ソフトな高分子複合体によるバイオ分子の構造・機能制御

Soft Polymer Complexes to Engineer Biopolymer Assemblies and Functions

丸山 厚

東京工業大学生命理工学院
〒226-8501
横浜市緑区長津田町 4259 B-57

Atsushi MARUYAMA
Department of Life Science and
Technology, Tokyo Institute of
Technology

Nagatsuta 4259 B-57, Midori,
Yokohama 226-8501, Japan

嶋田 直彦

東京工業大学生命理工学院
〒226-8501
横浜市緑区長津田町 4259 B-57

Naohiko SHIMADA
Department of Life Science and
Technology, Tokyo Institute of
Technology

Nagatsuta 4259 B-57, Midori,
Yokohama 226-8501, Japan

論文要旨：生体高分子は、特定の高次構造（Native な構造）に折りたたまれ（フォールディング）、場合によっては多分子組織化（アッセムブリング）し、多岐な生体機能を発現する。我々は、生体高分子の構造形成を制御することを目的に、イオン電荷を持つ主鎖と親水性の側鎖からなるくし型共重合体を設計した。共重合体は、反対電荷を持つ生体高分子と可溶性の高分子電解質複合体（IPEC）形成を介し、生体高分子間の静電反発を抑制し、その構造形成を促した。たとえば核酸の二重鎖、三重鎖および四重鎖形成速度を共重合体は顕著に高めた。共重合体のこのような効果は、分子ビーコンや核酸酵素などの機能性核酸の活性を高めるのに有用であった。共重合体は、電荷を持つペプチドのフォールディングも促しその機能を向上させた。脂質膜破壊活性を持つ E5 ペプチドの活性な構造への転移を促し、その膜破壊活性を顕著に高めることがわかった。イオン性くし型共重合体を基盤としたソフトで可溶性の IPEC 形成は、生体高分子の活用を広げると期待される。

Abstract: Correct folding and assembling are essential for biopolymers to exhibit their inherent biological activities. We have designed ionic comb-type copolymers consisting of a polyion backbone and hydrophilic graft chains to engineer folding and assembling of biopolymers, such as DNA and peptides, having opposite ionic charges. The cationic copolymer formed soluble and soft inter-polyelectrolyte complex (IPEC) with DNA and acidic peptides. The copolymers significantly facilitate nucleic acid assembly including DNA duplex, triplex and quadruplex formations. Activities of functional DNAs such as molecular beacons and DNazymes were enhanced by the copolymer. The cationic comb-type copolymers also facilitated folding of peptides having anionic charges. E5 peptide, a membrane active peptide, was folded into alpha-helical structure by the added copolymer. The copolymer/peptide mixture showed stronger membrane disrupting activity than peptide alone. Soluble and soft IPECs produced with the ionic comb-type copolymer are promising to improve function and applications of biopolymers.

Key words: inter polyelectrolyte complex, comb-type copolymer, DNA, peptide, folding

1 はじめに

生体高分子は人工の高分子では到底真似の出来ない優れた機能を発現する。それらには、触媒機能、分子認識機能、情報伝達機能、物質輸送機能などが含まれる。生体高分子のこれらの機能を利用し、産業や医療に活かすことは古くから行われており、様々な人工分子との複合

化による機能付加を目指したバイオコンジュゲート化学の概念も確立されている。

タンパク質や核酸（特に RNA）などの生体高分子は、特定の高次構造（Native な構造）に折りたたまれ（フォールディング）、時には多分子組織化（アッセムブリング）し、分子認識、触媒、情報伝達などの機能を発現する（Fig. 1）。逆に、高次構造が乱れるとその活性が失われる。このような状態を変性状態と呼んでいる。生体内では分子シャペロンと呼ばれるタンパク質が核酸やタンパク質

連絡者：丸山 厚
E-mail : amaruyama@bio.titech.ac.jp

Fig. 1 生体高分子の折りたたみをそれに働く分子間力

のフォールディングやアッセムブリングを介助している。著者らは、生体分子の折りたたみや集合体形成を合成高分子との複合体形成を介して制御し、その機能を高める試みを、特に高分子電解質複合体 (IPEC) に着目して検討してきた。本稿では、核酸やペプチドを対象とした例を紹介する。

