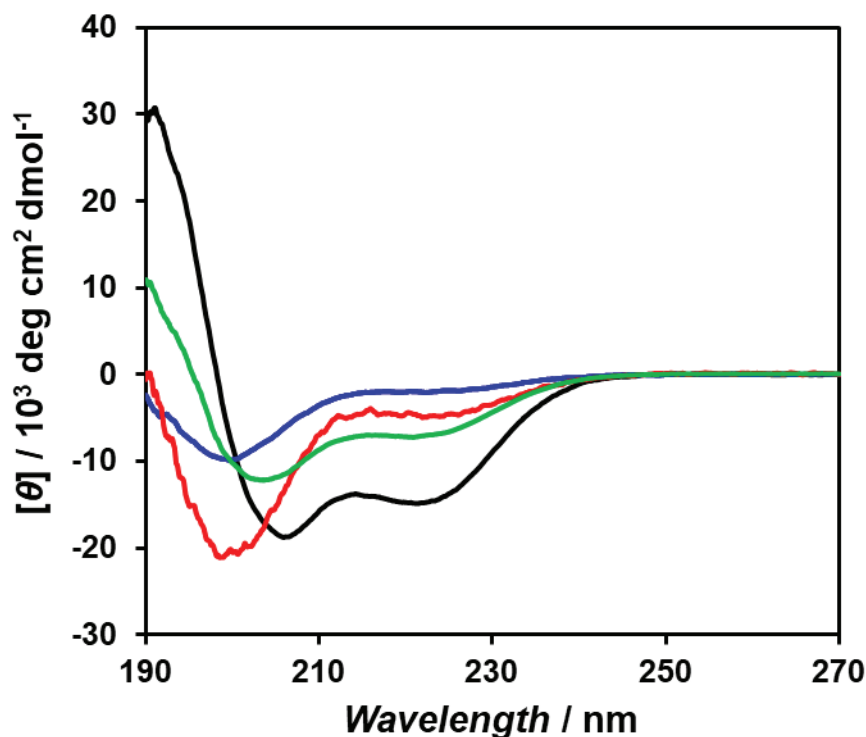


図 3-25. 50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 溶液(青), 12.5 μM coiled-coil-A ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 溶液(赤), 50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチド, 12.5 μM coiled-coil-A ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 混合溶液(緑), 50 μM coiled-coil-B ペプチド, 12.5 μM coiled-coil-A ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 混合溶液(黒) の CD スペクトル

図3-25赤より coiled-coil-A ペプチド単独ではランダムコイルを形成していることが確認された。一方で、図 3-25 緑より β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと coiled-coil-A ペプチドの混合溶液の CD スペクトルは 208 nm、222 nm に負の極大を 193 nm 付近に正の極大を示す α -helix に特徴的なスペクトルを示し、コイルドコイル構造が形成していることが確認された。また、このスペクトルの平均残基モル楕円率は β -annulus ペプチドと連結していない coiled-coil-B ペプチドと coiled-coil-A ペプチドの混合溶液から得られたスペクトル(図 3-25 黒)の平均残基モル楕円率に比べて小さいことから、 β -annulus-coiled-coil-B ペプチドの coiled-coil-B ペプチド配列の部分のみでコイルドコイルを形成していると考えられる。50 μM β -annulus 24 ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 溶液 の平均残基モル補正前の CD スペクトルを図 3-26 黒に、50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと 12.5 μM coiled-coil-A ペプチドの 10 mM Tris-HCl buffer 混合溶液の平均残基モル補正前の CD スペクトルを図 3-26 緑に示す。図 3-26 緑と図 3-26 黒の差スペクトルを図 3-27 赤に示す。

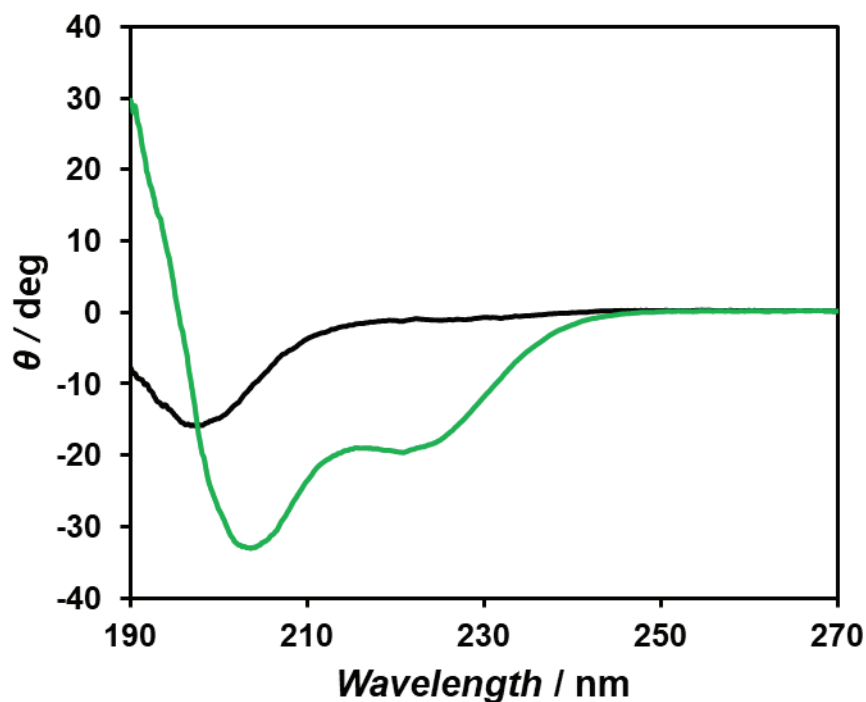


図 3-26. 50 μM β -annulus 24 ペプチド (黒) および 50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと 12.5 μM coiled-coil-A ペプチド混合溶液 (緑) の 10 mM Tris-HCl buffer 溶液(pH 7.4)の CD スペクトル (平均残基モル補正前)

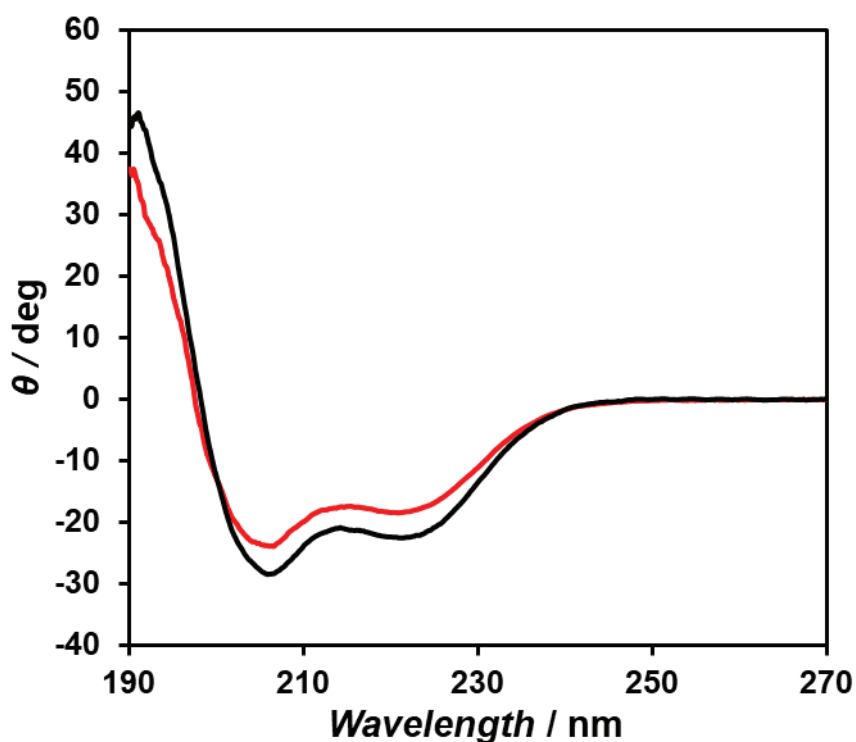


図 3-27. (黒) 50 μM coiled-coil-A ペプチドと 12.5 μM coiled-coil-B ペプチドの 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)混合液の平均残基モル補正前の CD スペクトル、(赤) 50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと 12.5 μM coiled-coil-A ペプチド混合溶液の CD スペクトルから 50 μM β -annulus 24 ペプチドの CD スペクトルを引いた差 CD スペクトル

図 3-27 黒に 50 μM coiled-coil-A ペプチドと 12.5 μM coiled-coil-B ペプチド混合液の平均残基モル補正前の CD スペクトル、図 3-27 赤に図 3-26 緑と図 3-26 黒の差スペクトルを示す。図 3-27 赤のスペクトルの α -helix 由来の 222 nm の楕円率は、図 3-27 黒のスペクトルの 81%の楕円率強度であることが確認された。このことより、 β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと coiled-coil-A ペプチドの混合溶液と coiled-coil-B ペプチドと coiled-coil-A ペプチドの混合溶液では同程度のコイルドコイルを形成していることが確認された。

次に、 β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと coiled-coil-A ペプチドの混合溶液から得られた CD スペクトルの coiled-coil-A ペプチド濃度依存性を評価した。

【実験操作】

100 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 溶液と種々の濃度の coiled-coil-A ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)を混合し、 β -annulus-coiled-coil-B ペプチド(50 μM)と coiled-coil-A ペプチド(3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100, 200 μM)の 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)混合液を調製した。この混合液を 1 時間、25 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートし、CD スペクトルを測定した。

【CD スペクトル測定条件】

セル: 光路長 1 mm 石英セル

温度: 25 $^{\circ}\text{C}$

なお、平均残基モル楕円率は 各ペプチドのアミノ酸残基濃度に合わせて計算した。

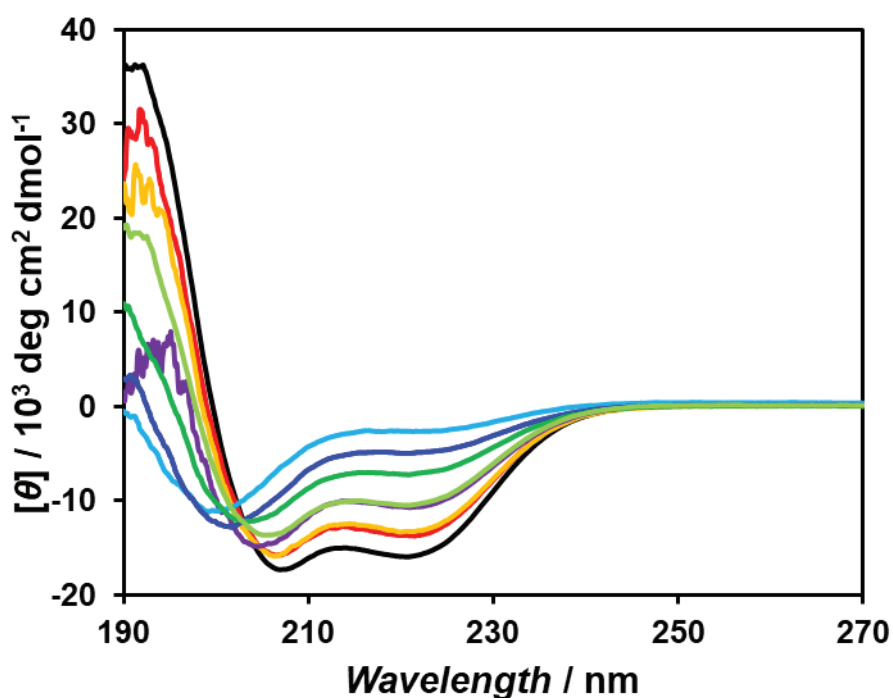


図 3-28. 50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと coiled-coil-A ペプチドの混合溶液から得られた CD スペクトル [coiled-coil-A]=3.12(青), 6.25(水色), 12.5(緑), 25(黄緑), 50(黒), 75(赤) 100(黄), 200 μM (紫)

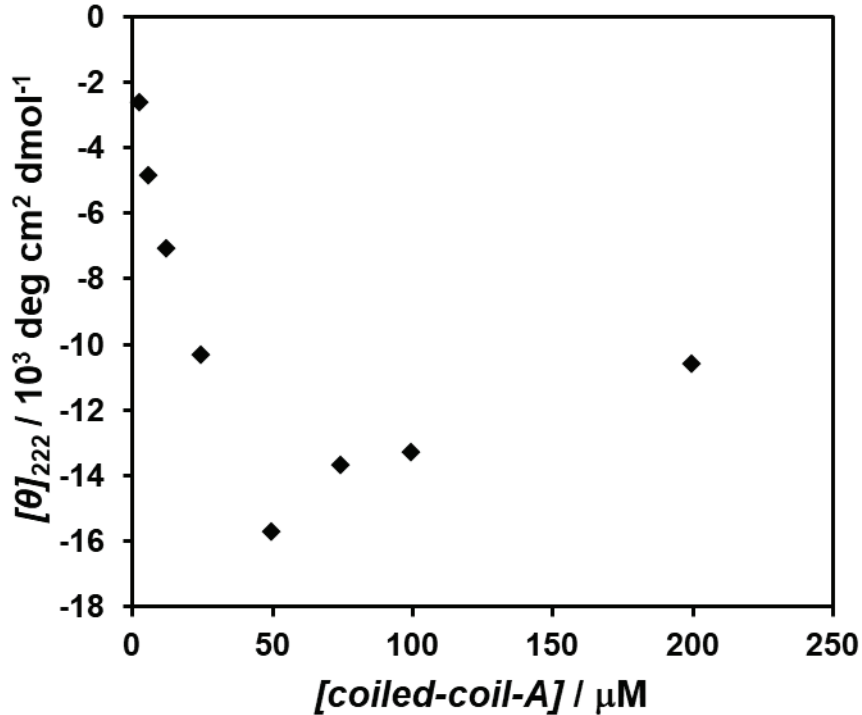


図 3-29. 50 μM β-annulus-coiled-coil-B ペプチドと coiled-coil-A ペプチド混合溶液の CD スペクトルより得られたα-helix 由来の 222 nm における平均残基モル楕円率の coiled-coil-A ペプチド濃度依存性

図 3-29 より、coiled-coil-A ペプチド濃度 50 μM までは、α-helix 由来の 222 nm のにおける平均残基モル楕円率が減少し、α-helix 含有率が大きくなった。一方で、coiled-coil-A ペプチド濃度 75 μM 以上では楕円率が増大した。これは coiled-coil-A ペプチド濃度 50 μM 以上の混合溶液中では、coiled-coil-A ペプチド濃度がβ-annulus-coiled-coil-B ペプチドよりも高くなるため、コイルドコイルを形成していない coiled-coil-A ペプチドが増加しているからだと考えられる。そこで、実際に人工ウイルスキャプシド上に存在する coiled-coil-B と coiled-coil-A は 1:1 でコイルドコイルが形成しているのかを確認するために job's plot を行った。

【実験操作】

50 μM β-annulus-coiled-coil-B ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 溶液と 50 μM coiled-coil-A ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)を、β-annulus-coiled-coil-B ペプチド: coiled-coil-A ペプチド= 1:0, 9:1, 6.67: 3.33, 1: 1, 3.33: 6.67, 1: 9, 0: 1 で混合した。これらの混合液を 1 時間、25°C でインキュベートし、CD スペクトルを測定した。

【CD スペクトル測定条件】

セル: 光路長 1 mm 石英セル

温度: 25°C

なお、平均残基モル楕円率は 各ペプチドのアミノ酸残基濃度に合わせて計算した。

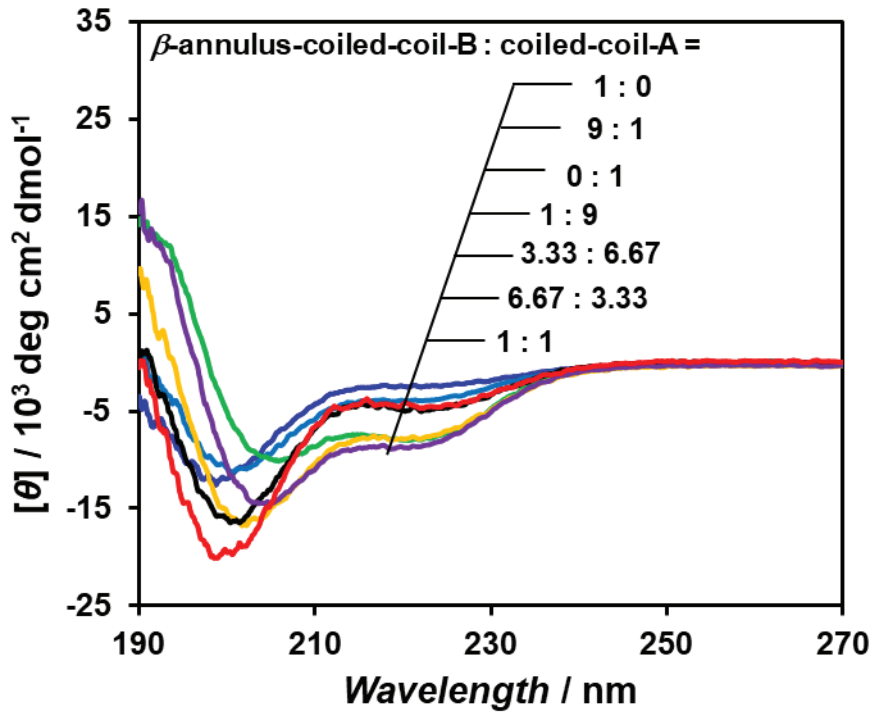


図 3-30. 種々の割合の β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと coiled-coil-A ペプチドの混合溶液から得られた CD スペクトル β -annulus-coiled-coil-B ペプチド: coiled-coil-A ペプチド= 1:0(青), 9:1(水色), 6.67:3.33(緑), 1:1(紫), 3.33:6.67(黄), 1:9(黒), 0:1(赤)

