

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655112

研究課題名(和文)効果的なタンパク質操作を志向した構造化PEG分子の開発

研究課題名(英文)Development of structured PEG for protein manipulation

研究代表者

村岡 貴博(Muraoka, Takahiro)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：70509132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ポリエチレングリコールに対するトポロジー、及び両親媒性効果について精査した。テトラエチレングリコールとペンタエリスリトールを組み合わせ、三角形型に構造化することにより、直鎖状分子に比べ脱水和温度が低下した。またこれにより、タンパク質に対する熱凝集を抑制する効果が生まれることが分かった。その際、タンパク質の変性温度と、ポリエチレングリコール誘導体の脱水和温度との関係が重要であることが示唆された。また、フェニル基を導入したポリエチレングリコールを合成し、その分子集合体の熱応答性が、ポリエチレングリコール部分の長さによって変化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Influences of topology and amphiphilicity of poly(ethylene glycol) were studied. Triangle poly(ethylene glycol) derivative was synthesized by combining tetra ethylene glycol and pentaeryt hritol, which showed lower dehydration temperature than the linear counterpart. Furthermore, it was found that the triangle poly(ethylene glycol) has protein stabilization effect. Phenyl-appended poly(ethylene glycol)s were also synthesized and the difference of the poly(ethylene glycol) chain affected the assembling property in water.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ポリエチレングリコール

#### 1. 研究開始当初の背景

水酸基とエチレンオキシド基から成る PEG は、タンパク質の巻き戻し促進、凝集抑制、そしてステルス化などタンパク質化学において数多くの特徴を持つ。この機能は、水溶性で、物質として安定であり、電荷を持たないといった PEG 独特の特徴に由来すると考えられる。通常用いられる PEG はポリマーであり、分子量分布が存在する。精密な機能評価を行うには分子量分布の無い「分子」であることが求められるが、意外にも分子としての PEG の合成例は極めて少ない (JOC 2006, 71, 9884; ACIE 2009, 48, 1248. の 2 例のみ)。従って当然、分子 PEG のタンパク質操作に関連した機能評価や、PEG の立体構造が持つ効果に関する検討は行われていない。

このように「PEG 化学」が手付かずのままである大きな原因の一つは、合成の困難さにある。PEG は極めて極性が強く水溶性であると共に殆どの有機溶媒にも可溶である。さらに紫外域にも吸収を持たない。従って、有機合成化学で通常行われる分液操作やシリカゲルカラムによる精製が極めて困難である。これが障壁となり、長鎖分子 PEG の合成は最近まで達成されなかったと言える。

#### 2. 研究の目的

本研究では、このような背景にある PEG を分子として扱い、かつその構造に多様性を持たせることで、構造の違いに由来する PEG の新たな特徴を分子として精密に探ることを目的とする。また本研究で様々な分子 PEG を合成する中で、その合成に関する知見も深まり、分子 PEG の合成方法論確立に貢献できる点も意義深い。具体的には、これまで一次元直鎖構造のみであった PEG に対し二次元・三次元構造を持つ PEG 誘導体分子を合成し、その機能を評価する。

#### 3. 研究の方法

様々な立体構造、および両親媒性を有する PEG 類縁体を合成し、光散乱、各種分光スペクトルを用いて、主に水中での物理化学的、超分子化学的性質を調べ、さらにタンパク質に対する安定化効果を調べる。

#### 4. 研究成果

ポリエチレングリコール(PEG)に対する構造的な影響を調べることを目的に、二、三次元的な骨格から成る構造化 PEG や、両親媒性を導入した PEG を開発した。テトラエチレングリコール(TEG)とペンタエリスリトールを組合せた三角形 PEG を開発し、直鎖状 PEG と比べ脱水和温度が低下し、タンパク質の熱凝集を効果的に抑制する性質が現れることを見出した。最終年度ではタンパク質の種類を増やし、その一般性や効果発現のためにもっとも重要な要素の探求を行った結果、タンパク質の変性温度と三角形 PEG の脱水和温度との関係が重要であることがわかった。さらに

フェニル基を導入した TEG、およびオクタエチレングリコール(OEG)を開発し、その物理化学、超分子化学的特徴を精密に調べ、特にエチレングリコール鎖の長さの効果を調べた。その結果、水中、室温でいずれもミセルと推測される分子集合体を形成するものの、熱に対する応答性に明確な違いが見られることがわかった。つまり、フェニル TEG では、温度上昇に連れて集合体のサイズが小さくなることから、ドデシル硫酸ナトリウムなどのイオン性両親媒性分子に似た応答を示すことが明らかとなった。対照的に、フェニル OEG では、温度上昇に連れて集合体のサイズが大きくなることが確認された。これは、エチレングリコールユニットの、親水的なゴースウ形から疎水的なアンチ形への熱による構造変化に起因するものと考えられ、熱応答性を有する PEG に特有の性質であると考えられる。従って、PEG 鎖の長さによって、両親媒性分子の温度応答性が変化することが明らかとなり、機能性両親媒性分子の設計において重要な知見が得られたと考えている。一連の研究の中で偶然発見された、多段階求核置換反応についても研究を進め、保護基交換反応などへの有用性を示すことができた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計7件)

1. Thermoresponsive Self-assembly and Conformational Changes of Amphiphilic Monodisperse Short Poly(ethylene glycol)s in Water

Nabanita Sadhukhan, Takahiro Muraoka, Daisuke Abe, Yuji Sasanuma, Dwiky Rendra Graha Subekti and Kazushi Kinbara Chem. Lett. 2014, 印刷中、査読有.

