

ペプチド集合体の酵素触媒による事後修飾法の確立 とエマルション型ワクチンの創製に関する研究

樋口, 亜也斗

<https://hdl.handle.net/2324/7363774>

出版情報 : Kyushu University, 2024, 博士 (工学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



氏 名 : 樋口 亜也斗

論文名 : ペプチド集合体の酵素触媒による事後修飾法の確立とエマルジョン型
ワクチンの創製に関する研究

区 分 : 甲

論文内容の要旨

超分子材料は分子間の非共有結合的な相互作用を介して形成され、単分子の設計によりその性質や機能を制御できる。特に、ペプチド鎖に疎水性置換基を導入した両親媒性ペプチド (PA) は、分子設計の自由度が高く、形成される材料の物性を容易に制御できるため、多様なバイオ材料への応用が期待されている。これまで、ペプチド配列にエピトープ配列を導入した PA が形成するペプチド集合体をワクチンに応用した研究が多く報告されているが、その多くはペプチド抗原の導入に留まり、より強力で持続的な免疫効果が期待される抗原タンパク質を導入した例は限られている。このため、ペプチド集合体にタンパク質を修飾する技術の確立が求められている。しかし、ペプチド集合体は形成経路に応じて異なる構造を取る複雑性を有しているため、PA モノマーへのタンパク質の導入は困難であった。この課題に対し、ペプチド集合体形成後にタンパク質を修飾する「事後修飾法」は、集合体の形成を阻害することなくタンパク質の修飾を可能にする手法として注目されている。特に、酵素触媒による事後修飾は、タンパク質の機能を損なわず部位特異的な修飾を行うことが可能な点で有望である。しかしながら、酵素触媒による事後修飾の例は少なく、外部環境あるいはその他の酵素反応性に影響を与え得る因子が明らかとなっていない。

第 1 章では、超分子材料の機能化とそのワクチン応用についてまとめた。また、超分子材料へのタンパク質の事後修飾の例を示し、酵素触媒を用いた超分子材料の事後修飾を行った研究の現状を述べた。その中で、グルタミン残基 (Gln) とリジン残基 (Lys) の側鎖間を架橋する酵素である微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) 反応性を持つ PA, Fmoc-(Leu)_n-Gln-Gly (Fmoc-L_nQG, n = 2, 3) が形成する集合体に Lys を含むペプチドタグを導入したタンパク質を MTG 反応を介して事後修飾可能なことを示した。しかしながら、Fmoc-L₂QG と Fmoc-L₃QG の間で酵素反応率に大きな差が見られ、この反応性の違いの原因については未解明であることを指摘した。

第 2 章では、PA 集合体の酵素触媒を用いた事後修飾法の確立のために Fmoc-L₂QG と Fmoc-L₃QG の酵素反応率の違いをもたらす因子の特定を目指した。この目的を達成するために 2 つの戦略を考えた。1 つ目の戦略として、溶液の pH により Fmoc-L_nQG 集合体表面に出るペプチド C 末端のカルボキシ基の荷電状態を変化させ、それに伴う集合体の形状や表面状態を改変させることで、これらの因子が及ぼす酵素反応への影響を評価した。その結果、Fmoc 基間の π - π スタッキングとペプチド鎖間の水素結合等の相互作用が pH に応じて変化し、集合体の形態や酵素反応性に影響を与えることが確認された。2 つ目の戦略として、酵素反応部位を持たないペプチド (非基質ペプチド) として Fmoc-L_n (n=2, 3) を設計し、非基質ペプチド集合体の存在が Fmoc-L_nQG の

酵素反応性に与える影響を調べた。その結果、共存する非基質ペプチド集合体の形態やサイズが酵素反応性に影響する可能性があることが明らかとなった。以上から、PA 集合体の特性とその外部環境が、PA 集合体の酵素触媒を用いた事後修飾に大きく影響することが示唆された。

第 3 章では、第 2 章にて確認された Fmoc-L₂QG と Fmoc-L₃QG の分子間相互作用や集合体形態の違いがペプチド配列によるものなのか、あるいは集合体の形成経路によるものなのかを明らかにするため、Fmoc-L₂QG と Fmoc-L₃QG の両集合体の形成経路について、分光学的および顕微鏡学的な解析を試みた。その結果、Fmoc-L₂QG は濃度依存的に形成経路が変化する一方で、Fmoc-L₃QG は複数の競合する形成経路が存在することが確認された。これらの結果より、アミノ酸 1 残基の違いが集合体の形成機構に大きく影響を与えることが明らかとなった。以上より、Fmoc-L₂QG と Fmoc-L₃QG の分子間相互作用や集合体形態の違いが集合体の形成経路によるものであることが示唆された。

第 4 章では、第 2, 3 章にて確立したペプチド集合体の酵素触媒による事後修飾法を用いたエマルション型ワクチンの創製を目指した。抗原タンパク質をペプチド集合体に修飾し、それを免疫賦活剤 (アジュバント) の一種である Oil-in-Water (O/W) 型エマルションの界面安定化剤として活用した O/W 型ペプチドエマルションを創製した。本エマルションは、エマルションの安定性をペプチド集合体により向上させるだけでなく、抗原タンパク質を共有結合で修飾することにより、免疫細胞への抗原タンパク質の送達能を高め、高いワクチン効果が期待できる。第 2, 3 章より、アミノ酸 1 残基の違いが集合体中の分子間相互作用、形態やその形成経路に影響を与えることが明らかとなった。また、Fmoc-L₂QG に関しては高い酵素反応性が得られた一方で、アミノ酸配列 L₂QG の N 末端に L を加えた Fmoc-LL₂QG では酵素反応性が Fmoc-L₂QG よりも低いことが確認されている。そこで、エマルション型ワクチンの創製に最適な PA 探索のため、ペプチド配列 L₂QG の N 末端アミノ酸を 20 種類のアミノ酸残基で置換した PA, Fmoc-XL₂QG (X = 20 種類のアミノ酸) を設計した。まず、本 O/W 型ペプチドエマルションに必要である自己組織化能、酵素反応性、油水界面安定化能の全てを併せもつ PA を探索した。その結果、X = E, N, Y, L の 4 種類の PA が 3 つの特性を併せ持つことが明らかとなった。次にこれら 4 種類の PA 集合体を用いて調製した O/W 型ペプチドエマルションの免疫細胞への抗原タンパク質の送達能評価を行った。その結果、いずれの PA に関しても、抗原タンパク質が共有結合的に修飾された O/W 型ペプチドエマルションを用いた際に免疫細胞への高い抗原タンパク質送達能が確認された。最後に、O/W 型ペプチドエマルションのワクチン効果の検証を動物実験により行った。その結果、O/W 型ペプチドエマルションは抗原タンパク質のみ及びポジティブコントロールとして用いた既存の O/W 型エマルションと比較して抗体産生能が高いことが明らかとなった。

第 5 章では、各章の総括と今後の展望について述べた。