

核酸を修飾した人工ウイルスキャプシドの
創製に関する研究

2020 年 1 月

中村 陽子

核酸を修飾した人工ウイルスキャプシドの創製に関する研究

目次

第1章 緒言

- 1-1 ウイルスキャプシド
 - 1-2 天然のウイルスキャプシドを用いたナノ材料
 - 1-3 タンパク質からなるナノカプセル
 - 1-4 人工設計ペプチドからなるナノ構造体
 - 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 DNA を修飾した人工ウイルスキャプシドの創製

- 2-1 序
 - 2-2 DNA 修飾 β -Annulus peptide の合成
 - 2-2-1 β -Annulus Cys peptide
INHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVCS の固相合成
 - 2-2-2 β -Annulus Cys peptide の脱保護及び樹脂からの切断
 - 2-2-3 逆相 HPLC による精製
 - 2-2-4 β -Annulus-dA₂₀ peptide の合成
 - 2-2-5 β -Annulus-dT₂₀ peptide の合成
 - 2-3 DNA 修飾 β -Annulus peptide の自己集合挙動
 - 2-3-1 DLS 測定
 - 2-3-2 TEM 観察
 - 2-3-3 ζ -電位測定
 - 2-4 DNA 修飾人工ウイルスキャプシド表面における DNA ハイブリダイゼーション挙動
 - 2-4-1 CD スペクトル
 - 2-4-2 蛍光スペクトル測定
 - 2-4-3 ポリヌクレオチド鎖との相補的塩基対形成によるキャプシド間凝集
 - 2-5 dA₂₀ 及び dT₂₀ 修飾人工ウイルスキャプシドの複合化
 - 2-7 まとめ
- 参考文献

第3章 人工ウイルスキャプシドへの短鎖 DNA の内包と還元による放出

- 3-1 序

- 3-2 DNA-SS- β -Annulus peptide の合成
 - 3-2-1 Cys- β -Annulus peptide
 - CINHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVGS の固相合成
 - 3-2-2 Cys- β -Annulus peptide の脱保護及び樹脂からの切断
 - 3-2-3 逆相 HPLC による精製
 - 3-2-4 DNA-SS- β -Annulus peptide の合成
 - 3-3 DNA-SS- β -Annulus peptide の自己集合挙動
 - 3-3-1 DLS 測定
 - 3-3-2 TEM 観察
 - 3-4 還元型グルタチオンを用いたジスルフィド結合切断による DNA 放出
 - 3-4-1 逆相 HPLC による分析
 - 3-4-2 MALDI-TOF-MS 測定
 - 3-4-3 DLS 測定
 - 3-4-4 TEM 観察
 - 3-5 ジチオスレイトール(DTT)を用いたジスルフィド結合切断による DNA 放出
 - 3-5-1 逆相 HPLC による分析
 - 3-5-2 MALDI-TOF-MS 測定
 - 3-5-3 DLS 測定
 - 3-5-4 TEM 観察
 - 3-6 まとめ
- 参考文献

第4章 人工ウイルスキャプシドへの mRNA の内包

- 4-1 序
- 4-2 dT₂₀-SS- β -Annulus peptide の合成
- 4-3 dT₂₀-SS- β -Annulus peptide の自己集合挙動
 - 4-3-1 DLS 測定
 - 4-3-2 TEM 観察
- 4-4 dT₂₀-SS- β -Annulus peptide と RNA のハイブリダイゼーション
 - 4-4-1 RNA の濃度決定
 - 4-4-2 RNA の DLS 測定
 - 4-4-3 ゲルシフトアッセイ
- 4-5 dT₂₀-SS- β -Annulus peptide と β -Annulus peptide の共集合によるキャプシドの作製
 - 4-5-1 DLS 測定
 - 4-5-2 TEM 観察
- 4-6 dT₂₀ と mRNA のハイブリダイゼーションによる共集合キャプシドへの mRNA の

内包

4-6-1 ゲルシフトアッセイ

4-6-2 DLS 測定

4-6-3 TEM 観察

4-6-4 人工ウイルスキャプシドに内包された mRNA のリボヌクレアーゼ耐性の評価

4-6-5 mCherry mRNA 内包 dT₂₀- β -Annulus の細胞導入実験 (CLSM 観察)

4-7 まとめ

参考文献

第 5 章 結言

第1章 緒言

1-1 ウイルスキャプシド

タンパク質は、共有結合の一種であるアミド結合によって数珠状に連なった直鎖状のポリペプチド鎖で構成されている。一次構造であるポリペプチド鎖は、鎖間で生じる水素結合により α -ヘリックスや β -シート構造といった二次構造を形成し、その後タンパク質全体では、静電相互作用や水素結合、疎水性相互作用などによって折り畳まれ、アミノ酸配列に特有の立体構造(三次構造)をとる。さらに同一のタンパク質サブユニットが自己集合して nm から μm オーダーの繊維状・球状構造体(四次構造)を形成することが知られている¹⁾。タンパク質集合体は、多量化することで高い親和性や特異性を獲得し、生体内で多様かつ高度な機能を発揮することができる。

ウイルスは、自身のゲノム核酸(DNA または RNA)と、その周りを取り囲むキャプシドと呼ばれる殻タンパク質から構成されているタンパク質集合体の一つである。ウイルスキャプシドは、数十~数百の同一のキャプシドタンパク質からなる集合体であり、構造は X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡(cryo-EM)などによって解析されている。その形状は棒状、球状、外側をエンベロープ(脂質二重膜)で覆われたものなどがあり、ウイルスの種類によって様々な形態を有することが知られている²⁾。

棒状ウイルスは、同一のキャプシドタンパク質が核酸に直接らせん状に結合した棒状の構造をしている。例えばタバコモザイクウイルス(TMV)は $300 \times 18 \text{ nm}$ の細長い形状をしている(図 1-1)。2,130 個のキャプシドタンパク質が棒状体の中心に位置する一本鎖 RNA に直接結合しており、1 周当たり 16.3 個結合してリングが形成される。このリングが積み重なり、らせん状に 130 回転巻き付いた形状であると考えられている³⁾。

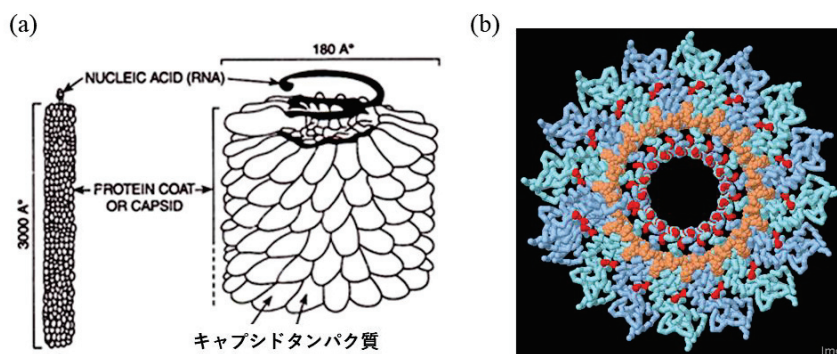


図 1-1. 棒状ウイルスである TMV: (a)全体像 (b)リング状側から見た立体構造

また、エンベロープと呼ばれる、キャプシドを覆う脂質二重膜を有したウイルスも存在する。例えばヒトの皮膚や唇などに痛みを伴う小胞を生じさせる単純ヘルペスウイルス(HSV)は、直径 125 nm の正二十面体キャプシドをタンパク質層(テグメント)が覆い、さらにエンベロープで覆われた構造をしている(図 1-2(a))。ヘルペスウイルスの核

酸を格納しているキャプシドは6量体、5量体、および1つの頂点ポータル（12量体）から成るユニークな構造をしており、頂点ポータルはキャプシドの自己集合時や宿主細胞への侵入時にウイルスDNAが出入りする分子モーターの役割を果たしている。近年 cryo-EM 及び単粒子解析によって、頂点ポータルでは2つの α -ヘリックスで構成された5つのコイルドコイル構造がキャプシド表面の5回対称軸の周りに垂直に結合された形状をしていることが明らかとなった（図1-2(b) 4）。

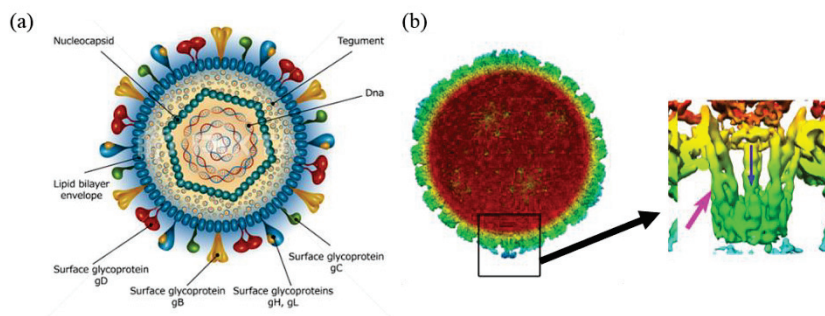


図1-2. HSV : (a) HSV 粒子全体の構造 (b) HSV キャプシドと頂点ポータルの立体構造とコイルドコイル構造

エンベロープを持たない球状ウイルスのキャプシド構造は、タンパク質サブユニットが高い対称性を有する中間体を経て規則的に集合し、一義的な正二十面体対称性構造を形成することが分かっている。例えば、トマトブッシュスタントウイルス(TBSV)は、180個のキャプシドタンパク質が2量体を経て高い対称性をもった5量体、6量体を形成したのち、相互に組み合されて正二十面体対称性を持ったキャプシドを形成する⁵⁾。6量体を形成する connecting arm 部分において、 β ストランドによる環状構造 (β -annulus 構造) が形成されており、これが TBSV キャプシドの内部骨格を形成している事が大きな特徴となっている(図1-3 (c))。

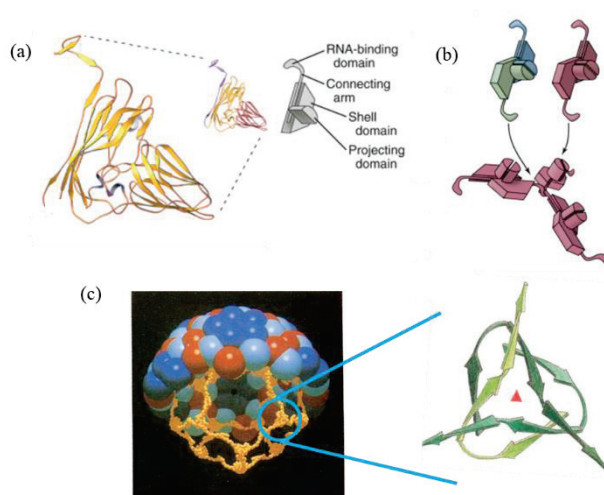


図1-3. TBSV のキャプシドタンパク質の模式図: (a)キャプシドタンパク質単量体 (b)多量体 (c)キャプシドの内部骨格および β -annulus 構造⁵⁾

これまで、ウイルスキャプシドは内部にゲノム核酸が無くても自己集合できるため、ドラッグデリバリーシステムなどの材料として利用する

研究が数多く行われてきた⁶⁾。しかし、タンパク質がどのように自己集合し、キャプシドを形成するのか未だに分からない事が多く、その機構が解明されればナノ材料としての分子設計が容易になるとの認識が高まってきている⁷⁾。これまでいくつかの球状ウイルスのキャプシド構造は、前述の通り X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡(cryo-EM)によって解析されてきたが、これらの方法では観察できない自己集合プロセスを、分子動力学シミュレーションによって予測する手法も取り入れられている。代表的なのは Zlotnick らによる熱力学的運動モデルであり、彼らは、タンパク質サブユニットによる核形成後にキャプシドの会合が急速に進み、過剰核生成の過程で中間体が多く生成され、かつ中間体は安定に存在できると予想している⁸⁾。

一方、Heck らは、タンパク質複合体の 4 次構造を保持したまま解析できるイオンモビリティスペクトロメトリー質量分析(IMS-MS)を用いることで、B 型肝炎ウイルス(HBV)及びノロウイルスのキャプシドを構成するオリゴマーを、集合中間体として検出できたと発表した⁹⁾。IMS-MS は、イオン化した試料を N₂ ガスで充填した IMS セルに導入し、外部電場によって加速移動させて分離する手法である。嵩高い化合物ほど N₂ ガスと頻りに衝突し移動度が低下するため、生じる移動時間の差を衝突断面積(Ω 値)として検出し、混合物中

であっても目的成分を単一のイオンとして分離することができる。この結果、6 量体のうち 3 角形(trimer of dimers)、5 回対称、準 6 回対称の形態が集合核となり、順次 2 量体が付加してキャプシドが形成されることが示された(図 1-4)。

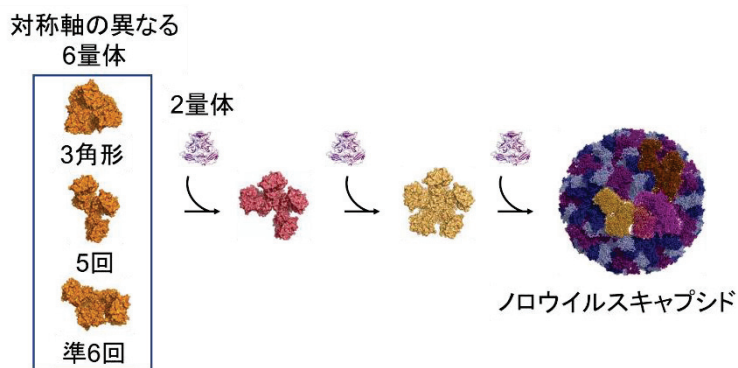


図 1-4. Heck らによるノロウイルスの自己集合モデル

また、Stonehouse らはサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)、Native PAGE(未変性ゲル電気泳動)、及びエレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)を用いて、さらに高次な構造を持つ中間体をとらえることができた¹⁰⁾。彼らは、HBV のキャプシドタンパク質をリンカーで化学的に架橋した 2 量体を作成し、基本ユニットの剛直性を増すことで、それ以上分解されない状態にした。その結果、2 量体で構成された 2 量体(dimer of dimers)から 5 量体(pentamer of dimers)の存在を確認し、これらが中間体であることを示した(図 1-5)。また、分離した dimer of dimers や trimer of dimers が再集合してキャプシドを形成する事ができたため、これらの自己集合過程は可逆的であることも示している。

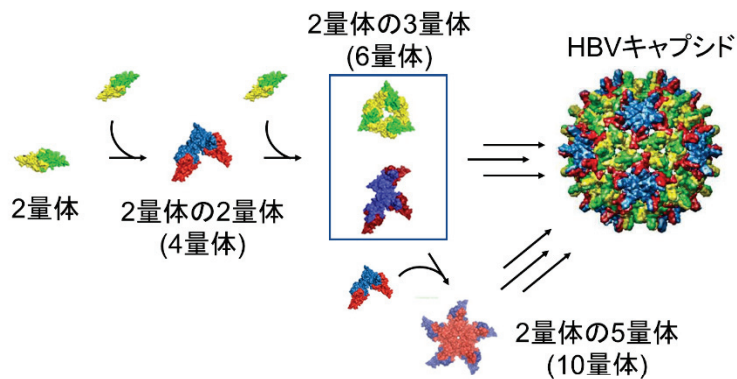


図 1-5. Stonehouse らによる HBV キャプシド中間体の予想

その後、Mateu らによって「不完全キャプシドの存在」、つまりキャプシド化されつつある中間状態が実験的に示されている¹¹⁾。彼らは SEC を用いて脱集合化したマウス微小ウイルス(MVM)キャプシドを分離した後、分解されたキャプシドの形状を透過型電子顕微鏡(TEM)、及び原子間力顕微鏡(AFM)を組み合わせて評価した。前述した Stonehouse らの論文では自己集合過程の初期中間体しか観察されなかったが、3 量体のタンパク質サブユニットが順次組み込まれていき、3 量体 1 個のみを欠いた不完全な形状のキャプシドまで確認することに成功した。同時に、キャプシド形成に関与していないと考えられる 10-20 nm 長のフィラメント構造の存在も示した。

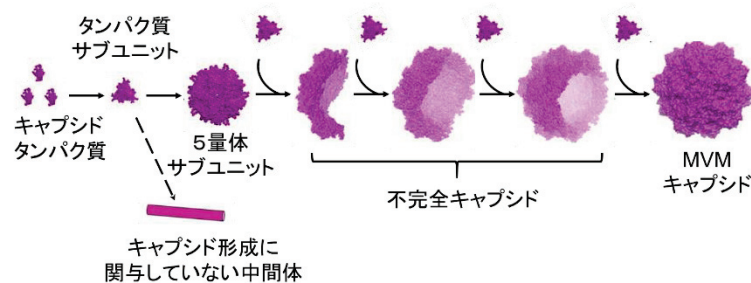


図 1-6. MVM キャプシドの自己集合過程

最近 Jarrold らは、電荷検出質量分析(Charge Detection Mass Spectrometry: CDMS)を用いたウイルス自己集合時のリアルタイム解析を行い、キャプシド形成過程における質量変化を解析した¹²⁾。タンパク質のような高分子は一部の MS で多価イオンとして検出されるため、2 量体などのオリゴマーの場合、同定が難しい。CDMS は誘導電荷やイオントラップ内の単一イオンの振動等を超伝導検出器で測定することで質量電荷比 m/z と分子質量 m を同時に決定できるため、タンパク質オリゴマーを区別して検出することが可能である。その結果、自己集合の初期段階においてキャプシド粒子が正十二面体形成に必要な 120 個以上に過剰に集合し、その後完全なキャプシドになる事が示された。

このことから、最後のブロックが形成途中の二十面体に挿入されるわけではなく、不完全な自己集合構造体が経時的に補正され、キャプシド形成が完了する事が示唆された。

このように、様々な分析技術の進歩により天然の球状ウイルスキャプシドの集合過程の解析が進んでいる。今後解明が進み、ウイルスキャプシド形成の制御が可能となれば、ドラッグキャリアの効率的な製造や、ウイルスの集合を阻害する抗ウイルス薬の開発など、医薬やナノ材料への応用が飛躍的に発展すると期待されている。

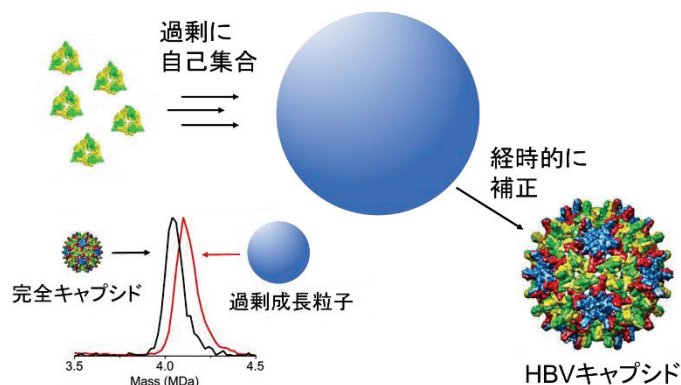


図 1-7. HBV キャプシド形成における最終段階の予想

1-2 天然のウイルスキャプシドを用いたナノ材料

ナノ材料の新規創製において、分子レベルでの精密な制御が重要視されている。前述の通り、一義的なサイズで正確に自己集合する天然のウイルスキャプシドは、棒状や球状といった様々な孤立空間を、危険な化学薬品を使用することなく、温和な条件下で形成できることから、3次元的な足場材料として用いる研究が盛んに行われている^{2, 13)}。

例えば Belcher らは、M13 ファージウイルスを用いたナノワイヤ状の電極材料を報告した¹⁴⁾。M13 ファージウイルスは、主要なキャプシドタンパク質である p8 が 2700 個集まって 1 本鎖 DNA を取り囲んだ棒状の形状をしている。p8 に遺伝子改変によってグルタミン酸を 2 つ導入し、塩

基性条件下でのキャプシド表面のアニオン性を増強させた。その結果、水中で KMnO_4 を加えたところ、キャプシド表面で酸化マンガンナノワイヤが星状に集積した事を確認している。また、このナノワイヤは表面にスパイク上

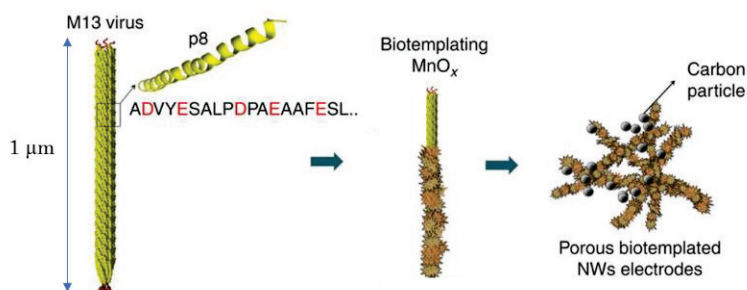


図 1-8. M13 ファージウイルスを足場材料としたリチウム空気電池の創製

の突起を有するため表面積が大幅に増加しており、従来のリチウムイオン電池と比べて重量エネルギー密度（重さ 1kg 当たりの電池容量）が 2-3 倍高い電池の創製が実現できる可能性を示唆した。

一方、Steinmetz らは球状ウイルスであるササゲモザイクウイルス(CPMV)のキャプシド表面が塩基性アミノ酸であるリジン残基に富んでいる事に着目し、N-ヒドロキシスクシンイミドとの架橋反応によってキャプシド表面にシアニン色素を修飾した（図 1-9）。また、棒状ウイルスである TMV のキャプシド表面に位置する一部の中性アミノ酸残基を塩基性アミノ酸へと遺伝子改変し、改変後のキャプシドの内側と外側に位置するアミノ酸に蛍光プローブを修飾しており、キャプシドの形状によって細胞取り込みに違いがあるか比較している。この結果、剛直で棒状の TMV よりも球状ウイルスの CPMV のほうが細胞に取り込まれやすい事を示した¹⁵⁾。

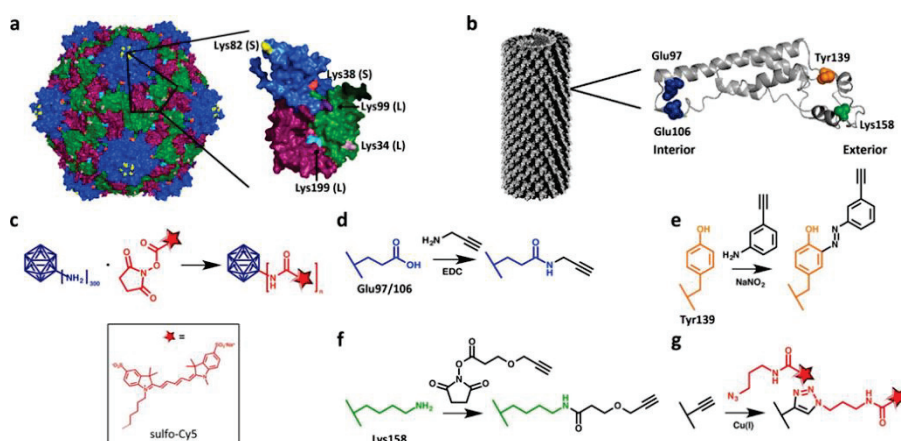


図 1-9. 天然ウイルスキャプシド表面への蛍光プローブの修飾

このように、天然のウイルスキャプシドを足場材料として機能性分子を導入する試みが行われている中、DNA も機能性分子材料として注目されている。自然界に存在あるいは合成で得られた一本鎖 DNA は、その立体構造によってタンパク質などの標的分子に特異的に結合できる核酸断片（アプタマー）として機能することが知られている。

Francis らはバクテリオファージ MS2 に T 細胞レセプターを標的とする細胞特異性アプタマーDNA を標識させた¹⁶⁾。キャプシドの外側に位置するトレオニン(T)を非天然アミノ酸である p-アミノ

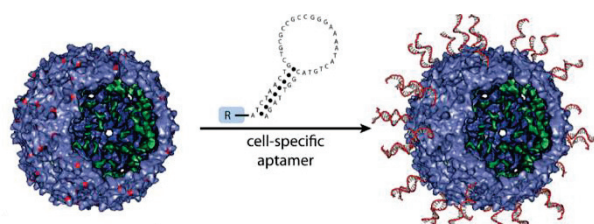


図 1-10. MS2 キャプシド上への DNA アプタマーの修飾

フェニルアラニンに変異し、フェニレンジアミン基で修飾した DNA アプタマーと酸化カップリングさせることで、キャプシドの外側にアプタマー-DNA を修飾し、ウイルスキャプシドに細胞標的性を持たせる事ができたと報告している。

1-3 タンパク質からなるナノカプセル

先述したウイルスキャプシド以外にも球状のタンパク質集合体について盛んに研究されている¹⁷⁾。カプセル状タンパク質集合体として、受容体介在エンドサイトーシスおよび細胞内輸送に関与するクラスリンが挙げられる。クラスリンは自己集合により

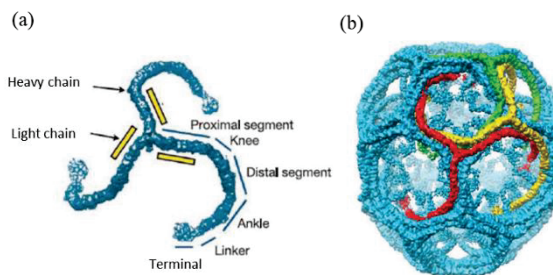


図 1-11. クラスリンの構造 (a) Triskelion の三叉構造 (b) cryo-EM により同定されたクラスリンナノカプセルの立体構造

さらにこの Triskelion は Mg^{2+} イオンの存在下で自己集合し、50-120 nm 程度の多面体構造を形成し、ゲスト分子の直径によってケージサイズが変化することが示されている¹⁸⁾。

超好熱性真正細菌 *Aquifex aeolicus* 由来ルマジシンターゼ(AaLs) は 16 nm の正十二面体対称性の中空キャプシドを形成するため、大腸菌発現を介した変異導入により機能性分子を内包する試みが行われている。例えば、Hilvert らは球状キャプシドに緑色蛍光タンパク質(GFP)を内包させたことを報告している^{19a)}。AaLs キャプシド内部に位置するカチオン性および中性アミノ酸残基をアニオン性アミノ酸残基へと改変し、8 残基アルギニンリンカーを C 末端に融合させた GFP を混合したところ、キャプシド内部へ GFP が取り込まれた(図 1-12 (a))。また、Hilvert らは circular permutation と呼ばれる、新規に C 末端と N 末端を作成して、従来ある C 末端と N 末端を接合させる遺伝子変異方法により、AaLs の新たな末端をキャプシド形成時に内側になるように配向させ、そこ

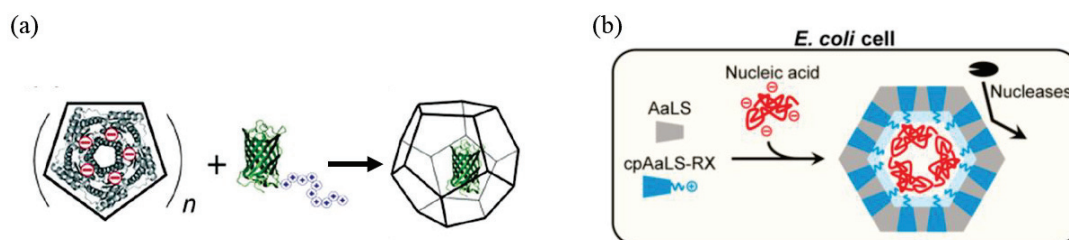


図 1-12. ルマジシンターゼキャプシドへのゲスト分子の内包 (a) 緑色蛍光タンパク質 GFP の内包 (b) RNA の内包

にオリゴアルギニンリンカーを連結した人工ペプチド(cpAaLS-RX)を作製した。これを野生型の AaLs と共集合させることで、静電相互作用によりアニオン性の RNA を内包させたことも報告しており、ナノカプセルによって RNA がヌクレアーゼ分解から保護できた事を示した(図 1-12 (b))^{19b)}。

一方、天然のタンパク質の二次、三次構造を基盤とし、新規のタンパク質集合体を作製する研究も行われている¹⁷⁾。例えば、Yeates らは、土壌細菌由来プロモペルオキシダーゼタンパク質の 3 量体変異株とインフルエンザウイルスのマトリクスタンパク質の 2 量体変異株をそれぞれ作成し、遺伝子融合させたところ、 α -ヘリックスがリンカーとなり、対称性を持ったタンパク質ケージを構築できたと報告した(図 1-13(a))^{20a)}。また、同様の手法で立方体のタンパク質集合体を構築したことを報告している(図 1-13(b))^{20b)}。

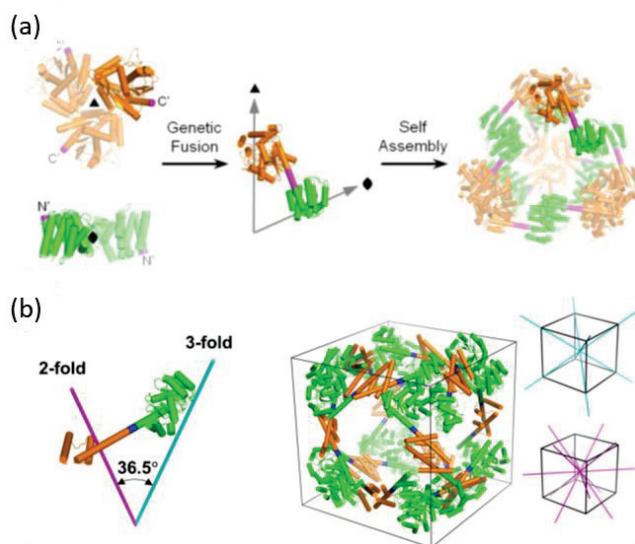


図 1-13. α -ヘリカルリンカーを介した天然タンパク質オリゴマーの遺伝子融合によるタンパク質集合体

(a) ナノゲージ (b) 立方体

また、Marsh らは、*Pseudomonas putida* 由来エステラーゼの 3 量体に、オリゴグリシンリンカーを連結した人工設計コイルドコイル 5 量体を遺伝子融合することにより、正二十面体対称性の中空キャプシドが構築された事を報告している²¹⁾。

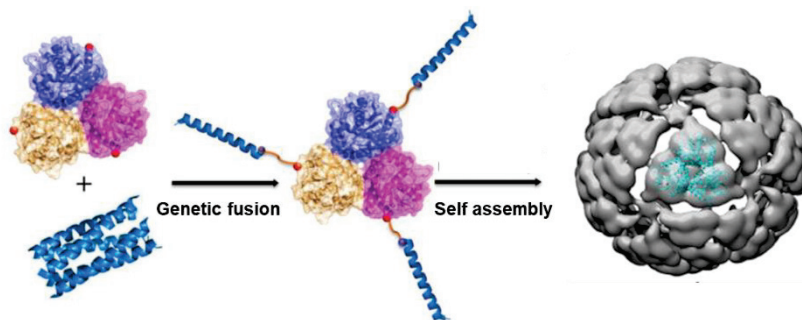


図 1-14. オリゴグリシンリンカーを介した遺伝子融合タンパク質によるキャプシドの構築

この他にも、Baker らは、タンパク質構造データベース(Protein Data Bank : PDB)より選出した 300 個の 3 量体をキャプシドのサブユニットとし、タンパク質分子設計ソフトウェア(RosettaDesign)を利用したアミノ酸配列の最適化によってアミノ酸改変を行った結果、緊密にパッケージングされた 25 nm の正二十面体対称性のナノカプセル(I3-01)を新たに構築できたことを cryo-EM によって確認している²²⁾。

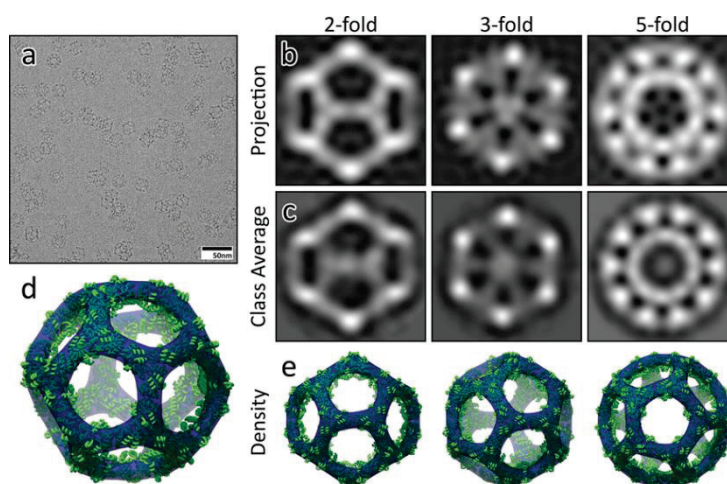


図 1-15. I3-01 ナノカプセル (a)cryo-EM 観察 (b)設計モデルからの逆投影 (c)投影映像の 2 次元平均像 (d)設計モデル (e)(c)の平均像から三次元再構成された I3-01 ナノカプセル

両親媒性物質をタンパク質に導入し、新規のタンパク質ナノカプセルを創製する試みも行われている。牛乳中の主要な乳清タンパク質である β -ラクトグロブリン(β -LG)は 162 残基のアミノ酸で構成されており、生理的 pH において 2 量体を形成している。Nallani らは、ポリエチレングリコール(PEG)の疎水性相互作用による自己集合化に着目し、 β -ラクトグロブリン A (β -LG A)とポリエチレングリコール(PEG)で構成される複合体を合成し、正負にそれぞれ荷電した β -LGA-PEG(-) と β -LGA-PEG(+)を等モルで混合したところ、80-100 nm の中空カプセル状に自己集合し、GFP などのゲスト分子を内包できる事を報告した²³⁾。

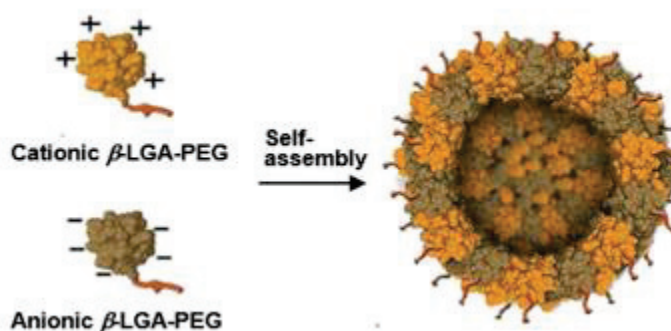


図 1-16. カチオン性およびアニオン性 β -ラクトグロブリン A-PEG 複合体による自己集合タンパク質ナノカプセル

また、Heddle らはこれまで金属イオンとチオール基が相互作用することで、タンパク質が一義的な高次集合体を形成することを見出している。そこで、RNA 結合タンパク質 (TRAP) の 11 量体のタンパク質リングの外縁に位置するアミノ酸をシステインへ改変し、金(i)-トリフェニルホスフィン化合物を付加したところ、自己集合し、均一なナノカプセルを形成した事を報告した²⁴⁾。

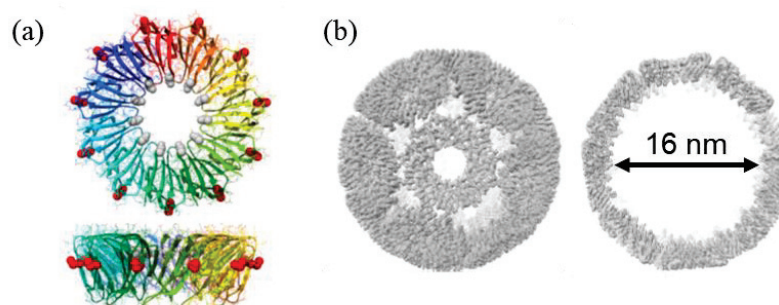


図 1-17. 金を付加したタンパク質リングによるナノカプセル
(a) TRAP のタンパク質リング構造 (b) TRAP ケージの cryo-EM 像

1-4 人工設計ペプチドを用いたナノ構造

先述の通り、タンパク質集合体は、巧みに自己集合し、生体内で多様かつ高度な機能を発揮していることから、ナノスケールの構造体として非常に魅力的な反応場である。このような天然のタンパク質集合体を参考にして、自己集合性のペプチドを自在に設計し、ボトムアップ式アプローチによってナノ構造体を創製する試みが行われている^{17, 25)}。ペプチドは先述した通り、 α -ヘリックスや β -シートといった二次構造に基づいて分子を設計することができるため、これまでファイバー、リング、チューブ、球状といった様々なナノ構造が創製されている。

例えば Mihara らは両末端に Pro を配置したペプチド (FI ペプチド:

H-PKFKIIEFEP-OH) を設計し、さらにこのペプチドがファイバー状の構造体へと自己集合することを報告している^{26a)}。親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸が交互に配置された繰り返し配列によって形成さ

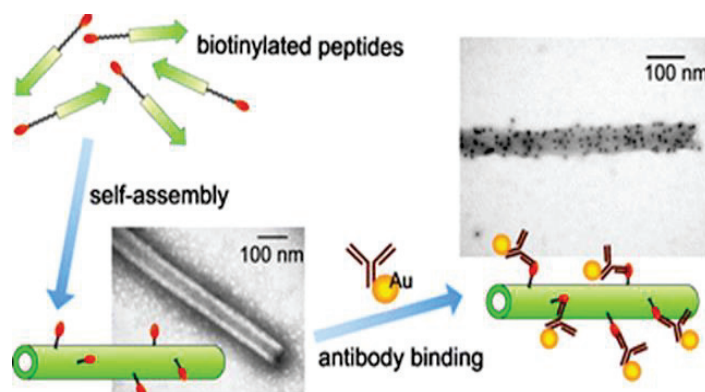


図 1-18. 自己集合性ペプチド FI を足場材料とした金ナノ粒子の集積²⁶⁾

れる β -シート構造が、中央の親水面と疎水面で反転し、リボン状に集合した結果、幅 80-130 nm のファイバー状構造を形成することを示した。さらに FI ペプチドの N 末端側にリンカーを介してビオチン基を導入したところ、50-70 nm 程度の中空のナノチューブへと変化した。また、金ナノ粒子を修飾した抗ビオチン抗体とペプチドを混合すると、ナノチューブ表面に金ナノ粒子が提示された事を TEM 観察によって確認した^{26b)}。

天然のウイルスキャプシドを模倣した人工設計によるペプチド集合体も注目を集めている。例えば、Matsuura らは、球状ウイルスキャプシドが三回対称性ユニットによる自己集合プロセスを経て球状構造体を構築することに着想を得て、逆平行 β -シート形成能を有するペプチド

FKFEFKFE を有した Trigonal(FKFE)₂ を設計・合成した結果、酸性水溶液中で自己集合して直径約 20 nm 程度の球状構造体を形成させることに成功した²⁷⁾。また、Matsuura らは、細胞内における抗酸化物質の一種であるトリペプチドのグルタチオンを三回対称性に配置した Trigonal-Glutathione

(TG) を合成し、水中で 100-250 nm の球状構造体を形成することを見出している²⁸⁾。TG は濃度依存的に中空の球状構造体から球状が潰れたような中実構造に変化することが SEM 観察により確認されており、明確な構造変化がナノ材料の新規創製における一助となる可能性を秘めている。

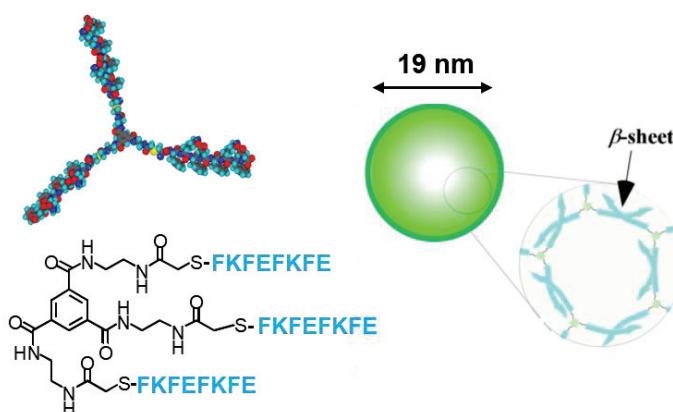


図 1-19. 三回対称性人工ペプチド Trigonal(FKFE)₂ の模式図²⁷⁾

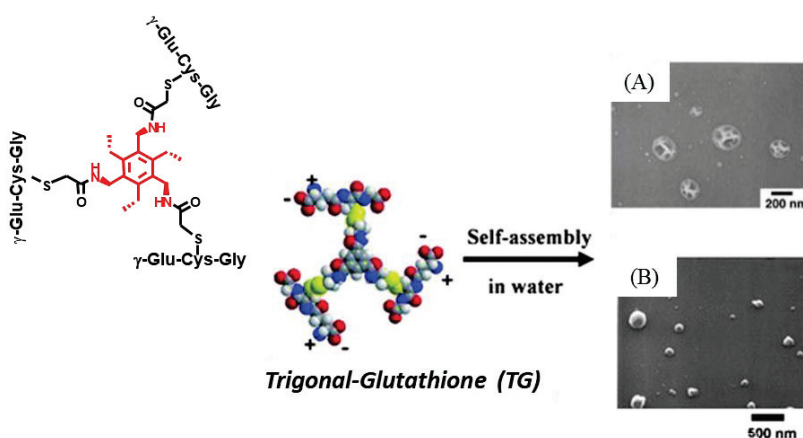


図 1-20. Trigonal-Glutathione の模式図及び SEM 像

(A) [TG] = 1 mM, (B) [TG] = 10 mM²⁸⁾

その他に、Ryadnov らは抗菌ペプチドのラクトフェリシンの構造モチーフを三回対称に配置した自己集合性ペプチドを開発している²⁹⁾。ラクトフェリシンは母乳や汗、唾液といった外分泌液中に含まれる鉄結合性の糖タンパク質であるラクトフェリンがペプシン消化を受けることで生成される 25 残基のペプチドである。このうち RRWQWR モチーフはトリプトファンジッパーと呼ばれる特異的な β -ヘアピン構造をとることが知られている。筆者らはラクトフェリ

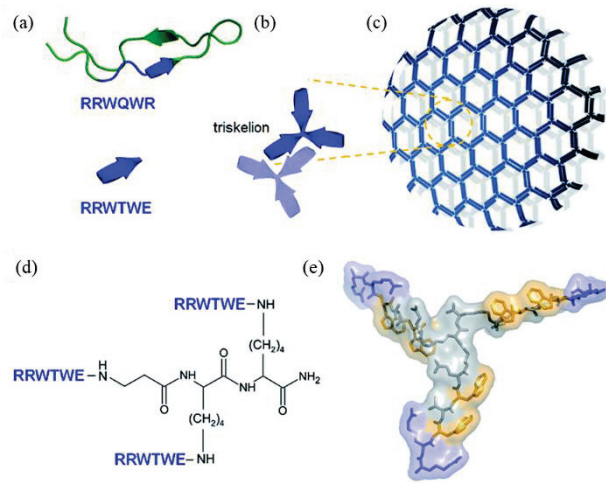


図 1-21. ラクトフェリシンモチーフの自己集合性人工ペプチド²⁹⁾

シンモチーフの Gln 残基を Thr 残基に、C 末端 Arg 残基を Glu 残基に改変した人工ペプチド(RRWTWE)を合成し、それらを三方向に配置したコンジュゲートが β -シートを介してハチの巣状に自己集合し、20-200 nm の中空の球状構造体を形成することを報告している。

1-5 人工ウイルスキャプシド

1-1 で取り上げた、天然の球状ウイルスであるトマトブッシュスタントウイルス (TBSV) は、高い対称性を持つサブユニットが組み合されて 33 nm のキャプシドを構成している。また、サブユニットを構成する全 388 残基のうち、69 番目の Ile 残基から 92 番目の Ser 残基から成る β -annulus 構造が正十二面体の内部骨格形成に深く関与していることが示されている (図 1-3)⁵⁾。これまで Matsuura らは、24 残基の β -Annulus ペプチ

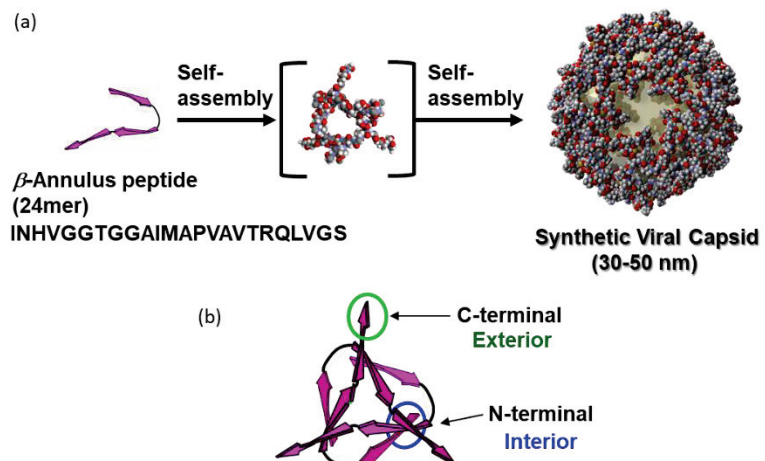


図 1-22. (a) β -Annulus ペプチドの自己集合による人工ウイルスキャプシド形成の模式図 (b) β -Annulus ペプチド末端の配向性

ド(INHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVGS)を合成し、水中で 30-50 nm の人工ウイルスキャプシドを形成することを見出した (図 1-22(a))。また、小角 X 線散乱(SAXS)測定により、内部が中空であることも示している^{17,30)}。さらに、 ζ -電位の pH 依存性から ζ -電位と C 末端側の電荷との相関性を見出しており、ペプチドの C 末端側が外側に、N 末端側が内側に配向していることを見出している (図 1-22(b))³¹⁾。

そこで、 β -Annulus ペプチドの表面に配向する C 末端側に化学修飾することで機能性分子を表面提示する試みが行われており、これまで金ナノ粒子 (図 1-23(a))³²⁾、Coiled-coil Spike (図 1-23(b))³³⁾、ヒト血清アルブミン(HSA) (図 1-23(c))³⁴⁾による表面提示を報告している。HSA は体内輸送や貯蔵など生体の恒常性を維持する機能を持つ、アミノ酸 585 残基で構成された単純なタンパク質であり、N 末端側から 34 番目の Cys 残基(Cys34)のみがチオール (SH) 基を有しているという特徴を持っている。そこで、 β -Annulus ペプチドの C 末端に Cys 残基を導入した β -Annulus Cys ペプチド (INHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVCS)を合成し、ビスマレイミドリンカーを用いて HSA の Cys34 と架橋した。その結果、Tris-HCl バッファー中で 50-70 nm 程度の球状構造体へと自己集合したことを示し、キャプシドの外表面に HSA が提示されたことを ζ -電位によって明らかにした。

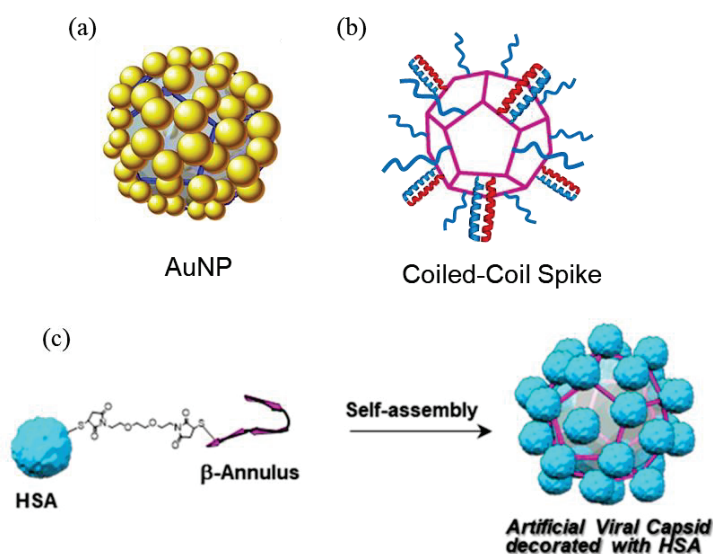


図 1-23. 機能性分子で表面を着せ替えた人工ウイルスキャプシド (a)金ナノ粒子 (b) Coiled-Coil Spike (c) HSA

また、人工ウイルスキャプシドは、静電相互作用によるアニオン性色素の取り込みが示されたことから、キャプシド内部がカチオン性であることが分かっている^{17,31)}。そこで、アニオン性分子である M13 ファージ DNA (図 1-24(a))³¹⁾、蛍光性ナノ粒子 CdTe (図 1-24(b))³⁵⁾や、N 末端修飾による蛍光性無機ナノ粒子 ZnO³⁶⁾および His タグ付き GFP (図

