

自己組織化するオリゴペプチドの医療応用

～薬理機能を制御可能なメディカルゲル～

森田 健太

神戸大学 大学院工学研究科 応用化学専攻

1. 研究開始当初の背景

20世紀は高分子の時代と呼ばれる。「ゲル」という分野においてもこれまでは高分子が常識であった。一方、この20年の間に水をゲル化する低分子（ハイドロゲル化剤）が新しいバイオマテリアルとして注目されてきた。ところが、これまでの低分子ゲル化剤に関する研究はゲル化剤分子の合成的な開発と基礎物性の解明が焦点であり、産業的に実用化された例は未だ皆無である。そこで申請者は、**高分子ではなく低分子ゲル化剤でしか成し得ない独特の性質・機能は何か**というテーマの下に研究を行っている。申請者の研究チームでは、Ac-Phe-Phe-Phe-Gly-Lys-OH (P1) という配列のペプチドは長い脂肪鎖を持たないにもかかわらず比較的低濃度でハイドロゲルを形成することを見出した¹。さらに、作製したハイドロゲルは細胞毒性がほぼ無視できるレベルであった。そこでドラッグデリバリーシステム (DDS) 研究を背景に持つ申請者は、**低分子ペプチドゲル化剤に薬剤を共に自己組織化 (co-assembly) させることで新たなメディカルゲル分野を構築できるのではないかと考えた**。本申請研究ではその実証のため、感染症予防・治療のための抗菌ゲルに着目した。抗菌薬分子は一般に疎水性が高く水に溶けないため、高分子でゲル化するにはゲル分子鎖に化学結合させるか分散剤が別に必要となる。しかし、いずれの場合も調製の手間がかかり、薬剤分子本来の構造を失ってしまう欠点があった (表 1)。これを解決するため、**薬剤と co-assembly できる疎水的な「場」を持つ低分子ゲル化剤を用いることで抗菌薬を「まぜるだけ」で薬剤の分子構造を改変することなく抗菌ゲルを作製する**。加えて、薬剤の抗菌機能をそこに「共存させる補因子」で制御することを目指す。

2. 目的

ペプチドゲル化剤と抗菌薬分子の co-assembly を利用して抗菌ナノ複合体、あるいは、抗菌ゲルの作製を行う。ペプチドゲル化剤のモデルとしては P1 を用いる。抗菌薬のモデルとしては、抗真菌薬の一種である Amphotericin B (AmB) を用いる。AmB は疎水性が高く水に溶けないため、それ単体で投与することができない。AmB は真菌の細胞膜にのみ存在する ergosterol と複合体化することで細胞膜に小孔を形成し、真菌を殺菌することが知られている。しかし、動物細胞にも弱い毒性を示し、標的とする真菌を選択できないことから、副作用のリスクが問題となっている。AmB と P1 から作製した抗菌材料の抗菌活性を調べることで、ゲル化剤が抗菌薬の機能に与える影響を明らかにする (図 1)。

