

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23107007

研究課題名（和文）細胞内核酸イメージングによる細胞機能発現の解明と調節

研究課題名（英文）Evaluation of cellular functions by imaging cellular nucleic acids

研究代表者

丸山 厚（Maruyama, Atsushi）

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：40190566

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 80,900,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、生体に優しくかつ高い時空間分解能で細胞内イメージングする核酸ナノセンシング法と核酸を標的とする細胞機能調節法の基盤を構築することを目的とした。

両親媒性酸性ペプチド（E5）とカチオン性ペプチドシャペロン材料（PAA-g-Dex）を組み合わせることで、細胞膜の透過性を向上し、細胞外から細胞質への直接的な分子導入を可能となることが示唆された。

人工核酸シャペロン（PLL-g-Dex）の添加によって、DNA酵素型核酸センサーのシグナル増幅活性を高め、ターゲット核酸検出感度を1000倍向上させることができた。また、検出条件が緩和できることも見いだされた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we showed that the cationic copolymer also enhances activity of an MNAzyme-type DNA sensor derived from the 10-23 DNAzyme and increased MNAzyme sensitivity. Furthermore, the copolymer enabled us to shorten the substrate-binding arms of the MNAzyme, decreasing the optimum temperature of the MNA assay from 50 °C to physiological temperature.

It was also demonstrated that the copolymer enhanced function of membrane disrupting peptides by facilitating their folding. Effective cytosolic delivery of macromolecular substances would be possible by using peptide/copolymer complex.

研究分野：生体機能性高分子

キーワード：カチオン性高分子 DNA 核酸酵素 ペプチド 脂質膜 グラフト共重合体 高分子電解質複合体

1. 研究開始当初の背景

細胞内の遺伝子発現を解析し、さらにその発現を制御する手法は、細胞機能の理解のみならず疾病の解析や治療にも有用である。これを可能にするには、1) 高感度の核酸プローブの創出、2) 遺伝子制御分子の機能強化、3) 核酸プローブや遺伝子制御分子の細胞内送達法の向上が不可欠となる。これらの項目は、個々に検討されているが、分子デバイスとしてこれらの要素を総合的に解決しようとするアプローチは少ない。本課題では、我々がカチオン性共重合体に見いだした核酸特異的機能などの知見を集約し、これらの課題を同時に解決する分子システムの構築を目指す。

2. 研究の目的

本課題では、細胞内において、DNA および RNA のイメージングを可能とする核酸ナノセンシング法の構築とそれによる細胞機能発現の解明と制御を目的とする。申請者らは、核酸のハイブリッド形成を分子科学的に考察し、ハイブリッド形成を格段に迅速・安定化する核酸シャペロン機能を持った高分子材料の構築並びに、核酸の配列を一塩基レベルまで厳密に識別可能な核酸プローブの開発を行ってきた。また、細胞内送達には細胞膜破壊/融合活性を持つペプチドが有用であるが、シャペロン高分子材料によりその効率を効果的に向上できることを見いだしてきた。本研究では、これらの知見を集約しさらに班内外の共同研究を通じて、生体に優しくかつ高い時空間分解能で細胞内イメージングする核酸ナノセンシング法とそれによる細胞機能調節法の基盤を構築する。また、細胞内の核酸間および核酸・タンパク質間相互作用に関わる反応パラメーターを抽出する。

3. 研究の方法

(1) 核酸プローブや遺伝子発現制御分子の細胞内への導入を促す手法として、a) エンドソームの pH 応答性高分子材料および、b) 膜融合性ペプチドの機能を向上する高分子材料の設計と評価をおこなった。

(2) 核酸イメージングの感度向上を計るため、a) 核酸酵素型核酸センサーおよび b) 分子ビーコン型核酸プローブに着目し、その機能を高めるシャペロン高分子材料の評価を行った。

(3) 遺伝子発現制御分子として、核酸酵素に着目し、その機能に対するシャペロン高分子の効果について検討した。

4. 研究成果

(1) エンドソーム pH 応答性核酸キャリアの設計

エンドソーム内の pH 変化 (pH 7.4 - 5.0) に応答する塩基性を有するポリカチオンでは高い遺伝子発現活性を示すものが多い。これ

を説明する機構として、細胞内への移行を促すプロトンスポンジ効果やプロトン化に依存した膜障害活性などが提唱されている。本研究ではアミノ酸の α -アミノ基が低い pKa を有することに着目し、新しいエンドソーム pH 応答性高分子の合成とその細胞内送達キャリアとしての評価を行った。