2 ソフトな高分子電解質複合体の設計と核酸ハイブリッドの形成制御

Fig. 1 に示すように、生体高分子の高次構造は疎水性相互作用、静電的相互作用、水素結合などの非共有結合的な相互作用などが多点で働くことで形成・安定化されている。なかでもタンパク質では、疎水的な相互作用がフォールディングや変性の駆動力として重要な働きをしている。DNA や RNA のような核酸は、繰り返し単位毎にリン酸基をもつ。高い密度で負電荷を持ち、その高分子電解質としての特性がフォールディングやアッセムブリングに強く影響する。これは、対イオン凝縮理論によって説明されているが、端的に言えば、同じ電荷が高密度になる構造 (コンフォメーション) は低密度のものに比べ不安定となる。共存する塩の濃度が高くなると静電反発が遮蔽されその安定性の差は小さくなる。具体的に核酸の二重らせん形成 (ハイブリダイゼーション) を例にとると、二重らせん状態ではリン酸イオン基の密度が単鎖の時より高くなるので、高分子電解質としての性質からは二重らせん形成は不利な構造となる。しかし NaCl や $MgCl_2$ などの共存塩を増やすことで、二重らせんが安定化される。この時、一価の Na イオンより二価の Mg イオンがより低濃度で働く。より多価のカチオン、つまりカチオン性の高分子 (ポリカチオン) を用いれば、より効果的に二重らせん形成を促進できるはずである。答えは、イエスでありノーである。ポリリシンをはじめ

とするポリカチオンはナノモルオーダー以下の極めて低濃度でも核酸と IPEC を形成し、低濃度でも核酸間の静電反発が遮蔽できる。しかし、複合体は脱水和、コンパクトな形態に凝縮し、不溶化する。既に二重らせんを形成していれば不溶化するものの結果的には二重らせんが安定化する。一方、二重らせんを形成する核酸のそれぞれが単鎖状態で IPEC 形成し不溶化すれば、単鎖間の出会う頻度は著しく低下し、二重らせん形成は困難となる。したがって、ポリカチオンを利用し核酸の構造形成を制御するためには、ポリカチオンの性質に工夫を加える必要が生じる。1 つは、IPEC 形成時の溶解性の向上、もう 1 つはポリカチオンと核酸との相互作用が核酸の特異的な認識や構造形成を損なわないようにする点である。ポリカチオンと核酸との IPEC の性状を制御するために、Fig. 2 に示すようなくし型共重合体を設計した。親水性の高分子をイオン性の高分子鎖の主鎖に枝状に配することで、核酸との IPEC の可溶性を高めるとともに、ポリカチオン主鎖と核酸との相互作用を側鎖により調整する狙いである。ポリリシン (PLL) をカチオン性主鎖、デキストラン (Dex) を親水性の側鎖とした場合、共重合体中のデキストランの重量組成を 80% 以上にした時、凝縮を伴わない可溶性の IPEC が得られた¹⁾。一分子観察からは核酸のランダムコイル状の溶存状態が、円二色性 (CD) スペクトルからは核酸の二次構造が、それぞれ複合体を形成しても保持されていることが確認された。PLL と Dex からなるくし型共重合体 (PLL-g-Dex) を DNA 集合体の安定性に与える効果を検討したところ、共重合体は二重らせん DNA の融解温度を約 20℃、三重らせんは約 50℃ 高めることがわかった²⁾。さらに共重合体の効果を、熱力学および速度論的に検討した結果、共重合体は核酸ハイブリッドの形成速度を高め、安定化することがわかった³⁾。核酸の化学修飾など様々

・ 親水性側鎖を配したイオン性くし型共重合体

- i. 反対電荷を有する生体高分子と可溶性高分子電解質複合体の形成
- ii. 生体高分子のイオン間反発の遮蔽
- iii. 生体高分子の折りたたみ、集合の促進
- iv. 生体高分子の機能制御

Fig. 2 イオン性くし型共重合体によるソフトな高分子電解質複合体形成

な手法で核酸ハイブリッドの安定化が試みられているが、その多くはハイブリッド解離速度を低下させるものであり、共重合体に見られた速度論的效果はきわめてユニークなものである⁴⁾。核酸ハイブリッドの安定性に与える共存塩濃度依存性は、共重合体存在下では抑制される。つまり、共重合体は核酸間の静電反発を抑制することで、核酸をあたかも非イオン性の生体高分子として振る舞わせることがわかった⁵⁾。