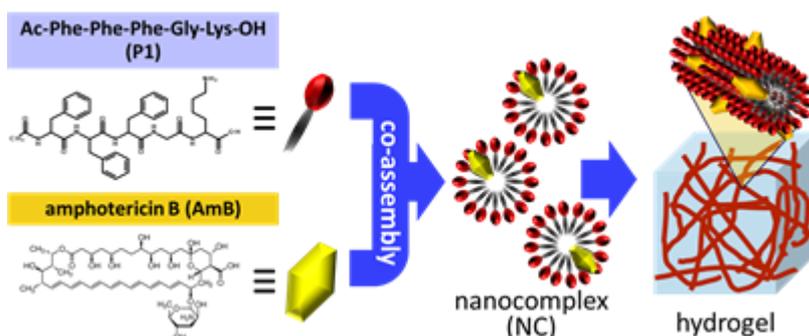


図 1 P1 と AmB の co-assembly によるナノ複合体とハイドロゲルの形成イメージ

3. 方法

3.1. AmB と P1 のナノ複合体 (AmB-NCs) の作製

0.2 mg/ml AmB と 0.1 wt% P1 を 10 mM リン酸緩衝液 (PB) に投入し、加熱することで

P1 を全て溶解した。遠心分離により AmB の残渣を除去し、AmB-P1 NC の分散液を得た。

3.2. AmB の定量

AmB の定量は全て、高速液体クロマトグラフィを用いて行った。(移動相：0.1% TFA 水溶液/0.1% TFA アセトニトリル、グラジエント：0-100% (移動相 B)、溶出時間：20 min、検出波長：230 nm)

3.3. AmB-NCs の抗真菌活性評価

YPD 培地中で前培養した *Saccharomyces cerevisiae* を OD660=0.01 の濃度で 96 well plate に播種した。ここに AmB-P1 NCs を添加した後、30°C で静置培養を行った。24h 後、OD660 を測定し 50% 阻害濃度 (IC50) を算出することで抗真菌活性を評価した。DMSO に溶解した AmB (free AmB) を遊離の AmB 溶液として用い、コントロールとした。また、AmB-P1 NCs と同時にプロテアーゼの一種であるキモトリプシン (ChT) を添加し同様に抗真菌活性評価を行った。

3.4. AmB-P1/YPD ゲル培地の作製

YPD 培地に P1 (1 wt%) と AmB を加え、加熱によってすべて溶解した後 96 well plate に分注して AmB-P1 ゲル培地を作製した。対照として DMSO に溶解した AmB と Agarose を用いて AmB-Agar ゲル培地も作製した。

3.5. 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

サンプルをカーボン支持膜付き Cu グリッド上にマウントし、2% リンタングスタン水溶液を用いてネガティブ染色を行った。

3.6. AmB-P1/YPD ゲル培地の抗真菌活性評価

濃度を調整した *S. cerevisiae* を播種し 30°C で静置培養した。24 h 後にコロニー形成を確認することで抗真菌活性評価を行った。

3.7. プロテアーゼ分泌菌選択的な毒性の発現

スキムミルクを窒素源に用いた *Aspergillus oryzae* 用プロテアーゼ高分泌培地 (MCD 培地) を作製した。上と同様にして AmB-P1/MCD ゲル培地と AmB-agar/MCD ゲル培地を作製し *A. oryzae* または *S. cerevisiae* を播種した。30°C で 24 h 静置培養した後、顕微鏡観察によってコロニー形成あるいは菌糸の生長を確認することで抗真菌活性を評価した。

4. 結果と考察

はじめに、AmB と P1 が co-assembly することを確認するため、P1 の最低ゲル化濃度 (MGC) 未満の P1 と AmB を混合することでミセル状のナノ複合体 (AmB-NCs) の作製を試みた。0.2 wt% の P1 と 0.2 mg/ml の AmB をリン酸緩衝液 (10 mM, pH 6.8) 中に投入し、加熱冷却することで AmB-NCs の黄色い分散液を得た。AmB-NCs の形態は TEM を用いて観察した。AmB-NCs は球状ミセルではなく、不完全な短いファイバー状のミセルを形成していた (図 2a)。AmB-NCs に含まれる AmB は HPLC を用いて定量した。0.2 mg/ml の AmB に対して P1 の投入量を変化させると、AmB-NCs として水中に可溶化した AmB の濃度も上昇した (図 2b)。AmB は P1 と co-assembly することで短いファイバー状ミセルとして AmB-NCs を形成していることが示された。