主鎖高分子 Polyallylamine (PAA, 5 kDa) または Poly-L-Lysine (PLL, 29 kDa) のアミノ基に対し Gly または Boc 保護されたアミノ酸 (His, Lys, Arg, Orn) を修飾し、その後 TFA によって脱保護を行った。ポリカチオンの修飾率及び塩基性は $^1\text{H-NMR}$ および pH 滴定法により決定した。また、蛍光タンパク質 (EGFP) またはルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA (pDNA) を用いてトランスフェクション活性を評価した。合成したポリカチオンと pDNA を混合し、NIH3T3 細胞培養液に加え 3 時間インキュベーションした。その後培地交換し、24 時間後の遺伝子発現量および細胞毒性を評価した。

アミノ酸を修飾率 90% 前後で側鎖に導入したポリカチオンを合成した。塩基性の測定結果から、合成したポリカチオンは α -アミノ基に由来するエンドソーム内 pH (7.4 - 5.0) でのバッファー能を示した。また、未修飾のポリカチオンは高い塩基性のみ、His 化合物は低い塩基性のみを持っているのに対し、Lys 化 PAA、Arg 化 PAA はその双方を有していた。

N/P (ポリカチオンのアミノ基 / 核酸のリン酸基) = 40 における遺伝子導入を行った結果、Lys 化 PAA と ArgPAA においてはどちらもレポーター遺伝子の発現が観察され、遺伝子発現には DNA との複合体形成・細胞膜への結合に効果的な高い pKa とエンドソーム内 pH に応答する低い pKa の塩基性基双方が必要と示唆された。一方、無水酢酸で Lys 化 PAA を処理し α -アミノ基をアセチル化すると、遺伝子導入活性は顕著に低下し、塩基性の低い α -アミノ基が遺伝子導入活性に有用であることが考えられた。主鎖ポリマーの分子量や種類を変えても、同様なアミノ酸依存性が見られた。遺伝子を細胞内に導入する上で適した pH 応答性を α -アミノ酸の α -アミノ基が有すると示唆された。 α -アミノ酸をビルディングブロックとして利用した生体適合性の高いキャリア設計が期待される。

(2) カチオン性共重合体による核酸酵素型核酸センサーの機能強化

配列特異的な RNA 切断活性をもつ DNAzyme は、その特徴から様々な生物工学的応用が期待されており、特定の配列の核酸存在下でのみ DNAzyme 活性を発現する MNAzyme を用いた核酸の増幅検出法も提案されている。一方で、その実用化にはさらなる反応性の向上が求められている。DNAzyme は一般にターンオーバー効率が低く、その改善が必要と考えられる。また、基質核酸が短鎖の場合には、それ

に対する結合性を高める必要がある。さらに MNAzyme の場合には、標的核酸に対する結合性も高めることが、核酸検出の高感度化に求められる。我々は、カチオン性くし形共重合体が核酸間の静電反発を軽減し、核酸のハイブリダイゼーションや鎖交換反応を促進することを見いだした。また、共重合体の添加により、マルチプルターンオーバー条件下 DNAzyme の反応速度を向上できることを見いだした。また、PLL-g-Dex による MNAzyme 活性の向上を検討した。

基質および標的核酸濃度をそれぞれ 200 nM、2 nM と一定にし、MNAzyme 濃度を変化させたときの反応の経時変化を検討した。共重合体が存在しないとき [MNAzyme] = 200 nM の時 60 分の反応で基質の約 3 割しか分解されないのに対し、共重合体存在下では 20 分以内に 5 割の基質が分解された。これは、共重合体がハイブリッド形成を促し、基質、MNAzyme および標的からなる核酸複合体の生成が進んだためと考えられる。