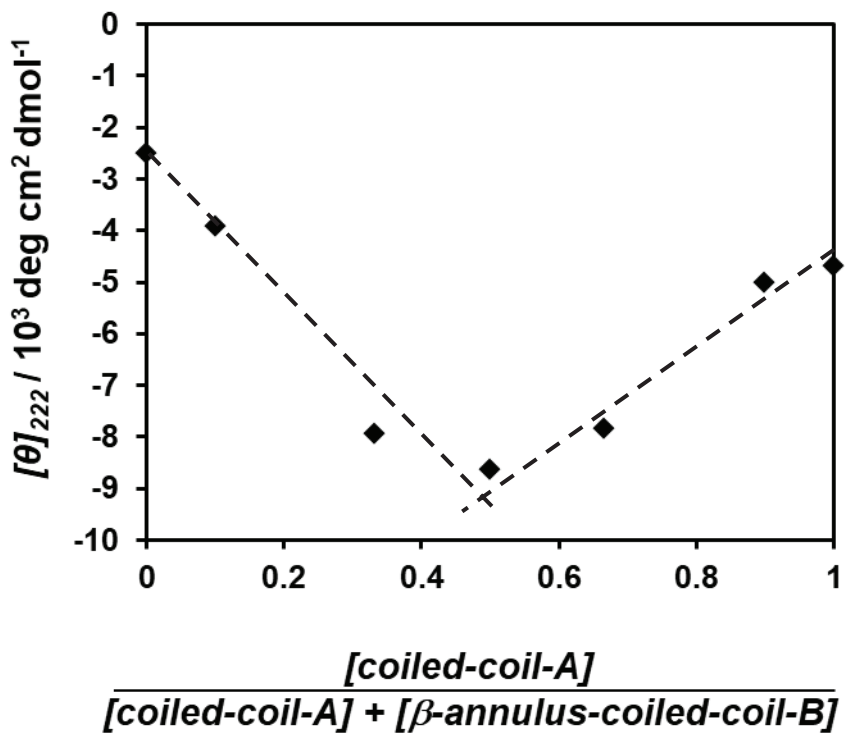


図 3-31. 種々の割合の β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと coiled-coil-A ペプチドの混合溶液から得られた α -helix 由来の 222 nm における平均残基モル楕円率の job's plot

β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと coiled-coil-A ペプチドの混合溶液の 222 nm における楕円率の job's plot において、 β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと coiled-coil-A ペプチドを 1:1 で混合した時、 α -helix 含有率が一番大きくなった(図 3-31)。これらのことから、人工ウイルスキャプシド上に存在する coiled-coil-B と coiled-coil-A は 1:1 でコイルドコイルを形成していることが明らかとなった。

次に混合溶液中でどのような集合体が形成しているのか評価した。まず、動的光散乱(DLS)測定により、混合溶液中の集合体の粒径を評価した。

【実験操作】

100 μ M β -annulus-coiled-coil-B ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)と種々の濃度の coiled-coil-A ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)を混合し、50 μ M β -annulus-coiled-coil-B ペプチド, 6.25, 12.5, 25, 50 μ M coiled-coil-A ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 混合液を調製した。これらの溶液を 1 時間、25°C でインキュベートし、DLS 測定を行った。

【DLS 測定条件】

セル: ZEN2112 - Low volume glass cuvette (12 μ L)

温度: 25°C

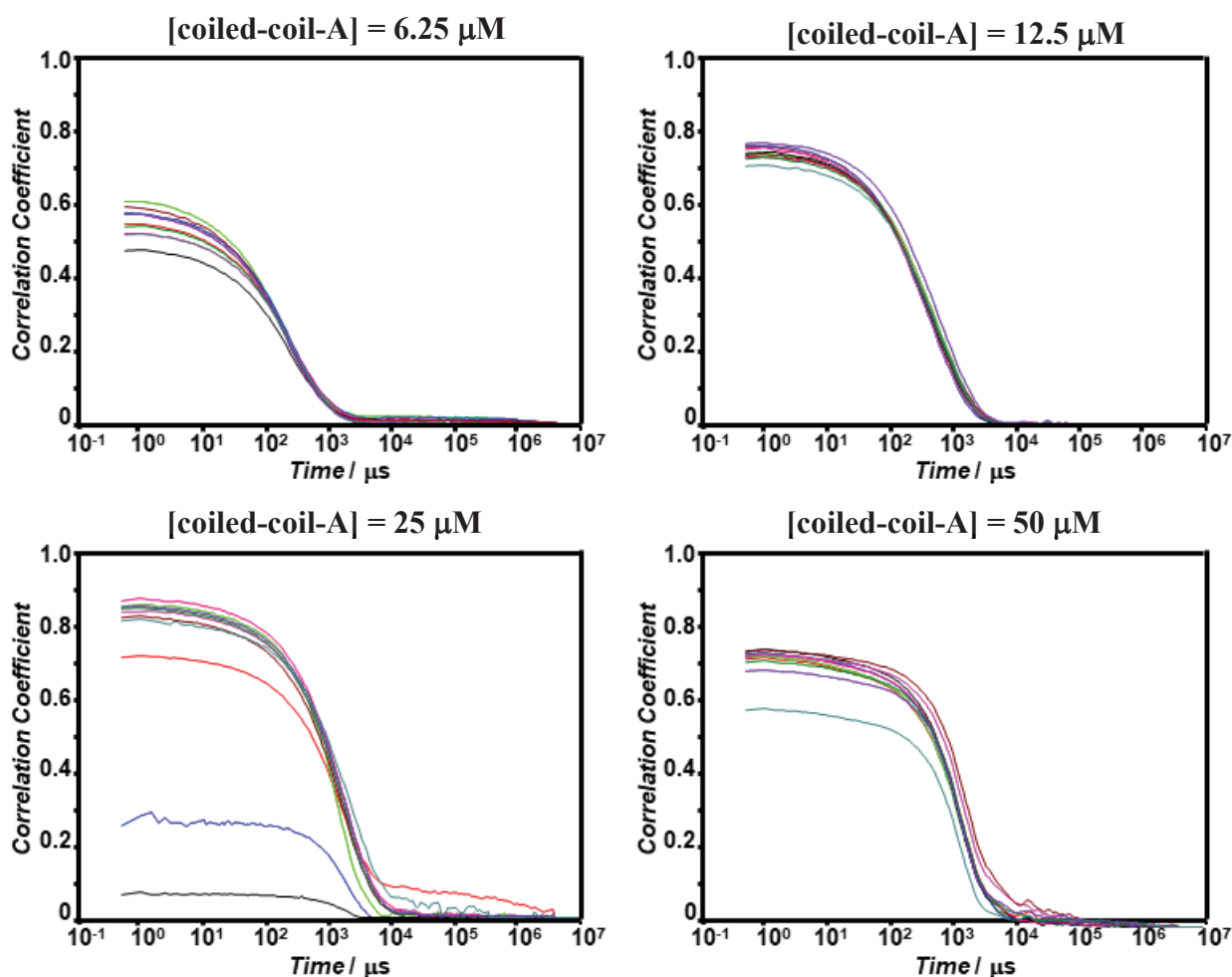


図 3-32. 各 coiled-coil-A ペプチド濃度における β -annulus-coiled-coil-B ペプチド (50 μ M) と coiled-coil-A ペプチドの混合溶液の DLS 測定から得られた自己相関関数

DLS 測定結果(図 3-32)より、coiled-coil-A ペプチド 濃度 6.25, 12.5 μM では自己相関関数の縦軸がそれなりに高く、信頼できるデータであると言える。また、10 回測定し、自己相関関数の再現性が取れたことから安定した構造体を形成していることが示唆される。

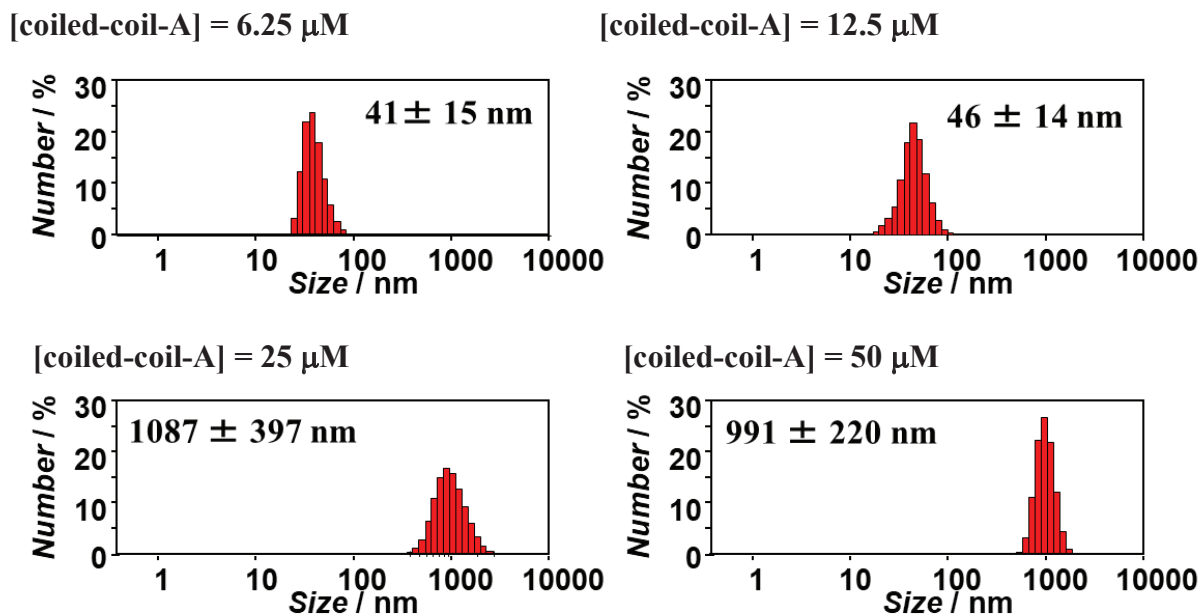


図 3-33. 各 coiled-coil-A 濃度における β -annulus-coiled-coil-B ペプチド(50 μM)と coiled-coil-A ペプチドの混合溶液の DLS 測定から得られた個数換算分布

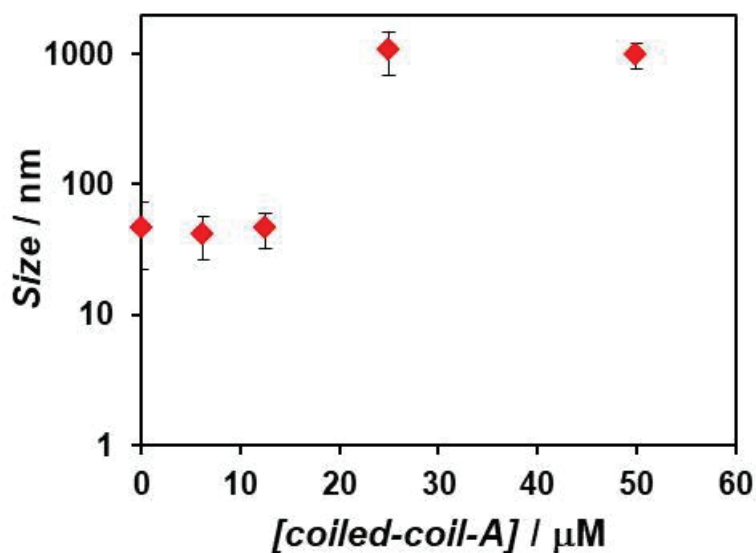


図 3-34. β -annulus-coiled-coil-B ペプチド(50 μM)と coiled-coil-A ペプチドの混合溶液の DLS 測定から得られた粒径の coiled-coil-A ペプチド濃度依存性

図 3-34 より、coiled-coil-A ペプチド濃度が 12.5 μM 以下において、40 nm 程度の人工ウイルスキャプシドと同程度の粒径分布を示した。一方で、coiled-coil-A ペプチド濃度が 25 μM 以上になると 1 μm 程度の非常に大きな粒径が確認された。そこで、次に混合溶液中でどのような形態の集合体が形成しているのか TEM 観察により評価した。

【実験操作】

100 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 溶液と種々の濃度の coiled-coil-A ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer 溶液を混合し、50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチド、12.5, 50 μM coiled-coil-A ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 混合液を調製した。これらの溶液を 1 時間、25°C でインキュベートした。この混合溶液を TEM グリッドに 5 μL 滴下し、液滴を 1 分間保持した後ろ紙で吸い取った。その後、2% $\text{Na}_3(\text{PW}_{12}\text{O}_{40}) \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 水溶液を 5 μL 滴下した。1 分間静置した後、ろ紙で液滴を吸い取った。その後、一晩減圧乾燥した。

【TEM 観察条件】

Grid: C-SMART Hydrophilic TEM grids, (ALLIANCE Biosystems)

加速電圧: 80 kV

染色: 2% $\text{Na}_3(\text{PW}_{12}\text{O}_{40}) \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 水溶液

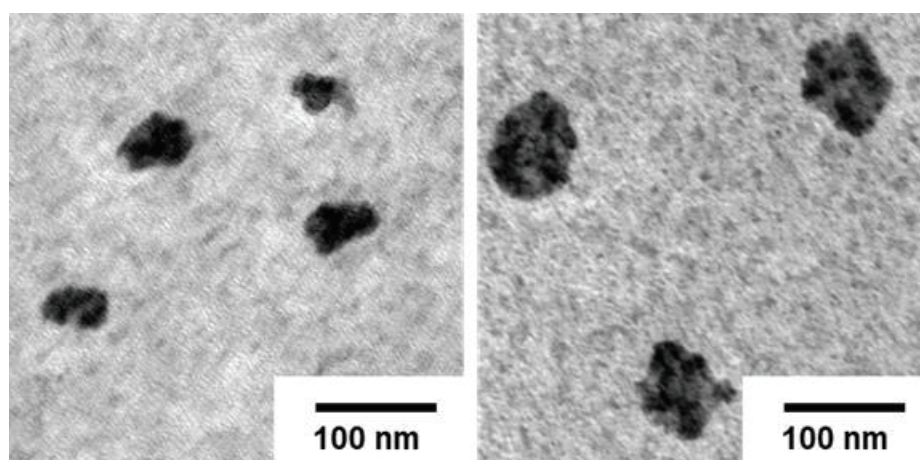


図 3-35. 50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと 12.5 μM coiled-coil-A ペプチドの混合溶液から得られた TEM 像

図 3-35 より、5 nm 程度の粒を表面に有する 60 nm 程度の球状集合体が確認された。このことから、表面に突起を有する人工ウイルスキャプシドが構築していると考えられる。

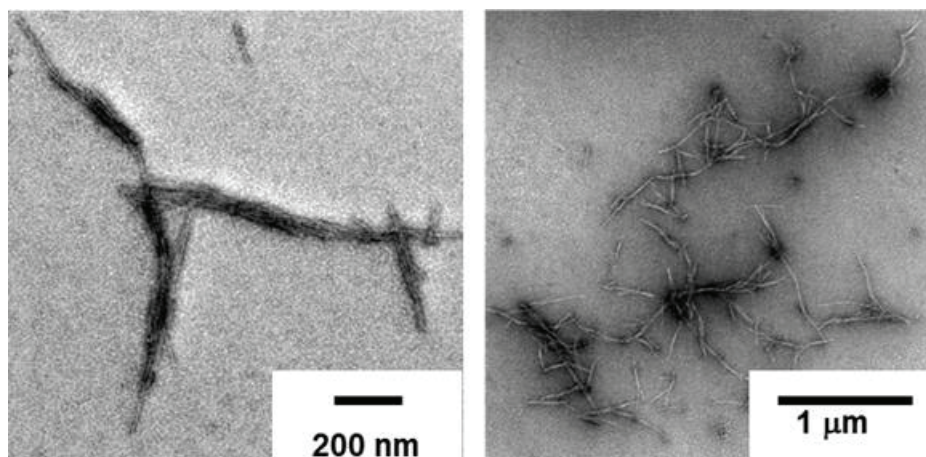


図 3-36. 50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと 50 μM coiled-coil-A ペプチドの混合溶液から得られた TEM 像

図 3-36 より、長さが 1 μm の繊維状集合体が観察された。この結果は、DLS 測定結果とも一致する。

これらの結果より、coiled-coil-A ペプチド濃度が 12.5 μM までは、人工ウイルスキャプシド上で、コイルドコイルが形成するが、25 μM 以上になると繊維状集合体が形成することと考えられる。これは β -annulus ペプチドの C 末端側は人工ウイルスキャプシド上で混みあっているため、coiled-coil-A ペプチド濃度がある一定まで増加すると立体障害により人工ウイルスキャプシド上でコイルドコイル形成できなくなり、その結果人工ウイルスキャプシドが崩壊し繊維状集合体が形成するのではないかと考えられる。そこで、 β -sheet からなるアミロイド線維に結合して蛍光強度が増大することが知られている蛍光色素 Thioflavin T を用いて繊維状集合体が β -sheet に起因して形成しているのか評価した。

