

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03836

研究課題名(和文) 化学反応性人工分子-生体分子ハイブリッド型分子スイッチの開発

研究課題名(英文) Development of chemically reactive molecular switch through hybrid of artificial molecule and biomolecule

研究代表者

池田 将 (IKEDA, Masato)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：20432867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体に適用可能な限られた条件下において、分子の機能を意のままに操る化学の創出は、困難で価値のある挑戦である。そのような生体適合性分子化学の成熟は、医薬分子の副作用の低減、新規作用機序の開発、薬物送達の実現など、機能性分子の医療応用において産業的にも学術的にも大きなインパクトを与えると期待される。本研究では、生体適合条件において機能をOFF-ON制御可能な分子スイッチの開発を目指し、生体分子(ペプチドおよび核酸)に化学反応性人工分子を導入し、還元環境に応答し構造変化する核酸アプタマーなど新たな機能性分子スイッチの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Establishment of chemical methodology to control functions of molecules under biocompatible conditions is difficult while valuable tasks to be challenged. Maturation of such chemistry would have large impact on industrial as well as academic research for the construction of functional molecules aiming at medicinal applications, such as inhibition of adverse effect, development of new action mechanism, realization of drug delivery systems. In this study, we successfully constructed nucleic acid aptamers capable of exhibiting structural transition in response to biocompatible reduction stimuli on the basis of semi-rational molecular design, in which biomolecules such as nucleic acids are coupled with chemically reactive artificial molecules with a precision at molecular level.

研究分野：生体機能関連化学、ナノバイオ超分子材料

キーワード：ナノバイオ ナノ材料 超分子化学 刺激応答性分子

1. 研究開始当初の背景

代表者らは「ナノ構造を形成する機能(自己集合能)」を有する分子(ペプチド、糖脂質)に対して、特定の刺激が加わると化学反応によって脱離する「感覚部位」をハイブリッドする戦略から、分子の集合状態を制御することに成功している。特筆すべきことは、化学反応の特性の活用によって生体適合条件において多様な刺激に対する応答を実現したことである。その成果の一つとして、過酸化水素、グルコース、コリン、NADHといった様々な生体分子(一部は疾病のマーカーとなる分子(= バイオマーカー))に論理応答する自己集合性ゲル材料の創製に世界ではじめて成功した。

2. 研究の目的

本研究では、この研究を発展させ、疾病に関連する刺激をインプットに生体適合条件において機能の OFF-ON 制御可能な分子スイッチの開発を目指した。

水中かつ常温常圧の生体に適用可能な限られた条件下において、分子の機能を意のままに操る化学の創出は、困難で価値のある挑戦である。そのような生体適合性分子化学の成熟は、医薬分子の副作用の低減、新規作用機序の開発、薬物送達の実限など、分子の医療応用において産業的にも学術的にも大きなインパクトを与えると期待される。本研究では、生体適合条件下で利用できる化学反応を開拓し、機能を OFF-ON 制御可能な分子スイッチの開発(図 1)を目指す。具体的には、生体内の特定環境で進行する化学反応によって解除される部位を、生体分子(ペプチドおよび核酸)にハイブリッドすることで、生体関連機能を OFF-ON 制御可能な分子スイッチの具現化に挑戦する。

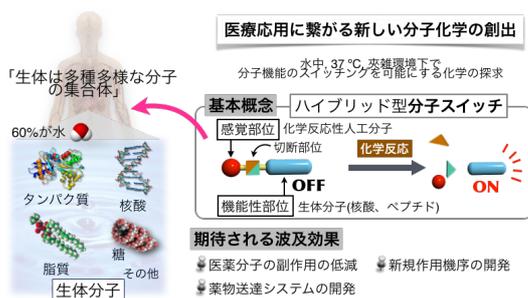


図 1 本研究の基本概念図

3. 研究の方法

(1) 生体関連機能を有するペプチドハイブリッド分子の刺激応答機能の開発

生体関連機能を有するペプチドは様々なもの(ペプチド系ホルモンなど)が知られているが、血中安定性の低さが医薬品開発の一つの障壁となっている。そこで、本研究では、図 1 に示す基本概念を基盤に、ペプチドの血中安定性を向上させるとともに、その生体関連機能を OFF 化することが可能な化学反応性