次に MNAzyme 濃度依存性を調べた結果、PLL-g-Dex 不在下では、MNAzyme 濃度の低下に伴い反応速度は顕著に低下し、[MNAzyme] = 2 nM の時にはほとんど反応が検出されなかった。つまり、ターンオーバー速度が遅いことを示す。一方、PLL-g-Dex 存在下では、いずれの MNAzyme 濃度においても、高い反応性を示し、ターンオーバーが効率的に行われたことを意味する。

基質濃度 200 nM および MNAzyme 濃度 2 nM と固定し、ターゲット核酸濃度を変化させて反応をおこなった。共重合体不在下では、ターゲット濃度が 2 nM 以上で検出可能であったのに対し、PLL-g-Dex 存在下では 20 pM のターゲットが検出できることがわかった。つまり、共重合体は MNAzyme の核酸検出感度を 100 倍以上向上することが見いだされた。

(3) カチオン性共重合体による膜融合性ペプチドの活性化

脂質二分子膜からなる脂質小胞の形成、融合、崩壊などは、細胞および細胞内小器官の形成、増殖、細胞内輸送など細胞機能の根源に関わる。一方で、脂質小胞の形成や構造転移の制御機構は以前未知の点が多く、さらにそれを制御する手法は、ほとんど無かった。本課題で、ペプチド・合成高分子複合体が、小胞 平膜転移を誘起する事が見出された。脂質二分子膜の平膜状態は、脂質疎水領域の露出が必要で、不安定構造であるが、ペプチド・高分子複合体が平膜状態を安定化する機能があると示唆された。実際、平膜状態から高分子の機能を解除すると、平膜から小胞に迅速に構造転移することも見出された。脂質構造転移の基礎的理解から、脂質小胞を利用した薬物デリバリー等の応用研究まで波及性の高い成果と考えられる。以下、具体的に述べる。

インフルエンザウィルスのヘマグルチニンの部分配列から設計された酸性のペプチド E5 は、酸性条件下で生体膜を不安定化する。E5 ペプチドの機能発現には、酸性化に伴うランダムコイルから α -ヘリックス構造への転移が必要とされている。カチオン性くし型共重合体は、E5 と可溶性のナノ会合体を形成し、E5 のヘリックスへの構造転移を促すことで、その膜破壊活性を著しく高めることを見出された。さらに、E5・共重合体会合体の脂質二分子ベシクルに対する効果を追求した結果、会合体は、ベシクルをシートへの構造転移させることが、観察された。本来不安定な構造である脂質 2 分子膜シートが、会合体によりベシクル構造より安定化された結果と考えられる。このような構造転移は、種々条件を変えても E5 ペプチドのみでは再現されず、ナノ会合体により新規機能が発現されたことを示す。新しい脂質膜デバイスへの可能性が期待される成果でもある。

(4) カチオン性高分子による分子ビーコン型核酸プローブの高感度化

分子ビーコンは、ステムループ構造を持つプローブ核酸であり、広く核酸解析に利用されている。しかし、その感度および応答速度の向上が課題となっていた。感度向上のために名古屋大学櫻田らは、通常ステム末端に配置される蛍光分子・消光分子ペアをステム内に配置する in-stem 型分子ビーコン (ISMB) を設計した。ISMB は、消光効率の向上と複数の蛍光分子の導入による感度向上が可能となる。しかし、応答速度の向上が課題として残されていた。一方、我々はカチオン性くし型共重合体が核酸ハイブリッド形成を促進することを見出していた。そこで、ISMB の標的核酸とハイブリッド形成を共重合体存在下で行った結果、100 倍以上、ハイブリッド形成速度が向上できると共に、共重合体のハイブリッド安定化効果も奏して、感度を世界最高レベルに向上できることを明らかとした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 39 件)

1. N. Yamaguchi, N. Shimada, S. Nakano, N. Sugimoto, A. Maruyama, D. Miyoshi. A reversible B-A transition of DNA duplexes induced by synthetic cationic copolymers, *Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, Accepted, 査読有
2. S. A. Fujihara, N. Shimada, A. Maruyama, K. Ishihara, S. Yusa, Preparation of upper critical solution temperature (UCST) responsive diblock copolymers bearing pendant ureido groups and their micelle formation behavior in water, in press, DOI: 10.1039/c5sm00499c, 査読有