【実験操作】

β -annulus-coiled-coil-B ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)溶液と coiled-coil-A ペプチド 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)溶液と Thioflavin T 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)溶液を混合し、50 μM β -annulus-coiled-coil-B, 50 μM coiled-coil-A, 5 μM Thioflavin T の 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)溶液を調製した。同様に、50 μM β -annulus-coiled-coil-B, 12.5 μM coiled-coil-A, 5 μM Thioflavin T の 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)溶液、50 μM β -annulus-coiled-coil-B, 5 μM Thioflavin T の 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)溶液を調製した。これらの溶液を 1 時間、25°C でインキュベートし、蛍光スペクトルを測定した。

【蛍光スペクトル測定条件】

| | | | |
|---------|-------------------------------|---------|---------------|
| 溶媒 | 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4) | 温度 | 25°C |
| セル光路長 | 1 mm | 測定範囲 | 460 nm-600 nm |
| 励起波長 | 440 nm | データ取込間隔 | 0.5 nm |
| 励起側バンド幅 | 5 nm | 蛍光側バンド幅 | 10 nm |
| レスポンス | 1 sec | 感度 | Medium |
| 走査速度 | 50 nm/min | 光源 | Xe |

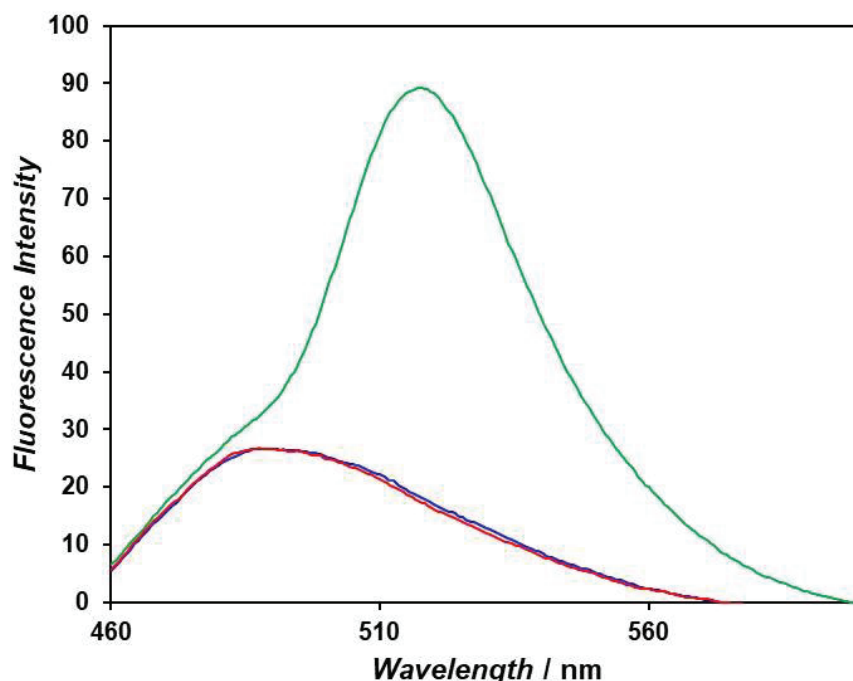


図 3-37. 50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと各濃度の coiled-coil-A ペプチド、5 μM Thioflavin T の 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)混合溶液の蛍光スペクトル [coiled-coil-A] = 0 (赤)、12.5 (青) 50 μM (緑)

図 3-37 より、50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと 12.5 μM coiled-coil-A ペプチドの混合溶液のスペクトル(図 3-37 青)は、 β -annulus-coiled-coil-B ペプチド単独のスペクトル(図 3-37 赤)と蛍光強度がほとんど変わらなかった。このことから、50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと 12.5 μM coiled-coil-A ペプチドの混合溶液の β -sheet 存在量は、 β -annulus-coiled-coil-B ペプチド溶液と同程度であると考えられる。一方で、50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと 50 μM coiled-coil-A ペプチドの混合溶液のスペクトル(図 3-37 緑)は、515 nm における蛍光強度が顕著に増大した。これは、50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと 50 μM coiled-coil-A ペプチドの混合溶液で β -sheet 存在量が増大したからであると考えられる。このことから、50 μM β -annulus-coiled-coil-B ペプチドと 50 μM coiled-coil-A ペプチドの混合溶液の TEM 像より確認された繊維状集合体が β -sheet 構造により形成していることが確認された。

混合溶液の DLS より得られた粒径分布、TEM 像および蛍光スペクトルの coiled-coil-A ペプチド濃度依存性より、coiled-coil-A ペプチド濃度が 12.5 μM 以下の場合、 β -annulus-coiled-coil-B ペプチドからなる人工ウイルスキャプシド表面でコイルドコイルを形成していると考えられる。一方で、coiled-coil-A ペプチド濃度が 25 μM 以上になると形成するコイルドコイルがキャプシド表面で過密になってしまい人工ウイルスキャプシドを形成することができず、繊維状集合体が形成するのではないかと考えられる(図 3-38)。

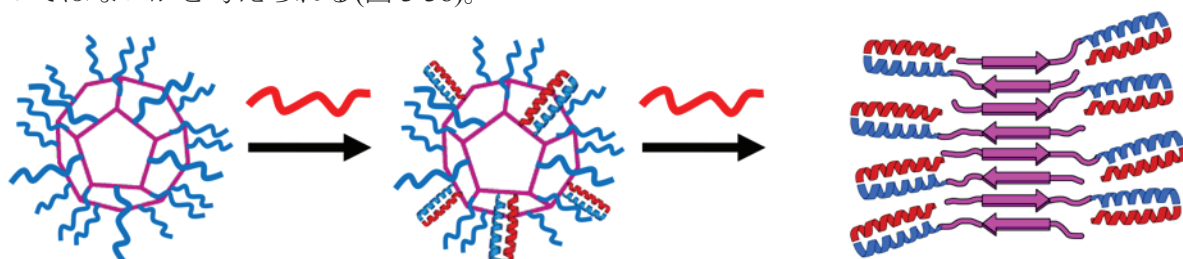


図 3-38. coiled-coil-A ペプチド濃度によって形成する混合溶液中の集合体の形態変化

3-6. まとめ¹¹⁾

本章では、表面にコイルドコイルの突起を有する人工ウイルスキャプシドの創製について述べた。Native chemical ligation 法によりコイルドコイル形成ペプチドを C 末端側に有する 49 mer β -annulus-coiled-coil-B を合成した。DLS 測定と TEM 観察より、そのペプチドが Tris-HCl buffer 中で自己集合して、人工ウイルスキャプシドを形成することを示した。また、 β -annulus-coiled-coil-B の自己集合からなる人工ウイルスキャプシドに相補的なコイルドコイル形成ペプチドを添加することにより、コイルドコイルが形成することが CD スペクトルにより確認された。また、混合溶液の DLS 測定と TEM 観察より、表面にコイルドコイルを有する人工ウイルスキャプシドの構築が示唆された。人工ウイルスキャプシド表面のコイルドコイル突起構造は、レセプタータンパク質などの様々な機能性分子を提示する際のプラットフォームとして有望な構造基盤であると期待される。

参考文献

- 1) (a) W. Weis, J. H. Brown, S. Cusack, J. C. Paulson, J. J. Skehel and D. C. Wiley, *Nature*, **333**, 426 (1988); (b) S. J. Gamblin, L. F. Haire, R. J. Russell, D. J. Stevens, B. Xiao, Y. Ha, N. Vasisht, D. A. Steinhauer, R. S. Daniels, A. Elliot, D. C. Wiley and J. J. Skehel, *Science*, **303**, 1838 (2004); (c) B. Szewczyk, K. Bienkowska-Szewczyk and E. Krol, *Acta Biochim. Pol.*, **61**, 397 (2014)
- 2) (a) M. J. van Raaij, A. Mitraki, G. Lavigne and S. Cusack, *Nature*, **401**, 935 (1999); (b) G. R. Nemerow, P. L. Stewart and V. S. Reddy, *Current Opinion in Virology*, **2**, 115 (2012)
- 3) K. Sugimoto, S. Kanamaru, K. Iwasaki, F. Arisaka and I. Yamashita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 2725 (2006)
- 4) J. M. Fletcher, R. L. Harniman, F. R. H. Barnes, A. L. Boyle, A. Collins, J. Mantell, T. H. Sharp, M. Antognozzi, P. J. Booth, N. Linden, M. J. Miles, R. B. Sessions, P. Verkade and D. N. Woolfson, *Science*, **340**, 595 (2013)
- 5) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis and S. B. H. Kent, *Science*, **266**, 776 (1994)
- 6) J. B. Blanco-Canosa and P. E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 6851 (2008)
- 7) (a) S. Batjargal, Y. Huang, Y. X. J. Wang and E. J. Petersson, *J. Pept. Sci.*, **20**, 87 (2014); (b) R. Okamoto, K. Mandal, M. Ling, A. D. Luster, Y. Kajihara and S. B. H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 5188 (2014); (c) S. Khan, S. Sur, P. Y. W. Dankers, R. M. P. da Silva, J. Boekhoven, T. A. Poor and S. I. Stupp, *Bioconj. Chem.*, **25**, 707 (2014)
- 8) S. K. Mahto, C. J. Howard, J. C. Shimko and J. J. Ottesen, *ChemBioChem*, **12**, 2488 (2011)
- 9) 山本翔也, 鳥取大学工学部物質工学科卒業論文 (2014).
- 10) M. Dittmann, J. Sauermann, R. Seidel, W. Zimmermann and M. Engelhard, *J. Pept. Sci.*, **16**, 558 (2010)
- 11) S. Fujita, K. Matsuura, *Org. Biomol. Chem.*, **15**, 5070 (2017)

第4章 光応答性人工ウイルスキャプシドの創製

4-1. 序

天然ウイルスの多くは、水中で一定の集合構造を維持する「静的な」ナノカプセルであるが、pH¹⁾や金属イオンに応答して構造変化する天然ウイルスキャプシドも存在することが知られている。例えば、Lim らは、天然の植物ウイルスの一つである *Hibiscus chlorotic ringspot carmovirus* (HCRSV)が Ca^{2+} イオン強度応答的に集合・解離することを利用し、抗癌剤であるドキソルビシンの Ca^{2+} イオン応答による徐放を報告している²⁾。しかしながら、光などの可逆的な外部刺激に応答するウイルスキャプシドは天然には存在しない。

そこで、本研究では、外部刺激である光に応答し、可逆的に形成・解離する人工ウイルスキャプシドの創製を検討する。近年、ペプチドやタンパク質にフォトクロミック化合物を導入し、その構造や機能を光制御する試みが精力的に行われている^{3,4)}。Hilvert らは、12 残基の β -ヘアピンペプチドのターン構造を形成する ^DPro-Gly を [3-(3-aminomethyl)phenylazo] phenylacetic acid (AMPP)に置換し、そのアゾベンゼン部分が cis 体では β -ヘアピン構造を形成するが、照射して trans 体に異性化すると劇的に集合形態が変化して凝集することを報告している⁵⁾。この研究から、ターン部分をアゾベンゼンで置き換えた場合、cis 体で二次構造を維持し、trans 体では構造変化が起きると考えられる。一方で、 β -annulus ペプチドはターン構造を形成することにより、三回対称性サブユニットを形成し、人工ウイルスキャプシドを形成することができる。そこで、 β -annulus ペプチドのターン構造をアゾベンゼンに置換したペプチドを合成すれば、光に応答して集合・解離する人工ウイルスキャプシドの創製が可能ではないかと考えられる。例えば、 β -annulus ペプチドのターン構造を形成している Val, Ala 残基をアゾベンゼンに置換すれば、その構造に劇的な変化を与え、アゾベンゼンが cis 体時にキャプシドが形成し、trans 体に異性化するとキャプシドが崩壊するような光刺激に応答するキャプシドの構築が期待される。光異性化は可逆性を有しているため、光刺激によるゲスト分子の捕捉・放出が可能であると考えられる。

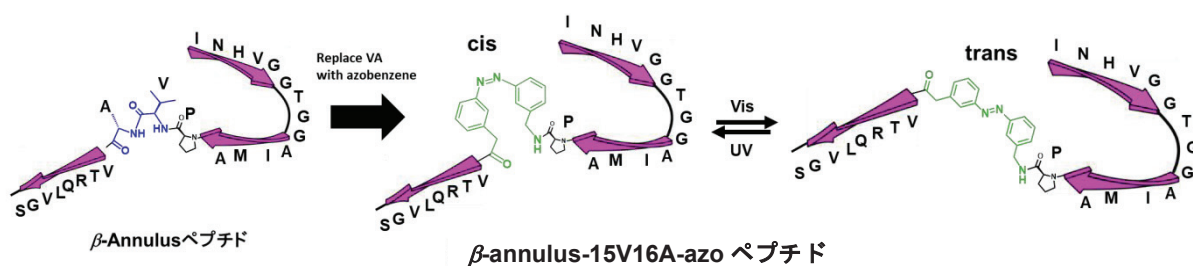


図 4-1. 光応答性を付与した β -annulus ペプチド

4-2. 分動力学計算(MacroModel)によるアゾベンゼン導入位置の検討

MacroModel を用いた分子動力学シミュレーションにより、 β -annulus ペプチドのターン部分をアゾベンゼンに置換しても 3 量体構造を維持できるのかどうかを評価した。ターン部分である 15, 16 残基目の Val, Ala を trans および cis 体アゾベンゼンに置換して、以下の条件で計算を行った。

[計算手法]

探索手法 : Molecular Dynamics

力場パラメータ : OPLS_2005

溶媒環境 : Water

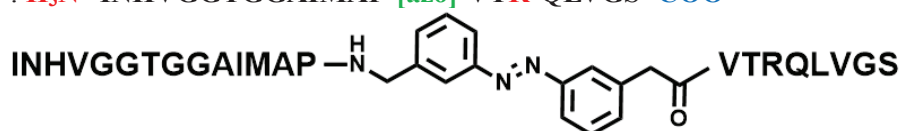
シミュレーション時間 : 10 ns

温度 : 298 K

[ペプチド配列]

β -annulus-15V16A-azo ペプチド

: H_3N^+ -INHVGTTGGAIMAP-[azo]-VTR⁺QLVGS -COO⁻



[初期構造]

Protein Data Bank (PDB)からトマトブッシュスタンウイルス(TBSV)のキャプシドタンパク質の座標データ(2TBV)を得た。60 個存在する TBSV キャプシドタンパク質 C 鎖の 68 残基目の Ile から 91 残基目の Ser の配列(ITHVGGVGGSIMAPVASRQLVGS)を 3 つ抜き出した。TBSV の種類が異なるため、配列が異なったためアミノ酸を置換し INHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVGS というアミノ酸配列にした。次に、この配列の 15, 16 残基目の Val, Ala を trans/cis 体の AMPP に置換し、MacroModel により Minimization を行った。その結果、以下に示すような Trigonal 状の構造が得られ、これを初期構造として使用した。また、電荷は pH 7 を想定し上のペプチド配列に示すように割り当てた。

trans 体

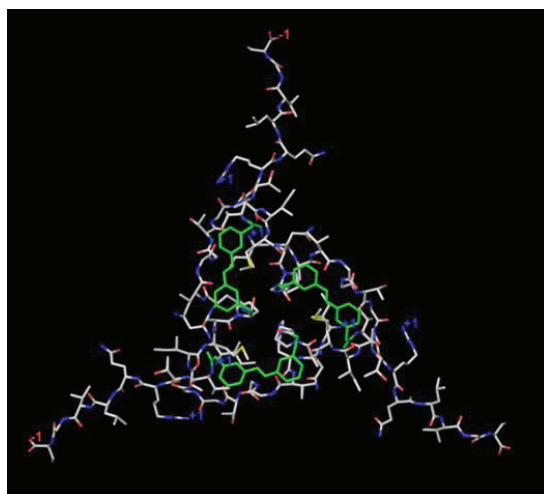


図 4-2. trans 体 β -annulus-15V16A-azo ペプチドの三量体の初期構造

cis 体

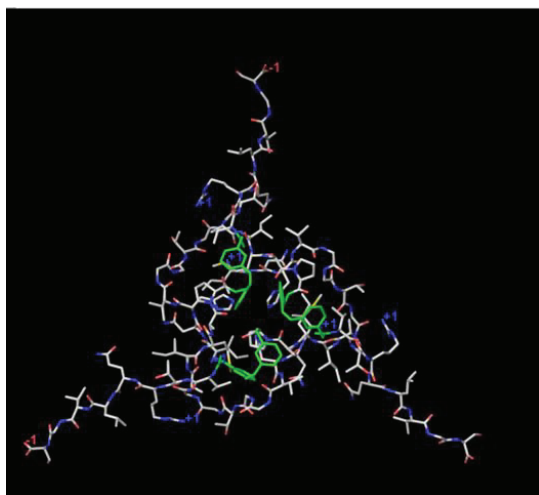


図 4-3. cis 体 β -annulus-15V16A-azo ペプチドの三量体の初期構造
[計算結果(10 ns 後)]

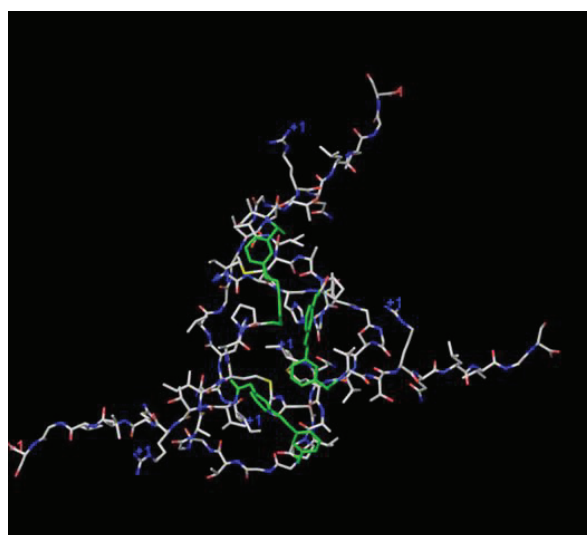


図 4-4. 10 ns 後の trans 体 β -annulus-15V16A-azo ペプチドの三量体($\Delta E = -52.1$ kJ/mol)

