

博士論文

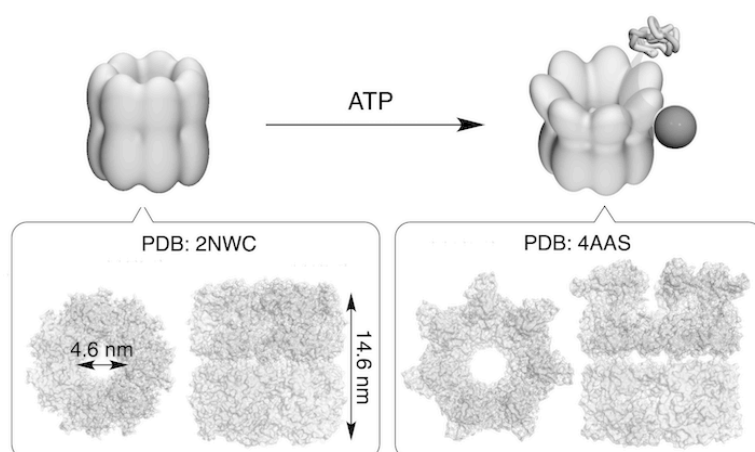
Nanostructure Engineering toward Medicinal  
Application

(医学的応用に向けたナノ構造の開発)

沈 昇賢

## 【1】緒言

多くの生体内での反応はナノスケールの構造体間の相互作用により駆動されている。代表例として、核酸やタンパクの巨大な超分子複合体であるリボゾームがあげられる。核酸からポリペプチドへの翻訳プロセスが高い精度でなされるという、この例から見られるように、自然のナノ構造体は人工的に設計できる物に比べてはるかに精緻で優れた機能を達成している。この数十年間、自然界のナノ構造体を理解し、模倣しようと多くの研究がなされてき

