

事項	所属	職名	氏名
研究代表者	京府大大学院生命環境科学研究科	准教授	田中 俊一
研究組織の体制	京府医大大学院医学研究科医系化学	准教授	武元 宏泰
研究の名称	機能性高分子ナノ薄膜に基づくタンパク質被覆技術の開発と細胞内送達		
研究のキーワード	pH応答性、ナノ薄膜、タンパク質、高分子、双性イオン		
研究の概要	<p>タンパク質の有する高次構造は既存の低分子医薬とは異なる標的に基づく創薬を可能とする。しかし、タンパク質はしばしば水溶液中での凝集や酵素分解・代謝に基づき生体内では速やかに本来の高次構造を喪失するものも多い上（生体内不安定性）、高分子構造に由来する低い細胞質移行性によりその標的は細胞外に限定される等、タンパク質の創薬素材としての潜在性を十分に発揮出来ないうでいた。そこで本研究では、タンパク質の生体内安定性を維持しつつその細胞内動態を制御するために、機能性高分子でのタンパク質の可逆的な被覆を着想した（図1）。これに関し、武元（京都府立医科大学）は機能性高分子による多様な生体高分子の被覆技術を有しており、田中（京都府立大学）は所望の物性を有するタンパク質を創出可能なタンパク質設計技術を有している。両者の基盤技術を両軸として、タンパク質の生体内安定性の向上及び効率的な細胞内送達・細胞質移行を可能とする革新的なプラットフォーム技術の開発へと挑む。</p> <p>①機能性ナノ薄膜で被覆 ②酵素分解を回避 ③酸性 pH に応答してナノ薄膜がエンドソーム膜を破壊 ④細胞質へ移行 ⑤細胞質でナノ薄膜分解</p> <p>（図1 本研究のナノ薄膜被覆タンパク質の概念図）</p>		
研究の背景	<p>一般にタンパク質に代表される高分子物質が細胞内で機能を発揮するためには、1) インタクトな状態でエンドサイトーシスを介して細胞に取り込まれ（生体内安定性）、2) リソソームでの分解を回避するために細胞質へと移行（細胞内動態制御）する必要がある。この2点を可能とする技術はsiRNAやmRNA等の核酸には多く開発されているが、タンパク質の細胞内送達に関する技術革新は限定的である。実際に医薬としての成功例は、生体内安定性の比較的高いタンパク質を細胞外分子標的医薬として開発するに留まっている。そこで本研究では、タンパク質の種類によらず生体内安定性を向上し、細胞取り込み後の細胞内動態を制御するために機能性高分子から成る機能性ナノ薄膜にて単分子のタンパク質を可逆的に被覆することを着想した。被覆されたタンパク質はナノ薄膜によりタンパク質同</p>		

	<p>士の凝集挙動や酵素分解を回避する。さらに、ナノ薄膜に細胞質移行能及び細胞内分解性を組み込むことで、被覆されたタンパク質の細胞質内放出を実現する。</p>
<p>研究の 進捗状況と 成果</p>	<p>まず、本研究の遂行における基盤の一つとして、様々な表面電荷を有するタンパク質の創出を行った。田中が有するドライ・ウェット双方のタンパク質工学技術を駆使し、緑色蛍光タンパク質（GFP）を鋳型として、等電点が酸性から塩基性（$pI = 4\sim 11$）まで広範に分布するバリエーション群を作製した。これらのバリエーションはいずれも、機能的側面（蛍光強度で評価）および構造的側面（熱安定性で評価）の両面において、野生型と比較して顕著な低下を示さないことを確認した。</p> <p>続いて、pH応答性高分子ベタインの前駆体となるポリアミノ酸を合成した。得られたポリアミノ酸の側鎖修飾を行うことで、pH応答性高分子ベタインへと変換した。得られたpH応答性高分子ベタインを十分加えた条件にて水溶液中でGFP分子と混合し、分子サイズを測定したところ、GFP単体のサイズが4 nmであった。それに対し、pH応答性高分子ベタインを混合することでpH 8以下では8 nmの構造物が出現した。このことは、pH 8以下でGFPとpH応答性ベタインとが相互作用して会合体を形成することを示している。また、各会合体の蛍光強度がGFP単分子と同等であることから、1分子のGFPを個別に被覆可能であることが明らかとなった。この際、GFPの表面電荷を調節したものを用意したが、いずれにおいても同等の被覆挙動を示していた。</p> <p>次に、GFPが被覆されていることを電気泳動法においても確認した。GFPはアニオン性なため正極側へと泳動する一方で、被覆されたGFPは電荷が中和されるためその移動度は大幅に抑制される。実際に、pH応答性高分子ベタインの等量を増やすに従って原点付近のバンドが強くなり、GFPの被覆率が向上することがわかった。原点以外にGFP由来のバンドが観察されなくなる等量として、10等量のpH応答性高分子ベタインがGFPを完全に被覆するためには必要であることが明らかとなった。</p> <p>さらに、GFPが被覆された状態においてトリプシン処理を行うことで、酵素耐性を検証した。すると、2時間トリプシン処理した結果GFP単体の系では蛍光強度が半分程度に減弱したのに対し、GFPが被覆された系では当初の蛍光強度が維持されていた。このことから、GFPを被覆することで生体内安定性を向上させることに成功した。</p> <p>2025年度はpH応答性高分子ベタインに基づいてGFPを被覆し、生体内安定性を向上可能であることを実証した。次のステップとして、2026年度では実際の生細胞を用いた評価を行う予定である。その際に、ナノ薄膜内に生分解性の構造を組み込むことで、タンパク質の細胞内送達ならびに細胞質での放出を可能とする技術の構築を完遂する。</p>
<p>地域への 研究成果の 還元状況</p>	<p>本研究で得られた成果については、学会および研究会を通じて積極的に発信を行い、地域における学術・産業基盤の強化に貢献した。具体的には、日本農芸化学会2026年度大会（同志社大学）および日本農芸化学会関西支部第538回講演会（神戸大学）において講演を行い、関連成果を広く発信した。これらの発表は、関西圏を中心とした大学・研究機関・企業の研究者に対して最新の研究知見を提供するものであり、地域におけるバイオ・創薬分野の研究開発の活性化に寄与している。さらに、本研究で得られた技術基盤は、今後の産学連携や医療・食品分野への応用展開が期待されており、地域産業への波及効果も見込まれる。</p>

<p>研究成果が 両大学連携に もたらす意義</p>	<p>本研究では、武元・田中が独自に有する知見・技術に基づいて、革新的なタンパク質被覆技術を開発している。研究提案者の両名は共に下鴨キャンパスにて研究活動を行っており、緊密な連携体制を構築している。医療・創薬における技術ニーズを認識する京都府立医科大学と農学・工学に秀でる京都府立大学とが共同して本提案を推進することで、タンパク質という治療モダリティの加速度的な発展へと取り組んでいる。</p>
<p>研究発表</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) <i>Macromolecular Rapid Communications</i>, 46 (2025) 2500156 2) <i>Langmuir</i>, 41 (2025) 30845-30853 3) <i>AMB Express</i>, 15 (2025) 136 4) <i>FEBS Letters</i>, 599 (2025) 1948-1963 5) <i>Protein Science</i>, 34 (2025) e70165 6) <i>Protein Science</i>, 34 (2025) e70018 7) <i>OpenNano</i>, 29 (2026) 100301