1-24(c))³⁷⁾の内包化を報告している。例えば、DNAの内包化の場合、アニオン性であるM13ファージの一本鎖DNA(7249残基)と β -Annulusペプチドを電荷比1:1で混合させたところ、動的光散乱測定により約82nmの粒径を確認し、TEM観察においても82-108nm程度の球状構造体であることを示した³¹⁾。また、DNAを選択的に染色するシスプラチンを用いたTEM観察を行った場合、この大きさの複合体は観察されず、代わりに23-37nm程度の球状粒子を確認した。一方、DNA分子のみをTEM観察した場合には凝集したような不揃いの形態のみを観察したことから、人工ウイルスキャプシドにM13ファージDNAが内包されたと考えられている(図1-25)。

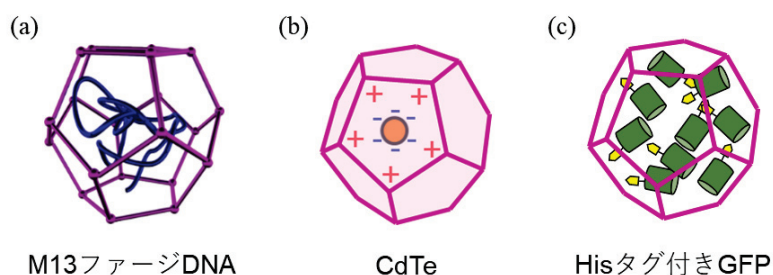


図1-24. ゲスト分子を内包した人工ウイルスキャプシド (a)M13ファージDNA (b) 蛍光性ナノ粒子 CdTe (c) His タグ付き GFP

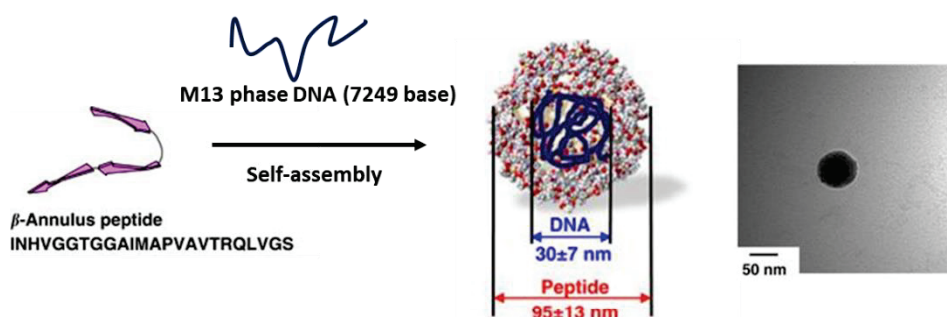


図1-25. 人工ウイルスキャプシドへのDNAの内包の模式図及びTEM像³¹⁾

1-6 本研究の概要

先述の通り、これまでTBSVの内部骨格に関与する24残基の β -Annulusペプチド(INHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVGS)が水中で自己集合することにより、30-50nm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。さらに、ペプチドのC末端側が外部表面に、N末端側が内部に配向していることから、外部表面への機能性分子の付与や、内部へのゲスト分子の内包を報告している。このような分子設計により、人工ウイルスキャプシドをナノカプセルのプラットフォームとして応用できる可能性を広げて

きた。本研究では、人工ウイルスキャプシドのナノ材料としてのさらなる多機能性を目指して、DNA による表面修飾、短鎖 DNA のキャプシドへの内包および mRNA の内包を検討した (図 1-26)。

第 2 章では、DNA の相補的塩基対形成を利用した分子集積や機能化を指向し、ホモポリマーである 20 残基のオリゴデオキシアデノシン(dA₂₀)および 20 残基オリゴチミジン(dT₂₀)をそれぞれ外側に修飾した人工ウイルスキャプシドの創製について述べる。DNA はシンプルなコード情報のみで構成され、相補的塩基対形成することから、ナノ構造物の創製に有用なツールであると認識されている。そこで、相補的な DNA を表面に修飾した人工ウイルスキャプシドの構築、及びハイブリダイゼーションによる集積化を検討した。

第 3 章では、ランダムな 20 塩基配列の DNA を人工ウイルスキャプシド内に内包した人工ウイルスキャプシドの創製について述べる。先述の通り、人工ウイルスキャプシドへの M13 phage のような長鎖 DNA の内包化に成功しているが、短鎖 DNA の内包化には成功していない。そこで人工ウイルスキャプシドの内側に配向する N 末端に Cys を導入し、ピリジルジスルフィド基をもつ架橋剤を介して短鎖 DNA をペプチドと強固に結合させ、人工ウイルスキャプシドへの短鎖 DNA の内包を検討した。また、還元剤を用いて、ジスルフィド結合の切断による内包した短鎖 DNA の放出を検討した。

第 4 章では、mRNA を内包した人工ウイルスキャプシドの創製について述べる。真核生物の mRNA は、3'末端に数百塩基に及ぶポリ A 配列を有しており、一部をハイブリダイゼーションの相補鎖として活用できれば、mRNA を内包した人工ウイルスキャプシドの構築が可能ではないかと考えた。そこで、第 3 章で述べた人工ウイルスキャプシドへの短鎖 DNA の内包化の方法を基盤として、人工ウイルスキャプシド内部に配向する N 末端に dT₂₀ を連結した。さらに mRNA をハイブリダイゼーションさせることで人工ウイルスキャプシド内部への mRNA の内包化を検討した。

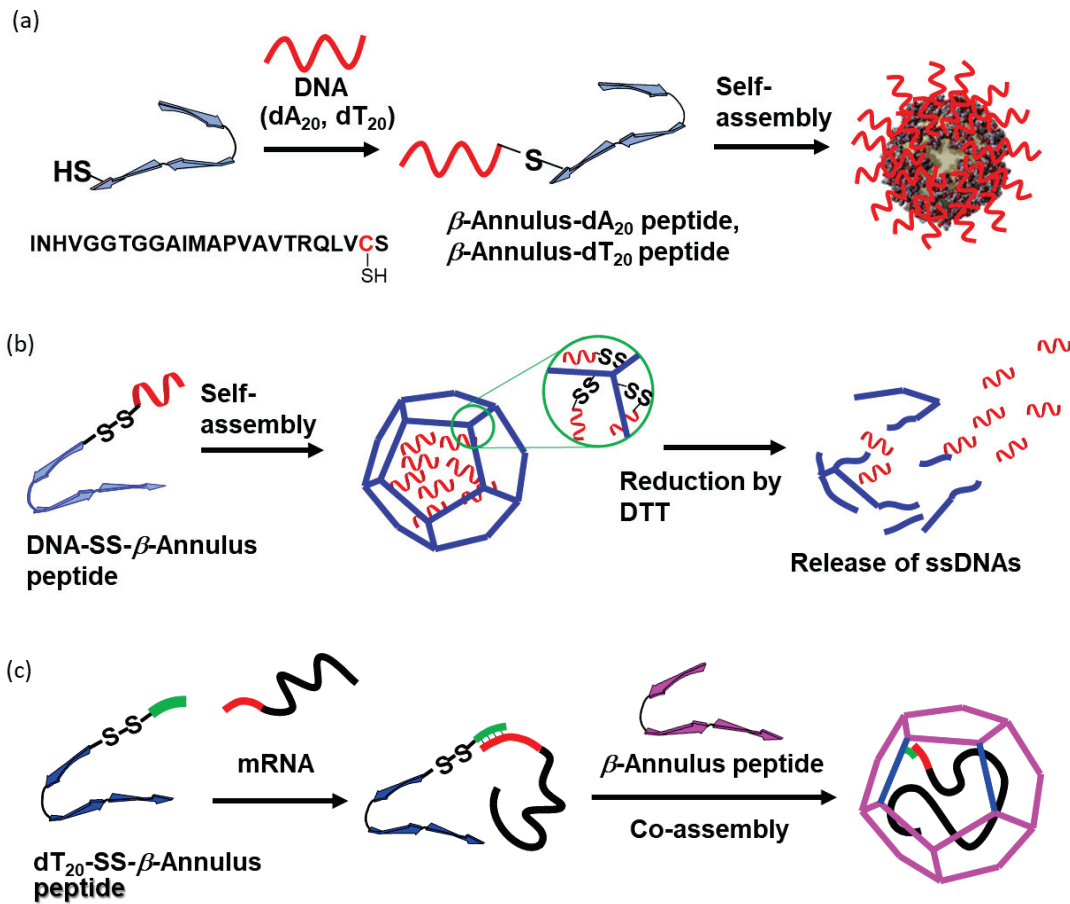


図 1-26. (a) DNA を修飾した人工ウイルスキャプシドの創製 (b) 人工ウイルスキャプシドへの短鎖 DNA の内包と還元による放出 (c)人工ウイルスキャプシドへの mRNA の内包

本論文で使用した機器は以下の通りである。

- ・ 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)

システムコントローラー: SHIMADZU CBM-20A

UV-VIS 検出器: SHIMADZU SPD-20A

送液ユニット: SHIMADZU LC-20AD (2 基)

カラムオーブン: SHIMADZU CTO-20A

オンラインデガッサ: SHIMADZU DGU-20A₃

インジェクションバルブ: Rheodyne 7725i

(2)

システムコントローラー: SHIMADZU SCL-10A VP

UV-VIS 検出器: SHIMADZU SPD-M20A

送液ユニット: SHIMADZU LC-20AR, LC-6AD

フラクションコレクタ: SHIMADZU FRC-10A

カラムオーブン: SHIMADZU CTO-20A

オンラインデガッサ: SHIMADZU DGU-20A₃

インジェクションバルブ: Rheodyne 7725i

・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 Daltonics Autoflex III

- ・動的光散乱(DLS)測定: Malvern, Zetasizer Nano ZS
- ・pH 測定機: HORIBA, 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
- ・円二色性分散計(CD): JASCO, J-820
- ・泳動用電源装置 : Atto mypower II300 AE-8130
- ・アガロース電気泳動装置 : Atto AE-6100
- ・ゲル撮影紫外線照射装置 : Atto TP-15MP (励起波長 312 nm)
- ・共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) : OLYMPUS, FLUOVIEW FV10i

参考文献

- 1) J. J. McManus, P. Charbonneau, E. Zaccarelli, N. Asherie, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **22**, 73(2016)
- 2) A. M. Wen, N. F. Steinmetz, *Chem. Soc. Rev.*, **45**, 4074 (2016)
- 3) A. Klung, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **354**, 531 (1999)
- 4) M. McElwee, S. Vijaykrishnan, F. Rixon, D. Bhella, *PLoS, Biol.*, **16**, e2006191 (2018)
- 5) (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)
- 6) (a) A. M. Wen, N. F. Steinmetz, *Chem. Soc. Rev.*, **45**, 4074 (2016); (b) M. F. Hagan, *Adv. Chem. Phys.*, **155**, 1 (2014)
- 7) Y. Nakamura, K. Matsuura, *化学*, **73**, 72 (2018)
- 8) S. Katen, A. Zlotnick, *Methods Enzymol.*, **455**, 395 (2009)

- 9) C. Uetrecht, I. M. Barbu, G. K. Shoemaker, E. van. Duijn, A. J. R. Heck, *Nat. Chem.*, **3**, 126 (2011)
- 10) K. Holmes, D. A. Shepherd, A. E. Ashcroft, M. Whelan, D. J. Rowlands, N. J. Stonehouse, *J. Biol. Chem.*, **290**, 16238 (2015)
- 11) M. Medrano, M. A. Fuertes, A. Valbuena, P. J. P. Carrillo, A. Rodríguez-Huete, M. G. Mateu, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 15385 (2016)
- 12) C. A. Lutomski, N. A. Lyktey, Z. Zhao, E. E. Pierson, A. Zlotnick, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 16932 (2017)
- 13) (a) A. Zeltins, *Mol. Biotechnol.*, **53**, 92 (2013); (b) M. G. Mateu, *Protein Eng. Des. Sel.*, **24**, 53 (2011); (c) S-Y. Lee, J-S. Lim, M. T. Harris, *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 16 (2012)
- 14) D. Oh, J. Qi, Y-C. Lu, Y. Zhang, Y. Shao-Horn, A. M. Belcher, *Nat. Commun.*, **4**, 2756 (2013)
- 15) A. M. Wen, M. Infusino, A. De Luca, D. L. Kernan, A. E. Czapar, G. Strangi, N. F. Steinmetz, *Bioconjugate. Chem.*, **26**, 51 (2015)
- 16) G. J. Tong, S. C. Hsiao, Z. M. Carrico, M. B. Francis, *Am. Chem. Soc.*, **131**, 11174 (2009)
- 17) K. Matsuura, *Chem. Commun.*, **54**, 8944 (2018)
- 18) (a) S. C. Harrison, T. Kirschhausen, *Cell*, **33**, 650 (1983); (b) A. Fotin, Y. Cheng, P. Sliz, N. Grigorieff, S. C. Harrison, T. Kirchhausen, T. Walz, *Nature*, **432**, 573 (2004)
- 19) (a) F. P. Seebeck, K. J. Woycechowsky, W. Zhuang, J. P. Rabe, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 4516; (b) Y. Azuma, T. G. W. Edwardson, N. Terasaka, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 566 (2018)
- 20) (a) Y-T. Lai, K-L. Tsai, M. R. Sawaya, F. J. Asturias, T. O. Yeates, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 7738 (2013); (b) Y-T. Lai, E. Reading, G. L. Hura, K-L, Tsai, A. Laganowsky, F. J. Asturias, J. A. Tainer, C. V. Robinson, T. O. Yeates, *Nat. Chem.*, **6**, 1065 (2014)
- 21) A. S. Cristie-David, J. Chen, D. B. Nowak, A. L. Bondy, K. Sun, S. I. Park, M. M. B. Holl, M. Su, E. N. G. Marsh, *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 9207 (2019)
- 22) Y. Hsia, J. B. Bale, S. Gonen, D. Shi, W. Sheffler, K. K. Fong, U. Nattermann, C. Xu, P-S. Huang, R. Ravichandran, S. Yi, T. N. Davis, T. Gonen, N. P. King, D. Baker, *Nature*, **535**, 136 (2016)
- 23) A. K. Khan, S. Gudlur, H.-P. M. de Hoog, W. Siti, B. Liedberg, M. Nallani, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **56**, 11754 (2017)
- 24) A. D. Malay, N. Miyazaki, A. Biela, S. Chakraborti, K. Majsterkiewicz, I. Stupka, C. S. Kaplan, A. Kowalczyk, B. M. A. C. Piette, G. K. A. Hochberg, D. Wu, T. P. Wrobel, J. L. P. benesch, K. Iwasaki, J. G. Heddle, *Nature*, **569**, 438 (2019)
- 25) K. Matsuura, *RSC. Adv.*, **4**, 2942 (2014)
- 26) (a) S. Matsumura, S. Uemura, H. Mihara, *Chem. Eur. J.*, **10**, 2789 (2004); (b) S. Matsumura, S. Uemura, H. Mihara, *Mol. BioSyst.*, **1**, 146 (2005)

- 27) K. Matsuura, K. Murasato and N. Kimizuka, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10148 (2005)
- 28) K. Matsuura, H. Matsuyama, T. Fukuda, T. Teramoto, K. Watanabe, K. Murasato, N. Kimizuka, *Soft Matter*, **5**, 2463 (2009)
- 29) V. Castelletto, E. D. Santis, H. Alkassam, B. Lamarre, J. E. Noble, S. Ray, A. Bella, J. R. Burns, B. W. Hoogenboom, M. G. Ryadnov, *Chem. Sci.*, **7**, 1707 (2016)
- 30) K. Matsuura, K. Watanabe, T. Matsuzaki, K. Sakurai, N. Kimizuka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 9662 (2010)
- 31) K. Matsuura, K. Watanabe, Y. Matsushita, N. Kimizuka, *Polym. J.*, **45**, 529 (2013)
- 32) K. Matsuura, G. Ueno, S. Fujita, *Polym. J.*, **47**, 146 (2015)
- 33) S. Fujita, K. Matsuura, *Org. Biomol. Chem.*, **15**, 5070 (2017)
- 34) K. Matsuura, T. Honjyo, *Bioconjugate. Chem.*, **30**, 1636 (2019)
- 35) S. Fujita, K. Matsuura, *Chem. Lett.*, **45**, 922 (2016)
- 36) S. Fujita, K. Matsuura, *Nanomaterials.*, **4**, 778, (2014)
- 37) K. Matsuura, T. Nakamura, K. Watanabe, T. Noguchi, K. Minamihata, N. Kamiya, N. Kimizuka, *Org. Biomol. Chem.*, **14**, 7869 (2016)

第2章 DNAを修飾した人工ウイルスキャプシドの創製

2-1 序

20塩基対程度の核酸であるオリゴデオキシリボヌクレオチド(ODN)は、相補的な塩基対との特異的なハイブリダイゼーションにより、ナノ材料を構築するためのビルディングブロックとして用いられている¹⁾。DNAはわずか4種類の塩基からなる単純なコードであるため、1,2,3次元のパターン化されたナノ構造を構築できる。そのため、タンパク質とナノ粒子を正確に配置させるナノ材料としての研究が行われている²⁾。例えば、Francisらは、長鎖テンプレートDNAをステーブルDNAとの相補的塩基対形成によって折り畳むことで作成される2次元ナノ構造体である「DNAオリガミ」の技術を応用し、ODNで修飾されたウイルスキャプシドがDNAオリガミタイル上で1次元的に配列されたことを報告した³⁾。また、FinnらはODNを表面修飾したCPMVキャプシドと、相補鎖ODNで修飾したキャプシドを混合することで、キャプシド組織体の構築を報告している⁴⁾。一方、人工設計ペプチドは生分解性があり、ドラッグデリバリーのキャリアなどの生体材料への応用が期待されている⁵⁾。例えば、Hashizumeらは遺伝子組み換えによりタンパク質ナノ粒子を作製し、血管内皮細胞への接合親和性のあるペプチドで表面修飾したところ、癌細胞への選択的デリバリーができることを示した⁶⁾。しかし、人工設計ペプチドで構成されたナノ粒子を用いて、その表面へ生体機能性分子を修飾する研究は発展途上である。

本章では、 β -AnnulusペプチドのC末端に20塩基のオリゴデオキシアデノシン(dA₂₀)を付加した β -Annulus-dA₂₀ペプチドおよびオリゴチミジン(dT₂₀)を付加した β -Annulus-dT₂₀ペプチドを合成し、DNA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(図2-1)。 β -Annulusペプチドはカプセル形成の際、C末端側がカプセル外側表面に配向することが知られている⁷⁾。したがって、C末端側にdA₂₀が結合するように分子設計することで、表面がDNAで修飾された人工ウイルスキャプシドが構築されることが考えられた。また、合成したペプチドの自己集合化挙動を動的光散乱(DLS)および透過型電子顕微鏡(TEM)によって分析した。さらに、DNA修飾人工ウイルスキャプシドと相補的DNAとのハイブリダイゼーション挙動を蛍光スペクトル測定、およびDLSによって評価した。

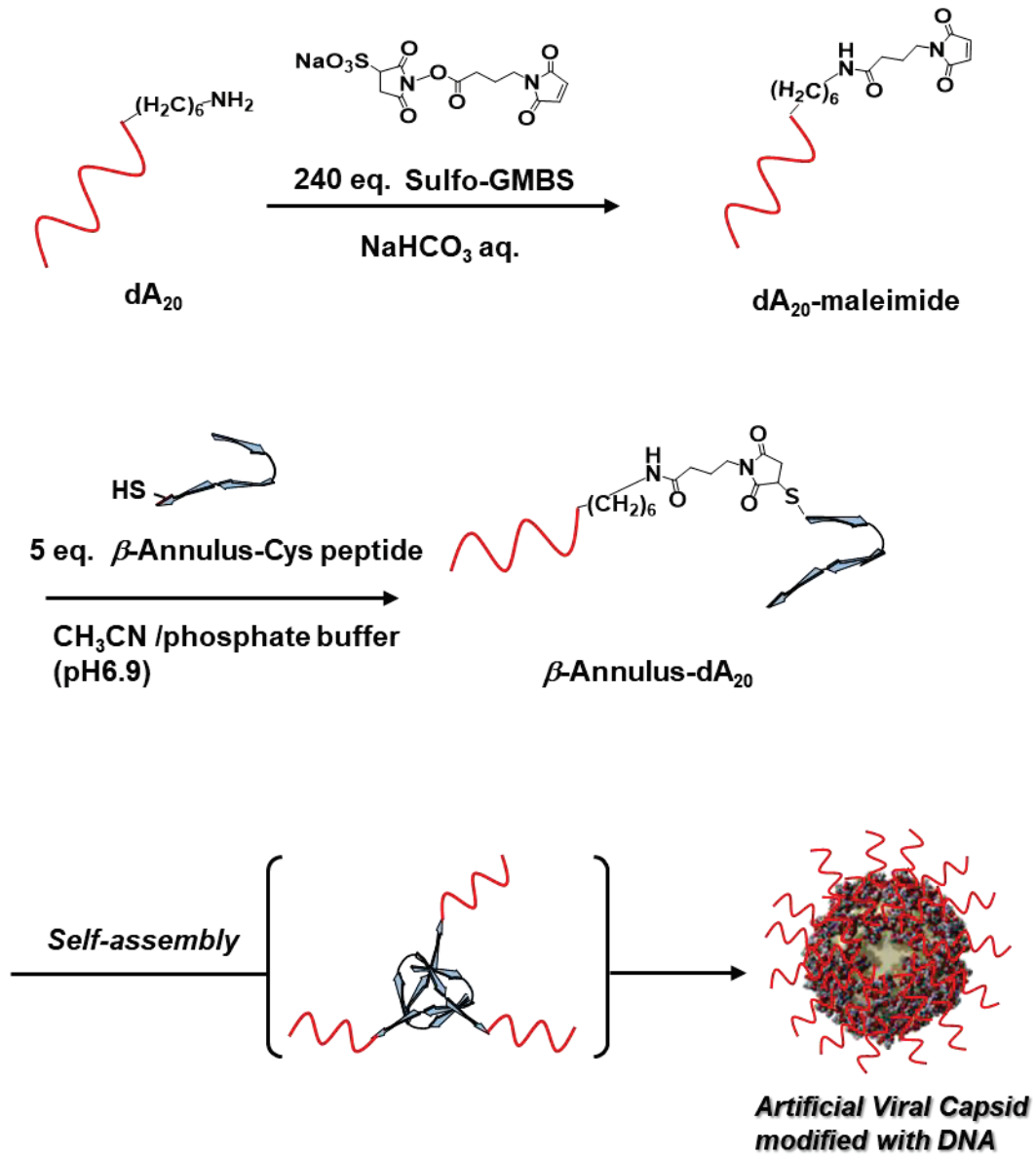


図 2-1. DNA を表面修飾した人工ウイルスキャプシドの創製

2-2 DNA 修飾 β -Annulus peptide の合成

2-2-1 β -Annulus-Cys peptide INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVCS の固相合成

β -Annulus-Cys peptide (INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVCS) を Fmoc 固相合成法を用いて合成した^{8,9)}。

【試薬】

アミノ酸導入済み樹脂

Fmoc-Ser(tBu)-Alko-PEG resin

【アミノ酸導入率約 0.23 mmol/g, 渡辺化学】 521 mg (0.125 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】 177 mg (0.50 mmol) ×2
Fmoc-Asn(Trt)-OH	【Mw 596.69, 渡辺化学】 298 mg (0.50 mmol)
Fmoc-His(Trt)-OH	【Mw 619.73, 渡辺化学】 310 mg (0.50 mmol)
Fmoc-Val-OH	【Mw 339.39, 渡辺化学】 170 mg (0.50 mmol) ×4
Fmoc-Gly-OH	【Mw 297.31, 渡辺化学】 149 mg (0.50 mmol) ×4
Fmoc-Thr(tBu)-OH	【Mw 397.48, 渡辺化学】 199 mg (0.50 mmol) ×2
Fmoc-Ala-OH · H ₂ O	【Mw 329.36, 渡辺化学】 165 mg (0.50 mmol) ×3
Fmoc-Met-OH	【Mw 371.46, 渡辺化学】 186 mg (0.50 mmol)
Fmoc-Pro-OH · AcOEt	【Mw 425.46, 渡辺化学】 213 mg (0.50 mmol)
Fmoc-Arg(Pbf)-OH · AcOEt · 0.2IPE	【Mw 669.29, 渡辺化学】 335 mg (0.50 mmol)
Fmoc-Gln(Trt)-OH	【Mw 610.72, 渡辺化学】 305 mg (0.50 mmol)
Fmoc-Leu-OH	【Mw 353.42, 渡辺化学】 177 mg (0.50 mmol)
Fmoc-Cys(Trt)-OH	【Mw 585.72, 渡辺化学】 293 mg (0.50 mmol)

縮合剤

O-(*1H*-Benzotriazole-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU)

【Mw 379.25, 渡辺化学】

O-(7-aza-*1H*-benzotriazole-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU)

【Mw 380.21, 渡辺化学】

縮合促進及びラセミ化抑制剤

1-Hydroxy-*1H*-benzotriazole hydrate (HOBt · H₂O) 【Mw 153.14, 渡辺化学工業】

(中和剤溶液)

N,N'-Diisopropylethylamine (DIPEA) 【Mw 129.25, 渡辺化学工業】

Fmoc 脱保護試薬

ピペリジン 【Mw 85.15, 渡辺化学工業】

溶媒

N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) 【渡辺化学工業】

第 1 級アミンの確認

・ 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】

第 1 級および 2 級アミンの確認

・ 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】

【実験操作】

(1) 樹脂の膨潤

プラスチック製のカラムに Fmoc-Ser(tBu)-Alko-PEG resin 602 mg (0.126 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 2.5 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。ただし、第 2 級アミンである プロリン (Pro) の Fmoc 基の除去は、(3) に示す TNBS キットによる確認ができないため、30 分攪拌を 2 回行った。

(3) Fmoc 基除去の確認

数個の樹脂を 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 分間放置して樹脂が赤色に呈色したことを確認し、次の操作に進んだ。なお、23 残基目の アスパラギン (Asn) の導入から、TNBS キットの代わりにクロラニルテストキットを用いた。クロラニルテストキットの場合、数個の樹脂を DMF 中に懸濁させ、2 % アセトアルデヒド DMF 溶液を 1 滴加え、続いて、2 % クロラニル DMF 溶液を 1 滴加え、室温で 5 分間放置するという操作を行い、樹脂が青色に呈色することで Fmoc 基除去を確認した。

(4) ペプチド鎖の伸長

樹脂の残ったカラムに、Fmoc-アミノ酸、HBTU、HOBT・2H₂O 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 2 時間攪拌した。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。Pro を導入する際は、攪拌を 3 時間行った。なお、13 残基目のメチオニン (Met) の導入から、HATU を使用した。

(5) アミノ酸導入の確認

数個の樹脂を 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、次の操作に進んだ。クロラニルテストキットの場合、数個の樹脂を DMF 中に懸濁させ、2% アセトアルデヒド DMF 溶液を 1 滴加え、続いて、2% クロラニル DMF 溶液を 1 滴加え、室温で 5 分間放置するという操作を行い、樹脂が青色に呈色していないことを確認した。

(2) から (5) をアミノ酸配列 Ile-Asn(Trt)-His(Trt)-Val-Gly-Gly-Thr(tBu)-Gly-Gly-Ala-Ile-Met-Ala-Pro-Val-Ala-Val-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Gln(Trt)-Leu-Val-Cys(Trt)-Ser とするまで繰り返した。

2-2-2 β -Annulus-Cys peptideの脱保護及び樹脂からの切断

【試薬】

トルフルオロ酢酸 (TFA)	【Mw 114.02, 東京化成】
1,2-エタンジチオール (EDT)	【Mw 94.20, 渡辺化学工業】
トリイソプロピルシラン (TIS)	【Mw 158.36, 渡辺化学工業】
<i>tert</i> -ブチルメチルエーテル イオン交換水 (H ₂ O)	【Mw 88.15, Wako】

【実験操作】

脱保護および樹脂からの切断

100 mL ナスフラスコに冷却した TFA 9.5 mL、イオン交換水 0.25 mL、EDT 0.25 mL、TIS 0.1 mL を混合した。そこに、ペプチド導入樹脂を加え、室温で 3 時間攪拌した。溶液を吸引ろ過し、減圧留去した。これに、氷冷した *tert*-ブチルメチルエーテル 20 mL を加え、遠心分離 (2000 rpm, 10 分) により、ペプチドを沈殿させ上澄みを取り除いた。この操作を 3 回行った。その後、凍結乾燥し、残存した液体をさらにエバポレーター

を用いて完全に留去し、再度凍結乾燥を行った。この操作を 2 回行った結果、固体の白色物質が得られた。

粗収量：546.4 mg 粗収率：184 %

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: α -CHCA, Mode: Linear positive

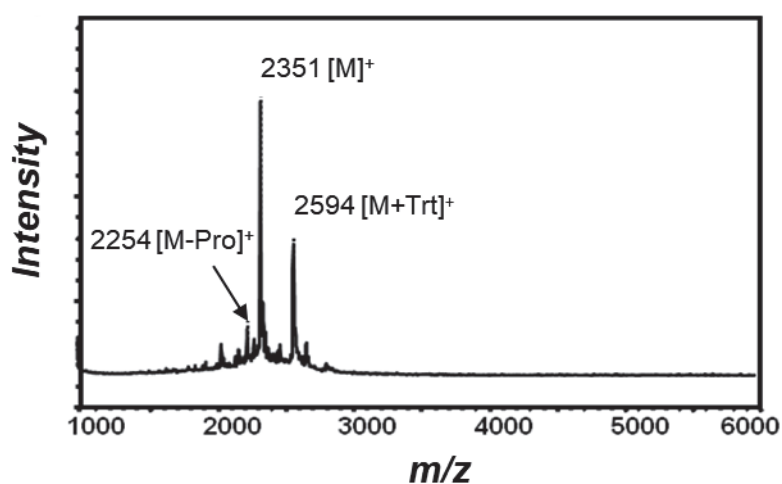


図 2-2. 粗ペプチドの MALDI-TOF-MS (matrix: α -CHCA)

2-2-3 逆相 HPLC による精製

【逆相 HPLC】

分取条件

試料：0.1 % TFA 入り水：0.1 % TFA 入りアセトニトリル：10 % 酢酸水溶液= 3 : 2 : 5
の組成からなる溶液に粗ペプチドを溶かしたもの

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

流量：10 mL / min

試料注入量：0.9 mg / mL \times 2 mL

検出：UV-vis 220 nm

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 75 % (0 min) \rightarrow 45 % (90 min)

アセトニトリル 25 % (0 min) \rightarrow 55 % (90 min)

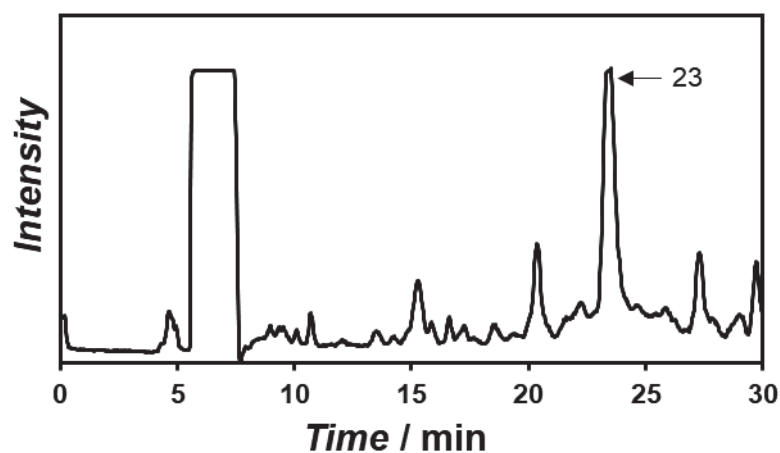


図 2-3. 逆相 HPLC チャート

【MALDI-TOF-MS】

保持時間 23 分の MALDI-TOF-MS 測定結果を以下に示す。

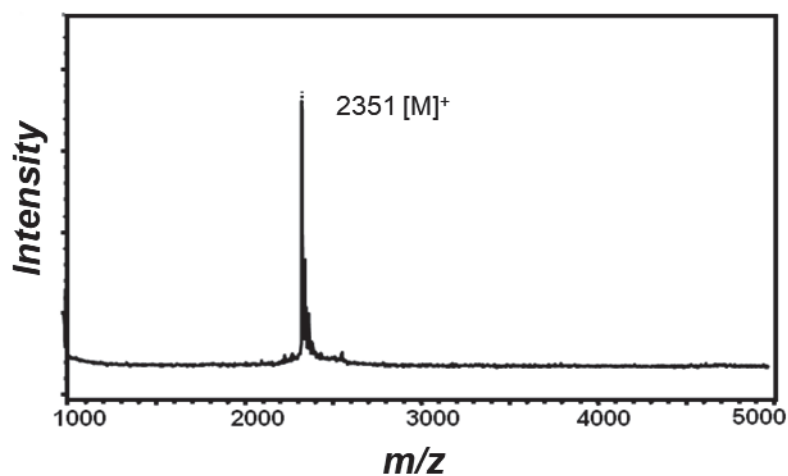


図 2-4. 分取時間 23 分の MALDI-TOF-MS (matrix: α -CHCA)

精製した β -Annulus-Cys ペプチドの収量・収率は次のようになった。

収量 : 5.1 mg

収率 : 13 %

2-2-4 β -Annulus-dA₂₀ peptide の合成

β -Annulus-dA₂₀ peptide の合成の前段階として、5'末端アミノ化 DNA (dA₂₀-(CH₂)₆-NH₂) へ架橋剤 Sulfo-GMBS を縮合し、dA₂₀-maleimide を合成した。

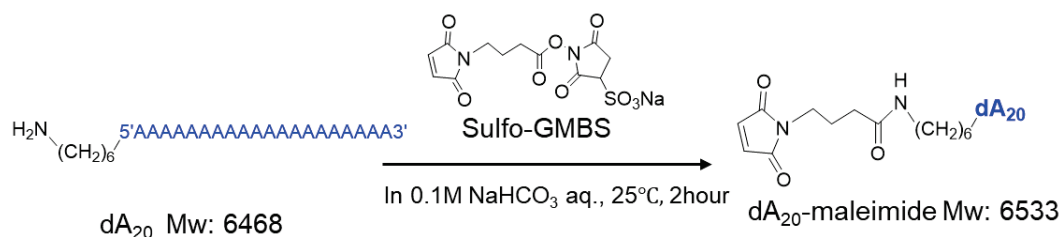


図 2-5. dA₂₀-maleimide 合成スキーム

【試薬】

dA₂₀-(CH₂)₆-NH₂ (NH₂-5'AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA3')

【Mw 6468.47, ジーンデザイン】

N-(4-Maleimidobutyryloxy) sulfosuccinimide (Sulfo-GMBS)

【Mw 382.82, Wako】

Sodium bicarbonate

【Mw 84.01, SIGMA】

【実験操作】

dA₂₀-(CH₂)₆-NH₂ 641.3 μg (100.5 nmol)の入ったエッペンドルフチューブにイオン交換水 100 μL を加え 1.0 mM 水溶液を調製した。そこに Sulfo-GMBS 9.1 mg (24 μmol, 240 当量) を入れ、0.1 M 重炭酸ナトリウム水溶液 500 μL を加えて、恒温槽で 25°C、2 時間インキュベートした。その後、大過剰の Sulfo-GMBS を除くため、透析膜 Spectra/por7 (cutoff Mw 1000: SPECTRUM 社製)を用いて透析を 20 時間行った。この間、透析外液の交換を 2 回行った。透析後回収したサンプルの一部について逆相 HPLC 分析を行い、残りは凍結乾燥を行った。同様に Sulfo-GMBS のみ、dA₂₀-(CH₂)₆-NH₂ のみについても逆相 HPLC 分析を行った。

【逆相 HPLC】

カラム：Inertsil ODS-3 (5 μm, 4.6×250 nm)

移動相：(A) CH₃CN / (B) 0.1 M NH₄HCO₂ aq

移動相組成：B 液 100 % (0 min) → 100 % (5 min)

100 % (5 min) → 50 % (55 min)

50 % (55 min) → 0 % (65 min)

試料注入量：20 μL

検出：UV-vis 260 nm

流量：1 mL / min

試料：(1) Sulfo-GMBS, (2) dA₂₀-(CH₂)₆-NH₂, (3) 透析後内液(dA₂₀-maleimide)

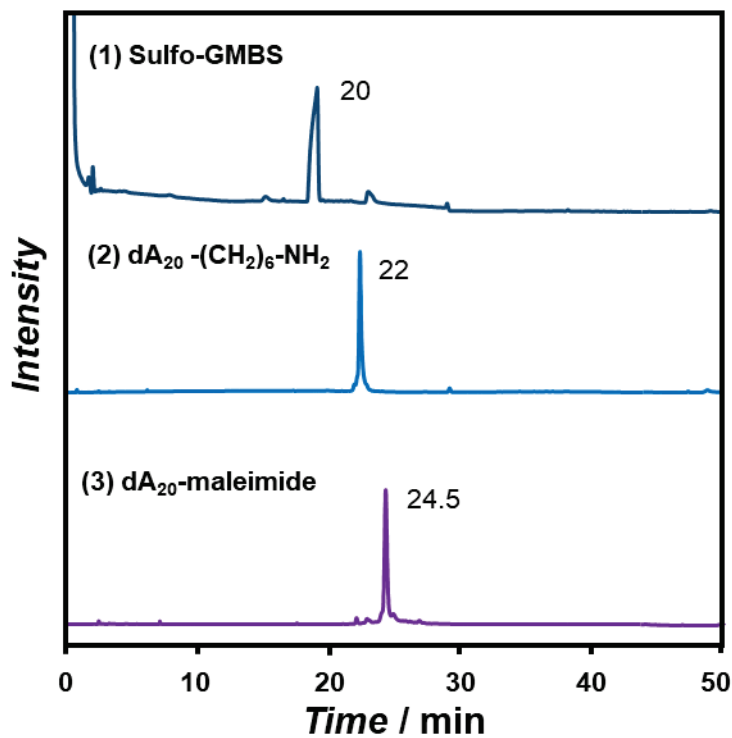


図 2-6. 逆相 HPLC チャート

【MALDI-TOF-MS】

図 2-6 より、(3)の透析後内液を分取したピーク (24.5 分)について MALDI-TOF-MS 測定を行った。この際、試料には HPLC の移動相であるギ酸アンモニウムが含まれているため、分取溶液に 100 μ L のイオン交換水を加え→液体窒素で凍結させ→遠心エバポレーターで遠心濃縮する操作を 4 回繰り返して脱塩操作を行った。

【マトリックス】: 以下の試薬を混合し調製

3-ヒドロキシ-2-ピリジンカルボン酸(3-HPA) 50 mg

イオン交換水 500 μ L

アセトニトリル 500 μ L

クエン酸二アンモニウム 5 mg

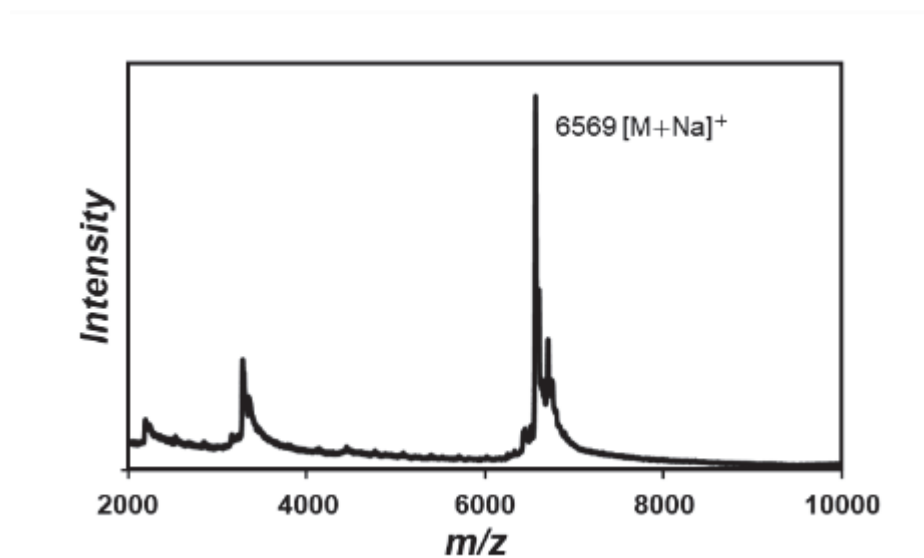


図 2-7. 透析後反応溶液の MALDI-TOF-MS (matrix: 3-HPA)

図 2-6 より、透析後サンプルの HPLC チャートでは、 $dA_{20}-(CH_2)_6-NH_2$ のチャートに見られた 22 分のピークおよび Sulfo-GMBS 由来の 20 分のピークは検出されず、新しく 24.5 分にピークが見られた。また、図 2-7 より、透析後のサンプルの MALDI-TOF-MS 測定を行った結果、 $m/z=6569$ に dA_{20} -maleimide (Mw 6533) に由来すると考えられるメインピークが得られた。よって、 dA_{20} -maleimide が合成されたと考え、 β -Annulus-Cys peptide の付加を行った。

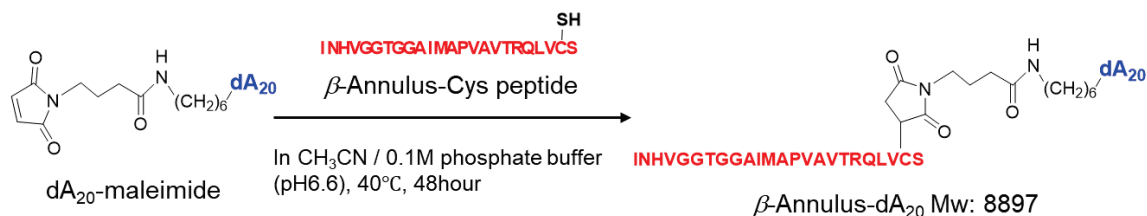


図 2-8. β -Annulus- dA_{20} の合成

透析後、エッペンドルフチューブに回収した dA_{20} -maleimide を凍結乾燥し、0.1 M リン酸バッファ (pH6.6) 200 μ L を加えた(A)。別のエッペンドルフチューブに秤量した β -Annulus-Cys ペプチド 1.1 mg (0.468 μ mol)を入れ、イオン交換水 400 μ L、アセトニトリル 600 μ L を加えてボルテックスで混合した。(A)と(B)を混合し、恒温槽で 40°C、24 時間インキュベートした。その後、逆相 HPLC による合成反応液の分析を行った。同様に β -Annulus-Cys ペプチドのみについても逆相 HPLC 分析を行った。

【逆相 HPLC】

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

移動相 : (A) CH₃CN / (B) 0.1 M NH₄HCO₂ aq

移動相組成 : B 液 100 % (0 min) \rightarrow 100 % (5 min)

100 % (5 min) \rightarrow 50 % (55 min)

50 % (55 min) \rightarrow 0 % (65 min)

試料注入量 : 20 μ L

検出 : UV-vis 260 nm ((3)のみ 220 nm)

流量 : 1 mL / min

試料 : (1) dA₂₀-(CH₂)₆-NH₂, (2) dA₂₀-maleimide, (3) β -Annulus-Cys peptide, (4) 合成反応液 (β -Annulus-dA₂₀)

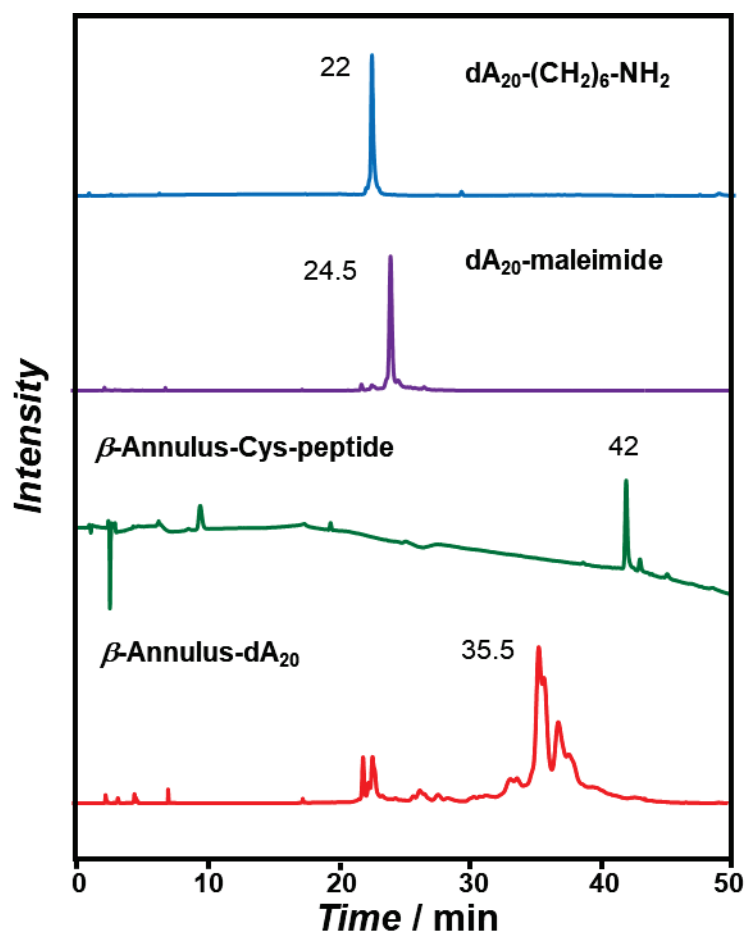


図 2-9. 逆相 HPLC チャート

図 2-9 に逆相 HPLC チャートの重ね合わせを示す。新たに検出された 35.5 分のピークを分取し、遠心エバポレーターで濃縮の後、透析膜 Spectra/por7 (cutoff Mw 1000 :

SPECTRUM 社製)を用いて 20 時間透析した。

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: 3-HPA, Mode: Linear positive

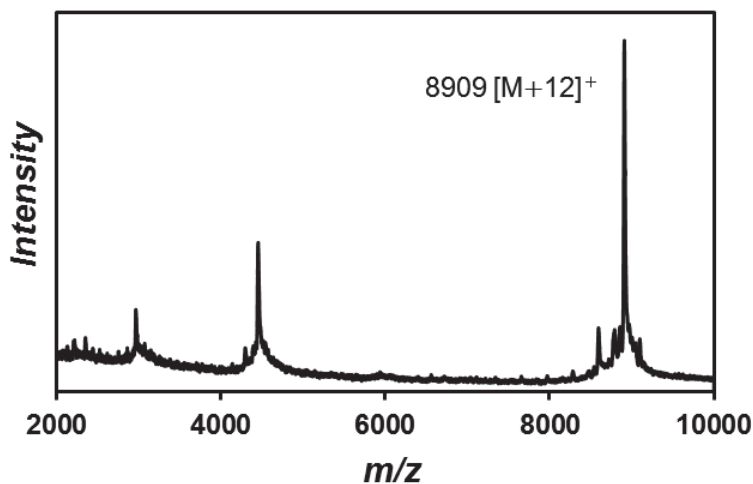


図 2-10. 精製後の β -Annulus-dA₂₀ ペプチドの MALDI-TOF-MS (matrix: 3-HPA)