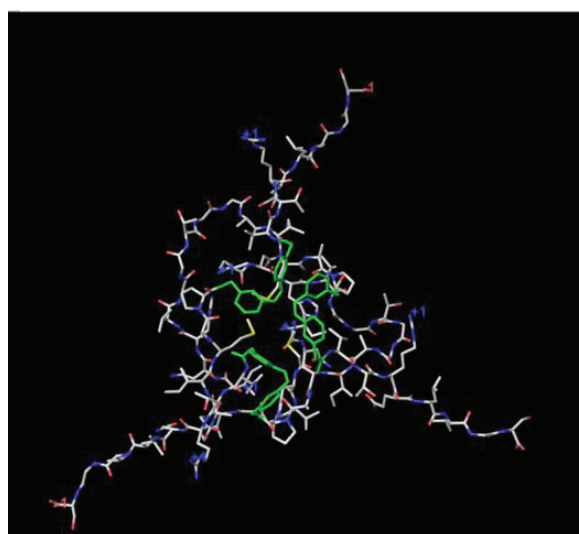
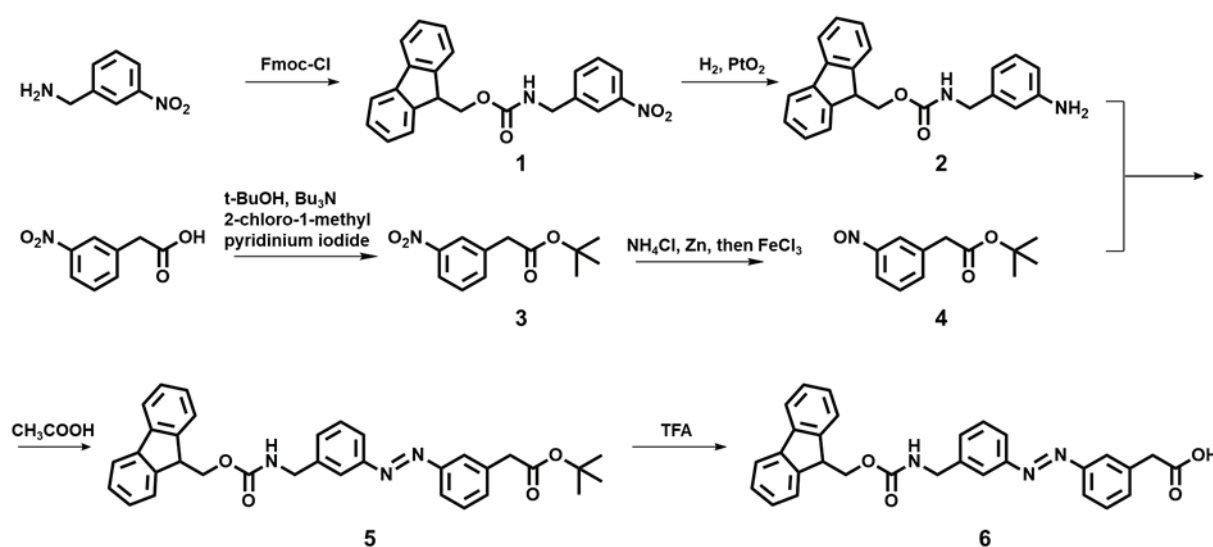


図 4-5. 10 ns 後の cis 体 β -annulus-15V16A-azo ペプチドの三量体($\Delta E = -132.7$ kJ/mol)

図 4-4 と図 4-5 より、10 ns 後に cis 体では元の構造をある程度保持したのに対して、trans 体では三量体構造が崩れていることが確認された。この結果から、cis 体を trans 体に光異性化させることで三量体構造が崩れ、人工ウイルスキャプシドが崩壊することが期待された。そこで、実際に 15, 16 残基目の Val, Ala をアゾベンゼンに置換したペプチド β -annulus-15V16A-azo を合成した。

4-3.Fmoc-AMPP の合成

ペプチド主鎖中にアゾベンゼンを組み込むために、Fmoc 基で保護されたアミンとカルボキシル基を有するアゾベンゼン誘導体(3-{3-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)methyl]phenylazo}phenyl)acetic Acid (Fmoc-AMPP)の合成を行った(Scheme 4-1)^{5,6)}。



scheme 4-1. Fmoc-AMPP の合成

[実験操作]

1 の合成

1.35 g (7.15 mmol)の 3-nitrobenzylamine hydrochloride [東京化成工業]と 5.95 mL(33.64 mmol)の DIPEA を 50 mL の CH₂Cl₂ に溶解させた。1.84 g (7.11 mmol)の Fmoc-Cl [東京化成工業]を 13 mL の CH₂Cl₂ に溶解させた。これらを混合させ 25°C で攪拌した。反応追跡を TLC により行い 22 時間で反応を終えた。その後、10% HCl 水溶液を加えて分液を行い、有機層を回収した。これを 3 回行った。次に、有機層に飽和 NaHCO₃ 水溶液を加えて中和を行った。その後、有機層をイオン交換水と飽和食塩水で洗浄し、有機層を回収した。回収した有機層に MgSO₄ を加え 30 分間攪拌し水分を除去した後、溶媒を減圧留去し白色固体を得た。

TLC: 展開溶媒 酢酸エチル: ヘキサン= 3: 1, R_f=0.73

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 4.24 (t, 1H), 4.47 (d, 2H), 4.51 (d, 2H), 5.2 (s, 1H), 7.32 (d, 2H), 7.41 (t, 3H), 7.51(d, 1H), 7.59 (d, 4H), 7.89 (d, 2H), 8.14 (s, 2H)

理論収量: 2.66 g (7.11 mmol), 収量: 2.46 g (6.58 mmol), 収率: 92.5%

2 の合成

1.5 g (4.00 mmol) の **1** に 70.1 mL の Ethanol: 1,4-Dioxane = 2: 1 混合液を加え、50°C の水浴によって温めて溶かした。この溶液に 14.0 mg の PtO₂[東京化成工業]を加えた後、H₂ (1 bar) 雰囲気にて、50°C で、12 時間攪拌した。反応終了後 Celite[和光純薬工業]を用いた吸引ろ過により触媒を除去した。溶媒を減圧留去し黄色固体を得た。

TLC: 展開溶媒 酢酸エチル: ヘキサン=3: 1, R_f=0.62

理論収量: 1.38 g (4.00 mmol), 粗収量: 1.31 g (3.80 mmol), 粗収率: 94.9%

3 の合成

1.35 g (7.45 mmol) の 3-Nitrophenylacetic acid[東京化成工業]、2.15 g (31.9 mmol) の *tert*-butanol[東京化成工業]、4 mL の Tributylamine[東京化成工業]を 25 mL のトルエンに溶解させた。2.22 g (8.66 mmol) の 2-Chloro-1-methylpyridinium iodide[東京化成工業]に 13 mL のトルエンを加えた。これらを混合させ還流した。反応追跡を TLC により行い 6 時間で反応を終えた。溶媒を減圧留去後、茶色液体を得た。この茶色液体をトルエン 4 mL に溶解させ、カラムクロマトグラフィー(充填剤: SiO₂, カラム径: 4.5 cm, 高さ 29 cm, 移動相溶媒: 酢酸エチル: ヘキサン=1: 3)による精製を行った。得られた分画を溶媒留去し黄色液体を得た。

TLC: 展開溶媒 酢酸エチル: ヘキサン=1: 3, R_f=0.43

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.46 (s, 9H), 3.65 (s, 2H), 7.5 (t, 1H), 7.62 (d, 1H), 8.13 (d, 1H), 8.16 (s, 1H)

理論収量: 1.77 g, 収量: 1.43 g, 収率: 80.8%

4 の合成

1.43 g (6.02 mmol) の **3** を 87.9 mL の Methoxyethanol に溶解させた。834 mg の NH₄Cl[東京化成工業]を 22.1 mL の水に溶解させた。これらを混合させ、30 分間 N₂ バブリングにより脱気した。その後、1.75 mg の Zn 粉末[東京化成工業]をゆっくり加え、25°C で 6 時間攪拌した。自然ろ過によって Zn 粉末を除去した。その後、8 mL の水: エタノール=2: 1 に溶解させた 3.62 mg の FeCl₃•6 H₂O[和光純薬工業]を -10°C でゆっくりと加えた。-10°C で 1 時間攪拌し、その後さらに混合液を 25°C で 1 時間攪拌した。酢酸エチルで 3 回抽出を行い、そのあと水で有機層を洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥を行い、溶媒を留去し、黄緑色液体を得た。この黄緑色液体を酢酸エチル: ヘキサン=1: 3, 4 mL に溶解させ、カラムクロマトグラフィー(充填剤: SiO₂, カラム径: 4.5 cm, 高さ 26 cm, 移動相溶媒: 酢酸エチル: ヘキサン=1: 3)による精製を行った。得られた分画を溶媒留去し緑色液体を得た。

TLC: 展開溶媒 溶媒: 酢酸エチル: ヘキサン=1: 3, R_f=0.5

理論収量: 1.33 g (6.02 mmol), 収量: 760 mg (3.44 mmol), 収率: 57.1%

5 の合成

760 mg (3.44 mmol) の **4** を 13.5 mL の酢酸に溶解させた。1.18 g (3.42 mmol) の **2** を 13.5 mL の酢酸に溶解させた。これらを混合させ 36 時間、25°C で攪拌した。得られた粗精製物を酢酸エチル: ヘキサン=1: 3 4 mL に溶解させ、カラムクロマトグラフィー(充填剤: SiO₂, カラム径: 4.5 cm, 高さ 28 cm, 移動相溶媒: 酢酸エチル: ヘキサン=1: 3)による精製を行った。得られた分画を溶媒留去

し橙色固体を得た。

(分析)TLC：展開溶媒 溶媒：酢酸エチル：ヘキサン=1: 3, $R_f=0.27$

理論収量: 1.88 g, 収量: 773 mg (1.41 mmol), 収率: 41.1%

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 1.45 (s, 9H), 3.63 (s, 2H), 4.25 (t, 1H), 4.50 (m, 2H), 5.2 (s, 1H), 7.31 (d, 2H), 7.40 (m, 4H), 7.48 (t, 2H), 7.61 (d, 2H), 7.76 (d, 2H), 7.83 (m, 4H)

6 の合成

772 mg (0.296 mmol)の **5** を 57 mL の CH_2Cl_2 に溶解させた。これに 5.7 mL の TFA を加え 36 時間攪拌した。その後 22.8 mL の水を加え、分液を行った。有機層を回収後、水でさらに 3 度洗浄した。有機層を MgSO_4 で乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物をメタノール: クロロホルム=2: 1(1% TEA 含有) 2 mL に溶解させ、カラムクロマトグラフィー(充填剤: SiO_2 , カラム径: 4.5 cm, 高さ 28 cm, 移動相溶媒: 1% TEA 含有メタノール: クロロホルム=2: 1)により精製した。得られた分画を溶媒留去し橙色固体を得た。

TLC：展開溶媒 溶媒：メタノール: クロロホルム=2: 1, $R_f=0.68$

理論収量 : 694 mg (1.41 mmol), 収量: 630 mg (1.28 mmol), 収率: 90.8%

【 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3)】

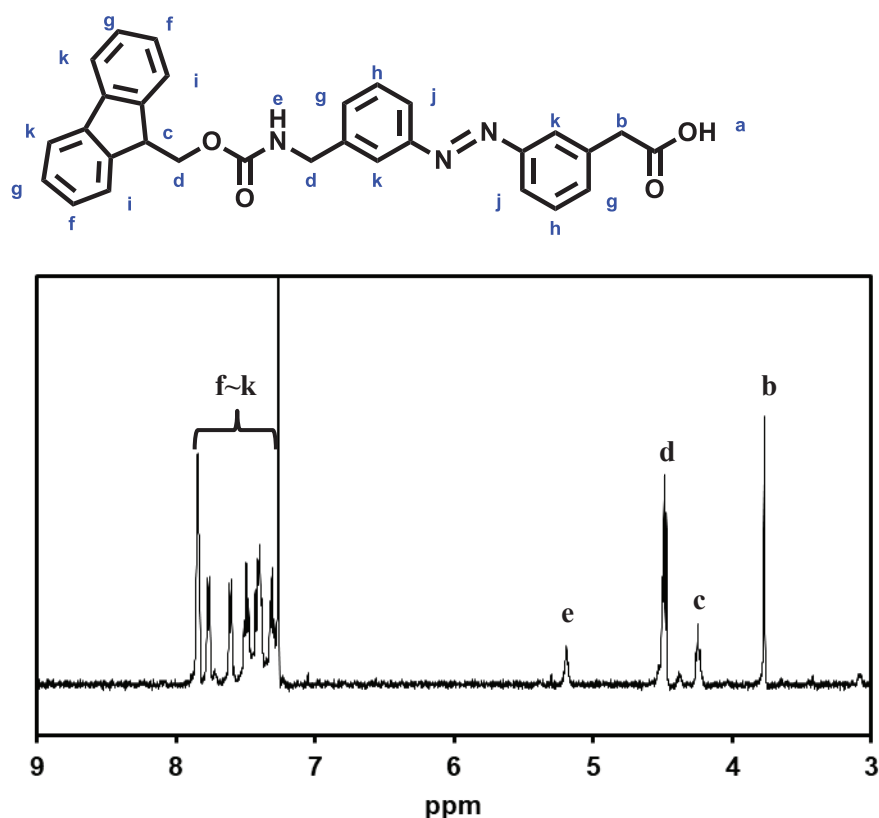


図 4-6. 6 の NMR チャート

表 4-1. 6 の NMR チャートの帰属

| ppm | 分裂 | 積分値 | 帰属 |
|------|----|-------|----|
| 3.76 | s | 2.20 | b |
| 4.24 | t | 1.27 | c |
| 4.50 | m | 4.18 | d |
| 5.21 | s | 0.78 | e |
| 7.31 | t | 2.11 | f |
| 7.40 | m | 4.50 | g |
| 7.50 | t | 2.42 | h |
| 7.61 | d | 1.97 | i |
| 7.76 | d | 2(基準) | j |
| 7.84 | bs | 4.23 | k |

【ESI-MS 測定】

Mode: positive

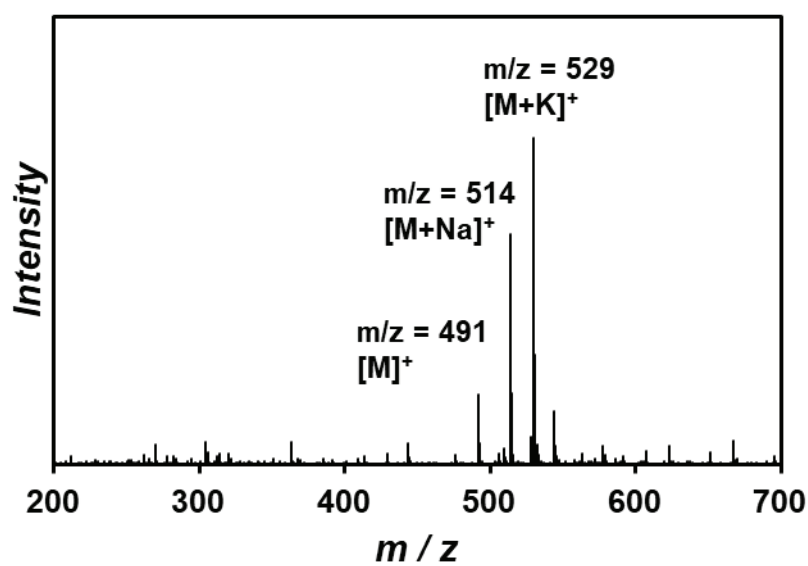


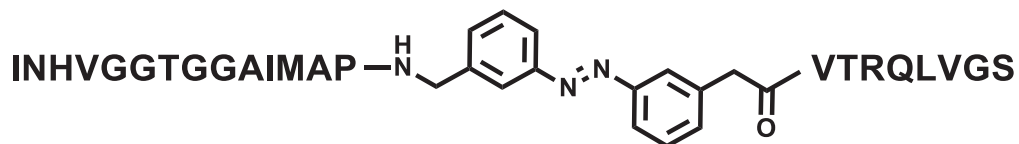
図 4-7. 6 の ESI-MS

図 4-6 の ¹H NMR スペクトルおよび図 4-7 の ESI-MS より Fmoc-AMPP(6)の合成が確認された。

4-4. β -annulus-15V16A-azo ペプチドの合成

ターン部分である 14, 15 残基目の Val, Ala をアゾベンゼンに置換した β -annulus ペプチドの合成を Fmoc 固相合成により行った。

β -annulus-15V16A-azo ペプチド: INHVGGTGGAIMAP-[azo]-VTRQLVGS (m/z = 2384)



【試薬】

樹脂

Fmoc-Ser(tBu)-Alko-PEG Resin 【0.24 mmol/g, 渡辺化学工業】 521 mg(0.125 mmol)

Fmoc アミノ酸

Fmoc-Ile-OH 【Mw 353.42, 渡辺化学工業】 353 mg(0.5 mmol)×2

Fmoc-Asn(Trt)-OH 【Mw 596.69, 渡辺化学工業】 597 mg(0.5 mmol)

