総説

人工ペプチドによる自己集合性材料 —ウイルスキャプシドと光誘起ナノファイバー

松浦和則 鳥取大学大学院工学研究科

In nature, many types of nano-structures are formed spontaneously through the self-assembly of biomolecules. This review article describes recent progress in chemical strategies to design artificial protein and peptide assemblies. C_3 -symmetric peptide conjugates and viral β -annulus peptide fragments were developed to construct virus-like peptide nanocapsules. Spatiotemporal control of peptide nanofiber growth was also achieved by photocleavage of a DNA-conjugated β -sheet forming peptide.

self-assembly / peptide / artificial viral capsid / photo-induced nanofiber / β -sheet

1. タンパク質・ペプチドの自己集合によるナノ構造体

天然には、アクチン繊維、微小管、ウイルスキャプシド、クラスリンなどのタンパク質からなるナノ構造体が数多く知られている。これらは、生体内でタンパク質が自発的かつ規則的に自己集合して形成される生体超分子であり、マクロな運動や分子輸送などの重要な機能を担っている。近年、これらの天然のタンパク質ナノ構造体の自己集合戦略に学び、人工的にナノ構造体を形成するタンパク質を分子設計することが可能となってきた¹⁾。例えば、林らは、ヘム-ヘムポケット間の相互作用を利用して、ヘムタンパク質を一次元集合化させたナノ繊維構造を構築することに成功している²⁾。Wagner らは、二量化したジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) とその阻害剤 (MTX) の二量体の相互作用により、タンパク質ナノリング構造の形成を示している³⁾。Yeates らは、二量体形成タンパク質サブユニットと三量体形成タンパク質サブユニットを連結した融合タンパク質を設計し、これらが自己集合することでナノ四面体構造を構築している⁴⁾。最近、同グループは、三量体形成部位として KDPGal アルドラーゼを、二量体形成部位として FkpA タンパク質を有する融合タンパク質を創製し、ナノ立方体構造の構築にも成功している⁵⁾。

また、最近、 α -ヘリックスが束になったコイルドコイル構造などの自己集合性のペプチドユニットを人工的に設計することも可能となっている。Jerala らは、

二量体コイルドコイル構造によりペプチド鎖が折りたたまれるという「ペプチド折り紙」により、ナノ四面体構造を構築している⁶⁾。同年に Woolfson らは、コイルドコイルを形成するペプチドを連結したハブユニットを合成し、互いに相補的な二量体コイルドコイル形成により自己集合させることで、粒径約 100 nm のナノカプセルを形成することに成功している⁷⁾。

このように、分子設計したタンパク質・ペプチドの自己集合によるナノ構造体構築が世界的に注目されている中、筆者らのグループも 2005 年頃より、ペプチドの自己集合によるナノ構造体の構築を研究している。本総説では、その概要を紹介する。

2. 三回対称性ペプチドコンジュゲート

球状のウイルスキャプシドは、60 の倍数個のタンパク質サブユニットが自己集合することで形成される正 20 面体対称性を有するナノカプセルである。そのようなウイルスキャプシドは、一義的なサイズ・空間・会合数を有する大変魅力的な生体分子材料であることから、近年、治療用核酸・タンパク質・無機ナノ粒子などの内包・輸送や酵素反応場としての利用が盛んに行われている⁸⁾⁻¹⁰⁾。天然のウイルスキャプシドをそのまま、もしくは部分改変したものをナノテクノロジーに利用することは可能となってきた。しかし、その生産には宿主への感染・増殖を行ったり、ウイルスゲノムを大腸菌内で大量発現したりする必要が

図 1
三回対称性 β -シート形成ペプチドコンジュゲートの自己集合による球状集合体の構築。

あるのが現状である。もし、完全化学合成によりウイルス類似のナノ構造を構築できれば、分子設計の自由度が広がり、様々な機能性ナノカプセルをより簡便かつ大量に生産できるようになると思われる。