3 くし型共重合体による機能性核酸の機能向上

核酸は任意の塩基配列のものが容易に合成可能になり、核酸そのものを機能材料とする研究が幅広く展開されている。それらには、核酸の配列特異的な自己組織化能を利用したものが多岐にわたる (Fig. 3)。もっとも頻繁に利用される例が、核酸解析のために利用する核酸プローブだろう。ほかにも、核酸のナノメートルオーダーでの構造緻密性を利用したナノ構造体の構築、さらにハイブリッド形成の可逆性を利用した核酸分子マシンや分子コンピューター、核酸そのものを医薬として活用する核酸医薬がある。また生化学的機能として酵素活性や受容体としての役割が、核酸に新たに見いだされており、機能材料としての核酸は年々広がりを増している。これら機能性核酸の性能を向上させるために、核酸ハイブリッドの安定性の向上やその形成速度を高める手法が求められるケースは多い。核酸プローブの一つに分子ビーコン (MB) がある (Fig. 4)。これは、両端に相補的な配列をもつステムループ型の核酸配列に、蛍光色素と消光基を修飾したものである。ステムループ状態では、蛍光色素と消光基が近接することで、蛍光色素からの発光が消光される。MB と相補的な配列を持つ標的となる核酸が存在すると、MB は標的核酸とハイブリッドを形成する。この時、蛍光色素と消光基が離れ、蛍光が回復する。つまり、標的核酸を蛍光強度の変化として検出す

ることができる。分子ビーコン法の感度を高めるために、浅沼らによりインステム型分子ビーコン (ISMB) が開発された⁶⁾。従来の MB がステム末端に蛍光色素および消光基を配しているのに対し、ステム内部に両者を配置することで、消光効果を高めるとともに蛍光色素・消光基の数を増やすことが可能となり、結果的に標的核酸に対する検出感度が向上できる。MB 法の共通の短所は、標的核酸とのハイブリッド形成速度や形成率がステム構造の存在により低くなり、結果的に検出感度に制約を与えることである。そこで、カチオン性共重合体 PLL-g-Dex により MB 法のさらなる改善を検討した。その結果を Fig. 5 に示す。共重合体を存在させた場合、MB と標的核酸とのハイブリッド形成が概ね 100 倍と顕著に速くなり、短時間で高いシグナルが得られた。結果的に、ISMB と共重合体を組み合わせることで、最も高い感度の MB システムが構成された⁷⁾。

DNA や RNA からなる核酸酵素も様々な応用が期待される機能性核酸である。とりわけ DNA からなる核酸酵素 (Deoxyribozyme, DNAzyme) は、調製が容易で安価、化学的・生化学的安定性が高く、様々な化学修飾もしやすい点で注目されている。なかでも RNA 切断活性、つまりリボヌクレアーゼ活性を持つ DNAzyme は、高い酵素活性を発現するものが試験管内進化法により取得されており、核酸医薬、バイオセンサーなどへの応用が精力的に取り組まれている。リボヌクレアーゼ活性を持つ DNAzyme の反応経路を Fig. 6 に示す。まず、DNAzyme の基質結合アームが基質となる RNA 配列とハイブリッドを形成し、酵素・基質複合体 (ES) を形成する。その後、2 価カチオン (M^{2+}) を補触媒として、基質 RNA を配列特異的に切断する。次に、酵素・生成物 (EP) が解離し、DNAzyme は新たな基質と ES を形成することで切断反応を繰り返す。これまでに得られている DNAzyme は、基質に対して酵素が過剰に存在