Fmoc-His(Trt)-OH 【Mw 619.73, 渡辺化学工業】 620 mg(0.5 mmol)

Fmoc-Val-OH 【Mw 339.39, 渡辺化学工業】 339 mg(0.5 mmol)×3

Fmoc-Gly-OH 【Mw 297.31, 渡辺化学工業】 297 mg(0.5 mmol)×5

Fmoc-Thr(tBu)-OH 【Mw 397.48, 渡辺化学工業】 397 mg(0.5 mmol)×2

Fmoc-Ala-OH · H₂O 【Mw 329.36, 渡辺化学工業】 329 mg(0.5 mmol)×2

Fmoc-Met-OH 【Mw 371.46, 渡辺化学工業】 371 mg(0.5 mmol)

Fmoc-Pro-OH · AcOEt 【Mw 425.46, 渡辺化学工業】 425 mg(0.5 mmol)

Fmoc-Arg(Pbf)-OH · AcOEt · 0.21PE 【Mw 669.29, 渡辺化学工業】 669 mg(0.5 mmol)

Fmoc-Gln(Trt)-OH 【Mw 610.72, 渡辺化学工業】 610 mg(0.5 mmol)

Fmoc-Leu-OH 【Mw 353.42, 渡辺化学工業】 353 mg(0.5 mmol)

Fmoc-Ser(tBu)-OH 【Mw 383.45, 渡辺化学工業】 383 mg(0.5 mmol)

Fmoc-AMPP-OH (6) 【Mw 492, 筆者合成】 123 mg(0.25 mmol)

1. 樹脂の膨潤

マイクロウェーブ合成装置用の 2-5 mL バイアル瓶に Fmoc-Ser(tBu)-Alko-PEG Resin を 521 mg(0.125 mmol)とスターラーチップを入れ、NMP を 2 mL 加え、1 時間攪拌した。

2. Fmoc 基の除去

アミノ酸導入樹脂が入ったバイアル瓶に、ピペリジン: DMF=40: 60(体積比)の溶液 2 mL を加え、3 分間攪拌した。攪拌後、溶液を取り除いた。次にピペリジン: DMF=20: 80(体積比)の溶液 2 mL を加え、10 分間攪拌した。攪拌後、溶液を取り除き、樹脂を NMP で 5 回洗浄した。

3. Fmoc 基除去の確認

少量の樹脂を DMF 中に懸濁させ、1%ピクリルスルホン酸 DMF 溶液を 1 滴、10%N,N-ジイソプロピルエチルアミン DMF 溶液を 1 滴加えた。室温で 2 分放置し、樹脂が赤色に呈色していることを確認した。

4. アミノ酸導入

樹脂の入ったバイアル瓶に、Fmoc-アミノ酸、COMU をそれぞれ樹脂上のアミノ酸に対して 4 等量、DIPEA を 8 等量加え、NMP 2 mL を加えて溶かした溶液を加えて、下記の反応条件設定で反応を行った。反応後、溶液を取り除き、樹脂を NMP で 5 回洗浄した。

【反応条件設定】

マイクロウェーブを照射する時間: 5 min

周波数: 2.45 GHz

反応温度: 75°C

出力: 35 W

制御圧力: Off

マイクロウェーブ照射前の攪拌時間: 30 s

マイクロウェーブの吸収度合い: High

5. アミノ酸導入の確認

少量の樹脂を DMF 中に懸濁させ、1%ピクリルスルホン酸 DMF 溶液を 1 滴、10%N,N-ジイソプロピルエチルアミン DMF 溶液を 1 滴加えた。室温で 2 分放置し、樹脂が赤色に呈色していないことを確認した。

2-5 の操作を配列が VTRQLVGS となるまで繰り返した。その後、樹脂を半分に分けた。

6. AMPP の導入

AMPP を縮合剤 COMU と NMP 中で混合させると中間体が析出したため、HBTU を用い縮合を行った。樹脂の入ったバイアル瓶に、Fmoc-AMPP-OH (6)、HBTU、HOBt・H₂O をそれぞれ樹脂上のアミノ酸に対して 4 等量、DIPEA を 8 等量、NMP 2 mL に溶解させた溶液を加えて、2 時間反応を行った。反応後、少量の樹脂を NMP で洗浄し TNBS キットにより赤色に呈色しないことを確認した。その後、反応溶液を取り除き、樹脂を NMP で 5 回洗浄した。

2-5 の操作をアミノ酸の等量を 8 等量に増加させ目的配列となるまで繰り返した。その後、樹脂をさらに半分に分けた。その後、クリーベージカクテルによりペプチドの脱樹脂を行った。

7. 脱樹脂・脱保護

サンプル瓶に TFA : H₂O : EDT : TIPS : チオアニソール = 86.5 : 5 : 2.5 : 1 : 5 を調製した。それを、アミノ酸導入済み樹脂に加え室温で 40 分攪拌した。これに *tert*-ブチルメチルエーテルを加え、遠心分離により、ペプチドを沈殿させ、上澄み液を取り除いた。この操作を 3 回行った。

残った白色沈殿物を水に溶解させ、MALDI-TOF-MS 測定を行った。

理論収量 : 74.5 mg, 粗収量: 33.8 mg, 収率: 45.4%

【MALDI-TOF-MS 測定】

Matrix: α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA)、Mode: Linear positive

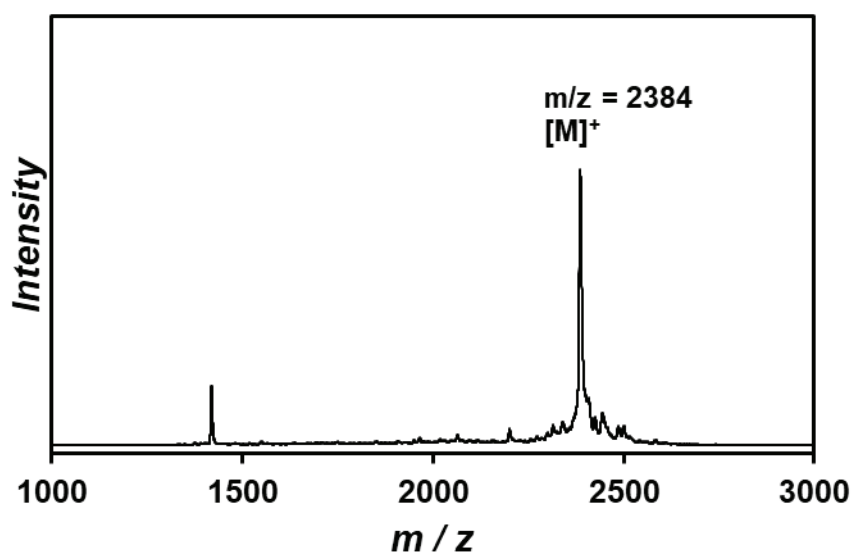


図 4-8. 粗 β -annulus-15V16A-azo ペプチドの MALDI-TOF-MS (Matrix : α -CHCA)

図 4-8 に示した粗 β -annulus-15V16A-azo ペプチドの MALDI-TOF-MS より、目的物 $m/z=2384$ が確認され、 β -annulus-15V16A-azo ペプチドの生成が確認された。これを HPLC により精製した。

【分離条件】

試料 : 3 mg の粗ペプチドを 1.5 mL のイオン交換水に溶かした溶液

カラム: Inertsil ODS-3 (5 μ m, 20 \times 250 mm)

試料注入量: 1.5 mL

移動相溶媒: 水 / アセトニトリル (ともに 0.1% TFA を含む)

移動相組成: 水 / CH₃CN: 73 / 27 \rightarrow 71 / 29 (100 min)、リニアグラジエント

検出: UV-vis 220 nm

流量 : 10 mL/min

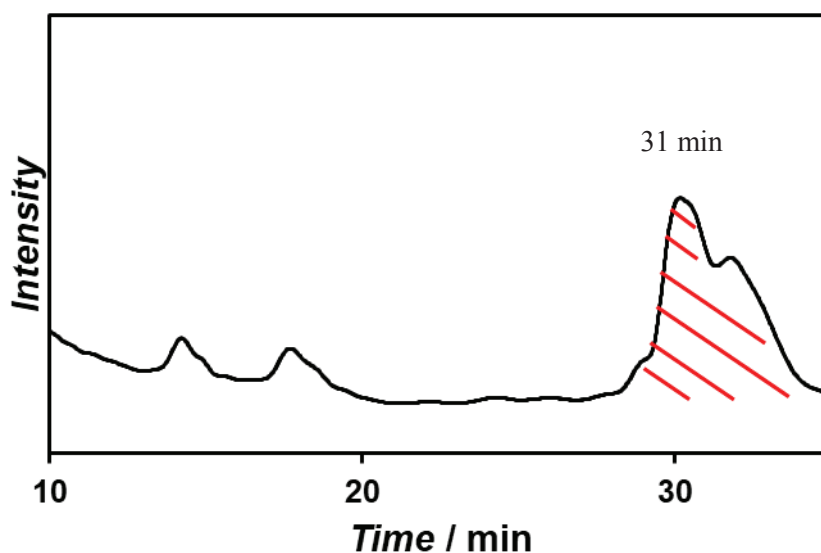


図 4-9. 分取時の HPLC チャート

図 4-9 の 31 min ごろのピークを分取した。その後、凍結乾燥により白色粉末を得た。粉末の MALDI-TOF-MS を測定した。

【MALDI-TOF-MS 測定】

Matrix: α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA)、Mode: Linear positive

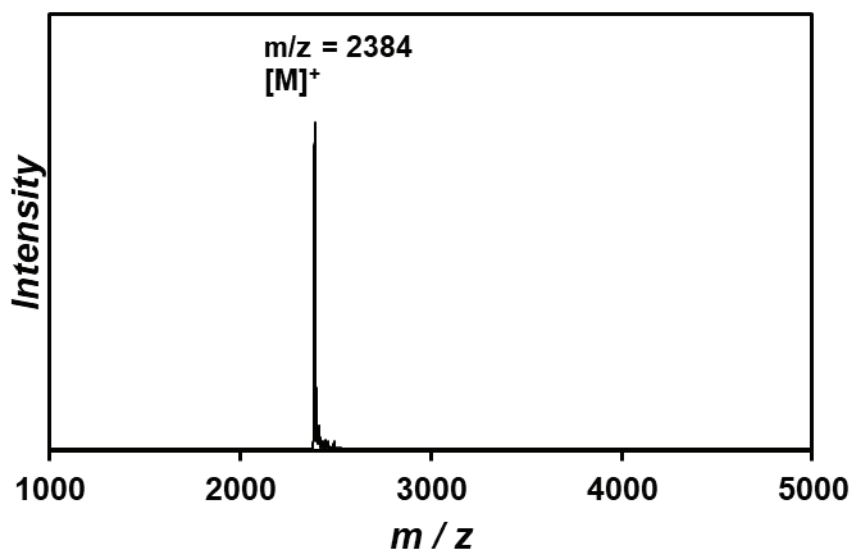


図 4-10. β -annulus-15V16A-azo ペプチドの MALDI-TOF-MS (Matrix : α -CHCA)

図 4-10 に示した β -annulus-15V16A-azo ペプチドの MALDI-TOF-MS により、目的物 $m/z=2384$ が単一ピークとして確認された。

収量: 0.81 mg 収率: 6.0%

4-5. β -annulus-15V16A-azo ペプチドの光異性化挙動

合成した β -annulus-15V16A-azo ペプチドの可視光、UV 照射による光異性化挙動を UV-vis スペクトル、HPLC により評価した。

まず UV 照射による光異性化挙動を UV-vis スペクトルにより評価した。

【実験操作】

β -annulus-15V16A-azo ペプチド粉末をイオン交換水に溶解させ、100 μ M β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液を調製した。これを 50 μ L セルに加えた。まず、蛍光スペクトル測定装置の光源を用いて 25°C で 425 nm の光を 30 min 照射した。その後、25°C で 325 nm の光を照射し、各照射時間の UV-vis スペクトルを測定した。

【UV-vis スペクトル測定条件】

セル: 光路長 1 cm 石英セル(50 μ L)

温度: 25°C

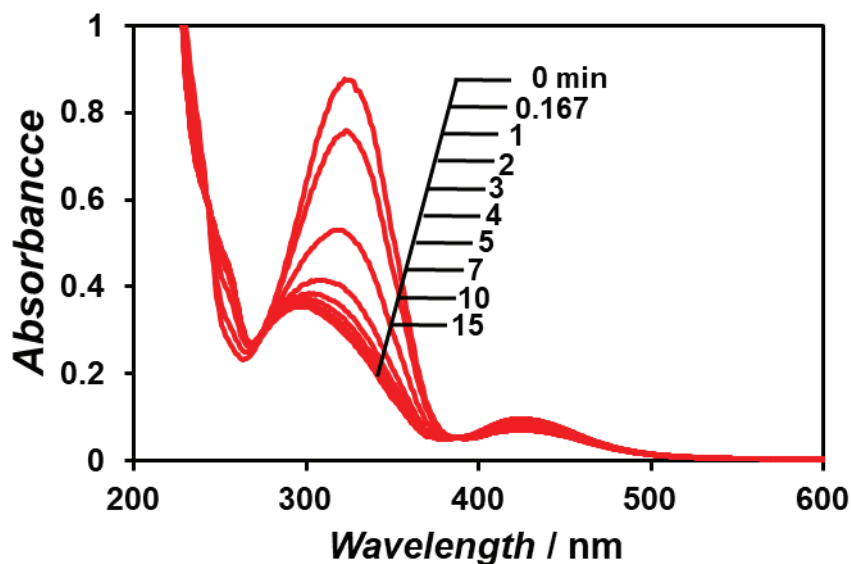


図 4-11. 各 UV 照射時間における 100 μ M β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の UV-vis スペクトル

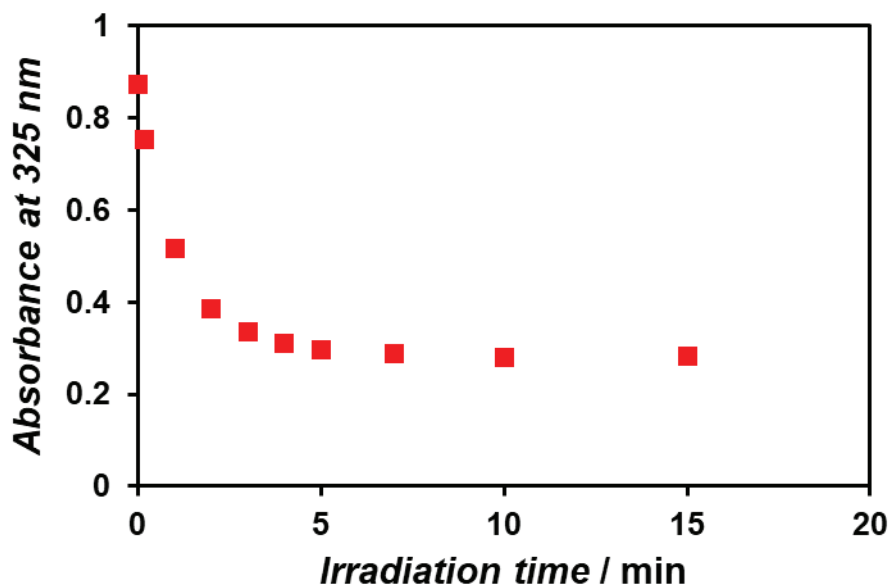


図 4-12. UV 照射による 100 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の 325 nm における吸光度の経時変化

図 4-11 よりペプチド溶液に 325 nm の光を照射すると 325nm 付近の吸収が小さくなり、425 nm 付近の吸収が大きくなった。これより、アゾベンゼンの trans 体から cis 体への光異性化が確認された。また、図 4-12 に示した 325 nm の吸光度の経時変化より、光照射 7 分頃から吸収の増大が見られなくなったことから定常状態になったと考えられる。これらのことから、今後 trans 体から cis 体へ光異性化させる際には 325 nm の光を 15 分照射することとした。次に、425 nm の光を照射し、cis 体から trans 体への光異性化挙動を UV-vis スペクトルにより評価した。

【実験操作】

325 nm の光を 15 分照射した 100 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液に、25°C で 425 nm の光を照射し、各照射時間の UV-vis スペクトルを測定した。

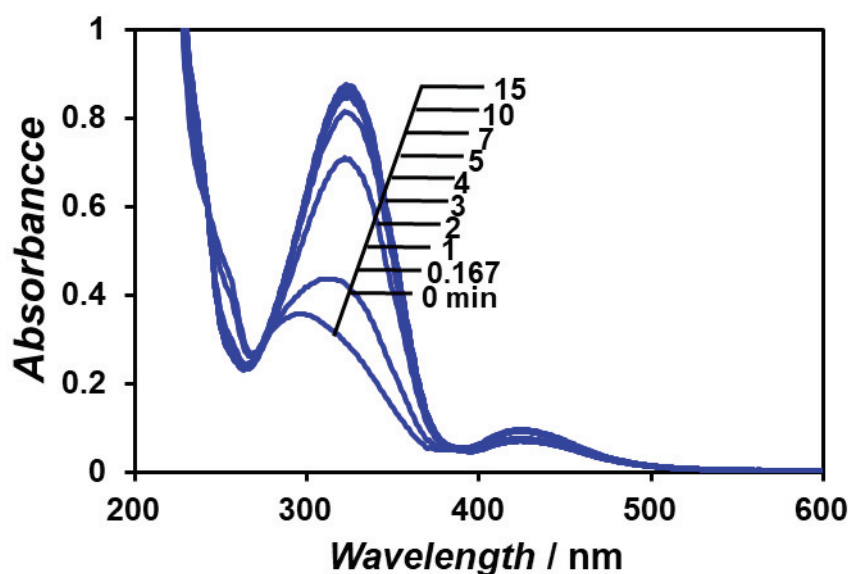


図 4-13. 各可視光照射時間における 100 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の UV-vis スペクトル

