

鳥取県環境学術研究等振興事業費補助金研究実績報告書

研究期間（1年目/3年間）

研究者 又は 研究代表者	氏名	(ふりがな) まつうらかずのり 松浦 和則
	所属研究機関 部局・職	鳥取大学 大学院工学研究科・教授 電話番号 0857-31-5262 電子メール ma2ra-k@chem.tottori-u.ac.jp
研究課題名	ペプチドナノカプセルを活用した人工ワクチンの開発	
研究結果	Fmoc固相合成と逆相HPLC精製によりCys残基を有する β -Annulus-Cysペプチドを合成し、MALDI-TOF-MSにより確認した。また、5'末端にアミノ基を有するCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN-NH ₂ , ホスホロチオエート型)を購入し、Sulfo-GMBS架橋剤と反応させ、マレイミド基を有するCpG ODNとした。これにCys残基を有する β -Annulus-Cysペプチドと反応させ、逆相HPLC精製により、核酸系アジュバントCpGを有する β -Annulusペプチドコンジュゲートを合成し、MALDI-TOF-MSにより目的物の単一分子量であることを確認した。	
研究成果	β -Annulus-CpGペプチドコンジュゲートを水中に分散させ、自己集合させることにより、100nm程度の粒径の球状集合体を形成していることが動的光散乱(DLS)測定および透過型電子顕微鏡(TEM)観察から明らかとなった。また、 ζ 電位測定から、期待通り、核酸CpGがナノカプセル表面にあることがわかった。	
次年度研究計画	<ul style="list-style-type: none"> ・β-Annulus-CpGペプチドコンジュゲートの効率的合成法を確立し、大量合成を行う。 ・CpGを提示したペプチドナノカプセルの粒径制御 ・共同研究先の大阪大学 微生物病研究所 吉岡准教授にβ-Annulus-CpGペプチドコンジュゲートのサンプルを送付し、細胞に導入した際のサイトカイン(IL-6、IL-12、IFN-α、IFN-γ)の産生量などを調べる。 ・CpGを提示したペプチドナノカプセルへの各種抗原分子の内包を検討する。 	
報告責任者	所属・職 氏名	研究・国際協力部研究協力課・課員・朝野弘昭 0857-31-5494 ken-jyosei@adm.tottori-u.ac.jp

- 注1) 表題には、環境部門、地域部門、北東アジア学術交流部門のいずれかを記載すること。
 2) 「研究期間（ 年目/ 年間）」及び「次年度研究計画」は、環境部門のみ記載すること。
 3) 研究者の知的財産権などに関する内容等で、非公開としたい部分は、罫線で囲うなど明確にし、その理由を記すこと。
 4) 研究実績のサマリーを併せて提出すること。

「ペプチドナノカプセルを活用した人工ワクチンの開発」

鳥取大学 大学院工学研究科・教授 松浦和則

緒言

ウイルス性感染症の拡大を防止することは、科学のみならず社会問題として緊急に解決すべき課題である。これらの感染防御法として、新たなコンセプトに基づくワクチンの開発が強く望まれている。我々はこれまで、天然のトマトブッシュスタンウイルスの骨格形成に関わっているとされる β -Annulus 配列の 24 残基ペプチドを合成し、その自己集合によりウイルス様ナノカプセルを構築することに世界で初めて成功している。本研究では、新たな人工ワクチンの開発を指向して、自己集合性のペプチドナノカプセルの表面に核酸系免疫活性化分子 (CpG) を構造制御して提示する方法を開拓し、その細胞内導入および抗体産生能を評価することを目的としている (図 1)。

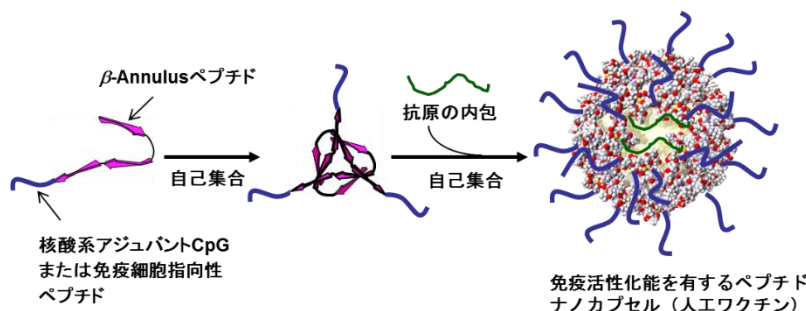


図 1. 核酸系免疫活性化分子 (CpG) を提示したペプチドナノカプセルの構築

本年度の成果

Fmoc 固相合成により、C 末端側に Cys 残基を有する β -Annulus-Cys peptide (INHVGTTGGAIM APVAVTRQLVCS) を合成し、逆相 HPLC で精製、MALDI-TOF-MS で確認した。一方、5'-アミノ化したホスホロチオエート型 CpG オリゴデオキシリボヌクレオチド (CpG オリゴ、ATCGA CTCTCGAGCGTTCTC、ジーンデザイン社製) を Sulfo-GMBS によりマレイミド化し、透析後、 β -Annulus-Cys peptide と付加反応させることで、 β -Annulus-CpG conjugate を合成し、逆相 HPLC で精製、MALDI-TOF-MS で目的物に相当する分子量ピーク ($m/z = 9061$) を確認した。得られた β -Annulus-CpG conjugate の UV-vis スペクトルの 260 nm における吸光度から、収量 154 μ g、収率 17 % と求められた。

