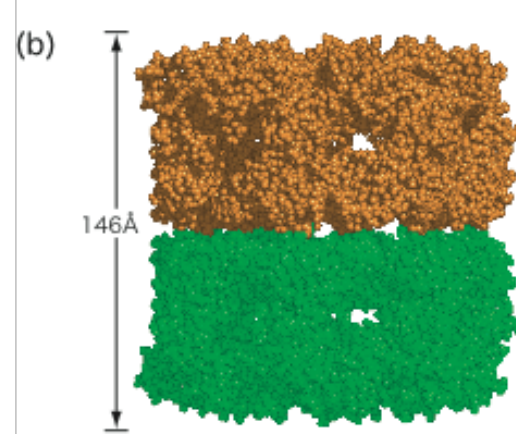
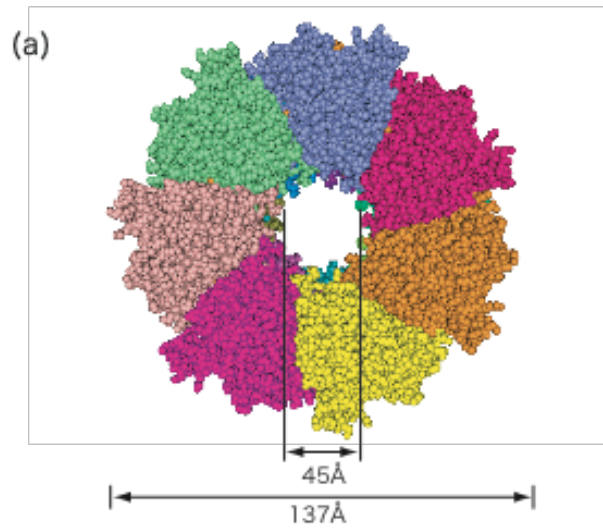