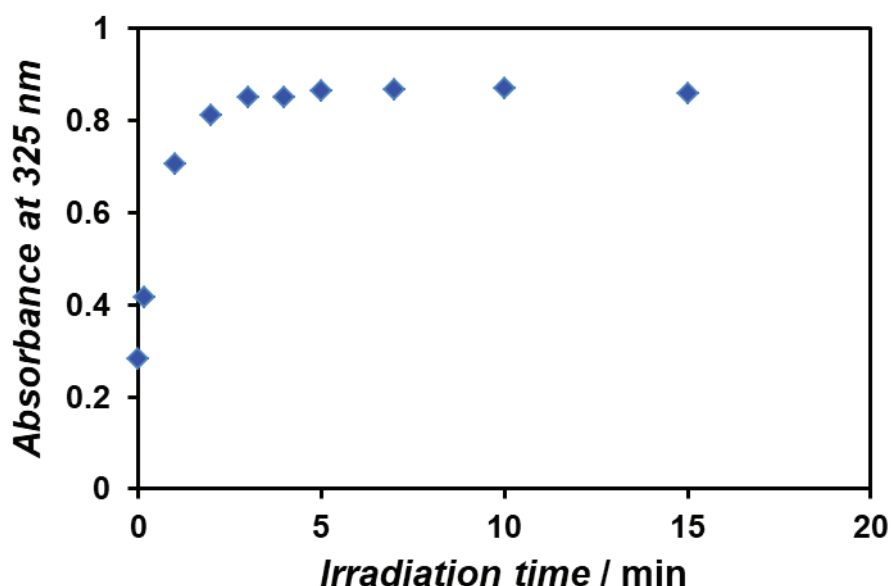


図 4-14. 可視光照射による 100 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の 325 nm における吸光度の経時変化

図 4-13 より、ペプチド溶液に 425 nm の光を照射すると 425 nm 付近の吸収が小さくなり、325 nm 付近の吸収が大きくなった。これより、アゾベンゼンの cis 体から trans 体への光異性化が確認された。また、図 4-14 に示した 325 nm の吸光度の経時変化より、光照射 4 分頃から吸収の増大が見られなくなったことから定常状態になったと考えられる。これらのことから、今後 cis 体から trans 体へ光異性化させる際には 425 nm の光を 15 分照射することとした。

次に HPLC によりどの程度異性化しているのかを確認するためにペプチドのピーク面積より異性化率を評価した。

【実験操作】

β -annulus-15V16A-azo ペプチド粉末をイオン交換水に溶解させ、100 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液を調製した。これを 50 μL セルに加えた。まず、25°C で 425 nm の光を 30 min 照射した。その溶液を 15 μL 採取し HPLC による分析を行った。その後、残った溶液に 25°C で 325 nm の光を 15 min 照射、15 μL 採取し HPLC による分析を行った。

試料：上記の試料

カラム: Inertsil ODS-3 (5 μm , 4 \times 250 mm)

試料注入量: 15 μL

移動相溶媒: 水 / アセトニトリル (ともに 0.1% TFA を含む)

移動相組成: 水 / CH_3CN 74 / 26 \rightarrow 72 / 28 (100 min)、リニアグラジエント

検出: UV-vis 220 nm

流量：1 mL/min

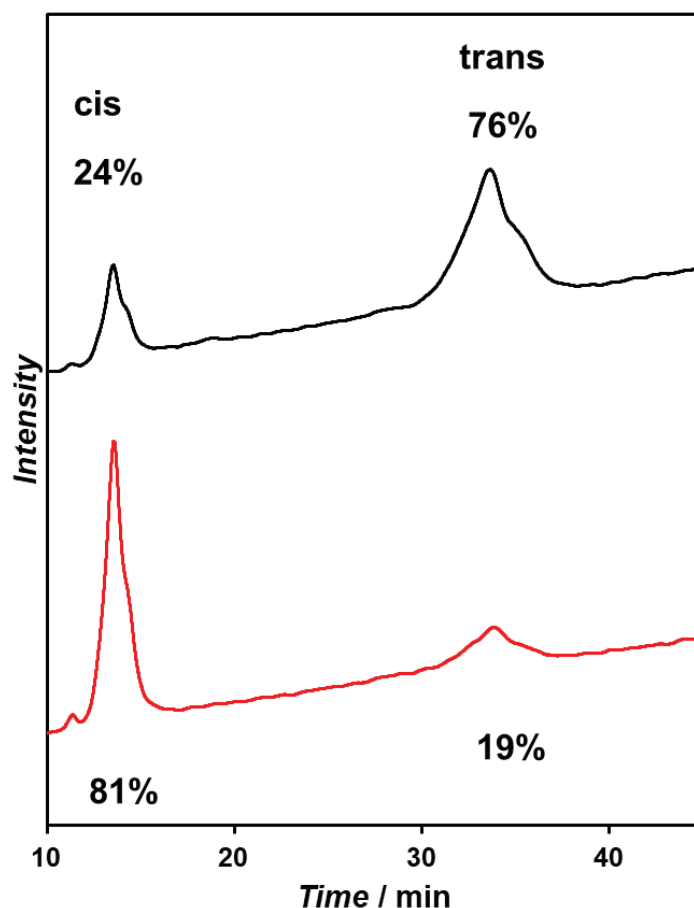


図 4-15. 100 μ M β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の HPLC チャート
(黒)可視光照射後、(赤)UV 照射後

図 4-15 黒より、13 分ごろに小さなピークが、33 分ごろに大きなピークが確認された。また、図 4-15 赤より、325 nm の光を照射すると 33 分ごろのピーク面積が減少し、13 分ごろのピークが増大した。このことから、33 分頃に出現するのが trans 体由来のピークで、13 分ごろに出現するピークが cis 体由来であると考えられる。HPLC チャートのピーク面積より異性化率を算出すると、可視光照射後では trans: cis=76: 24 であったが、UV 光照射後に trans: cis=19: 81 であり、UV 光によりアゾベンゼンが異性化していることが確認された。異性化率が低いのはアゾベンゼン周りの立体障害が大きいことが原因であると考えられる。

4-6. β -annulus-15V16A-azo ペプチドの自己集合挙動

β -annulus-15V16A-azo ペプチドが水中で自己集合して、どのような集合体を形成するのか DLS 測定、TEM 観察により評価した。

まず、DLS 測定により可視光照射後の β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液中でどの程度の大きさの集合体が形成しているか評価した。

【実験操作】

凍結乾燥した β -annulus-15V16A-azo ペプチド粉末にイオン交換水を加え、 $100 \mu\text{M}$ β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液を調製した。この溶液を光路長 1 cm 石英セル($50 \mu\text{L}$)に入れ、 15 分間可視光照射した。この溶液を希釈し、 $50, 25, 10, 5, 1 \mu\text{M}$ β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液を調製し、DLS 測定を行った。

【DLS 測定条件】

セル: ZEN2112 - Low volume glass cuvette ($12 \mu\text{L}$)

温度: 25°C

[β -annulus-15V16A-azo ペプチド] = $100 \mu\text{M}$

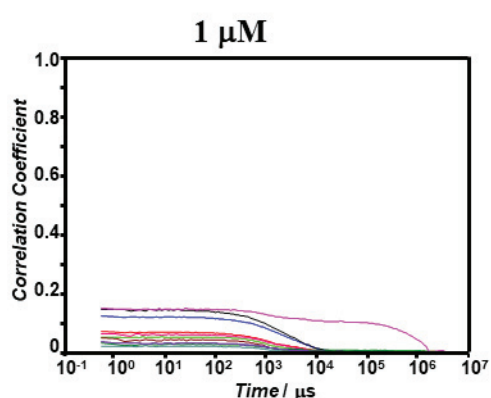
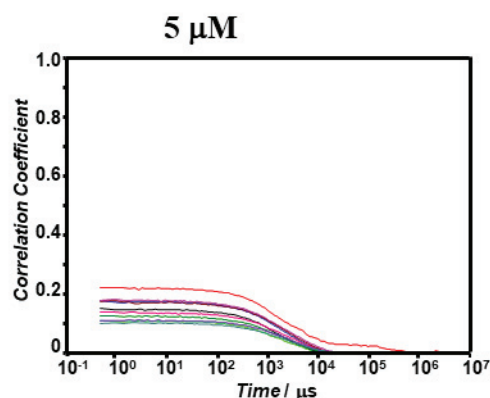
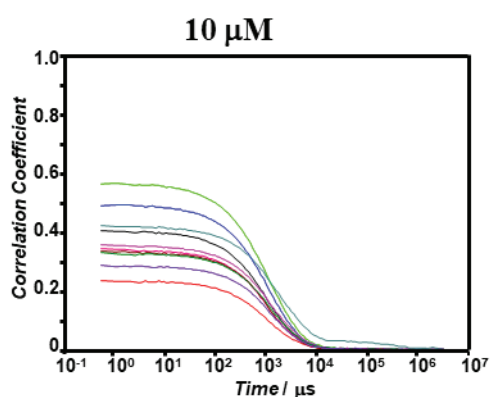
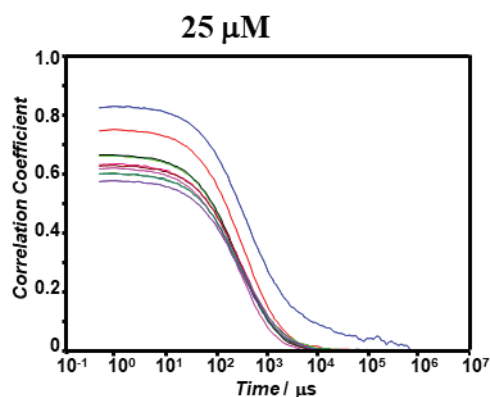
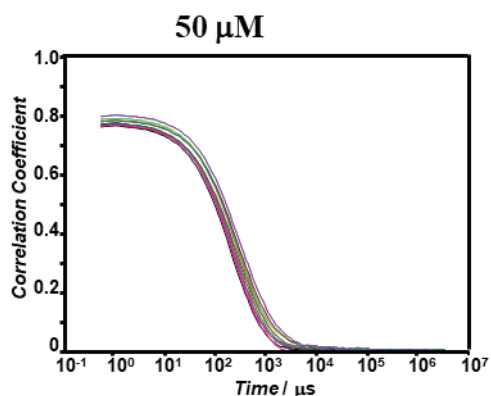
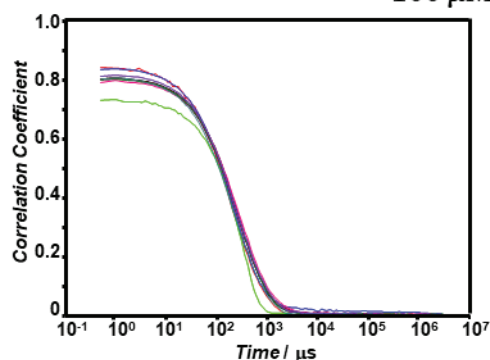


図 4-16. 各濃度における可視光照射後の β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の DLS 測定から得られた自己相関関数

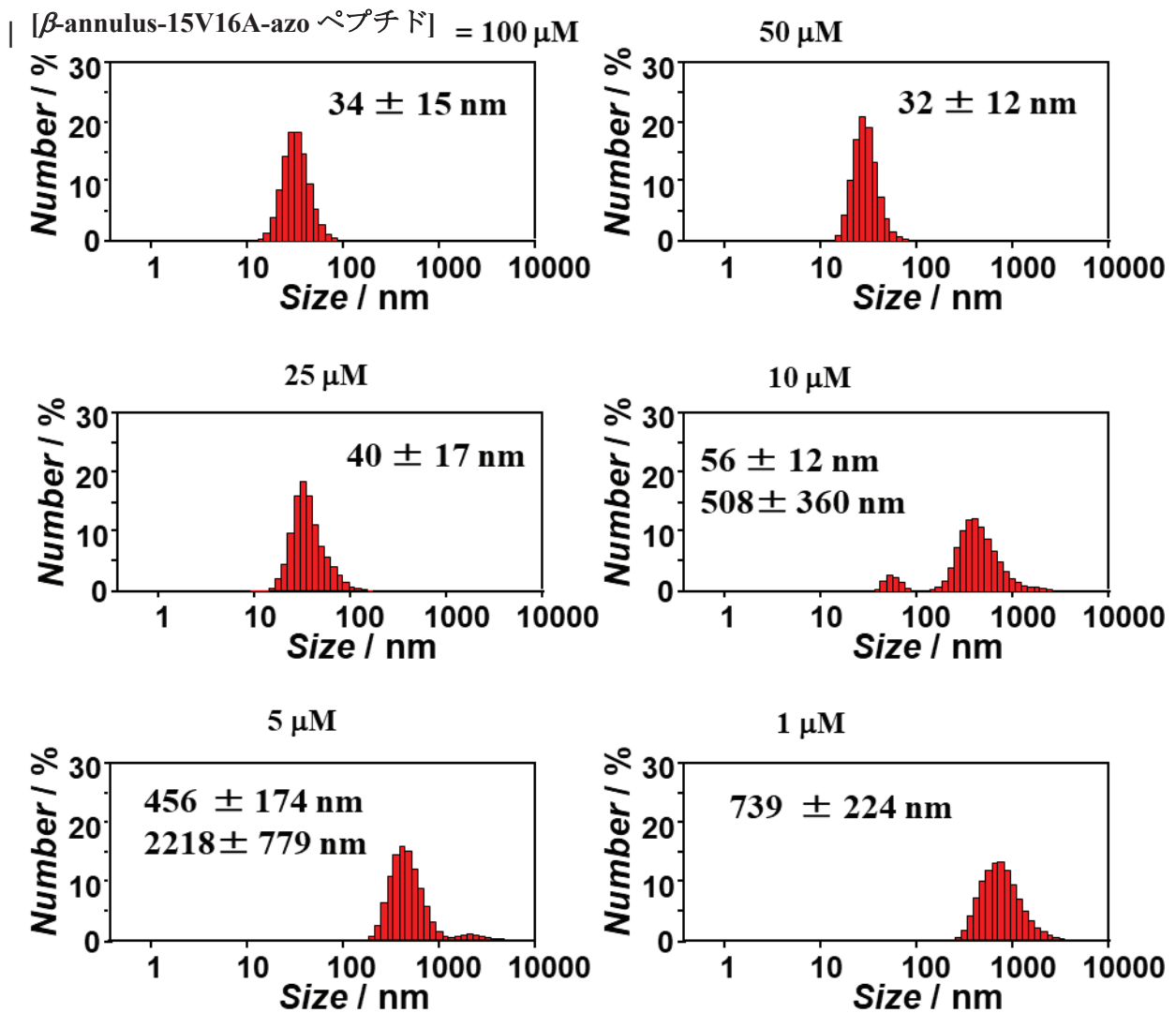


図 4-17. 各濃度における可視光照射後の $\beta\text{-annulus-15V16A-azo}$ ペプチド水溶液の DLS 測定から得られた個数換算分布

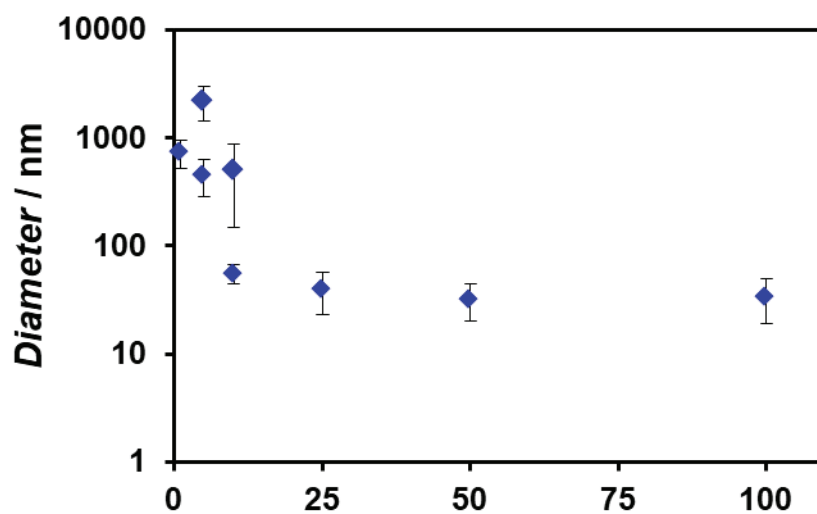


図 4-18. 可視光照射後の $\beta\text{-annulus-15V16A-azo}$ ペプチド水溶液の DLS 測定から得られた粒径分布の濃度依存性

図 4-18 より、25-100 μM の濃度範囲において、 β -annulus 24 からなる人工ウイルスキャプシドと同様の 30-50 nm 程度の大きさの集合体の形成が確認された。この結果より、 β -annulus 配列の 2 残基をアゾベンゼンに置き換えても、人工ウイルスキャプシドと同様の集合体が形成していることが示唆された。また、集合体の粒径は 25 μM 以上において濃度にあまり依存しないこともわかった。ペプチド濃度が 5 μM 以下の集合体は、図 4-16 より自己相関関数の縦軸の始まりが 1 から離れており、再現性も悪いため不安定な構造体なのではないかと考えられる。