3. N. Shimada, H. Kinoshita, S. Tokunaga, T. Umegae, N. Kume, W. Sakamoto, A. Maruyama, Inter-polyelectrolyte nano-assembly induces folding and activation of functional peptides, *J. Controlled Rel.*, 218, 45-52 (2015), DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.10.001、[査読有](#)
 4. K. Kawai, K. Higashiguchi, A. Maruyama, T. Majima, DNA microenvironment monitored by controlling redox blinking, *BioPhysBio*, 16, 3590-3594 (2015) DOI: 10.1002/cphc.201500793、[査読有](#)
 5. J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, MNzyme-catalysed nucleic acid detection enhanced by a cationic copolymer, *Biomater. Sci.*, 3, 716-720 (2015) DOI: 10.1039/C4BM00449C、[査読有](#)
 6. K. Kawai, A. Maruyama, Triple helix conformation-specific blinking of Cy3 in DNA, *Chem. Commun.*, 51, 4861-4864, 2015, DOI: 10.1039/C5CC00607D、[査読有](#)
 7. J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, Enhancement of deoxyribozyme activity by cationic copolymers, *Biomater. Sci.*, 3, 308-316, 2015, DOI: 10.1039/C4BM00256C、[査読有](#)
 8. N. Shimada, W. Song, A. Maruyama, DNA strand exchange reaction activated by cationic comb-type copolymers having ureido groups, *Biomater. Sci.*, 2, 1480-1485 (2014), DOI: 10.1039/C4BM00207E、[査読有](#)
 9. D. Miyoshi, Y. M. Ueda, N. Shimada, S. I. Nakano, N. Sugimoto, A. Maruyama, Drastic stabilization of parallel DNA hybridizations by a polylysine comb-type copolymer with hydrophilic graft chain, *ChemMedChem.*, 9, 2156-63 (2014) , DOI: 10.1002/cmdc.201402157、[査読有](#)
 10. K. Kawai, T. Koshino, A. Maruyama, T. Majima, Blinking Triggered by The change in the solvent accessibility of a fluorescent molecule, *Chem. Commun.*, 50, 10478-81 (2014) , DOI: 10.1039/c4cc00377b、[査読有](#)
 11. R. Arivazhagan, M. Endo, K. Hidaka, N. Shimada, A. Maruyama, H. Sugiyama, Lock-and-key mechanism for the controllable fabrication of DNA origami structures, *Chem. Commun.*, 50, 8743-6(2014), Aug, DOI: 10.1039/C4CC02244K、[査読有](#)
 12. S. Yusa, M. Morihara, K. Nakai, S. Fujii, Y. Nakamura, A. Maruyama, N. Shimada, Thermo-responsive liquid marbles, *Polym. J.*, 46, 145-148 (2014). DOI: 10.1038/pj.2013.84、[査読有](#)
 13. A. Maruyama, N. Sonda, K. Yamasaki, S. Kidoaki, N. Shimada, M. Maeshiro, M. Miyazaki, Cationic comb-type copolymer excludes intercalating dye from DNA without inducing DNA condensation, *Curr. Nanosci.*, 10, 185-188 (2014) DOI: 10.2174/1573413709666131129000024、[査読有](#)
 14. K. Kawai, T. Majima, A. Maruyama, Detection of single-nucleotide variations by monitoring the blinking of fluorescence induced by charge transfer in DNA, *ChemBioChem.*, 14, 1430-1433, 2013, Aug., DOI: 10.1002/cbic.201300380、[査読有](#)
 15. A. Kano, Y. Taniwaki, I. Nakamura, N. Shimada, K. Moriyama, A. Maruyama, Tumor delivery of Photofrin® by PLL-g-PEG for photodynamic therapy, *J. Controlled Rel.*, 167, 315-321 (2013), DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.02.016、[査読有](#)
 16. J. Du, L. Wu, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, Polyelectrolyte-Assisted Transconformation of Stem-loop DNA, *Chem. Commun.*, 49, 475-477 (2013). DOI: 10.1039/C2CC37139A、[査読有](#)
 17. J. Michaelis, A. Maruyama, O. Seitz, Promoting strand exchange in a DNA templated transfer reaction, *Chem. Commun.*, 49, 618-620 (2013). DOI: 10.1039/C2CC36162K、[査読有](#)
- 〔学会発表〕(計72件)
1. Atsushi Maruyama, Invited speaker, Manipulation of lipid bilayer membranes by peptide/cationic copolymer complex, 11th International Conference, Medical Applications of Novel Biomaterials and Nanotechnology, Perugia, Italy, June 5-6, 2016
 2. Atsushi Maruyama, Invited speaker, Design of polymer materials to activate functional DNA and peptides, 11th International Symposium on Polymers Therapeutics from Laboratory to Clinical Practice, Valencia, Spain, May23, 2016
 3. Atsushi Maruyama, Invited speaker, Interpolyelectrolyte nanoassembly to engineer DNA, peptides, and lipids, Self-assembled Biofunctional Nanomaterials (#433), Pacificchem 2015, Honolulu, Dec. 15, 2015
 4. Atsushi Maruyama, Invited speaker, Enhancement of DNA enzyme activity by nano-assembling with cationic copolymers, Organic, Inorganic and Hybrid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications (#23), Pacificchem 2015, Honolulu, Dec. 19, 2015
 5. 丸山厚, 招待講演、バイオ分子の個性を輝かせるソフト高分子複合体、平成27年度日本化学会コロイドおよび界面化学部会先端技術講座、東京、化学会館、平成27年12月2日
 6. Atsushi Maruyama, Invited speaker, MNzyme-catalyzed Nucleic Acid Detection

