

特集 バイオ機能材料としての特異構造ポリマー

# $\beta$ -1,3-グルカン/DNA複合体の性質と核酸医薬 DDS への応用

## A Novel $\beta$ -1,3-Glucan/Polynucleotide Complex and its Application to Functional Oligonucleotide Delivery

櫻井和朗

Kazuo SAKURAI

 Department of Chemistry and Biochemistry,  
 Faculty of Environmental Engineering, The Kitakyushu of University  
 E-mail: sakurai@env.kitakyu-u.ac.jp

筆者らは $\beta$ -1,3-グルカンと核酸が作る高分子複合体に関して基礎的な性質を調べるとともに、核酸医薬の Drug Delivery System (DDS) への応用を展開してきた。本稿ではこの複合体の性質と応用の可能性について最近の研究結果を紹介する。

**Abstract:** Schizophyllan (SPG) is a natural  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan and can form a complex with polynucleotides. This paper reviews our recent work including structural analysis of the complex with microscopy and computer chemistry, and potential application to a drug delivery system to specifically transport functional oligonucleotides such as antisense DNA and CpG DNA to antigen presenting cells.

**Keywords:**  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan / Complex / Polynucleotides / DDS / Dectin-1

### 1. はじめに

有史以前から紙や綿として利用されている多糖は最も身近な天然由来の高分子物質の一つである。高分子科学の黎明期においてはセルロース誘導体が“高分子性”を示す化合物として精力的に研究されたことからわかるように、多糖は高分子科学の初期の段階から研究対象の中心であった<sup>1)</sup>。図1に示すカードランなどの $\beta$ -1,3-グルカンは海藻や菌糸体が生産する多糖であり、食品の増粘剤や化粧品の添加剤として利用されるとともに、漢方薬の有効成分の一つでもある。カードランやシゾフィランの発見は我が国においてなされ、その後の結晶構造解析や溶液論に関する研究に

おいても日本が主導的な役割を果たしてきた。

筆者らは $\beta$ -1,3-グルカンと核酸が水素結合と疎水の相互作用を駆動力として化学量論的な高分子複合体を形成することを見いだした<sup>2),3)</sup>。本稿ではその基礎的な性質について最近の結果を紹介するとともに、 $\beta$ -1,3-グルカンが抗原提示細胞に認識される性質を利用した核酸医薬の選択的送達への応用を述べる<sup>4)~6)</sup>。

### 2. 多糖核酸複合体の構造と性質

天然における $\beta$ -1,3-グルカンは3重螺旋の状態で存在することが多い。X線構造解析によると、主鎖を構成するグルコースの2位のヒドロキシル基間の分子間水素結合により3本の多糖が同一の方向に還元端をそ

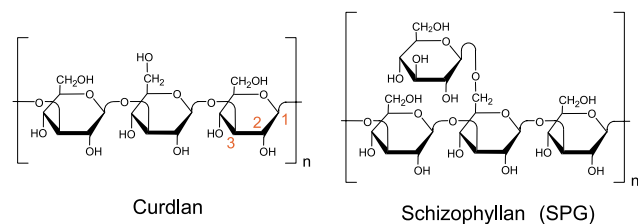


図1  $\beta$ -1,3-グルカンであるカードランとシゾフィランの化学構造



櫻井和朗 Kazuo SAKURAI

北九州市立大学国際環境工学部  
 [808-0135] 北九州市若松区ひびきの1-1  
 教授, 理学博士。  
 専門は生体高分子, 放射光, 高分子物性。