図 2-10 より、目的物 (Mw: 8897) 由来と考えられるピーク (m/z = 8909)が確認された。

【UV-vis スペクトル】

試料： 20 倍希釈 β -Annulus-dA₂₀ 水溶液 200 μ L

測定範囲：200-350 nm

温度：25°C

バンド幅: 1.5 nm

使用セル：光路長 1 mm 石英セル

レスポンス: Fast

溶媒：イオン交換水

走査速度: 400 nm / min

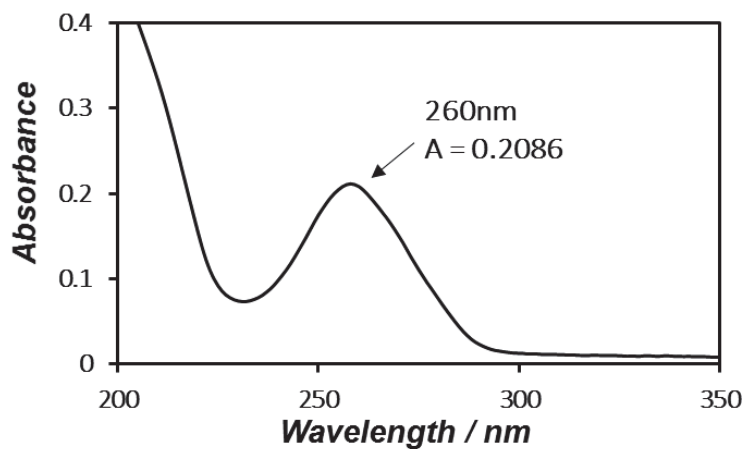


図 2-11. 10 倍希釈 β -Annulus-dA₂₀ ペプチド水溶液の UV-vis スペクトル

精製した β -Annulus-dA₂₀ の濃度決定を UV-vis スペクトル測定によって行った。図 2-11 より 260nm における吸光度 $A=0.2086$ 、セル長=0.1 cm、一本鎖 dA₂₀ のモル吸光係数は $\epsilon = 20 \times 15300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であるので¹⁰⁾、 β -Annulus-dA₂₀ の濃度（原液）は、

$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot l} = \frac{0.2086}{20 \times 15300 \times 0.1} \times 20 = 13.63 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$13.63 \times 10^{-5} \text{ M} \times 200 \times 10^{-6} \text{ L} = 27.26 \times 10^{-9} \text{ mol} = 27.26 \text{ nmol}$$

収率は、

$$\frac{27.26 \text{ nmol}}{100 \text{ nmol}} \times 100 = 27.26 \%$$

以上のように濃度を算出した。また、これまでの合成を合計し、次の収率・収量で β -Annulus-dA₂₀ を得た。

収率：25.2%

収量：35.2 nmol

2-2-5 β -Annulus-dT₂₀ peptide の合成

先述した 2-2-4 β -Annulus-dA₂₀ peptide の合成手法を用い、 β -Annulus-dT₂₀ peptide の合成を行った。

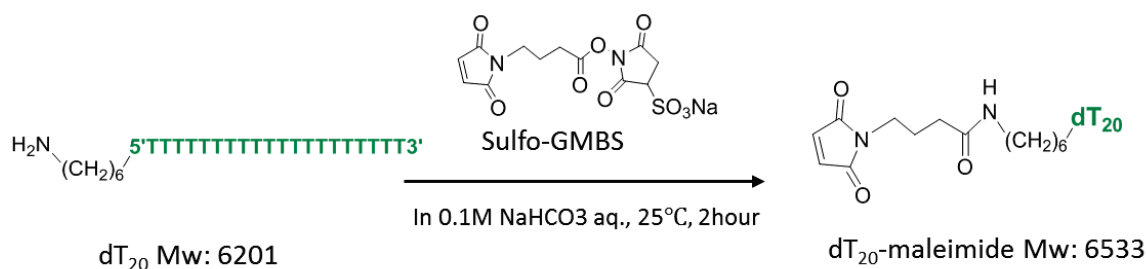


図 2-12. dT₂₀-maleimide 合成スキーム

【試薬】

dT₂₀-(CH₂)₆-NH₂ 【Mw6201.2 ジーンデザイン】

N-(4-Maleimidobutyryloxy) sulfosuccinimide (Sulfo-GMBS)

Sodium bicarbonate

【Mw 382.82 , Wako】

【Mw 84.01 , SIGMA】

【実験操作】

dT₂₀-(CH₂)₆-NH₂ 595.2 μg (96 nmol)の入ったエッペンドルフチューブにイオン交換水を96 μL 加え、1.0 mM 水溶液を調製した。そこに Sulfo-GMBS 9.1 mg(24 μmol, 240 当量)をいれ、0.1 M 重炭酸ナトリウム水溶液 500 μL を加えて、恒温槽で 25°C、2 時間インキュベートした。その後大過剰の Sulfo-GMBS を除くため透析膜 Spectra/por7 (cutoff Mw1000 : SPECTRUM 社製)を用いて 20 時間透析した。この間、透析外液の交換を 1 回行った。透析後、回収したサンプルの一部について逆相 HPLC 分析を行い、残りは凍結乾燥を行った。

【逆相 HPLC】

カラム : Inertsil ODS-3 (5 μm, 4.6×250 nm)

移動相 : (A) CH₃CN / (B) 0.1 M NH₄HCO₂ aq

移動相組成 : B 液 100 % (0 min) → 100 % (5 min)

100 % (5 min) → 50 % (55 min)

50 % (55 min) → 0 % (75 min)

試料注入量 : 20 μL

検出 : UV-vis 260 nm

流量 : 1 mL / min

試料 : (1) dT₂₀-(CH₂)₆-NH₂, (2) 透析後内液(dT₂₀-maleimide)

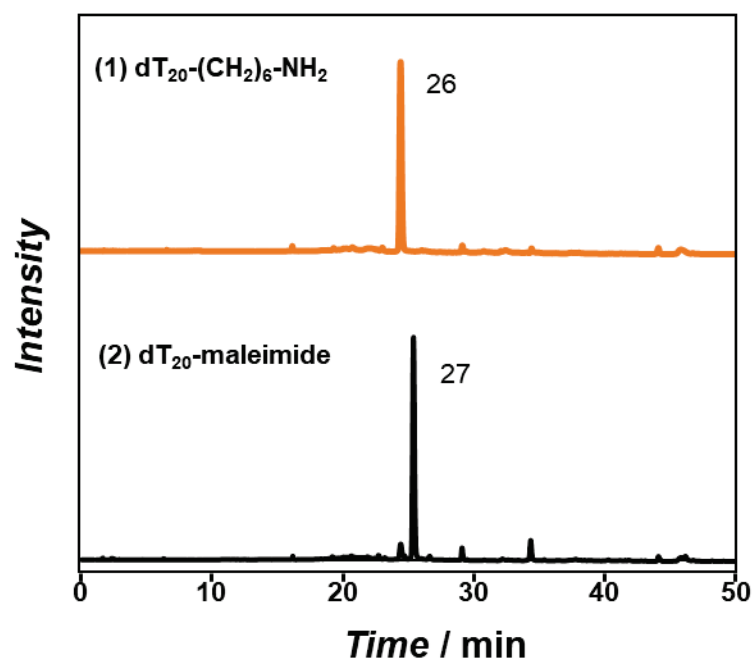


図 2-13. 逆相 HPLC チャート

図 2-13 より、(2)の透析後反応溶液で新たに得られた 27 分のピークを分取した。その後、遠心エバポレーターで濃縮後、MALDI-TOF-MS 測定を行った。

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: 3-HPA, Mode: Linear positive

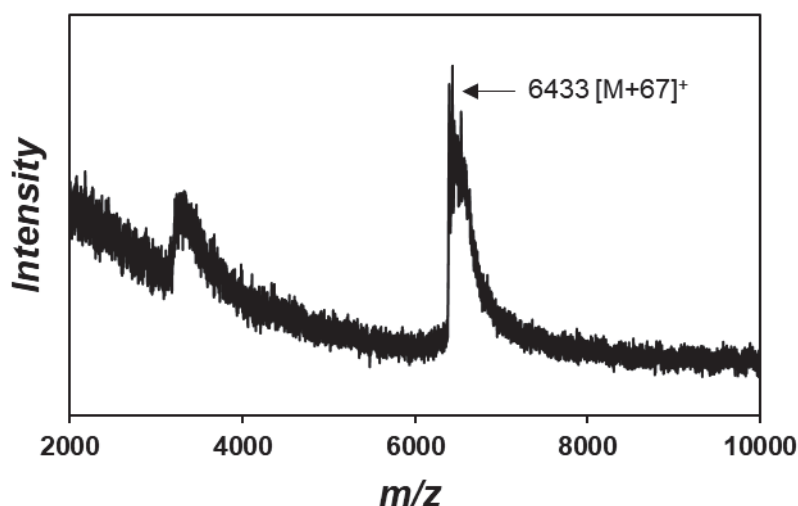


図 2-14. 保持時間 27 分の MALDI-TOF-MS (matrix: 3-HPA)

透析後反応液の MALDI-TOF-MS 測定を行った結果、 $m/z = 6433$ にメインピークが得られた。目的物である dT_{20} -maleimide (Mw: 6366) より +67 ずれておりピークがブロードしているが、 dT_{20} -maleimide に由来するものと考えられる。よって dT_{20} -maleimide が合成されたと考え、 β -Annulus-Cys peptide の付加を行った。

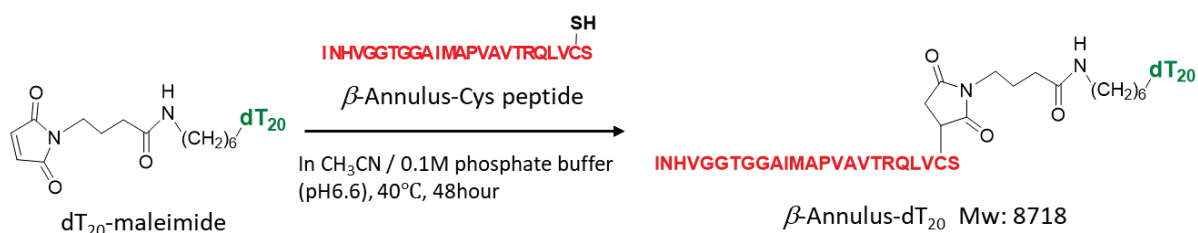


図 2-15. dT_{20} -maleimide 合成スキーム

透析後、 dT_{20} -maleimide を含む反応液を凍結乾燥し、0.1 M リン酸バッファー(pH 6.6) 200 μ L を加えた(A)。別のエッペンドルフチューブに秤量した β -Annulus-Cys peptide 1.1mg (0.468 μ mol)を入れ、イオン交換水 400 μ L、アセトニトリル 600 μ L を加えてボルテック

スで混合した(B)。(A)と(B)を混合し、恒温槽で 40°C、24 時間インキュベートした。その後、逆相 HPLC による合成反応液の分析を行った。

【逆相 HPLC】

カラム：Inertsil ODS-3 (5 μm, 4.6×250 mm)

移動相：(A) CH₃CN / (B) 0.1 M NH₄HCO₂ aq

移動相組成：B 液 100 % (0 min) → 100 % (5 min),

100 % (5 min) → 50 % (55 min)

試料注入量：20 μL

検出：UV-vis 260 nm

流量：1 mL / min

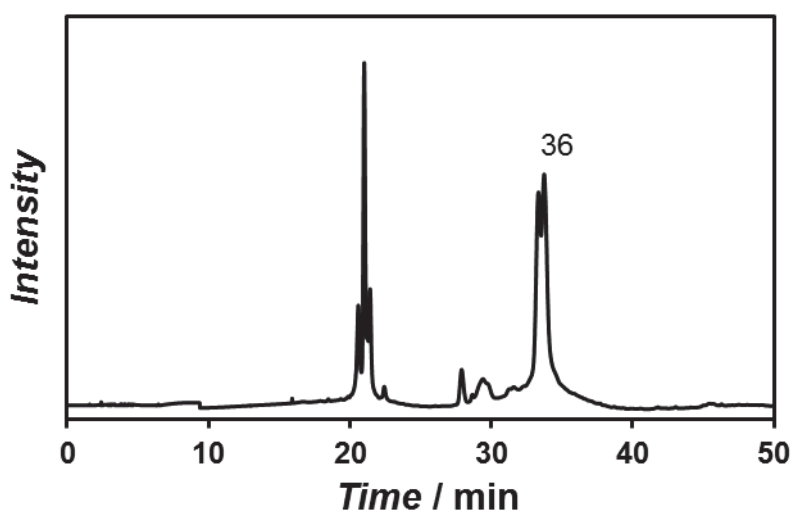


図 2-16. 反応後溶液の逆相 HPLC チャート

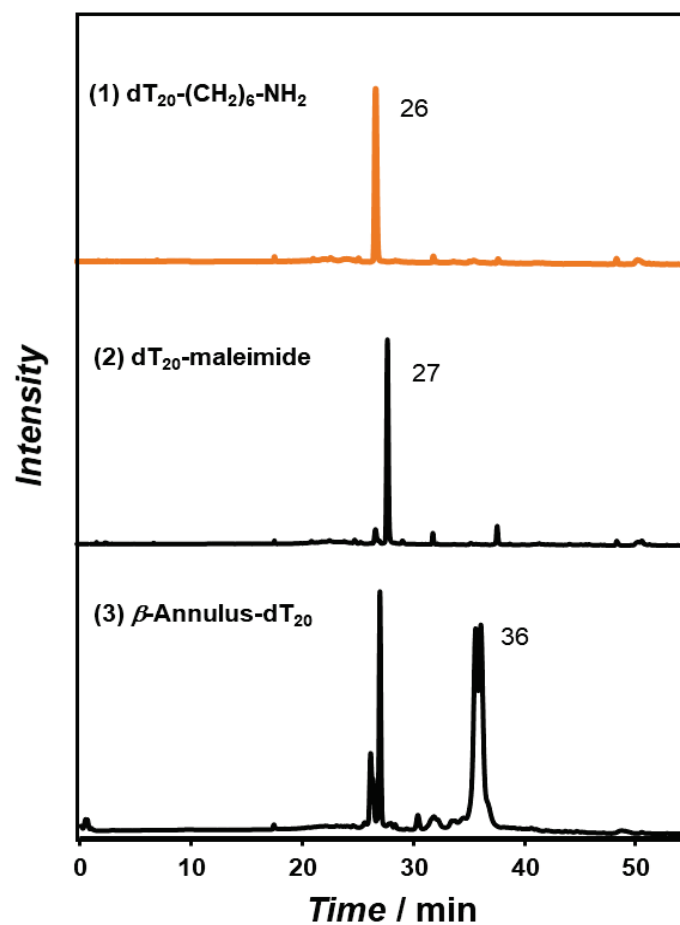


図 2-17. 逆相 HPLC チャート(重ね合わせ)

図 2-17 に逆相 HPLC チャートの重ね合わせを示す。新たに検出された 36 分のピークを分取後、遠心エバポレーターで濃縮し、透析膜 Spectra/por7 (cutoff Mw 1000 : SPECTRUM 社製)を用いて 20 時間透析した。

【MALDI-TOF-MS 測定】

Matrix: SA, Mode: Linear positive

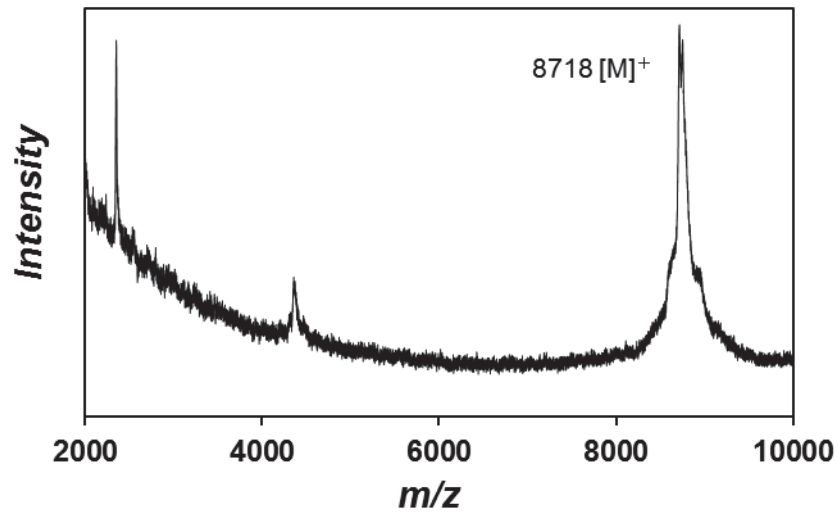


図 2-18. 精製後の dT₂₀-β-Annulus ペプチドの MALDI-TOF-MS (matrix: SA)

図 2-18 より、目的物のピークである m/z = 8718 が確認された。

【UV-vis スペクトル】

試料： 20 倍希釈 β-Annulus-dT₂₀ 水溶液 200 μL

測定範囲： 200-350 nm

温度： 25°C

使用セル： 光路長 1 mm 石英セル

溶媒： イオン交換水

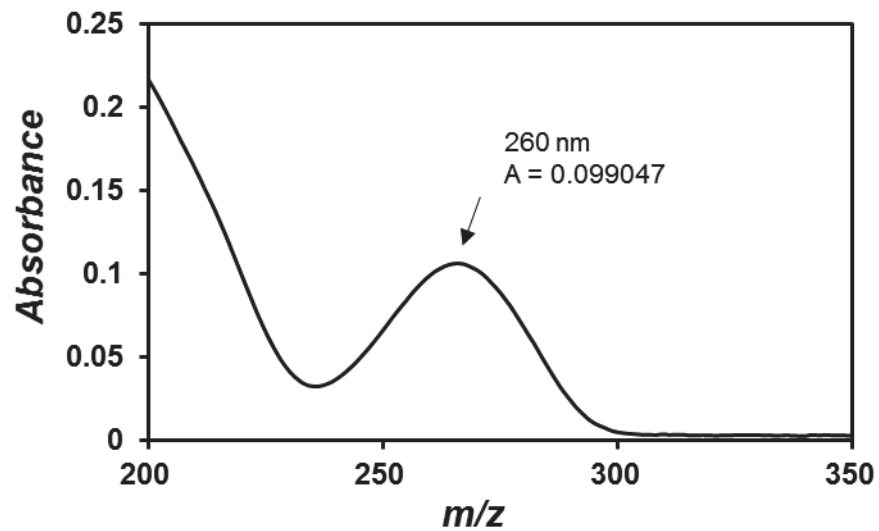


図 2-19. 10 倍希釈 β-Annulus-dT₂₀ ペプチド水溶液の UV-vis スペクトル

260nm における吸光度 $A=0.099047$ 、セル長= 0.1 cm、一本鎖 dT₂₀ のモル吸光係数は $\epsilon = 20 \times 9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であるので¹⁰⁾

β -Annulus-dT₂₀ の濃度 (原液) は、

$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot l} = \frac{0.099047}{20 \times 9300 \times 0.1} \times 20 = 10.65 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$10.65 \times 10^{-5} \text{ M} \times 200 \times 10^{-6} \text{ L} = 21.3 \times 10^{-9} \text{ mol} = 21.3 \text{ nmol}$$

収率は、

$$\frac{21.3 \text{ nmol}}{96 \text{ nmol}} \times 100 = 22.2 \%$$

収率 22.2 %

収量 185.65 μg

2-3 DNA 修飾 β -Annulus peptide の自己集合挙動

10 mM phosphate buffer (pH 7.1) 中において、 β -Annulus-dA₂₀ ペプチド及び β -Annulus-dT₂₀ ペプチドがどのような集合体を形成するのか、DLS 測定および TEM 観察によって評価した。

2-3-1 DLS 測定

10 mM phosphate buffer (pH 7.1) を加えて 25 μM β -Annulus-dA₂₀ ペプチドの 10 mM phosphate buffer 溶液、および 25 μM β -Annulus-dT₂₀ ペプチドの 10 mM phosphate buffer 溶液を調製し、超音波を 5 分間照射した。

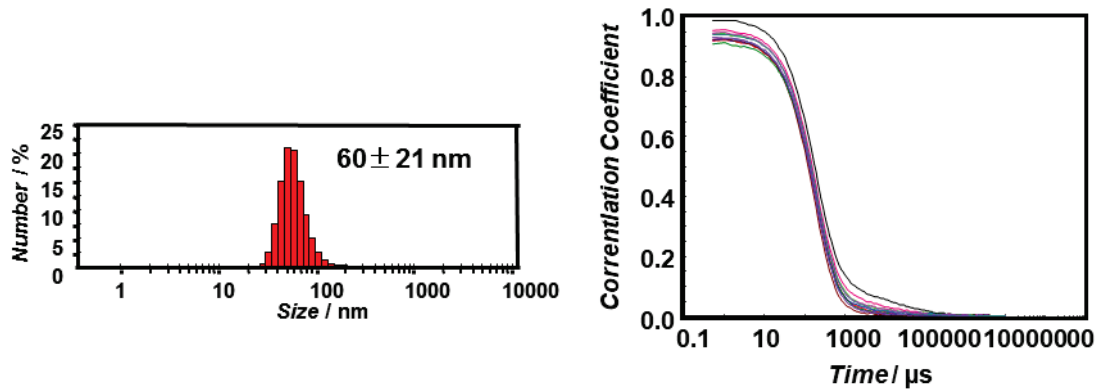
【DLS 測定条件】

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

温度 : 25°C

※試料調製後 10 分以内に測定

$[\beta\text{-Annulus-dA}_{20}] = 25 \mu\text{M}$



$[\beta\text{-Annulus-dT}_{20}] = 25 \mu\text{M}$

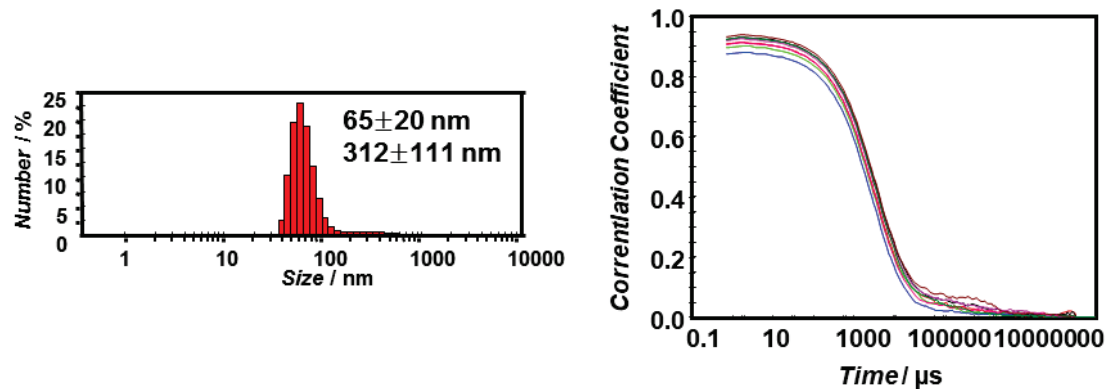


図 2-20. $25 \mu\text{M}$ における $\beta\text{-Annulus-dA}_{20}$ ペプチドおよび $\beta\text{-Annulus-dT}_{20}$ ペプチド 10 mM phosphate buffer 溶液の DLS 測定から得られた(左)個数換算分布、(右)自己相関関数

図 2-20 より、どちらのペプチドにおいても 60 nm 程度の集合体が確認され、人工ウイルスキャプシドが形成されていると考えられる。次に $\beta\text{-Annulus-dA}_{20}$ ペプチドが集合体形成する際のキャプシド粒径の濃度依存性について DLS 測定によって評価した。

【試料調製】

$\beta\text{-Annulus-dA}_{20}$ ペプチドに 10 mM phosphate buffer (pH 7.1) を加えて、それぞれ 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12.5 μM , 6.25 μM , 3.13 μM , 1.56 μM , 0.78 μM , 0.38 μM の濃度に希釈し、それらを測定の直前に 5 分間超音波を照射して試料調製した。

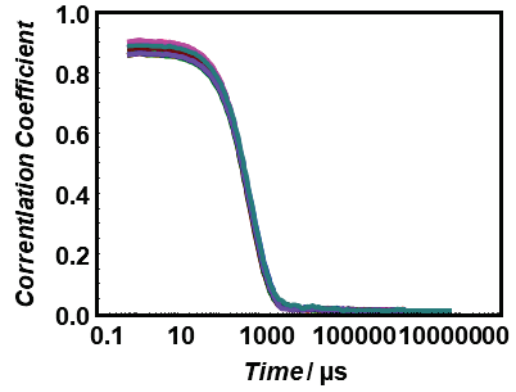
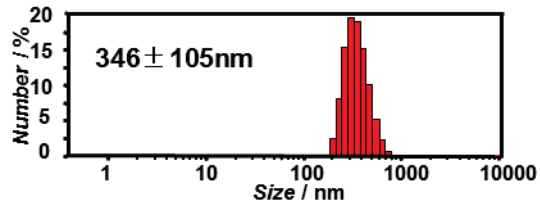
【測定条件】

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

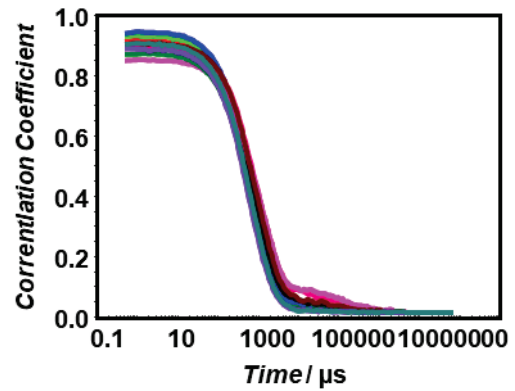
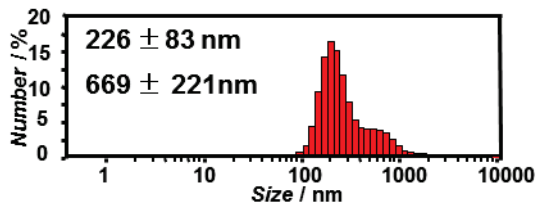
温度 : 25°C

Attenuator : 固定しない

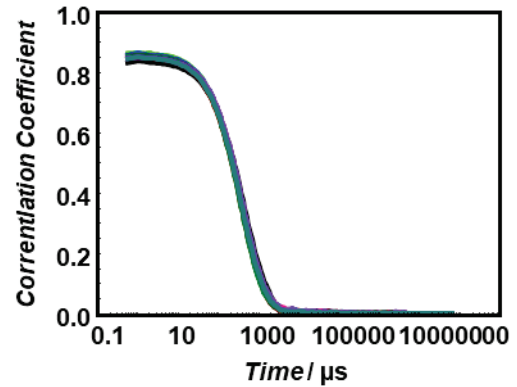
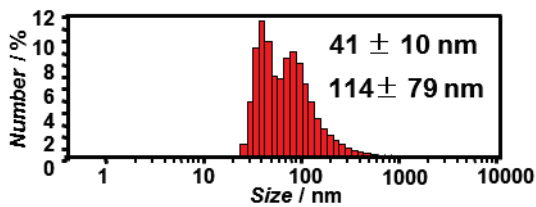
$[\beta\text{-Annulus-dA}_{20}] = 100 \mu\text{M}$



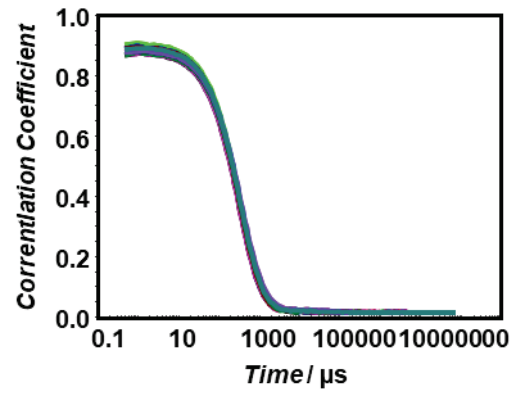
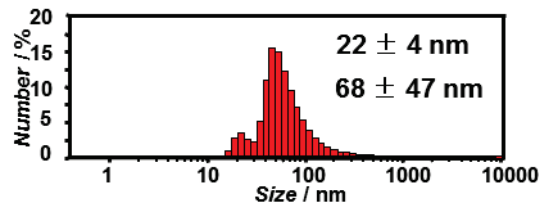
$[\beta\text{-Annulus-dA}_{20}] = 50 \mu\text{M}$



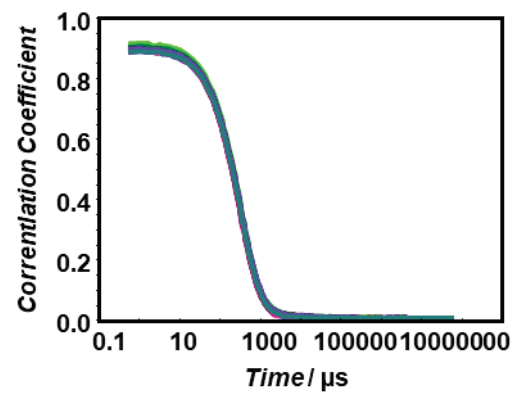
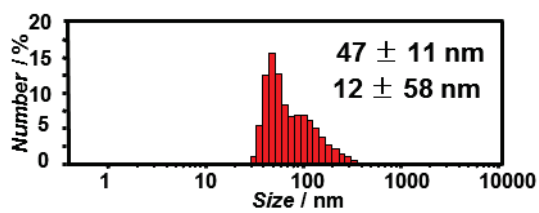
$[\beta\text{-Annulus-dA}_{20}] = 25 \mu\text{M}$



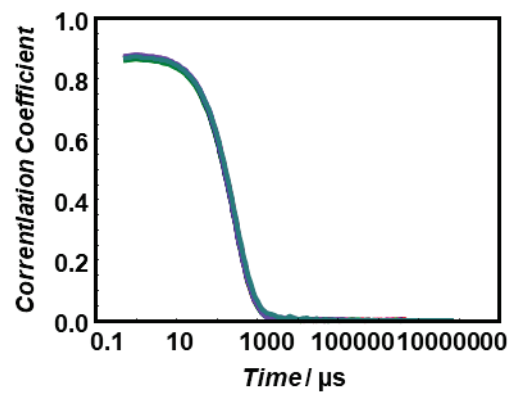
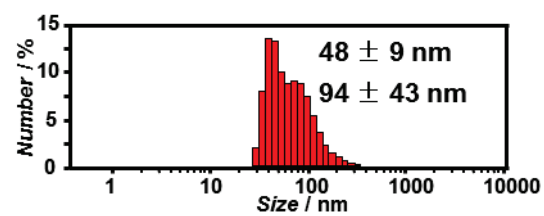
$[\beta\text{-Annulus-dA}_{20}] = 12.5 \mu\text{M}$



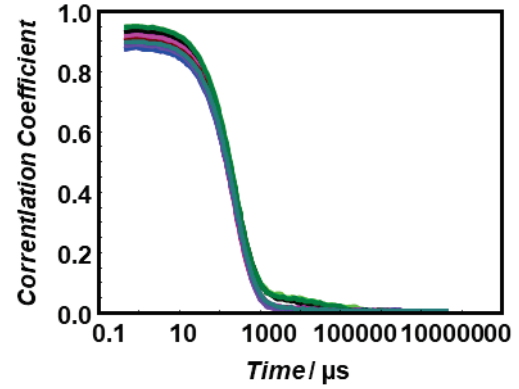
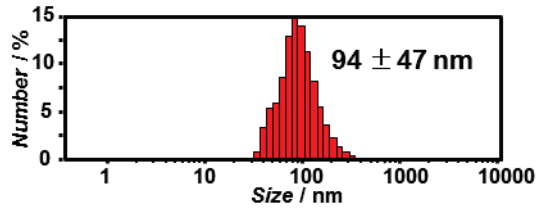
$[\beta\text{-Annulus-dA}_{20}] = 6.25 \mu\text{M}$



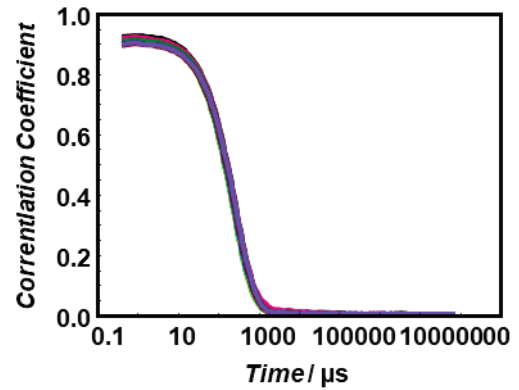
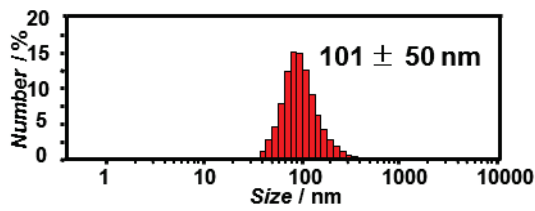
$[\beta\text{-Annulus-dA}_{20}] = 3.13 \mu\text{M}$



$[\beta\text{-Annulus-dA}_{20}] = 1.56 \mu\text{M}$



$[\beta\text{-Annulus-dA}_{20}] = 0.78 \mu\text{M}$



$[\beta\text{-Annulus-dA}_{20}] = 0.38 \mu\text{M}$

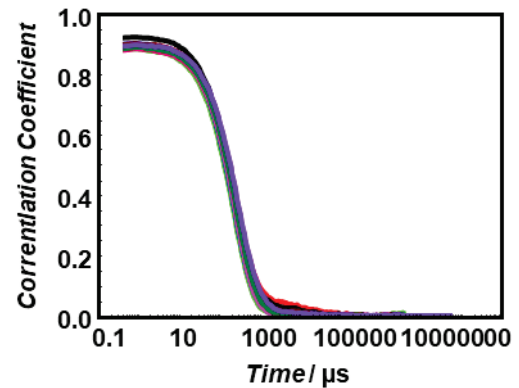
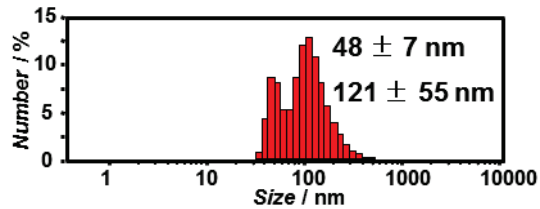


図 2-21. $\beta\text{-Annulus-dA}_{20}$ 10 mM phosphate buffer (pH 7.1) 溶液中での各濃度における DLS 測定から得られた(左)個数換算分布、(右)自己相関関数

図 2-21 の DLS 測定結果から、キャプシド粒径の濃度依存性をまとめると次のようになる。

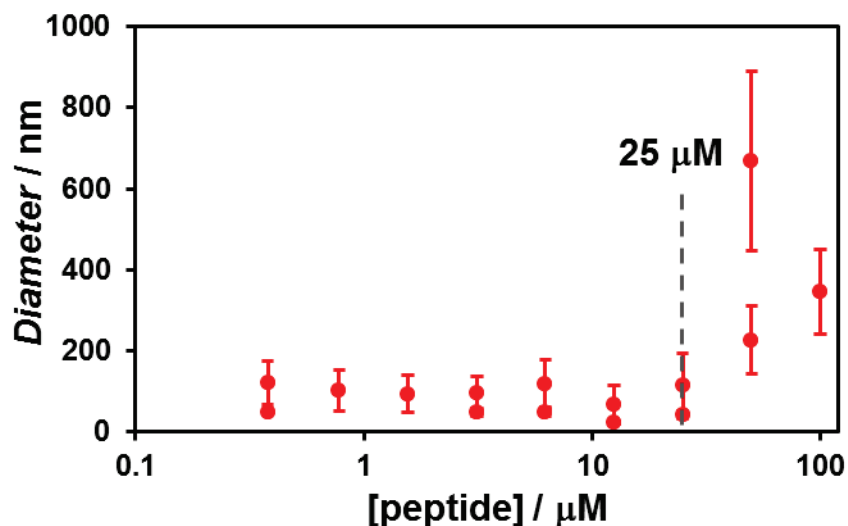


図 2-22. β -Annulus-dA₂₀ 10 mM phosphate buffer (pH 7.1) 溶液中の個数換算分布の濃度依存性

図 2-22 より 0.38-25 μM の濃度では、 β -Annulus-dA₂₀ は 18-190 nm の粒径の集合体を形成することが示された。一方、50-100 μM の濃度では 200 nm 以上の凝集体を形成することが分かった。未修飾の β -Annulus ペプチドの臨界会合濃度(CMC)は 25 μM であるため¹¹⁾、 β -Annulus-dA₂₀ は低濃度で自己集合できることは興味深い。DNA を修飾することでキャプシド構造が安定化するメカニズムは未だ明らかではないが、人工ウイルスキャプシド表面に密集した DNA 鎖間の類似電荷による引力^{12,13)}もしくは水和力¹⁴⁾が安定性に寄与している可能性があると考えられる。

2-3-2 TEM 観察

次に、TEM 観察により、 β -Annulus-dA₂₀ ペプチドおよび β -Annulus-dT₂₀ ペプチドの 10 mM phosphate 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% $\text{Na}_3(\text{PW}_{12}\text{O}_{40})(\text{H}_2\text{O})_n$ 水溶液

【実験操作】

β -Annulus-dA₂₀ ペプチド 10 mM phosphate buffer 溶液を Grid に 5 μ L 滴下し、1 分間静置した。その後、ろ紙を用いて液滴を取り除き、2 % Na₃(PW₁₂O₄₀)(H₂O)_n 水溶液を 5 μ L 滴下し、1 分間静置後、液滴を取り除いた。その後 1 晩減圧乾燥を行った。

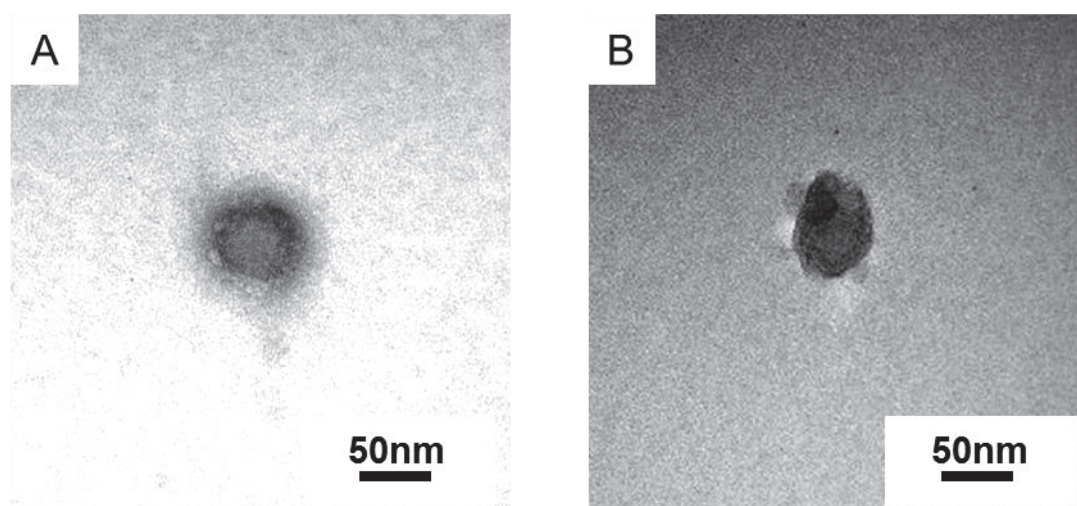


図 2-23. β -Annulus-dA₂₀ ペプチドおよび β -Annulus-dT₂₀ ペプチド 10 mM phosphate buffer 溶液から得られた TEM 像 (A) [β -Annulus-dA₂₀] = 25 μ M, (B) [β -Annulus-dT₂₀] = 25 μ M

図 2-23 より、 β -Annulus-dA₂₀ ペプチドおよび β -Annulus-dT₂₀ ペプチドの 25 μ M において、50 nm 程度の球状構造体を確認した。図 2-20 の DLS の結果と比較して、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。24 残基 β -Annulus ペプチド (INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS) の自己集合により得られる人工ウイルスキャプシドの粒径は 30-50 nm¹¹⁾ であり、キャプシド表面を 20 塩基の DNA で修飾された場合、粒径は約 44-64 nm と予測される⁸⁾。したがって、粒径の増大は、キャプシド表面の dA₂₀ および dT₂₀ の修飾によるものであると考えられる。

2-3-3 ζ -電位測定

ζ -電位を測定し、 β -Annulus-dA₂₀ のカプセル表面の電荷を調べた。

【測定条件】

試料 : A: 25 μ M β -Annulus-dA₂₀ ペプチド, B: β -Annulus-Cys 溶液 各 1 mL

溶媒 : 10 mM phosphate buffer (pH 7.1)

セル : DT1061 Clear disposable zeta cell

温度 : 25°C

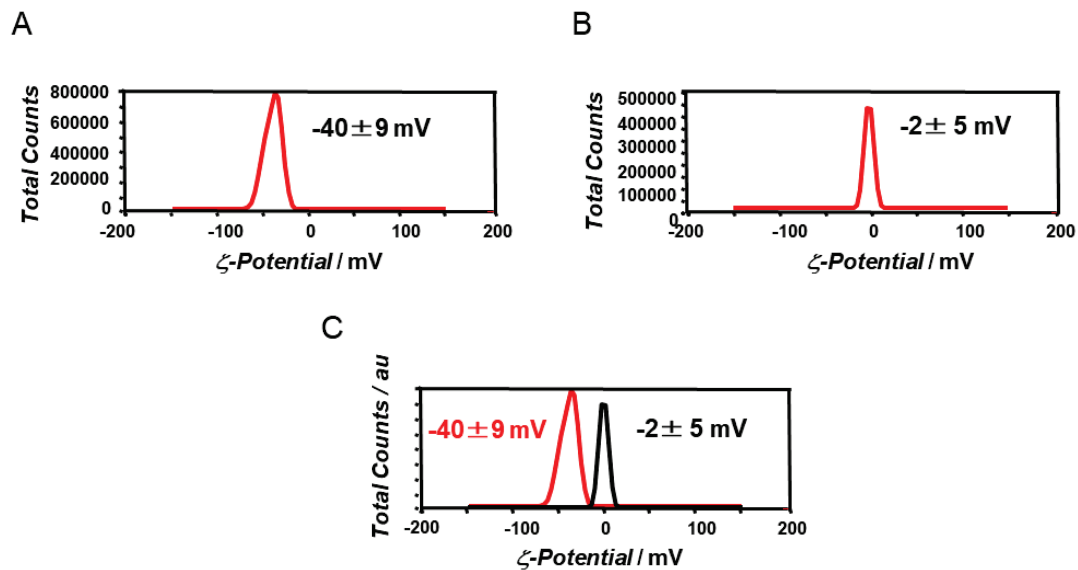


図 2-24. ζ -電位測定 (A) [β -Annulus-dA₂₀] = 25 μ M, (B) [β -Annulus-Cys] = 25 μ M, (C) 重ね合わせ

図 2-24 より、 β -Annulus-Cys ペプチドの表面電荷がほぼ 0 であるのに対して、 β -Annulus-dA₂₀ は明らかに大きい負の値をとっており、強くアニオン性を帯びていることが示された。したがって、表面が DNA で修飾されたキャプシドが形成していると考えられる。

2-4 DNA 修飾人工ウイルスキャプシド表面における DNA ハイブリダイゼーション挙動

表面が DNA で修飾されたカプセルが形成していることが示されたので、次にそのカプセル表面におけるハイブリダイゼーション挙動の評価を行った。

2-4-1 CD スペクトル

円二色性 (CD) スペクトルを測定し、 β -Annulus-dA₂₀ ペプチド溶液の DNA の二次構造を評価した。

【試薬】

Polytymidylic acid sodium salt (Poly dT) 【SIGMA】

【実験操作】

合成した β -Annulus-dA₂₀ ペプチドに 10 mM phosphate buffer (pH 7.1) を加え、25 μ M β -Annulus-dA₂₀ 10 mM phosphate buffer 溶液を調製した。なお、 β -Annulus ペプチドは、粉

末状態にミリ Q 水を加えて 100 μ M β -Annulus 水溶液に調製した

【CD スペクトル】

【CD スペクトル測定条件】

溶媒：10mM phosphate buffer (pH 7.1) セル：光路長 0.1 cm 石英セル

温度：25 $^{\circ}$ C

試料：各 200 μ L

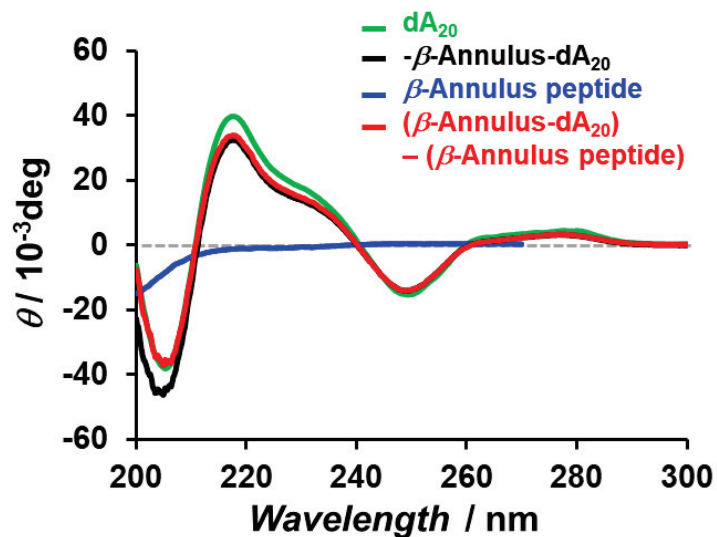


図 2-25. β -Annulus-dA₂₀ と各核酸溶液の CD スペクトル: (緑) dA₂₀, (黒) β -Annulus-dA₂₀, (青) [β -Annulus ペプチド] = 100 μ M, (赤) β -Annulus-dA₂₀ と β -Annulus ペプチドの差スペクトル; [A] = [T] = 0.5 mM

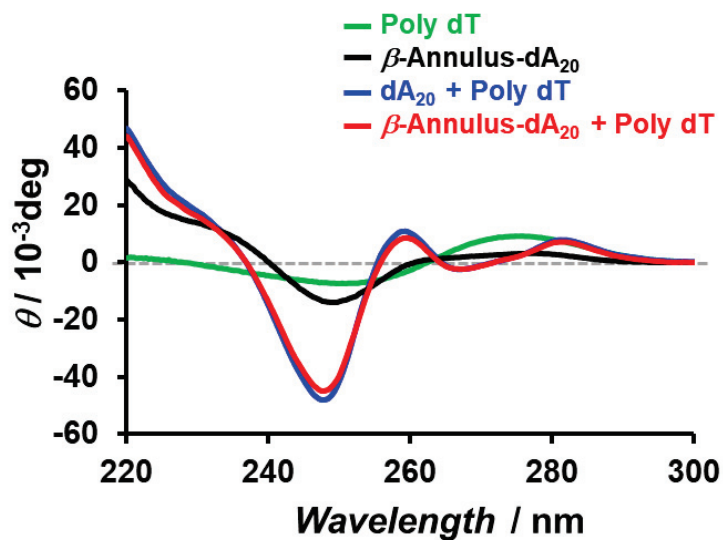


図 2-26. 等モル濃度 Poly dT 存在下での CD スペクトル: (緑) Poly dT, (黒) β -Annulus-dA₂₀, (青) dA₂₀ + Poly dT, (赤) β -Annulus-dA₂₀ + Poly dT; [A] = [T] = 0.5 mM