変異型シャペロニン複合体を 利用した細胞内への局所的薬物 送達システム用ナノカプセル

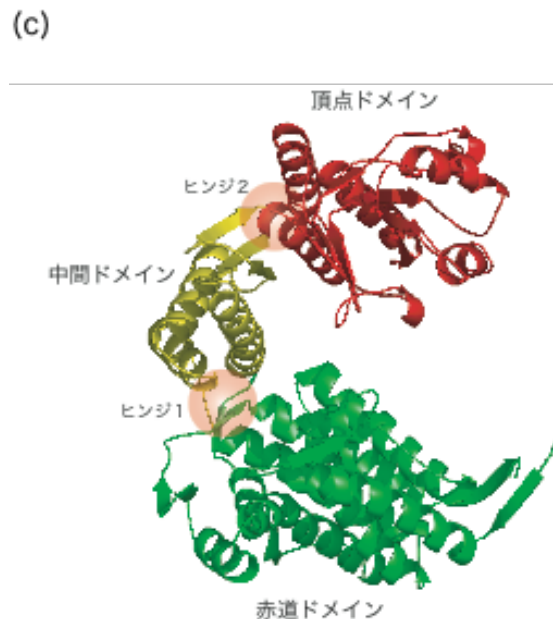
神奈川工科大学 工学部 応用化学生物学科
教授 小池 あゆみ

2024年10月15日

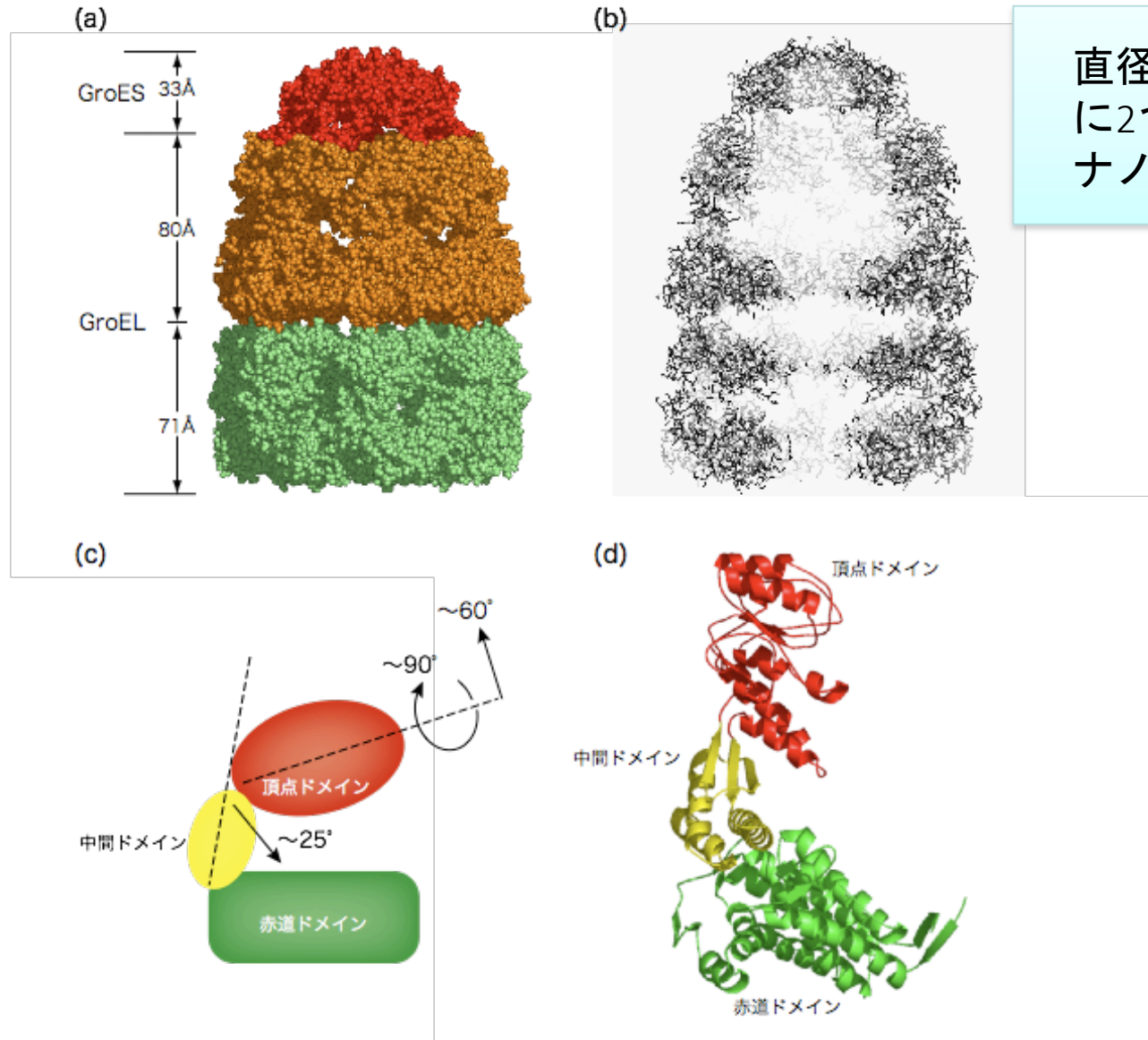
シャペロニンGroELとGroESの構造



直径 5 nm の空洞を
1分子に2つ持つ。



シャペロニン複合体の構造



新生ポリペプチドの フォールディング経路のモデル

大腸菌サイトゾル

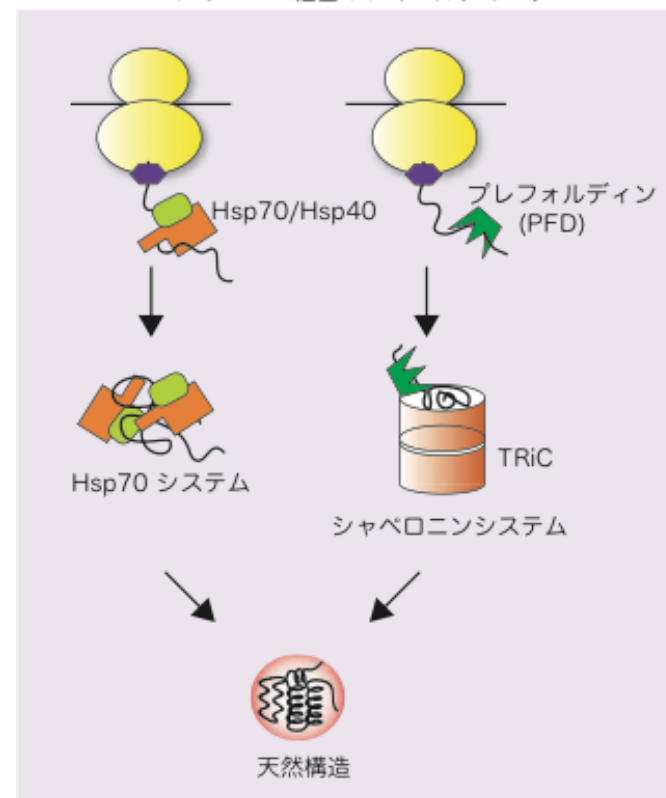
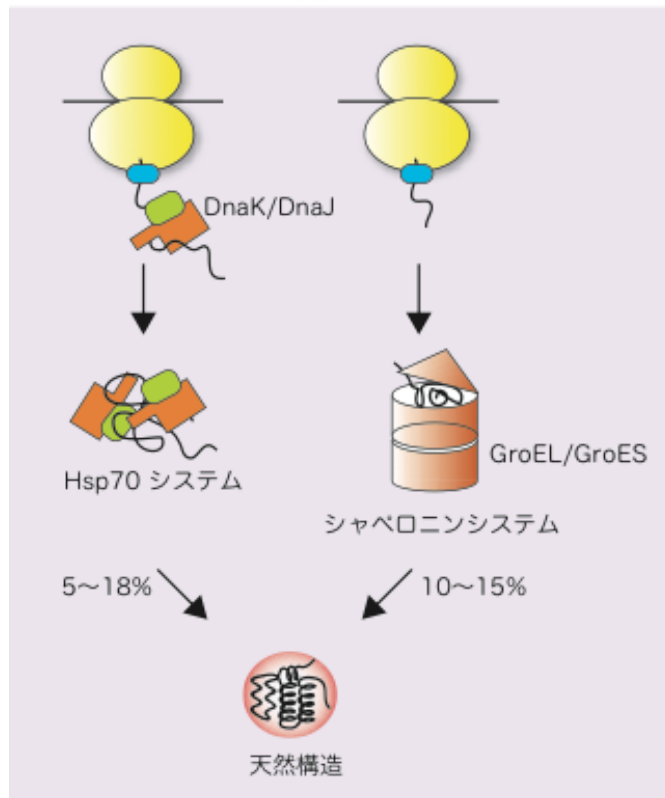
哺乳類サイトゾル

自発的フォールディング

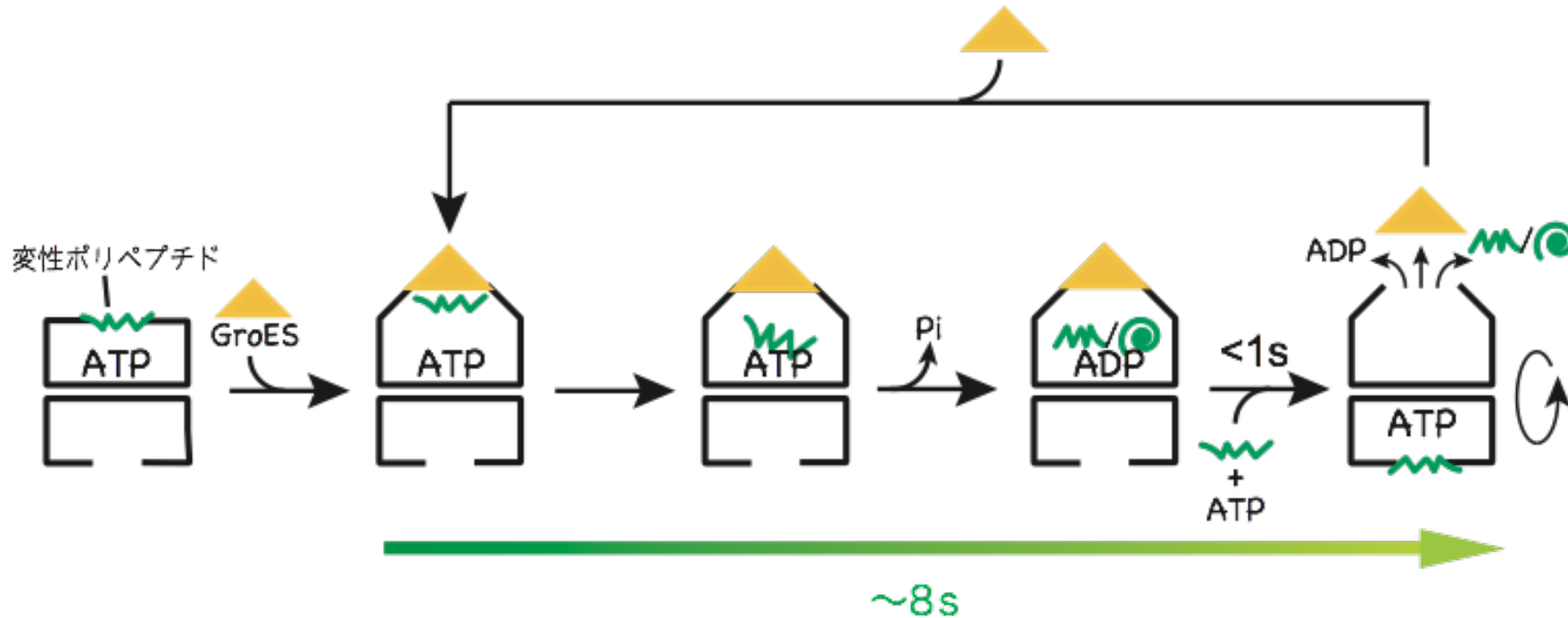
シャペロン経由のフォールディング

自発的フォールディング

シャペロン経由のフォールディング



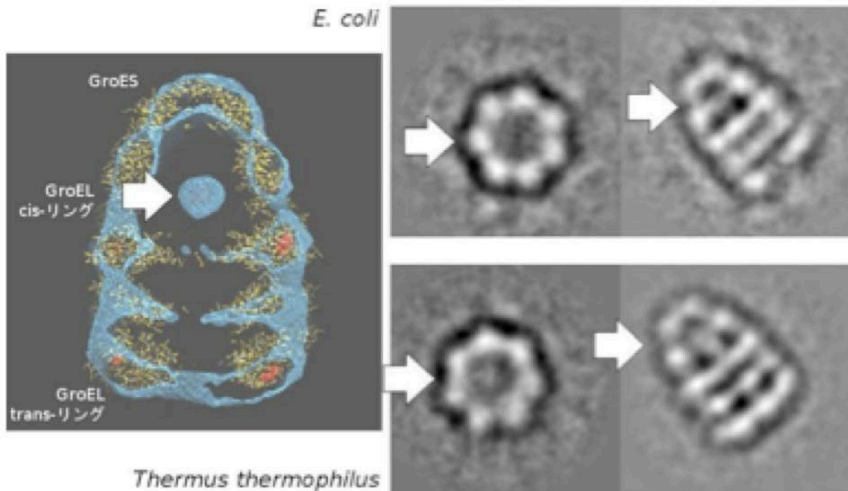
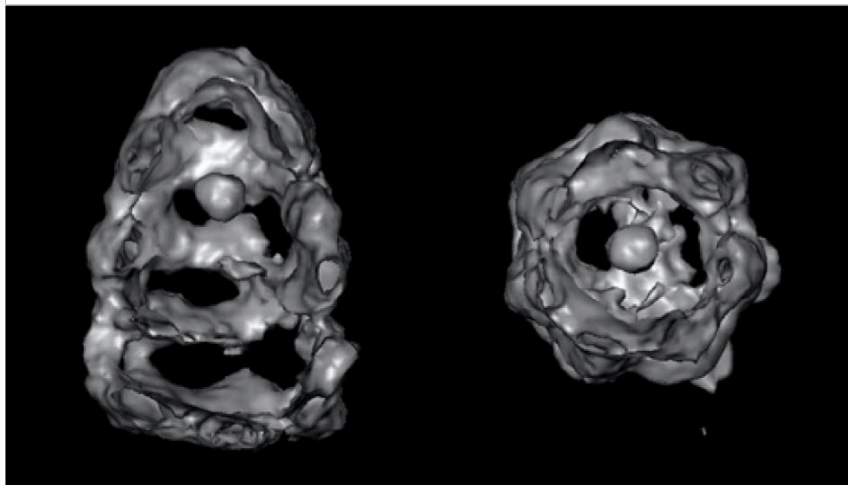
シャペロニンの作用機構モデル 「閉じ込め、保護し、放出する」