次に、DLS 測定により UV 照射後の β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液中でどの程度の大きさの集合体が形成しているか評価した。

【実験操作】

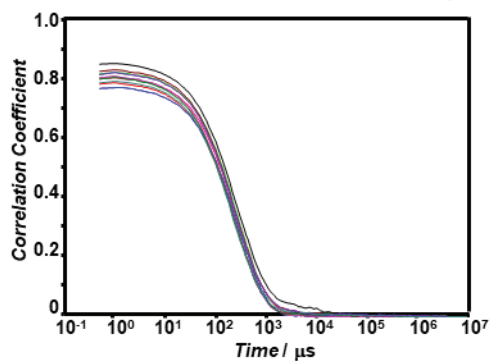
凍結乾燥した β -annulus-15V16A-azo ペプチド粉末にイオン交換水を加え、100 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液を調製した。この溶液を光路長 1 cm 石英セル(50 μL)に入れ、15 分間 UV 照射した。この溶液を希釈し、50, 25, 10, 5 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液を調製し、DLS 測定を行った。

【DLS 測定条件】

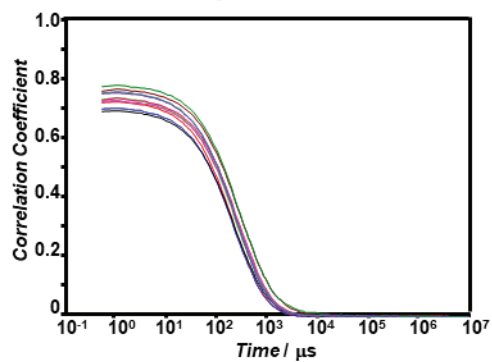
セル: ZEN2112 - Low volume glass cuvette (12 μL)

温度: 25°C

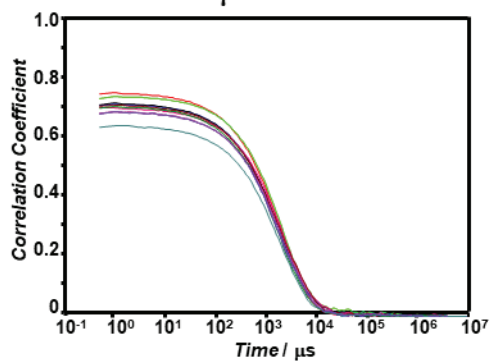
[β -annulus-15V16A-azo ペプチド] = 100 μ M



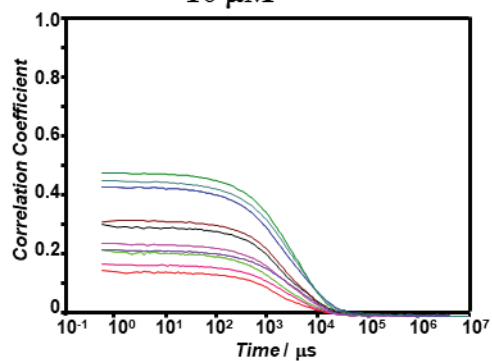
50 μ M



25 μ M



10 μ M



5 μ M

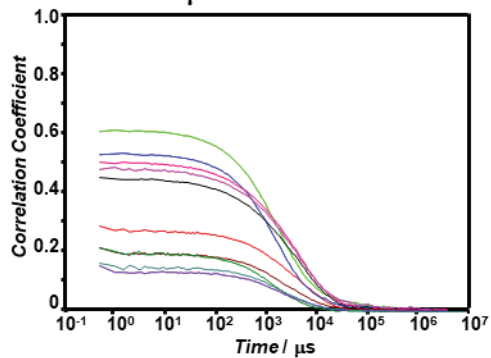


図 4-19. UV 照射後の β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の DLS 測定から得られた自己相関関数

| [β -annulus-15V16A-azo ペプチド] = 100 μ M

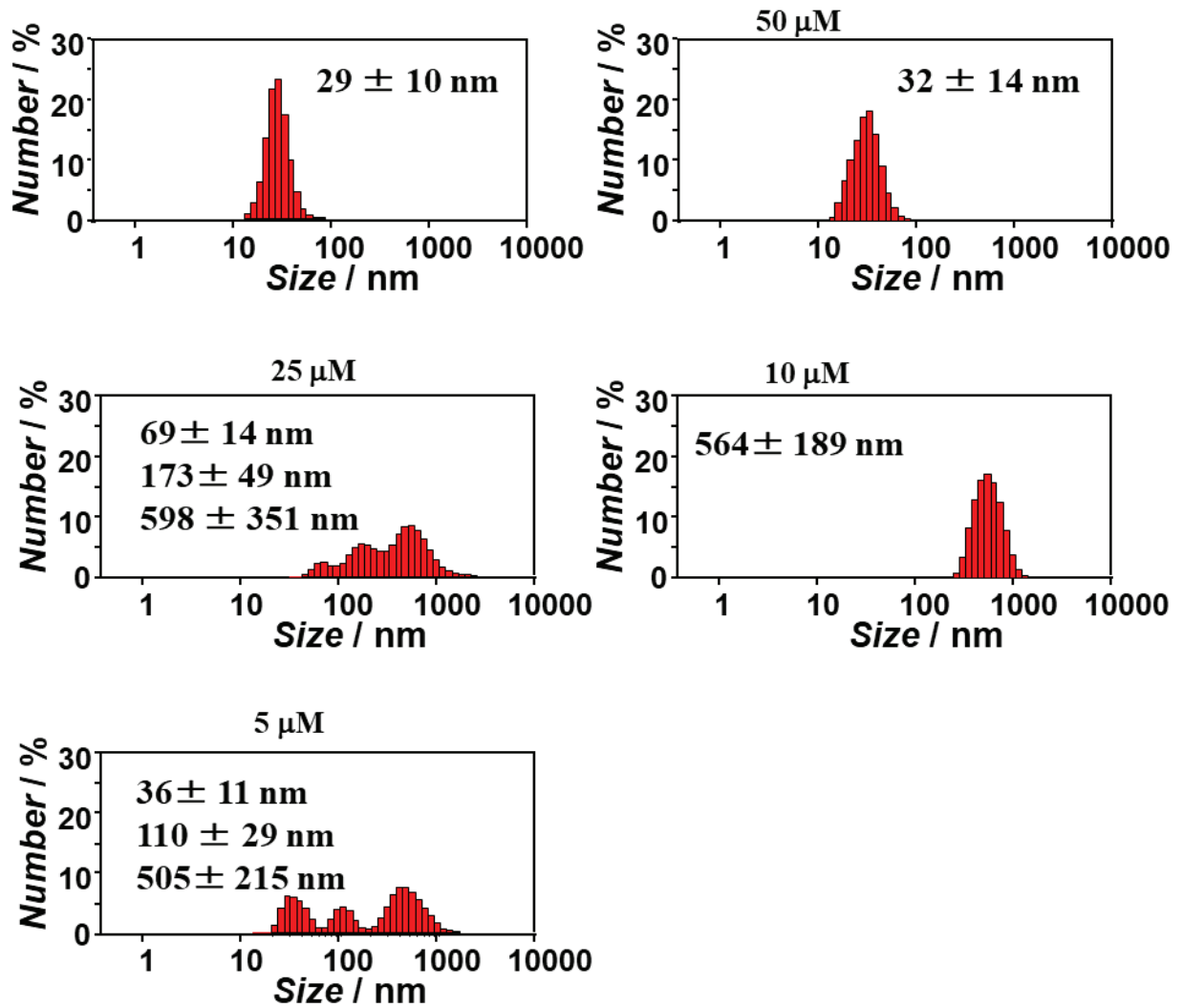


図 4-20. 各濃度における UV 照射後の β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の DLS 測定から得られた個数換算分布

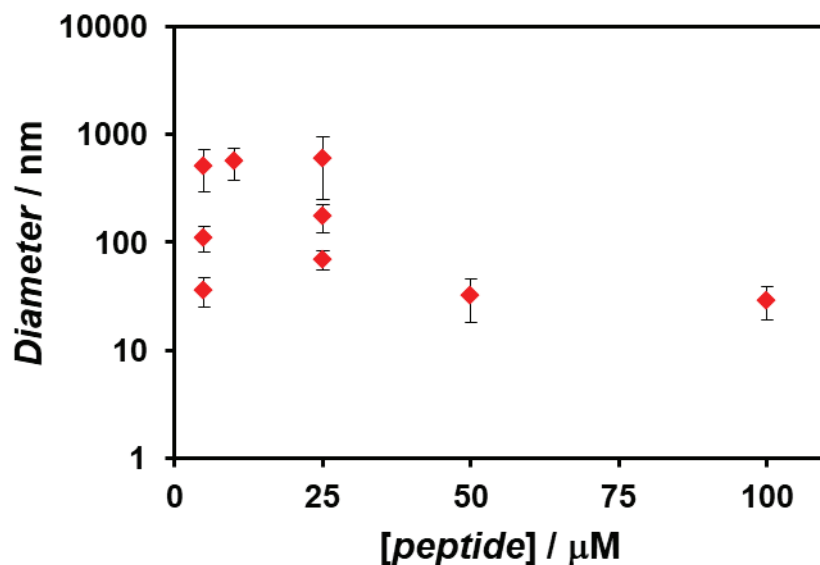


図 4-21. UV 照射後の β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の DLS 測定から得られた粒径分布の濃度依存性

図 4-21 より、50-100 μM の濃度範囲において、 β -annulus 24 ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドと同様の 30-50 nm 程度の大きさの集合体の形成が確認された。一方で、5-25 μM の濃度において 500 nm 程度の大きな粒径が確認された。これより、25 μM 以下の濃度において不定形の凝集体が形成していることを示唆された。このことから、25 μM の濃度において UV 照射前後で自己集合挙動が変化することが示唆された。そこで、UV 照射前後での CAC に変化が生じているのではないかと考え、CAC を測定した。

【実験操作】

凍結乾燥した β -annulus-15V16A-azo ペプチド粉末にイオン交換水を加え、100 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液を調製した。この溶液を光路長 1 cm 石英セル(50 μL)に入れ、15 分間可視光照射した。この溶液を希釈し、50, 25, 10, 5, 1 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液を調製し、DLS 測定を行った。また、残った溶液に 15 分間 UV 照射した。同様に、この溶液を希釈し、50, 25, 10, 5 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液を調製し、DLS 測定を行った。

【DLS 測定条件】

セル: ZEN2112 - Low volume glass cuvette (12 μL)

温度: 25°C

Attenuator: 11

Positioning method: Centre of the cell (water clear sample only)

なお、Count Rate を 10 回測定した平均を Mean Count Rate とした。

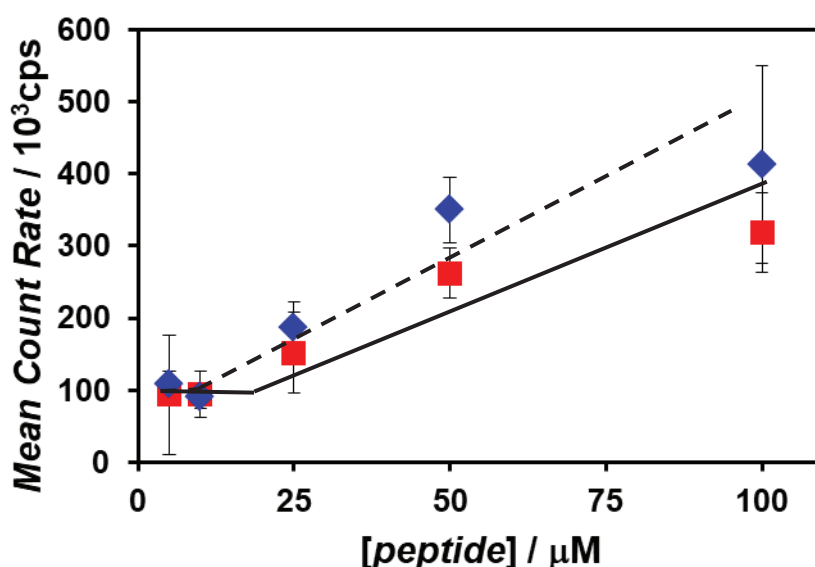


図 4-22. β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の DLS 測定から得られた光散乱強度の濃度依存性(青)可視光、(赤)UV 照射後

図 4-22 より、可視光照射後では β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液から得られた散乱強度の濃度依存性から、25-100 μM では散乱強度が濃度に比例して上昇したが、10 μM 以下の濃度では散乱強度は一定となり、CAC は 10 μM 付近に存在すると考えられる。一方で、25-100 μM の濃度において UV 照射後の溶液の散乱強度が、可視光照射後の散乱強度よりも低かった。このことから、UV 照射後では、CAC が可視光照射後より高い濃度 25 μM 付近に存在すると考えられる。これは、DLS 測定の結果とも一致する。このことから、 β -annulus-15V16A-azo ペプチドの CAC は、光異性化により変化することが確認された。

次に、UV 光照射前後において、 β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液中でどのような集合体を形成しているのか TEM により観察を行った。

【実験操作】

100 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液を光路長 1 cm 石英セル(50 μL)に入れ、15 分間可視光照射した。この溶液を TEM グリッドに 5 μL 滴下し、液滴を 1 分間保持した後ろ紙で吸い取った。その後、2% $\text{Na}_3(\text{PW}_{12}\text{O}_{40}) \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 水溶液を 5 μL 滴下した。1 分間静置した後、ろ紙で液滴を吸い取った。その後、一晚減圧乾燥した。また、残った溶液に 15 分間 UV 照射し、同様の操作を行った。

【TEM 観察条件】

Grid: C-SMART Hydrophilic TEM grids, (ALLIANCE Biosystems)

加速電圧: 80 kV

染色: 2% $\text{Na}_3(\text{PW}_{12}\text{O}_{40}) \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 水溶液

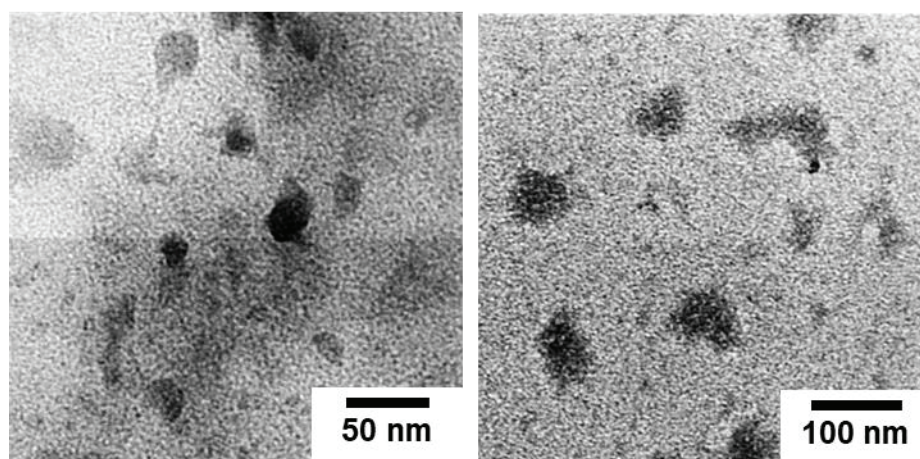


図 4-23. 可視光照射後の100 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の TEM 像

図 4-23 の可視光照射後の100 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の TEM 像より、少し歪な形をしているものの球状集合体が観察された。粒径は $37 \pm 18 \text{ nm}$ ($n=14$)であり、DLS の結果ともほぼ一致している。このことから、可視光照射後のペプチド水溶液中で、人工ウイルスキャプシドと同程度の 40 nm の球状集合体が形成していることが確認された。

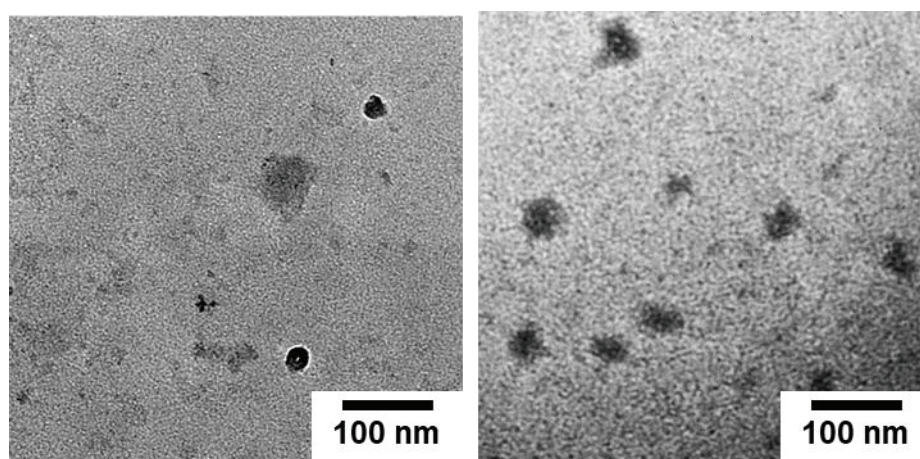


図 4-24. UV 光照射後の100 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の TEM 像

図 4-24 の UV 光照射後の100 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の TEM 像でも、球状集合体が観察された。粒径は $35 \pm 8 \text{ nm}$ ($n=10$)であり、DLS の結果ともほぼ一致している。これらの結果から、100 μM において光異性化前後で人工ウイルスキャプシドと同様の球状集合体が形成していることが確認された。これらのことから、100 μM において光異性化前後でペプチド集合体の形態に大きな変化は確認されなかった。これは、測定した溶液中に trans 体と cis 体が混在しているため、大きな変化が確認されなかったのではないかと考えられる。