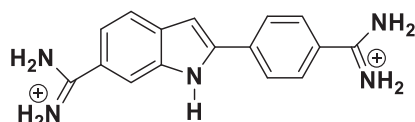
図 2-25 より、dA₂₀(緑)とβ-Annulus-dA₂₀ (黒)、および差スペクトル(赤)のピーク形状はほぼ重複していた。dA₂₀ の 248 nm における負の極大の強度がいずれのスペクトルでも変わらなかったことから、DNA の二次構造はβ-Annulus-Cys ペプチドとのコンジュゲーションによって影響を受けないことが示された。また図 2-26 より、248 nm において、β-Annulus-dA₂₀ への相補的な Poly dT の添加(赤)によって、β-Annulus-dA₂₀ (黒)よりも大きな負のピークが確認された。これは、dA₂₀ と Poly dT の混合(青)スペクトルとほぼ形状が一致しており、キャプシド表面の dA₂₀ と Poly dT のハイブリダイゼーションによるものと考えられる。なお、一般的な 2 本鎖 DNA の CD スペクトルは 240 nm-280 nm の範囲で正負がほぼ反転した形状 (B 型) の CD スペクトルを示すが、チミンとアデニンのみの特殊な配列であるため、正の極大が弱い C 型のスペクトルを示したと考えられる。

2-4-2 蛍光スペクトル測定

2 重鎖 DNA に特異的に結合して蛍光増大させる色素 DAPI を用いた蛍光スペクトル測定により、β-Annulus-dA₂₀ ペプチドおよびβ-Annulus-dT₂₀ ペプチドのハイブリダイゼーションを評価した。

【試薬】

4',6-Diamidino-2-phenylindole,dihydrochloride (DAPI) 【Mw:350.25 同仁化学】



【試料調製】

ストック溶液として調製した 100 μM DAPI の 10mM phosphate buffer 溶液 (pH 7.1) 20 μL に、10mM phosphate buffer (pH 7.1)を 180 μL 加えて 10 μM DAPI 溶液を 200 μL 調製し、ブランクとして用いた。試料は A と T の最終塩基濃度が等しくなるようにそれぞれストック溶液を調製し、100 μM DAPI 溶液 20 μL を加え、10 mM phosphate buffer (pH 7.1)で希釈して各 200 μL 調製した。

【測定条件】

試料: 各 200 μL

溶媒: 10 mM phosphate buffer (pH 7.1)

励起波長: 345 nm

測定範囲: 360-600 nm

感度: very low

温度: 25°C

セル: 光路長 0.1cm 石英セル

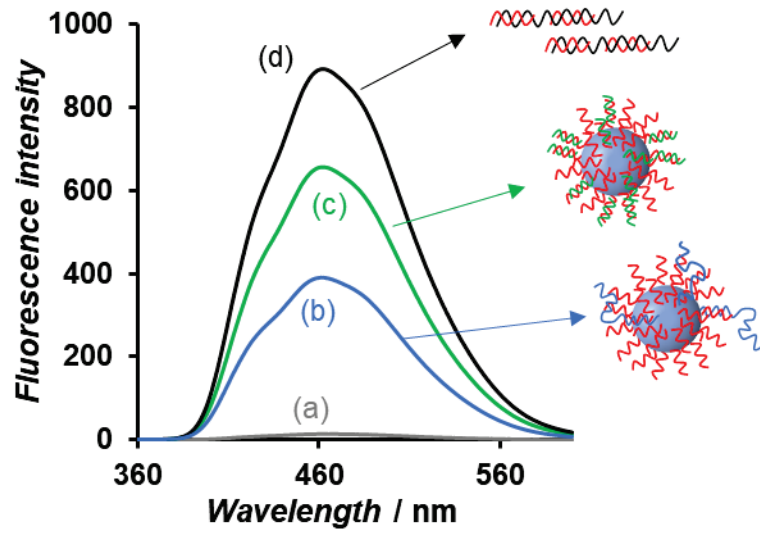


図 2-27. 10 μM DAPI 10 mM phosphate buffer 溶液の蛍光スペクトル: (a) DAPI, (b) DAPI+ β -Annulus-dA₂₀ + Poly dT, (c) DAPI+ β -Annulus-dA₂₀ + dT₂₀, (d) DAPI+ dA₂₀ + Poly dT ; [A] = [T] = 0.5 mM

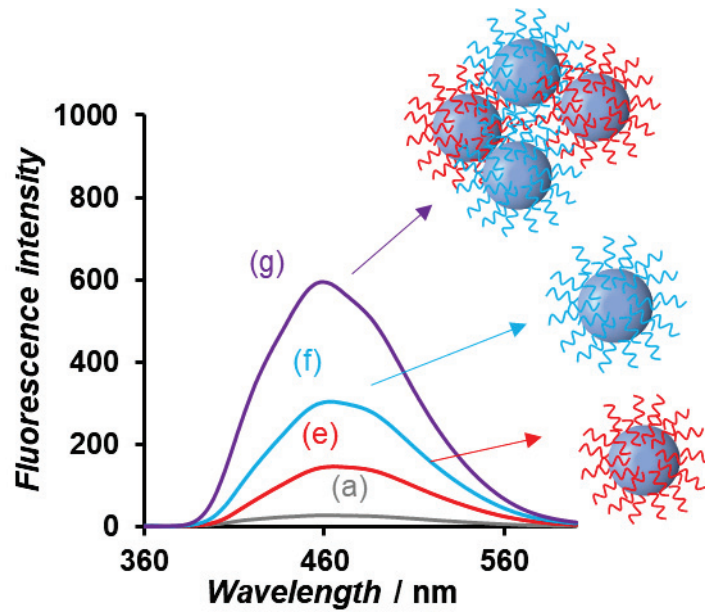


図 2-28. 10 μM DAPI 10 mM phosphate buffer 溶液の蛍光スペクトル: (a) DAPI, (e) DAPI+ β -Annulus-dA₂₀, (f) DAPI+ β -Annulus-dT₂₀, (g) DAPI+ β -Annulus-dA₂₀ + β -Annulus-dT₂₀ ; [A] = [T] = 0.5 mM

DAPI は DNA2 本鎖の副溝、特にアデニン・チミンに富んだ領域に優先的に結合することで蛍光強度を増強する¹⁵⁾。図 2-27 より、DAPI のみでは弱い蛍光を示し、(d) dA₂₀ と Poly dT の混合溶液では高い蛍光強度を示したため、図中のイラストの通り、完全なハイブリダイゼーションをしていると考えられる。対照的に、(b) β -Annulus-dA₂₀ + Poly dT および(c) β -Annulus-dA₂₀ + dT₂₀ における蛍光強度は小さくなっており、部分的にハイブリダイゼーションしていると考えられる。また、(c) β -Annulus-dA₂₀ + dT₂₀ の方が、(d) β -Annulus-dA₂₀ + Poly dT より蛍光強度が高いのは、短鎖 DNA 同士でより緊密に相補鎖形成できたためと考えられる。

また図 2-28 より、(g) β -Annulus-dA₂₀ + β -Annulus-dT₂₀ の蛍光強度は、(e) β -Annulus-dA₂₀ および(f) β -Annulus-dT₂₀ の蛍光強度の合計と比較して、約 1.4 倍増加した事が示された。これは、図中のイラストに示した通り、キャプシド間の立体障害の影響で、キャプシド表面の dA₂₀ と dT₂₀ のハイブリダイゼーションが部分的だったためと考えられる。

2-4-3 ポリヌクレオチド鎖との相補的塩基対形成によるキャプシド間凝集

CD スペクトル測定と DAPI を用いた蛍光スペクトル測定により、DNA で表面が修飾された人工ウイルスキャプシドの構築が示唆された。次に相補的塩基対を持つポリヌクレオチド鎖を添加した場合、どのような構造をとるか DLS 測定および TEM 観察を行った。

【試薬】

Polythymidylic acid sodium salt (Poly dT) 【SIGMA】

Polydeoxyadenylic acid sodium salt (Poly dA) 【SIGMA】

【DLS】

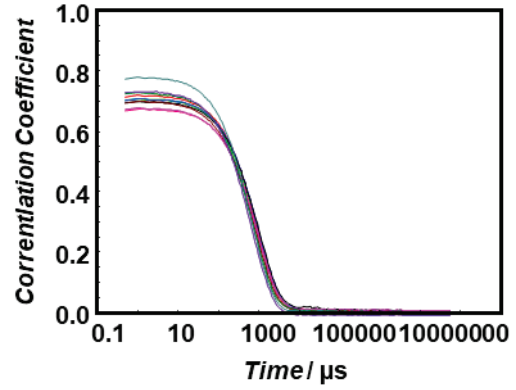
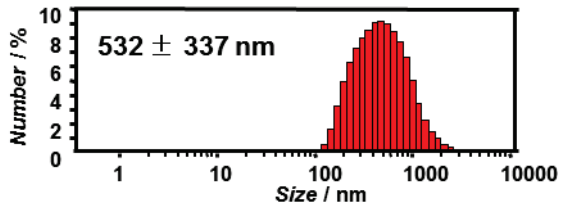
【DLS 測定条件】

溶媒：10 mM phosphate buffer (pH 7.1)

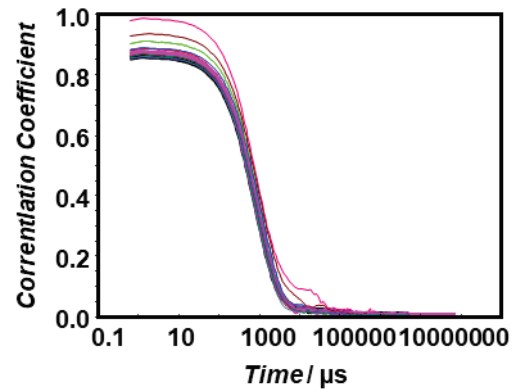
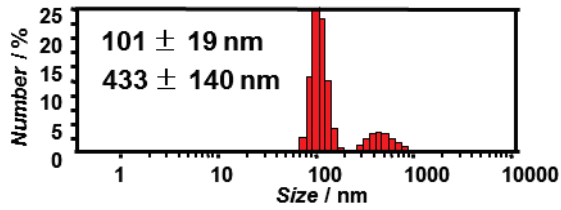
セル：ZEN2112-Low volume glass cuvette (12 μ L)

温度：25°C

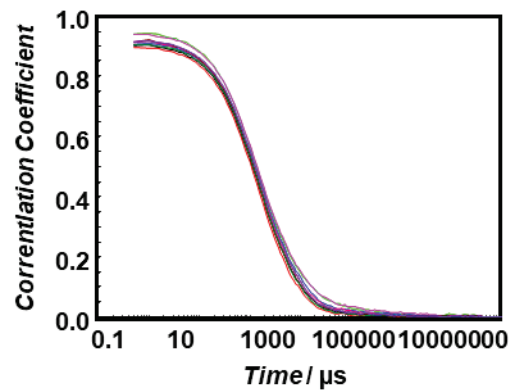
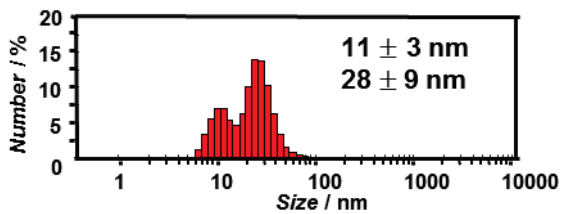
25 μM β -Annulus-dA₂₀ + Poly dT 溶液
 ([A] = [T] = 500 μM)



25 μM β -Annulus-dA₂₀ + PolydA 溶液
 ([A] = 500 μM)



25 μM β -Annulus-dT₂₀ + Poly dA 溶液
 ([T] = [A] = 500 μM)



25 μM β -Annulus-dT₂₀ + Poly dT 溶液

([T] = 500 μM)

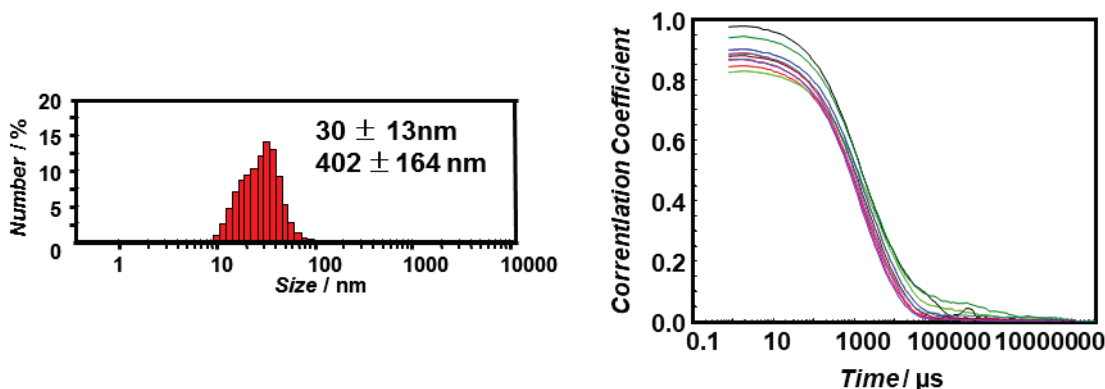


図 2-29. ポリヌクレオチド鎖存在下における各 DNA 修飾ペプチドの DLS から得られた (左)個数換算分布、(右)自己相関関数

図 2-29 より、 β -Annulus-dA₂₀ は、Poly dT 存在下において約 500 nm 程度の凝集体を形成したのに対し、Poly dA 存在下では人工ウイルスキャプシドよりやや大きい 100 nm 程度の粒径が得られた。一方、 β -Annulus-dT₂₀ は、Poly dT 存在下において人工ウイルスキャプシドと同程度の 30 nm 程度の粒径を示し、Poly dA 存在下ではそれよりもさらに小さな 10 nm 程度の粒径を示した。

DLS 測定より得られた各粒径がどのような構造か確認するため、TEM 観察を行った。

【TEM】

【TEM 観察条件】

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

加速電圧: 80 kV

染色: 2 % Na₃(PW₁₂O₄₀)(H₂O)_n 水溶液

図 2-30 より、Poly dT 存在下での β -Annulus-dA₂₀ からは約 300 nm 程度の凝集体が観測されたのに対し、Poly dA 存在下では 50 nm 程度の球状構造体が確認された。また、Poly dA 存在下での β -Annulus-dT₂₀ からは約 300 nm 程度の凝集体および、30 nm 程度の球状構造体が観測されたのに対し、Poly dT 存在下では 50 nm 程度の球状集合体が観測された。図 2-29 の DLS 測定結果ともほぼ一致した事から、 β -Annulus-dA₂₀ および β -Annulus-dT₂₀ は相補的塩基配列の DNA を認識し、キャプシド間がポリヌクレオチド鎖によって架橋されることで、DNA 修飾人工ウイルスキャプシドの凝集が起こったと考えられる。

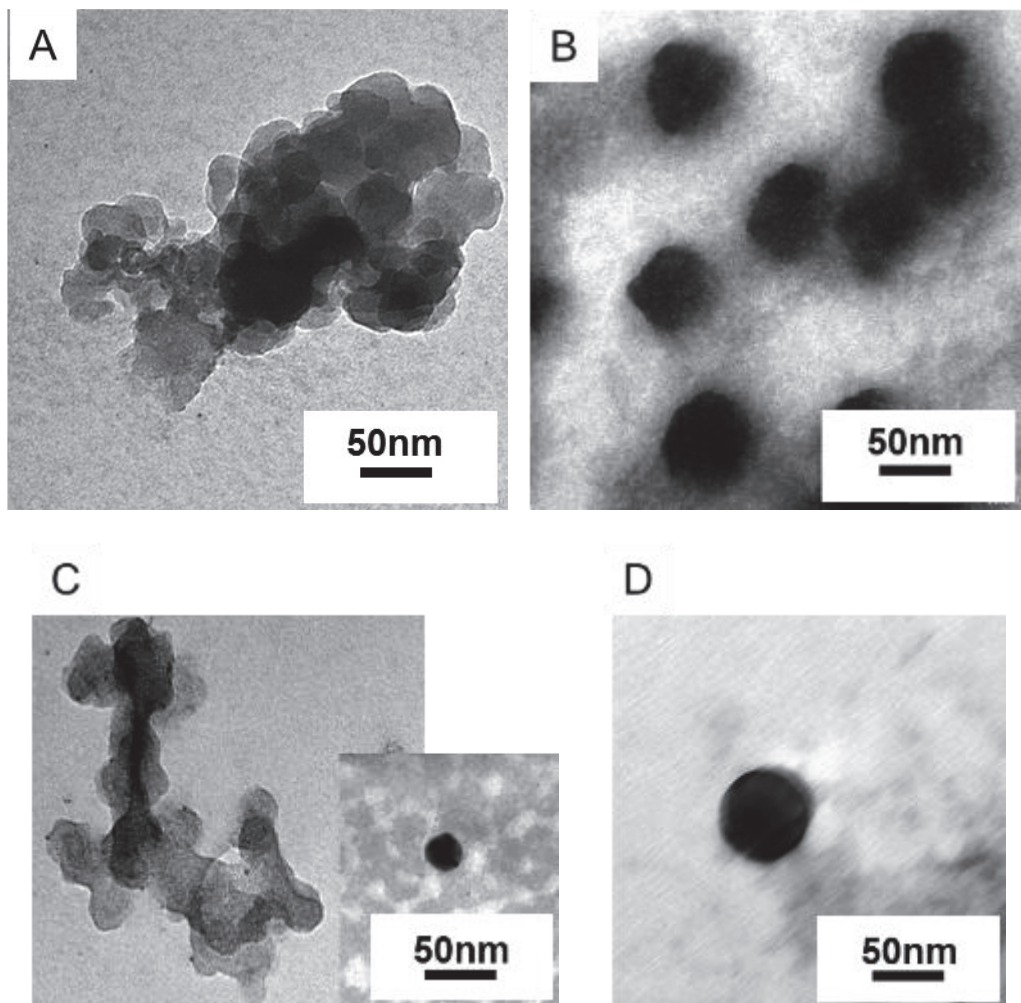


図 2-30. ポリヌクレオチド鎖存在下における各 DNA 修飾ペプチド溶液から得られた TEM 像 (A) Poly dT 存在下 β -Annulus-dA₂₀, (B) Poly dA 存在下 β -Annulus-dA₂₀, (C) Poly dA 存在下 β -Annulus-dT₂₀, (D) Poly dT 存在下 β -Annulus-dT₂₀

2-5 dA₂₀ 及び dT₂₀ 修飾人工ウイルスキャプシドの複合化

β -Annulus-dA₂₀ および β -Annulus-dT₂₀ からなる人工ウイルスキャプシドは相補鎖のポリヌクレオチド鎖によって架橋され、キャプシド間が凝集することが示された。そこで、 β -Annulus-dA₂₀ および β -Annulus-dT₂₀ からなる人工ウイルスキャプシド間での複合化が起こるかどうか、DLS 測定および TEM 観察を行った。

【実験操作】

粉末の β -Annulus-dA₂₀ ペプチドおよび β -Annulus-dT₂₀ ペプチドに 10 mM phosphate buffer (pH 7.1) を加えて混合し、終濃度がそれぞれ 25 μ M となるように調製した ([A] = [T] = 500 μ M)。

【DLS】

【DLS 測定条件】

溶媒：10mM phosphate buffer (pH 7.1)

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

温度：25 $^{\circ}$ C

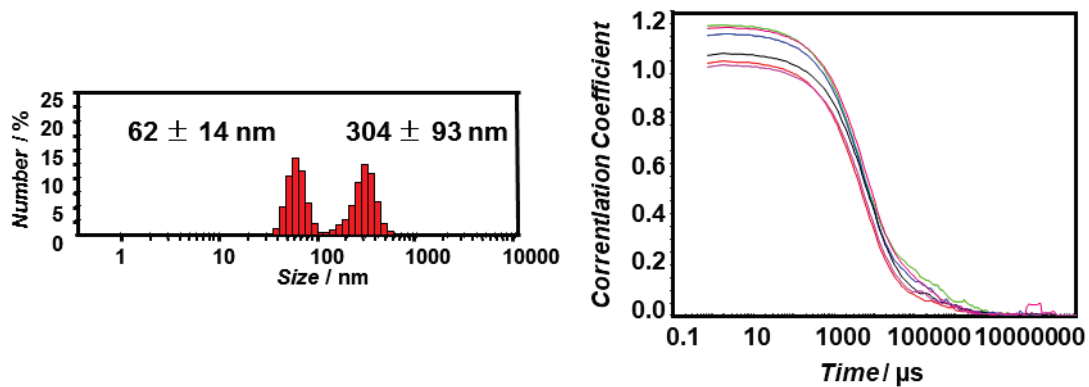


図 2-31. β -Annulus-dA₂₀ および β -Annulus-dT₂₀ の混合溶液における DLS から得られた(左)個数換算分布、(右)自己相関関数

図 2-31 より、60 nm 程度の個々の人工ウイルスキャプシドと思われる粒径と、200-600 nm 程度の凝集体をそれぞれ確認した。DLS 測定より得られた各粒径がどのような形態であるかを確認するため、TEM 観察を行った。

【TEM】

【TEM 観察条件】

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

加速電圧: 80 kV

染色: 2% Na₃(PW₁₂O₄₀)(H₂O)_n 水溶液

図 2-32 より、110 nm 程度の凝集体と思われる構造体と、30 nm 程度の球状構造体が観測された。図 2-31 の DLS の結果とほぼ一致していると考えられることから、 β -Annulus-dA₂₀ ペプチドおよび β -Annulus-dT₂₀ ペプチドを混合した溶液中では、人工ウイルスキャプシド単体と凝集体が共存していることが考えられる。これらの結果より、DNA で修飾された人工ウイルスキャプシドは、相補鎖を形成する DNA で修飾された人工ウイルスキャプシドとの部分的なハイブリダイゼーションにより、凝集体を形成する事が示唆された。

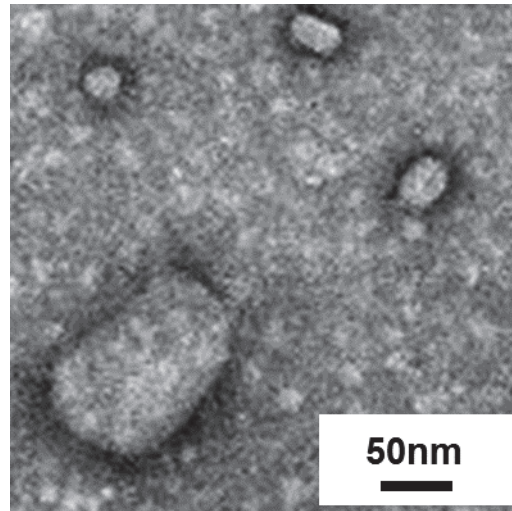


図 2-32. β -Annulus-dA₂₀ ペプチドおよび β -Annulus-dT₂₀ ペプチドの混合溶液から得られた TEM 像

2-7 まとめ^{9,16)}

Fmoc 固相合成法を利用して C 末端から 2 残基目に Cys を有する β -Annulus-Cys ペプチドの合成に成功した。さらに、 β -Annulus-Cys ペプチドへ dA₂₀ および dT₂₀ を導入した β -Annulus-dA₂₀ ペプチドおよび β -Annulus-dT₂₀ ペプチドの合成に成功した。 β -Annulus-dA₂₀ ペプチドおよび β -Annulus-dT₂₀ ペプチド溶液の DLS 測定、TEM 観察により DNA を C 末端側に修飾してもリン酸バッファー中で人工ウイルスキャプシドと思われる 50 nm 程度の球状構造体を形成することが示された。 β -Annulus-dA₂₀ ペプチド溶液の ζ -電位測定により、人工ウイルスキャプシドの表面が DNA で修飾されている事が示された。また、 β -Annulus-dA₂₀ ペプチド溶液 CD スペクトル測定により、人工ウイルスキャプシドの表面に提示された DNA の二次構造は、通常の DNA とほぼ同じ構造をしている事が分かり、キャプシドへの修飾による DNA の構造変化がないことが示唆された。また、相補鎖を形成する Poly dT 溶液と混合した場合、キャプシド表面でハイブリダイゼーションしていることが確認された。

β -Annulus-dA₂₀ および β -Annulus-dT₂₀ からなるキャプシド上でのハイブリダイゼーション挙動の評価により、人工ウイルスキャプシドの表面に提示された DNA は、それぞれ相補的な DNA を認識できることが示された。また、相補鎖を形成する DNA で修飾された人工ウイルスキャプシドは、部分的なハイブリダイゼーションによって凝集体を形成することがわかった。このことから、人工的に設計したペプチドナノ粒子を、DNA をビルディングブロックとして用いることで集積できることが示唆された。

参考文献

- 1) A. V. Pinheiro, D. Han, W. M. Shih, H. Yan, *Nature Nanotech.*, **6**, 763 (2011)
- 2) F. A. Aldaye, A. L. Palmer, H. F. Sleiman, *Science*, **321**, 1795 (2008)
- 3) N. Stephanopoulos, M. Liu, G. J. Tong, Z. Li, Y. Liu, H. Yan, M. B. Francis, *Nano Lett.*, **10**, 2714 (2010)
- 4) E. Strable, J. E. Johnson, M. G. Finn, *Nano Lett.*, **4**, 1385 (2004)
- 5) (a) K. Matsuura, *RSC Adv.*, **4**, 2942 (2014); (b) J. J. McManus, P. Charbonneau, E. Zaccarelli, N. Asherie, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **22**, 73 (2016)
- 6) M. Murata, S. Narahara, T. Kawano, N. Hamano, J. S. Piao, J. H. Kang, K. Ohuchida, T. Murakami, M. Hashizume, *Mol. Pharm.*, **12**, 1422 (2015)
- 7) K. Matsuura, K. Watanabe, Y. Matsushita, N. Kimizuka, *Polymer. J.*, **45**, 529 (2013)
- 8) 山田沙紀, 鳥取大学工学部物質工学科卒業論文 (2012)
- 9) 西川晶子, 鳥取大学工学部物質工学科卒業論文 (2013)
- 10) 中山広樹, 新版 バイオ実験イラストレイテッド 本当にふえる PCR, 秀潤社 (2010)
- 11) K. Matsuura, K. Watanabe, T. Matsuzaki, K. Sakurai, N. Kimizuka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 9662 (2010)
- 12) A. Martín-Molina, G. Luque-Caballero, J. Faraudo, M. Quesada-Pérez, J. Maldonado-Valderrama, *Adv. Colloid Interf. Sci.*, **206**, 172 (2014)
- 13) M. Kurona, A. Arnold, *Eur. Phys. J.*, **38**, 20 (2015)
- 14) M. R. Reddy, M. Berkowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 3165 (1989)
- 15) F. A. Tanius, J. M. Veal, H. Buczak, L. S. Ratmeyer, W. D. Wilson, *Biochemistry*, **31**, 3103 (1992)
- 16) Y. Nakamura, S. Yamada, S. Nishikawa, K. Matsuura, *J. Pept. Sci.*, **23**, 636 (2017)

第3章 人工ウイルスキャプシドへの短鎖 DNA の内包と還元による放出

3-1 序

近年、核酸は抗体医薬に次ぐ新たな医薬品として注目されている。1本鎖ないし2本鎖の短鎖 DNA (RNA) が、標的となる DNA または mRNA に配列依存的に結合し、遺伝子発現を抑制することから、ターゲット特異的で副作用も少ない有用な医薬品として数多く研究されている¹⁾。しかし、オリゴ核酸は血液や体液中の核酸分解酵素 (DNase または RNase) によって加水分解を受けてしまい、さらに負電荷を帯びた高分子であるため、細胞表面の負電荷との反発を受けるために細胞内への取り込み効率が低いという問題がある²⁾。

そこで確実に標的細胞へ供給することが核酸医薬実用化への課題となっており、細胞内導入キャリアの創製が期待されている³⁾。近年、第1章でも取り上げた M13 ファージ⁴⁾や CPMV⁵⁾の他、HIV に代表されるレンチウイルスやアデノウイルスなどの天然のウイルスがキャリアとして用いられているが⁶⁾、ウイルスの持つ免疫原性によるアレルギーや、免疫反応を引き起こす危険性が懸念されている⁷⁾。そこでカチオン性ポリマーなどの非ウイルス性キャリアの開発も盛んに行われているが、遺伝子発現効率はウイルス性キャリアに比べて低い事が多く、安全かつ機能的なドラッグデリバリー技術が求められている⁸⁾。

これまで松浦らは、トマトブッシュスタンウイルスのキャプシドタンパク質の内部骨格モチーフである β -Annulus 構造を形成する 24 残基ペプチドを合成し、水中での自己集合により直径 30-50 nm のウイルス様ナノカプセルを形成することを見出した⁹⁾。また、ペプチドの C 末端側はカプセル表面側に、N 末端側はカプセル内部に配向していることも示しており、人工ウイルスキャプシドの内部に静電相互作用を利用してアニオン性の長鎖 DNA を内包できたことも報告している¹⁰⁾。

一方、細胞内には抗酸化物質の一つであるグルタチオンが還元型で高濃度に存在している (0.5-10 mM)。グルタチオンは、分子内にチオール基 (-SH) を有するトリペプチドであり、細胞内に取り込まれたタンパク質中のジスルフィド結合を還元することが知られている¹¹⁾。そこで、この細胞内の還元環境を利用して、細胞内にキャリアを用いて DNA を導入後、細胞質で DNA を放出させる研究が行われている。例えば、片岡らはチオール基を導入した高分子ミセルを合成し、還元剤を加えるとジスルフィド結合が切断されてミセルが崩壊し、内包した siRNA が放出されることを報告している¹²⁾。また、Langer らは PBS 中での GSH 濃度が 10 mM (細胞内還元環境下) の時、ポリプレックスが解離し、DNA 遊離が誘導された事を報告している¹³⁾。

本章では、人工ウイルスキャプシドへの短鎖 DNA の内包と還元による放出を達成するために、 β -Annulus peptide の N 末端側に Cys を導入し、ピリジルジスルフィド基をもつ架橋剤 SPDP を介してオリゴ DNA を連結した β -Annulus ペプチド (DNA-SS- β -Annulus

peptide)を合成した (図 3-1)。また、合成したペプチドの自己集合化挙動を動的光散乱 (DLS)、および透過型電子顕微鏡(TEM)によって分析した。さらに、還元剤存在下におけるキャプシドからの短鎖核酸の放出挙動を逆相 HPLC、DLS および TEM 観察によって評価した。

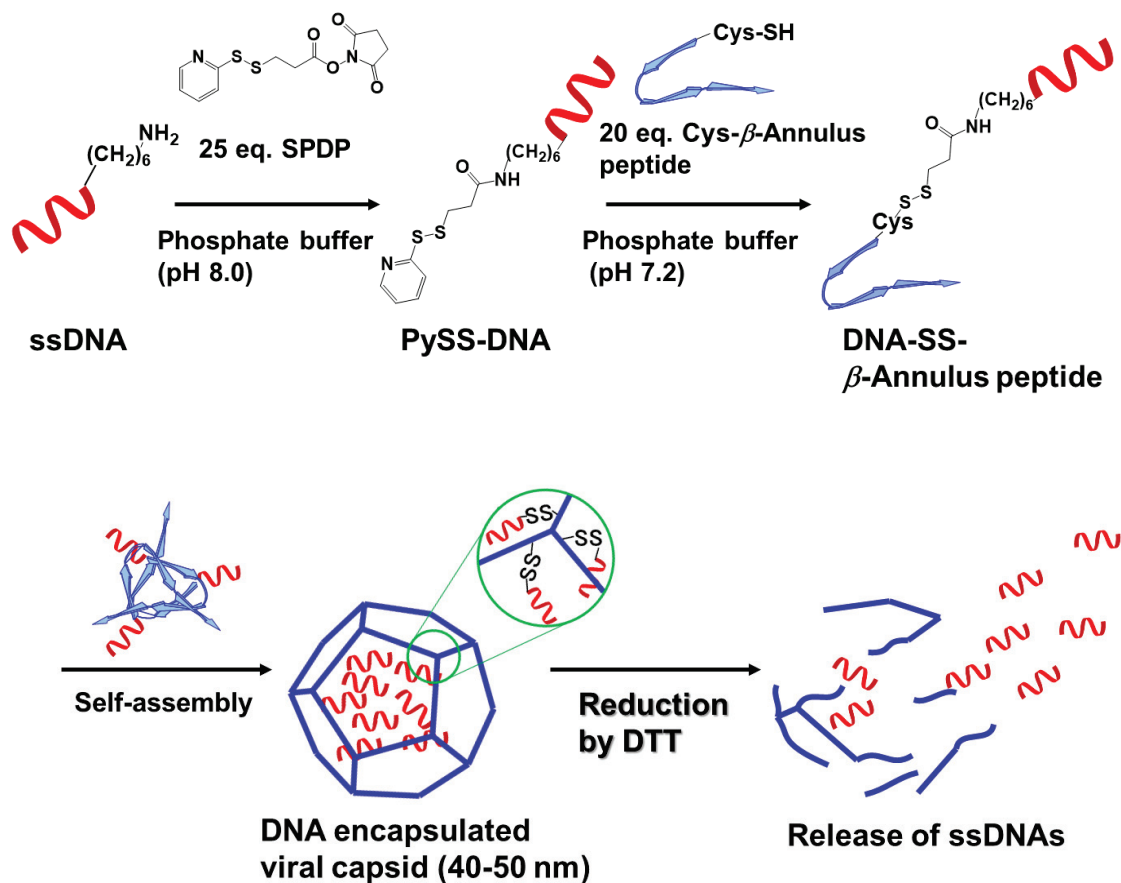


図 3-1. ジスルフィド結合を介して短鎖核酸を内包した人工ウイルスキャプシドの創製

3-2 DNA-SS- β -Annulus peptide の合成

3-2-1 Cys- β -Annulus peptide CINHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS の固相合成

Cys- β -Annulus peptide (CINHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS) を、Fmoc 固相合成法を用いて合成した。

【試薬】

樹脂

Fmoc-Ser(tBu)-Alko-PEG Resin

【0.24 mmol/g, 渡辺化学】 521 mg(0.125 mmol)

Fmoc アミノ酸

Fmoc-Ile-OH	【Mw 353.42, 渡辺化学】 177 mg (0.5 mmol)×2
Fmoc-Asn(Trt)-OH	【Mw 596.69, 渡辺化学】 298 mg (0.5 mmol)
Fmoc-His(Trt)-OH	【Mw 619.73, 渡辺化学】 310 mg (0.5 mmol)
Fmoc-Val-OH	【Mw 339.39, 渡辺化学】 170 mg (0.5 mmol)×4
Fmoc-Gly-OH	【Mw 297.31, 渡辺化学】 149 mg (0.5 mmol)×4
Fmoc-Thr(tBu)-OH	【Mw 397.48, 渡辺化学】 199 mg (0.5 mmol)×2
Fmoc-Ala-OH · H ₂ O	【Mw 329.36, 渡辺化学】 165 mg (0.5 mmol)×3
Fmoc-Met-OH	【Mw 371.46, 渡辺化学】 186 mg (0.5 mmol)
Fmoc-Pro-OH · H ₂ O	【Mw 355.40, 渡辺化学】 178 mg (0.5 mmol)
Fmoc-Arg (Pbf)-OH	【Mw 648.78, 渡辺化学】 324 mg (0.5 mmol)
Fmoc-Gln(Trt)-OH	【Mw 610.72, 渡辺化学】 305 mg (0.5 mmol)
Fmoc-Leu-OH	【Mw 353.42, 渡辺化学】 177 mg (0.5 mmol)
Fmoc-Cys(Trt)-OH	【Mw 585.72, 渡辺化学】 293 mg (0.5 mmol)

縮合剤

(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy)dimethylamino(morpholino)carbenium hexafluorophosphate (COMU) 【Mw 428.27, 渡辺化学工業】

中和剤

N,N'-Diisopropylethylamine (DIPEA) 【Mw 129.25, 渡辺化学工業】

Fmoc 脱保護溶液

ピペリジン 【Mw 85.15, 渡辺化学工業】 Fmoc 基の脱保護

溶媒

N-Methyl-2-Pyrrolidone (NMP) 【渡辺化学】

N,N-Dimethylformamide (DMF) 【渡辺化学】

第一級アミンの確認

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】

第一級および二級アミンの確認

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】

【マイクロウェーブ合成装置による反応条件】

反応時間：5 min

反応温度：75°C

反応前攪拌時間：30 sec

マイクロウェーブ吸収度：High

出力：35 W (出力領域 0-400 W)

周波数：2.45 GHz

【実験操作】

(1) 樹脂の膨潤

バイアルに Fmoc-Ser(tBu)-Alko-PEG Resin 521 mg (0.125 mmol) を入れ、NMP を 2 mL 加えてよく振り混ぜ、1 時間攪拌した。その後 1 日冷蔵庫で膨潤させた。

2) Fmoc 基の除去

アミノ酸導入樹脂の入ったバイアルに、40%ピペリジン溶液 2 mL を加えてよく振り混ぜ、スターラーで 3 分間攪拌した。溶液を除去後、20%ピペリジン溶液 2 mL を加えてよく振り混ぜ、10 分間攪拌した。次に、溶液を取り除き、樹脂を NMP で 5 回洗浄した。なお Fmoc 基除去時にマイクロウェーブは使用しなかった。

(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。第2級アミンであるプロリンの Fmoc 基除去は、クロラニルテストキットに

より確認した。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 を加えて混合し、マイクロウェーブ合成装置 (Biotage 社製) で 75°C、5 分間反応を行った。終了後、溶液を取り除いて残った樹脂を NMP で洗浄 (NMP 5mL 加えてスターラーで 30 秒攪拌後に NMP を除去する操作を 5 回) した。なお、システイン、ヒスチジンの導入の際は手動合成を行った。上記の溶液をバイアルに加えて溶かした後、スターラーで攪拌しながら 90 分間室温で反応させ、溶液を除去後に残った樹脂を 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) から (5) をアミノ酸配列

Cys(Trt)-Ile-Asn(Trt)-His(Trt)-Val-Gly-Gly-Thr(tBu)-Gly-Gly-Ala-Ile-Met-Ala-Pro-Val-Ala-Val-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Gln(Trt)-Leu-Val-Gly-Ser(tBu)となるまで繰り返した。

3-2-2 Cys- β -Annulus peptide の脱保護及び樹脂からの切断

【試薬】

トルフルオロ酢酸 (TFA) 【Mw 114.02, 東京化成】

1,2-エタンジチオール (EDT) 【Mw 94.20, 渡辺化学工業】

トリイソプロピルシラン (TIS) 【Mw 158.36, 渡辺化学工業】

イオン交換水 (H₂O)

tert-ブチルメチルエーテル 【Mw 88.15, 和光純薬】

【実験操作】

サンプル瓶に TFA 3.17 mL、イオン交換水 0.083 mL、EDT 0.083 mL、TIS 0.033 mL (94 % TFA, 2.5 % water, 2.5 % EDT, 1 % TIS) を混合し、ペプチド導入樹脂が入ったカラムに加えてボルテックスで混合した。30 分毎に上下振とうでよく混合しながら室温で 3 時間静置した。次に、カラムの下に 100 mL ナスフラスコを用意し、溶液の吸引ろ過を行った。得られた溶液を遠沈管に移し、氷冷した *tert*-ブチルメチルエーテルを 20 mL 加え、遠心分離 (4000 rpm, 5 分) によりペプチドを沈殿させ上澄みを除去する作業を 5 回行い、十分に乾燥させた後、凍結乾燥により回収した。

理論収量 : 301 mg (0.125 mmol)

粗収量 : 238 mg

粗収率 : 79.1 %

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: α -CHCA, Mode: Linear positive

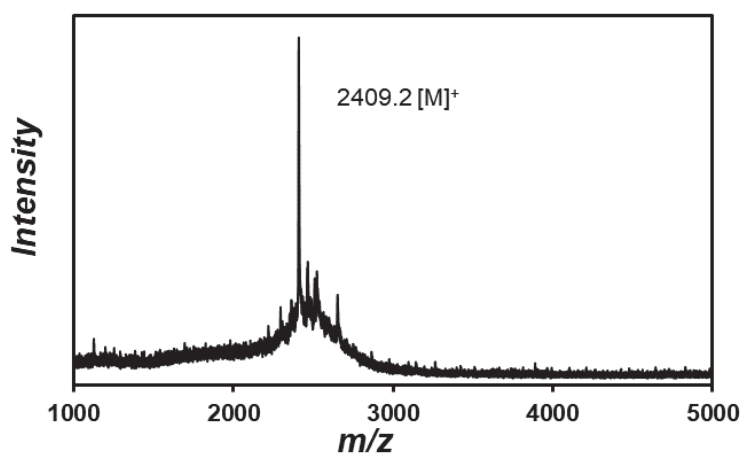


図 3-2. 粗ペプチドの MALDI-TOF-MS (matrix: α -CHCA)

3-2-3 逆相 HPLC による精製

【逆相 HPLC】

分取条件

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

試料注入量: 500 μ L

移動相: 水/アセトニトリル (0.1 % TFA 含)

移動相組成: 水 78 % (0 min) \rightarrow 50 % (95 min) リニアグラジエント

検出: UV-vis 220 nm

流量: 10 mL / min

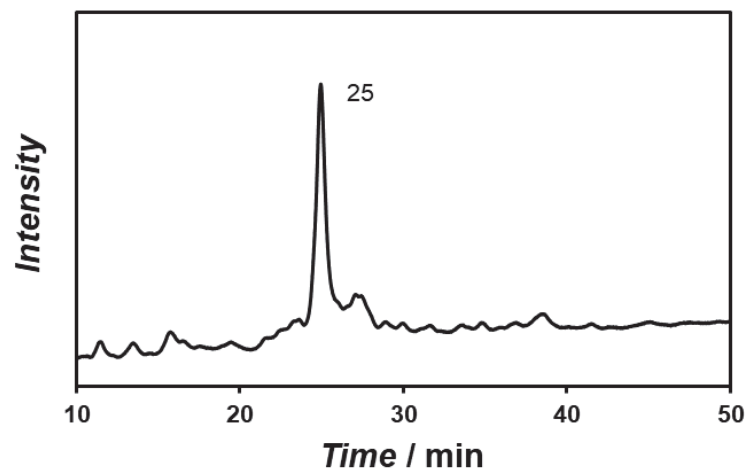


図 3-3. 逆相 HPLC チャート

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: α -CHCA, Mode: Linear positive

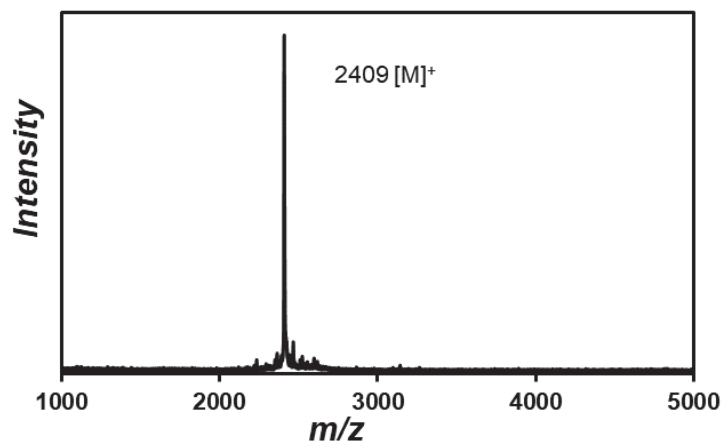


図 3-4. 分取時間 25 分の MALDI-TOF-MS (matrix: α -CHCA)

精製した Cys- β -Annulus ペプチドの収量・収率は次のようになった。

収量 : 3.93 mg

収率 : 21.2 %

3-2-4 DNA-SS- β -Annulus peptide の合成

DNA-SS- β -Annulus peptide の合成の前段階として、5'末端アミノ化 DNA (DNA-(CH₂)₆-NH₂) へ架橋剤 SPDP を縮合し、PySS-DNA を合成した¹⁴⁾。

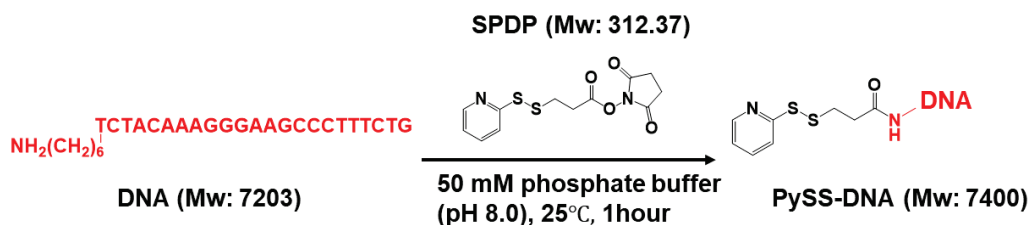


図 3-5. PySS-DNA 合成スキーム

【試薬】

5'アミノ化 DNA 【ジーンデザイン MW: 7203

NH₂-(CH₂)₆-5'-TCTACAAAGGGAAGCCCTTTCTG-3'】

N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) 【東京化成 Mw 312.36】

【実験操作】

5'アミノ化 DNA 1037.8 μg (0.144 μmol) を 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) 720 μL で溶解し、0.2 mM 水溶液に調製した。0.2 mM DNA バッファー溶液 200 μL (0.04 μmol)とアセトニトリルに溶解して調製した 10 mM SPDP 100 μL (1 μmol , 25 当量)とを混合し、恒温槽を用いて 25 $^\circ\text{C}$ 、1 時間インキュベートした。その後、大過剰の SPDP を除くため透析膜 Spectra/por7 (cutoff Mw 1000 : SPECTRUM 社製)を用いて 20 時間透析した。この間、透析外液の交換を 2 回行った。透析後回収したサンプルの一部について逆相 HPLC 分析を行い、残りは凍結乾燥を行った。同様に SPDP のみ、DNA-(CH₂)₆-NH₂ のみについても逆相 HPLC 分析を行った。

【逆相 HPLC】

カラム: Inertsil WP300 C18 (5 μm , 4.6 \times 250 mm)

移動相: (A) CH₃CN / (B) 0.1 M NH₄HCO₂ aq

移動相組成: B: 100 % (0 min) \rightarrow 0 % (95 min)

検出: UV-vis 260 nm

流量: 1 mL / min

試料 : (1) SPDP, (2) DNA-(CH₂)₆-NH₂, (3)透析後内液(PySS-DNA)

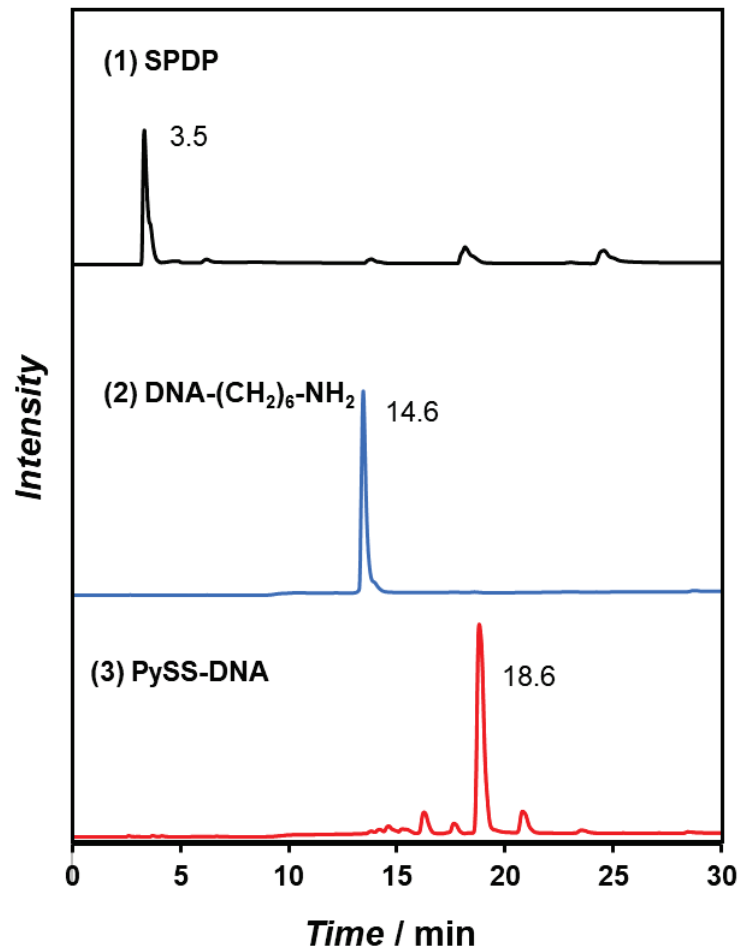


図 3-6. 逆相 HPLC チャート

図 3-6 より、新たに確認した 18.6 分のピークを分取し、遠心エバポレーターで脱塩操作を行った後、MALDI-TOF-MS 測定を行った。

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: 3-HPA, Mode: linear positive