そこで筆者らは、ウイルスキャプシドには三回対称軸が含まれることから、三回対称性の β -シート形成ペプチドコンジュゲート Trigonal-(FKFE)₂ を設計・合成した (図 1)¹¹⁾。このコンジュゲートは、酸性水溶液中で逆平行 β -シート形成により自己集合し、約 19 nm の球状集合体を形成した。これは、正 12 面体構造をとったときに予想される粒径 (16 nm) に匹敵する粒径である。三回対称性でない (FKFE)₂ ペプチドでは、通常の β -シート形成ペプチドと同様に繊維状集合体を形成することから、球状集合体となったのは、三回対称性コンジュゲートの特徴であると言える。また、トリプトファンジッパー形成ペプチド (CKTWTWTE) を三回対称に配置したコンジュゲート (Trigonal-WTW) では、pH に応答して、約 30 nm の球状構造、繊維状構造、不定形構造に変化することを見出した¹²⁾。さらに筆者らは、天然トリペプチドであるグルタチオン γ -Glu-Cys-Gly を三回対称に配置したコンジュゲート (Trigonal-glutathione) も水中で自己集合し、100-250 nm 程度の球状構造体を形成することを見出している¹³⁾。

3. 人工ウイルスキャプシドの構築

上記の三回対称ペプチドコンジュゲートは、水中で自己集合することでウイルスサイズの球状集合体を与えるものの、集合体表面や内部への選択的化学修飾を施すのは困難であった。そこで、次に筆者らは、植物

図 2
(A) TBSV 由来 β -Annulus ペプチドの自己集合による人工ウイルスキャプシドの構築の模式図。(B) TEM 像。(C) DLS による粒径分布。

ウイルスの一種であるトマトブッシュスタントウイルス (TBSV) の正十二面体の内部骨格構造に着目した。この内部骨格は、三回対称性の β -Annulus モチーフから成っていることがわかっている。筆者らは、TBSV のキャプシドを構成しているコートタンパク質 (388 残基) のうち、 β -Annulus モチーフを構成している 24 残基のペプチド (INHVG GTGGAIMAPVAVTRQLVGS) を完全化学合成し、その自己集合挙動を検討した (図 2)¹⁴⁾。その結果、この β -Annulus ペプチドは、水中に溶解させるだけで自己集合し、30-50 nm の球状集合体を形成することが動的光散乱 (DLS) 測定および透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により明らかになった。また、放射光を用いた小角 X 線散乱 (SAXS) 測定により、 β -Annulus ペプチドは水溶液中において中空ナノカプセル構造を形成していることが明らかとなった。わずか 24 残基のウイルス由来ペプチド断片だけで、繊維状集合体や一分子折り畳み構造を形成することなく、ウイルス様のナノカプセル (人工ウイルスキャプシド) を選択的に形成したことは、驚くべき結果であると言える。

この人工ウイルスキャプシドの ξ 電位 (表面電荷) の pH 依存性を測定すると、 β -Annulus ペプチドの C 末端側の電荷のみが表面電荷に寄与し、N 末端側の電

図 3

(A) 人工ウイルスキャプシドへの DNA の内包の模式図. (B) シスプラチン染色 (DNA のみ染色) による TEM 像. (C) 酢酸ウラニル染色 (複合体全体染色) による TEM 像. (D) シスプラチン染色 TEM (青) と酢酸ウラニル染色 TEM (赤) から得られた粒径分布.

