

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04907

研究課題名(和文) 合成高分子アシストによる機能強化タンパク質の開発

研究課題名(英文) Functional enhancement of proteins assisted with synthetic polymers

研究代表者

与那嶺 雄介 (Yonamine, Yusuke)

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号：50722716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タンパク質表面から生体機能模倣ポリマーを伸長し、タンパク質が内在的に欠如している多機能性を補完して機能強化したタンパク質を開発することを目指した。当初想定していた合成高分子だけではなく、生理条件で伸長が可能な生体高分子にも焦点を当てた。具体的にはDNAに着目し、抗体から長鎖DNAを伸長し蛍光色素をインターカレートさせ高感度蛍光プローブとしての応用を検討した。研究成果として、標的細胞を検出する高感度蛍光プローブの基礎実験を行い、ガン細胞表面から経時的にDNAを伸長して蛍光色素をインターカレートさせることで、強い蛍光シグナルを示す検出剤を開発できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した生細胞の表面修飾技術を基盤として、「機能強化細胞」を創出することが可能となる。修飾する人工構造体は、合成高分子に限らず、DNAナノテクノロジーや自己組織化、MOFなどのボトムアップ技術で構築されたナノ構造体や、フォトリソグラフィーや3Dプリント、MEMSといったトップダウン技術で作製した構造体も選択し得る。これまで融合が全く考慮されていなかった研究領域を結び合わせるにより、細胞工学の分野でブレイクスルーを起こすことも期待できる。さらに、遺伝子工学的アプローチでは達成できない機能を付与した「機能強化細胞」を作製し産業的に利用することで、広く社会に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to develop functionalized proteins modified with biomimetic artificial polymers, which are compensated the lack of flexibility in the genetic information of proteins. In the original concept, we were going to focus on artificial polymers as the modifier, however, we expanded the concept to include biopolymers because they have advantage in polymerization in a pure physiological condition. Specifically, we developed a highly sensitive fluorescent detection system using long-chain DNAs with an intercalator dye which are elongated from an antibody for immunostaining. We have achieved (1) selection of a DNA polymerase that elongates significantly long DNA chains, (2) time-dependent elongation of long DNAs from an antibody that recognizes a cancer cell, and (3) to develop a highly sensitive fluorescent detection system by intercalating a fluorescent dye into the elongated DNAs, showing strong fluorescent signal.

研究分野：生体高分子化学

キーワード：生体高分子 機能拡張 表面改質 ハイブリッド

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、酵素や抗体に代表されるように、生体内反応の触媒や感染に対する防御機構を担うなど、生物の生命活動を支える物質であり、人工的には未だ模倣できないような、精緻で高機能な性能を有している。一方、正しいフォールディングのために、タンパク質1分子のサイズには制限があり、標的への認識機能と触媒機能は、トレードオフの関係にあるなど、多様な特性を搭載することには限界がある。近年、生体高分子と相互作用し、生理活性を示す合成高分子が精力的に開発されており、これらをタンパク質とハイブリッド化することで、内在的な欠点を補完し、機能を強化することが期待できる。これまでに、様々な高分子の重合法が開発されており、幅広い種類のモノマーを使って、精密に長さを制御できるまでに至っている。さらに近年、水中・室温条件でも実施可能な手法が報告され、タンパク質や細胞表面から高分子鎖を伸長させる、画期的な研究も実施され始めている。本研究では、酵素や抗体表面から直接、生体機能模倣ポリマーを伸長し、タンパク質が内在的に欠如している多機能性を補完して、機能を強化したタンパク質の開発を行うことを目指した。

## 2. 研究の目的

本研究は当初、タンパク質を修飾するポリマーとして合成高分子に焦点を絞る予定であった。一方、近年の当該研究分野における他グループの研究進展が顕著であり、本研究のコンセプトに関して新規性の低下が懸念された。そこでタンパク質修飾ポリマーとして合成高分子だけではなく、生体適合性が高く温和な条件で伸長が可能な生体高分子にも焦点を当てることとし、その研究開発の優先度を上げた。純然たる生理条件下で、タンパク質表面から高分子鎖を伸長することで、当該研究分野に新たなアプローチ法を示せる。具体的にはDNAに着目し、免疫染色用の抗体から長鎖DNAを伸長し、蛍光色素をインターカレートして、高感度蛍光プローブとしての応用を検討した。近年、合成高分子を利用した高感度蛍光プローブが開発されているが、疎水性による水溶性の低下や、濃度消光による蛍光シグナルの低下が懸念される。一方DNAは、高い水溶性と生体適合性を有した生体高分子であり、塩基対のスタッキング構造に挿入された蛍光色素は、仕切られた状態で配置され濃度消光が起きない。加えて、抗体表面上から伸長させることで長鎖DNAを高密度に細胞へ付加でき、高い蛍光シグナルを得ることが期待できる。