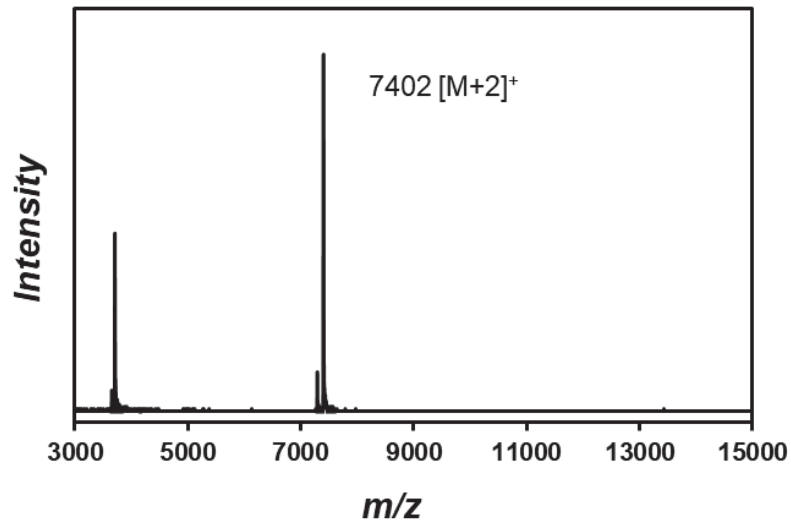


図 3-7. 透析後反応溶液の MALDI-TOF-MS (matrix: 3-HPA)

図 3-6 より、透析後サンプルの HPLC チャートでは、DNA-(CH₂)₆-NH₂ のチャートに見られた 14.6 分のピークおよび SPDP 由来の 3.5 分のピークは検出されず、新しく 18.6 分にピークが見られた。また、図 3-7 より、透析後のサンプルの MALDI-TOF-MS 測定を行った結果、 $m/z = 7402$ に PySS-DNA (Mw 7400) に由来すると考えられるメインピークが得られた。よって、PySS-DNA が合成されたと考えた。次に UV-vis スペクトル測定を行い、PySS-DNA の濃度決定を行った (図 3-8)。

【UV-vis スペクトル】

試料： 20 倍希釈 PySS-DNA 水溶液 200 μ L

測定範囲： 200-350 nm

温度： 25°C

バンド幅: 1.5 nm

レスポンス: Fast

走査速度: 400 nm / min

使用セル： 光路長 1 mm 石英セル

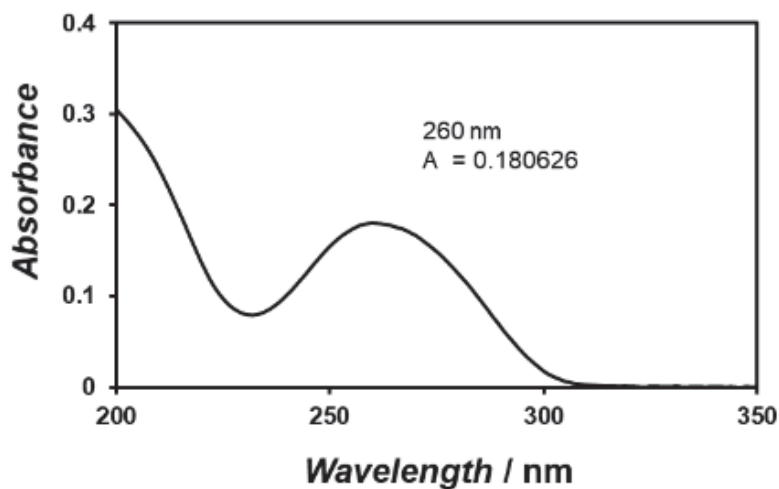


図 3-8. 20 倍希釈 PySS-DNA 水溶液の UV-vis スペクトル

260 nm における吸光度 $A = 0.180626$, セル長 $l = 0.1$ cm, DNA のモル吸光係数 $\epsilon = 15300 \times 6 + 7400 \times 6 + 11800 \times 5 + 9300 \times 6 = 251,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ より¹⁵⁾, DNA 濃度は、

$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot l} = \frac{0.180626}{251000 \times 0.1} \times 20 = 1.44 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$1.44 \times 10^{-4} \text{ M} \times 200 \times 10^{-6} = 28.8 \times 10^{-9} \text{ mol}$$

PySS-DNA の収率は、

$$\frac{28.8 \text{ nmol}}{40 \text{ nmol}} \times 100 = 72 \%$$

収率: 72 %

収量: 28.8 nmol

PySS-DNA の合成を確認できたので、次に、Cys- β -Annulus peptide の付加を行った (図 3-9)。

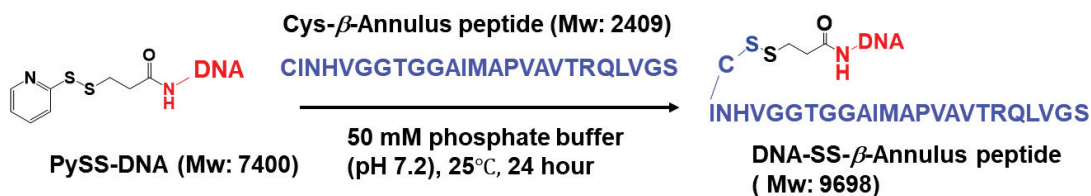


図 3-9. DNA-SS- β -Annulus peptide の合成スキーム

PySS-DNA (28.8 nmol)を 50 mM phosphate buffer (pH 7.2)に溶解させ、0.1 mM に調製した。別のエッペンドルフチューブに秤量した粗 Cys- β -Annulus peptide 1.4 mg (581 nmol) を 50 mM リン酸バッファ(pH 7.2)に溶解させ、2 mM に調製した。その後、モル比で PySS-DNA : Cys- β -Annulus 粗 peptide = 1: 20 となるように混合し、恒温槽を用いて 25°C で 24 時間インキュベートした。その後、合成反応液の逆相 HPLC 分析を行った。同様に Cys- β -Annulus ペプチドのみについても逆相 HPLC 分析を行った。

【逆相 HPLC】

カラム: Inertsil WP300 C18 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm)

移動相: (A) CH₃CN / (B) 0.1 M NH₄HCO₂ aq

移動相組成: B: 90 % (0 min) \rightarrow 0 % (95 min)

検出: UV-vis 220 nm (Cys- β -Annulus peptide), 260 nm (DNA-SS- β -Annulus peptide)

流量: 1mL / min

試料: (1) Cys- β -Annulus (2) DNA-SS- β -Annulus

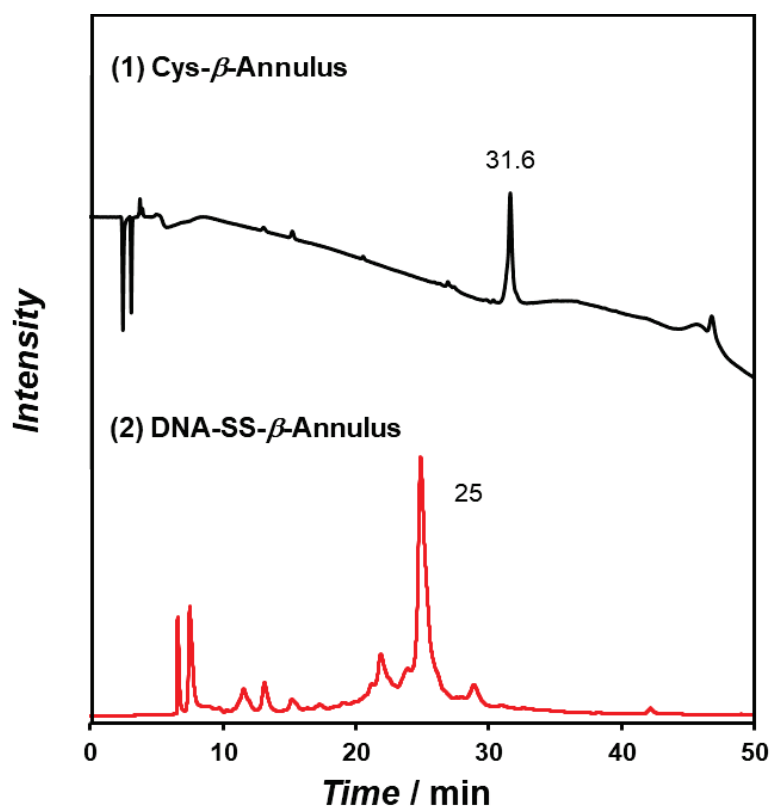


図 3-10. 逆相 HPLC チャート

図 3-10 に逆相 HPLC チャートの重ね合わせを示す。新たに検出された 25 分のピークを分取後、遠心エバポレーターで濃縮の後、透析膜 Spectra/por7 (cutoff Mw 1000 : SPECTRUM 社製)を用いて透析を 20 時間行った。

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: 3-HPA, Mode: Linear positive

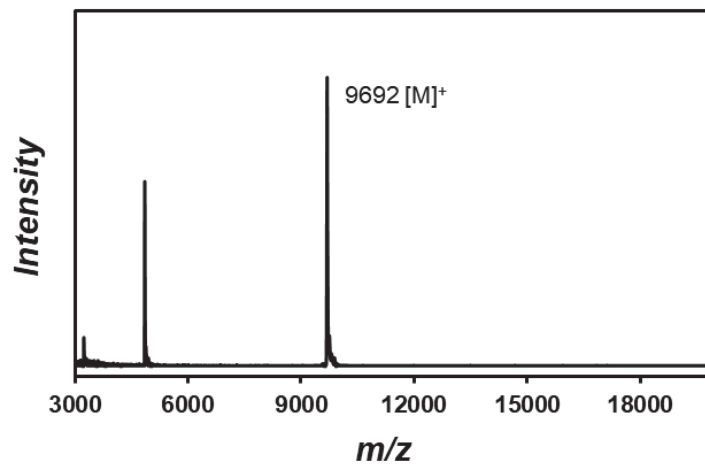


図 3-11. 精製後の DNA-SS- β -Annulus ペプチドの MALDI-TOF-MS (matrix: 3-HPA)

図 3-11 より、目的物(Mw: 9698)由来と考えられるピーク ($m/z = 9692$)が確認された。

【UV-vis スペクトル】

試料 : 15 倍希釈 DNA-SS- β -Annulus 水溶液 200 μ L

測定範囲 : 200-350 nm

温度 : 25°C

バンド幅: 1.5 nm

レスポンス: Fast

走査速度: 400 nm / min

使用セル : 光路長 1 mm 石英セル

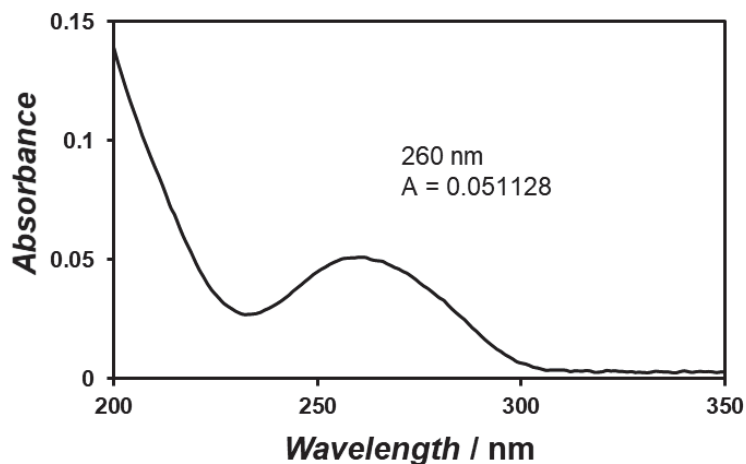


図 3-12. 15 倍希釈 DNA-SS-β-Annulus ペプチド水溶液の UV-vis スペクトル

図 3-12 より、260 nm における吸光度 $A = 0.051128$ 、セル長 $l = 0.1$ cm, DNA のモル吸光係数 $\epsilon = 15300 \times 6 + 7400 \times 6 + 11800 \times 5 + 9300 \times 6 = 251,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ より¹⁵⁾、DNA 濃度は、

$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot l} = \frac{0.051128}{251000 \times 0.1} \times 15 = 3.05546 \times 10^{-5} \text{ M}$$

収量は、

$$3.05546 \times 10^{-5} \text{ M} \times 200 \times 10^{-6} = 6.11 \times 10^{-9} \text{ mol}$$

収率は、

$$\frac{6.11 \text{ nmol}}{28.8 \text{ nmol}} \times 100 = 21 \%$$

収率 : 21 %

収量 : 6.11 nmol

3-3 DNA-SS-β-Annulus peptide の自己集合挙動

10 mM phosphate buffer (pH 7.1) 中において、DNA-SS-β-Annulus ペプチドがどのような集合体を形成するのか、DLS 測定および TEM 観察によって評価した。

3-3-1 DLS 測定

【試料調製】

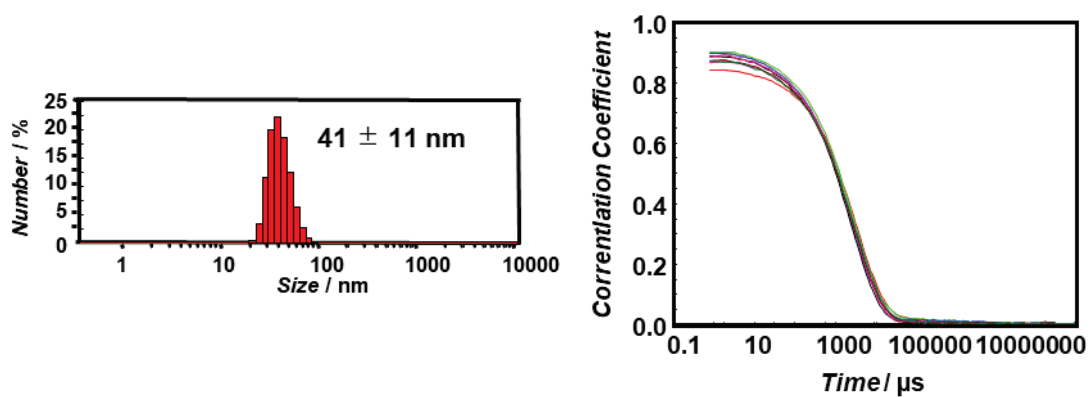
DNA-SS- β -Annulus ペプチドの粉末固体に 10 mM phosphate buffer (pH 7.1) を加えて、それぞれ 100、75、50、25、10、5、1 μ M の濃度に希釈した。それらを 5 分間超音波を照射し、1 時間 25°C でインキュベートして調製した。

【測定条件】

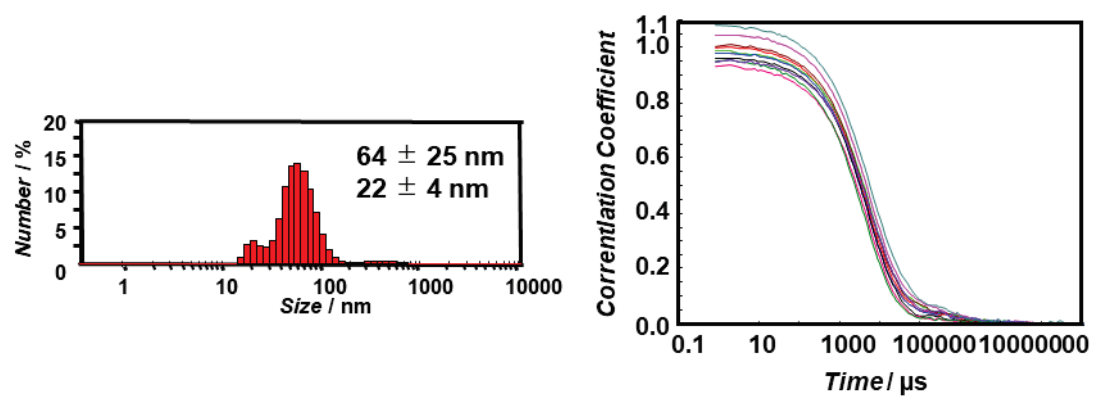
セル：ZEN2112-Low volume glass cuvette (12 μ L)

温度：25°C

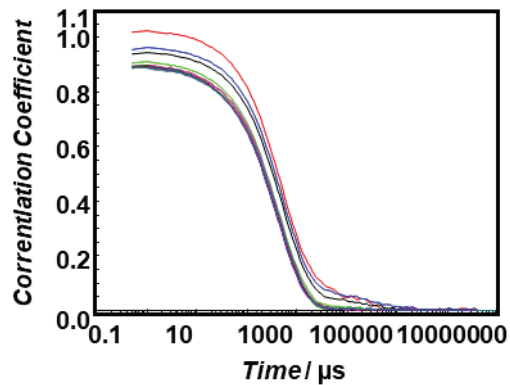
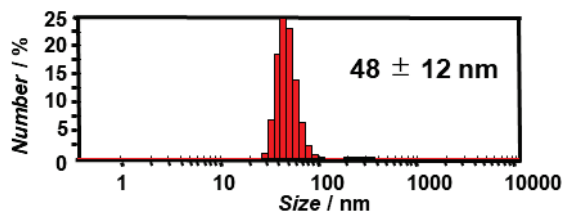
[DNA-SS- β -Annulus] = 100 μ M



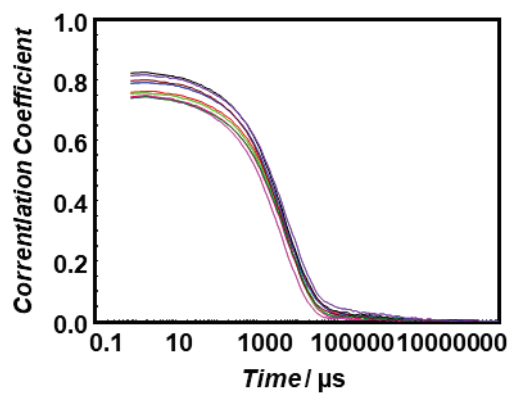
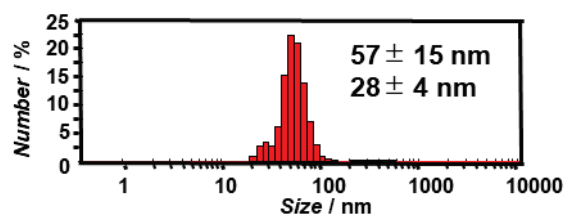
[DNA-SS- β -Annulus] = 75 μ M



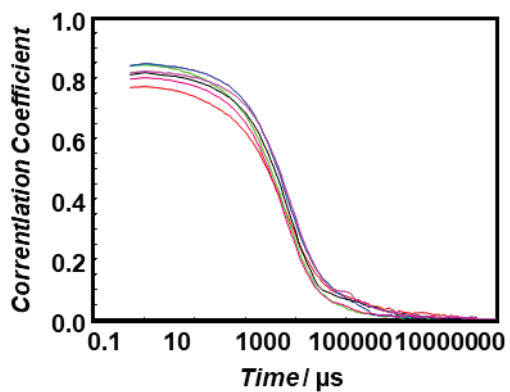
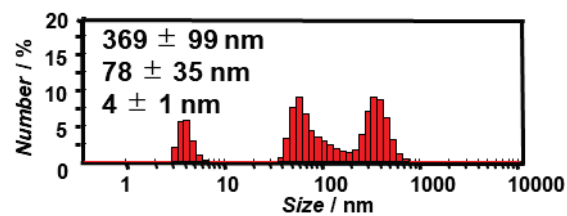
[DNA-SS- β -Annulus] = 50 μ M



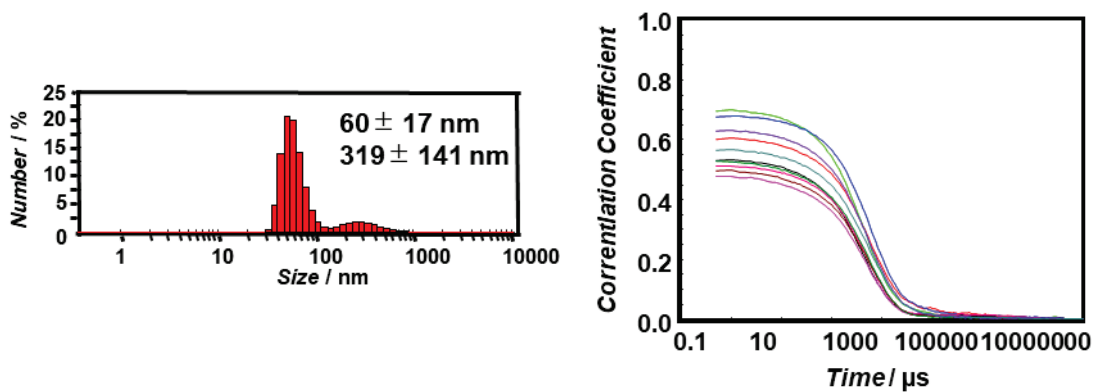
[DNA-SS- β -Annulus] = 25 μ M



[DNA-SS- β -Annulus] = 10 μ M



[DNA-SS- β -Annulus] = 5 μ M



[DNA-SS- β -Annulus] = 1 μ M

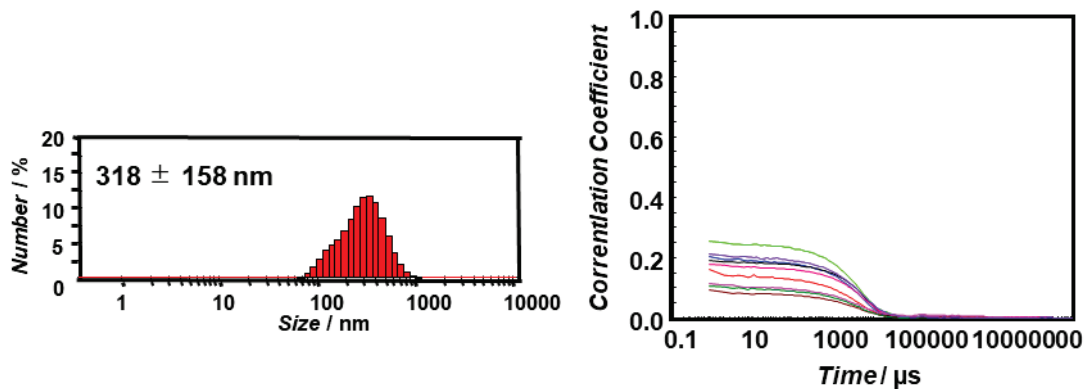


図 3-13. DNA-SS- β -Annulus 10 mM phosphate buffer (pH 7.1) 溶液中での各濃度における DLS 測定から得られた(左)個数換算分布、(右)自己相関関数

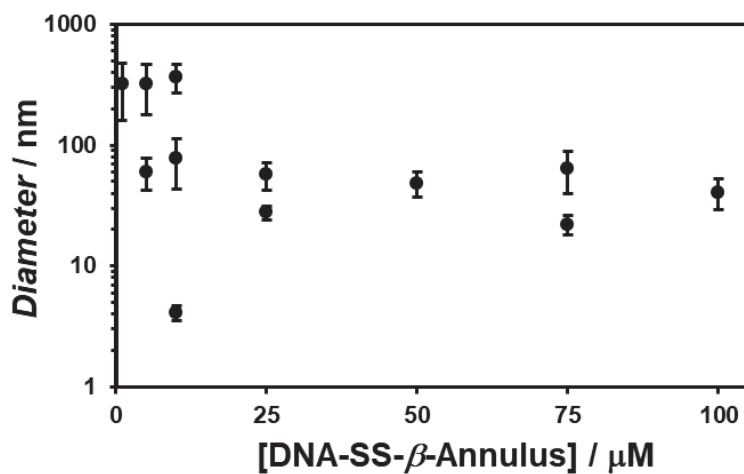


図 3-14. DNA-SS- β -Annulus 10 mM phosphate buffer (pH 7.1) 溶液の個数換算分布の濃度依存性

図 3-13 および 14 に、DNA-SS- β -Annulus 水溶液の DLS 測定から得られた個数換算分布の濃度依存性を示す。25-100 μM の濃度範囲で 30-50 nm の粒径を示すことが分かった。しかし、10 μM 以下の濃度で 300 nm 以上の大きな粒径が観察されたため、人工ウイルススキャプシド同士が凝集体を形成していると考えられる。

次に、DLS 測定による光散乱強度の濃度依存性を評価した。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。形成する構造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。

【試料調製】

溶媒：10mM phosphatebuffer (pH 7.1, 0.45 μm フィルター濾過済み)

粉末固体の DNA-SS- β -Annulus ペプチドを 100 μM に調製後、1、1.56、2.5、3.13、5、10、25、30 μM となるように溶媒で希釈し、5 分間超音波処理後、1 時間 25 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートして調製した。

【DLS 測定条件】

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

温度: 25 $^{\circ}\text{C}$

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。

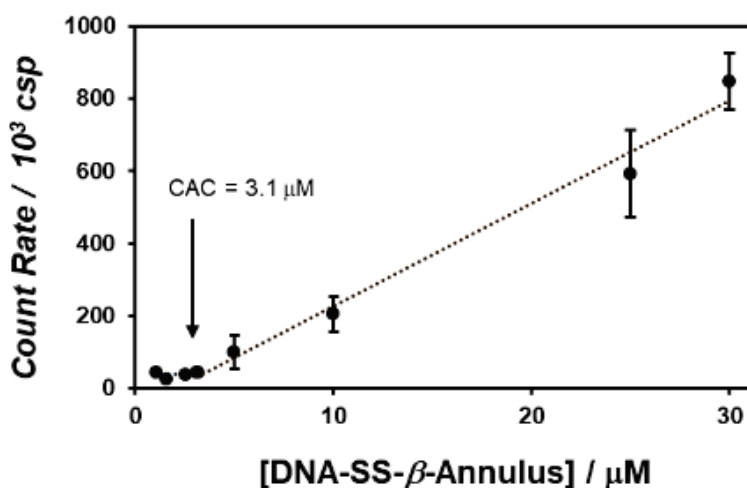


図 3-15. DNA-SS- β -Annulus 10 mM phosphate buffer (pH 7.1) 溶液の DLS 測定から得られた光散乱強度の濃度依存性

図 3-15 より、3.13 μM 以上の濃度から光散乱強度が濃度に依存して増加する結果となった。このため、CAC は 3.13 μM であることが示唆された。

また、様々な pH の水溶液中において DNA-SS- β -Annulus ペプチドがどのような構造体を形成するのかを DLS 測定によって評価した。

【試料調製】

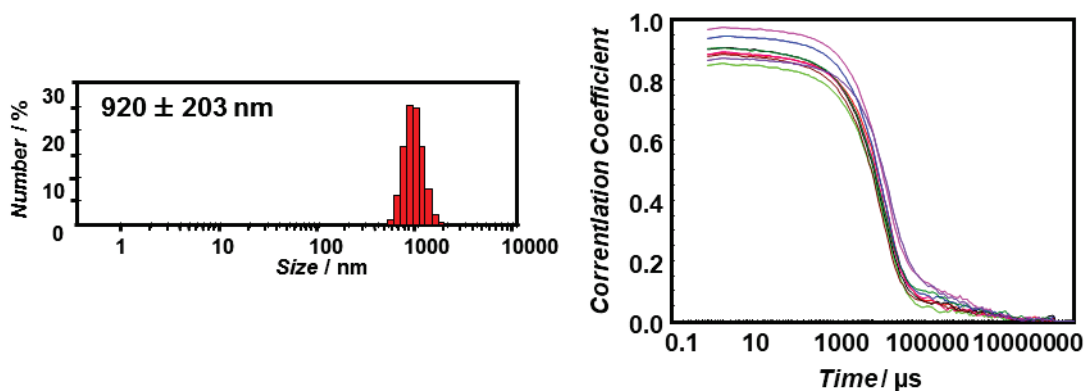
粉末固体の DNA-SS- β -Annulus にミリ Q 水を加えて 100 μM の水溶液(pH 4.2)を調製した。この水溶液に極少量の 5 M NaOH 水溶液、または 0.1 M HCl 水溶液を添加して、各 pH の DNA-SS- β -Annulus 水溶液(pH 2.1、9、11)を調整した。pH 調整の際に加えた NaOH 水溶液および HCl 水溶液は極少量のため、濃度変化は無視できるものとした。その後 5 分間超音波処理を行い、1 時間 25 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートして調製した。

【DLS 測定条件】

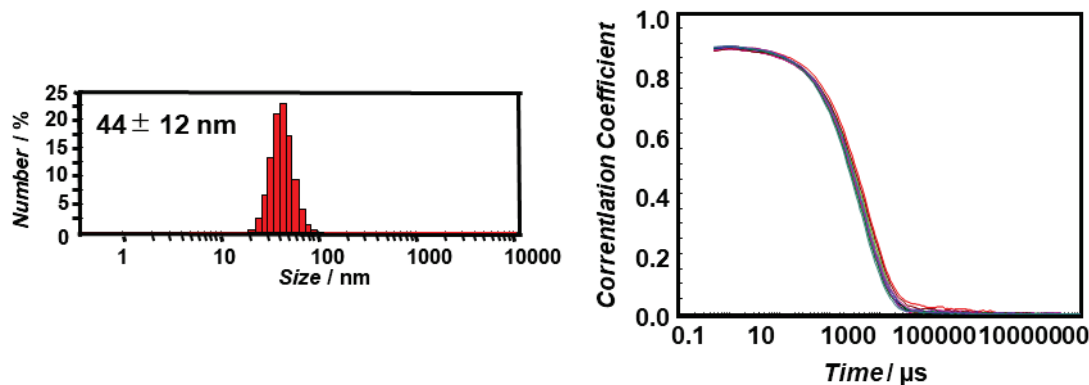
セル: ZEN2112 -Low volume glass cuvette (12 μL)

温度: 25 $^{\circ}\text{C}$

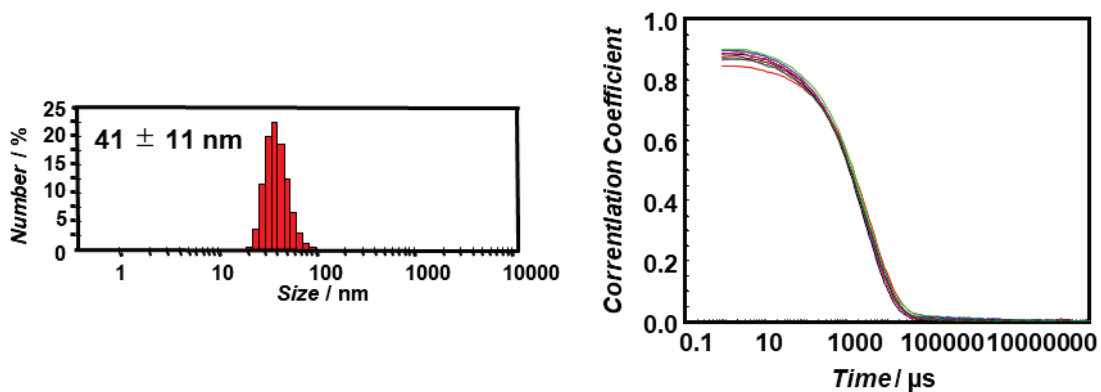
【pH 2.1】



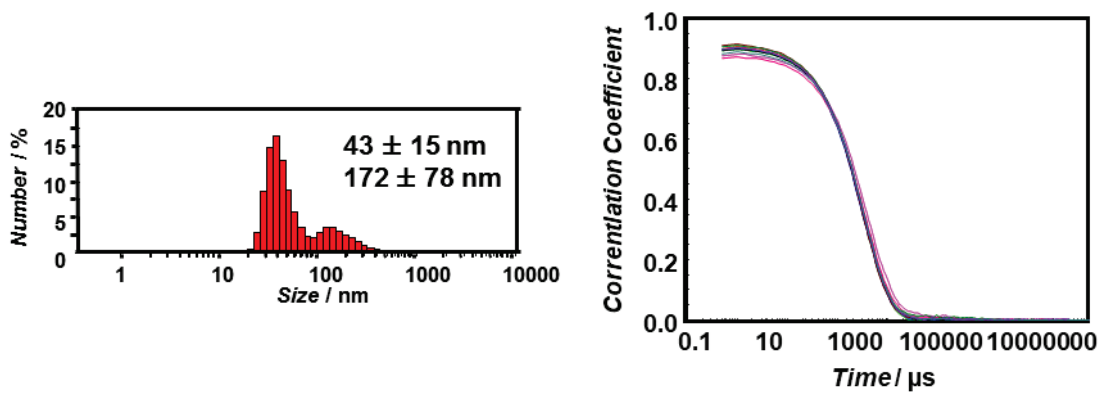
【pH 4.2】



【pH 7】 10mM phosphatebuffer (pH 7.1)



【pH 9】



【pH 11】

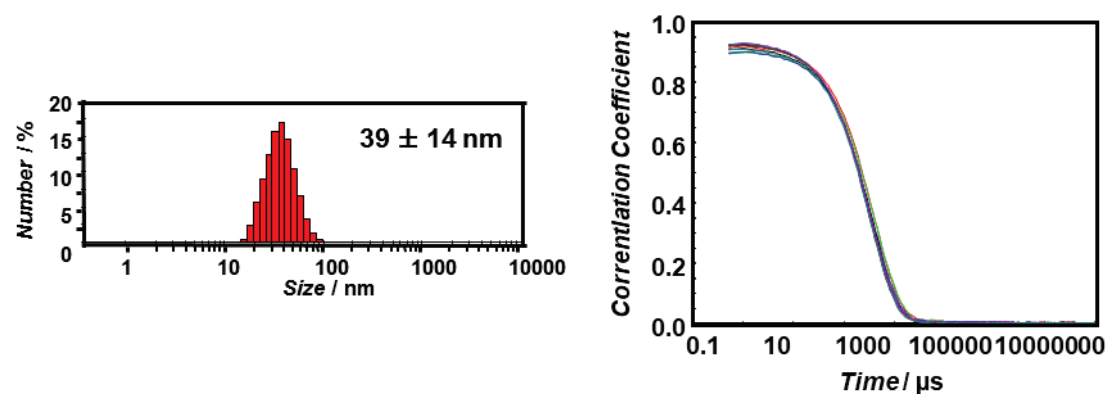


図 3-16. DNA-SS- β -Annulus 各 pH 溶液の DLS 測定から得られた
(左)個数換算分布、(右)自己相関関数

3-3-2 TEM 観察

TEM 観察により、DNA-SS- β -Annulus ペプチドの 10 mM phosphate buffer 中での形態を評価した。また、pH 依存性についても評価した。

【試料調製】

DNA-SS- β -Annulus ペプチドの粉末固体に 10 mM phosphate buffer (pH 7.1) を加えて 50 μ M に調製した。また、DNA-SS- β -Annulus にミリ Q 水を加えて 100 μ M の水溶液(pH 4.2)を調整した。この水溶液に極少量の 5M NaOH 水溶液、または 0.1M HCl 水溶液を添加して、各 pH の DNA-SS- β -Annulus 水溶液(pH 2.1、9、11)を調整した。pH 調整の際に加えた NaOH 水溶液および HCl 水溶液は極少量のため、濃度変化は無視できるものとした。その後 5 分間超音波処理を行い、1 時間 25°C でインキュベートして調製した。

【測定条件】

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

加速電圧: 80 kV

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

【実験操作】

各 DNA-SS- β -Annulus ペプチド溶液を Grid に 5 μ L 滴下し、1 分間静置した。その後、ろ紙を用いて液滴を取り除き、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 分間静置後、液滴を取り除いた。その後 1 晩減圧乾燥を行った。

【DNA-SS- β -Annulus】= 50 μ M, pH 7.1

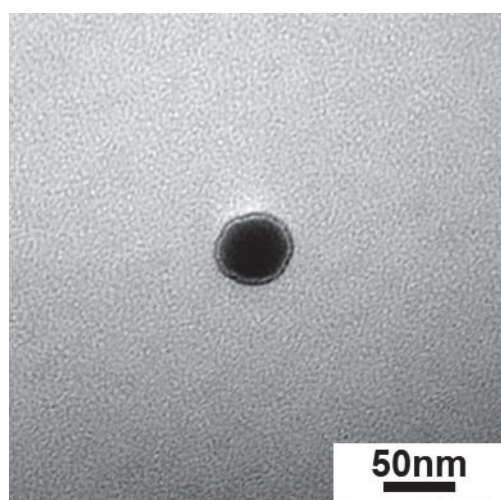


図 3-17. 50 μ M DNA-SS- β -Annulus ペプチド 10 mM phosphate buffer (pH 7.1)溶液から得られた TEM 像

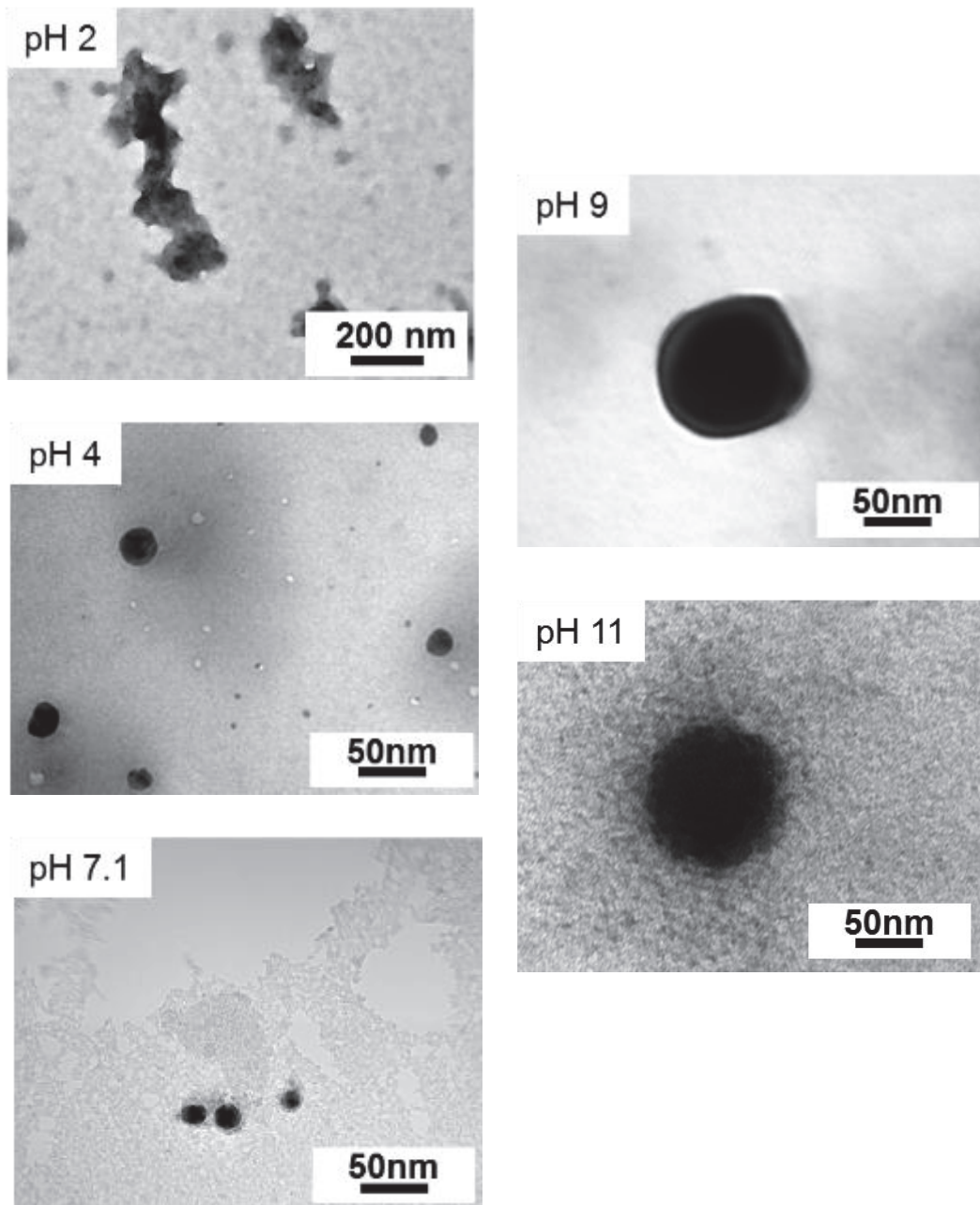


図 3-18. 100 μ M DNA-SS- β -Annulus ペプチド各 pH 溶液から得られた TEM 像

図 3-17 より、50 μM DNA-SS- β -Annulus ペプチド水溶液において、50 nm 程度の球状構造体を確認した。また、図 3-18 および DLS 測定の結果から、DNA-SS- β -Annulus は人工ウイルスキャプシドを形成し、pH 4-11 の範囲で安定して自己集合することが示された。一方、第 2 章で述べた dA₂₀- β -Annulus は 50 μM 以上の高濃度では凝集体が確認されており、キャプシドの内側と外側にそれぞれ DNA を修飾した場合、集合体を形成する濃度が異なるのは興味深い。多価アニオン性である DNA は、多価の対イオンによって凝縮する¹⁶⁾。アニオン性である DNA がキャプシドに内包された場合、人工ウイルスキャプシドの内部カチオン性によって静電凝縮され、高濃度でも安定的に球状構造体を形成していると考えられる。

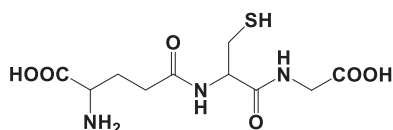
3-4 還元型グルタチオンを用いたジスルフィド結合切断による DNA 放出

還元型グルタチオン(GSH)を使用して、DNA-SS- β -Annulus のジスルフィド結合の切断を検討した^{13,17)}。反応に用いるグルタチオン濃度を細胞内還元環境下である 10 mM とし、生体内環境を想定してインキュベートの温度設定を 37°C とした¹⁷⁾。反応時のバッファーはこれまでの実験で用いてきた 10 mM phosphate buffer (pH 7.1)を引き続き使用した。

【試薬】

Glutathione (GSH) (Reduced Form) L- γ -glutamyl-L-cysteinyglycine

【Wako, Mw 307.33】



3-4-1 逆相 HPLC による分析

【試料調製】

粉末固体の DNA-SS- β -Annulus を 10 mM phosphatebuffer (pH 7.1)バッファーに溶解して 100 μM に調製した。別のエッペンドルフチューブに 50 mM GSH 溶液 8 μL 、100 μM DNA-SS- β -Annulus phosphatebuffer 溶液 20 μL 、10mM phosphate buffer (pH 7.1) 12 μL を加えて 37°C でインキュベートを行った。終濃度は[GSH]=10 mM、[DNA-SS- β -Annulus]=50 μM とした。インキュベート 2、12、18 時間後に逆相 HPLC で分析を行った。

【HPLC 分析条件】

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

移動相 : (A) CH₃CN (B)0.1M Na₄HCO₂ aq

移動相組成 : B:100 % (0 min) – 100 % (3 min), B:100 % (3 min) – 0 % (73 min)

検出 : UV-vis 260 nm

流量 : 1 mL/min

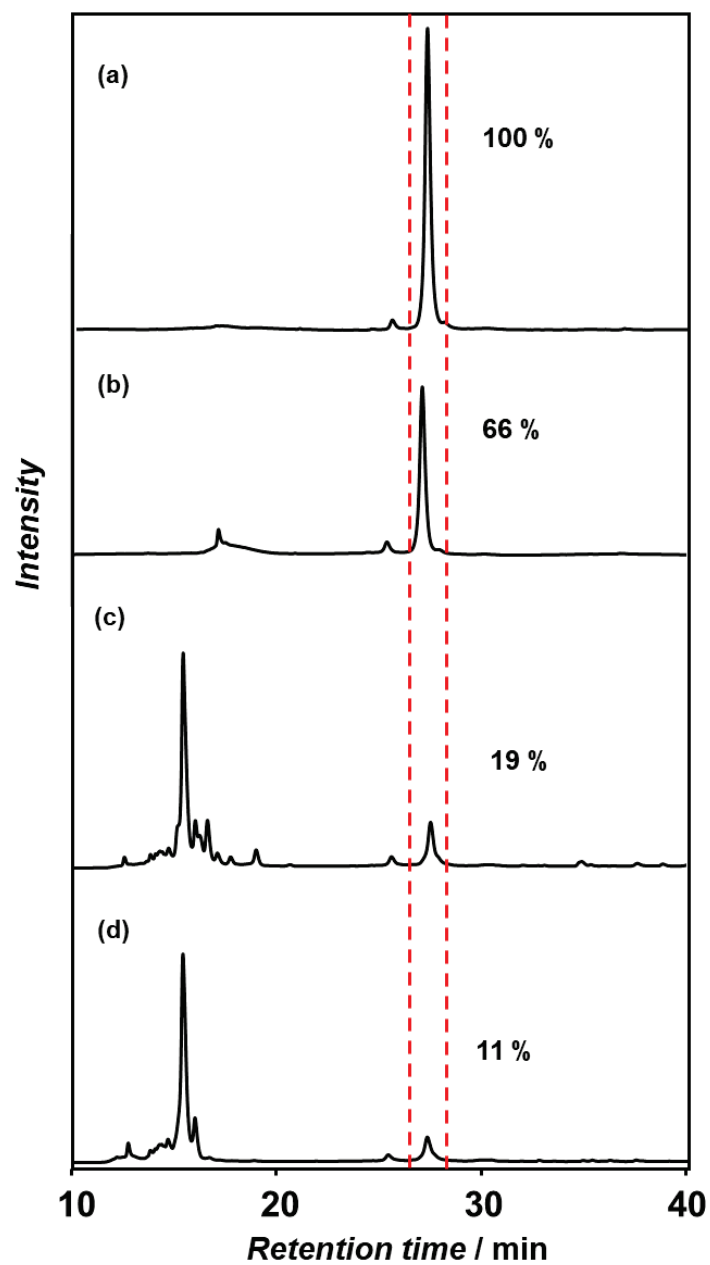


図 3-19. 逆相 HPLC チャート (a) DNA-SS- β -Annulus のみ、 (b) GSH 混合 2 時間後、
(c) 12 時間後、 (d) 18 時間後

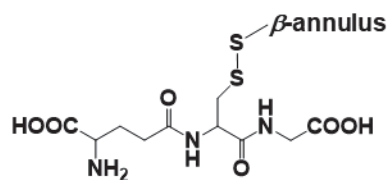
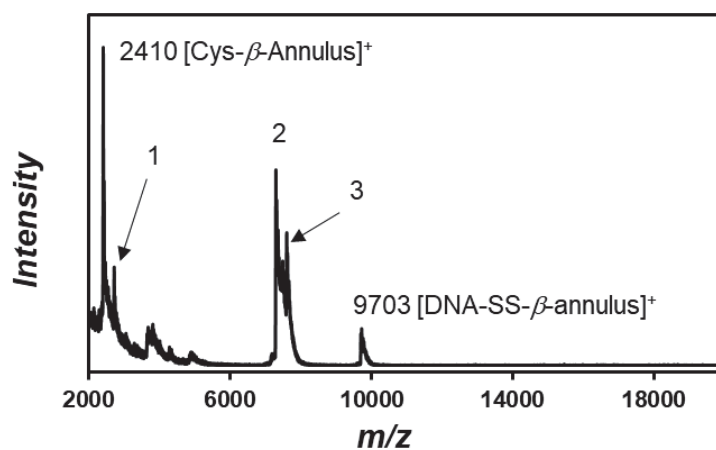
図 3-19 より、GSH 未添加の DNA-SS- β -Annulus のピーク面積を 100 %とした場合、DNA-SS- β -Annulus 由来のピークは GSH と混合後 2 時間で 66 %、12 時間で 19 %、混合