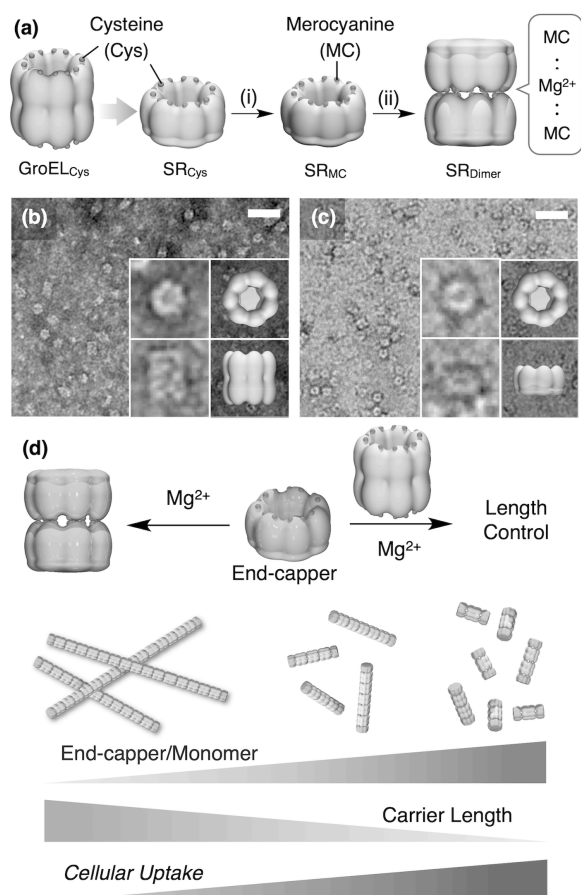


**Figure 1.** Structure of Chaperonin GroEL and its role of refolding denatured protein fueled by ATP.

た。特に超分子化学という分野はこの点において目覚ましい進歩を達成しており、注目を集めている。特に、タンパク質などの機能を持つ自然のナノ構造体を超分子重合のモノマーとして用いる戦略が長い間試みられてきたが、実現できた例は大変少ないのが現状である。一方で、相田、ビスワスらは 2009 年に大腸菌由来の GroEL タンパクに遺伝的変異・化学的修飾をすることで、タンパクナノチューブの構築に成功した。<sup>[1],[2]</sup> GroEL は二つの中空樽形構造が壁を隔てて繋がった構造を有する。この構造は ATP の加水分解をエネルギー源として構造変化し、変性タンパク質の再折りたたみを促進する (Figure 1)。このようなナノ構造タンパクから超分子重合体を構築することは、応用の面で大きく二つの意味を持つ。一つは、外部から隔離された 1 次元に続いた穴にゲストを取り込むことで、ゲストの安定な 1 次元連続構造体を構築する可能性である。もう一つは、ATP に応答して形を変える特性を利用することで、ATP 濃度が高い領域での特異的な構造体の崩壊、及びそれに伴うゲストの放出を期待できる点である。機能性ナノ構造の開発・応用は現代化学において大変重要であるが、ナノスケールで起きる相互作用に対する理解は未だ不十分であり、社会的な要求に比べて 成功例が今尚非常に少ないと言える。

このような背景を踏まえ、本研究は医学応用可能なナノ構造の構築・応用を目的とし、4 項目から構成される。(1) 新たな GroEL 変異体を設計することにより、GroEL ナノチューブの長さの調節に成功するとともに、ナノチューブの長さと細胞内の取り込み率の関係性を始めて見出した。(2) 超磁性ナノ粒子を含む GroEL ナノチューブの構築に成功するとともに、磁場によってチューブが可逆的に側方相互作用をする現象を見出した。(3) siRNA を含むナノチューブ構造体を構築し、内在的的化学シグナルの ATP やグルタチオンに応答して分解することを利用し、癌組織特異的な遺伝子治療剤の配送が可能であることを示した。(4) 鉄ナノ粒子の表面リガンドの分子構造を変えることで、水分子との相互作用を促進させ、T1 造影剤としての機能を増幅するという、これまでに例のない手法を用いることで、安定で性能の高い鉄由来造影剤の開発に成功した。

## 【2】 ストッパーによる GroEL ナノチューブの長さ制御<sup>(2)</sup>



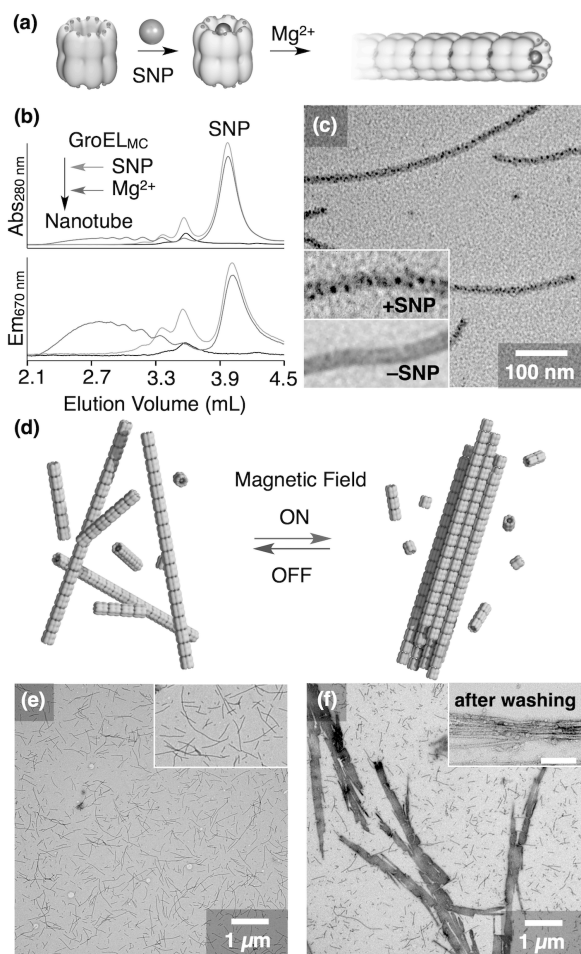
**Figure 2.** Engineering of a novel protein SR<sub>MC</sub> and its function as a polymerization stopper. (a) Structures of SR<sub>Cys</sub> having a half-cut morphology compared with GroEL<sub>Cys</sub>, its merocyanine-modified stopper SR<sub>MC</sub>, and the magnesium ion induced dimer SR<sub>Dimer</sub>. Transmission electron microscopy of (b) GroEL<sub>Cys</sub> and (c) SR<sub>Cys</sub>. Scale bar: 50 nm. (d) Schematic illustration of the stopper function to control the carrier length and its effect on the cellular uptake.