2. Transesterification on Polyols by Intra- and Intermolecular Nucleophilic Substitutions

Takahiro Muraoka, Kota Adachi, Rainy Chowdhury and Kazushi Kinbara PLoS ONE 2014, 9, e91912、査読有.

3. Thermal-Aggregation Suppression of Proteins by a Structured PEG Analogue: Importance of Denaturation Temperature for Effective Aggregation Suppression

Takahiro Muraoka, Nabanita Sadhukhan, Mihoko Ui, Shunichi Kawasaki, Enrikko Hazemi, Kota Adachi, and Kazushi Kinbara Biochem. Eng. J. 2014, 86C, 41-48、査読有.

4. Development and Functionalization of Structural Mimics of Multipass Transmembrane Proteins

Takahiro Muraoka and Kazushi Kinbara  
J. Syn. Org. Chem. Jpn. 2013, 71, 1045-1050、  
査読有。

5. A Structured Monodisperse PEG for the  
Effective Suppression of Protein  
Aggregation

Takahiro Muraoka, Kota Adachi, Mihoko Ui,  
Shunichi Kawasaki, Nabanita Sadhukhan,  
Haruki Obara, Hidehito Tochio, Masahiro  
Shirakawa, and Kazushi Kinbara  
Angew. Chem., Int. Ed. 2013, 52, 2430-2434、  
査読有。

6. Ion Permeation by a Folded Multiblock  
Amphiphilic Oligomer Achieved by  
Hierarchical Construction of  
Self-Assembled Nanopores

Takahiro Muraoka,\* Tatsuya Shima, Tsutomu  
Hamada, Masamune Morita, Masahiro Takagi,  
Kazuhito V. Tabata, Hiroyuki Noji, and  
Kazushi Kinbara\*  
J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 19788-19794、  
査読有。

7. Development of Photoresponsive  
Supramolecular Machines Inspired by  
Biological Molecular Systems

Takahiro Muraoka, and Kazushi Kinbara  
J. Photoch. Photobio. C 2012, 13, 136-147、  
査読有。

〔学会発表〕(計4件)

1. 2014.3.11: 野口遵研究助成金講演会(東京)

「膜タンパク質模倣分子の開発と機能」

村岡貴博

口頭発表

招待講演

2. 2013.9.2: 御茶ノ水女子大学 化学科講演  
会(東京)

「生体に使う、生体を真似る機能性分子開  
発」

村岡貴博

口頭発表

招待講演

3. 2013.6.24: Collaborative Conference on  
Materials Research (韓国, 濟州島)

"Discrete PEGs with Distinctive  
Functions"

村岡貴博

口頭発表

招待講演

4. 2013.11.29: XVI National Conference On  
Surfactants, Emulsions and Biocolloids  
(NATCOSEB) (インド, Chennai)

"Monodisperse Amphiphilic PEG  
Macromonomer Refolds Protein  
Effectively"

Nabanita Sadhukhan, Takahiro Muraoka,  
Mihoko Ui, Kazushi Kinbara

口頭発表

招待講演

5. 2013.12.9: 12th International  
Conference on Frontiers of Polymers and  
Advanced Materials (ニュージーランド、  
Auckland)

"Development of Chiral Synthetic  
Transmembrane Protein Mimics"

Daiki Noguchi, Takahiro Muraoka, Kazushi  
Kinbara

口頭発表

6. 2013.12.9: 12th International  
Conference on Frontiers of Polymers and  
Advanced Materials (ニュージーランド、  
Auckland)

"Non-linear amphiphilic discrete  
oligo(ethylene glycol)s: synthesis and  
protein modification"

Adam M. Wawro, Takahiro Muraoka, Mihoko Ui,  
Kazushi Kinbara

口頭発表

7. 2013.9.30: 日本化学会東北支部 70 周年  
記念国際会議(仙台)

"Functionalized PEGs As An Effective  
Protein Manipulator"

Sadhukhan Nabanita, Muraoka Takahiro,  
Mihoko Ui, Kinbara Kazushi

ポスター発表

8. 2013.9.30: 日本化学会東北支部 70 周年  
記念国際会議(仙台)

"Development of PEG-Based Functional  
Molecules"

Hidetaka Honda, Takahiro Muraoka, Kazushi  
Kinbara

ポスター発表

9. 2013.9.30: 日本化学会東北支部 70 周年  
記念国際会議(仙台)

"Development of a Photoresponsive Hybrid  
Protein"

Saori Miura, Takahiro Muraoka, Mihoko Ui,  
Kazushi Kinbara

ポスター発表

10. 2013.9.30: 日本化学会東北支部 70 周年  
記念国際会議(仙台)

"Development of functional amphiphiles  
operative in aqueous media"

Takahiro Muraoka, Kazushi Kinbara

ポスター発表

11. 2013.9.30: 日本化学会東北支部 70 周年  
記念国際会議（仙台）

“ Liquid Crystalline Property of Cyclic  
Multi-Block Amphiphiles ”

Tatsuya Shima, Takahiro Muraoka, Kiyoshi  
Kanie, Atsushi Muramatsu, Kazushi Kinbara  
ポスター発表

12. 2013.9.30: 日本化学会東北支部 70 周年  
記念国際会議（仙台）

“ 膜貫通型機能性分子の開発と評価 ”

梅津かおり, 村岡貴博, 金原数  
ポスター発表

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/labo/kinbara/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

村岡 貴博 (MURAOKA TAKAHIRO)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：70509132

### (2)研究分担者

無し

### (3)連携研究者

無し