後 18 時間で 11 %にまで減少した。さらに GSH による切断によって新たに生成された化合物と思われるピークを 15 min 前後に確認した。

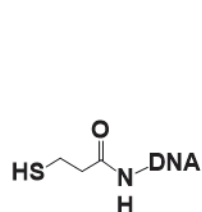
3-4-2 MALDI-TOF-MS 測定

【MALDI-TOF-MS】

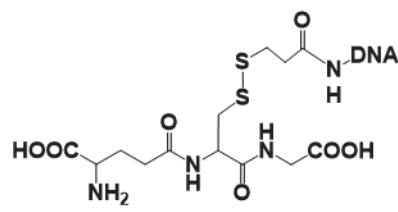
Matrix: 3-HPA, Mode: Linear positive



1 GSS- β -annulus (Mw: 2714)



2 DNA-SH (Mw: 7291)



3 DNA-SSG (Mw: 7596)

図 3-20. GSH 混合 18 時間後の DNA-SS- β -Annulus 溶液の MALDI-TOF-MS 結果 (matrix: 3-HPA)および生成物

GSH を用いたジスルフィド結合の切断には図 3-19 および 3-20 に示す反応が想定さ

れ、①-⑤の化合物が生成すると考えられる。

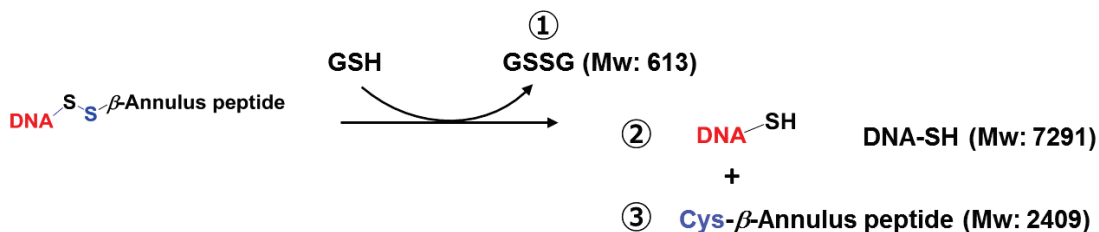


図 3-21. GSH 還元反応によって生成される化合物①-③

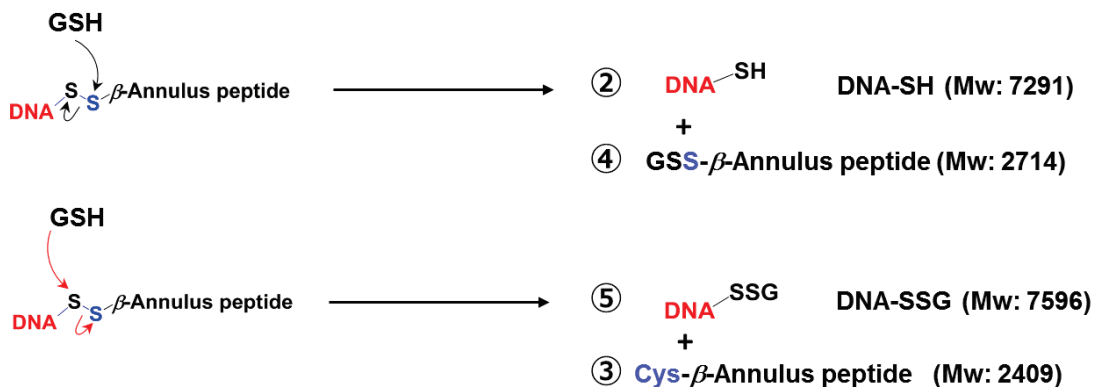


図 3-22. ジスルフィド交換反応によって生成される化合物①-③

図 3-20 の MALDI-TOF-MS 測定より、GSH との反応後溶液中に得られた複数のピークは、図 3-22 に示した②DNA-SH (Mw: 7291)、③Cys- β -Annulus (Mw: 2409)、④GSS- β -Annulus peptide (Mw: 2714)、⑤DNA-SSG (Mw: 7596)に由来するものと考えられる。よって、GSH を DNA-SS- β -Annulus へ添加した場合、ジスルフィド交換反応が起こると考えられる。

3-4-3 DLS 測定

【DLS 測定条件】

セル : ZEN2112-Low volume glass cuvette (12 μ L), 温度 : 25 $^{\circ}$ C

[DNA-SS- β -Annulus] = 50 μ M, [GSH] = 10 mM

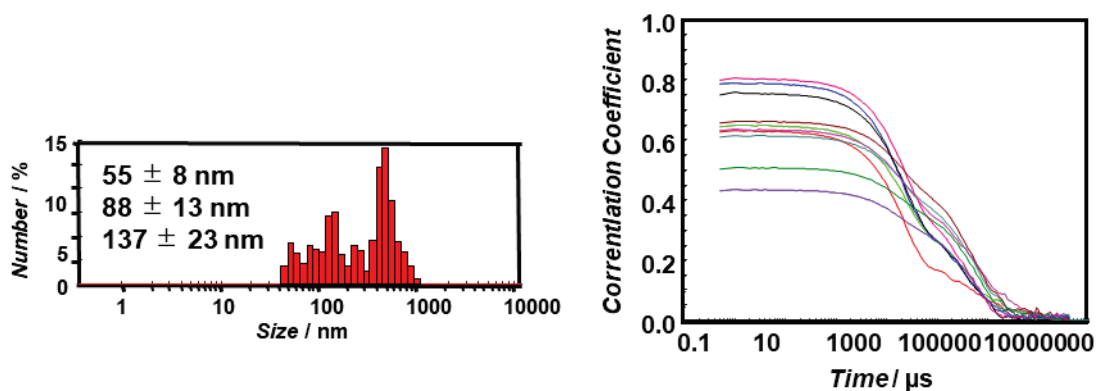


図 3-23. GSH 混合 18 時間後の DNA-SS- β -Annulus 溶液における DLS から得られた
(左)個数換算分布、(右)自己相関関数

図 3-23 より、50 nm 程度の人工ウイルスキャプシドと思われる粒径と、凝集体が確認された。DLS 測定より得られた各粒径がどのような形態であるかを確認するため、TEM 観察を行った。

3-4-4 TEM 観察

【TEM 観察条件】

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

加速電圧: 80 kV

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

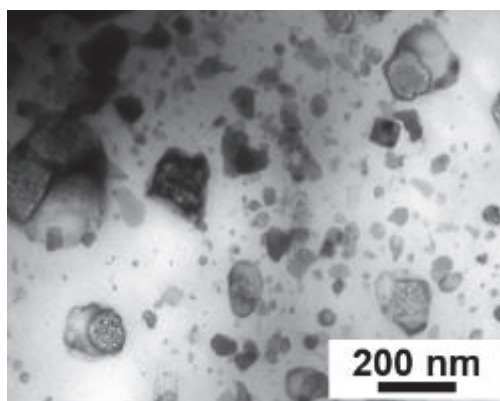


図 3-24. GSH 混合 18 時間後の DNA-SS- β -Annulus 溶液から得られた TEM 像

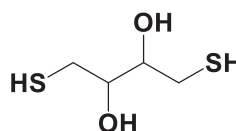
図 3-24 より、キャプシドが崩壊したような像と、ややいびつではあるが 50 nm 程度の球状構造体を確認した。図 3-23 の DLS 測定結果とほぼ一致した結果となったことから、10 mM GSH を使用した場合、人工ウイルスキャプシドからの DNA の放出が部分的であったことが考えられる。よって、反応時間を長くしても還元反応は不完全であったことが示された。

3-5 ジチオスレイトール(DTT)を用いたジスルフィド結合切断による DNA 放出

GSH と異なり、分子間のジスルフィド交換が起こらない還元剤 DTT を用いて、DNA-SS- β -Annulus のジスルフィド結合の切断について検討した。

【試薬】

(+/-)-Dithiothreitol 【Wako Mw: 154.25】



3-5-1 逆相 HPLC による分析

【試料調製】

粉末固体の DNA-SS- β -Annulus を 10mM phosphatebuffer (pH 7.1)に溶解して 100 μ M に調製した。また、秤量した DTT 粉末を 10mM phosphatebuffer (pH 7.1)に溶解して 50 mM に調製して、ストック溶液とした。別のエッペンドルフチューブに 50 mM DTT 溶液 16 μ L、100 μ M DNA-SS- β -Annulus 溶液 40 μ L、10 mM phosphate buffer (pH 7.1) 24 μ L を加えて 37°C でインキュベートを行った。終濃度は[DTT]=10 mM、[DNA-SS- β -Annulus]=50 μ M とした。インキュベート 2 時間後に逆相 HPLC で分析を行った。

【HPLC 分析条件】

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

移動相：(A) CH₃CN (B)0.1 M Na₄HCO₂ aq

移動相組成：B:100 % (0 min) – 100 % (3 min), B:100 % (3 min) – 0 % (73 min)

検出：UV-vis 260 nm

流量：1 mL/min

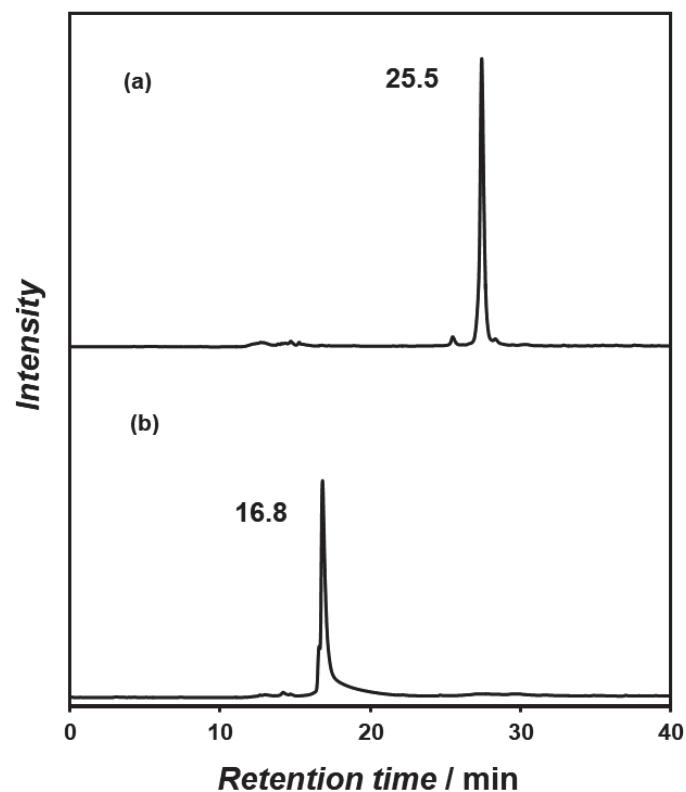


図 3-25. 逆相 HPLC チャート (a) DNA-SS- β -Annulus のみ (b) DTT 混合 2 時間後

図 3-25 より、DNA-SS- β -Annulus 由来のピークは DTT と混合後 2 時間で消失し、新たに生成物と思われるピーク(16.8 min)が確認された。一方、GSH による還元反応では、18 時間後でも DNA-SS- β -Annulus 由来のピークが確認された(図 3-19)。これは GSH の酸化還元電位(-0.24 V)が DTT(-0.33 V)と比べて低いためであると考えられる。

3-5-2 MALDI-TOF-MS 測定

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: 3-HPA, Mode: Linear positive

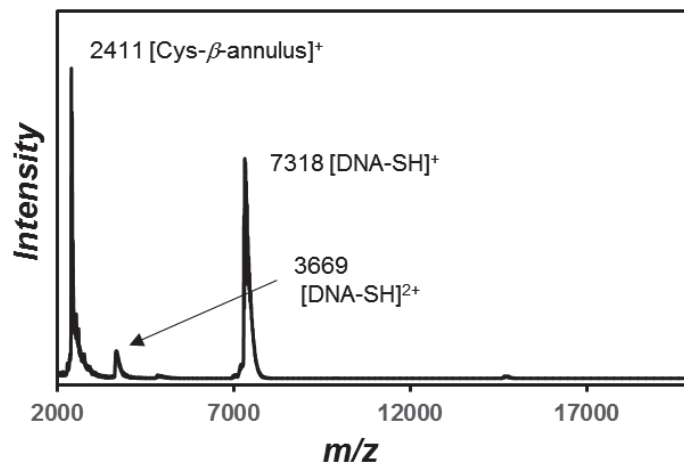


図 3-26. DTT 混合 2 時間後の DNA-SS-β-Annulus 溶液の MALDI-TOF-MS
(Matrix: 3-HPA)

DTT との混合溶液中において、DNA-SS-β-Annulus ペプチドと DTT の連続したチオール/ジスルフィド交換反応により、最終的に図 3-27 に示す環化 DTT と①、②の化合物が生成されると考えられる。

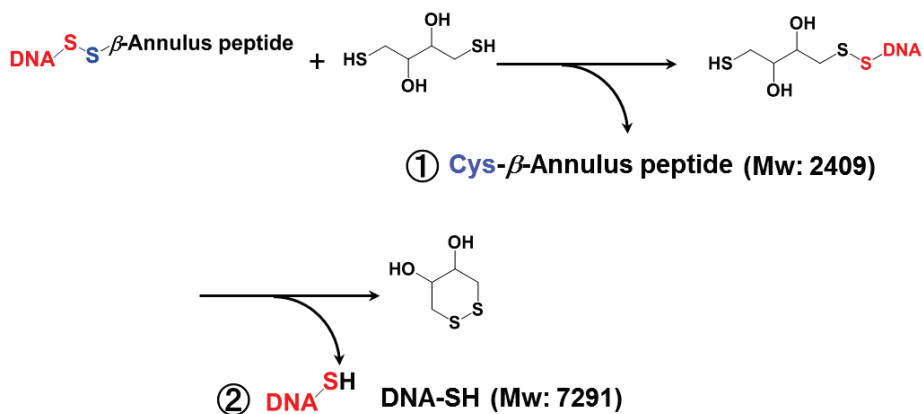


図 3-27. DTT とのチオール/ジスルフィド交換反応によって生成される化合物①②

図 3-26 の MALDI-TOF-MS 結果より、生成物①Cys-β-Annulus (Mw: 2409)と思われるピーク ($m/z = 2411$) と、生成物②DNA-SH (Mw: 7291)由来と考えられるピーク ($m/z = 7318$) が確認された。したがって、DTT を用いた還元反応によって短鎖 DNA を放出できたことが示された。

3-5-3 DLS 測定

【DLS 測定条件】

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

温度：25 $^{\circ}$ C

[DNA-SS- β -Annulus] = 50 μ M, [DTT] = 10 mM

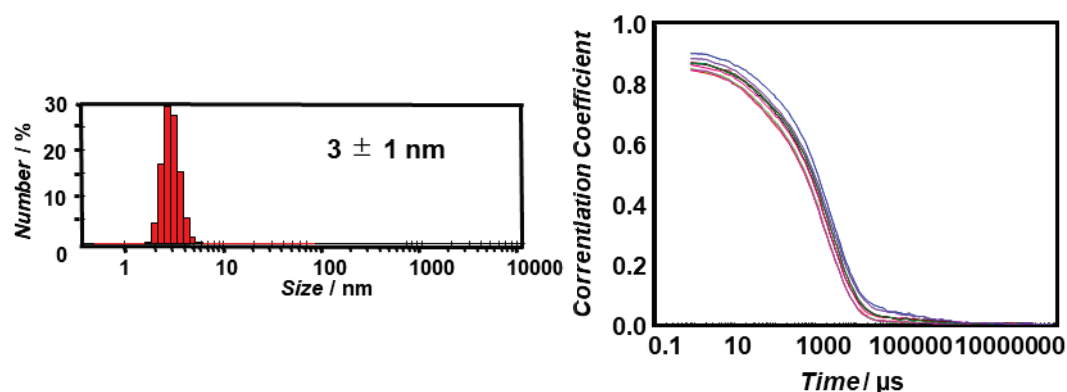


図 3-28. DTT 混合 2 時間後の DNA-SS- β -Annulus 溶液における DLS から得られた (左)個数換算分布、(右)自己相関関数

図 3-28 より、小さな粒径のみを確認した。DNA が放出されたことで人工ウイルスキャプシドの集合体が崩壊した可能性がある。そこで、DNA を修飾する前段階である Cys- β -Annulus ペプチドについて DLS 測定を行った。

【試料調製】

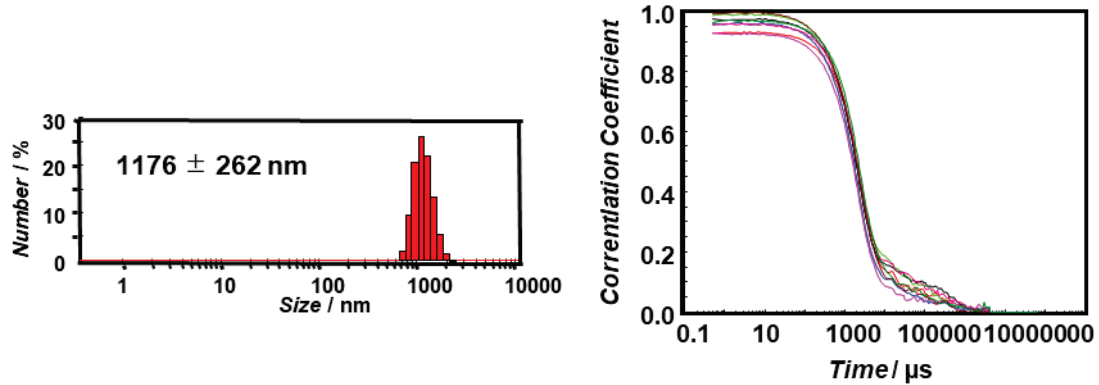
粉末固体の Cys- β -Annulus ペプチドを 10mM phosphatebuffer (pH 7.1)バッファーに溶解して 50 μ M に調製した。また、別のエッペンドルフチューブに 50 mM DTT 溶液 16 μ L、100 μ M Cys- β -Annulus 溶液 40 μ L、10 mM phosphate buffer (pH 7.1) 24 μ L を加えて 37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートを行った。終濃度は[DTT] = 10 mM、[Cys- β -Annulus] = 50 μ M とした。

【DLS 測定条件】

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

温度：25 $^{\circ}$ C

(1) [Cys- β -Annulus] = 50 μ M



(2) [Cys- β -Annulus] = 50 μ M, [DTT] = 10 mM

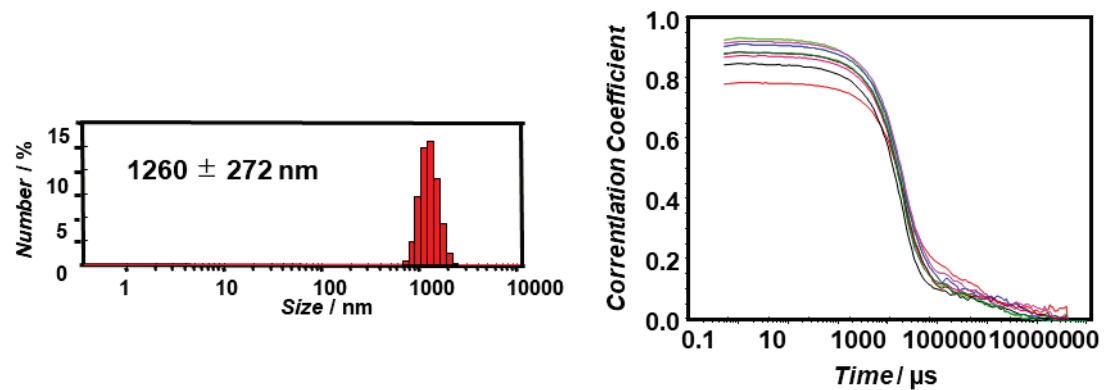


図 3-29. Cys- β -Annulus 溶液における DLS から得られた(左)個数換算分布、(右)自己相関関数; (1) Cys- β -Annulus 溶液、(2)DTT 混合 2 時間後の Cys- β -Annulus 溶液

図 3-29 より、DNA 未修飾の Cys- β -Annulus ペプチドでは凝集体と思われる粒径分布を確認した。つまり、DNA を含まない Cys- β -Annulus ペプチドは球状構造体を形成しない可能性が示唆された。図 3-28 の DLS 測定より得られた DTT 混合 2 時間後の DNA-SS- β -Annulus の粒径がどのような形態であるかを確認するため、TEM 観察を行った。

3-5-4 TEM 観察

【TEM】

【TEM 観察条件】

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

加速電圧: 80 kV

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

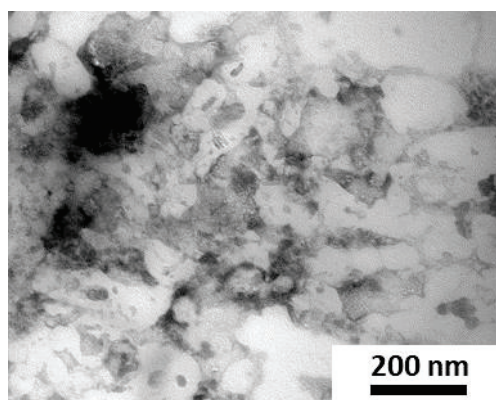


図 3-30. DTT 混合 2 時間後の DNA-SS- β -Annulus 溶液から得られた TEM 像

図 3-30 より、球状構造体が崩壊したような像が確認された。これらの結果より、人工ウイルスキャプシドに内包された短鎖 DNA は、ジスルフィド結合の還元的開裂により放出され、この際にキャプシドの破壊を伴うことが示唆された。

3-6 まとめ¹⁸⁾

Fmoc 固相合成法を利用して N 末端に Cys を有する Cys- β -Annulus ペプチドの合成に成功した。さらに、Cys- β -Annulus ペプチドに短鎖 DNA が連結された DNA-SS- β -Annulus ペプチドの合成に成功した。DNA-SS- β -Annulus ペプチド溶液の DLS 測定、TEM 観察により、リン酸バッファー中で人工ウイルスキャプシドと思われる 50 nm 程度の球状構造体を形成することが示された。短鎖 DNA を導入していない Cys- β -Annulus は球状に集合しないことが確認されたことから、短鎖 DNA は人工ウイルスキャプシドに内包されていることが示唆された。

GSH および DTT を用いたジスルフィド結合切断による DNA 放出を、逆相 HPLC、DLS 測定および TEM 観察によって検討したところ、短鎖 DNA の放出および、人工ウイルスキャプシドの破壊が示された。これらのことから、ジスルフィド結合を介して DNA を内包した人工ウイルスキャプシドは、siRNA やアンチセンス DNA といった短鎖核酸医薬のデリバリーシステムにおける、核酸の放出制御に利用できる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) (a) D. Luo, W. M. Saltzman, *Nat. Biotechnol.*, **18**, 33 (2000); (b) R. L. Juliano, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 6518 (2016)

- 2) K. Mizumoto, Y. Kaziro, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **34**, 1 (1987)
- 3) Y. Ma, R. J. M. Nolte, J. J. L. M. Cornelissen, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 811 (2012)
- 4) L. Chen, A. J. Zurita, P. U. Ardel, R. J. Giordano, W. Arap, R. Pasqualini, *Chem. Biol.*, **11**, 1081 (2004)
- 5) G. Destito, R. Yeh, C. S. Rae, M. G. Finn, M. Manchester, *Chem. Biol.*, **14**, 1152 (2007)
- 6) A. M. Wen, N. F. Steinmetz, *Chem. Soc. Rev.*, **45**, 4074 (2016)
- 7) J. Jo, Y. Tabata, *Drug Delivery System*, **32**, 50 (2017)
- 8) (a) H. Mok, T. G. Park, *Macromol. Biosci.*, **9**, 731 (2009); (b) B. Ballarin-Gonzalez, K. A. Howard, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 1717 (2012); (c) S. Fumoto, *Yakugaku Zasshi*, **129**, 1055 (2009)
- 9) K. Matsuura, K. Watanabe, T. Matsuzaki, K. Sakurai, N. Kimizuka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 9662 (2010)
- 10) K. Matsuura, K. Watanabe, Y. Matsushita, N. Kimizuka, *Polym. J.*, **45**, 529 (2013)
- 11) (a) W. J. Wedemeyer, E. Welker, M. Narayan, H. A. Scheraga, *Biochemistry*, **39**, 4207 (2000); (b) K. J. Woycechowsky, R. T. Raines, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**, 533 (2000); (c) H. Kadokura, F. Katzen, J. Beckwith, *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 111 (2003)
- 12) S. Matsumoto, R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Miyata, A. Ishii, M. Oba, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, *Biomacromolecules*, **10**, 119(2009)
- 13) G. T. Zugates, D. G. Anderson, S. R. Little, I. E. B. Lawhorn, R. Langer, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 12726 (2006)
- 14) L. Chen, S. Fang, X. Xiao, B. Zheng, M. Zhao, *Anal. Chem.*, **88**, 11306 (2016)
- 15) 中山広樹, 新版 バイオ実験イラストレイテッド 本当にふえるPCR, 秀潤社 (2010)
- 16) M. Kuron, A. Arnold, *Eur. Phys. J. E.*, **38**, 20 (2015)
- 17) Z. Yang, Y. Li, J. Gao, Z. Cao, Q. Jiang, J. Liu, *Colloids. Surf. B. Biointerfaces.*, **153**, 111 (2017)
- 18) Y. Nakamura, H. Inaba, K. Matsuura, *Chem. Lett.*, **48**, 544 (2019)

第4章 人工ウイルスキャプシドへの mRNA の内包

4-1 序

遺伝情報は、核内で DNA から mRNA へ転写された後、核外輸送され、細胞質においてタンパク質へと翻訳される。近年、mRNA からの翻訳過程において、高度な制御機構が働いている事が明らかになってきており、細胞の癌化や、免疫応答によって分泌されるサイトカインなどの発現は、細胞外シグナルに応答した mRNA によって調節されていると考えられている¹⁾。そこで mRNA による目的タンパク質の効果的な発現を行い、がん治療などに応用する研究が注目されている。しかし、RNA はリボースの 2 位がヒドロキシ基であるため DNA よりも分解されやすく、さらに負電荷を帯びた高分子であるため細胞内への取り込み効率が低い²⁾。そのため、mRNA をナノ粒子などで保護し、細胞内へ送達する手法が試みられている。例えば Pascolo らは、魚の精子由来アルギニンリッチ配列を持つ天然ペプチドのプロタミンを用いて、静電相互作用により mRNA との複合体を作製し、約 300 nm 程度の強固に結合したナノ粒子を形成したことを報告している³⁾。

一方、真核生物における mRNA は、合成過程において特徴的な塩基配列によって修飾を受ける事が分かっている。まず、DNA から RNA ポリメラーゼIIによる転写反応によって前駆体 mRNA が合成される際、ほぼ同時にプロセシングが起り、成熟 mRNA へと迅速で効率的に合成される⁴⁾。このプロセシング反応は、5'末端キャッピング、遺伝情報をもたないイントロンのスプライシング、3'末端 Poly A テール付加といった一連の転写後修飾が行われる過程である。真核生物の mRNA における 5'末端キャッピングと 3'末端 Poly A テール付加は普遍的にみられる修飾であり、これらはエキソヌクレアーゼによる分解から保護されると考えられている (図 4-1)^{2, 5)}。5'末端キャッピング部位は、三リン酸結合を介してグアノシンが 5'末端の RNA の水酸基と 5'-5'結合している。一方、Poly A テールは 3'末端に数百ものアデニンが付加された部位であり、翻訳開始と mRNA 分解の調節を担うと考えられているが、具体的な機能は解明されていない⁵⁾。しかし Walter らは、mRNA の蛍光一分子観察の研究において、蛍光プローブを mRNA の翻訳部位ではなく Poly A テール部位へ修飾してもタンパク質への翻訳効率の低下が見られなかったと報告しており、Poly A テールへの修飾は、mRNA の翻訳機能を損なわない可能性が示唆されている⁶⁾。

本章では、数百塩基配列になる Poly A テールの一部をハイブリダイゼーションの相補鎖として活用することで、人工ウイルスキャプシドに mRNA を内包させることを検討した。まず、 β -Annulus peptide の N 末端側に dT₂₀ を修飾した dT₂₀-SS- β -Annulus ペプチドを作製し、内部に dT₂₀ が内包されたキャプシドの構築を検討した(図 4-2)。その後、赤色蛍光タンパク質 (m-Cherry) をコードした Poly A テール付加 mRNA と dT₂₀-SS- β -Annulus の複合体形成による内包化を検討した。

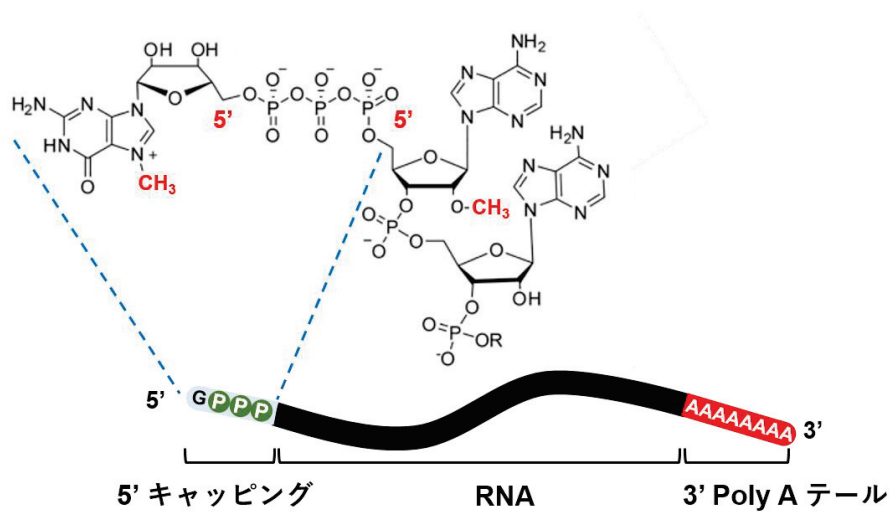


図 4-1. 真核生物 mRNA の構造

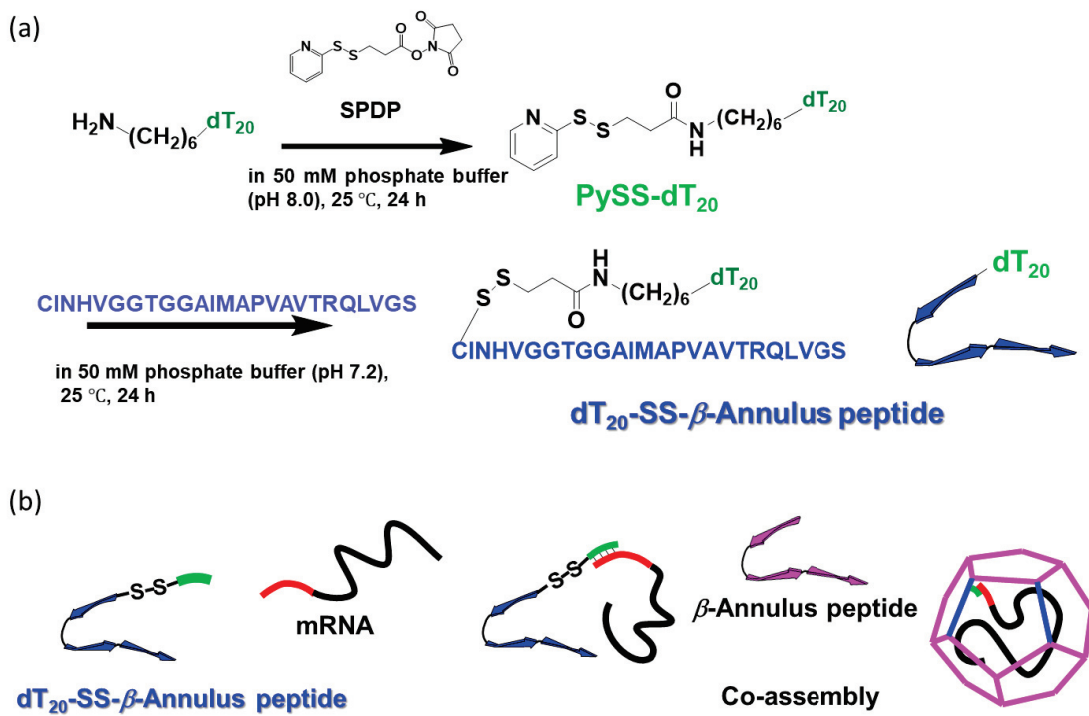


図 4-2. mRNA を内包した人工ウイルスキャプシドの創製

(a) dT₂₀-SS-β-Annulus ペプチドの合成、 (b) mRNA 内包人工ウイルスキャプシドの創製

4-2 dT₂₀-SS-β-Annulus peptide の合成

dT₂₀-β-Annulus peptide の合成前段階として、5'末端アミノ化 DNA(dT₂₀-(CH₂)₆-NH₂) へ架橋剤 SPDP を縮合し、PySS-dT₂₀ の合成を行った⁷⁾。

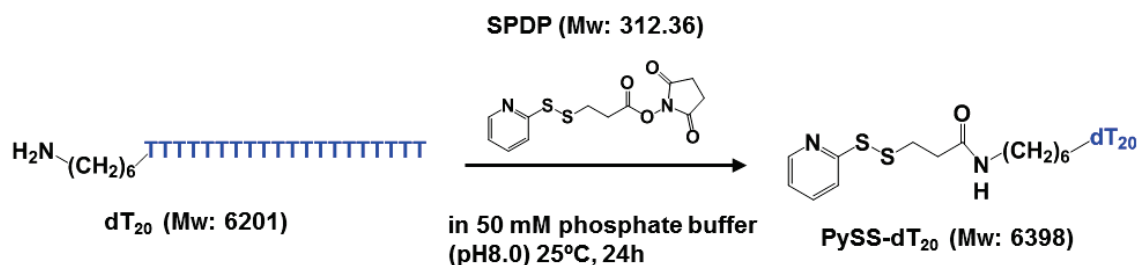


図 4-3. PySS-dT₂₀ 合成スキーム

【試薬】

5'amino-dT₂₀ (NH₂-(CH₂)₆-5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') 【ベックス MW: 6201】

N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) 【東京化成 Mw: 312.36】

Cys-β-Annulus peptide: 合成方法は第 3 章に示す

【CINHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS Mw: 2409】

【実験操作】

5'amino-dT₂₀ (230.6 nmol)に 230.6 μL のミリ Q 水を加えて 46 μL ずつ 5 本に分注し、凍結乾燥をしてストックとした。このうちの 1 本(46 nmol)に 50 mM リン酸バッファー (pH 8.0)を加えて 0.2 mM とした。次に SPDP を 0.0019 g 秤量し、アセトニトリル 608 μL に溶解して 10 mM 溶液とした。これらをモル比で dT₂₀ : SPDP = 1 : 20 となるように混合し、25°C で 1 時間インキュベートを行った。その後、大過剰入った SPDP を除くため透析膜 Spectra/por7 (SPECTRUM, cutoff Mw1000)を用いてイオン交換水による透析を一晚行った。この間透析外液の交換を 1 回行った。透析後回収したサンプルの一部について逆相 HPLC 分析を行い、残りは凍結乾燥を行った。同様に SPDP、5'amino-dT₂₀(dT₂₀)についても逆相 HPLC 分析を行った。

【逆相 HPLC】

カラム : Inertsil WP300 C18 (5μm, 4.6×250 mm)

移動相 : (A) CH₃CN / (B) 0.1 M NH₄HCO₂ aq

移動相組成 : B:100 % (0 min) → 0 % (95 min)

検出 : UV-vis 260 nm

流量 : 1 mL/min

試料 : (1) 5' amino-dT₂₀ (dT₂₀), (2) SPDP
(3) 混合後反応液(PySS-dT₂₀), (4) PySS-dT₂₀ 溶液 透析内液

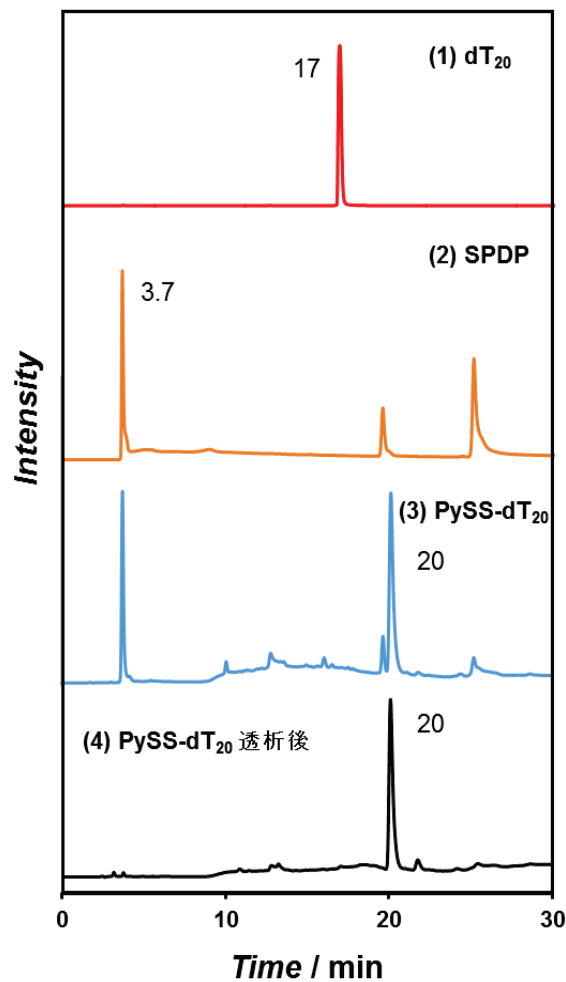


図 4-4. 逆相 HPLC チャートまとめ

図 4-4 より、(3)の混合溶液において dT₂₀ のみのピークが消失していることから、PySS-dT₂₀ が合成された事を確認した。また、(4)透析後のチャートより SPDP 由来のピークは消失したため、SPDP は透析によって除去された事を確認した。

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: 3-HPA, Mode: Linear positive

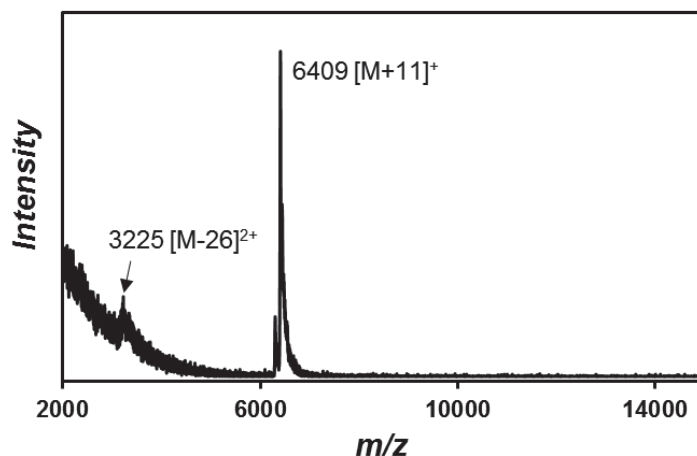


図 4-5. 透析後の PySS-dT₂₀ の MALDI-TOF-MS (Matrix: 3-HPA)

図 4-5 より、透析後のサンプルの MALDI-TOF-MS 測定を行った結果、 $m/z = 6409$ に PySS-dT₂₀ (Mw: 6398) に由来すると考えられるメインピークが得られた。よって、PySS-dT₂₀ が合成されたと考えた。次に UV-vis スペクトル測定を行い、PySS-dT₂₀ の濃度決定を行った。

【UV-vis スペクトル】

試料： 5 倍希釈 PySS-dT₂₀ 水溶液 200 μ l

バンド幅： 1.5 nm

測定範囲： 200-350 nm

レスポンス: Fast

温度： 25°C

走査速度: 400 nm / min

使用セル： 光路長 1 mm 石英セル

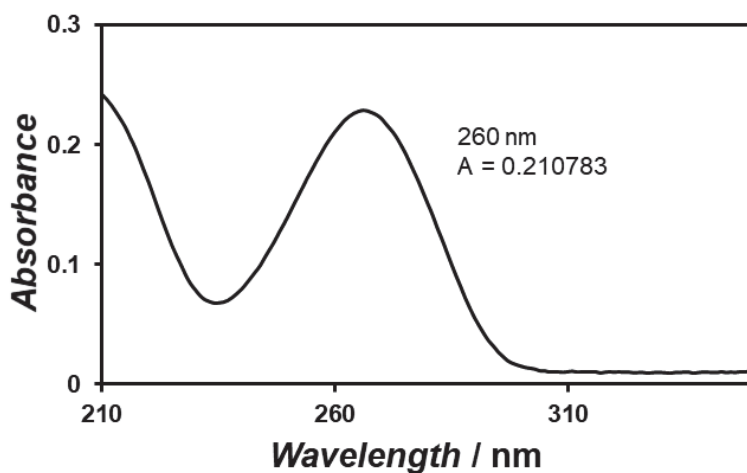


図 4-6. 5 倍希釈 PySS-dT₂₀ 水溶液の UV-vis スペクトル

260 nm における吸光度 $A = 0.210783$, セル長 $l = 0.1$ cm, DNA のモル吸光係数 $\epsilon = 9300 \times 20 = 186,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ より⁸⁾, DNA 濃度は、

$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot l} = \frac{0.210783}{20 \times 9300 \times 0.1} \times 5 = 5.67 \times 10^{-5} \text{ M}$$
$$5.67 \times 10^{-5} \text{ M} \times 770 \times 10^{-6} \text{ uL} = 43.6 \text{ nmol}$$

PySS-dT₂₀ の収率は、

$$\frac{43.6 \text{ nmol}}{46 \text{ nmol}} \times 100 = 94.8 \%$$

収率: 94.8 %

収量: 43.6 nmol

PySS- dT₂₀ の合成を確認できたので、次に、Cys- β -Annulus peptide の付加を行った。PySS-dT₂₀ (43.6 nmol) に 50 mM phosphate buffer (pH 7.2) に溶解し 0.1 mM に調製した。別のエッペンドルフチューブに秤量した粗 Cys- β -Annulus ペプチド 1.7 mg (706 nmol) を同様に 50 mM phosphate buffer (pH 7.2) に溶解して 2 mM に調製した。その後、モル比で PySS- dT₂₀ : Cys- β -Annulus 粗 peptide = 1 : 20 となるように混合し、25°C の恒温槽で 24 時間インキュベートを行った。その後、逆相 HPLC による合成反応液の分析を行った。

【逆相 HPLC】

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

移動相 : (A) CH₃CN / (B) 0.1 M NH₄HCO₂ aq

移動相組成 : B:90 % (0 min) \rightarrow 0 % (95 min)

検出 : 260 nm

流量 : 10 mL/min

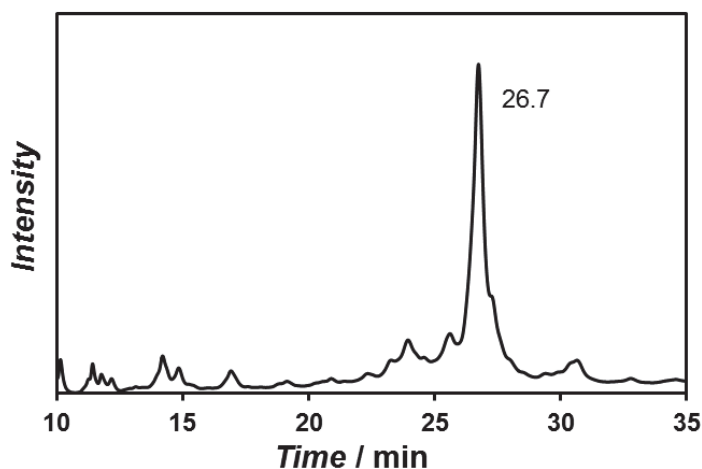


図 4-7. HPLC チャート

図 4-7 より、新たに検出された 26.7 分のピークを分取後、遠心エバポレーターで濃縮の後、透析膜 Spectra/por7 (cutoff Mw 1000 : SPECTRUM 社製)を用いて透析を 20 時間行った。

【MALDI-TOF-MS】

Matrix: 3-HPA, Mode: Linear positive

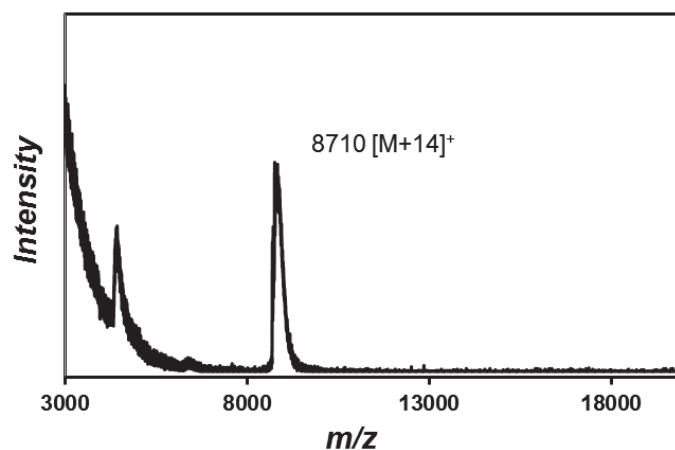


図 4-8. HPLC 26.7 min 分取ピークの MALDI-TOF-MS 結果

図 4-8 より、目的物(Mw: 8696)由来と考えられるピーク ($m/z = 8710$)が確認された。

【UV-vis スペクトル】

試料： 5 倍希釈 dT₂₀-SS-β-Annulus 水溶液 200 μL

測定範囲： 200-350 nm

温度： 25°C

使用セル： 光路長 1 mm 石英セル

バンド幅: 1.5 nm

レスポンス: Fast

走査速度: 400 nm / min

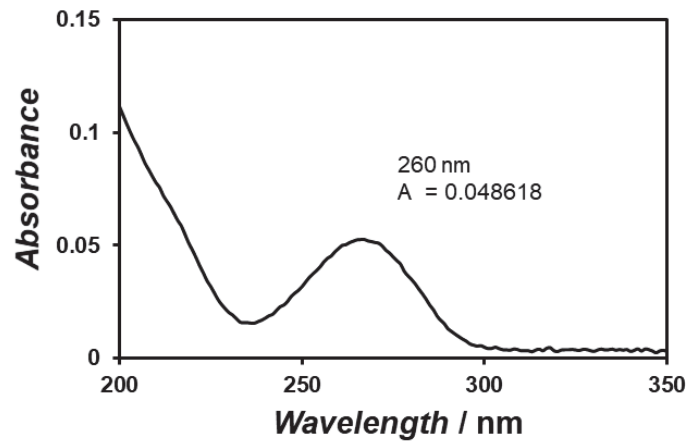


図 4-9. 5 倍希釈 dT₂₀-SS-β-Annulus ペプチド水溶液の UV-vis スペクトル

図 4-9 より、260 nm における吸光度 $A = 0.0486181$ 、セル長 $l = 0.1$ cm, DNA のモル吸光係数 $\epsilon = 9300 \times 20 = 186,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ より⁸⁾、DNA 濃度は、

$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot l} = \frac{0.0486181}{20 \times 9300 \times 0.1} \times 5 = 1.31 \times 10^{-5} \text{ M}$$

収量は、

$$1.31 \times 10^{-5} \times 962 \times 10^{-6} = 12.6 \times 10^{-9} \text{ mol}$$

収率は、

$$\frac{12.6 \text{ nmol}}{46 \text{ nmol}} \times 100 = 27.4 \%$$

収率 : 27.4 %

収量 : 12.6 nmol

4-3 dT₂₀-SS-β-Annulus peptide の自己集合挙動

PBS バッファー (pH 7.4) 中において、dT₂₀-SS-β-Annulus ペプチドがどのような集合体を形成するのか、DLS 測定および TEM 観察によって評価した。