GroEL ナノチューブを生体内で利用するためには、その長さを制御することが最初の関門である。しかし、GroEL モノマー (GroEL<sub>MC</sub>) の重合は、逐次重合メカニズムで起きるため、長さの制御が今まで不可能だった。GroEL ナノチューブは複数のメロシアニン (以下 MC) と Mg<sup>2+</sup> の非共有結合でチューブ構造を形成することが先行研究から知られている。本研究では、GroEL<sub>MC</sub> と全く同じ反応部位を持つが、C<sub>2h</sub> 対称性をなくしたタンパクをストッパーとして用いる手法により長さの制御を可能にした。本研究で着目したのは、Horwich 等から報告された SR (Single Ring の略語) 変異体だった。<sup>[3]</sup> SR 変異と従来のシステイン変異 (C to A, K311C/L314C) を組み合わせることで得られた SR<sub>Cys</sub> に、MC を化学的に修飾することで SR<sub>MC</sub> を作成した (Figure 2a)。意図した通り、SR<sub>Cys</sub> と SR<sub>MC</sub> は GroEL<sub>Cys</sub> のサイズに比べて半分になっていることが電子顕微鏡 (TEM)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、動的光散乱 (DLS) により確認された (Figure 2b, c)。さらに、SR<sub>MC</sub> に Mg<sup>2+</sup> を加えることで GroEL と同じサイズの 2 量体を形成することを確認した。これらの結果から、SR<sub>MC</sub> はストッパーとしてナノチューブの長さを制御する可能性が高いと判断し、GroEL<sub>MC</sub> と混ぜて重合を行なった。その結果、系にある SR<sub>MC</sub> の量とナノチューブの長さには、負の

相関があることが TEM や SEC の観測により示された。ナノチューブの平均した長さの調節は 320 nm (SR<sub>MC</sub>/GroEL<sub>MC</sub> = 0) から 40 nm (SR<sub>MC</sub>/GroEL<sub>MC</sub> = 5.4) までの範囲で調節可能であった。この成果は、タンパクナノチューブのサイズを人為的にコントロールした初めての例である。

最近、球状ナノキャリアのサイズと細胞への取り込み率の相関に関する研究が多くなされているが、ナノチューブ構造に関してはその報告例が未だになかった。長さが制御されたナノチューブを用いて、長さとの取り込み率の相関を明らかにする目的で細胞実験を行なった。それぞれ違う蛍光分子を導入したされた GroEL<sub>MC</sub> (Cy5) と SR<sub>MC</sub> (Alexa 568) を用いて、同じ手法で長さがコントロールされたナノチューブを Hep3B 細胞に入れ、共焦点顕微鏡やフローサイトメトリー法を用いて取り込み率を比較する実験を行なった。その結果、ナノチューブの長さが短いほど細胞内に取り込まれやすい傾向が見られた (Figure 2d)。この成果は生体機能の発現に対して長さの制御が重要であることを示唆する。