Enhanced by a Cationic Copolymer, The 3rd China-Japan Symposium on Nanomedicine, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing, June. 19, 2015

7. Atsushi Maruyama, Keynote speaker, Enhancement of DNAzyme Sensor Functions by Cationic Copolymers, The 6th Taiwan-Japan Symposium on nanomedicine, Jan 8, 2015, Academia Sinica, Taipei
8. Atsushi Maruyama, Invited speaker, Cationic Comb-type Copolymers to Engineer DNA, Peptides and Lipids, JSPS A3 Foresight International Symposium 2014 on Nano-Biomaterials and Regenerative Medicine, Oct. 8, 2014, Tokyo Women's Medical Univ., Tokyo
9. 丸山厚, 招待講演、高分子ナノ会合体で生体高分子の構造と機能を制御する、平成26年未踏科学サマー道場、8月30日、湘南国際村センター、三浦
10. Atsushi Maruyama, Invited speaker, Polymer materials to control assembly and functions of biopolymers: DNA, peptide and lipid, The 2nd International Symposium on Polymer Ecomaterials PEM 2014, August 22-26, 2014, Kunming, China
11. Atsushi Maruyama, Invited speaker, Enhancement of DNAzyme Activity with Cationic Comb-type Copolymer for Nucleic Acid Detection, The 5th INTERNATIONAL CONFERENCE on the DEVELOPMENT of BIOMEDICAL ENGINEERING in VIETNAM, June 16 – 18th, 2014, Ho Chi Minh City, Vietnam
12. Atsushi Maruyama, Invited speaker, Cationic Comb-Type Copolymer Enhances DNAzyme Activity, International Symposium on Smart Biomaterials~2nd Hoffman Family Symposium, March 24-25, 2014, NIMS, Tsukuba
13. Atsushi Maruyama, Plenary lecture, Novel thermo-responsive polymers for biomedical application, 2nd International Conference on Biomaterials Science in Tsukuba (ICBS2013), , March 21, 2013, Tsukuba
14. Atsushi Maruyama, Invited speaker, Soluble polyelectrolyte complex to engineer biopolymer assembly and functions, The 9th SPSJ International Polymer conference (IPC 2012), Dec. 14, 2012, Kobe

〔図書〕(計2件)

1. J. Gao, A. Maruyama, Biohybrid, in Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials, S. Kobayashi, K. Muellen (eds.), Springer, in press, (分担執筆).
2. 嶋田直彦, 丸山厚、遺伝子診断チップ、先端バイオマテリアルハンドブック、秋吉一成、石原一彦、山岡哲二監修、pp.

437-438、エヌ・ティ・エヌ (2012)、2ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 厚 (MARUYAMA, ATSUSHI)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授
研究者番号：40190566

(2) 研究分担者

嶋田 直彦 (SHIMADA, NAOHIKO)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教
研究者番号：10423972