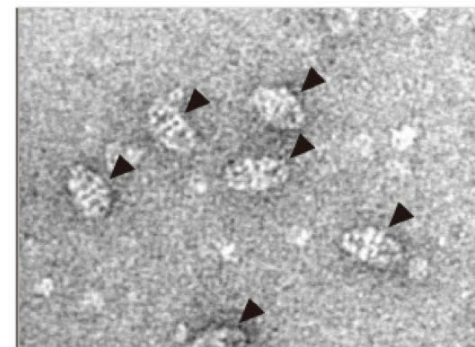
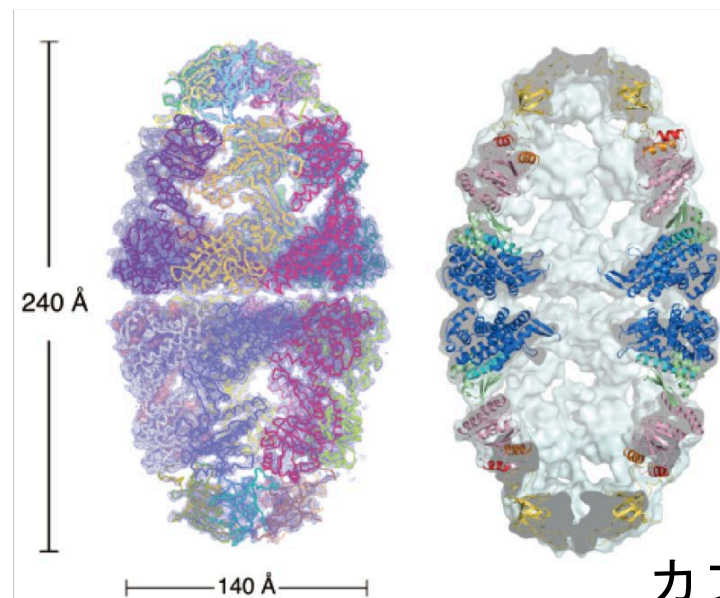
ATPが加水分解する時間 (~8s) がシャペロニンの反応サイクルのタイマーとして働く。

生命の仕組みの活用: 開閉制御可能な タンパク質性ナノカプセルの細胞内局所送達

Chaperonin



Kanno R., Koike-Takeshita A. et al *Structure*, 2009



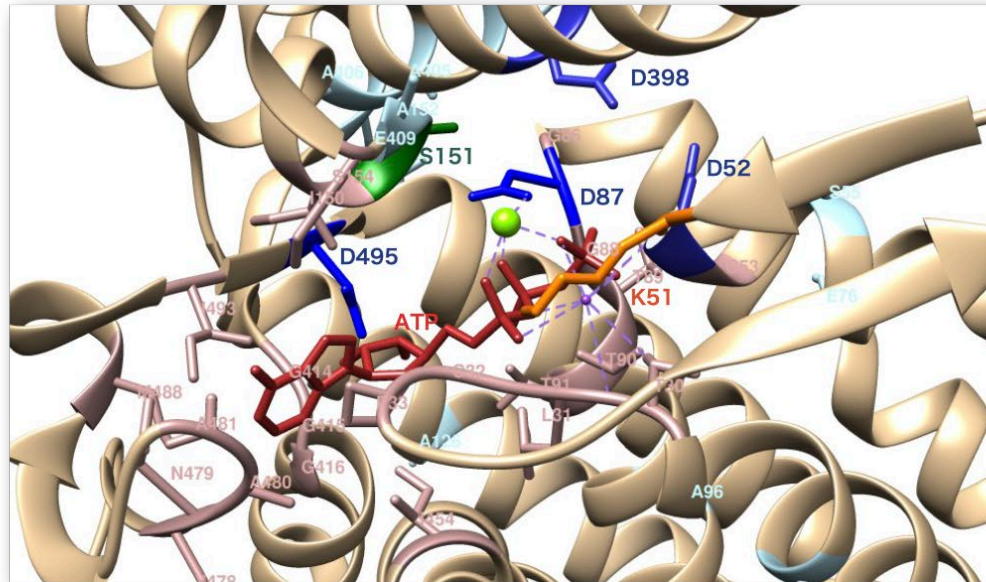
カプセルとしての特徴

- ・ サイズ一定
- ・ 開閉可能
- ・ 修飾が可能

Koike-Takeshita A, et al *J. Biol. Chem.*, 2014

Koike-Takeshita A, et al *J. Mol. Biol.*, 2014

サイクル時間を制御したシャペロニン変異体

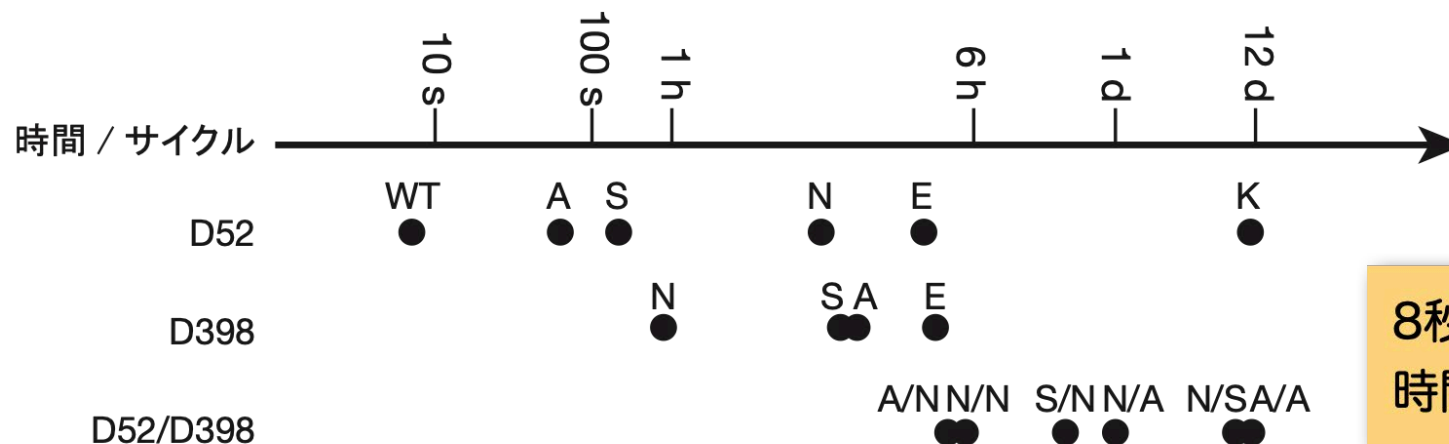


ATP加水分解に重要なアミノ酸を置換することで、サイクル時間を遅く出来る。

Koike-Takeshita A, Arakawa T, Taguchi H, Shimamura T., *J. Mol. Biol.*, **426**(21), 3634-41 (2014).