Fig. 3 核酸のナノ (バイオ) テクノロジーへの応用

Fig. 4 核酸プローブとしての分子ビーコン

Fig. 5 MB法におけるカチオン性くし型共重合体 (PLL-g-Dex) の促進効果

Fig. 6 リボスクレアーゼ活性を持つ DNAzyme の反応経路

する条件では、高い酵素活性を示す。一方、基質が酵素に対して過剰に存在する条件下では、活性が大きく低下するものが多い。これは、EPが安定なため、その解離が遅く、酵素のターンオーバー効率が低いことに起因する。EPの解離は、反応温度を高めることで速めることが可能であるが、温度を上げるとESの形成速度が低下するというジレンマに陥る。DNAzyme反応のターンオーバー効率を高めるためには、核酸ハイブリッドの形成・解離のダイナミクスを速める手法が必要となる。すでにPLL-g-Dexには、こうしたハイブリッド形成のダイナミクスを高めることが見いだされており⁸⁾、DNAzyme反応のターンオーバー効率を高める上でも有効と推測された。そこで、PLL-g-DexのDNAzyme反応に与える効果を検討した。その結果、共重合体は、酵素過剰な条件下では酵素反応に影響しないものの、基質過剰条件下では酵素反応速度を顕著に促進し、PLL-g-Dexがターンオーバー過程を速めることが明らかとなった⁹⁾。さらに、共重合体の効果を、DNAzyme反応を利用した核酸センサー (MNAzyme) にも適用した。MNAzymeは、標的核酸の存在を、酵素反応を利用し

Fig. 7 MNAzyme 型核酸センサーに対するカチオン性くし型共重合体の効果

て化学増幅しつつ検出することができる核酸からなる核酸センサー分子である。核酸の検出反応では、PCR がシグナル増幅できる手法として頻繁に利用されているが、PCR にはタンパク質酵素、ヌクレオチド三リン酸など低温保存が必要な試薬のほか、サーマルサイクラーと呼ばれる装置による厳密な加熱・冷却制御が不可欠である。一方、MNAzyme 型のセンサーは、核酸配列のみで構成され、温度制御も単純で良い。つまり、検査機関外の Point-of-Care での検査が可能となり、水際の感染症対策等に有利である。Fig. 7 は、標的となる核酸の濃度を変化させ、MNAzyme 反応を共重合体存否で比較した結果である。共重合体 PLL-g-Dex の不在下では、50 nM の標的核酸を辛うじて検出できるが、2 nM ではバックグラウンドシグナルと判別不能であった。これに対して、共重合体存在下では、2 nM 標的核酸を数分で、20 pM の標的も数十分で検出可能となり、共重合体を存在させることで MNAzyme 型核酸センサーの感度を数 100 倍高められることが見いだされた¹⁰⁾。このほかにも共重合体は、核酸タイピング法¹¹⁾や核酸ナノマシン¹²⁾の機能向上にも有用であることがわかっている。

4 カチオン性くし型共重合体によるペプチド構造・機能制御

核酸で見出された共重合体の機能は、核酸以外の生体高分子にも展開可能と考えられた。そこで、多価の負電荷をもつペプチドに着目した。E5 ペプチドは、インフルエンザウィルスの膜タンパク質であるヘマグルチニンの脂質膜破壊部位を模倣した 20 アミノ酸残基からなる酸性ペプチドで、5 残基のグルタミン酸を含む酸性ペプチドである。インフルエンザウィルスは、この細胞膜破壊活性を利用して細胞内へと感染する。E5 は、中性 pH ではランダムコイル構造であるが、酸性 pH ではグルタミン酸側鎖のカルボキシル基のイオン解離が抑えられ、

E5: GLFEAIAEFIEGGWEGLIEG

Fig. 8 脂質膜破壊活性を持つ E5 ペプチドの構造

静電反発の解消とともに α -ヘリックス構造に転移する。この時、両親媒性のヘリックス構造を形成することで膜破壊活性を発現する (Fig. 8)。近年核酸医薬やタンパク質医薬が注目されているが、その中には細胞内への送達を必要とするものも多い。E5 のような脂質膜破壊性ペプチドは、ドラッグデリバリーの研究領域では、細胞内デリバリーの分子ツールとしてその利用が検討されている。しかし、これらのペプチドは、元来疎水性が高いことで溶解性に乏しく、酸性下では凝集するとともにヘリックス構造への転移が阻害され、結果的にその機能も低下してしまう問題点がある。つまり、E5 ペプチドの膜破壊活性を高めるためには、溶解性を維持したまま両親媒性ヘリックス構造への転移を促す必要があると考えられた。そこで、反対の電荷を持つカチオン性くし型共重合体によりペプチドの構造転移を促し、機能の向上を図れないか検討した¹³⁾。まず E5 ペプチドの構造転移に及ぼす共重合体の効果を調べた。Fig. 9 には円二色性 (CD) スペクトルにより E5 ペプチドの構造を調べた結果を示す。E5 ペプチド溶液の pH を中性から徐々に低下させると、220 nm での CD シグナルはやや負に強くなるが、明確な α -ヘリックスを示すシグナルは見られなかった。一方で溶液の散乱が強まりペプチドが酸