荷は影響を与えないことがわかった¹⁵⁾. つまり、ペプチドの N 末端側が内部を、C 末端側が表面側に配向していることが示され、中性 pH においては、ナノカプセル表面は両性イオン性であり、内側は陽イオン性であることが示唆された. 陽イオン性と思われる人工ウイルスキャプシドの内部には、ウラニンや 8-アニリノナフタレンスルホン酸ナトリウム (ANS) のような陰イオン性の色素が人工ウイルスキャプシド構造に影響を与えることなく内包されることがわかった. また、ポリアニオンである M13 phage DNA の人工ウイルスキャプシドへの内包を検討したところ、DNA 選択的染色剤 (シスプラチン) を用いた TEM 観察では、30 nm 程度の球状粒子が観察されたのに対し、酢酸ウラニルを用いた TEM 観察では、90 nm 程度の球状粒子が観察された (図 3). つまり、人工ウイルス殻内部に DNA が凝縮されて内包された二層構造が形成されていることが示唆された¹⁵⁾. さらに、 β -Annulus ペプチドの N 末端側に、ZnO 結合ペプチドを導入することで、蛍光性の ZnO ナノ粒子の人工ウイルス殻への内包にも成功している¹⁶⁾.

β -Annulus ペプチドの C 末端側が表面に配向していることが示唆されているので、C 末端側の化学修飾により、機能性分子を人工ウイルスキャプシド表面に提示することができると思われる. β -Annulus ペプチドの C 末端に金ナノ粒子 (5 nm) を結合させたコンジュゲートを合成し、臨界面会濃度以上の濃度となるように水中に分散させ、未集合の金ナノ粒子を透析で除いたところ、人工ウイルスキャプシドと同様の約 50 nm に金ナノ粒子が 30-60 個程度集合した構造が TEM で

図 4

(A) 金ナノ粒子修飾人工ウイルスキャプシドの構築の模式図. (B) TEM 像. (C) DLS から求めた粒径分布.

図 5

(A) 光応答性アミノ酸を有する β -sheet 形成ペプチド-DNA コンジュゲート 1 の光誘起ナノファイバー形成の模式図. (B) 照射前の 1 の TEM 像. (C) 照射後に形成したナノファイバーの TEM 像.

観察された (図 4)¹⁷⁾. 未修飾の人工ウイルスキャプシドの pH 4.6 における ζ -電位は 0.01 ± 3.43 mV であるのに対し、金ナノ粒子で被覆された人工ウイルスキャプシドの pH 4.6 における ζ -電位は -30.5 ± 9.8 mV であり、金ナノ粒子のみの場合と同程度の電位であった. これらのことから、金ナノ粒子が人工ウイルスキャプシド表面に提示されていることが示唆される. さらに最近、同様の戦略により、ヒト血清アルブミン (HSA) や DNA などを人工ウイルスキャプシドに表面修飾できることもわかってきている.

4. ペプチドナノ繊維の光誘起成長制御

ペプチドの自己集合によるナノ構造形成を、何らかの刺激に応答するようにできれば、ナノ構造形成・崩壊を動的に制御することも可能となる. これまで、光応答性アミノ酸を組み込んで、光刺激によるペプチドナノファイバーの自己集合を制御した例があるが、ペ

プチド自己集合の時間と空間を光制御した例は報告されていなかった。筆者らは、集合抑制部位および空間制御部位としての DNA (dA_{20}) と β -sheet 形成能を持つ FKFEFKFE ペプチドを、光応答性アミノ酸を介して連結したコンジュゲート **1** を分子設計した (図 5)¹⁸⁾。このコンジュゲート **1** は、水溶液中で DNA のアニオン性のために自己集合が抑制されているが、光照射 (365 nm) することによりペプチド部位が離脱し、それらが自己集合することでペプチドナノファイバーが形成することが示された。また、相補的な DNA である dT_{20} を固定したガラス基板上でハイブリダイゼーションさせ光照射した場合、選択的にペプチドナノファイバーが成長することを見出した。つまり、光によるペプチドナノファイバー成長の時空間制御に成功したと言える。人工の外部刺激により分子集合体の形成を誘起することで、任意のタイミング・場所でタンパク質や細胞の足場を形成することが可能となり、新しい刺激応答性バイオマテリアルとなると思われる。

