

論文の内容の要旨

論文題目 Nanostructure Engineering toward Medicinal Application
(医学的応用に向けたナノ構造の開発)

氏 名 沈 昇賢

【1】緒言

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た。一方で、相田らは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。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。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ตอบสนอง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。

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、内在的化学シグナルのATPやグルタチオンにตอบสนอง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

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

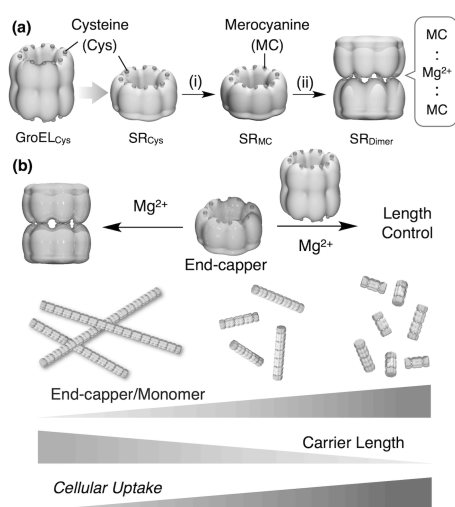


Figure 1. Engineering of a novel protein SR_{MC} and its function as a polymerization stopper. (a) Structures of SR_{Cys} having a half-cut morphology compared with GroEL_{Cys}, merocyanine-modified stopper SR_{MC}, and the magnesium ion induced dimer SR_{Dimer}. (b) Schematic illustration of the stopper function to control the carrier length and its effect on the cellular uptake.

る。しかし、GroELモノマー (GroEL_{MC}) 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。本研究では、GroEL_{MC}と全く同じ反応部位を持つが、C_{2h}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。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_{Cys}に、Merocyanine (MC)を化学的に修飾することでSR_{MC}を作成した (Figure 1a)。意図した通り、SR_{Cys}とSR_{MC}はGroEL_{Cys}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。SR_{MC}をGroEL_{MC}と混ぜて重合を行なった結果、系にあるSR_{MC}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から40 nm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。さらに、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 1b)。

【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

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。得られたナノ粒子をGroEL_{MC}と結合させ、それにMg²⁺加えることで鉄ナノ粒子を含むGroELナノチューブ (NT_{SNP}) の構築に成功した (Figure 2a)。

NT_{SNP}の磁場に対する応答性を調べるために、30

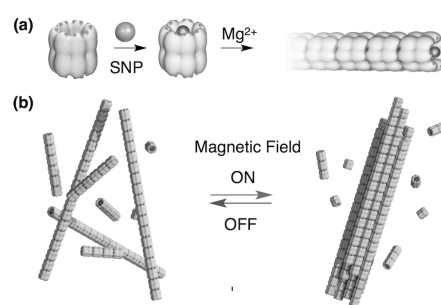


Figure 2. 1D array of superparamagnetic nanoparticle inside the GroEL nanotubes and their magnetic field-induced lateral assembly. (a) Schematic illustration of the formation of 1D array inside the GroEL nanotube (NT_{SNP}). (b) Schematic illustration of the magnetic field induced lateral assembly of NT_{SNP}.

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。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

2015年、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 (TEGGu₄) 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TEGGu₄重合体を形成した (siRNA_{NC}) (Figure 3a)。siRNA_{NC}とGroEL_{MC}の混合物を分析した結果、GroEL_{MC}とsiRNA_{NC}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_{siRNA}) が形成されていることが確認された (Figure 3b)。

また、興味深いことに、このNT_{siRNA}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_{NC}を放出することがSECやTEM観測でわかった。さらに、細胞実験によりNT_{siRNA}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 3c)。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_{siRNA}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。

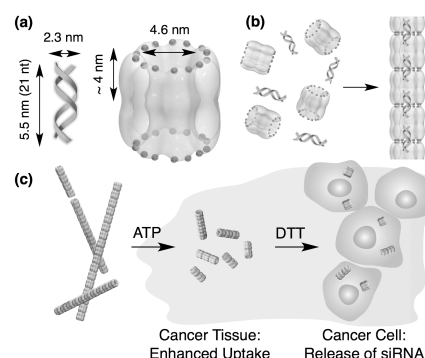


Figure 3. Medicinal application of GroEL nanotube bearing siRNA nanocaplet inside the cavity. (a) Sizes of GroEL monomer (GroEL_{MC}) and siRNA nanocaplet (siRNA_{NC}). (b) Schematic illustration of the autopolymerization of GroEL_{MC} and siRNA_{NC}. (c) Schematic illustration of nanotube dissociation in response to ATP and DTT.

【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

従来のMRI造影剤はGd³⁺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。しかし、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

4a)。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。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 4b)。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。

【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リ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。

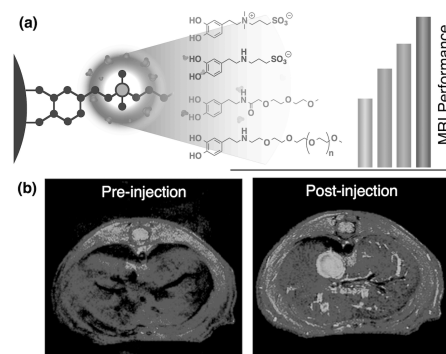


Figure 4. Development of high-performance MRI T1 contrast agent based on iron oxide nanoparticle. (a) Molecular variations on the nanoparticle surface and their effect on the MRI performance. (b) Mouse in vivo MRI before and after injecting the contrast agent developed herein.