性化に伴い凝集・不溶化することが確認された。これに対し、ペプチド溶液にカチオン性くし型共重合体（ポリアリルアミン（PAA）-g-Dex）を加えていくと、CD シグナルは典型的な α -ヘリックスのパターンを示した。このとき溶液の散乱は変わらず、共重合体がペプチドの溶存性を保ちつつ α -ヘリックスへと転移させたことを示す。共重合体が E5 のグルタミン酸側鎖間の静電反発を遮蔽し、中性 pH でもヘリックスへの転移を促し、かつその溶存性を Dex 側鎖の効果で維持させた結果である。共重合体は E5 ペプチドの活性構造への転移を促し、かつその溶存性を維持したことから、ペプチドの膜破壊活性を高めることが期待される。そこで、脂質小胞（リポソーム）に対する膜破壊活性を調べた。Fig. 10 は、色素を内包したリポソームからの色素の漏出により、膜破壊活性を調べた結果である。まず E5 が膜破壊活性を示すといわれている pH5.4 で調べると、確かに E5 は色素の漏出を促し、膜を破壊することがわかる。しかし、その活性はくし型共重合体存在下で行うと、顕著に高め

られた。次に、中性 pH で同様な実験を行った。E5 は中性 pH では全く膜破壊活性を示さなかったが、共重合体存在下では高い膜破壊活性が誘導された。共重合体が溶存性とヘリックスへの転移を促すことで E5 ペプチドの機能を高めた結果と考えられる。このような共重合体のペプチド機能強化効果が、細胞膜に対しても発揮されるか検討を加えた。Fig. 11 は、ヒト白血病細胞株 HL-60 細胞に対する細胞膜破壊活性を、乳酸脱水素酵素の細胞内からの漏出で調べた結果である。E5 のみでは pH5.4 においても膜破壊活性が見られないが、共重合体が共存すると強い活性が観察された。同様に、中性 pH でも E5 と共重合体共存下でのみ活性が見られた。いずれの pH でも E5 のペプチド配列をスクランブル化した E5sc を E5 の代わりに用いると、全く活性が見られなくなり、共重合体が E5 のフォールディングや溶存性を高め、その構造特異的な機能を増強したことが示される。

リポソーム膜と細胞膜の双方に対し共重合体がペプチ

Fig. 9 E5 ペプチドの構造に及ぼすカチオン性くし型共重合体（PAA-g-Dex）の効果

Fig. 10 E5 ペプチドの膜破壊活性に及ぼすくし型共重合体の効果

Fig. 11 E5 ペプチドの膜破壊活性に及ぼすくし型共重合体の効果

ド機能を強化することがわかった。興味深いことの1つは、共重合体により E5 の活性を中性 pH 下でオン・オフ制御できることである。新しい機能性ペプチドシステムとしての可能性が示唆される。実際、共重合体とペプチドの複合体を形成・解離することで、脂質膜の構造を可逆的に制御できることが見いだされている¹⁴⁾。

最近、医薬としてもペプチドが注目されている。その際も、ペプチドのフォールディング制御と溶存性の維持が課題となることが多い。共重合体で見いだされた機能は、ペプチド医薬の領域にも波及できると考えられる。

5 おわりに

高分子電解質複合体の溶存性を高め、かつ生体高分子との相互作用を制御する目的で、親水鎖を配したイオン性くし型共重合体を設計した。単純な作業仮説であるが、予想を超える効果を核酸やペプチドを対象として見い出すことができた。これらの例で興味深い点は、くし型共重合体は比較的強く生体高分子と相互作用するが、1) その相互作用が生体高分子独自の構造を損なわないこと、2) 共重合体と生体分子の相互作用が、生体分子間、たとえば核酸間やペプチドと脂質膜間の相互作用を見かけ上は阻害せず、むしろそれらの相互作用を促している点である。DNAzyme で見れば、共重合体は触媒活性に必要な核酸の二次構造を損なわず、同様に触媒活性に不可欠な二価カチオンの核酸への配位に強く影響しない点