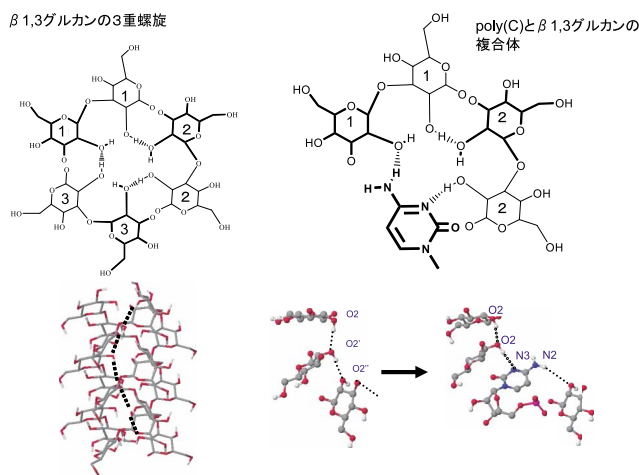


図2  $\beta$ -1,3-グルカン3重螺旋の構造(左)とpoly(C)/カードラン複合体の構造

ろえて並び、右巻き螺旋を形成していることが知られている<sup>7),8)</sup>。図2にはその断面図と側面図を示した。初期の構造研究では同一の高さにあるグルコース（図2の同じ太さで描かれたグルコース）間の水素結合が支配的であると考えられていたが、分子動力学と量子化学的計算を組み合わせることで詳細な検討をしたところ、図2に示すように、1段上か下の異なる分子鎖のグルコースと分子間水素結合を形成し、連続した水素結合が3重螺旋にそって形成されていることが判明した。この構造を想定しないと次に述べる複合体の構造が説明できない<sup>9)</sup>。

$\beta$ -1,3-グルカンの3重螺旋をDMSO等の極性有機溶媒に溶解すると螺旋が解けてランダムコイル状の単鎖となる。この溶媒を水に戻すと3重螺旋の構造が再生される。この“Renature”の過程に核酸が存在すると、3重螺旋の一本の高分子鎖が核酸によって置き換わる。この反応はきわめて定量的に進み、糖の繰り返し単位（図1）2モルに対して核酸塩基が3モル反応する<sup>2),3)</sup>。すなわち、糖の主鎖のグルコース2分子が核酸塩基1分子と結合し複合体を形成していると考えられる。複合体形成により、塩基間の積重ねが増加する方向に核酸の立体配座が変化するため、円偏光2色性（CD）の増大や紫外光の淡色効果を観測することができる（図3）。また、温度の上昇によって複

合体は協同的に解離する。解離曲線より求めた解離エントロピーは200 kcal/mol程度であった。シチジル酸の重合体であるpoly(C)はアデニル酸の重合体poly(A)より高い温度で解離する。これらの事実より、複合体の解離現象は2重螺旋DNAの融解現象と酷似しており、糖は核酸との複合体の中で、あたかも相補核酸のように振舞うことが示された。シゾフィランは単なるグルコースの重合体であり、まったくカチオン電荷も相補的な核酸塩基ももたないにもかかわらず、擬似相補的な振舞いを示すことはきわめて興味深い。

計算化学を用いてSPG/poly(C)の構造最適化をした結果を図2右に示す。シトシンのN3とN2が分子間水素結合に参加することで安定な多糖：核酸が2：1の螺旋を形成している。複合体では多糖3重螺旋の連続した水素結合の一部が核酸塩基の水素結合部位で置換わっていることがわかる。SPGと(dA)<sub>60</sub>の複合体の慣性自乗半径 $\langle S^2 \rangle$ と分子量 $M_w$ の関係を図4に示す。ここでは、3重螺旋とRenatureしたSPG（それぞれT-SPGとR-SPGと表記）を比較のために示した。T-SPGの水溶液中の $\langle S^2 \rangle$ と $M_w$ の関係は持続長200 nmのKratky-Porod鎖で記述できることがわかっているが<sup>10)</sup>、得られた複合体のデータもT-SPGとほぼ一致している。このことから、SPG/(dA)<sub>60</sub>の水溶液中での形態はT-SPGと同様な屈曲性をもった棒状分子であると結論できる。図4に原子間力顕微鏡で観察したSPG/poly(C)の複合体の像を示す<sup>11)</sup>。得られた像は棒状であり、光散乱から得られた結果と一致している。以上のことから、 $\beta$ -1,3-グルカンと核酸からなる複合体は局所的には図2で示した化学構造をとり、全体としてはもとの3重螺旋と類似した比較的固い棒状の形態を取っていると結論できる。