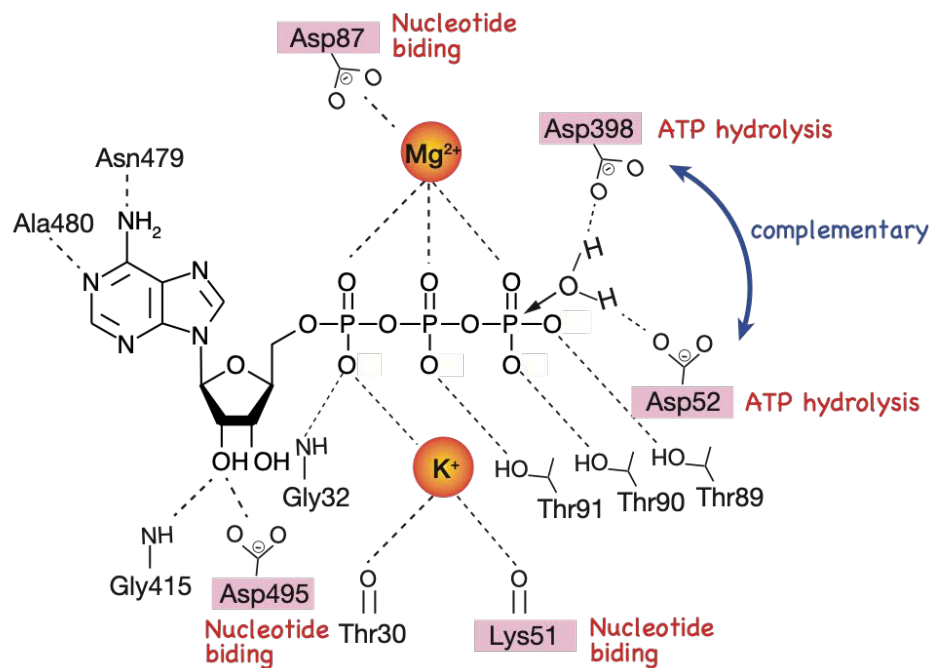
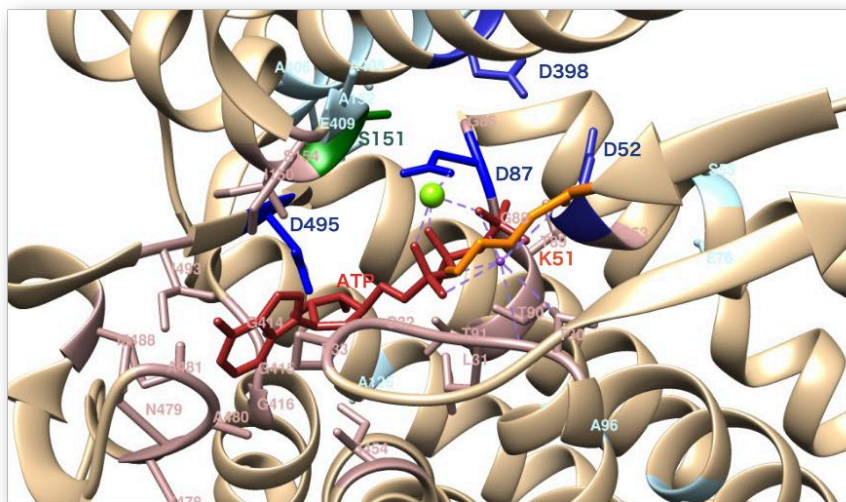


サイクル時間を変えたGroEL変異体ライブラリー



8秒~12日の様々な時間で蓋が開く

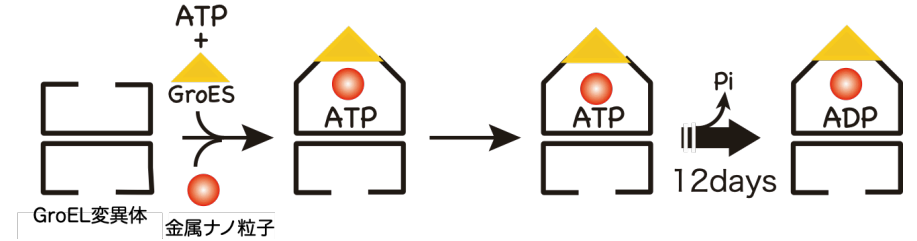
各アミノ酸残基の役割



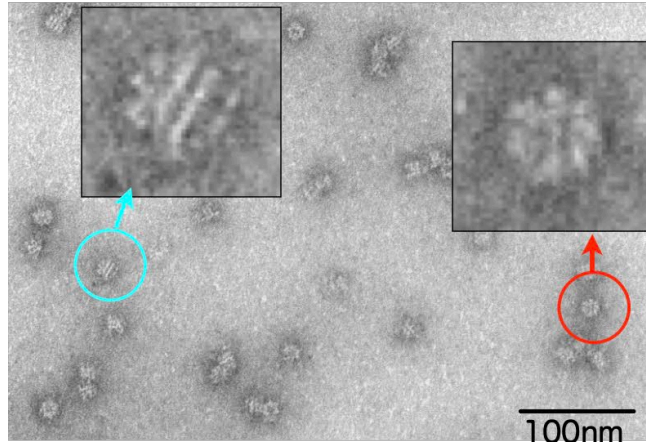
サイクル時間を変えたGroEL変異体ライブラリー

Mutant	ATPase activity	Nucleotide binding	Time/cycle	Substrate binding	GroES binding	Folding activity
WT	+	—	8sec	+	+	+
D52A	↓	—	70sec	+	+	+
D52S	↓	—	150sec	+	+	+
D52N	↓	+	40min	+	+	+
D52E	↓	+	200min	+	+	+
D52K	↓	+	> 12days	+	+	+
D398A	↓	+	60min	+	+	+
D398S	↓	+	> 60min	+	+	+
D398N	↓	—	270sec	ND	+	ND
D398E	↓	+	240min	ND	+	ND
D52A,D398A	↓	+	12days	+	+	+
D52A,D398N	↓	+	360min	ND	+	ND
D52S,D398N	↓	+	1day	ND	+	ND
D52N,D398A	↓	+	1day < D52N,398A < 12days	ND	+	ND
D52N,D398S	↓	+	≅ 12days	ND	+	ND
D52N,D398N	↓	+	360min	ND	+	ND
K51A	↓	↓	60sec	+	↓ / +*	+
K51D	↓	↓	35sec	+	↓ / +*	↓
D87A	↓	↓	200sec	+	↓ / ↓*	↓
D495A	↓	↓	160sec	+	↓ / ↓*	↓