が挙げられる。くし型共重合体で形成される可溶性の複合体の特徴は、局所的には複合体の形成・解離を許すダイナミクスを持つソフトな一面であろう。このことで核酸やペプチド自体の固有の分子特性を犠牲にすることなく、その機能を高めるものと推察される。このようなソフトな高分子複合体の特徴を、さらに広く展開できればと願っている。

文 献

- 1) Y. Sato, Y. Kobayashi, T. Kamiya, H. Watanabe, T. Akaike, K. Yoshikawa, A. Maruyama, *Biomaterials*, **26**, 703 (2005). N. Sonda, M. Hirano, N. Shimada, A. Kano, S. Kidoaki, A. Maruyama, *Chem. Lett.*, **40**, 250 (2011). A. Maruyama, N. Sonda, K. Yamasaki, S. Kidoaki, N. Shimada, M. Maeshiro, M. Miyazaki, *Curr. Nanosci.*, **10**, 185 (2014).
- 2) A. Maruyama, M. Katoh, T. Ishihara, T. Akaike, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 3 (1997). A. Maruyama, H. Watanabe, A. Ferdous, M. Katoh, T. Ishihara, T. Akaike, *Bioconjugate Chem.*, **9**, 292 (1998).
- 3) H. Torigoe, A. Ferdous, H. Watanabe, T. Akaike, A. Maruyama, *J. Biol. Chem.*, **274**, 6161 (1999). L. Wu, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, *Soft Matter*, **4**, 744 (2008).
- 4) H. Torigoe, A. Maruyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1705 (2005). H. Torigoe, A. Maruyama, S. Obika, T. Imanishi, T. Katayama, *Biochemistry*, **48**, 3545 (2009).
- 5) A. Maruyama, Y. Ohnishi, H. Watanabe, H. Torigoe, A.

- Ferdous, T. Akaike, *Colloids Surf. B*, **16**, 273 (1999).
- 6) H. Kashida, T. Takatsu, T. Fujii, K. Sekiguchi, X. Liang, T. Takase, Y. Yoshida, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 7044 (2009). Y. Hara, T. Fujii, H. Kashida, K. Sekiguchi, X. G. Liang, K. Niwa, T. Takase, Y. Yoshida and H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 5502 (2010).
- 7) H. Asanuma, T. Osawa, H. Kashida, T. Fujii, X. Liang, K. Niwa, Y. Yoshida, N. Shimada, A. Maruyama, *Chem. Commun.*, **48**, 1760 (2012).
- 8) W. J. Kim, T. Ishihara, T. Akaike, A. Maruyama, *Chem. Eur. J.*, **7**, 176 (2001). W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12676 (2002). R. Moriyama, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, *Biomaterials*, **32**, 2351 (2011). R. Moriyama, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, *Biomaterials*, **32**, 7671 (2011).
- 9) J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, *Biomater. Sci.*, **3**, 308 (2015).
- 10) J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, *Biomater. Sci.*, **3**, 716 (2015).
- 11) W. J. Kim, Y. Sato, T. Akaike, A. Maruyama, *Nat. Mater.*, **2**, 815 (2003). K. Yamana, Y. Fukunaga, Y. Ohtani, S. Sato, M. Nakamura, W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, *Chem. Commun.*, **19**, 2509 (2005).
- 12) S. W. Choi, N. Makita, S. Inoue, C. Lesoil, A. Yamayoshi, A. Kano, T. Akaike, A. Maruyama, *Nano Lett.*, **7**, 172 (2007). J. Du, L. Wu, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, *Chem. Commun.*, **49**, 475 (2013).
- 13) N. Shimada, H. Kinoshita, S. Tokunaga, T. Umegae, N. Kume, W. Sakamoto, A. Maruyama, *J. Controlled Rel.*, **218**, 45 (2015).
- 14) N. Shimada, H. Kinoshita, T. Umegae, S. Azumai, N. Kume, W. Sakamoto, M. Kaya, H. Higuchi, A. Maruyama, *Manuscript in preparation*.