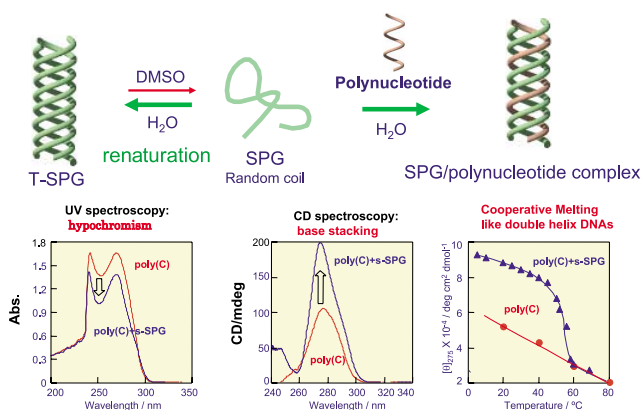


図3  $\beta$ -1,3-グルカンの3重螺旋が解離・再生する過程で形成する多糖核酸複合体。複合化することによって起きる淡色効果と円偏光2色性の増大と、昇温による協同的解離

### 3. 多糖核酸複体の核酸医薬のDDSへの応用

SPGと複合化された核酸は酵素による加水分解や血清中のタンパク質との非特異的な吸着から保護されることがわかっている<sup>12)</sup>。その結果、マウスの体内での核酸の分解速度は20倍以上抑制される。Gordonらは抗原提示細胞（APC）上に $\beta$ -1,3-グルカンを認識する受容体が存在するところを示した<sup>13),14)</sup>。この受容体はDectin-1と呼ばれ、最近の研究によるとエンドサイトーシスによる細胞外物質の取り込みにも関与している。これらの事実より、筆者らはSPG核酸複合体を用いてAPC特異的に核酸医薬を送達できるのではないかと考えた（図5）。Dectin-1によって取り込まれた複合体は後期エンドソームやリソソームに存在するといわれるCpG配列をもったDNAの受容体であるTLR9にDNAを送り届ける。DNA自体では細胞への侵入は不可能である。たとえ細胞内に侵入できたとしましてもリソソームにおいて酵素で容易に分解されてしまうと考えられる。しかし、複合化することにより

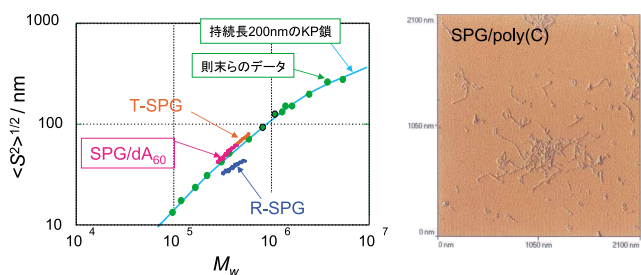


図4 複合体と3重螺旋SPGの慣性自乗半径と分子量の関係（左）と複合体の原子間力顕微鏡写真

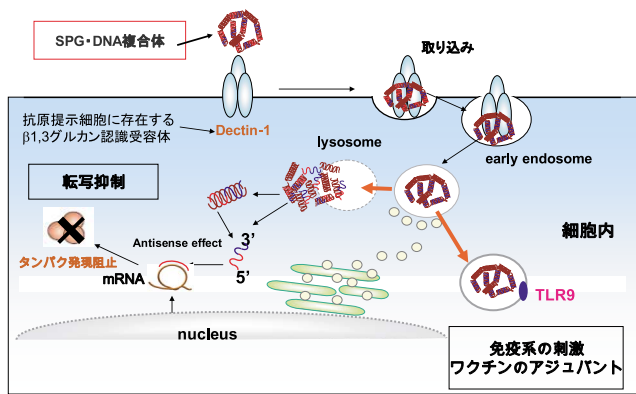


図5 抗原提示細胞のDectin-1を介した複合体の取り込みに関する想定図

これらの課題を解決できると考えた。また、一部の複合体はエンドサイトーシスの経路を抜け出して細胞質へ移行すると期待される。この場合には、複合化した核酸にアンチセンス鎖を選べば、mRNAのセンス鎖部分に結合してタンパク質への転写を抑制すると期待される。

#### 4. 動物を用いた試験の例

多糖核酸複合体を核酸医薬のDDS (Drug Delivery System) に利用しようとする研究は医学系の研究者や企業との共同研究で進められている。ここでは、大阪大学の微生物病研究所の石井先生と行った免疫刺激性CpGDNAに関するデータを紹介する<sup>4),5)</sup>。