の感覚部位を開発し、生体内の特定環境のみで化学反応を介して ON になるハイブリッド型分子スイッチを開発する。

(2) 生体関連機能を有する核酸ハイブリッド分子の刺激応答機能の開発

核酸は、様々な機構で生体機能を制御していることが明らかになっている。本研究では、低酸素環境下で化学反応により抗凝血機能が ON になる核酸アプタマーを利用したハイブリッド型分子スイッチを開発する。

4. 研究成果

(1) 生体関連機能を有するペプチドハイブリッド分子の刺激応答機能の開発

①細胞内で作用するペプチドおよび②細胞外で作用するペプチドに大きく分けて、研究を進めた。

①細胞内で作用するペプチドとしては、アポトーシス抑制タンパク質(IAP)を阻害する SMAC ペプチド(アミノ酸配列: AVPI)に着眼し、感覚部位を導入した。自己集合能を向上させるため、疎水性のアルキル鎖を導入した。合成したペプチド単独では十分な自己集合能を有していなかったため、ポリカチオンを集合の促進剤に添加したところ、数 100 nm のナノファイバーが絡み合った超分子ナノ構造体を形成することを見出した(図 2)。また、還元剤に反応して、そのナノ構造体からアポトーシス抑制タンパク質(IAP)を阻害する SMAC ペプチドが放出されることを確認した(*Chem. Lett.* 2015)。

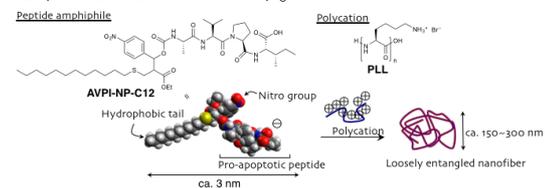


図 2 還元応答部位を導入した自己集合性 SMAC ペプチドとポリカチオンからなる超分子ナノ構造体形成の模式図

②細胞外で作用するペプチドに関しては、新たな人工細胞外マトリックス(細胞培養基材)の創製を目的に、糖鎖を修飾した自己集合性ペプチドライブラリーを構築した。その自己集合構造を、分光的手法および電子顕微鏡観察や蛍光顕微鏡観察により、評価したところ、糖鎖の構造の僅かな違いで、ナノスケールの超分子構造体の形態が大きく異なることを明らかにした(図 3, *Org. Biomol. Chem.* 2017)。このようなナノ構造体を細胞の培養に利用することで、糖鎖の構造やナノ構造体が細胞の機能に与える影響を評価することが可能になる。

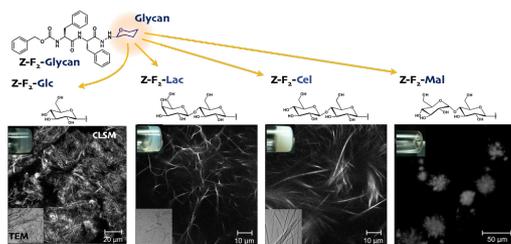


図3 糖鎖の構造に依存した糖鎖修飾自己集合性ペプチドの形成する超分子ナノ構造体（電子顕微鏡・蛍光顕微鏡画像）

さらに、化学反応を起点として刺激に応答した超分子ナノ構造体の構造変換や過渡的な構造形成に関する興味深い知見を得た（論文投稿準備中）。

(2) 生体関連機能を有する核酸ハイブリッド分子の刺激応答機能の開発

①還元環境に応答してランダムコイルから G-quadruplex 構造に構造変化する核酸分子スイッチの開発

本研究では、核酸として Thrombin 結合性アプタマー (TBA, 塩基配列:GGTTGGTGGTTGG) に対して感覚部位(化学反応性人工部位)を導入し、Thrombin への結合機能を OFF 化できること(ランダムコイル構造になること)を明らかにした。一方で、還元環境下で化学反応により感覚部位が除去されると、Thrombin 結合機能を有する G-quadruplex 構造に変換されることを見出した(図4, *ChemBioChem* 2016)。このような人工核酸分子スイッチは、低酸素状態にある血液凝固部位でのみ抗凝血機能が ON になり、凝血が必要な創傷部位では OFF のままであることによる副作用の低減や機能の増強が期待できる。

