

(様式 2)

学位論文の概要及び要旨

氏 名 中村 陽子 印

題 目 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

学位論文の概要及び要旨

球状ウイルスの外殻タンパク質集合体であるウイルスキャプシドは、キャプシド内部への機能性分子の導入や、外部表面への化学修飾を行うことで、薬物輸送材料やナノリアクター、ワクチンの足場材料などへの応用が盛んに研究されている。一方、ナノカプセルを形成する人工タンパク質集合体についても研究されており、天然のタンパク質集合体を参考にして、自己集合性のタンパク質・ペプチドを自在に分子設計し、ボトムアップアプローチによってナノカプセルが創製されている。

これまで Matsuura らは、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)の内部骨格に関与する β -Annulus ペプチドを人工的に合成し、水中で自己集合して 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ている¹⁾。また、内部が中空で、 β -Annulus 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示している^{1,2)}。そこで、 β -Annulus ペプチドの C 末端側を化学修飾することで金ナノ粒子³⁾、Coiled-coil Spike⁴⁾、ヒト血清アルブミン(HSA)⁵⁾といった機能性分子を表面提示することに成功している。また、人工ウイルスキャプシドの内部カチオン性を利用した M13 フェージ DNA²⁾、蛍光性ナノ粒子 CdTe⁶⁾の内包や、N 末端修飾による ZnO ナノ粒子⁷⁾および His-tag GFP⁸⁾の内包にも成功している。このように、人工的に設計・合成した自己集合性ペプチドに機能性材料を付与した分子設計により、人工ウイルスキャプシドを機能性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さらなる多機能化を目指して、DNA による表面修飾、短鎖 DNA および mRNA の人工ウイルスキャプシドへの内包を検討した。

第 1 章では、本研究の背景、ならびに本研究の目的および構成について述べた。

第 2 章では、DNA を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、DNA を表面修飾した人工ウイルスキャプシドを創製するために、表面に配向する C 末端側に DNA(dA₂₀, dT₂₀) を連結した β -Annulus ペプチド

を分子設計した(図 1)。Fmoc 固相合成法を用いて C 末端から 2 残基目に Cys を有する β -Annulus-Cys ペプチドを合成した。次に、5'末端アミノ化 DNA (dA₂₀-(CH₂)₆-NH₂, dT₂₀-(CH₂)₆-NH₂) へ架橋剤

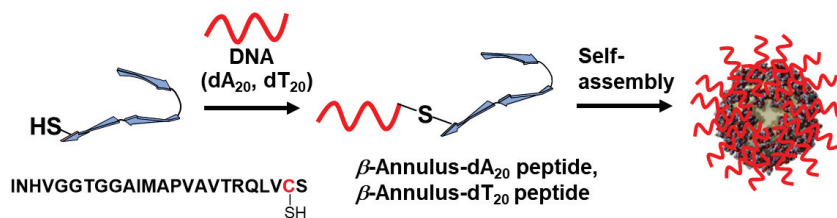


図 1. β -Annulus-dA₂₀ ペプチドの合成と自己集合

Sulfo-GMBS を縮合し、dA₂₀-maleimide および dT₂₀-maleimide を得た。その後、 β -Annulus-Cys peptide へ付加し、 β -Annulus-dA₂₀ ペプチドおよび β -Annulus-dT₂₀ ペプチドを合成し、逆相 HPLC による精製後、MALDI-TOF-MS によって同定した。10 mM phosphate buffer (pH 7.1)中の DLS 測定より、 β -Annulus-dA₂₀ ペプチド(25 μ M)は 41 ± 10 nm、 β -Annulus-dT₂₀ ペプチド(25 μ M)は 65 ± 20 nm の集合体を形成していることが示され、TEM 観察においても 50 nm 程度の球状構造体が確認された (図 2)。また、 β -Annulus-dA₂₀ ペプチド溶液 (25 μ M) 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。

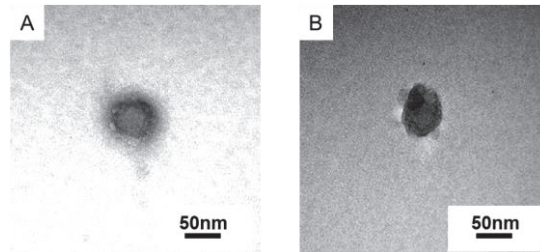


図 2. β -Annulus-dA₂₀ ペプチドおよび β -Annulus-dT₂₀ペプチドの TEM 像 (A) [β -Annulus-dA₂₀] = 25 μ M, (B) [β -Annulus-dT₂₀] = 25 μ M