4.7. ペプチド水溶液への光照射による集合形態の変化

CAC 付近で光異性化を行えば、溶液中でペプチドの集合挙動が変化するのではないかと考えられるので、25 μM において DLS 測定および TEM 観察実験を行った。

【実験操作】

100 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液を希釈し 25 μM 水溶液を調製した。これを DLS 測定用セルに 15 μL 加えた。まず、25°C で 425 nm の光を 15 min 照射し、DLS 測定を行った。測定後、25°C で 325 nm の光を 15 min 照射し、DLS 測定を行った。

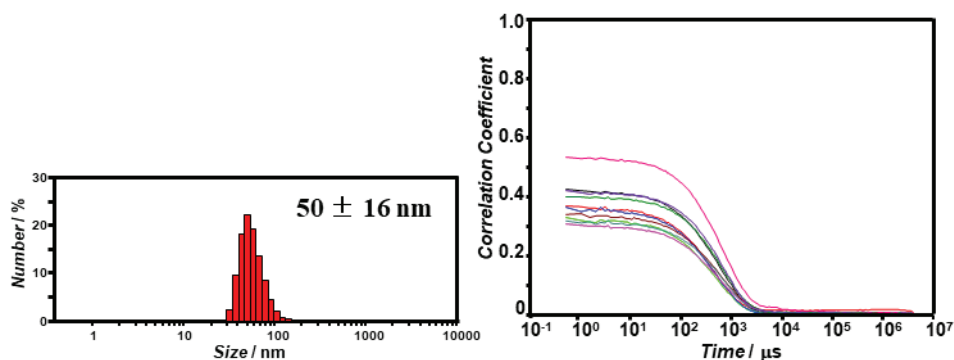


図 4-25. 可視光照射後の 25 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の DLS 測定結果 (左) 個数換算分布 (右) 自己相関関数

図 4-25 左より、人工ウイルスキャプシドと同程度の 50 nm 程度の粒径が確認された。次に、この水溶液に UV 光を照射し、DLS 測定を行った。

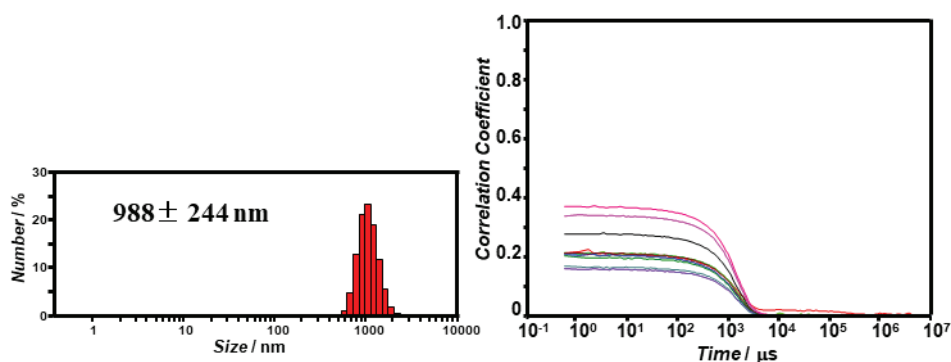


図 4-26. UV 光照射後の 25 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の DLS 測定結果 (左) 個数換算分布 (右) 自己相関関数

図 4-26 より、UV 照射後、人工ウイルスキャプシドと同程度の 50 nm 程度の粒径が確認されず、非常に大きな粒径が確認された。このことから溶液中で光によりペプチドの集合形態の変化が示唆された。

次に、25 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の UV 光照射前後でどのような集合体を形成しているのか TEM により観察を行った。

【実験操作】

100 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液を希釈し 25 μM 水溶液を調製した。これを DLS 測定用セルに 15 μL 加え、25°C で 425 nm の光を 15 min 照射した。この溶液を TEM グリッドに 5 μL 滴下し、液滴を 1 分間保持した後ろ紙で吸い取った。その後、2% $\text{Na}_3(\text{PW}_{12}\text{O}_{40}) \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 水溶液を 5 μL 滴下した。1 分間静置した後、ろ紙で液滴を吸い取った。その後、一晩減圧乾燥した。また、残った溶液に 15 分間 UV 照射し、同様の操作を行った。

【TEM 観察条件】

Grid: C-SMART Hydrophilic TEM grids, (ALLIANCE Biosystems)

加速電圧: 80 kV

染色: 2% $\text{Na}_3(\text{PW}_{12}\text{O}_{40}) \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 水溶液

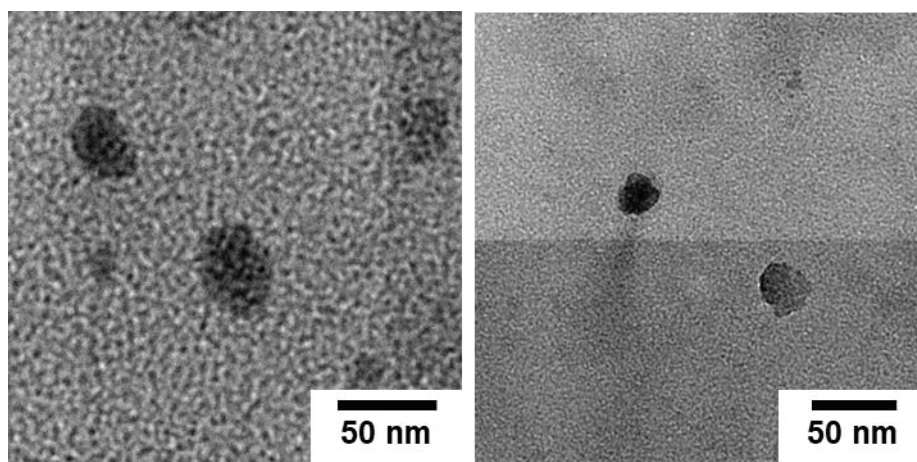


図 4-27. 可視光照射後の 25 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の TEM 像

図 4-27 の可視光照射後の 25 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の TEM 像より、球状集合体が観察された。粒径は 33 ± 7 nm ($n=5$) であり、DLS の結果ともほぼ一致している。このことから、可視光照射後の 25 μM ペプチド水溶液中で、人工ウイルスキャプシドと同程度の球状集合体が形成していることが確認された。

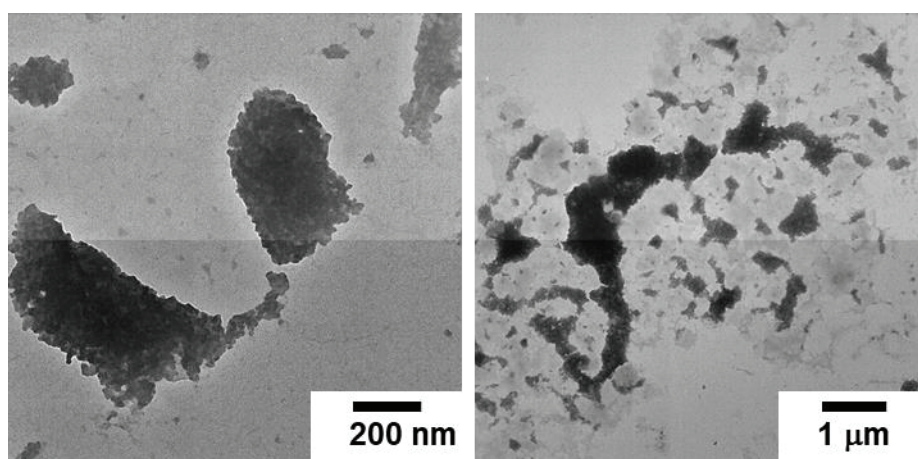


図 4-28. UV 照射後の 25 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の TEM 像

一方、図 4-28 の UV 照射後の 25 μM β -annulus-15V16A-azo ペプチド水溶液の TEM 像では、非常に大きな凝集体が観察された。この結果は、DLS の結果ともほぼ一致している。このことから、25 μM 溶液中では、光によりペプチドの集合形態の変化が示唆された。

4-8. まとめ

β -annulus 配列の屈曲部位である VA の位置にアゾベンゼンを導入した β -annulus-15V16A-azo ペプチドを合成し、その光異性化による自己集合挙動の変化を評価した。このペプチド水溶液(100 μM)に、UV 光(325 nm)を 15 分間照射するとアゾベンゼンが cis 体に異性化し、これに可視光(425 nm)を 15 分間照射すると trans 体に異性化することが確認された。UV 光照射前のペプチド水溶液(25 μM)の動的光散乱(DLS)測定により、未修飾の人工ウイルスキャプシドと同程度の約 50 nm の集合体形成が確認された。一方、UV 光照射後では、約 1 μm の凝集体形成が示唆された。この結果から、光異性化によって β -annulus-15V16A-azo ペプチドの自己集合挙動の光制御が可能であることが示唆された。光応答性を有する人工ウイルスキャプシドは、光照射によるゲスト分子の放出が可能であるため、ドラッグデリバリーシステムの有用なキャリアとなることが期待される。

一方で、アゾベンゼンの光異性化によるペプチドの自己集合挙動の変化が 25 μM でしか確認されておらず、劇的な自己集合挙動の変化とは言えないと考えられる。これはアゾベンゼンの導入位置を検討する際に MacroModel による分子動力学計算はペプチド中のすべてのアゾベンゼンが cis 体か trans 体で計算したが、実際に自己集合挙動を評価した際には、cis 体、trans 体のアゾベンゼンが混在している系で評価を行ったことが原因として考えられる。そこで、今後 HPLC による分取により cis 体、trans 体のアゾベンゼンを有するペプチドを単離し、どちらか一方のアゾベンゼンしか存在しないペプチドで自己集合挙動の光制御の評価を行うべきであると考えられる。また、アゾベンゼン導入位置が悪いことも原因であると考えられる。例えば、球状集合体形成に重要な 14 残基目の Pro をアゾベンゼン置換したペプチドを合成すれば、アゾベンゼンの光異性化による自己集合挙動の劇的な変化が期待できるのではないかと考えられる。

参考文献

- 1) T. Douglas, M. Young, *Nature*, **393**, 152 (1998)
- 2) Y. Ren, S. M. Wong, L.Y. Lim, *Bioconj. Chem.*, **18**, 836 (2007)
- 3) W. Szymański , J. M. Beierle , H. A. V. Kistemaker , W. A. Velema , B. L. Feringa, *Chem. Rev.*, **113**, 6114 (2013)
- 4) T. M. Doran, E. A. Anderson, S. E. Latchney, L. A. Opanashuk, B. L. Nilsson, *ACS Chem. Neurosci.*, **3**, 211 (2012)
- 5) A. Aemissegger, V. Kräutler, W. F. V. Gunsteren, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 2929 (2005)
- 6) A. Aemissegger, D. Hilvert, *Nat. Protoc.*, **2**, 161 (2007)

第5章 結論

5-1. 本論文の統括

本論文では、 β -annulus ペプチドの自己集合により構築される人工ウイルスキャプシドのさらなる機能化を目指して、無機微粒子との複合化、突起状構造の付与、光応答性の付与を検討した。

第1章では、天然のタンパク質集合体の構造および機能や、タンパク質・ペプチドの自己集合を利用した人工のナノ集合体構築に関する研究について述べた。また、 β -annulus ペプチドの自己集合による人工ウイルスキャプシドの構築および機能化の戦略について述べた。

第2章では、無機物と人工ウイルスキャプシドの複合化について述べた。まず、ZnO 結合配列を有する β -annulus ペプチドを合成し、ZnO ナノ粒子と混合させることで人工ウイルスキャプシドへの ZnO ナノ粒子の内包を検討した。透過型電子顕微鏡(TEM)観察より、10 nm 程度の ZnO ナノ粒子が複数集合し、50 nm 程度の凝集体を形成していることが確認された。ZnO-binding β -annulus ペプチドと ZnO ナノ粒子混合液の蛍光スペクトルは、ZnO ナノ粒子のみのスペクトルとは異なったため、ZnO ナノ粒子の表面状態の変化が示唆された。これらのことから、ZnO ナノ粒子を内包した人工ウイルスキャプシドが構築されたと考えられる。

次に、アニオン性の表面電荷を有する蛍光性 CdTe ナノ粒子の人工ウイルスキャプシドへの内包挙動を、蛍光相関分光法(FCS)を用いてその場解析した。CdTe ナノ粒子分散液に β -annulus ペプチドを添加していくと、臨界会合濃度(CAC)以下では FCS 曲線に変化はなかったが、CAC 以上で CdTe ナノ粒子の拡散時間が大きくなった。得られた拡散時間から蛍光分子の見かけの粒径を計算すると、人工ウイルスキャプシドと同程度の 30~50 nm と求められた。これらのことから、水溶液中での人工ウイルスキャプシドへの蛍光性ナノ粒子の動的な内包挙動のその場解析に成功した。

さらに、C 末端に金結合部位として GGGCG 配列を導入した β -annulus ペプチドと金ナノ粒子のコンジュゲートの自己集合により、金ナノ粒子により被覆された人工ウイルスキャプシドを構築した。動的な光散乱(DLS)測定および TEM 観察から金ナノ粒子が人工ウイルスキャプシドの表面に集積した構造体を形成していることが確認された。また UV-vis スペクトル測定から、金ナノ粒子のみの吸収波長より 10 nm 程長波長シフトしていることが確認された。このことから、金ナノ粒子間のプラズモンカップリングが示唆された。

第3章では、アデノウイルスなどの天然の突起を有するウイルスを模倣した表面にコイルドコイルの突起を有する人工ウイルスキャプシドの創製について述べた。キャプシド表面に配向するC末端側にコイルドコイル形成配列を有する β -annulusペプチドI NHVGGTGGAIMAPVAVTROLVGGCGGGKIAALKKKNAALKQKIAALKQ (β -annulus-coiled-co

il-B)をNative Chemical Ligation法を用いて合成した。合成したペプチドと相補的なコイルドコイルを形成するペプチドEIAALEKENAALQEIAALEQ (coiled-coil-A)を混合し、表面にコイルドコイル突起を有する人工ウイルスキャプシドの構築を検討した。混合溶液のCDスペクトルにより二次構造を評価したところ、モル比1:1でのコイルドコイル形成が確認された。また、 β -annulus-coiled-coil-Bペプチド 50 μ Mに対して、12.5 μ M coiled-coil-Aペプチドと混合させたとき、約60 nmの人工ウイルスキャプシドの表面に5 nm程度の粒のついた球状集合体の形成がTEM観察により確認された。人工ウイルスキャプシド表面のコイルドコイル突起構造は、レセプタータンパク質などの様々な機能性分子を提示する際のプラットフォームとして有望な構造基盤であると期待される。

第4章では、天然ウイルスには存在しない光応答性を付与した人工ウイルスキャプシドの創製について述べた。近年、ペプチドやタンパク質にフォトクロミック基を導入し、その構造・機能を光制御した研究されている。 β -annulus配列の屈曲部位であるVAの位置にアゾベンゼンを導入した β -annulus-15V16A-azoペプチドを合成し、その光異性化による自己集合挙動の変化を評価した。このペプチド水溶液(100 μ M)に、UV光を15分間照射するとアゾベンゼンがcis体に異性化し、これに可視光を15分間照射するとtrans体に異性化することが確認された。UV光照射前のペプチド水溶液(25 μ M)のDLS測定により、約50 nmの集合体形成が確認されたが、UV光照射後では、約1 μ mの凝集体形成が確認された。これらの結果から、 β -annulus-15V16A-azoペプチドの自己集合挙動の光制御が可能であることが示唆された。創製した光応答性を有する人工ウイルスキャプシドは、光照射によるゲスト分子の放出が可能であるため、ドラッグデリバリーシステムの有用なキャリアとなることが期待される。一方で、アゾベンゼンの光異性によるペプチドの自己集合挙動の変化がまだ十分でないと考えられるため、今後cis体、trans体のアゾベンゼンを有するペプチドを単離し、自己集合挙動の光制御の評価を行う必要がある。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、日々の研究、論文執筆などご指導を賜りました鳥取大学大学院松浦和則教授に心より感謝申し上げます。未熟な私が博士論文を執筆できたのも先生の多大なる協力のおかげだと感じています。私は先生の研究に対する姿勢に感銘を受け、博士号を志しました。今後も、先生に指導していただいたことを心に留め、研究者として社会に貢献できるよう、よりおもしろい研究ができるように尽力したいと思います。6年間の研究生生活を支えていただき本当にありがとうございました。

また、副査を務めていただいた鳥取大学大学院 伊藤敏幸教授、河田康志教授に心より感謝いたします。

韓旻娥准教授(現 Kongju National University 教授)に感謝申し上げます。

様々なご指導を賜りました稲葉央助教に感謝申し上げます。特に、報告会において貴重なご指摘、ご助言をしていただいたことで研究が前進いたしました。

本研究の遂行において透過型電子顕微鏡(TEM)観察を行うにあたり、ご指導いただきました鳥取大学農学部電顕室の谷口氏、足定氏に深く感謝申し上げます。

研究室生活を支えて下さった中村陽子氏(現鳥取大学大学院博士後期課程)に感謝致します。

また、上野元貴氏、坂田達彦氏ならびに山本翔也氏をはじめとする、共に研究を行った同輩、後輩諸氏に深く感謝いたします。

本論文の4章は JSPS 科研費 JP16J03349 の助成を受け、研究を遂行しました。ご支援していただき感謝申し上げます。

最後に、9年間にわたる学生生活を支援してくれた両親に深く感謝いたします。