

(様式2)

学位論文の概要及び要旨

氏 名 藤田 聖矢 印

題 目 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

学位論文の概要及び要旨

球状ウイルスは、内部に核酸を有し、一義的なサイズと会合数を有する18~100 nm程度のキャプシドと呼ばれるタンパク質の殻で覆われている天然の超分子集合体である。近年、一定の内部空間を有するウイルスキャプシドをナノリアクターやナノキャリアとして応用する研究や、規則正しく配置されたウイルス表面を機能分子の足場材料として応用する研究が注目されている。しかし、これまでのウイルスキャプシドを用いたナノテクノロジー研究には、天然由来のキャプシドや、それらの変異体がいられ、分子設計の自由度が高いとは言えない。そこで、我々は合成化学的アプローチを用いた人工ウイルスキャプシドの構築に取り組んでいる。具体的には、tomato bushy stunt virusの骨格形成に関わっている24 残基の β -annulus ペプチド(INHVGGTGG AIMAPVAVTRQLVGS)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た。また、人工ウイルスキャプシドの内部に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、本研究の背景、ならびに本研究の目的および構成について述べた。

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。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。

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INHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVGGCGGGKIAALKKKNAALKQKIAALKQ (β -annulus-coiled-coil-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EIAALEK ENAALEQEIAALEQ (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。

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・機能の光制御が研究されている。 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-V15A16-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-V15A16-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。

第5章では、本論文で得られた知見を統括した。