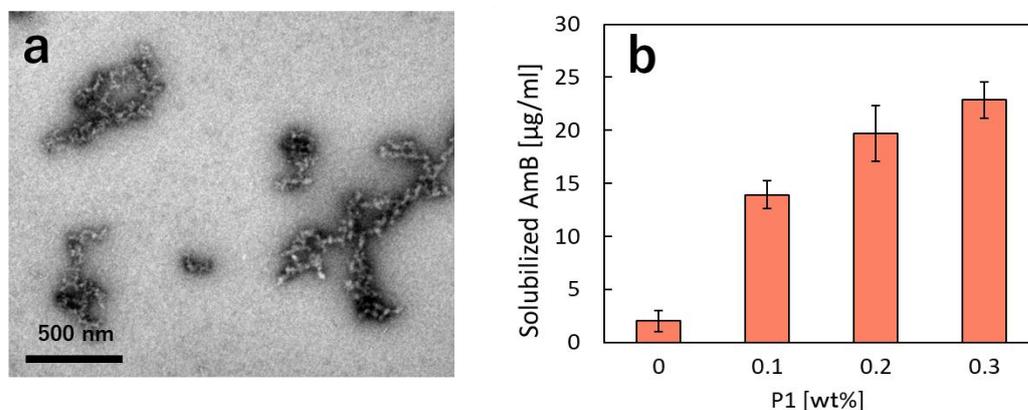


図 2 (a) AmB-NCs の TEM 画像、(b) AmB-NCs として可溶化された AmB の濃度

続いて、P1 の MGC 以上で P1 と AmB を混合することで AmB と P1 が co-assembly したハイドロゲルの作製を試みた。1 wt% の P1 のみから作製したハイドロゲル (P1 gel) は直径約 10 nm のファイバーから形成されていた (図 3a)。一方、0.2 mg/ml の AmB を共存させると、黄色く均一なハイドロゲル (AmB-P1 gel) が得られた。AmB-P1 gel はファイバーの直径は変化しないものの、ゲルを形成しているファイバーが短く不完全なものであることが TEM 観察から示された (図 3b)。以上から、AmB は P1 と co-assembly することで水中に分散可能となるが、P1 の規則的な自己組織化に干渉して本来の自己組織化体の形態を変化させてしまうことが明らかとなった。

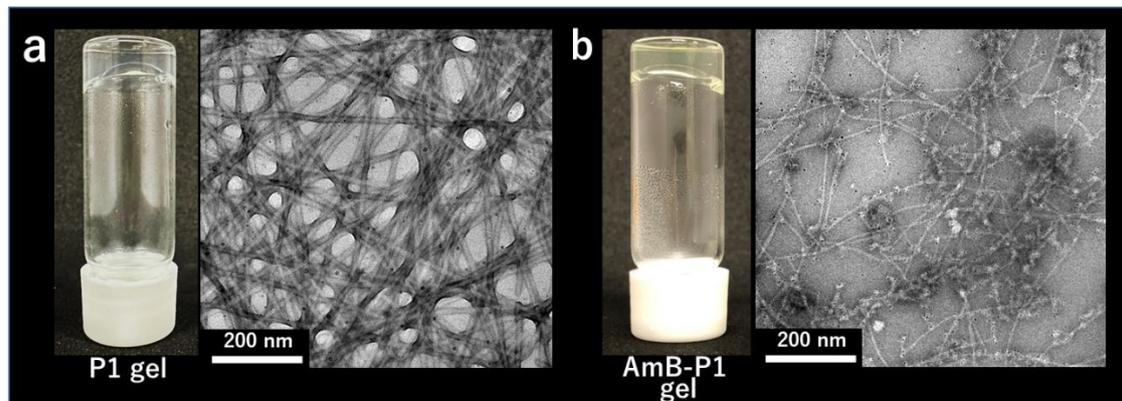


図 3 (a) P1 のみから作製したハイドロゲル (P1 gel)、(b) P1 と AmB から作製したハイドロゲル (AmB-P1 gel) の外観と TEM 画像