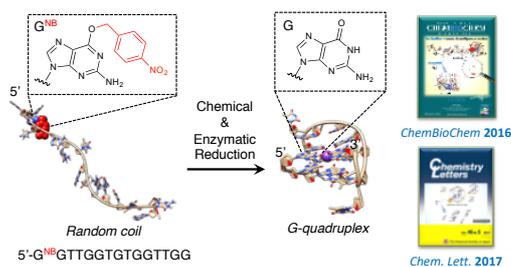


図4 人工化学反応性部位を導入したグアニンを配列中に有する低酸素応答性核酸分子スイッチの構造変化機構

②還元環境に応答して Duplex から G-quadruplex 構造に構造変化する核酸分子スイッチの開発

上記の核酸分子スイッチを利用し、一本鎖のランダムコイル状態とは異なり、二本鎖状態である Duplex 構造を初期状態として、還元環境に応答して、G-quadruplex 構造へ構造変化する核酸分子スイッチの開発を行った。

Duplex 構造は、ランダムコイル構造と比較すると生体内での安定性の向上や相補鎖にターゲティング能などの新たな機能の合理的設計の自由度の向上が期待できる。化学反応性人工分子部位の修飾数や配列を検討した結果、還元環境に応答して Duplex から G-quadruplex 構造に構造変化する核酸分子スイッチの開発に成功し、その分子設計指針を確立した(論文投稿中)。

さらに、これまでに中心的に進めてきた還元刺激に応答する核酸の構築は、モノマー分子に化学反応性人工分子を導入し、オリゴマー化することで目的の核酸を合成する手法を利用してきた。この手法とは相補的になる、核酸に化学反応性人工分子をポスト修飾する化学的手法の開発に取り組み、その候補となる手法を見出した(論文投稿準備中)。この研究を進展させることで、より広範囲の生体分子(化学合成が困難な分子量の大きなペプチドやタンパク質、あるいは核酸)を対象に OFF-ON スイッチング機能の搭載が可能になると期待される。

以上に示すように、本研究では、疾病に関連する刺激をインプットに、生体適合条件において機能の OFF-ON 制御可能な分子スイッチの開発を行った。本研究で開発した分子スイッチのさらなる発展の可能性として、例えば、生体分子を基盤とした医薬分子の副作用の低減、新規作用機序の開発、薬物送達の実限などが挙げられ、機能性分子の医療応用において産業的にも学術的にも大きなインパクトにつながると期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

- ① Effect of carbohydrate structures on the hydrogelation ability and morphology of self-assembled structures of peptide-carbohydrate conjugates in water, Tomoya Tsuzuki, Marina Kabumoto, Hanae Arakawa, Masato Ikeda, *Org. Biomol. Chem.*, 15, 4595-4600 (2017), 査読有, DOI: 10.1039/C7OB00816C
- ② Chemically caged nucleic acids, Masato Ikeda, Marina Kabumoto, *Chem. Lett.*, 46 (5) 634-640 (2017), 査読有, DOI: 0.1246/cl.161063
- ③ Synthesis of self-assembling aryloptoid bearing hydrophilic polymer on the basis of soluble polymer-supported liquid-phase synthesis, Tomoya Tsuzuki, Hiroshi Katagiri, Yoshiaki Kitamura, Yukio Kitade, Masato Ikeda, *Tetrahedron*, 72 (43) 6886-6891 (2016), 査読有, DOI: 10.1016/j.tet.2016.09.022
- ④ Preparation of supramolecular