## 3. 研究の方法

本研究では、免疫染色用の抗体からDNA伸長酵素で伸長した長鎖DNAに、蛍光色素をインターカレートさせて高密度化した蛍光プローブを開発するために、下記3項目に関して検討した。

### (1) DNAを極めて長く伸長する酵素の検討

まず、伸長様式の異なる2種類のDNA伸長酵素(クレノウ断片 exo(-): 2本鎖で伸長、Phi29: 1本鎖で伸長)を用いて、長鎖DNAの形成をアガロースゲル電気泳動で確かめた。

### (2) ガン細胞を標的とする抗体からのDNA伸長

次に、上記で検討したDNA伸長酵素を用いて、タンパク質の表面からDNAを伸長できるか評価した。具体的には、乳ガン細胞表面の標的タンパク質(Her2)に結合する抗体(Trastuzumab)に対し、クリック反応を利用してDNA開始点を導入した。そこへDNA伸長酵素とプライマー、核酸モノマーを添加し、DNAが伸長されるかSDS-PAGEで確認した(図1)。

### (3) 長鎖DNAを利用したガン細胞の高感度蛍光検出剤

最後に、標的細胞を検出する高感度蛍光プローブの基礎実験を行った。具体的には簡略化した実験系、すなわちビオチン修飾したHeLa細胞に対してストレプトアビジン(SAV)とビオチン化DNAを結合させ、本研究の概念が実証可能か調査した(図2a)。はじめに、各末端にアミン反応性架橋基(NHS基)とビオチン基を有するビオチン標識剤を用いて、細胞表面タンパク質のアミノ基と共有結合させることで細胞表面にビオチン基を掲示させた。次に、末端にスパーサー配列(dT<sub>5</sub>)を介してビオチン基を有するDNA(dC<sub>15</sub>)に、事前にプライマー(dG<sub>15</sub>)をハイブリダイゼーションさせてdsDNAとし、SAVを介してビオチン化細胞の表面に固定化した。表面にDNAが掲示された細胞へ、DNA伸長酵素、核酸モノマーを添加してDNA伸長反応を行い、0h、0.5h、2h後に蛍光色素(GelGreen™)で染色して評価した。

## 4. 研究成果

### (1) DNAを極めて長く伸長する酵素の検討

アガロースゲル電気泳動の結果、どちらの酵素も DNA が 10,000 bp 以上に伸長されることが確認できた。1 本鎖伸長酵素では、基質の DNA に結合した後は解離することなく伸長し DNA の長さに大きな分布が生じた。一方、2 本鎖伸長酵素では、解離と結合を繰り返し DNA の長さが比較的均一となった。このように両者の DNA 伸長様式に大きな違いが見られ、用途によって特色を使いこなす必要があることが分かった。また、どちらも核酸モノマーの基質特異性が低いため、人工塩基でも取り込み、クリックケミストリー用の官能基を有する核酸モノマーも利用できることが明らかとなった。

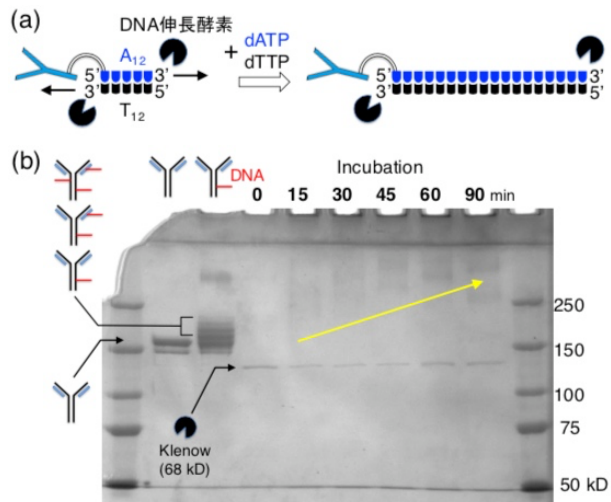


図 1 (a) DNA 伸長酵素による抗体からの DNA 伸長。(b) 非還元 SDS-PAGE の結果。

### (2) ガン細胞を標的とする抗体からの DNA 伸長

SDS-PAGE の結果から、DNA プライマーを導入した抗体のバンドは、通常の抗体と比較して高分子量側にシフトしている様子が確認できた。また、酵素と核酸モノマーを添加して DNA を伸長した抗体のバンドは、経時的に高分子量側にシフトし、分子量分布が広がったことによりバンドがスマアになった (図 1 b)。これらの結果から、抗体表面から DNA を経時的に伸長できることが確かめられた。