AmB と P1 が形成した自己組織化体の抗真菌活性を、モデル真菌として *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741) を用いて評価した。AmB-NCs の抗真菌活性は、*S. cerevisiae* を液中培養しながら経時的に濁度測定 (OD660) を行い、その生育を記録することで評価した。DMSO に溶解した AmB を遊離 AmB として添加した群をポジティブコントロールとして用いた。結果として、遊離 AmB は *S. cerevisiae* の生育を大きく遅らせたが、同じ濃度の AmB-NCs は *S. cerevisiae* の生育に全く影響を与えなかった (図 4a)。また、AmB-P1 gel の抗真菌活性については、溶媒に YPD 培地を用いて AmB-P1 gel を作製し、その上で *S. cerevisiae* を培養することで評価した。ポジティブコントロールとして、遊離 AmB を添加した培地を寒天で固化したもの (AmB-agar gel) を用いた。その結果、遊離 AmB は 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で *S. cerevisiae* の生育を完全に阻害したが、AmB-P1 gel では 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の AmB 濃度でも全く阻害が見られなかった。この結果は予想と異なるが、AmB は P1 と co-assembly することでその抗真菌活性を失うという興味深い知見を与えた。AmB が抗菌機能を失った理由としては、AmB が P1 と比較的強い相互作用を持つことによって、真菌の細胞膜上で正しくチャンネルを形成できなくなったということが考えられる。ただし、未だ実験的に示されたわけではない。

AmB の抗真菌活性が P1 との co-assembly によって失われたのであれば、P1 を分解することでその機能を回復できるのではないかと発想が生まれた。P1 は α -chymotrypsin (ChT) というタンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) によって分解できる。そこで、*S. cerevisiae* の液中培養系において、AmB-NCs と ChT を添加したところ、AmB-NCs 単体と比べて *S. cerevisiae* の生育が阻害された (図 4a)。AmB-NCs 中の P1 が ChT によって分解されたことで AmB が溶液中に遊離し、抗真菌活性が回復したと考えられる。

最後に、AmB-P1 gel を用いた菌種選択的な殺菌に挑戦した。病原性の真菌は、人間など動物に感染する際にプロテアーゼを分泌することが知られている。そこで、AmB-P1 gel は病原真菌の分泌するプロテアーゼによって分解されて初めて AmB を放出し、病原真菌を殺菌するのではないかと考え、実験を設計した。今回、病原真菌のモデルとして *Aspergillus oryzae* (RIB40) を選択した。*A. oryzae* は変法 CD 固形培地 (MCD 培地) 上で培養を行うとプロテアーゼを分泌することが報告されている²。まず、*S. cerevisiae* と *A. oryzae* を寒天または P1 でゲル化した MCD 培地上で培養し、分泌されたプロテアーゼの活性測定を行った。*S. cerevisiae* はプロテアーゼを分泌せず、*A. oryzae* はいずれの培地上でもプロテアーゼを分泌していた (図 5a)。続いて、MCD 培地を溶媒として AmB-agar gel と AmB-P1 gel を作製し、AmB-agar gel には遊離 AmB を添加した。これらのゲル培地上で *S. cerevisiae* を培養したところ、図 4b の結果と同様に、AmB-agar gel 上では生育せず、AmB-P1 gel 上では生育が見られた (図 5bi, iii)。これは、

AmB-P1 gel 中の AmB は抗真菌活性が抑制されていることを示している。一方、*A. oryzae* は AmB-agar gel, AmB-P1 gel の両方において生育が見られなかった(図 5bii, iv)。*A. oryzae* は AmB-P1 gel 上でプロテアーゼを分泌しているため、AmB と co-assembly している P1 を分解し AmB を放出することで生育できなくなっていると考えられる。