哺乳類細胞に有効なCpG DNAには、その配列によりIL-12産生を誘導するK型と、IL-12とともにIFN- $\alpha$ 産生を誘導するD型の二種類が存在する。Dectin-1を有している樹状細胞の一つであるCD11c陽性と陰性細胞を含むマウスの初代培養細胞に複合体を用いてK型とD型のCpGDNAを添加した時のサイトカインの産生を比較した(図6)。ここでは、CpG DNAの受容体であるTLR-9を発現していないノックアウトマウス由来の細胞と比較をした[図中のTLR9(-/-)]。DNAには、SPGと安定な複合体を形成させるために5'末端側に40塩基からなるオリゴdAを付加している。図の上段は、K型とD型のIL-12産生量を比較した結果である。K型が投与された場合、IL-12産生量は複合化により大幅に増加している。K型とD型を比較すると、K型のほうがD型よりも遥かにIL-12産生が多い。ノックアウトマウスを用いた場合には、TLR-7とTLR-4を刺激するR848とLPSの系でIL-12の産出が観察されるのに対して、CpGDNAではまったく産出が見られない。これらの結果は、K型とD型の複合体による応答はTLR-9による認識を介していることを示している。下段は、IFN- $\alpha$ の産生量を比較している。K型では産生が見られず、D型においてのみIFN- $\alpha$ 産生が見られ、産生量は複合化によって大幅に増加している。

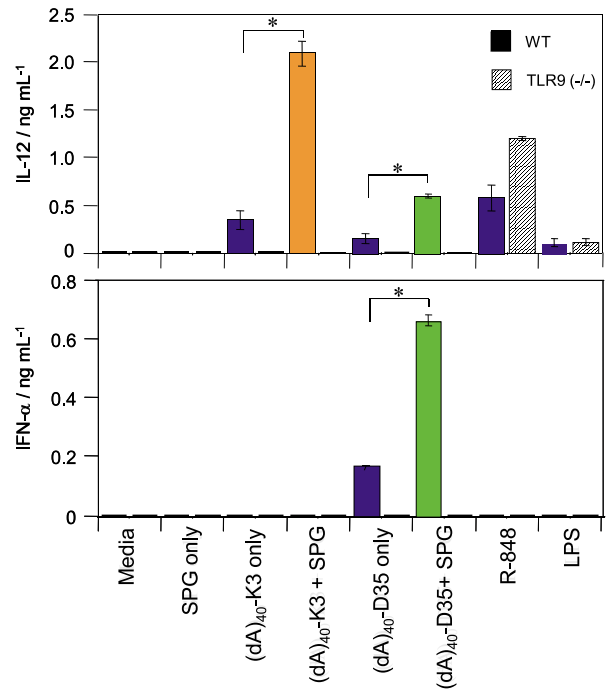


図6 Flt3Lで誘導されたマウス由来の樹状細胞にK型とD型のCpGDNAを作用させた時のサイトカインの産生。WT:通常のマウスであり、TLR9(-/-)はTLR9をノックアウトしたマウスから取り出した細胞であることを示す。橙と緑色は図7でサイトカインの産生が多かった複合体に対応。

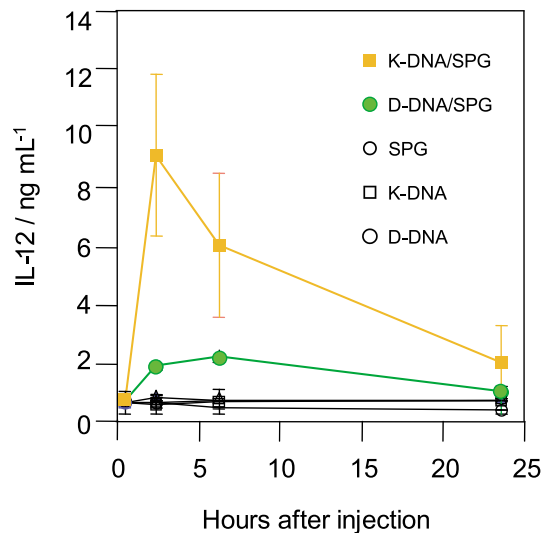


図7 CpGDNAをC57/B6マウスに投与した時のIL-12の産生応答

図7は、K型とD型CpG DNAをマウスの尾静脈から投与したあとの血液中に産生されたIL-12の量を調べた結果である。IL-12はSPGとCpG DNAの単独投与においてはほとんど産出されていないが、複合体として投与することで、単独の場合よりも2~9倍量多いIL-12の産出を促す。このようなIL-12 p40産生の増加は、CpG DNAが複合化されることで得られた高い安定性と生体中でAPCに特異的に複合体が送達さ