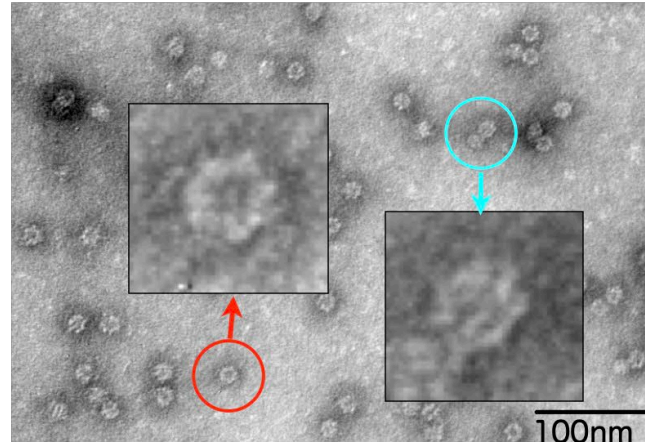
シャペロニンはタンパク質以外にも閉じ込める ～金属ナノ粒子の内包～



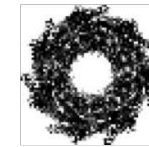
A. GroEL



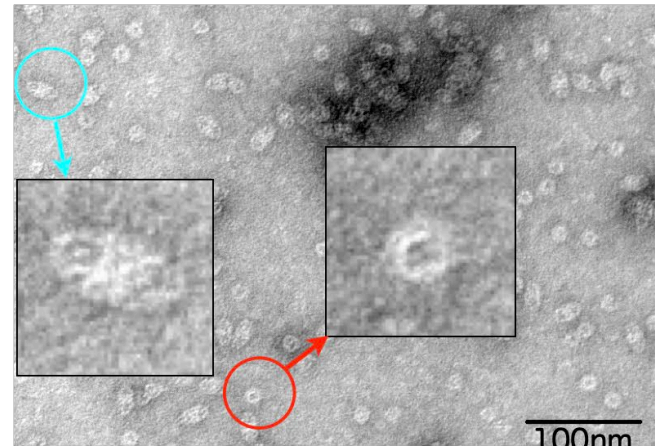
B. GroEL+ATP+ナノ粒子



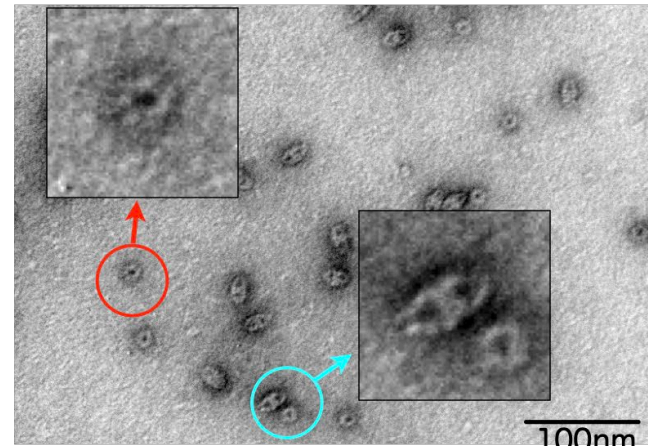
Top view



Side view

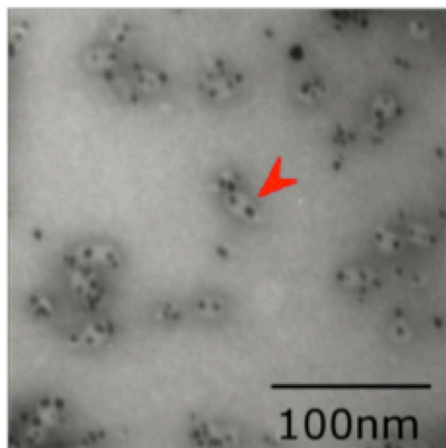


C. GroEL+GroES+ATP



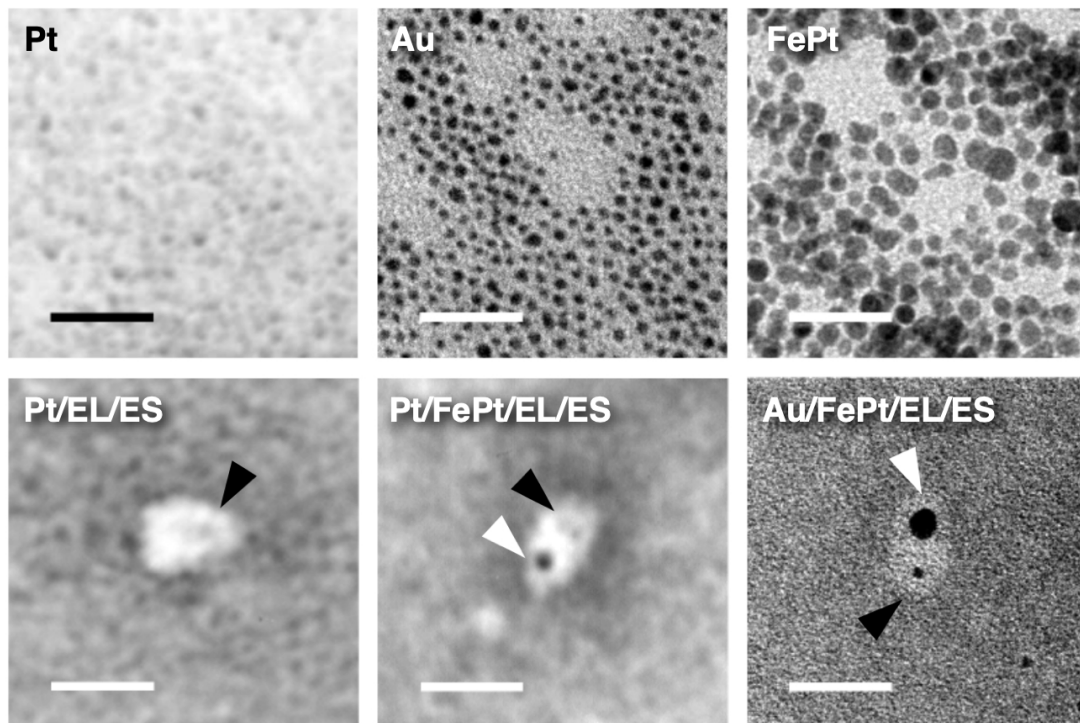
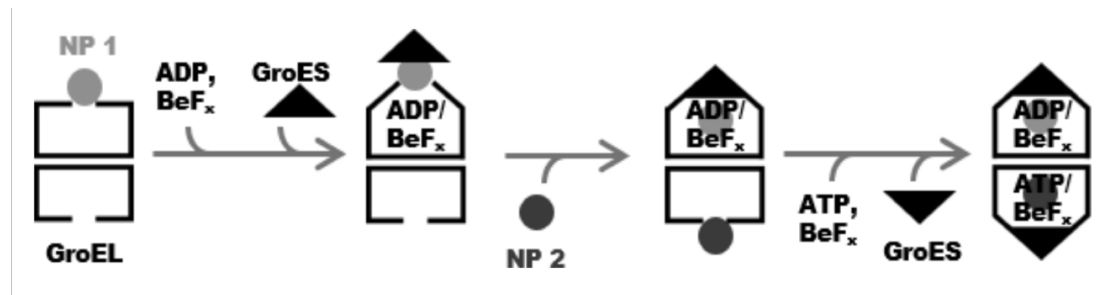
D. GroEL+GroES+ATP+ナノ粒子

内包率の向上と異種ナノ粒子の内包制御



内包率 95.4%

混合比率、接触時間等検討し、
大幅な内包率向上に成功

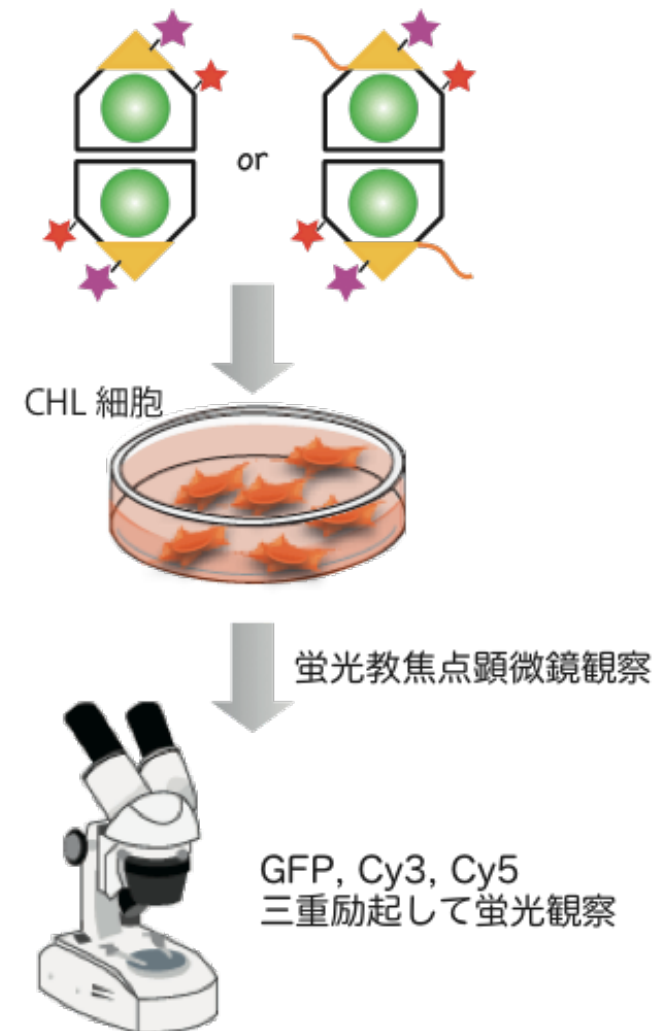
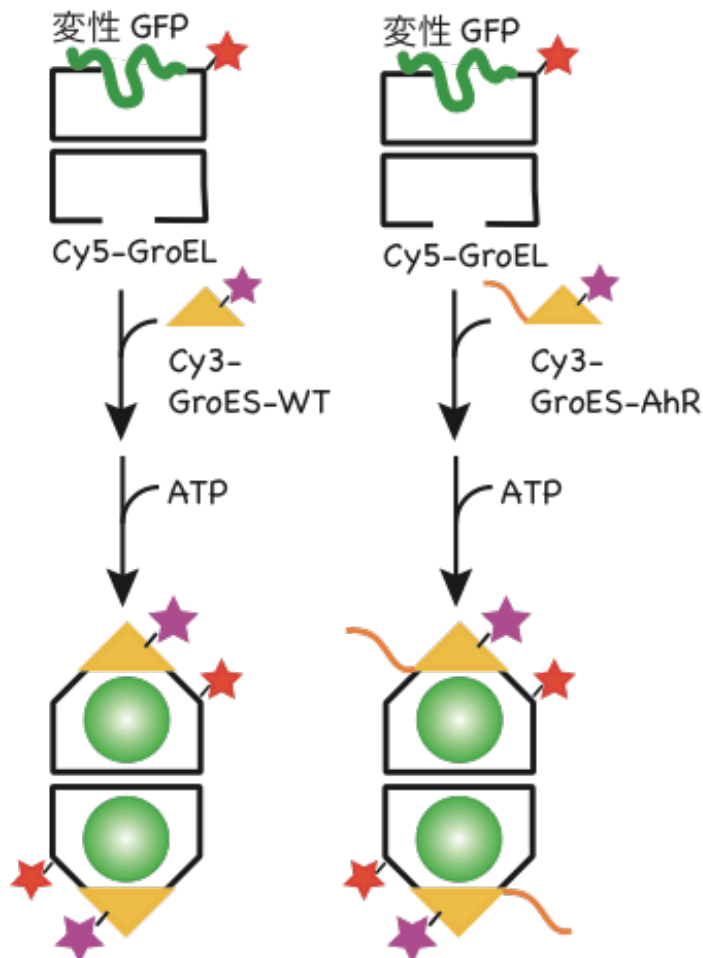