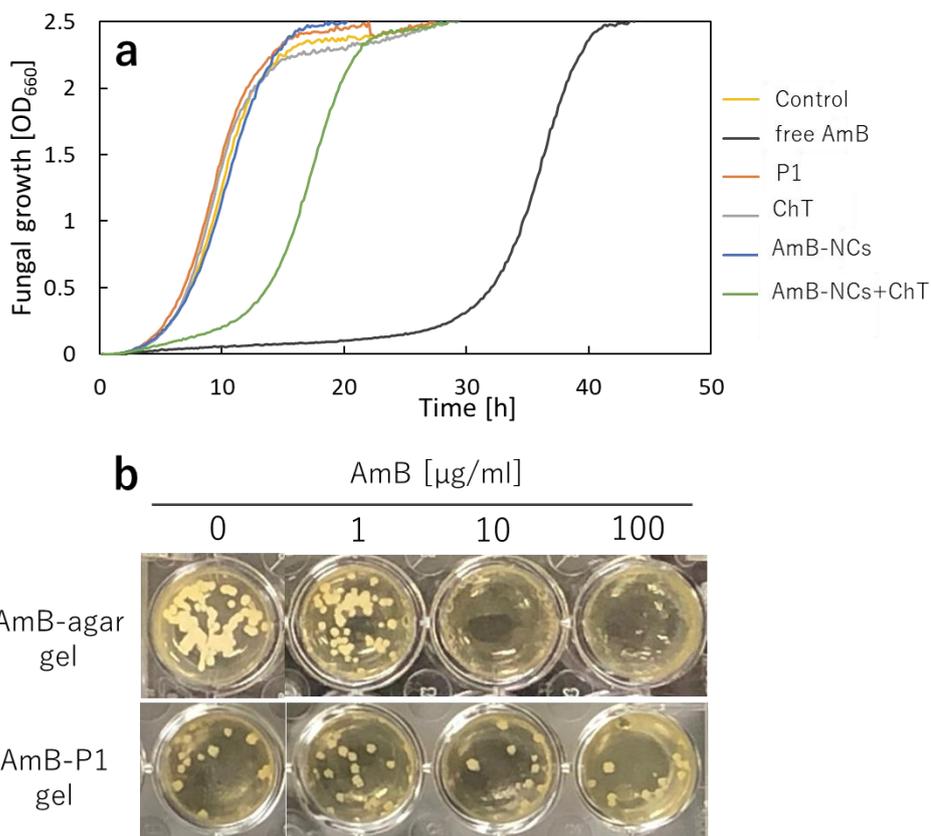


図 4 (a) AmB-NCs、(b) AmB-P1 gel の抗真菌活性評価

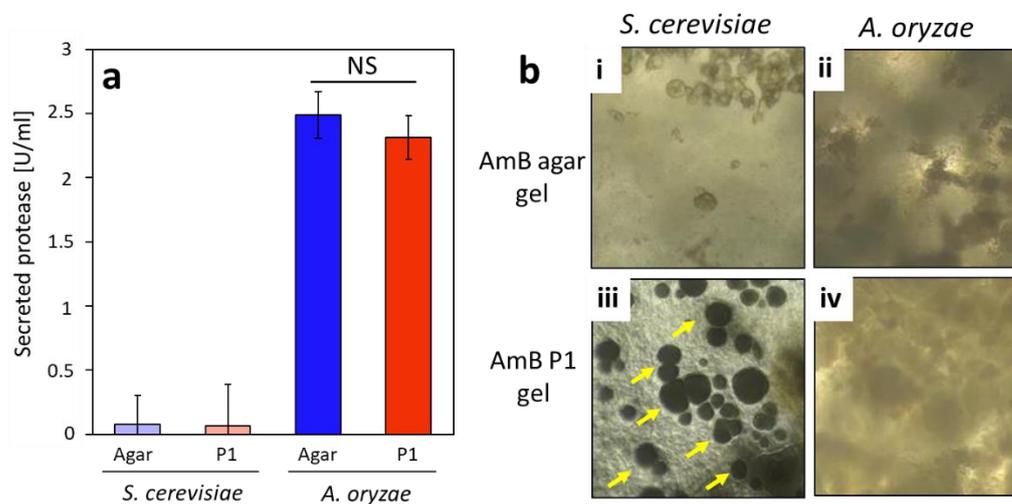


図 5 (a) MCD 培地を寒天または P1 でゲル化した培地上で生育した *S. cerevisiae* と *A. oryzae* が分泌したプロテアーゼの活性、(b) 遊離 AmB を添加し寒天でゲル化した MCD 培地(AmB-agar gel)、または、MCD 培地を溶媒として作製した AmB-P1 gel 上における *S. cerevisiae* と *A. oryzae* の生育。画像は 1 mm×1 mm の顕微鏡画像を示す