- hydrogel-enzyme hybrids exhibiting biomolecule-responsive gel degradation, Hajime Shigemitsu, Takahiro Fujisaku, Shoji Onogi, Tatsuyuki Yoshii, Masato Ikeda, Itaru Hamachi, *Nat. Protoc.*, 11 (9) 1744-1756 (2016), 査読有, DOI: 10.1038/nprot.2016.099
- ⑤ In situ real-time imaging of self-sorted supramolecular nanofibers, Shoji Onogi, Hajime Shigemitsu, Tatsuyuki Yoshii, Tatsuya Tanida, Masato Ikeda, Ryou Kubota, Itaru Hamachi, *Nat. Chem.*, 8 (8), 743-752 (2016), 査読有, DOI: 10.1038/nchem.2526
- ⑥ Reduction-responsive guanine incorporated into G-quadruplex-forming DNA, Masato Ikeda, Masahiro Kamimura, Yukiko Hayakawa, Aya Shibata, Yukio Kitade, *ChemBioChem*, 17 (14), 1304-1307 (2016), 査読有, DOI: 10.1002/cbic.201600164
- ⑦ New Solid Phase Submonomer Synthesis of Arylopeptoid Oligomers Using Reductive Amination, Masato Ikeda, Keito Horio, Tomoya Tsuzuki, Ryo Torii, Aya Shibata, Yoshiaki Kitamura, Hiroshi Katagiri, Yukio Kitade, *Tetrahedron Lett.*, 56 (48), 6762-6729 (2015), 査読有, DOI: 10.1016/j.tetlet.2015.10.056
- ⑧ Pro-apoptotic Peptide Amphiphile Self-Assembled with the Assistance of Polycations, Masato Ikeda, Maika Kawakami, Yukio Kitade, *Chem. Lett.*, 44 (8), 1137-1139 (2015), 査読有, DOI: 10.1246/cl.150399
- [学会発表] (計 30 件)
- ① ペプチド誘導体からなる超分子ナノ構造体の時間発展的形態制御, 荒川華恵, 池田将, 日本化学会 第 98 春季年, 2018 年
- ② 環境を感知して形を変える分子系, 池田将, 第 64 回 SIGMBI: 分子ロボティクスの今後の展望について 2017 年
- ③ 化学反応を基盤とした刺激応答性分子システムの開発, 池田将, 2nd Symposium on New Trends of Nano- or Bio-materials Design in Supramolecular Chemistry, 2017
- ④ 刺激応答性超分子ナノファイバーからなるヒドロゲル, 池田将, 平成 29 年度 第 47 回繊維学会夏季セミナー, みんなの森ぎふメディアコスモス, 2017 年
- ⑤ Biomolecule-responsive self-assembled supramolecular materials, Masato Ikeda, Malaysia Polymer International Conference 2017 (MPIC 2017), 2017
- ⑥ 刺激に応答して自己集合能を制御可能なグアニン誘導体の創製, 北川裕晃, 早川由希子, 池田将, 中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2017 年
- ⑦ 化学反応を起点とする自己集合性ペプチドナノ構造体の構造変換, 杉浦拓弥, 株本万里奈, 酒井洋幸, 金田拓朗, 池田将, 中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2017 年
- ⑧ 還元応答性グアニン塩基を利用した DNA 高次構造変換, 早川由希子, 上村雅大, 池田将, 中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2017 年
- ⑨ 環状芳香族性ペプチド四量体の合成と動的構造変化挙動, 早川征秀, 大澤彩香, 片桐洋史, 池田将, 高分子学会, 2017 年
- ⑩ 超分子ファイバーを内包したリポソームの創製, 荒川華恵, 池田将, ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム, 2017 年
- ⑪ 新規環状芳香族性ペプチド四量体の創製, 大澤彩香, 早川征秀, 片桐洋史, 池田将, ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム, 2017 年
- ⑫ 化学反応性基を複数有する自己集合性ペプチドからなる超分子ヒドロゲルの多刺激応答性の開発, 株本万里奈, 池田将, ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム, 2017 年
- ⑬ pH 応答性超分子ファイバーの形成制御, 荒川華恵, 池田将, 日本化学会春季年会, 2017 年
- ⑭ 側鎖に脱離基を有するペプチドからなる化学反応性超分子ヒドロゲルの開発, 株本万里奈, 杉浦拓弥, 池田将, 日本化学会春季年会 2017 年
- ⑮ Supramolecular nanofibers for manipulating nano- and micro materials, Masato Ikeda, 27th 2016 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (From Micro & Nano Scale Systems to Robotics & Mechatronics Systems), 2016
- ⑯ Biomolecule Responsive Supramolecular Hydrogel-Enzyme Hybrids, Masato Ikeda, 9th Japan-China Joint Symposium on Functional Supramolecular Architectures, 2016
- ⑰ 刺激応答性超分子ファイバーの形成制御, 荒川華恵, 北出幸夫, 北出幸夫, 池田将, 中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2016 年
- ⑱ 白金(IV) - ペプチド複合体の自己集合挙動, 杉浦拓弥, 北出幸夫, 池田将, 中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2016 年
- ⑲ 環状芳香族性ペプチドの創製, 早川征秀, 鳥居遼, 片桐洋史, 北出幸夫, 北出幸夫, 池田将, 中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2016 年
- ⑳ 化学反応を活用した刺激応答性ナノ繊維