GroELカプセルの核輸送

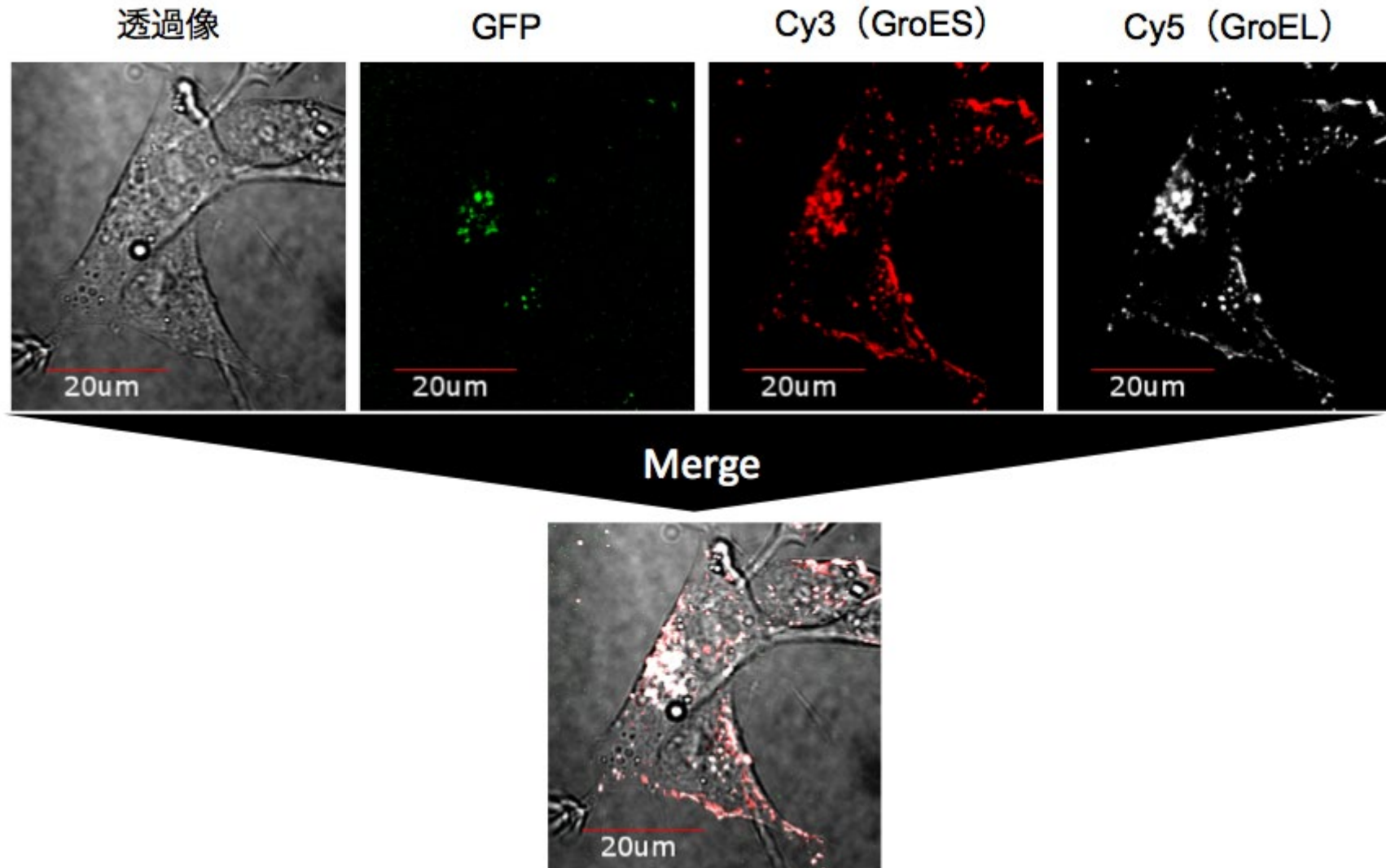
蛍光ラベルした GroEL 複合体の調製

細胞導入と動態観察

AhR: 核輸送シグナル配列

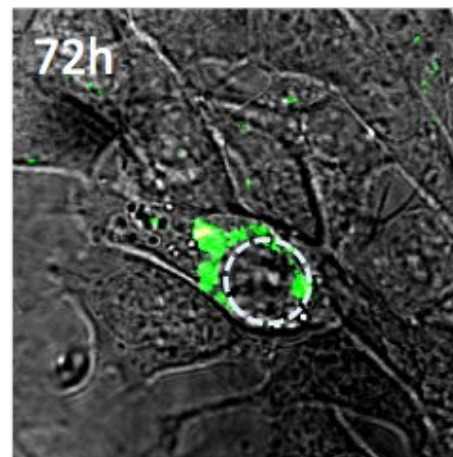
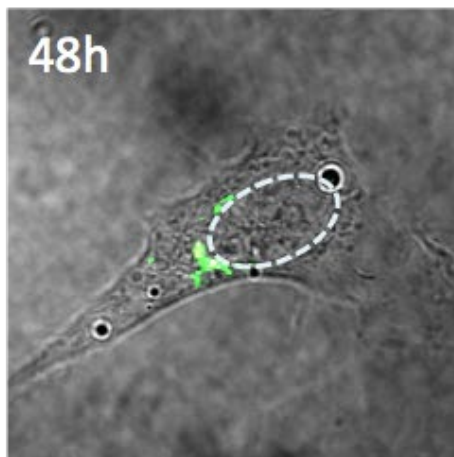
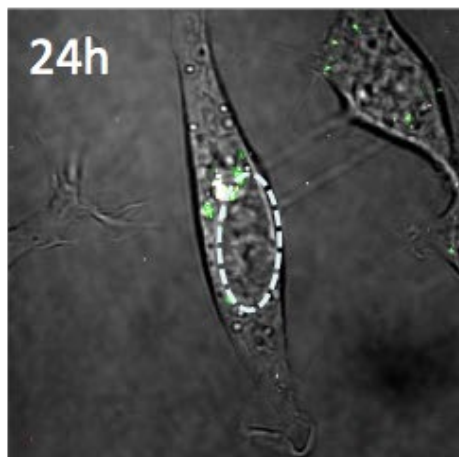


GroELカプセルの核輸送

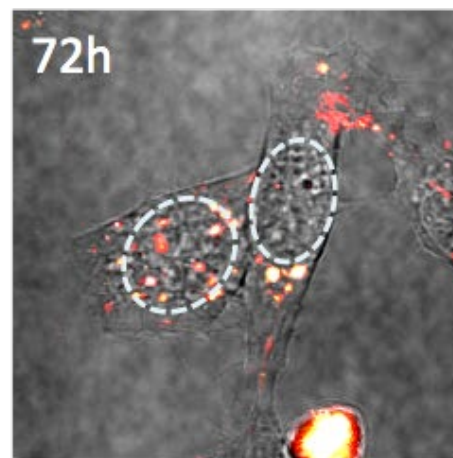
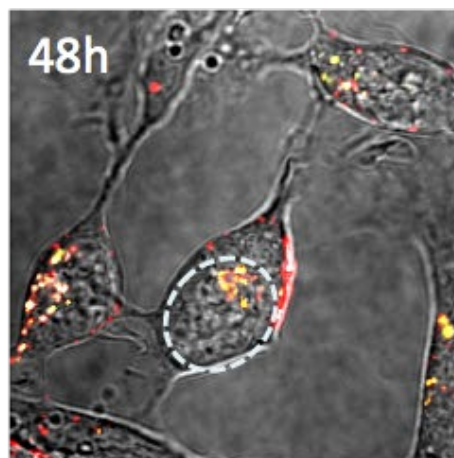
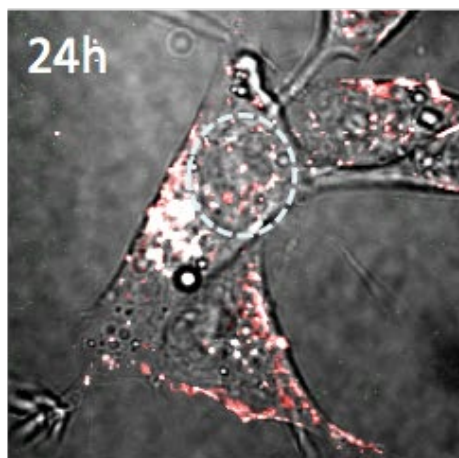