5. おわりに

本総説では、筆者らが開発してきた三回対称ペプチドコンジュゲートやウイルス由来 β -Annulus ペプチドの自己集合により、ウイルス様ペプチド集合体を構築できることを示した。このような分子設計したペプチドによる人工ウイルスキャプシドは、ドラッグデリバリーシステム、遺伝子デリバリー材料、蛍光イメージング材料、人工ワクチンとして応用できるかもしれない。また、DNA-ペプチドコンジュゲートの主鎖の光切断反応によるペプチド繊維成長の時空間制御システムについても概説した。このような光刺激がトリガーとなりナノ構造形成が促進されるシステムは、天然のタンパク質システムには無く、人工系ならではの特徴であり、光応答性の細胞培養基剤などへの応用が期待できる。今後、分子設計技術の発展により、様々なタンパク質・ペプチドの自己集合による機能性ナノ構造体が開発されることが期待される。

文 献

- 1) Matsuura, K. (2014) RSC Adv. **4**, 2942-2953. DOI: 10.1039/C3RA45944F.
- 2) Kitagishi, H. *et al.* (2007) J. Am. Chem. Soc. **129**, 10326-10327. DOI: 10.1021/ja073295q.
- 3) Carlson, J. C. T. *et al.* (2006) J. Am. Chem. Soc. **128**, 7630-7638. DOI: 10.1021/ja060631e.
- 4) Padilla, J. E. *et al.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 2217-2221. DOI: 10.1073/pnas.041614998.
- 5) Lai, Y.-T. *et al.* (2014) Nat. Chem. **6**, 1065-1071. DOI: 10.1038/nchem.2107.
- 6) Gradišar, H. *et al.* (2013) Nat. Chem. Biol. **9**, 362-366. DOI: 10.1038/nchembio.1248.
- 7) Fletcher, J. M. *et al.* (2013) Science **340**, 595-599. DOI: 10.1126/science.1233936.
- 8) Douglas, T., Young, M. (2006) Science **312**, 873-875. DOI: 10.1126/science.1123223.
- 9) Steinmetz, N. F., Evans, D. J. (2007) Org. Biomol. Chem. **5**, 2891-2902. DOI: 10.1039/B708175H.
- 10) Bronstein, L. M. (2011) Small **7**, 1609-1618. DOI: 10.1002/smll.201001992.
- 11) Matsuura, K. *et al.* (2005) J. Am. Chem. Soc. **127**, 10148-10149. DOI: 10.1021/ja052644i.
- 12) Matsuura, K. *et al.* (2011) Chem. Commun. **47**, 265-268. DOI: 10.1039/C0CC01324B.
- 13) Matsuura, K. *et al.* (2009) Soft Matter **5**, 2463-2470. DOI: 10.1039/B819472F.
- 14) Matsuura, K. *et al.* (2010) Angew. Chem. Int. Ed. **49**, 9662-9665. DOI: 10.1002/anie.201004606.
- 15) Matsuura, K. *et al.* (2013) Polymer J. **45**, 529-534. DOI: 10.1038/pj.2012.235.
- 16) Fujita, S., Matsuura, K. (2014) Nanomaterials **4**, 778-791. DOI: 10.3390/nano4030778.
- 17) Matsuura, K. *et al.* (2015) Polymer J. **47**, 146-151. DOI: 10.1038/pj.2014.99.
- 18) Furutani, M. *et al.* (2015) Chem. Commun. **51**, 8020-8022. DOI: 10.1039/c5cc01452b.

松浦和則

松浦和則 (まつうら かずのり)

鳥取大学大学院工学研究科教授

1996 年東京工業大学大学院生命理工学研究科博士課程修了。博士 (工学)。同年名古屋大学工学研究科助手。2001 年九州大学工学研究科助教授。07 年同准教授。06-10 年 JST さきがけ研究員 (兼任)。12 年より現職。

研究内容: 生体分子組織体の構築

連絡先: 〒 680-8552 鳥取市湖山町南 4-101

E-mail: ma2ra-k@chem.tottori-u.ac.jp

URL: <http://www.chem.tottori-u.ac.jp/~matsuura/>