4-3-1 DLS 測定

【試料調製】

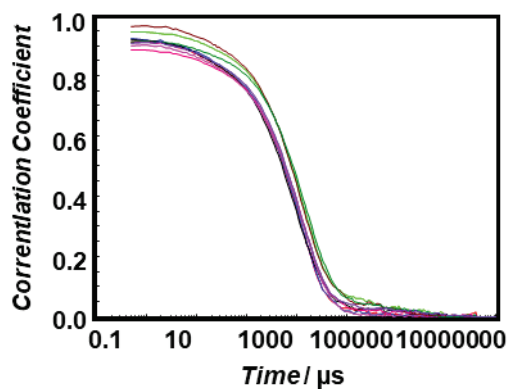
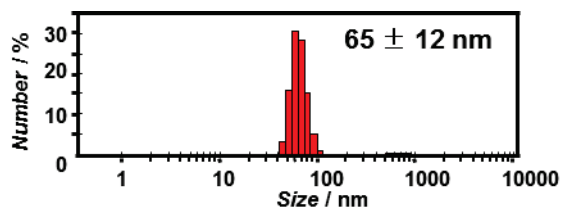
粉末個体の dT₂₀-SS-β-Annulus を 125, 100, 50, 25, 10, 5, 1 μM の濃度に PBS で希釈した。それぞれ測定前に 3 分間超音波処理を行い、DLS 測定を行った。

【測定条件】

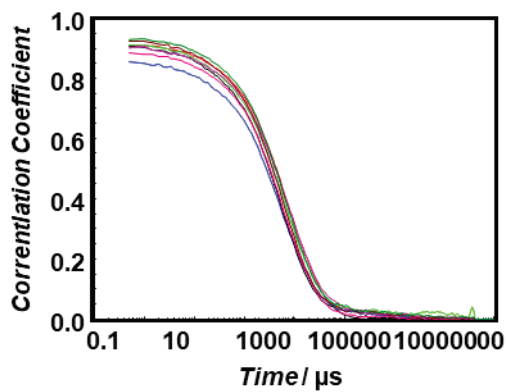
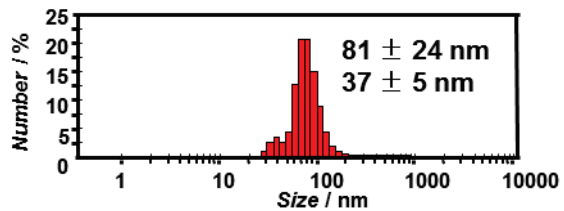
セル：ZEN2112-Low volume glass cuvette (12 μ L)

温度：25°C

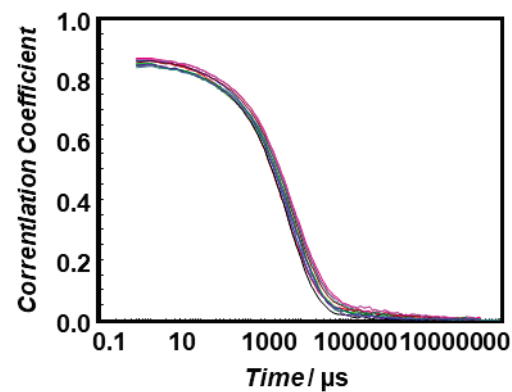
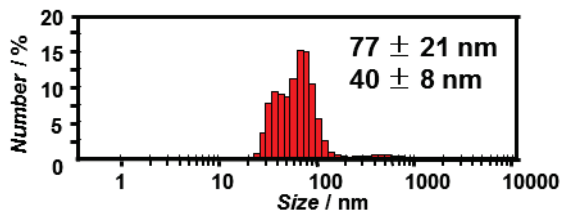
[dT₂₀-SS- β -Annulus] = 125 μ M



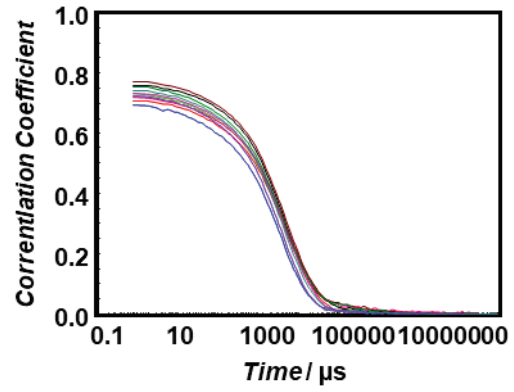
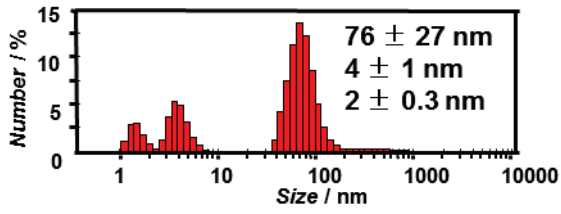
[dT₂₀-SS- β -Annulus] = 100 μ M



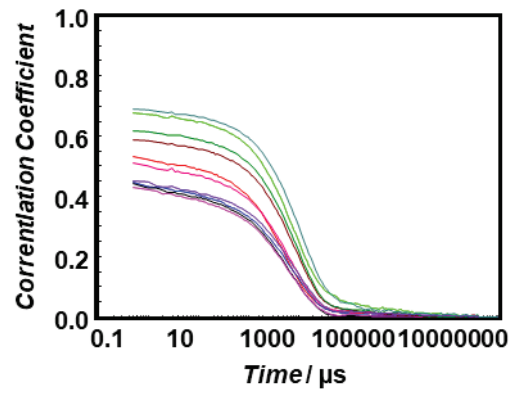
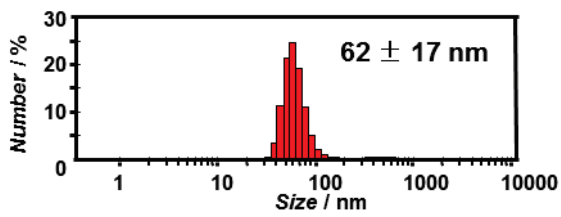
[dT₂₀-SS- β -Annulus] = 50 μ M



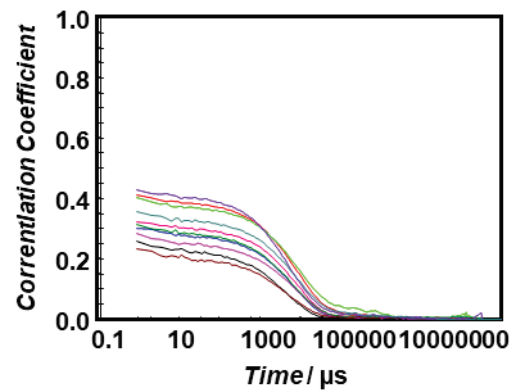
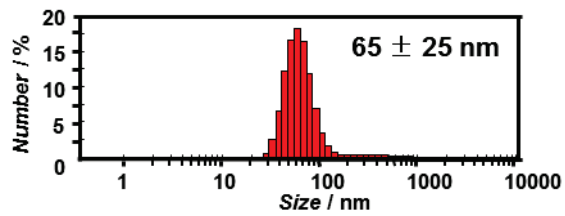
[dT₂₀-SS-β-Annulus] = 25 μM



[dT₂₀-SS-β-Annulus] = 10 μM



[dT₂₀-SS-β-Annulus] = 5 μM



[dT₂₀-SS-β-Annulus] = 1 μM

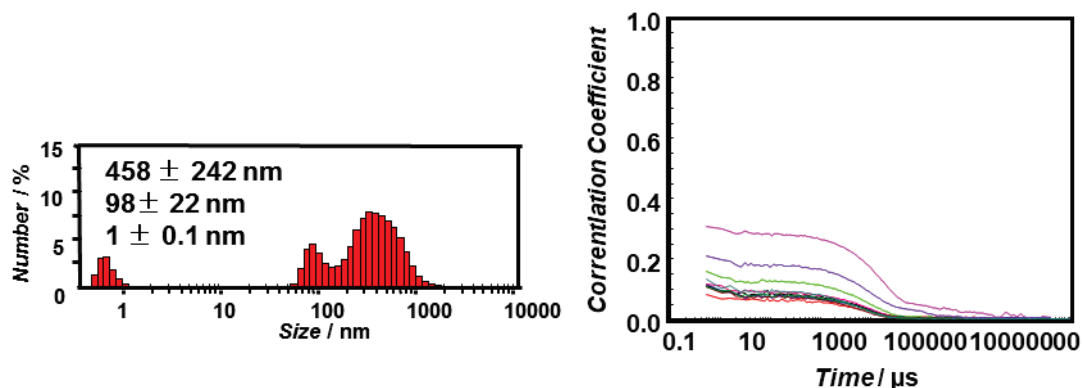


図 4-10. dT₂₀-SS-β-Annulus PBS (pH 7.4) 溶液中での各濃度における DLS 測定から得られた(左)個数換算分布、(右)自己相関関数

図 4-10 の DLS 測定結果から、キャプシド粒径の濃度依存性をまとめると次のようになる。

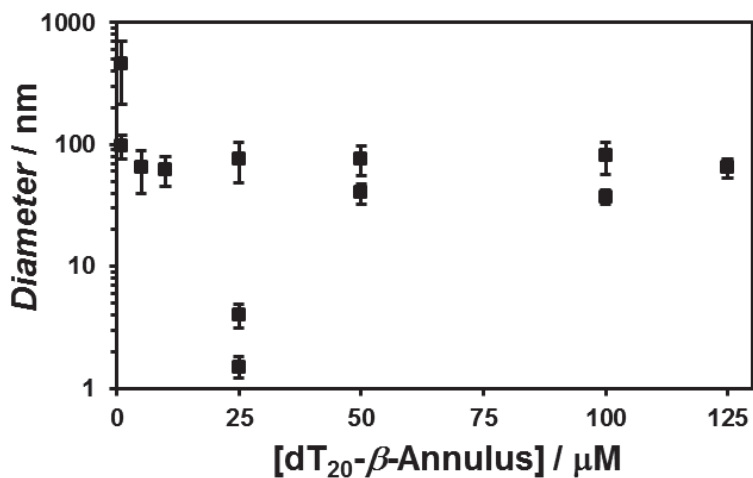


図 4-11. dT₂₀-SS-β-Annulus PBS (pH 7.4) 溶液の個数換算分布の濃度依存性

図 4-10 および 11 に dT₂₀-SS-β-Annulus 水溶液の DLS 測定から得られた個数換算分布の濃度依存性を示す。5-125 μM の濃度範囲で 50 nm 程度の粒径を示すことがわかった。これは第 3 章で示した DNA-SS-β-Annulus ペプチドの自己集合挙動とほぼ同じ結果となった。

4-3-2 TEM 観察

TEM 観察により、dT₂₀-SS- β -Annulus ペプチドの PBS buffer 中での形態を評価した。

【試料調製】

dT₂₀-SS- β -Annulus ペプチドの粉末固体に PBS buffer (pH 7.4) を加えて 50 μ M に調製した。

【測定条件】

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

加速電圧: 80 kV

染色: 2% Na₃(PW₁₂O₄₀)(H₂O)_n 水溶液

【実験操作】

各 dT₂₀-SS- β -Annulus ペプチド溶液を Grid に 5 μ L 滴下し、1 分間静置した。その後、ろ紙を用いて液滴を取り除き、2% Na₃(PW₁₂O₄₀)(H₂O)_n 水溶液を 5 μ L 滴下し、1 分間静置後、液滴を取り除いた。その後 1 晩減圧乾燥を行った。

[dT₂₀-SS- β -Annulus] = 50 μ M, pH 7.4

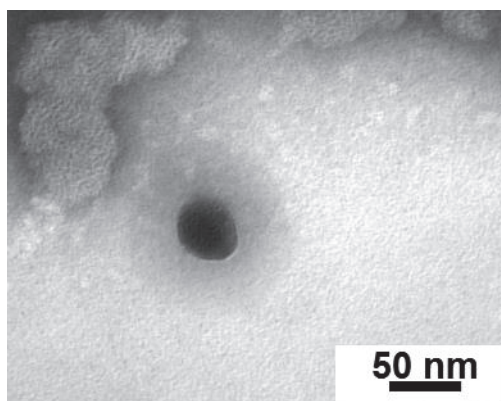


図 4-12. 50 μ M dT₂₀-SS- β -Annulus ペプチド PBS buffer (pH 7.4) 溶液から得られた TEM 像

図 4-12 より、50 μ M dT₂₀-SS- β -Annulus ペプチド水溶液において、50 nm 程度の球状構造を確認した。第 3 章で述べた短鎖 DNA を修飾した DNA-SS- β -Annulus と同様、多価アニオン性である DNA が人工ウイルスキャプシドの内部カチオン性によって凝縮され、安定的に球状構造体を形成していると考えられる⁹⁾。

4-4 dT₂₀-SS- β -Annulus peptide と RNA のハイブリダイゼーション

4-4-1 RNA の濃度決定

dT₂₀-SS- β -Annulus とのハイブリダイゼーションの前段階として、使用する Poly A および mCherry mRNA の濃度決定を行った。

【試薬】

Poly A 【Sigma-Aldrich】

mCherry Fluorescent Protein coding mRNA 【~1kb, 1mg/mL, OZB】

【mCherry mRNA】

mCherry は、3つの α -ヘリックスと13の β -シートによって構成された β -バレル構造を持つ、単量体の蛍光タンパク質である¹⁰⁾。サンゴの一種であるイソギンチャクモドキ(*Discosoma sp*)由来の4量体構造の赤色蛍光タンパク質(DsRed)を元として、部位特異的変異誘発を用いて作製された変異体の一種であり、蛍光が安定でレーザー光照射下でも退色しにくい特徴を持つ。今回使用した mCherry mRNA は mCherry をコードした、3'末端側に Poly A テールを有する修飾 mRNA である。

[励起波長 587 nm、蛍光波長 610 nm]



図 4-13. mCherry の β -バレル構造

mCherry mRNA シーケンス (GenBank 参照) 911 塩基

```
AUGGUGAGCAAGGGCGAGGAGGAUAACAUGGCCAUCAUCAAGGAGUUCAUGCGC
UUCAAGGUGCACAUGGAGGGCUCCGUGAACGGCCACGAGUUCGAGAUCGAGGGC
GAGGGCGAGGGCCGCCCUACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCUGAAGGUGACC
AAGGGUGGCCCCUGCCUUCGCCUGGGACAUCUGUCCCCUCAGUUCAUGUACG
GCUCCAAGGCCUACGUGAAGCACCCCGCCGACAUCCCCGACUACUUGAAGCUGUC
CUUCCCCGAGGGCUUCAAGUGGGAGCGCGUGAUGAACUUCGAGGACGGCGGCGU
GGUGACCGUGACCCAGGACUCCUCCUGCAGGACGGCGAGUUCAUCUACAAGGU
GAAGCUGCGCGGCACCAACUUCCCCUCCGACGGCCCCGUAAUGCAGAAGAAGACC
AUGGGCUGGGAGGCCUCCUCCGAGCGGAUGUACCCCGAGGACGGCGCCCUGAAG
GGCGAGAUCAAGCAGAGGCUGAAGCUGAAGGACGGCGGCCACUACGACGCUGAG
GUCAAGACCACCUACAAGGCCAAGAAGCCCGUGCAGCUGCCCGGCGCCUACAACG
UCAACAUCAAGUUGGACAUCACCUCCACAACGAGGACUACACCAUCGUGGAAC
AGUACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACUCCACCGGCGGCAUGGACGAGCUGUACA
```

AGUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【Poly A の塩基換算濃度の決定】

Poly A の濃度が不明だったため、UV-vis 測定によって濃度決定を行った。また、配列長も不明であるため、塩基あたりでの濃度とした。

【試料調製】

エッペンドルフチューブに 1 mg の Poly A 粉末を秤量して取り、ミリ Q 水 1 mL に溶解した。さらにミリ Q 水で 50 倍希釈を行い、1cm キュベットに試料を取り、UV-vis 測定を行った。

【UV-vis スペクトル】

試料 : 50 倍希釈 Poly A 水溶液 200 μ L

測定範囲 : 200-350 nm

温度 : 25°C

バンド幅: 1.5 nm

レスポンス: Fast

走査速度: 400 nm / min

使用セル : 光路長 1 cm 石英セル

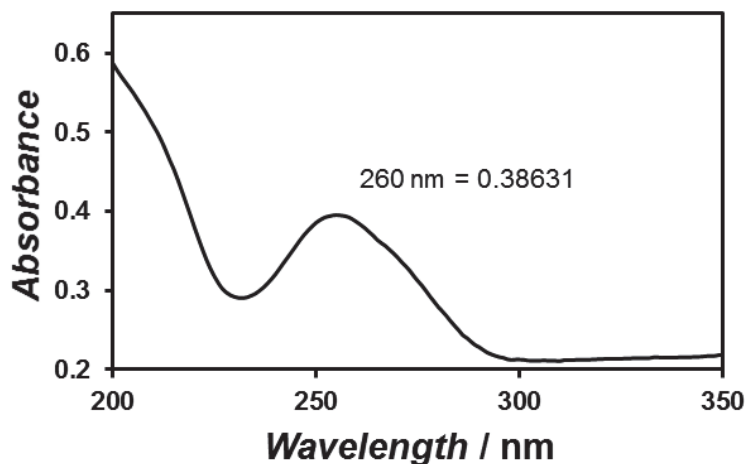


図 4-14. 50 倍希釈 Poly A 水溶液の UV-vis スペクトル

260 nm における吸光度 $A = 0.38631$ の時、Oligocalc¹¹⁾より、 $25 \mu\text{M} = 12.2 \mu\text{g/mL}$ と算出した。2 mM Poly A PBS 溶液を作製し、ストックとした。

【mCherry mRNA の分子換算濃度および塩基換算濃度の決定】

RNA の平均分子量 340¹²⁾、OZB 社より購入した mCherry mRNA の鎖長は 1kb 未満であるため、鎖長を 1000 として、分子量 $340 \times 1000 = 340,000$
購入時の mCherry 濃度は、1 mg/mL であるため、分子換算濃度は、
 $1 \text{ g/L} = 2.941 \text{ } \mu\text{mol/L} = 2.941 \text{ nmol/mL}$
塩基換算濃度は、 $2.941 \times 1000 = 2.941 \text{ } \mu\text{mol/mL}$ とした。

4-4-2 RNA の DLS 測定

Poly A および mCherry mRNA の DLS 測定を行い、それぞれの単体における粒子径を見積もった。

【試料調製】

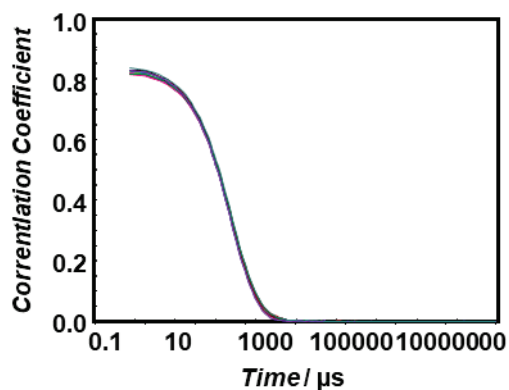
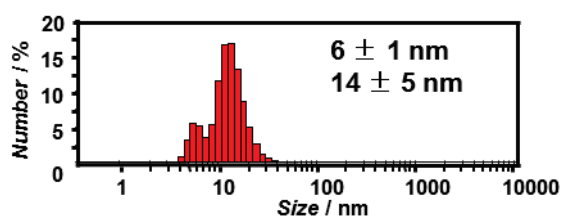
2 mM Poly A PBS 溶液および 3 mM mCherry mRNA PBS 溶液それぞれ PBS で希釈し 1 mM に調製した。

【測定条件】

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

温度：25°C

[Poly A] = 1 mM



[mCherry mRNA] = 1 mM

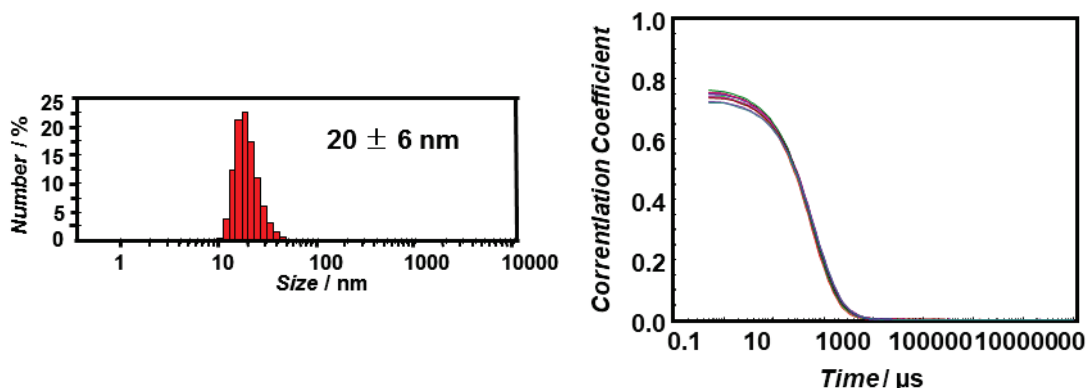


図 4-15. RNA PBS (pH 7.4)溶液中における
DLS 測定から得られた(左)個数換算分布、(右)自己相関関数

図 4-15 より、Poly A および mCherry mRNA は PBS 溶液中で 10-20 nm の粒径であることを確認した。

4-4-3 ゲルシフトアッセイ

電気泳動は、電場に応答して溶液中の荷電分子が反対電荷側へ移動する現象であり、網目構造を持つゲルの片側に核酸を注入すると、ヌクレオチドの負電荷を帯びたリン酸基の影響により、陽極側に引き寄せられて移動する。また、ゲルの網目状構造の分子ふるい効果によって、分子の大きいものは遅く移動する。この性質を利用して、タンパク質-DNA 複合体をポリアクリルアミドゲルまたはアガロースゲルで電気泳動すると、直鎖状 DNA よりもゆっくりと移動することが知られている¹³⁾。このことから、ゲルシフトアッセイはゲル移動の遅延によるタンパク質-DNA 複合体形成を評価する方法として用いられている。一方、 β -Annulus ペプチドは ζ 電位の pH 依存性が N 末端側の電荷に影響されず、C 末端側の電荷と一致するため、N 末端側が内部に配向している事が示唆されている¹⁴⁾。中性領域での β -Annulus ペプチドの正味電荷は 0 であり、PBS バッファー (pH 7.4) 中において人工ウイルスキャプシドに核酸が内包された場合、電荷の遮蔽によって電気泳動を行ってもアプライ位置から移動しないと考えられる。そこでハイブリダイゼーション後の試料について、ゲルシフトアッセイによる内包化挙動の評価を行った¹⁵⁾。

【試薬】

アガロース S 【ニッポンジーン, 濃度範囲 0.5-2 % 分離範囲 0.5- 30 kbp】

GelRed 核酸ゲル染色水溶液 【励起波長 270, 510 nm; 蛍光波長 600 nm, wako】

50 × TAE 【wako】

Bluejuice Gel loading buffer (10×) 【Thermo Fisher】

【試料調製】

粉末個体の dT₂₀-SS-β-Annulus (2 nmol)に PBS (pH 7.4)を加えて 100 μM とした。2 mM Poly A PBS 溶液と 3 mM mCherry mRNA PBS 溶液を用意し、塩基換算濃度が等しくなるように調製し、混合後、25°C の恒温槽で 30 分インキュベートを行った。試料の濃度を表 4-1 に示す。

表 4-1. dT₂₀-SS-β-Annulus とのハイブリダイゼーションに用いた各 RNA の濃度

RNA	Peptide	PBS	終濃度
2 mM Poly A 10 μL	100 μM dT ₂₀ -SS-β-Annulus 10 μL	-	[peptide] = 50 μM, [A] = [T] = 1 mM
3 mM mRNA 6.7 μL	100 μM dT ₂₀ -SS-β-Annulus 10 μL	3.3 μL	[peptide] = 50 μM, [mRNA nt] = [T] = 1 mM

【実験操作】

GelRed をプレキャストした 2 w/v %のアガロースゲルに試料をロードし、1×TAE 泳動バッファーを加えた泳動槽に、ゲルを 210 V で 30 分間電気泳動を行った。その後、励起波長 312 nm トランスイルミネーターを用いてデジタルカメラで撮影した。

終濃度 [dT₂₀-SS-β-Annulus] = 50 μM, [A] = [T] = [nt] = 1 mM

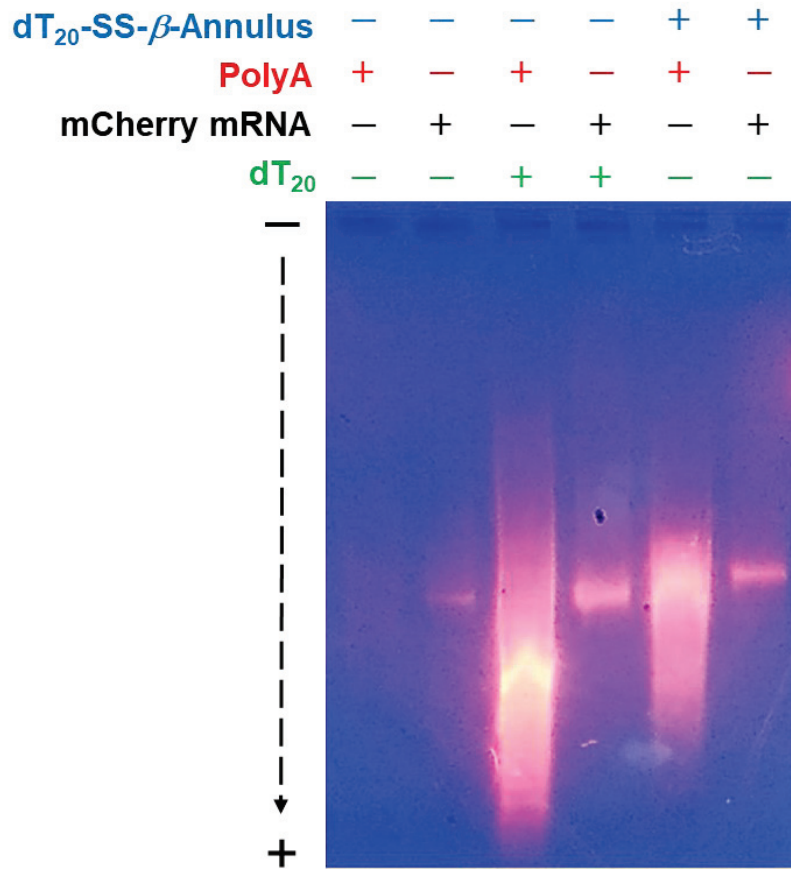


図 4-16. dT₂₀-SS-β-Annulus と RNA との混合溶液におけるゲルシフトアッセイ
 (左から Poly A, mCherry mRNA, Poly A + dT₂₀-NH₂, mCherry mRNA + dT₂₀-NH₂,
 Poly A + dT₂₀-β-Annulus, mCherry mRNA + dT₂₀-β-Annulus)

図 4-16 より、Poly A + dT₂₀-SS-β-Annulus、mCherry mRNA + dT₂₀-SS-β-Annulus は Poly A+dT₂₀、mCherry mRNA + dT₂₀ のバンド位置よりも上部にバンドを確認した。mCherry mRNA のみと mCherry mRNA + dT₂₀ の二重鎖形成バンドの位置がほぼ同じであることから、dT₂₀-SS-β-Annulus と RNA をそれぞれ混合した場合、フリーの核酸よりもゆっくりと泳動したことがわかる。よって、人工ウイルスキャプシドと各 RNA が複合体を形成していることが考えられる。

4-5 dT₂₀-SS-β-Annulus peptide と β-Annulus peptide の共集合によるキャプシドの作製

RNA と dT₂₀-SS-β-Annulus を塩基換算濃度で等モル混合した場合、複合体の形成を確認したが、アプライ位置からバンドが移動しており、十分にキャプシド形成されていない

い事が示唆された。キャプシド内に dT₂₀ が多く存在すると、内包されにくい可能性が考えられる。そこで、dT₂₀ を修飾したペプチドと未修飾の β -Annulus ペプチドを混合して、dT₂₀ による修飾が少ないペプチドを調製し、DLS 測定および TEM 観察を行った。

【試薬調製】

粉末固体の dT₂₀-SS- β -Annulus および β -Annulus にミリ Q 水を加え、ペプチドのモル比で [dT₂₀-SS- β -Annulus]:[β -Annulus] = 1 : 9、1 : 4.5、1 : 2、1 : 1 となるように混合後、約 5 分間超音波処理を行った。それぞれの混合溶液におけるペプチド濃度は以下の通り。

表 4-2. dT₂₀-SS- β -Annulus と β -Annulus 混合溶液における各濃度

dT ₂₀ -peptide	β -Annulus peptide	water	[dT ₂₀ -SS- β -Annulus]:[β -Annulus] 終濃度
100 μ M 10 μ L	900 μ M 10 μ L	-	1 : 9 = 50 μ M : 450 μ M
100 μ M 10 μ L	450 μ M 10 μ L	-	1 : 4.5 = 50 μ M : 225 μ M
100 μ M 10 μ L	1 mM 2 μ L	8 μ L	1 : 2 = 50 μ M : 100 μ M
100 μ M 10 μ L	1 mM 1 μ L	9 μ L	1 : 1 = 50 μ M : 50 μ M

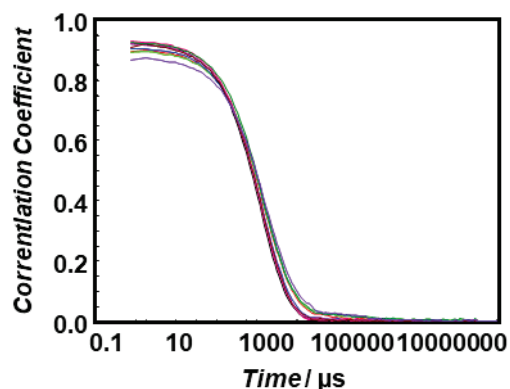
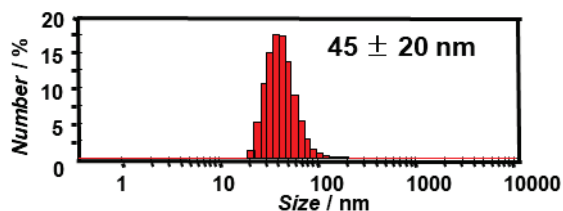
4-5-1 DLS 測定

【測定条件】

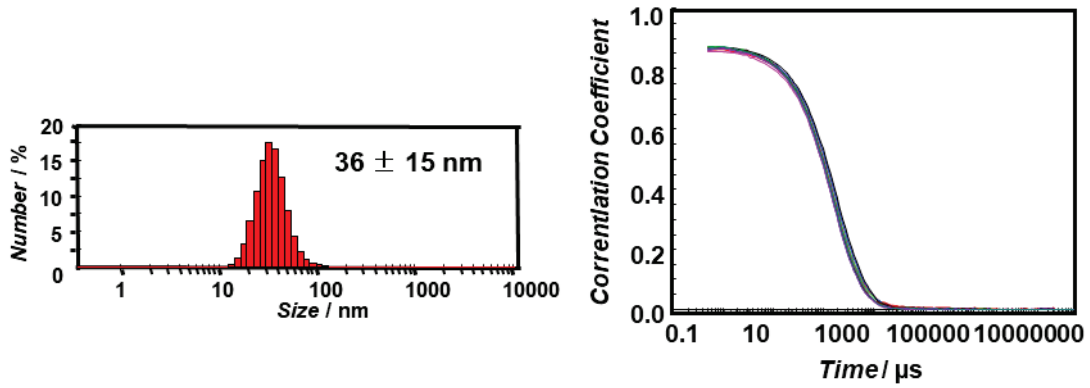
セル : ZEN2112-Low volume glass cuvette (12 μ L)

温度 : 25°C

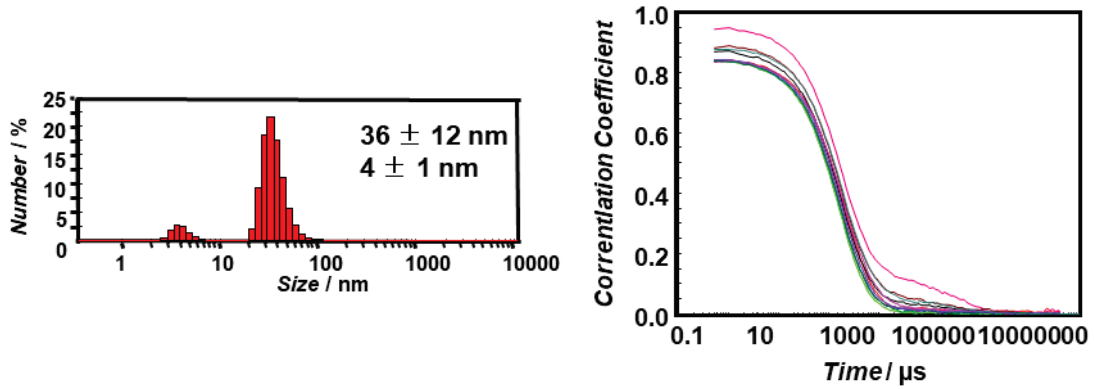
[dT₂₀-SS- β -Annulus] : [β -Annulus] = 1 : 9



[dT₂₀-SS-β-Annulus] : [β-Annulus] = 1 : 4.5



[dT₂₀-SS-β-Annulus] : [β-Annulus] = 1 : 2



[dT₂₀-SS-β-Annulus] : [β-Annulus] = 1 : 1

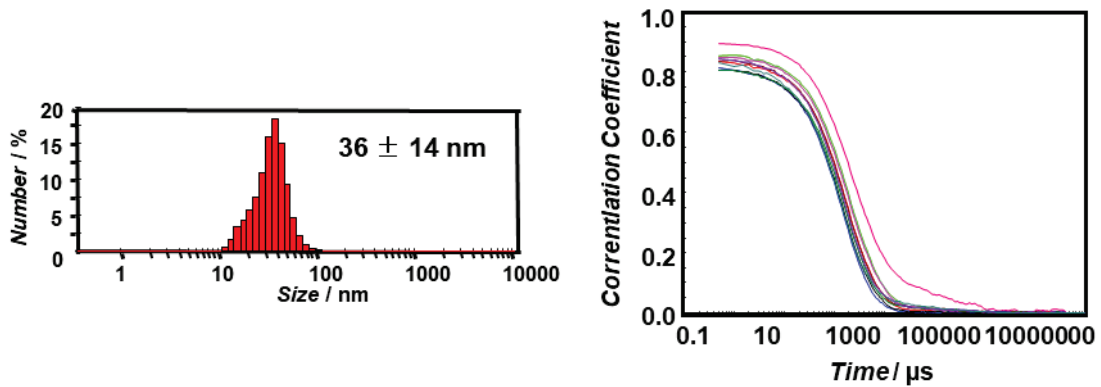


図 4-17. dT₂₀-SS-β-Annulus と β-Annulus の混合水溶液における DLS 測定から得られた(左)個数換算分布、(右)自己相関関数

図 4-17 より、dT₂₀-SS-β-Annulus と β-Annulus の濃度比率を変えて混合したところ、いずれの比率でも約 40 nm 程度の粒径をとることが確認された。

4-5-2 TEM 観察

4-5-1 において、dT₂₀-SS-β-Annulus ペプチドは β-Annulus ペプチドと共集合していることが示唆された。そこで、TEM 観察において形態を評価した。また、RNA とのハイブリダイゼーションの前段階としてアニーリングを行う場合、キャプシドが安定的に形成されるか確認するため、共集合ペプチドの熱安定性についても TEM 観察によって形態を評価した。

【試料調製】

粉末固体の dT₂₀-SS-β-Annulus および β-Annulus にミリ Q 水を加え、ペプチドのモル比で [dT₂₀-SS-β-Annulus] : [β-Annulus] = 1 : 9 = 50 μM : 450 μM となるように混合した。また、PBS バッファーでペプチドのモル比で [dT₂₀-SS-β-Annulus] : [β-Annulus] = 1 : 9 = 50 μM : 450 μM となるように混合したペプチド水溶液について、それぞれ (a) 37°C、30 分 (b) 60°C、10 分加熱処理を行った後、4°C で 30 分静置した。その後、それぞれの試料について TEM 観察を行った。

【測定条件】

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

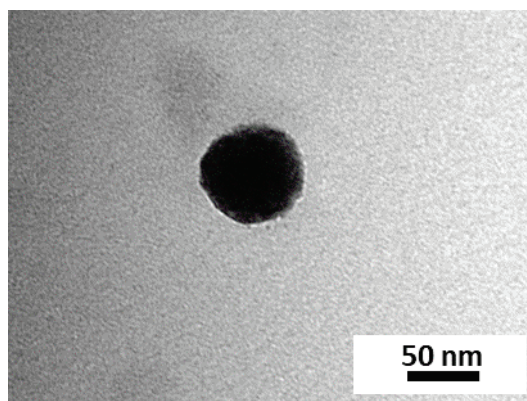
加速電圧: 80 kV

染色: 2 % Na₃(PW₁₂O₄₀)(H₂O)_n 水溶液

【実験操作】

ペプチド混合溶液を Grid に 5 μL 滴下し、1 分間静置した。その後、ろ紙を用いて液滴を取り除き、2 % Na₃(PW₁₂O₄₀)(H₂O)_n 水溶液を 5 μL 滴下し、1 分間静置後、液滴を取り除いた。その後 1 晩減圧乾燥を行った。

【dT₂₀-SS- β -Annulus】 : [β -Annulus] = 1 : 9 ミリ Q 水中



【dT₂₀-SS- β -Annulus】 : [β -Annulus] = 1 : 9 PBS 溶液中

(a) 37°C、30 分間静置

(b) 60°C、10 分間静置

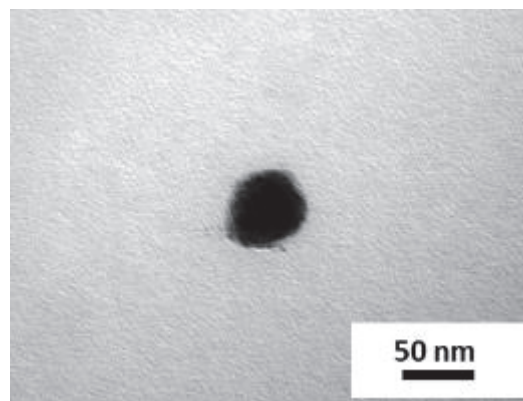
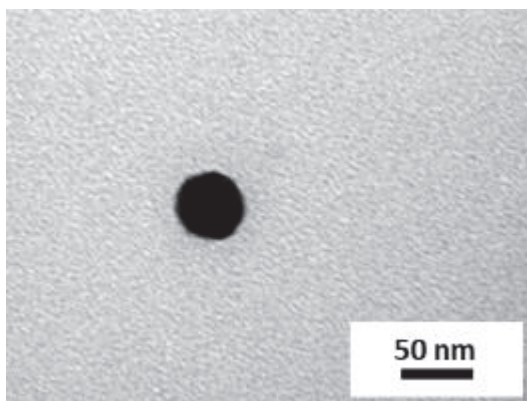


図 4-18. dT₂₀-SS- β -Annulus と β -Annulus の混合水溶液の加熱処理後に得られた TEM 像

図 4-18 より、dT₂₀-SS- β -Annulus と β -Annulus による共集合ペプチドは水溶液中で 70 nm 程度の球状構造体を示し、DLS 測定結果とほぼ一致したことから、人工ウイルスキャプシドを形成することが示された。また、どちらの加熱条件でも 50 nm 程度の球状構造体を示すことが確認された。したがって共集合ペプチドは、加熱と急冷による影響は受けないことが示された。

4-6 dT₂₀ と mRNA のハイブリダイゼーションによる共集合キャプシドへの mRNA の内包

共集合ペプチドに dT₂₀ とのハイブリダイゼーションを利用して mRNA を結合させ、キャプシドへ内包されるかゲルシフトアッセイで評価を行った。

4-6-1 ゲルシフトアッセイ

【試薬】

アガロース S 【ニッポンジーン, 濃度範囲 0.5 - 2 % 分離範囲 0.5 - 30 kbp】

GelRed 核酸ゲル染色水溶液 【wako】

50 × TAE 【wako】

Bluejuice Gel loading buffer (10×) 【Thermo Fisher】

OneSTEP ladder 50 (0.05 - 2 kbp) 【ニッポンジーン】

【試料調製】

粉末状で保存していた dT₂₀-SS-β-Annulus ペプチドおよびβ-Annulus ペプチドにミリ Q 水を加えて混合後、約 5 分間超音波処理し、凍結乾燥して混合ペプチド (モル比 1 : 9、1 : 4.5、1 : 2、1 : 1) を得た。凍結乾燥後の各濃度比の混合ペプチド粉末に、3 mM mCherry mRNA PBS 溶液を dT₂₀ とヌクレオチド濃度が等しくなるように添加し、ゆっくりとピペッティングを行って各溶液を調製した。その後、恒温槽で 25°C、30 分インキュベーションを行って調製した。混合溶液におけるペプチド濃度およびヌクレオチド濃度は表 4-3 に示すとおりとした。

表 4-3. dT₂₀-SS-β-Annulus と β-Annulus 混合ペプチドとヌクレオチドの各濃度

[dT ₂₀ -SS-β-Annulus] : [β-Annulus]	[mCherry mRNA nt] : [T]
1 : 9 = 50 μM : 450 μM	1 : 1 = 1 mM
1 : 4.5 = 50 μM : 225 μM	1 : 1 = 1 mM
1 : 2 = 50 μM : 100 μM	1 : 1 = 1 mM
1 : 1 = 50 μM : 50 μM	1 : 1 = 1 mM

また、DNA を修飾していない粉末状の精製β-Annulus ペプチドを PBS バッファー(pH 7.4)で 1 mM に調製後、3 mM mCherry mRNA 溶液、次いで PBS を加えてゆっくりとピペッティングを行って 500 μM 混合溶液を調製した。

【実験操作】

DNA マーカーおよび各試料を、GelRed をプレキャストした 3 w/v % のアガロースゲルにロードし、210 V で 30 分間電気泳動を行った。その後、励起波長 312 nm のトランス

イルミネーターを用いてデジタルカメラで撮影した。

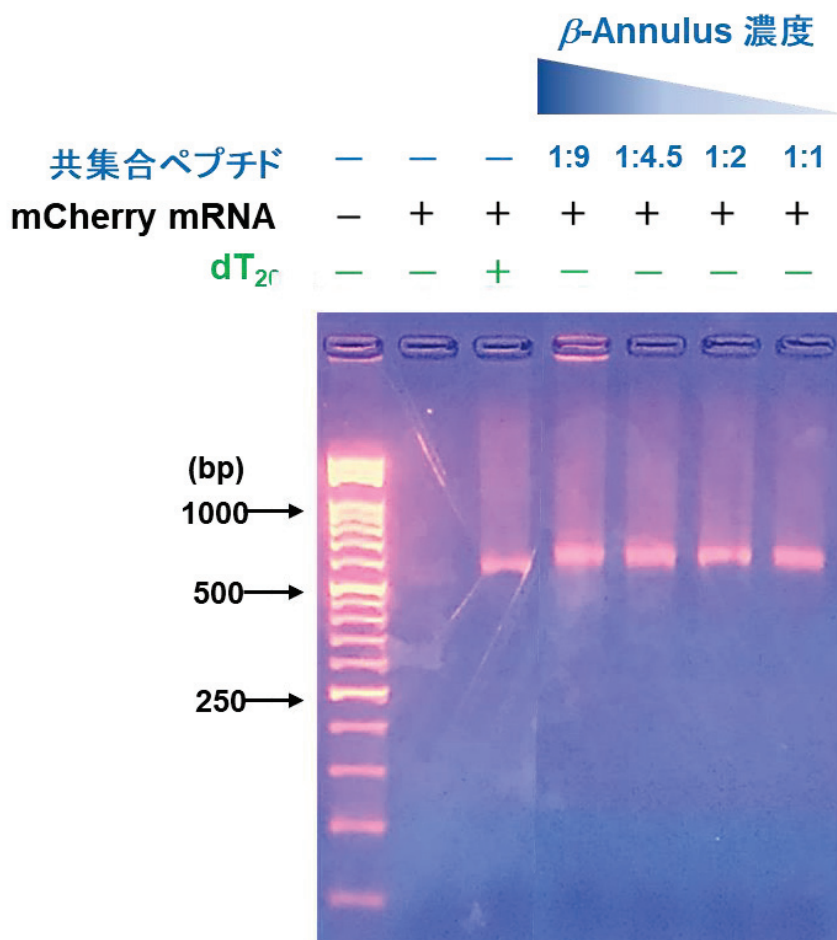


図 4-19. dT₂₀-SS- β -Annulus と β -Annulus による共集合ペプチドと mCherry mRNA とのハイブリダイゼーション後に行ったゲルシフトアッセイ結果

(左から、DNA マーカー、mCherry mRNA のみ、mCherry mRNA + dT₂₀-NH₂、mCherry mRNA + 共集合ペプチド (1:9, 1:4.5, 1:2, 1:1))

図 4-19 より、各ペプチドにヌクレオチド濃度 1 mM の mCherry mRNA を混合し、25°C で 30 分間インキュベート後に電気泳動を行ったところ、ペプチド濃度の比率[dT₂₀-SS- β -Annulus peptide] : [β -Annulus peptide] = 1 : 9 の混合ペプチドにおいて、アプライ位置から泳動されていないバンドを確認し、mCherry mRNA の電荷の遮蔽が起きた事が示された。

[β -Annulus] = 500 μ M

[mCherry mRNA nt] = 1 mM

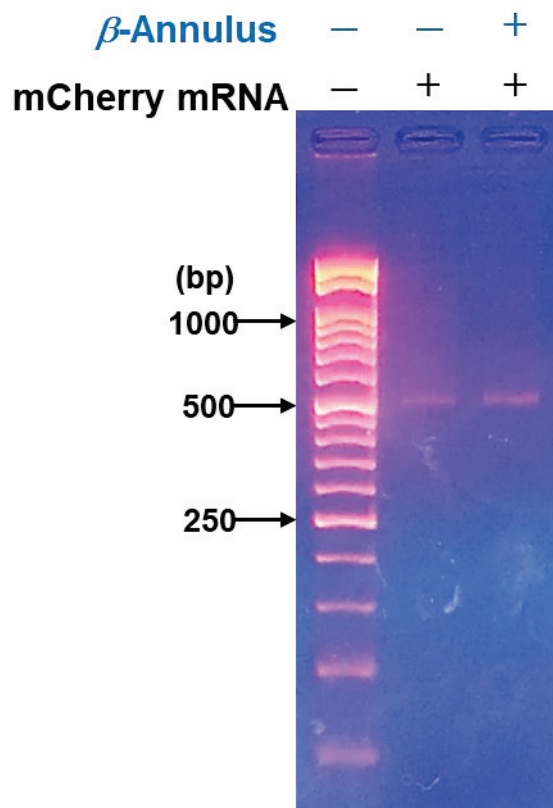


図 4-20. DNA 未修飾 β -Annulus ペプチドと mCherry mRNA とのハイブリダイゼーション後に行ったゲルシフトアッセイ結果
(左から DNA マーカー, mCherry mRNA, mCherry mRNA + β -Annulus)

図 4-20 より、DNA を修飾していない β -Annulus ペプチドを mCherry mRNA と混合した場合、mCherry mRNA 単体と泳動位置が変わらなかったため、 β -Annulus ペプチド単体では mRNA を内包できないことが示された。よって、共集合したペプチドとのハイブリダイゼーションによって、mCherry が内包化されている可能性が示唆された。しかし、図 4-19 において、複合体を形成していると考えられるバンドが、すべての濃度の共集合ペプチドにおいて 600 塩基対付近で確認された。そこで、ペプチド濃度の比率が [dT₂₀-SS- β -Annulus] : [β -Annulus] = 1 : 9 の共集合ペプチドを用いて、内包化の条件検討を行った。