合成した β -Annulus-CpG conjugate の水中での自己集合挙動を調べるために、水中ならびに 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.1) 中での動的光散乱分布 (DLS) 測定を行ったところ、水中で 100 μ M においては平均粒径 103 nm の集合体が、リン酸緩衝液 (pH 7.1) 中、同濃度においては平均粒径 79 nm および 470 nm の集合体形成が確認された (図 2)。しかし、これらの集合体は時間経過とともに凝集し、44 時間後には 500 nm 程度の大きさになることがわかった。これらの集合体の透過型電子顕微鏡 (TEM) 像の一例を、図 3 に示す。水中、リン酸バッファー中ともに、均一粒径ではなく、20~

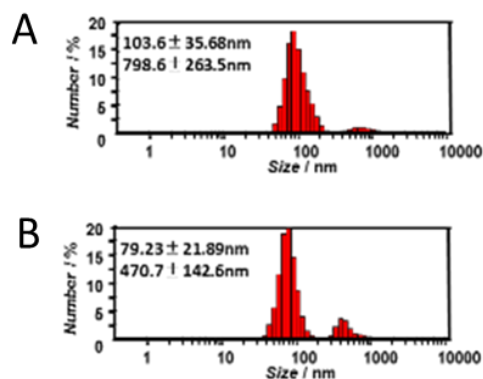


図 2. β -annulus-CpG conjugate 溶液 (100 μ M) の DLS 粒径分布。A: 水中、B: 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.1) 中。

250 nm 程度の多分散粒径の球状集合体が観察された。

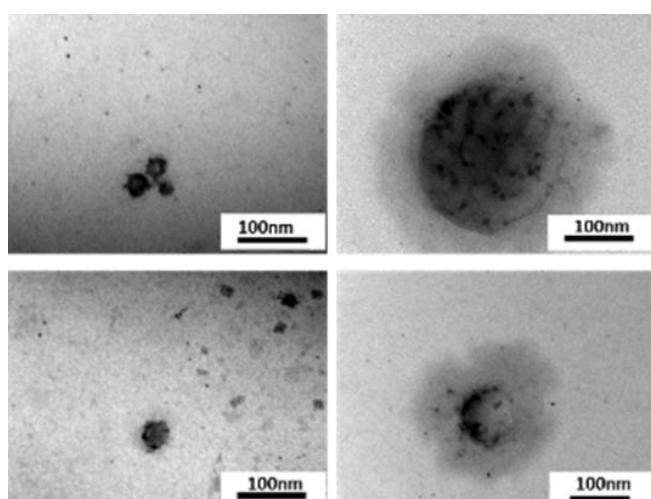


図 3. β -Annulus-CpG conjugate の水溶液 (100 μ M) の TEM 像の例。リンタングステン酸染色。

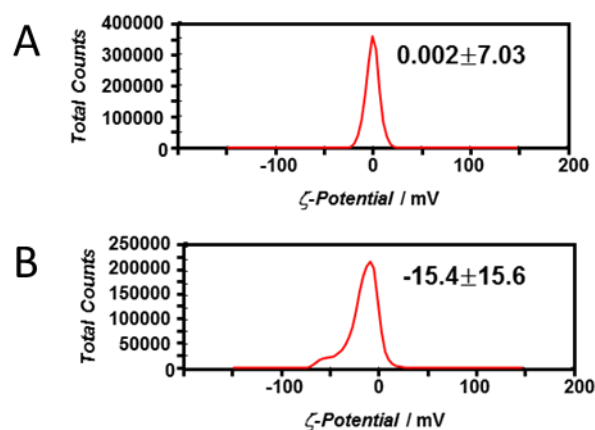


図 4. 10 mM リン酸緩衝液中の β -Annulus-Cys peptide (A) および β -Annulus-CpG conjugate (B) の ζ 電位。濃度 : 12 μ M。

次に、 β -Annulus-CpG conjugate のナノカプセル表面に CpG オリゴ DNA が修飾されているかどうかを ζ -電位測定により調べた (図 4)。pH 7.1 において β -Annulus-Cys peptide からなる集合体の表面電荷はほぼ 0 であったのに対し、 β -Annulus-CpG conjugate からなる集合体は負の表面電位を有していることが示された。これは、ペプチドナノカプセル表面に、オリゴ DNA が提示できていることを意味する。よって、粒径分布が広いものの、期待通りの核酸系免疫活性化分子 (CpG) を提示したペプチドナノカプセルの構築に成功したと言える。

今後の研究計画

次年度は、以下の項目を検討する。

- 1) β -Annulus-CpG conjugate の効率的合成法を確立し、大量合成を行う。
- 2) CpG 提示したペプチドナノカプセルの粒径分布が狭くなるように、自己集合法を改良する。
- 3) 共同研究先の大阪大学 微生物病研究所 吉岡准教授に CpG- β -Annulus ペプチドコンジュゲートのサンプルを送付し、細胞に導入した際のサイトカイン (IL-6、IL-12、IFN- α 、IFN- γ) の産生量などを調べる。
- 4) CpG 提示したペプチドナノカプセルへの各種抗原分子の内包を検討する。

成果発表

- 1) 松浦和則・山田沙紀・西川晶子・中村陽子、「DNA 修飾人工ウイルスキャプシドの創製」、2015 年日本化学会中国四国支部大会、2015 年 11 月 4 日、岡山大学