β -Annulus-dA₂₀ ペプチド溶液 (25 μ M) と相補鎖を形成する Poly dT 溶液 (500 μ M) の混合溶液における CD スペクトル測定により、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

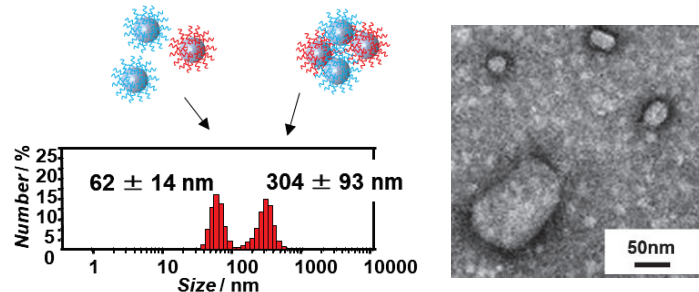


図 3. β -Annulus-dA₂₀ ペプチドと β -Annulus-dT₂₀ ペプチドの混合溶液から得られた DLS 測定における個数換算分布および TEM 像

を認識できることが示された。また、相補鎖を形成する dA₂₀ および dT₂₀ で修飾された人工ウイルスキャプシドを混合すると、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 (図 3)。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⁹⁾。

第 3 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について述べた。まず、短鎖 DNA を内包した人工ウイルスキャプシドを創製するために、内部に配向する N 末端側にジスルフィド結合を介して DNA を連結した β -Annulus ペプチドを分子設計した (図 4)。Fmoc 固相合成法を利用して N 末端に Cys を有する Cys- β -Annulus ペプチドを合成した。次に 5' 末端アミノ化 DNA (DNA-

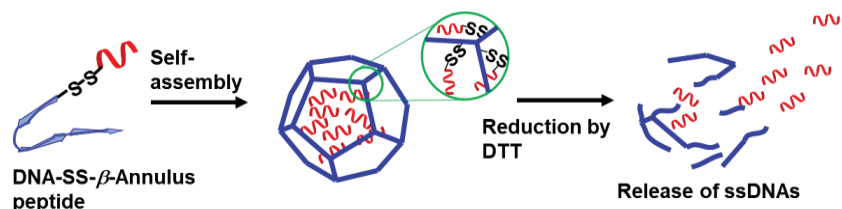


図 4. DNA-SS- β -Annulus ペプチドの自己集合と還元剤 DTT による短鎖 DNA の放出

(CH₂)₆-NH₂) へ架橋剤 SPDP を縮合し、PySS-DNA を得た。その後 Cys- β -Annulus ペプチドへ導入し、DNA-SS- β -Annulus ペプチドを合成し、逆相 HPLC による精製後、MALDI-TOF-MS によって同定した。10 mM phosphate buffer (pH 7.1)中の DLS 測定および TEM 観察より、DNA-SS- β -

Annulus ペプチドは 25-100 μM の濃度範囲で 30-50 nm の粒径の球状集合体を形成することが分かった (図 5)。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人工ウイルスキャプシドからの 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崩壊が確認された (図 6)。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を細胞内還元環境での放出制御が可能なデリバリー材料として利用できる可能性が示唆された¹⁰⁾。

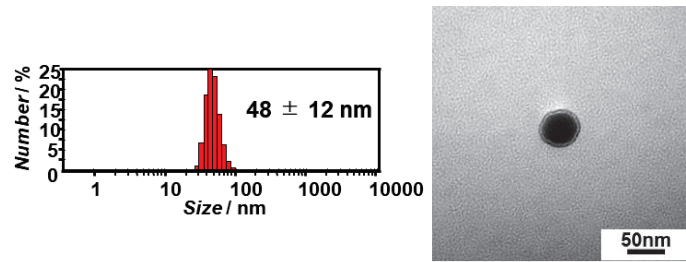


図 5. 50 μM DNA-SS- β -Annulus ペプチド 10 mM phosphate buffer (pH 7.1)溶液から得られた DLS 測定における個数換算分布および TEM 像

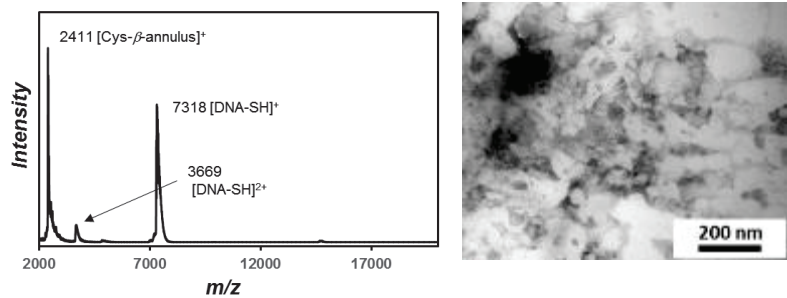


図 6. DTT 混合 2 時間後の DNA-SS- β -Annulus 溶液から得られた MALDI-TOF-MS(matrix: 3-HPA)および TEM 像