5. 結論

P1 は AmB と co-assembly することで AmB を内包した NCs やゲルファイバーといった

組織化体を形成した。その際、AmB の抗菌活性は抑制され、NCs やゲルは抗菌活性を示さなかった。ここにプロテアーゼを作用させると組織化体の P1 が分解されることで AmB の放出が起こり、AmB の抗菌活性が回復した。さらに、AmB-P1 gel 培地はプロテアーゼを分泌する *A. oryzae* に特異的な毒性を示した。以上から、P1 と抗菌薬の co-assembly は、既存の抗菌薬の機能を制御してプロテアーゼ分泌菌への特異性を付与することが示唆された。プロテアーゼは、病原菌が分泌し、人体に感染する際に利用していることが知られている。P1 を用いて既存の抗菌薬にプロテアーゼ分泌菌特異性を付与すれば、患者の組織やそれ以外の常在菌を保護したまま感染症治療を行うことができる。すなわち、既存の抗菌薬の適応範囲を広げる「ドラッグリポジショニング」を実現する可能性がある。

本申請研究の計画段階で予定されていた「複数要素の同時 co-assembly」と「シミュレーションを用いた co-assembly の分子論的解析」は成果報告までに行うことができなかった。しかし、薬剤分子とペプチドの co-assembly を利用することで薬剤の機能が制御できるという予想外の発見を得た。本研究は米国化学会の発行する ACS Applied Nano Materials 誌に高く評価され、現在 Revise 段階ではあるが、裏表紙へ掲載される予定である。

6. 謝辞

本研究は神戸大学大学院工学研究科 界面材料工学研究室で実施されました。丸山達生教授に感謝いたします。使用した微生物は全て神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科（石井純准教授）から分与されました。本研究は川西記念新明和教育財団の助成によって成り立っております。貴財団に対し深く感謝を表します。

7. 参考文献

1. Restu WK, Nishida Y, Yamamoto S, Ishii J, Maruyama T. Short Oligopeptides for Biocompatible and Biodegradable Supramolecular Hydrogels. *Langmuir*. 2018;34(27):8065-8074. doi:10.1021/acs.langmuir.8b00362
2. Kumura H, Ishido T, Shimazaki K. Production and partial purification of proteases from *Aspergillus oryzae* grown in a medium based on whey protein as an exclusive nitrogen source. *J Dairy Sci*. 2011;94(2):657-667. doi:10.3168/jds.2010-3587

8. 成果発表

8.1. 査読論文

- (1) K. Morita, Y. Nishimura, J. Ishii, T. Maruyama, Micelle-Like Nano-Assembly of Short Peptide Creates Antimicrobial Selectivity in a Conventional Antifungal Drug, *ACS Appl. Nano Mater.*, Under review.

8.2. 学会発表

- (1) 森田健太、レストウウィタカルティカ、西村勇哉、石井純、丸山達生, Function Control of Hydrophobic Antimicrobial Molecules by utilizing Self-Assembly of Oligopeptide-Type Low Molecular Weight Hydrogelator, 4th G'L'owing Polymer Symposium in KANTO (GPS-K2021) (2021)
- (2) 森田健太、レストウウィタカルティカ、西村勇哉、石井純、丸山達生, オリゴペプチドとの co-assembly による薬剤分子の機能制御, 第 70 回高分子学会年次大会 (2021)
- (3) 森田健太、レストウウィタカルティカ、西村勇哉、石井純、丸山達生, 短鎖ペプチドの自己組織化による抗菌性分子の機能制御, 第 70 回高分子討論会 (2021)
- (4) 森田健太、レストウウィタカルティカ、西村勇哉、石井純、丸山達生, 短鎖ペプチドの自己組織化を利用した疎水性抗菌分子の機能制御, 化学工学会第 52 回秋季大会 (2021)