### 【3】磁性 ゲストを内包した GroEL ナノチューブの可逆的なバンドル化<sup>(3)</sup>

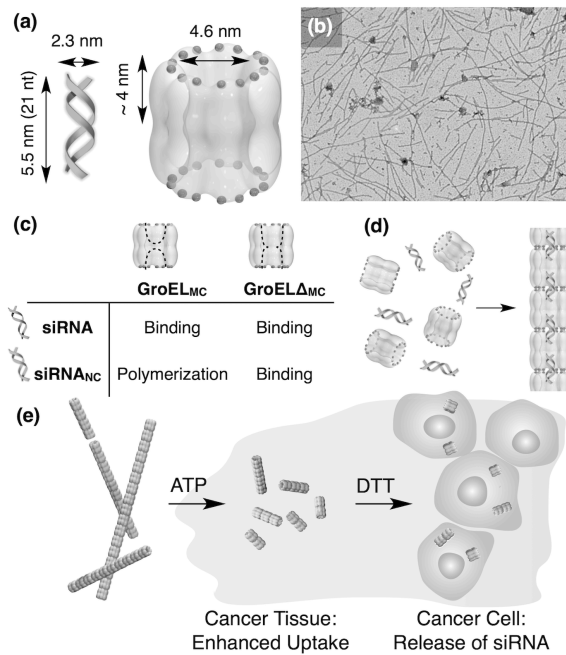


**Figure 3.** 1D array of superparamagnetic nanoparticle inside the GroEL nanotubes and their magnetic field-induced lateral assembly. (a) Schematic illustration of the formation of 1D array inside the GroEL nanotube (NT<sub>SNP</sub>). (b) Size exclusion chromatography trace of the formation of NT<sub>SNP</sub> starting from GroEL<sub>MC</sub>. (c) Transmission electron microscopy of NT<sub>SNP</sub>. (d) Schematic illustration of the magnetic field induced lateral assembly of NT<sub>SNP</sub>. NT<sub>SNP</sub> (e) before and (f) after annealing inside the magnet bore (0.5 T) for 30 minutes.

緒言に述べた通り、GroEL ナノチューブは外部と分離された穴が連続的に続いているという形態的な特徴を持つ。外部刺激に応答するゲストをナノチューブの穴に含ませることで、ナノチューブの自己組織化などの新たな動的挙動を誘起する仕組みを設計した。そのために着目した超磁性鉄ナノ粒子 (SNP) はサイズが小さく (10 nm 以下)、永久的な磁気モーメントを持たないが、外部磁場の印加により磁気モーメントが誘導される。この超磁性鉄ナノ粒子を GroEL の穴に効率的に取り込ませることを目的として、2.5 nm のナノ粒子を合成した。溶解性に影響が無い範囲でのナノ粒子の表面を設計する必要があるため、表面のリガンドを検討した。最適化の結果、双性イオンリガンドに 15mol% の疎水性蛍光分子を導入した系が適切であることが分かった。得られたナノ粒子を GroEL<sub>MC</sub> と結合させ、それに Mg<sup>2+</sup> 加えることで鉄ナノ粒子を含む GroEL ナノチューブ (NT<sub>SNP</sub>) の構築に成功した (Figure 3a)。周りの過剰な SNP を超遠心で除いた後、SEC や TEM によって NT<sub>SNP</sub> の同定を行なった (Figure 3b, c)。これまでになされてきた超磁性ナノ粒子で 1 次元連続構造体を構築する試みは、粒子が小さく、永久磁気モーメントがないため、束状の凝集体になってしまう結果に陥っていた。一方本研究では、GroEL ナノチューブに内包した状況で重合する手法により、精緻な超磁性ナノ粒子アレイの構築に初めて成功した。

NT<sub>SNP</sub> の磁場に対する応答性を調べるために、30 分間 0.5 T の磁場を印加した結果、バンドル化が TEM 観察や DLS により確認された (Figure 3e, f)。また、バンドル化されていないナノチューブの長さを統計的に調べた結果、長いナノチューブほどバンドル化しやすいことが明らかとなった。一方、このバンドルを再び磁場がないところで 2 時間ほど静置したところ、最初と同様の状態に戻ることを確認した。これらの結果は理論的な予測と一致する。磁場という外部刺激により、GroEL ナノチューブ内部のナノ粒子アレイに可逆的な側方相互作用を起こすことで、ナノチューブの 3D アセンブリを初めて達成した。