核へのカプセル送達

Cy5標識GroEL 52,398A/ Cy3標識GroES-WT/GFP/ATP

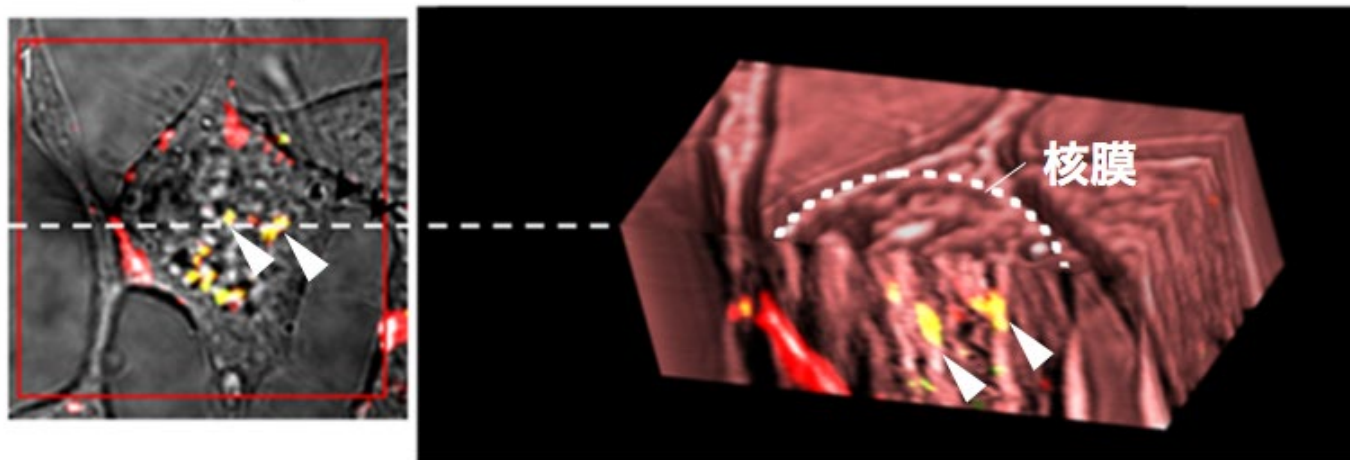


Cy5標識GroEL 52,398A/Cy3標識GroES-AhR/GFP/ATP

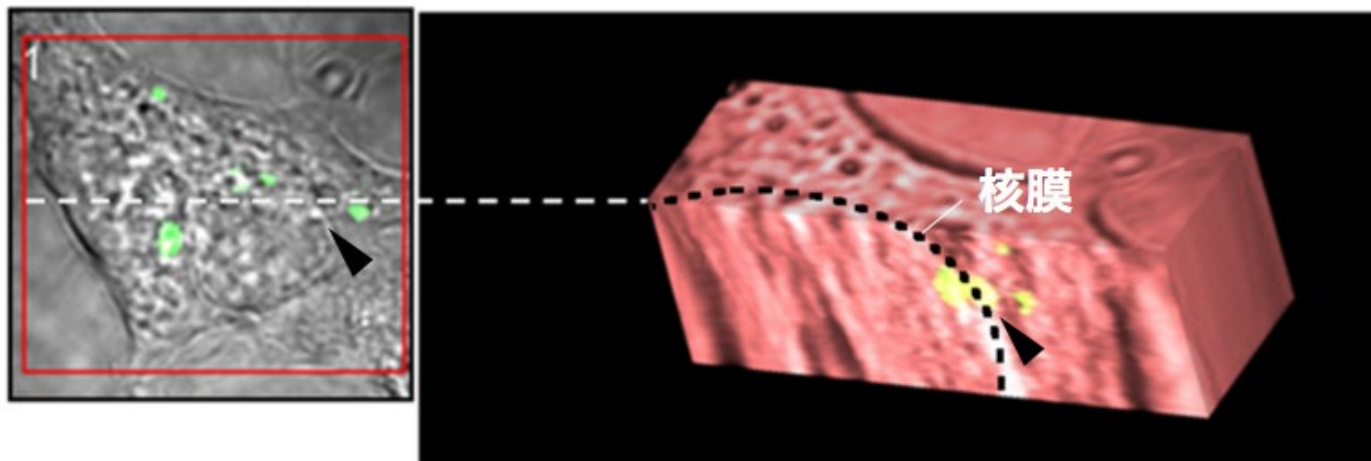


核へのカプセル送達

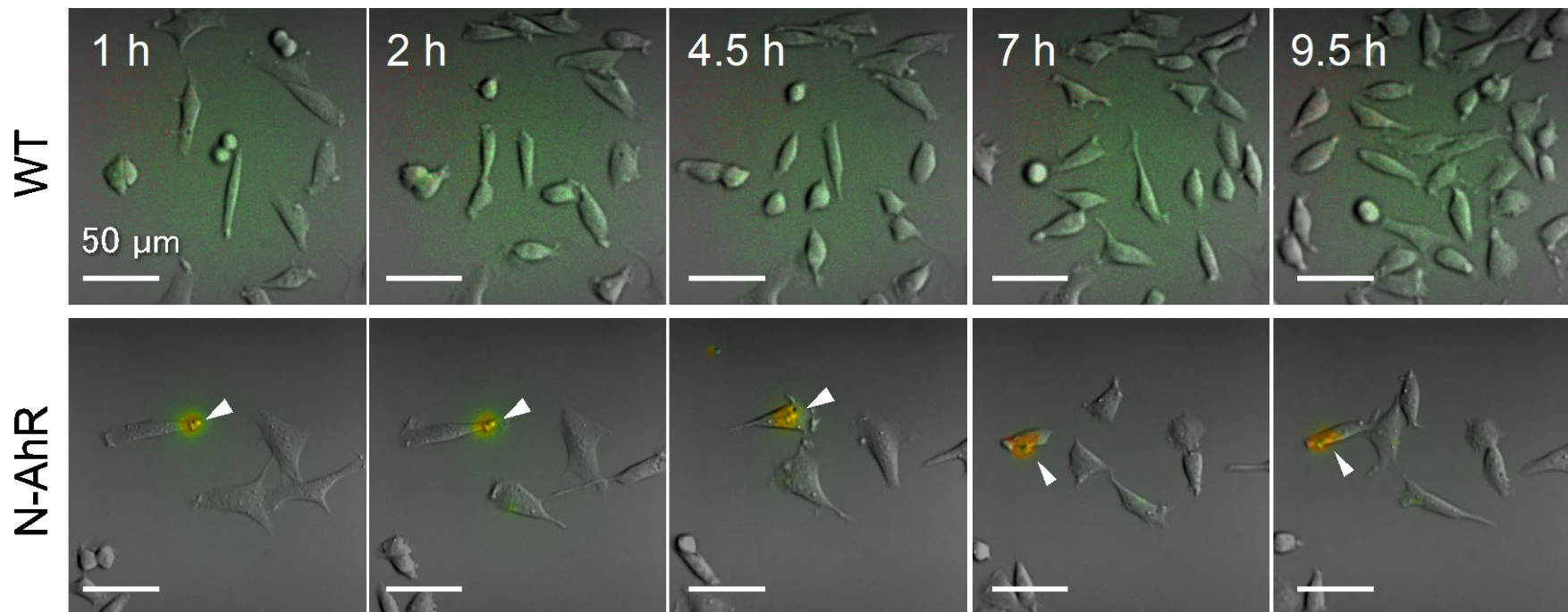
Cy5標識GroEL/Cy3標識GroES-AhR/GFP/ATP



Cy5標識GroEL/Cy3標識GroES-WT/GFP/ATP



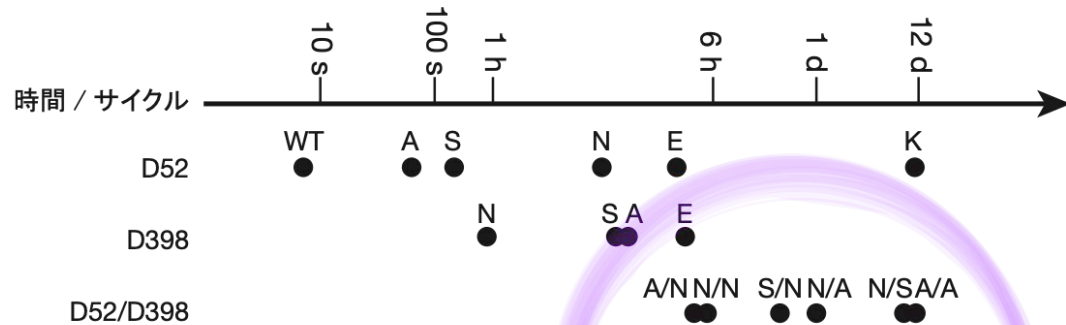
核へのカプセル送達



GroES	The stability of complexes	Delivery time after the administration		
		Cell membrane	Cyto- plasm	Cell nuclear
GroES ^{WT}	+	-	-	-
GroES ^{N-AhR}	+	1 h	4.5 h	7 h

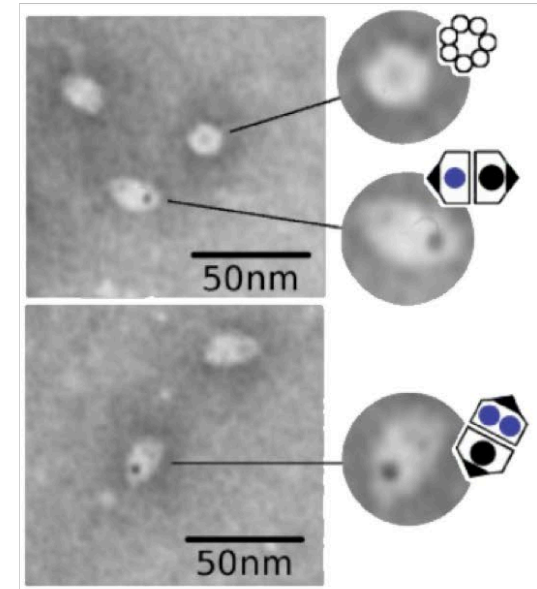
タンパク質性カプセル材料 としてのシャペロニンの応用

◆GroEL変異体ライブラリの作製/開閉時間の制御



特許第5540367号「シャペロニン変異体およびこれをコードするDNA」

◆2つの空間の閉じ込め制御

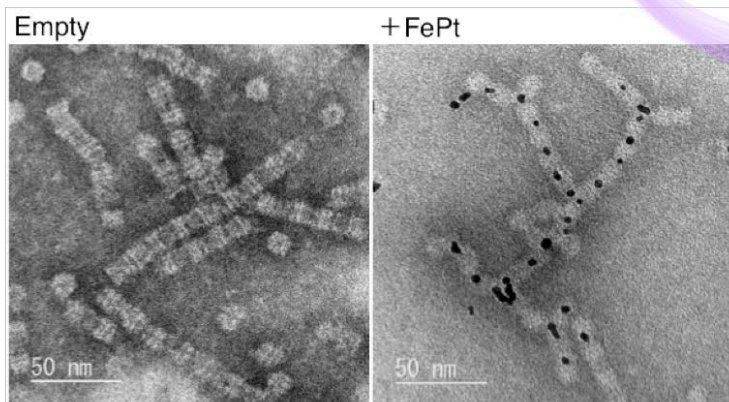


特許第6099069号「シャペロニン複合体及びその製造方法」

特許第6212752号「シャペロニン複合体の製造方法」

H. Yoda and A. Koike-Takeshita, Microscopy (2021) 70 (3): 289
2024年度 日本顕微鏡学会論文賞

◆薬剤内包GroELナノテープ

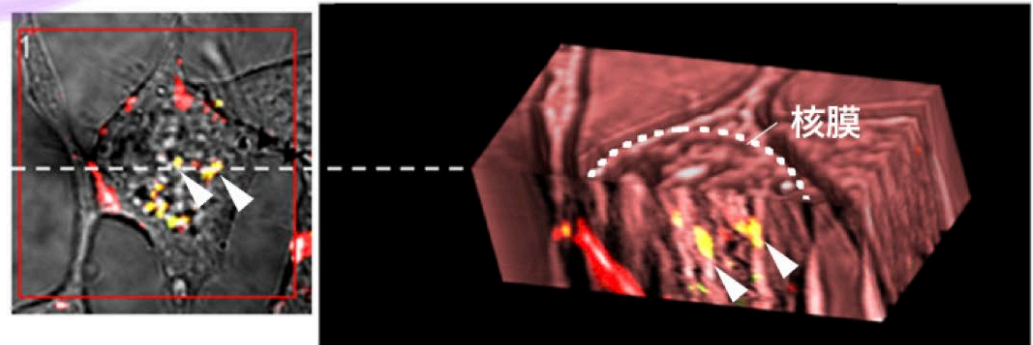


特願2017-210088

「GroEL含有液、その製造方法及びその使用方法」

◆細胞核へのシャペロニンカプセル送達

Cy5標識GroEL/Cy3標識GroES-AhR/GFP/ATP



特許第6454008号「変異型シャペロニン複合体を利用した細胞内への局所的薬物送達システム用ナノカプセル」

従来技術とその問題点

既に実用化されているものには、リポソームによる薬物送達等があるが、