### (3) ガン細胞表面からの長鎖 DNA 伸長

蛍光顕微鏡観察の結果、DNA 伸長を行った条件では、細胞周囲から強い蛍光シグナルが得られた。一方、酵素を添加しなかった条件では、弱い蛍光シグナルのみが確認された。また、DNA の伸長を経時的に蛍光色素で追跡した結果、伸長反応時間が長くなるにつれ、蛍光強度が増強した (図 2 b)。一方、対照実験では経時的な蛍光増強は見られなかった (図 2 c)。これらの結果から、DNA 伸長酵素により細胞表面から DNA が経時的に伸長し、多くの蛍光色素が挿入されることで、強い蛍光シグナルが得られることが分かった。

本研究で開発した技術は、極微量の標的タンパク質の検出や、蛍光検出フローサイトメーターでの選別を明確に行うための高感度プローブとして応用が期待できる。

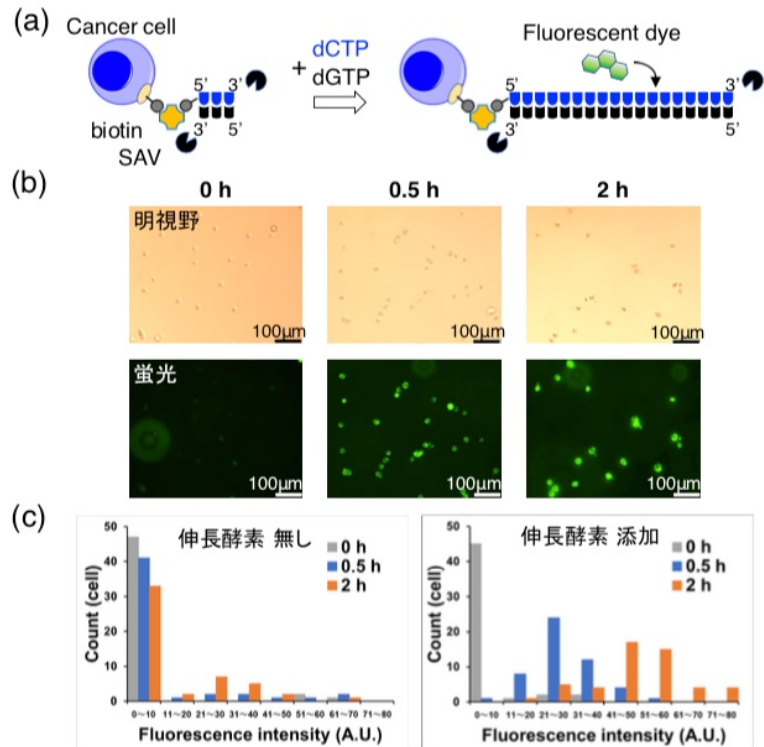


図 2 (a) ガン細胞表面から伸長した長鎖 DNA の高感度蛍光検出剤としての応用。(b) 顕微鏡による蛍光強度の経時的な増強の確認。(c) 蛍光強度の経時変化の定量評価。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Y. Yonamine, N. Okada, H. Mitomo, K. Ijiro
2. 発表標題 Development of a highly sensitive DNA-based fluorescence labeling reagent using DNA elongation enzyme
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田 直大、与那嶺 雄介、三友 秀之、居城 邦治
2. 発表標題 DNA伸長酵素を用いた高感度蛍光プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田 直大、与那嶺 雄介、三友 秀之、居城 邦治
2. 発表標題 DNA伸長酵素を用いた高感度蛍光プローブの開発
3. 学会等名 第55回高分子学会北海道支部研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 N. Okada, Y. Yonamine, H. Mitomo, K. Ijiro
2. 発表標題 Development of a highly sensitive DNA-based fluorescent probe using DNA elongation enzyme
3. 学会等名 The 21th RIES-Hokudai International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Sekizawa, H. Mitomo, S. Nakamura, Y. Yonamine, A. Hozumi, K. Ijio
2. 発表標題 2.発表標題 pH-induced reversible orientation change of gold nanorods immobilized on a DNA-modified substrate
3. 学会等名 Okinawa Colloids 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三友 秀之, 関澤 祐侑, 二瓶 瑞生, 中村 聡, 与那嶺 雄介, 松尾 保孝, 居城 邦治
2. 発表標題 DNAブラシ基板に吸着させたカチオン性金ナノロッドのpHに依存した配向変化
3. 学会等名 第68回高分子学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Sekizawa, H. Mitomo, S. Nakamura, Y. Yonamine, K. Ijio
2. 発表標題 pH-induced reversible orientation change of gold nanorods adsorbed on a DNA-modified substrate
3. 学会等名 The 20th RIES-Hokudai International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 与那嶺 雄介
2. 発表標題 高分子化学によるサイボーグ細胞の創出
3. 学会等名 連携型博士研究人材総合育成システムシンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 与那嶺 雄介
2. 発表標題 人工構造体で修飾した細胞:「サイボーグ細胞」の創出
3. 学会等名 第5回分子ロボティクス若手の会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
オーストラリア	Monash University, Parkville campus		