#### 【4】 siRNA を内包した GroEL ナノチューブの構築とその生体内での応用 <sup>(5)</sup>



**Figure 4.** Medicinal application of GroEL nanotube bearing siRNA nanocaplet inside the cavity. (a) Sizes of GroEL monomer (GroEL<sub>MC</sub>) and siRNA nanocaplet (siRNA<sub>NC</sub>). (b) Transmission electron microscopy image of GroEL nanotube bearing siRNA<sub>NC</sub> (NT<sub>siRNA</sub>). (c) Summary of control experiments manifesting the effect of guanidium polymer that forms the caplet and the wall between the two rings of GroEL. (d) Schematic illustration of the autopolymerization of GroEL<sub>MC</sub> and siRNA<sub>NC</sub>, formed via the combined effect of merocyanine coordination to siRNA and hydrophobic stacking. (e) Schematic illustration of nanotube dissociation in response to ATP and DTT, both of which are the representative cancer-specific and intracellular chemicals.

2015年、ハシム、大黒、相田らはリン酸イオンを有する生体高分子である siRNA に、グアニジウムイオン部位を持つモノマー (<sup>TEG</sup>Gu<sub>4</sub>) が動的に接着する性質とチオール酸化反応を利用して、siRNA 分子の表面に <sup>TEG</sup>Gu<sub>4</sub> 重合体を形成した。<sup>[4]</sup> 得られた siRNA ナノカプレット (siRNA<sub>NC</sub>) はそのサイズが siRNA とほぼ同じであるが、負電荷は <sup>TEG</sup>Gu<sub>4</sub> により中和されている (Figure 4a)。siRNA<sub>NC</sub> と前述した GroEL<sub>MC</sub> の混合物を TEM や SEC で分析した結果、予想外にもナノチューブ構造を形成していることが分かった (Figure 4b)。この現象のメカニズムを調べるために GroEL の中心部位の壁を無くした GroEL<sub>Δ</sub> や、メロシアニン修飾前の GroEL、siRNA などを用いて比較実験を行なった結果、メロシアニン部位の RNA ヘリックスへの挿入と疎水性相互作用のシナジー効果が原因であることが示された (Figure 4c)。つまり、GroEL<sub>MC</sub> と siRNA<sub>NC</sub> が交互に積み重ねた形の自己組織化により、ナノチューブ構造 (NT<sub>siRNA</sub>) が形成されていると考えられる (Figure 4d)。

また、興味深いことに、この NT<sub>siRNA</sub> に対し DTT や ATP を単独で加えると長いナノチューブ構造が短いチューブに分解する一方、ATP と DTT が共存する条件では、より敏感にモノマーまで分解し、siRNA<sub>NC</sub> を放出することが SEC や TEM 観測でわかった。このシ