【試料調製】

粉末状で保存していた dT₂₀-SS- β -Annulus ペプチドおよび β -Annulus ペプチドにミリ Q 水を加えて混合後、約 5 分間超音波処理し、凍結乾燥して混合ペプチド（モル濃度比 1:9）を得た。その後、混合ペプチドの粉末固体に 3 mM mCherry mRNA 溶液をそれぞれ 6 μ L 添加し、次いで PBS を加えてゆっくりとピペッティングを行って各溶液を調製した。次に、各時間でアニーリング処理を行い、ハイブリダイゼーションが促進されるか検討した。なお、④は蒸散を防ぐためにミネラルオイルを 10 μ L 添加した。混合溶液におけるペプチド濃度およびヌクレオチド濃度は表 4-3 に示すとおりとした。また、アニーリングの温度および時間を表 4-4 の通りに行い、急冷による集合体の凝集を避けるために 37°C および 25°C での静置時間を設定した。

表 4-4. アニーリングの温度および時間

条件	60°C	37°C	25°C	4°C
(1) 4°C	-	-	-	30 min
(2) 25°C	-	-	30 min	-
(3) 37°C	-	30 min	10 min	-
(4) 60°C	10 min	10 min	20 min	-

【実験操作】

DNA マーカーおよび各試料を、GelRed をプレキャストした 3 w/v %のアガロースゲルにロードし、4°C、210 V で 30 分間電気泳動を行った。その後、励起波長 312 nm トランスイルミネーターを用いてデジタルカメラで撮影した。

終濃度

共集合ペプチド([dT₂₀-SS- β -Annulus] : [β -Annulus]) = 1 : 9 = 50 μ M : 450 μ M)

[mCherry nt] : [T] = 1 : 1 = 1 mM

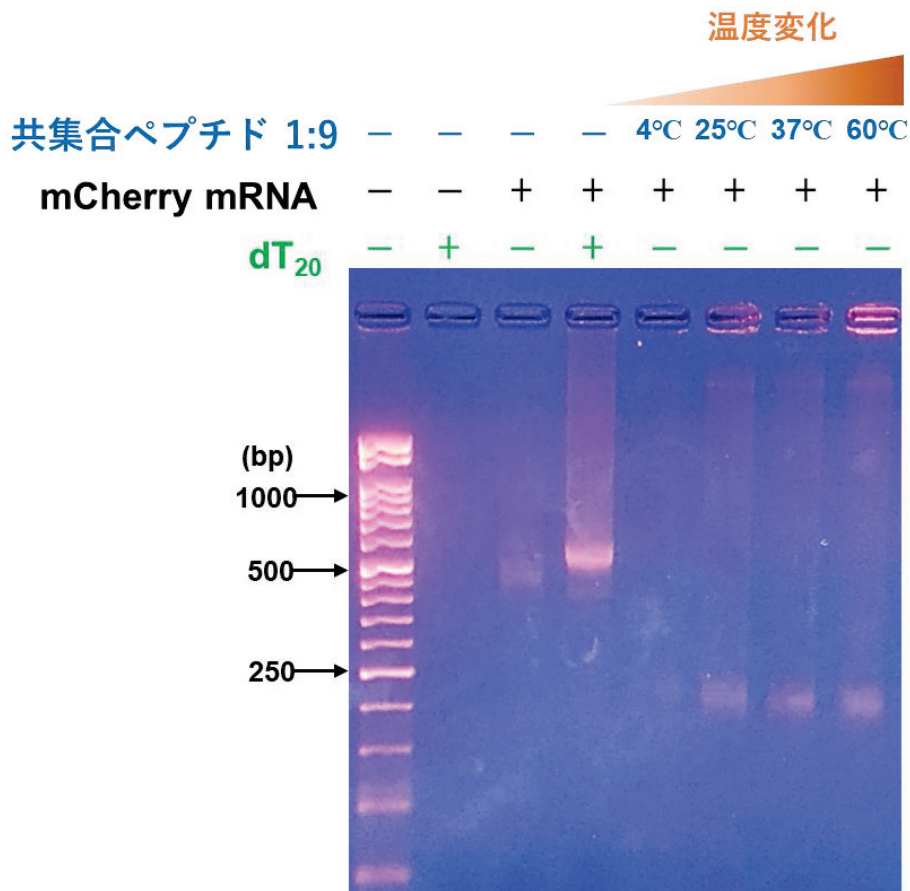


図 4-21. 各アニーリング条件でのハイブリダイゼーション後に行った
ゲルシフトアッセイ結果

(左から DNA マーカー, dT₂₀-NH₂, mCherry mRNA, mCherry mRNA + dT₂₀, mCherry
mRNA+ 共集合ペプチド(4, 25, 37, 60 °C))

図 4-21 より、25°C、37°C、60°C でアニーリングを行った共集合ペプチドと mCherry mRNA との混合溶液において、アプライ位置から移動していないバンドを得た。また、静置条件が 4°C の場合、共集合ペプチドへの mRNA の複合化が起きなかったと考えられる。一方、600 塩基対付近で見られていた複合体と考えられるバンドは得られなかった。4°C での電気泳動に変更した事で、電気泳動中に生じた熱によるペプチドの変性が起きなかったためと考えられる。このことから、25、37、60°C で静置、及びアニーリングを行った場合に mCherry mRNA の内包が起こる可能性が示唆された。

4-6-2 DLS 測定

アニーリング温度をそれぞれ変更した共集合ペプチドと mCherry mRNA との混合溶液において、それぞれ DLS 測定を行った。

【測定条件】

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

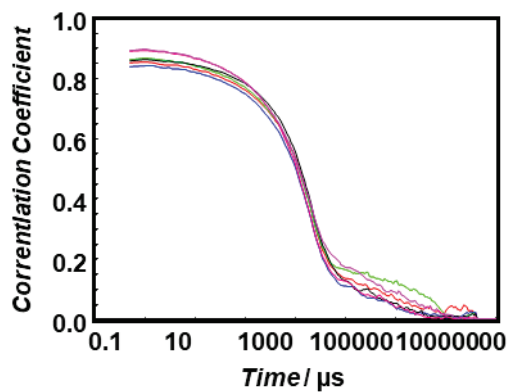
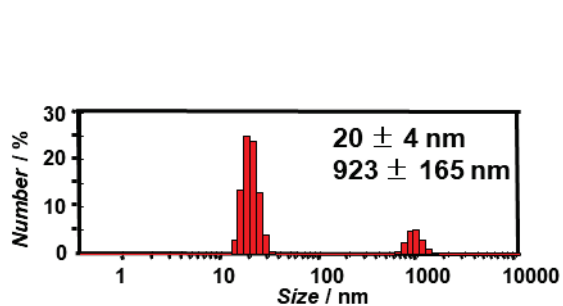
温度：25°C

終濃度

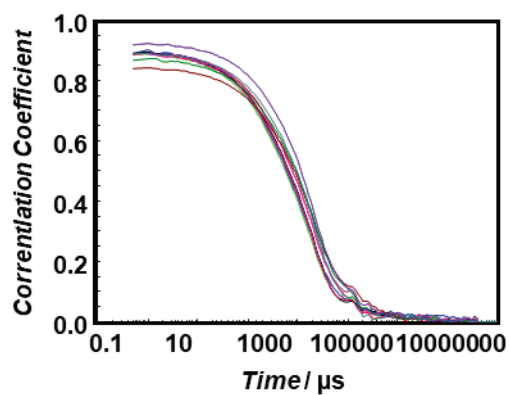
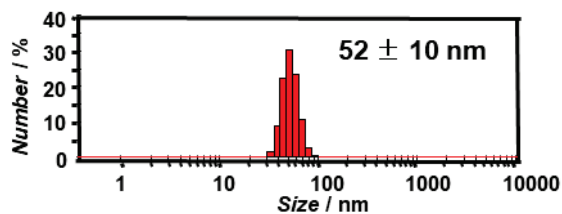
共集合ペプチド([dT₂₀-SS- β -Annulus] : [β -Annulus]) = 1 : 9 = 50 μ M : 450 μ M)

[mCherry mRNA nt] : [T] = 1 mM

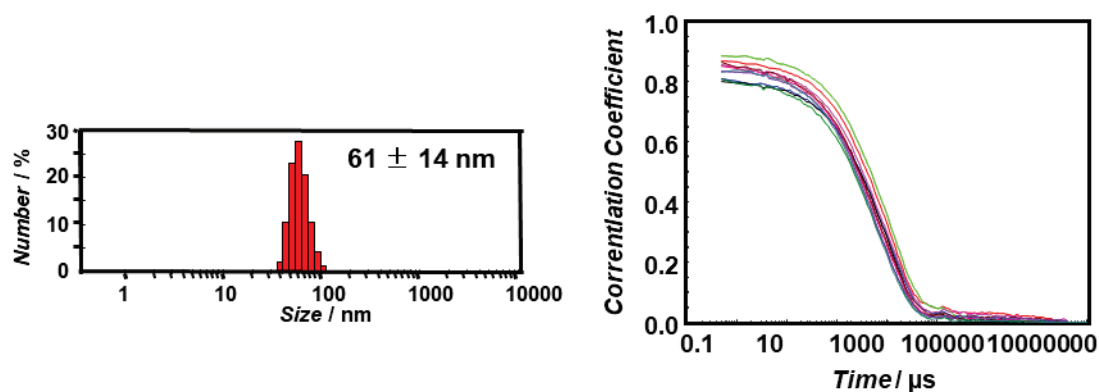
(1) 4°C



(2) 25°C



(3) 37°C



(4) 60°C

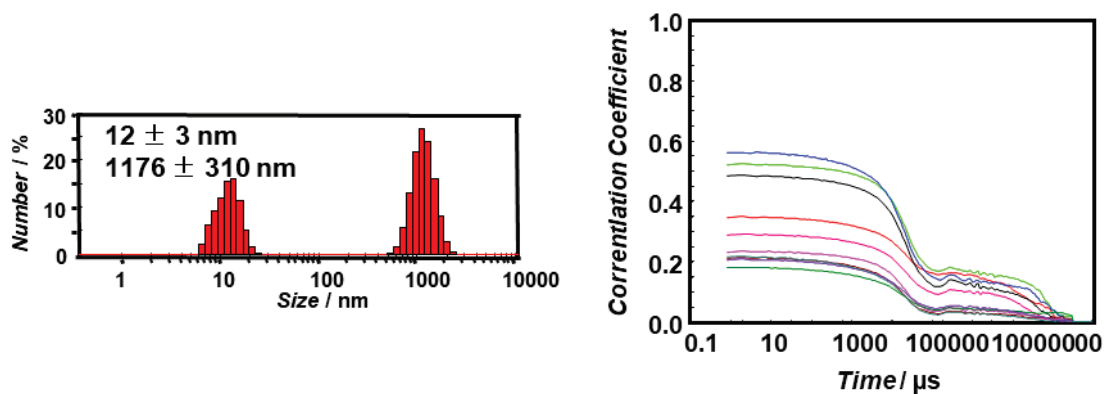


図 4-22. 共集合ペプチドと mCherry mRNA とのアニーリング温度別混合溶液における DLS 測定から得られた(左)個数換算分布、(右)自己相関関数

図 4-22 より、アニーリング温度が(2) 25°C、(3) 37°C の混合溶液において 50-60 nm 程度の粒径を確認した。(4) 60°C の場合、凝集体と思われる粒径および、mRNA 単体と思われる粒径を確認した。次に TEM 観察において形態を評価した。

4-6-3 TEM 観察

【測定条件】

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

加速電圧: 80 kV

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

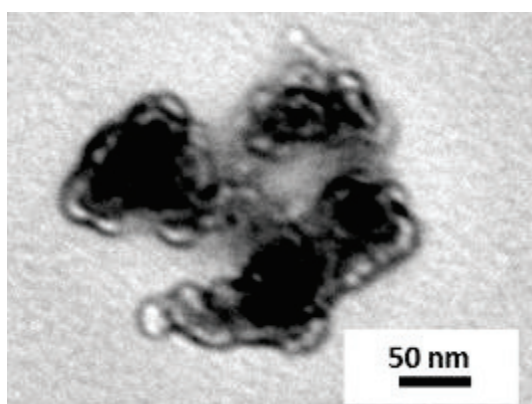
【実験操作】

ペプチド混合溶液を Grid に 5 μ L 滴下し、1 分間静置した。その後、ろ紙を用いて液滴を取り除き、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 分間静置後、液滴を取り除いた。その後 1 晩減圧乾燥を行った。

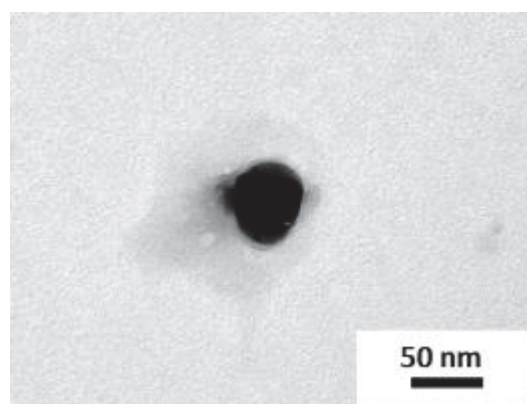
共集合ペプチド([dT₂₀-SS- β -Annulus] : [β -Annulus] = 1 : 9 = 50 μ M : 450 μ M)

[mCherry nt] : [T] = 1 mM

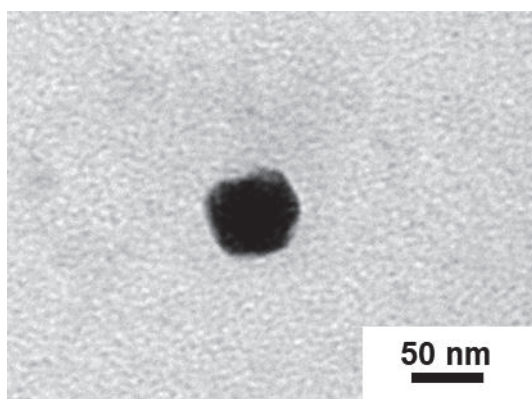
(1) 4°C



(2) 25°C



(3) 37°C



(4) 60°C

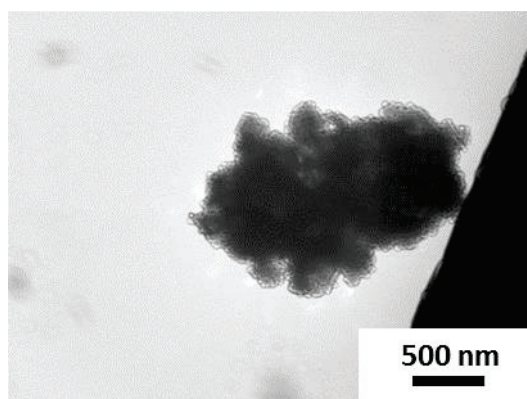


図 4-23. 共集合ペプチドと mCherry mRNA とのアニーリング温度別混合溶液において得られた TEM 像

図 4-23 より、アニーリング温度が(2) 25°C、(3) 37°C の混合溶液において 50-60 nm 程度の球状構造体を確認した。一方、(1) 4°C および(4) 60°C では凝集体と思われる集合体を確認した。4-6-2 の DLS 測定結果と同様の結果が得られたことから、温和な条件下

において、共集合ペプチドへの mCherry mRNA の内包が起こることが示唆された。

4-6-4 人工ウイルスキャプシドに内包された mRNA のリボヌクレアーゼ耐性の評価

RNA を特異的に加水分解する RNase A は、一本鎖 RNA のピリミジン塩基の 3'側に隣接するヌクレオシドとの間を切断するエンドリボヌクレアーゼであり、RNA 塩基のうちシトシン(C)とウラシル(U)に特異的であることが知られている¹⁶⁾。よって、未内包の mRNA はリボヌクレアーゼによって分解されるが、人工ウイルスキャプシド内に内包された mRNA は分解されないと考えられる。そこで、dT₂₀-SS- β -Annulus ペプチドと β -Annulus ペプチドによる共集合ペプチドと mCherry mRNA の混合溶液に RNase A を添加し、リボヌクレアーゼ耐性をゲルシフトアッセイによって評価した。

【試薬】

RNase A (Ribonuclease A from Bovine pancreas, 100 mg, 比活性 83.8 U/mg) 【ナカライテスク】

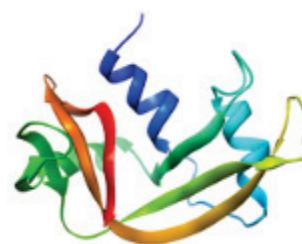


図 4-24. RNase A

【試薬調製】

RNase A を 1.089 mg 秤量し、PBS 91.3 μ L を加えて 1 unit/mL の RNase A 溶液を調製した。粉末状態で保存しておいた dT₂₀-SS- β -Annulus peptide にミリ Q 水を加えて 100 μ M 溶液を調製し、同様に粉末状の β -Annulus peptide (0.132 mg) にミリ Q 水を加えて 900 μ M に調製した。エッペンドルフチューブにそれぞれ 9 μ L ずつ入れ、凍結乾燥して共集合ペプチドを調製した。次に、凍結乾燥しておいた混合ペプチドに、3 mM mCherry mRNA PBS 溶液を 6 μ L 加えてゆっくりとピペッティングを行った後、PBS を 12 μ L 加えて 18 μ L とし、25°C で 30 分間インキュベーションを行った。

また、mRNA の内包の比較として、C 末端に dT₂₀ を修飾した β -Annulus-dT₂₀ ペプチドを用意した。粉末状態で保存しておいた β -Annulus-dT₂₀ ペプチドに PBS バッファーを加えて 100 μ M に調製した。100 μ M β -Annulus-dT₂₀ 4.5 μ L に 3 mM mCherry mRNA 3 μ L を加えてゆっくりとピペッティングを行い、PBS 1.5 μ L を加えて 25°C で 30 分間インキュベーションを行った。次に、各ペプチド 3 μ L に RNase A を 3 μ L 加えて 37°C で各時間インキュベーションを行った。同様に 3 mM mCherry mRNA 1 μ L に PBS 2 μ L を加えた後に RNase A を 3 μ L 加えて 37°C で 10 分インキュベーションを行った。その後、それぞれの試料についてアガロースゲル電気泳動を行った。

終濃度

[mCherry mRNA nt] = [T] = 1 mM, [β -Annulus] = 450 μ M

[dT₂₀-SS- β -Annulus peptide] = [β -Annulus-dT₂₀] = 50 μ M

【実験操作】

DNA マーカーおよび各試料を、GelRed をプレキャストした 3 w/v % のアガロースゲルにロードし、4°C、210 V で 30 分間電気泳動を行った。その後、励起波長 312 nm トランスイルミネーターを用いてデジタルカメラで撮影した。

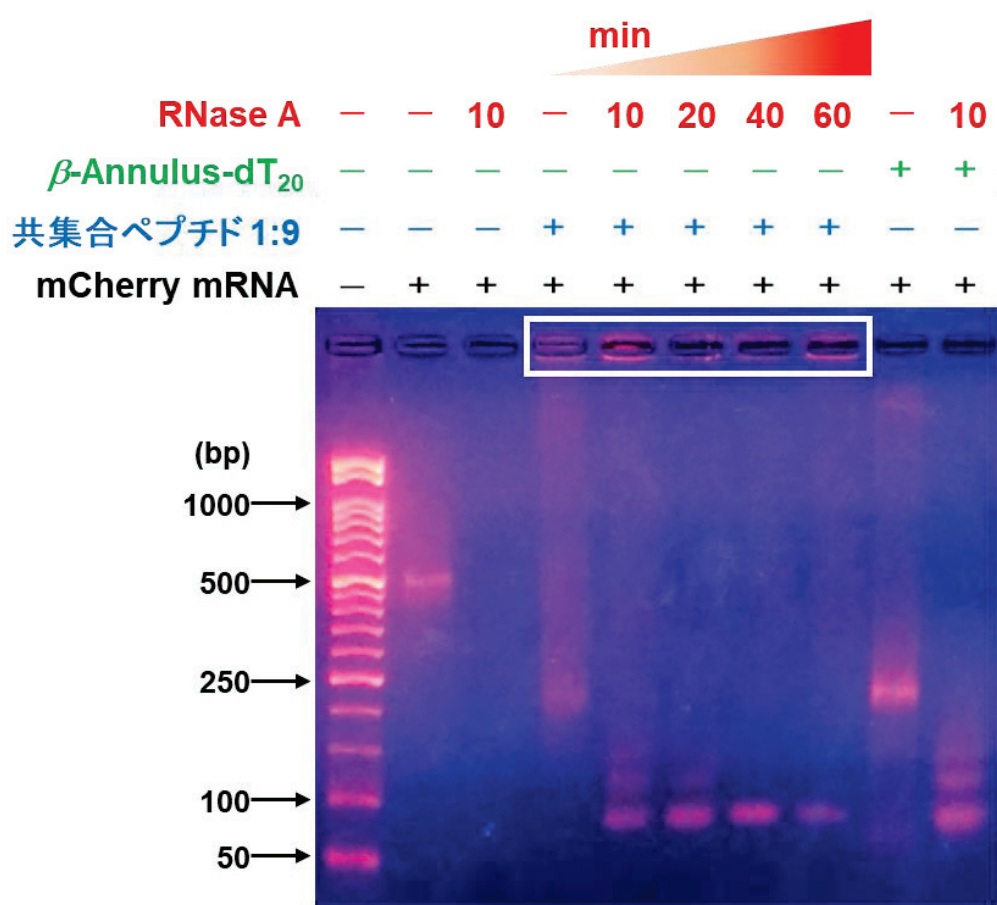


図 4-25. RNase A との反応後のゲルシフトアッセイ結果

(左から DNA マーカー, mCherry mRNA, mCherry mRNA + RNase A, mCherry mRNA + 共集合ペプチド(RNase A 無添加, RNase A 混合後 10 分, 20 分, 40 分, 60 分), mCherry mRNA + β -Annulus-dT₂₀ (RNase A 無添加, RNase A 混合後 10 分))

図 4-25 より、RNase A を添加した場合、mCherry mRNA 単独および β -Annulus-dT₂₀ペ

プチドと mCherry mRNA の混合溶液ではバンドの消失、または mRNA 断片と考えられる移動距離の長いバンドを確認したため、RNase A による分解が起こったことが示された。一方、共集合ペプチドと mCherry mRNA の混合溶液では、60 分経過してもアプライ位置から移動していないバンドを確認した。また、dT₂₀ を C 末端に修飾し、dT₂₀ が外部表面にある β -Annulu-dT₂₀ ペプチドに mCherry mRNA を添加した場合、電荷の遮蔽は確認できず、Rnase A を添加後に mRNA 断片と考えられる複数の移動距離の長いバンドを確認した。このことから共集合ペプチドで構築された人工ウイルスキャプシドに mRNA が内包されている事が示唆された。しかし、共集合ペプチドと mCherry mRNA の混合溶液では、mRNA 断片と思われる複数のバンドも確認したことから、混合溶液中にはキャプシドに内包されていない、または複合化されていない mRNA も含まれていることが分かった。

4-6-5 mCherry mRNA 内包 dT₂₀- β -Annulus の細胞導入試験 (CLSM 観察)

これまでに当研究室の佐藤は、 β -Annulus ペプチドの N 末端側に蛍光色素 TAMRA を導入した TAMRA- β -Annulus による細胞導入試験を行い、細胞内への取り込みを確認している¹⁷⁾。また、TAMRA- β -Annulus の C 末端側に His16 量体(His₁₆)を導入した TAMRA- β -Annulus-His₁₆ において、細胞取り込み効率が 3.2 倍上昇したことを報告している。His₁₆ は、鳥取大学農学部の岩崎らによって見出された細胞透過性ペプチドであり¹⁸⁾、生理的条件下で無電荷である一方、代表的な細胞透過性ペプチドとして知られる Arg8 量体 (RRRRRRRR)¹⁹⁾と比較して 5.5~6 倍の細胞透過性があることが示されている。そのため、His₁₆ をペプチドに導入すれば、mCherry の放出および発現が効率的に確認できると考えた。そこで、dT₂₀-SS- β -Annulus と、 β -Annulus 及び β -Annulus-His₁₆ との共集合ペプチドによる mCherry mRNA 内包人工ウイルスキャプシドの細胞導入試験を行い、CLSM 観察を行った。

【細胞】

ヒト肝ガン細胞由来 HepG2 細胞

【試薬】

トランスフェクション試薬 【TransIT-mRNA Transfection kit, Mirus】

* 脂質とポリアミンで構成された非リポソーム型試薬

【培地条件】

ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM 培地)

10 % ウシ胎児血清(v/v), 100 μ g/mL ストレプトマイシン, 100 units/mL ペニシリン, 1mM

ピルビン酸ナトリウム, 1% MEM 非必須アミノ酸 (v/v, Sigma M7145)

【試料調製】

粉末状で保存していた dT₂₀-SS- β -Annulus ペプチドおよび β -Annulus ペプチドにミリ Q 水を加えて混合後、約 5 分間超音波処理し、凍結乾燥して混合ペプチド (モル濃度比 1:9) を得た。dT₂₀-SS- β -Annulus ペプチドと β -Annulus-His₁₆ ペプチドについても同様の操作によってモル比 1:9 の混合ペプチドを得た。各混合ペプチドの粉末に 3 mM mCherry mRNA PBS 溶液を 6 μ L 加えてゆっくりとピペッティングを行った後、PBS を 12 μ L 加えて 18 μ L とし、25°C で 30 分間インキュベートして試料を調製した。

【実験操作】

HepG2 細胞を細胞密度 1.0 x 10⁴ cells / 100 μ L / well になるように single-well glass bottom dish に播種し、DMEM 培地で 37°C, 5.0% CO₂ 条件で 24 h 培養した。その後、培地を除去し、PBS バッファー (pH 7.4, 0.45 μ m フィルターろ過済み) で調製した各試料と新しい培地を合計 100 μ L/well となるように添加し、37°C, 5.0% CO₂ 条件で 48 h 培養した。各試料の終濃度および培地への添加量は表 4-5 に示す通りとした。その後、CLSM 観察によって mCherry の発現を評価した。

【測定条件】

表 4-5. 各試料における終濃度および培地添加量

(1)	[mCherry mRNA] = 1 μ M 10 μ L	mRNA Boost Reagent 2 μ L	TransIT-mRNA Reagent 2 μ L
(2)	[mCherry mRNA] = 1 μ M ([nt] = 1 mM) 10 μ L		
(3)	([mCherry mRNA] = 1 μ M, [dT ₂₀ -SS- β -Annulus] = 50 μ M, [β -Annulus] = 450 μ M) 10 μ L		
(4)	([mCherry mRNA] = 1 μ M, [dT ₂₀ -SS- β -Annulus] = 50 μ M, [β -Annulus-His ₁₆] = 450 μ M) 10 μ L		

mCherry: 励起波長 587 nm, 蛍光波長 610 nm

【結果】

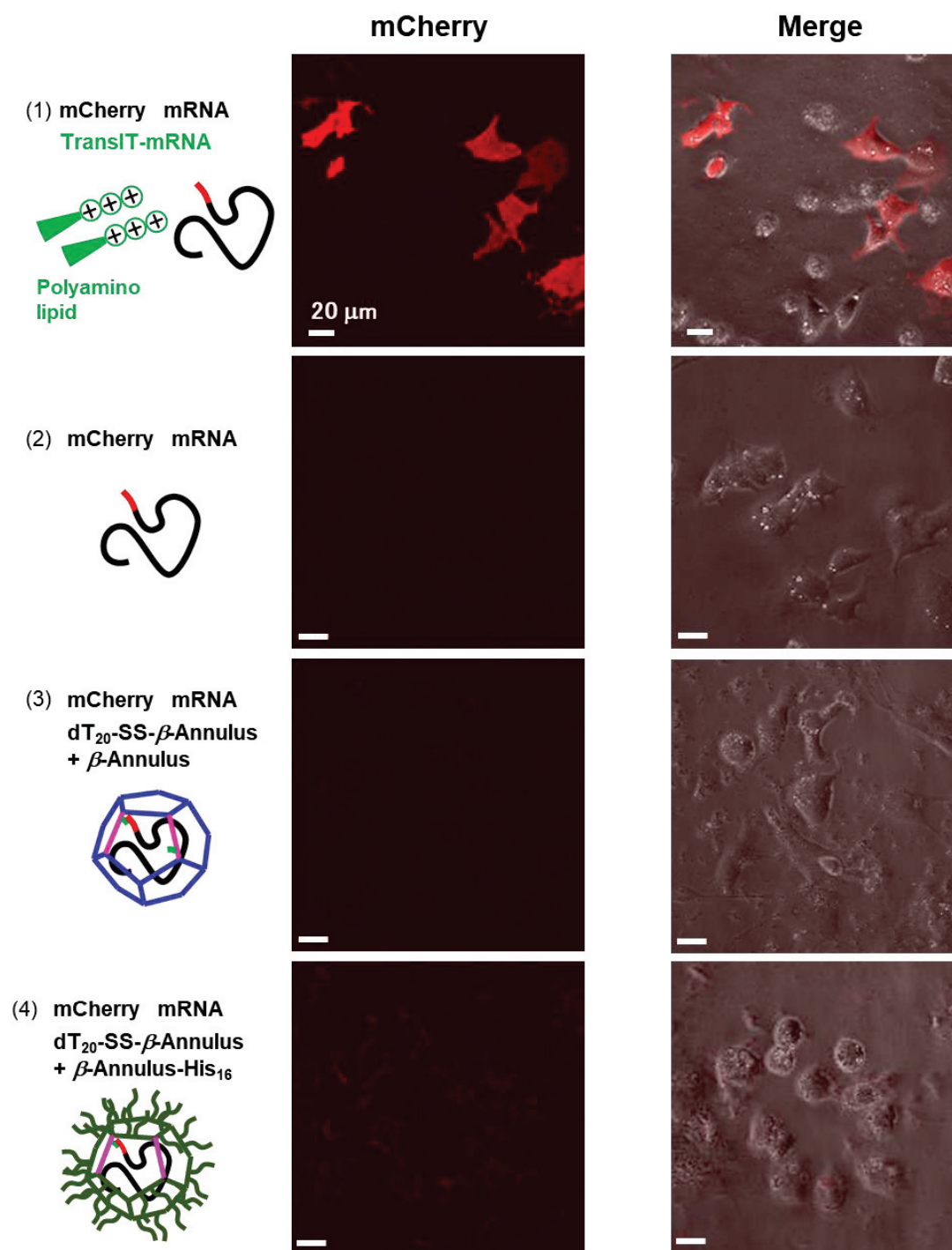


図 4-26. 各試料を添加した HepG2 細胞の CLSM 像

(1) mCherry mRNA + トランスフェクション試薬、(2) mCherry mRNA (3) mCherry mRNA + 共集合ペプチド(dT₂₀-SS-β-Annulus + β-Annulus)、(4) mCherry mRNA + 共集合ペプチド (dT₂₀-SS-β-Annulus + β-Annulus-His₁₆)

図 4-26 に各サンプルにおける CLSM 観察の結果を示す。(3) mRNA 内包共集合ペプチドの CLSM 観察の結果、赤色の蛍光は認められなかった。一方、(4) β -Annulus-His₁₆ との mRNA 内包共集合ペプチドにおいて、mCherry 由来の赤色蛍光が確認された。

【ImageJ】

図 4-26 の結果を元に、画像解析ソフト ImageJ²¹⁾による蛍光強度の定量を行った。

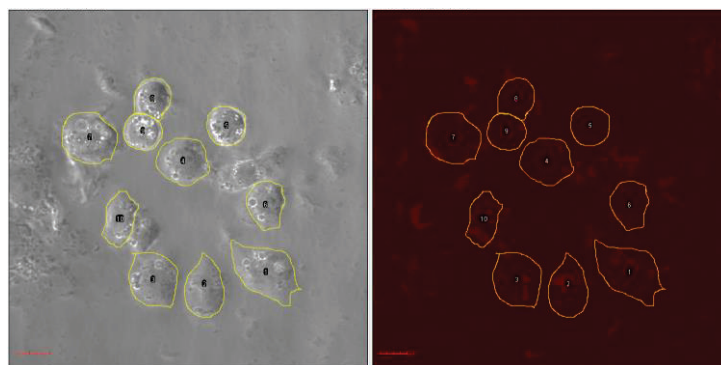


図 4-27. ImageJ による蛍光強度の算出方法(左)明視野、(右)mCherry 像

【算出方法】

1. 図 4-27(左)の明視野において細胞(n=10)を選択し、その後 mCherry チャンネル(図 4-27(右))で同一の箇所を取り囲み、領域の面積当たりの蛍光強度を定量した。
2. 明視野において何も無い領域を選択し(n=5)、面積当たりの蛍光強度を計算した。
3. バックグラウンド補正として 1 から 2 を引き、mCherry 発現量の平均値を定量した。

【結果】

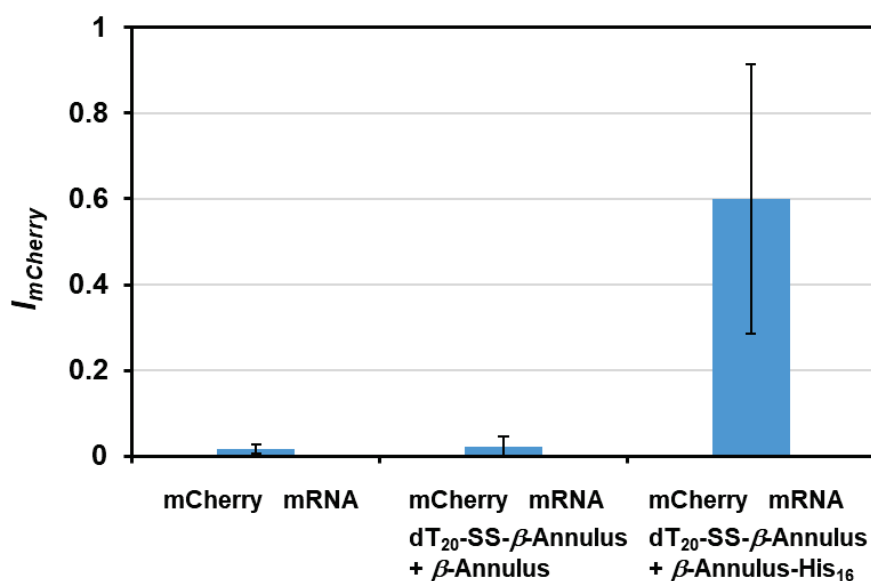


図 4-28. 各サンプルにおける mCherry の蛍光強度

図 4-28 より、dT₂₀-SS- β -Annulus と β -Annulus-His₁₆ の共集合ペプチドにおいて、mCherry 蛍光強度は dT₂₀-SS- β -Annulus と β -Annulus の共集合ペプチドの場合と比べて約 26.5 倍増大した事が示された。以上のことから、細胞透過性ペプチド(His₁₆)を表面提示した人工ウイルスキャプシドにおいて、細胞内で mCherry の発現を確認した。つまり、細胞内に導入された mCherry は還元環境下でペプチドから放出されたことが示唆された。しかし、図 4-26 より、トランスフェクション試薬を用いたポジティブコントロールと比べて蛍光強度が低いことが分かる。これは、人工ウイルスキャプシド内のジスルフィド結合の存在比が dT₂₀-SS- β -Annulus のみで構築されたキャプシドの 1/10 であるため、キャプシドの崩壊が部分的であったことが影響していると考えられる。

キャプシドの崩壊が部分的である可能性に関しては、mRNA 内包共集合ペプチドへ還元剤(GSH または DTT)を添加し、逆相 HPLC 及び MALDI-TOF-MS 測定を行う事によって mCherry mRNA の放出挙動が評価できると考えられる。また、dT₂₀ より鎖長の短い DNA を β -Annulus ペプチドの N 末端に修飾し、C 末端側へ細胞透過性ペプチドを修飾するといった分子設計を検討することで、mRNA の内包と細胞導入後の放出が両立した新規のドラッグデリバリーキャリアの創製が期待できると考えられる。

4-7 まとめ

第 3 章で合成した Cys- β -Annulus ペプチドの N 末端に dT₂₀ を修飾した dT₂₀-SS- β -Annulus ペプチドの合成に成功した。dT₂₀-SS- β -Annulus ペプチド溶液の DLS 測定、TEM 観察により、PBS バッファー中で人工ウイルスキャプシドと思われる 50 nm 程度の球状構造体を形成することが示された。

mCherry mRNA と dT₂₀-SS- β -Annulus のハイブリダイゼーションを、ゲルシフトアッセイ、DLS 測定および TEM 観察によって検討した。この結果、 β -Annulus ペプチド単体では、mRNA は内包されないことが示された一方、dT₂₀-SS- β -Annulus ペプチドと β -Annulus ペプチドとの共集合ペプチドにおいて、mRNA の内包が示唆された。また、リボヌクレアーゼ耐性試験により、共集合ペプチドによって内包された mRNA が分解から保護された事が示された。

細胞透過性ペプチドである His₁₆ を C 末端に修飾した β -Annulus-His₁₆ との共集合ペプチドを作製し、細胞内へ mRNA を導入することに成功した。

これらのことから、ジスルフィド結合を介して dT₂₀ を内包した人工ウイルスキャプシドは、ハイブリダイゼーションによって核酸を内包し、核酸医薬のキャリアとして利用できる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) (a) H. Yin, R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy, A. J. Vegas, J. R. Dorkin, D. G. Anderson, *Nat. Rev.*

- Genet.*, **15**, 541 (2014); (b) U. Sahin, K. Kariko, O. Tureci, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **13**, 759 (2014); (c) K. J. Kauffman, M. J. Webber, D. G. Anderson, *J. Control. Release*, **240**, 227 (2016); (d) J. C. Kaczmarek, P. S. Kowalski, D. G. Anderson, *Genome. Med.*, **9**, 60 (2017)
- 2) K. Mizumoto, Y. Kaziro, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **34**, 1(1987)
 - 3) B. Scheel, R. Teufel, J. Probst, J-P. Carralot, J. Geginat, M. Radsak, D. Jarrossay, H. Wagner, G. Jung, H-G. Rammensee, I. Hoerr, S. Pascolo, *Eur. J. Immunol.*, **35**, 1557 (2005)
 - 4) Y. Hirose, J. L. Manley, *Genes Dev.*, **14**, 1415(2000)
 - 5) (a) D. Kaida, M. G. Berf, I. Younis, M. Kasim, L. N. Singh, L. Wan, G. Dreyfuss, *Nature*, **468**, 664 (2010); (b) A. O. Subtelny, S. W. Eichhorn, G. R. Chen, H. Sive, D. P. Bartel, *Nature*, **508**, 66 (2014); (c) E. Wahle, *J. Biol. Chem*, **270**, 2800 (1995); (d) L. Weill, E. Belloc, F. A. Bava, R. Mendez, *Nature Struct. Mol. Biol.* **19**, 577(2012); (e) C. R. Eckmann, C. Rammelt, E. Wahle, *WileyInterdiscip. Rev. RNA*, **2**, 348(2011)
 - 6) T. C. Custer, N. G. Walter, *Protein Science*, **26**, 1363(2017)
 - 7) L. Chen, S. Fang, X. Xiao, B. Zheng, M. Zhao, *Anal. Chem.*, **88**, 11306 (2016)
 - 8) 中山広樹, 新版 バイオ実験イラストレイテッド 本当にふえるPCR, 秀潤社 (2010)
 - 9) M. Kuron, A. Arnold, *Eur. Phys. J. E.*, **38**, 20 (2015)
 - 10) X. Shu, N. C. Shaner, C. A. Yarbrough, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Biochemistry*, **45**, 9639 (2006)
 - 11) Oligonucleotide Properties Calculator,
<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>
 - 12) Technical and legal references, Promega, <https://www.promega.co.jp/cat/cat20.pdf>
 - 13) (a) W. Hendrickson, *BioTechniques*, **3**, 346 (1985); (b) A. Revzin, *BioTechniques*, **7**, 346 (1989)
 - 14) K. Matsuura, K. Watanabe, T. Matsuzaki, K. Sakurai, N. Kimizuka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 9662 (2010)
 - 15) J. Kong, Y. Wang, J. Zhang, W. Qi, R. Su, Z. He, *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 14032 (2018)
 - 16) L. W. Schultz, D. J. Quirk, R. T. Raines, *Biochemistry*, **37**, 8886 (1998)
 - 17) 佐藤祐希, 鳥取大学持続性社会創生科学研究科工学専攻 化学バイオコース 応用化学分野修士論文 (2019)
 - 18) T. Iwasaki, Y. Tokuda, A. Kotake, H. Okada, S. Takeda, T. Kawano, Y. Nakayama, *J. Control. Release.*, **210**, 115 (2015)
 - 19) S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.*, **276**, 5836 (2001)
 - 20) ImageJ, <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>

第5章 結言

本論文では、 β -Annulus ペプチドの自己集合によって構築される人工ウイルスキャプシドを、ナノ材料として多機能化することを目指して、DNA による表面修飾、短鎖 DNA および mRNA の内包を検討した。

第1章では、天然のウイルスキャプシドの構造および球状ウイルスの自己集合プロセスや、天然ウイルスキャプシドや球状タンパク質集合体を利用した機能性ナノ集合体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形成および化学修飾による機能化について述べた。

第2章では、DNA を表面に修飾した人工ウイルスキャプシドの創製について述べた。まず、C 末端から2番目に Cys を有する β -Annulus-Cys ペプチドを合成し、dA₂₀ および dT₂₀ を導入した β -Annulus-dA₂₀ ペプチドおよび β -Annulus-dT₂₀ ペプチドを合成した。動的光散乱(DLS)測定および透過型電子顕微鏡(TEM)観察より、 β -Annulus-dA₂₀ ペプチドおよび β -Annulus-dT₂₀ ペプチドは、それぞれ 50 nm 程度の球状構造体を形成していることが確認された。 β -Annulus-dA₂₀ ペプチド溶液の ζ -電位測定により、人工ウイルスキャプシドの表面が DNA で修飾されている事が示された。円二色性分散(CD)測定により、人工ウイルスキャプシドの表面に提示された DNA の二次構造は、通常の DNA とほぼ同じ構造をしている事が分かり、キャプシドへの修飾による DNA の構造変化がないことが示唆された。また、 β -Annulus-dA₂₀ および β -Annulus-dT₂₀ からなるキャプシド上でのハイブリダイゼーション挙動の評価により、人工ウイルスキャプシドの表面に提示された DNA は、それぞれ相補的な DNA を認識できることが示された。また、相補鎖を形成する DNA で修飾された人工ウイルスキャプシドは、部分的なハイブリダイゼーションによって凝集体を形成することがわかった。このことから、DNA がビルディングブロックとして機能し、人工ウイルスキャプシドの集積化が可能であることが示唆された。

第3章では、ランダムな 20 塩基配列の DNA を、ジスルフィド結合を介して内包した人工ウイルスキャプシドの創製について述べた。短鎖 DNA (RNA)は、標的となる核酸に配列依存的に結合して遺伝子発現を抑制することから、標的特異的で副作用も少ない有用な核酸医薬品として注目されているが、加水分解を受けやすく細胞取り込みが低いという問題があった。そこで、核酸医薬をキャリアに導入させ、細胞内還元環境を利用して細胞質で核酸を放出する研究が行われている。本章ではまず、 β -Annulus ペプチドの N 末端側に Cys を導入した Cys- β -Annulus ペプチドを合成し、ピリジルジスルフィド基をもつ架橋剤 SPDP を介してオリゴ DNA を連結した β -Annulus ペプチド(DNA-SS- β -Annulus peptide)を合成した。DLS 測定および TEM 観察より、50 nm 程度の球状構造

体を形成することが示された。短鎖 DNA を導入していない Cys- β -Annulus は球状に集合しないことが確認されたことから、短鎖 DNA は人工ウイルスキャプシドに内包されていることが示唆された。還元剤である GSH および DTT を用いたジスルフィド結合切断による DNA 放出を、逆相 HPLC、DLS 測定および TEM 観察によって検討したところ、短鎖 DNA の放出および、人工ウイルスキャプシドの破壊が示された。これらのことから、ジスルフィド結合を介して DNA を内包した人工ウイルスキャプシドは、siRNA やアンチセンス DNA といった短鎖核酸医薬のデリバリーシステムにおいて、核酸を放出制御するための基盤材料として有用なキャリアとなると期待される。

第4章では、mRNA を内包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、目的タンパク質の効果的な発現を担う mRNA を、核酸医薬として応用する研究が行われている。真核生物における mRNA は、3'末端に Poly A テールを有していることが知られている。これをハイブリダイゼーションの相補鎖として利用し、人工ウイルスキャプシドへの mRNA 内包化の可能性を検討した。まず、第3章で述べた人工ウイルスキャプシドへの短鎖 DNA の内包化法を基盤として、Cys- β -Annulus ペプチドの N 末端に dT₂₀ を修飾した dT₂₀-SS- β -Annulus ペプチドを合成した。DLS 測定および TEM 観察より、50 nm 程度の球状構造体を形成することが示された。合成した dT₂₀-SS- β -Annulus と β -Annulus ペプチドの共集合により人工ウイルスキャプシドを構築する際に、dT₂₀ 部位と相補鎖形成する Poly A テールを有する mRNA を混合し、mRNA を内包した人工ウイルスキャプシドの構築を検討した。その結果、mRNA 混合溶液におけるゲルシフトアッセイ、DLS 測定および TEM 観察により、人工ウイルスキャプシドへの mRNA の内包が示唆された。さらにリボヌクレアーゼ耐性試験により、共集合ペプチドによって内包された mRNA が分解から保護された事が示された。また、細胞透過性ペプチドである His₁₆ を C 末端に修飾した β -Annulus-His₁₆ との共集合ペプチドを作製し、細胞内へ mRNA を導入することに成功した。一方、 β -Annulus ペプチド単体では、mRNA は内包されないことがゲルシフトアッセイにより示された。これらのことから、ジスルフィド結合を介して dT₂₀ を内包した人工ウイルスキャプシドは、ハイブリダイゼーションにより mRNA を内包することができ、mRNA の DDS 材料としても有望であると考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、研究における様々なアドバイスや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いたします。技術補佐員時代から数えて約 7 年間、装置の操作方法から実験の進め方、論文執筆等々に至るまで、研究を一からご指導頂けたのは、貴重で幸運な事だったと感じています。また、松浦先生の的確なアドバイスや研究者としての高い着眼点は、現在の仕事でも大変参考になる事が多く、社会人としても成長させて頂いたと思います。本当にありがとうございました。

また、学位論文審査委員を務めていただきました鳥取大学大学院工学研究科 齋本博之教授、伊福伸介教授、野上敏材教授に心より感謝いたします。

本研究を進めるにあたって、細胞導入試験及び共焦点レーザー顕微鏡観察をはじめとした直接的な実験のアドバイスや、論文執筆においてご指導を賜りました稲葉央助教に感謝申し上げます。

技術補佐員時代に、女性研究者としての視点で様々なアドバイスを頂きました韓旻娥准教授(現 Kongju National University 教授)に感謝申し上げます。

松浦研究室卒業生の山田沙紀氏、西川晶子氏におかれましては、本研究を進めるにあたって、基礎となる実験方法等を参考にさせていただきました。感謝いたします。

技術補佐員から学生へと立場が変わる中で、安達仁朗氏（現理化学研究所）はじめ、松浦研究室の卒業生の皆さん、現研究室の学生諸氏には、沢山の助言を頂きながら多くの時間を共有できましたことに深く感謝いたします。

大学院での研究活動を進めるにあたり、多大なるご理解とご配慮を賜りました(株)鳥取再資源化研究所 竹内義章氏、中野恵文氏、今崎孝治氏、ならびに勤務先である(株)エーイーエスラボ 馬場貴志氏、坪倉佳代子氏に深く感謝申し上げます。

そして、常に励まし、最後まで支えて下さった濱口壽郎氏に心から感謝申し上げます。最後に、いつも笑顔で送り出してくれた子供達、家族に深く感謝します。