薬物の封入効率

薬物の放出特性の制御

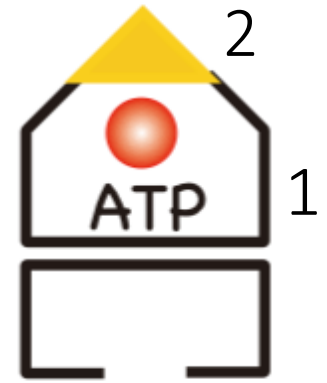
体内分布

等の課題がある。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、薬物を送達後に放出するシャペロニンカプセルの開発に成功した。
- シャペロニン複合体を細胞内に導入させ、被内包物を～7時間で核内にまで到達させることが可能となった。
- シャペロニンカプセルが開くまでの時間は、8秒～12日程度まで制御が可能となった。

新技術の構成



1. 「ATP加水分解活性低下型GroELサブユニット変異体」を含むシャペロニン複合体
→被内包物の保持時間を制御する技術
2. 「核移行シグナルペプチドが付加されたGroES活性を有するサブユニット」を含むシャペロニン複合体
→細胞内の核に局所的に到達させる技術

想定される用途

- 本技術の特徴を生かすためには、細胞核への化合物送達システムに適用することのメリットが大きいと考えられる。
- 上記以外に、不安定化合物の安定化や分散性の効果が得られる。
- また、達成された2種類の化合物の内包制御技術に着目すると、薬剤輸送やバイオセンサといった用途に展開することが可能と思われる。

実用化に向けた課題

- 現在、細胞投与による核への薬剤送達が可能のところまで開発済み。送達時間の短縮化を検討している。
- 今後、変異体ごとの細胞内での薬剤放出時間について実験データを取得し、放出時間の制御に適用していく場合の条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、送達効率を向上できるよう技術を確認する必要がある。

企業への期待

- ヒト由来のシャペロニンを使ったカプセルの共同開発。
- 細胞内小器官への薬物送達システムの共同開発。
- 医薬分野などで疎水性タンパク質等の安定な分散、徐放を検討中の企業にも本技術が有効と考える。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：変異型シャペロニン複合体を利用した細胞内への局所的薬物送達システム用ナノカプセル
- 出願番号：特願2017-519141
- 特許番号：特許6454008
- 出願人：学校法人幾徳学園
- 発明者：小池 あゆみ、依田 ひろみ、高村 岳樹

お問い合わせ先

神奈川工科大学
研究推進機構 研究支援部門

TEL 046-291-3277

e-mail ken-shien@ccml.kanagawa-it.ac.jp