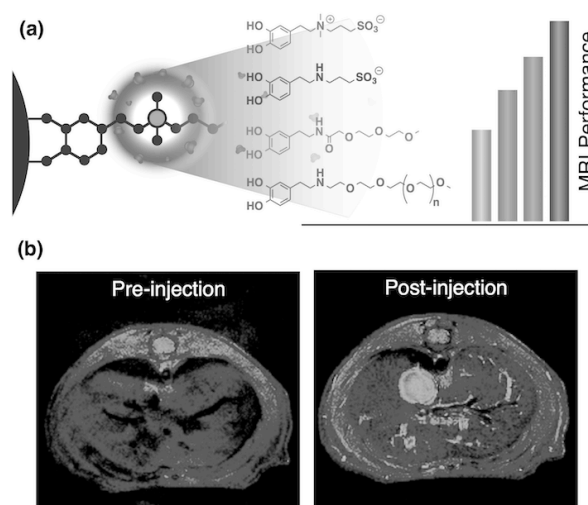
ナジー効果は ATP により GroEL ナノチューブが短くなるというビスワスの先行研究や、DTT により <sup>TEG</sup>Gu<sub>4</sub> が siRNA から解離するというハシムらの報告から説明できる。さらに、細胞実験により NT<sub>siRNA</sub> が癌細胞に取り込まれることを確認し、RNA 干渉まで誘導することを見出した。ATP 濃度が高い癌組織でナノチューブ構造が短くなり、細胞への取り込みが促進され、また細胞内で濃度の高いグルタチオンや ATP の活性により siRNA を放出するという、新たな癌組織特異的な siRNA 送達系の構築に成功した (Figure 4e)。自然界のウイルスのようにタンパクの自己組織化による siRNA 複合体を構築した例は今まで報告されていない。今回の発見は二つの面に置いて人工ウイルスの要件を満たしている。第一に、自己組織化したタンパクの殻で外部環境から siRNA を保護する構造は、ウイルスのそれと同様である。第二に、特定の環境に応答してタンパク質の殻に内包した核酸を放出し、その生理活性を発現するというウイルス必須の機能という点でも共通する。従って、本研究で開発した NT<sub>siRNA</sub> はウイルスの構造や機能を模倣した初めての成功例になる。

## 【5】鉄ナノ粒子の表面リガンド効果を利用した MRI 造影剤の開発<sup>(6)</sup>

従来の MRI 造影剤は  $Gd^{3+}$  などの遷移金属錯体由来のものがほとんどである。これらの錯体は高い水縦緩和機能 (T1) を示しているが、配位結合から離れた自由遷移金属イオンにより、腎性全身性線維症 (NSF) などの深刻な副作用が生じることが報告されている。このような背景から、ナノ粒子由来の造影剤への試みは多くの研究グループからなされていたが、金属錯体由来のものに比べてその性能が低く、実用段階には達していないと認識されてきた。そのうち、鉄ナノ粒子は長い間確立された合成方法という利点とともに、生体内での安定性が高いことで注目を集めてきた。最近、Hyeon らの研究によって、ナノ粒子サイズを小さくするほど T1 緩和能は向上する現象が証明された。<sup>[5]</sup> しかし、このサイズを小さくした鉄ナノ粒子でも、金属錯体 ( $r_1/r_2 \sim 0.9$ ) に比べて実質的に到達できる値ははるかに低い ( $r_1/r_2 \sim 0.2$ ) ことが報告されている。

本研究では、従来の鉄ナノ粒子表面に結合するリガンドの分子構造を改良することで、金属錯体に迫る造影能を達成した。4 種類のリガンドを 2.5 nm の鉄ナノ粒子にそれぞれ結合させ、水緩和能測定方法を用いて比較した結果、分子構造によって  $r_1$  値が大きく変化し、T1 造影剤としての性能が向上することが確認された (Figure 5a)。具体的には、ナノ粒子表面の電荷の有無及び、電荷と表面との距離が近いかに依存して性能が変わる傾向が見られた。特に、4 級アンモニウムを粒子表面の近くに持つ双生イオンが全ての実験において一番高い値を示した。アンモニウムイオン周辺の水分子に対する MD 計算の比較結果から 4 級アンモニウム周辺の水分子の数や交換速度が非常に高くなっていることが先行研究で報告されたことから、表面の近くにある水分子が本現象の原因だと考えられる。このような傾向が金属種類を変えても維持されていたことから、「表面リガンド効果」は高い普遍性を持つことが示唆される。今回の研究は、今まで造影剤設計で見逃されてきた「表面近傍の水分子の様子」という、もう一つの重要なパラメータを提示した意味を持つ。

本研究で開発した高性能 MRI 造影剤は様々な疾患に応用しようと判断し、その可能性を生体実験により評価した。高性能鉄ナノ粒子を生体モデルマウスに注入したところ、血管周辺にコントラストの増幅が見られた (Figure 5b)。注入された造影剤は腎臓濾過により排出されることが、MR イメージから確認された。さらに、神経腫瘍を持つ生体モデルを用いて造影剤の性能を評価したところ、腫瘍組織のコントラストが十分に増加された。また 3D 血管造影図の分析により、腫瘍成長の結果できた新生血管も可視化できることがわかった。これらの結果から、今回開発されたナノ粒子は神経腫瘍の有無、及び腫瘍の進行状況まで診断できる機能性造影剤として応用の可能性が示唆される。