れたことに起因するものとする。

## 5. 終わりに

中性の多糖である $\beta$ -1,3-グルカンと核酸が作る複合体の性質と応用について一部ではあるが紹介をした。アンチセンスDNAやCpGDNAのデリバリーに関しては、既存のカチオン性リポソームやポリカチオンでは実現できなかった標的特異性と安全性を達成している。将来、いくつかの病気の治療に使われる日がくると信じている。

最近、とかく「応用」に重点が置かれた目的指向的な研究が大学でも推奨されているようである。しかし、独創的な応用研究は、盤石な基礎研究の上に立っている。基礎研究は目的指向の発想からは生まれることは少なく、科学者の自然現象に対する好奇心と探求心から生まれる。したがって目的指向的な管理や評価を強化するほど革新的な応用研究が生まれにくくなるのではと危惧をしている。

以前にも述べているが<sup>15)</sup>、本項の複合体は、筆者が某繊維メーカーから新海先生のJSTのプロジェクトに出向(リストラ?)している時に、冷蔵庫に残っていたpoly(C)とSPGを混ぜたら、とても奇妙なCDスペクトルを見いだしたことから偶然発見された。その奇妙な現象の重大性をいち早く認識され、その後の私の研究を自由にさせていただいた新海先生に

感謝をしている。私を派遣した会社がテーマをもち込んでいたり、新海先生が官僚的な研究管理をされていたらできなかった発見であると思っている。

## 文 献

- 1) H. Staudinger, *Macromolecular Chemistry*. In *Nobel Laureates*
- 2) K. Sakurai and S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 4520 (2000)
- 3) K. Sakurai, M. Mizu, and S. Shinkai, *Biomacromolecules*, **2**, 641 (2001)
- 4) N. Shimada, K. J. Ishii, Y. Takeda, C. Coban, Y. Torii, S. Shinkai, S. Akira, and K. Sakurai, *Bioconjugate Chem.*, **17**, 1136 (2006)
- 5) N. Shimada, K. J. Ishii, Y. Takeda, C. Coban, Y. Torii, S. Shinkai, S. Akira, and K. Sakurai, *Bioconjugate Chem.*, **18**, 1280 (2007)
- 6) M. Mizu, K. Koumoto, T. Anada, T. Matsumoto, M. Numata, S. Shinkai, T. Nagasaki, and K. Sakurai, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8372 (2004)
- 7) Y. Deslandes, R. H. Marchessault, and A. Sarko, *Macromolecules*, **13**, 1466 (1980)
- 8) E. D. T. Atkins and K. D. Parker, *Nature*, **220**, 784 (1968)
- 9) K. Miyoshi, K. Uezu, K. Sakurai, and S. Shinkai, *Chem. Biodiversity*, **1**, 916 (2004)
- 10) Y. Kashiwagi, T. Norisuye, H. Fujita, *Macromolecules*, **14**, 1220 (1981)
- 11) A. H. Bae, S. W. Lee, M. Ikeda, M. Sano, S. Shinkai, and K. Sakurai, *Carbohydr. Res.*, **339**, 251 (2004)
- 12) M. Mizu, K. Koumoto, T. Kimura, K. Sakurai, and S. Shinkai, *Biomaterials*, **25**, 3109 (2004)
- 13) G. D. Brown and S. Gordon, *Nature*, **413**, 36 (2001)
- 14) G. D. Brown, J. Herre, D. L. Williams, J. A. Willment, A. S. Marshall, and S. Gordon, *J. Exp. Med.*, **197**, 1119 (2003)
- 15) K. Sakurai, K. Uezu, M. Numata, T. Hasegawa, C. Li, K. Kaneko, and S. Shinkai, *Chem. Commun (Camb)*, 4383 (2005)