第 4 章では、人工ウイルスキャプシドへの mRNA の内包について述べた。3'末端に Poly A テールを有する mRNA を内包した短鎖人工ウイルスキャプシドを創製するために、内部に配向する N 末端側にジスルフィド結合を介して dT₂₀ を連結した β -Annulus ペプチドを分子設計した (図 7)。5'末端アミノ化 DNA (dT₂₀-(CH₂)₆-NH₂) へ架橋剤 SPDP を縮合し、PySS- dT₂₀ を得た。次に、N 末端に Cys を有する Cys- β -Annulus ペプチドへ導入して dT₂₀-SS- β -Annulus を合成し、逆相 HPLC による精製後、MALDI- TOF-MS によって同定した。PBS バッファ (pH 7.4)中の DLS 測定および TEM 観察により、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

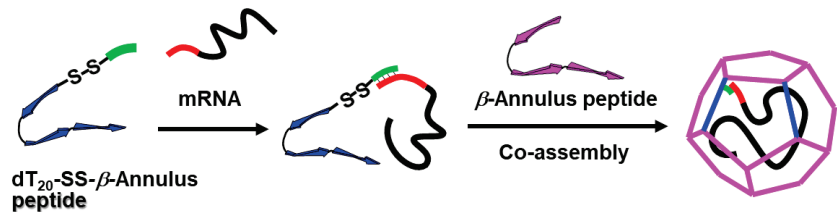


図 7. DNA-SS- β -Annulus ペプチドの自己集合と還元剤 DTT による短鎖 DNA の放出

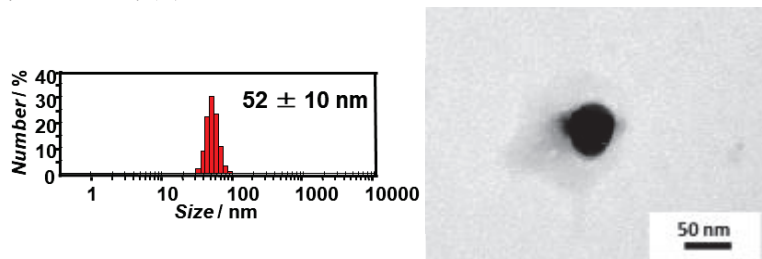


図 8. 共集合ペプチドと mCherry mRNA との混合溶液において得られた MALDI-TOF-MS (matrix: 3-HPA)および TEM 像

ところ、dT₂₀-SS- β -Annulus と β -Annulus との共集合ペプチドにおいて、mRNA のキャプシドへの内包が示さ

れた。一方、 β -Annulus ペプチド単体では、mRNA はキャプシドに内包されないことが示された。これらのことから、ジスルフィド結合を介して 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。

第 5 章では、本論文で得られた知見について総括した。

【参考文献】

- 1) (a) K. Matsuura, K. Watanabe, T. Matsuzaki, K. Sakurai, N. Kimizuka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 9662 (2010); (b) K. Matsuura, *Chem. Commun.*, **54**, 8944 (2018)
- 2) K. Matsuura, K. Watanabe, Y. Matsushita, N. Kimizuka, *Polym. J.*, **45**, 529 (2013)
- 3) K. Matsuura, G. Ueno, S. Fujita, *Polym. J.*, **47**, 146 (2015)
- 4) S. Fujita, K. Matsuura, *Org. Biomol. Chem.*, **15**, 5070 (2017)
- 5) K. Matsuura, T. Honjyo, *Bioconjugate. Chem.*, **30**, 1636 (2019)
- 6) S. Fujita, K. Matsuura, *Chem. Lett.*, **45**, 922 (2016)
- 7) S. Fujita, K. Matsuura, *Nanomaterials.*, **4**, 778, (2014)
- 8) K. Matsuura, T. Nakamura, K. Watanabe, T. Noguchi, K. Minamihata, N. Kamiya, N. Kimizuka, *Org. Biomol. Chem.*, **14**, 7869 (2016)
- 9) Y. Nakamura, S. Yamada, S. Nishikawa, K. Matsuura, *J. Pept. Sci.*, **23**, 636 (2017)
- 10) Y. Nakamura, H. Inaba, K. Matsuura, *Chem. Lett.*, **48**, 544 (2019)