

学位論文題名

Conjugation of gold nanoparticle with viral capsid proteins for biomedical applications

(生物医学的応用を目指したウイルスキャプシドタンパク質と金ナノ粒子のコンジュゲーション)

学位論文内容の要旨

近年、金属ナノ粒子はそのサイズに依存した光学あるいは磁気特性が注目され、細胞内への遺伝子薬剤の送達キャリアーとして、また腫瘍組織に対する治療ツールとしての研究が盛んに行われている。これまでに核酸を表面に修飾したナノ粒子、あるいは合成チオール化合物によって被覆されたナノ粒子が開発されている。しかし、これらの場合多くは血清中における高分散性、標的物に対する特異性、さらには容易な合成方法といった点で個々の機能は有しているものの、全てを網羅した機能性分子の開発には及んでいない。そこで単独で高い標的性を持ち、かつ血清中でも高い分散能を有するウイルスキャプシドタンパク質に着目した。ウイルスカプセルは、高い標的性と細胞導入率を兼ね備えた理想的なナノ粒子の分散剤になると考えられる。例えば JC ウイルスのキャプシドタンパク質のみで構成されたウイルスカプセルは、ウイルスゲノムを持たないため病原性や感染力は無いが、野生型ウイルスと同様のレセプター介在型エンドサイトーシスによって効果的に哺乳類細胞内へ導入される。しかしながら、これまでにウイルスタンパク質でナノ粒子を被覆した例は *in vitro* での再集合系でしか報告されていない。再集合系の欠点は、ウイルスサイズ以上のナノ粒子を内包する事が出来ないという点である。さらには、盛んに自己集合が行われているウイルスは植物ウイルスが主であった。そこで本研究では、人を宿主とする JC ウイルスのキャプシドタンパク質 VP1 を用いて、金ナノ粒子にウイルスキャプシドタンパク質の機能を付与させ、光温熱療法またはウイルスセンシングにおける機能性ナノ材料として展開することを目的とした(Fig.1)。

第1章では、ナノビルディングブロックとしてのウイルス粒子の魅力と先行研究の紹介、生体材料としてナノ粒子を利用する上での被覆材に関する課題について言及した。

第2章では、大腸菌発現系を用いて JC ウイルスのキャプシドタンパク質 VP1 を回収し、タンパク質の自己集合能についての検討を行った。JC ウイルスはナノ粒子や薬剤の細胞内送達キャリアーとして期待されているが、報告例はほぼ皆無であった。そこで、本学位論文において JC ウイルス VP1 の *in vitro* における自己集合条件を決定した。ウイルスキャプシドタンパク

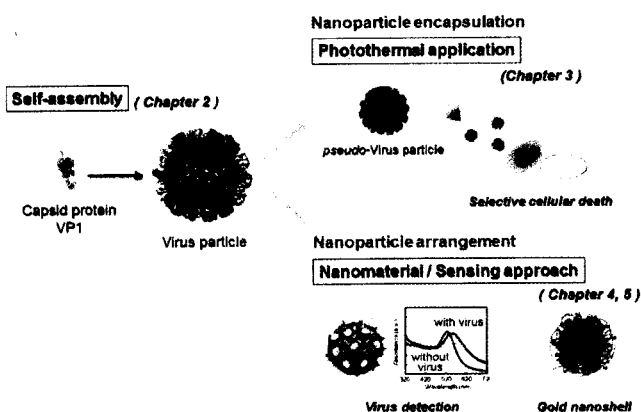


Fig. 1 Schematic illustration of three topics of interest based on viral distinct interactions presented in this thesis.

質 VP1 は、まず大腸菌内で形成されたウイルスカプセルとして回収した。これを還元剤である 2-mercaptoethanol、 Ca^{2+} をキレートする EDTA を添加することでウイルスカプセルから VP1 pentamer へと解離させた。その後、解離した VP1 pentamer が自己集する NaCl 濃度、 CaCl_2 濃度および pH 条件を検討した。ウイルスカプセルの同定には、サイズ排除クロマトグラフィー、走査型透過電子顕微鏡を用いた。その結果、*in vitro* での再集合では、野生型のウイルスと同じサイズでの粒子 (T=7 構造) は確認されなかった。その一方、NaCl 濃度が 0.1-1.0 M の条件で、野生型のウイルス粒子よりも小さな構造体 (T=1 構造) が形成されることが見出された。さらに、野生型のウイルス粒子の構造安定性にとって重要な因子である Ca^{2+} 濃度を高めると、VP1 の凝集が起こることがわかった。これらの条件を利用し、*in vitro* での VP1 再集合系を用いた金ナノ粒子の内包について検討を行った。その結果、アニオン性の電荷を有する金ナノ粒子でのみ再集合による金ナノ粒子の内包が行われ、T=1 structure の内径より小さな金ナノ粒子でのみ内包可能であることが明らかとなった。