- ～分子ロボットの骨格としての可能性～,
池田将, 「細胞を創る」研究会 8.0, 2015
年
- 21 化学反応を活用した刺激応答性ナノ繊維
～分子ロボットの骨格としての可能性～,
池田将, 第2回分子ロボ若手会, 2015年
 - 22 化学反応性分子と生体分子からつくる刺
激応答性材料, 池田将, 日本生物工学会
中部支部例会, 2015年
 - 23 刺激応答性ナノ材料の開発と医療応用の
可能性, 池田将, 第127回日本薬理学会
近畿部会, 2015年
 - 24 環状芳香族性ペプトイドの合成, 鳥居遼,
池田将, 北出幸夫, 片桐洋史, 中部化学
関係学協会支部連合秋季大会, 2015年
 - 25 インターカレーターを基軸とした核酸タ
ンパク質複合体の創製, 竹内慧, 株本万
里奈, 池田将, 北出幸夫, 中部化学関係
学協会支部連合秋季大会, 2015年
 - 26 動的共有結合形成を利用した刺激応答性
ナノ構造体の創製, 酒井洋幸, 池田将,
北出幸夫, 中部化学関係学協会支部連合
秋季大会, 2015年
 - 27 多様な刺激に応答する超分子ヒドロゲル
の創製, 金田拓朗, 池田将, 北出幸夫,
北出幸夫, 中部化学関係学協会支部連合
秋季大会, 2015年
 - 28 超分子ナノファイバーの self - sorting
と動態イメージング, 重光孟, 小野木祥
玄, 吉井達之, 谷田達也, 池田将, 窪田
亮, 浜地格, 高分子学会, 2015年
 - 29 刺激応答性ナノ材料の開発と医療応用の
可能性, 池田将, 日本薬理学会近畿部会,
2015年
 - 30 DDS 応用を目指したインターカレータ
ー・二本鎖核酸複合体の構築, 株本万里
奈, 池田将, 北出幸夫, 日本化学会,
2015年

〔図書〕(計1件)

- ① 池田将 (分担)、フロンティア出版、自己
組織化マテリアルのフロンティア, 2015
年, 39~46

〔その他〕

ホームページ等

研究室のホームページ

https://www1.gifu-u.ac.jp/~mb_chem1/IkedaGroup/index.html

岐阜大学 HP 内の研究紹介ページ(英語)

・https://www.gifu-u.ac.jp/en/about/about_gu/glg/ikeda.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 将 (IKEDA, Masato)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：20432867