**Figure 5.** Development of high-performance MRI T1 contrast agent based on iron oxide nanoparticle. (a) Molecular variations on the nanoparticle surface and their effect on the MRI performance. (b) Mouse in vivo MRI before and after injecting the contrast agent developed herein.

## 【6】 結言

本研究では、ナノスケールの相互作用を理解し、その理解をナノ構造の設計に利用することで、新たな機能性構造体の構築に成功した。シャペロニン GroEL の二つの中空樽形構造間相互作用を遺伝的な変異でなくすことにより、GroEL ナノチューブ成長のストッパーを構築し、平均の長さを制御した。また、GroEL の疎水性空洞と適切に相互作用できる人工ゲストのデザインに成功し、1次元連続体をナノチューブの内側に構築することで、磁場の印加によりナノチューブの可逆的な側方相互作用を誘導した。さらに、電荷が中和された siRNA を用いて、メロシアニン部位の挿入により形成される新たな1次元集合体の形成を発見し、それを元に癌細胞特異的な化学刺激に応答する siRNA 送達系を開発した。最後に、ナノ粒子表面の水和がりガンドの化学構造に依存して変化し、それが MRI 造影剤の性能に大きく影響を与えることを見出した。さらに、神経腫瘍に応用可能な鉄由来の高性能造影剤の開発に成功した。本研究から見出した様々なナノスケール相互作用の理解や制御戦略は、人工組織の構築や新たな機能性ナノ材料などへの応用が期待される。

## 【7】 参考論文

- [1] Biswas, S.; Kinbara, K.; Oya, N.; Ishii, N.; Taguchi, H.; Aida, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7556–7557.
- [2] Biswas, S.; Kinbara, K.; Niwa, T.; Taguchi, H.; Ishii, N.; Watanabe, S.; Miyata, K.; Kataoka, K.; Aida, T. *Nature Chemistry* **2013**, *5*, 613–620.
- [3] Weissman, J. S.; Hohl, C. M.; Kovalenko, O.; Kashi, Y.; Chen, S.; Braig, K.; Saibil, H. R.; Fenton, W. A.; Horwich, A. L. *Cell* **1995**, *83*, 577–587.
- [4] Hashim, P. K.; Okuro, K.; Sasaki, S.; Hoashi, Y.; Aida, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15608–15611.
- [5] Kim, B. H.; Lee, N.; Kim, H.; An, K.; Park, Y. I.; Choi, Y.; Shin, K.; Lee, Y.; Kwon, S. G.; Na, H. B.; Park, J.-G.; Ahn, T.-Y.; Kim, Y.-W.; Moon, W. K.; Choi, S. H.; Hyeon, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12624–12631.

## 【8】 発表論文

- (1) Sim, S.; Kim, Y.; Kim, T.; Lim, S.; Lee, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20270–20272.
- (2) Sim, S.; Miyajima, D.; Niwa, T.; Taguchi, H.; Aida, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 4658–4661.
- (3) Sim, S.; Niwa, T.; Taguchi, H.; Aida, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 11152–11155.
- (4) Sim, S.; T. Aida, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 492–497.
- (5) Sim, S.; Hashim, P. K.; Okuro, K.; Anraku, Y.; Kataoka, K.; Niwa, T.; Taguchi, H.; Aida, T. *To be submitted*.
- (6) Sim, S.; Miyajima, M.; Nitta, N.; Aoki, I.; Aida, T. *To be submitted*.
- (7) Kashiwagi, D.; Sim, S.; Niwa, T.; Taguchi, H.; Aida, T. *To be submitted*.