第3章では、VP1 表面のアミノ酸残基の分布に着目し、金ナノ粒子を核とした疑似ウイルス粒子の作製について検討を行った。キャプシドタンパク質 VP1 の Solvent accessibility を計算すると、内側表面のシステイン残基 97 番目のみが溶媒と接していることが推察された。金ナノ粒子表面を低分子である BSPP (bis(p-sulfonatophenyl) phenylphosphine) で保護した場合、金ナノ粒子の粒径に依存せず金ナノ粒子表面に VP1 が集合化している様子が観察された。集合化の相互作用をバッファー条件、XPS、タンパク質の点変異等により検証した結果、Au と S の相互作用であることが示された。これは金ナノ粒子表面の金原子にシステイン残基 97 番目が直接結合していることを示唆している。VP1 被覆の金ナノ粒子を用いて細胞取り込みの実験をした結果、ICP-AES により VP1 被覆の金ナノ粒子は BSPP 金ナノ粒子よりも取り込み量が高く、粒径が 40 nm の金ナノ粒子において最も取り込み効率が高いことが分かった。さらに、VP1 被覆の金ナノ粒子が取り込まれた細胞に強い光を照射すると、照射スポット内において細胞死が選択的に誘導されることが見出された。

第4章では、JC ウイルスのシアル酸認識能を利用し、ウイルス粒子表面における金ナノ粒子の三次元集合化を行った。シアル酸を提示した金ナノ粒子と JC ウイルスカプセルを高濃度デキストリン溶液中で共存条件におくと、金ナノ粒子の集合化に伴い吸収スペクトルにおいて、およそ 25nm のレッドシフトが見られた。電子顕微鏡では直径 15 nm の金ナノ粒子において、JC ウイルス粒子を核とした金ナノ粒子の集合化が観察された。この結果から、シアル酸提示金ナノ粒子を用いた本系は溶液中におけるウイルスセンシングへの貢献が期待される。

第5章では、シアル酸ポリマーを合成し JC ウイルスを核とした金ナノシェル型構造体の作製を行った。金イオンをキレートするポリヒスチジンを主鎖とし、数残基にシアル酸を提示した。スクロース密度勾配遠心、イムノプロットングによりウイルス粒子とシアル酸ポリマーの相互作用が起きていることが明らかとなった。金イオンを添加すると、金イオンの添加量に応じてナノシェル型構造体の粒径増加が観察された。

第6章では、第2章から第5章までの本学位論文における総括を行った。

以上より、ウイルスカプシドタンパク質 VP1 による金属ナノ構造体を構築することで、光温熱療法の薬剤およびウイルス検出の材料へ応用できることを示した。本研究の成果は今後の生物医学における金属ナノ粒子の利用に有用な知見を与えるものである。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	居 城 邦 治
副 査	教 授	石 森 浩一郎
副 査	教 授	坂 口 和 靖
副 査	教 授	村 越 敬
副 査	准教授	新 倉 謙 一

学 位 論 文 題 名

Conjugation of gold nanoparticle with viral capsid proteins for biomedical applications

(生物医学的応用を目指したウイルスキャプシドタンパク質と
金ナノ粒子のコンジュゲーション)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

近年、金属ナノ粒子はそのサイズに依存した光学あるいは磁気特性が注目され、細胞内への遺伝子薬剤の送達キャリアーとして、また腫瘍組織に対する治療ツールとしての研究が盛んに行われている。これまでに核酸を表面に修飾したナノ粒子あるいは合成チオール化合物によって被覆されたナノ粒子が開発されている。しかし、これらの場合多くは血清中における高分散性、標的物に対する特異性、簡便な合成方法といった点で個々の機能は優れているものの、全てを網羅した機能性分子の開発には及んでいない。

本論文は、単独で高い標的性を持ち、かつ血清中でも高い分散能を有するウイルスキャプシドタンパク質に着目し、金ナノ粒子にウイルスキャプシドタンパク質の機能を付与させた機能性ナノ材料としての展開に関して報告している。タンパク質の内側にのみ分布しているシステイン残基を利用して、タンパク質被覆による分子認識能を有した金ナノ粒子を作製し、疑似ウイルスとして金ナノ粒子を細胞内へ効率よく導入する手法を確立した。疑似ウイルスは粒径が制御可能であることから、細胞内導入における疑似ウイルスの最適粒子径が見出され、さらに光照射により選択的に細胞を死滅させることが明らかとなった。また、ウイルスキャプシドタンパク質の糖鎖認識能を利用する事で、糖鎖提示金ナノ粒子のウイルス表面における三次元集積化を誘起し、水溶液中における高感度な光学的ウイルスセンシングの系を確立することができた。

これらの結果は、生体内における金属ナノ粒子の薬剤としての利用あるいは病原体の高感度検出といった生物医学的応用に関してウイルスキャプシドタンパク質 VP1 の有用性を他に先駆けて見出したことを意味している。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格のあるものと認める。