

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18384

研究課題名（和文）高分子ナノ複合体による高効率な生体膜ダイナミクス操作と応用

研究課題名（英文）Polymer nano-complex-based high efficient control of the dynamics of living membranes and the application

研究代表者

増田 造（Masuda, Tsukuru）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・助教

研究者番号：70814010

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、刺激応答性高分子と膜破壊ペプチドE5のナノ複合体を設計し、種々の脂質膜に作用させることで生体膜の構造転移を試みた。カチオン性的高分子鎖を主鎖に親水性高分子を側鎖に持つカチオン性くし型共重合体は複合化によりE5ペプチドを活性化する。複合体をリポソームに添加したところ、ベシクル形状からシートに高効率に構造転移した。これは膜の親・疎水界面エネルギーを劇的に低下したことによると考えられる。さらに親水性側鎖・温度応答性側鎖を持つカチオン性くし型共重合体を設計することで、温度応答変化によって脂質膜形態を操作できる可能性が示された。また、脂質膜自体に高分子を固定化する新規な手法も開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体膜の形態変化・出芽・融合といった動的な挙動を生理的な条件下において効率的に制御する人工材料が設計できれば、生体膜の動的挙動の機構解明や新規な薬物送達など生体材料としての応用に大きく貢献することができる。

本高分子・ペプチド複合体が誘起する脂質膜のベシクル（小胞）からシート形状への構造転移は100%近い高効率である点が特徴のひとつである。さらに、刺激応答性高分子の相転移とカップリングした構造転移の制御にも成功している。このような環境変化を認識した脂質膜の構造転移や、本研究で開発した効果的に高分子材料と生体分子を複合化する手法は、新しい生体材料としての展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, the nano-complex of the smart polymer and membrane-active peptide, E5 has been designed to control the transformation of lipid membranes. A cationic comb-type polymer composed of the cationic main chain and hydrophilic side chain forms a complex with E5 peptide, resulting in enhancement the activity of E5. When this complex was added to the liposome, transformation from vesicle into sheet was induced. This would be because the complex significantly decreased the interfacial energy of the lipid membrane. Moreover, A cationic comb-type copolymer with thermoresponsive side chain was designed. The use of the thermoresponsive polymer allowed the transformation control of the lipid membrane by temperature change. A novel method to modifying the polymer chain onto the surface of lipid membrane was also developed.

研究分野：高分子材料・生体材料

キーワード：生体材料 高分子材料 生体膜活性化ペプチド 精密ラジカル重合 生体膜

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体膜の形態変化・出芽・融合といった動的な挙動は生命現象において重要な役割を担う。これらを生理的な条件下において効率的に制御する人工材料が設計できれば、生体膜の動的挙動の機構解明や新規な薬物送達など生体材料としての応用に大きく貢献することができる。

インフルエンザウイルス表面のタンパク質であるヘマグルチニンの N 末端部分を模倣した E5 ペプチドは中性条件ではランダムコイルとなるが、酸性条件下では両親媒性のヘリックスを形成し、膜破壊機能を発現する (図 1(A))。しかしながら、この E5 ペプチドは生体膜に対する作用は持つものの、ヘリックス形成時において難水溶性であり活性が低いという課題があった。

研究開始当初、カチオン性の高分子鎖を主鎖に、親水性の高分子鎖を側鎖に有するカチオン性くし型共重合体 poly(allylamine)-*graft*-dextran (PAA-g-Dex) (図 1(B)) が、静電相互作用により E5 ペプチドと可溶なナノ複合体を形成し、中性条件下でヘリックス形成と活性化を誘起することが明らかになっていた (図 1(C))。さらに、E5/PAA-g-Dex 複合体を不飽和脂質からなるリポソームに添加すると脂質膜が 100% の効率で安定なシート構造を形成する極めてユニークな現象を見出ししていた。これは生体材料としての展開に向けて大きな可能性を有しているが、現象の物理化学的解釈・複数の脂質から構成される膜への作用機序は不明であった。さらに、材料学的な立場からは、環境変化を認識した脂質膜の構造転移や効果的に高分子材料と生体分子を複合化する手法が実現できれば、新しい生体材料としての展開が可能になると考えられた。

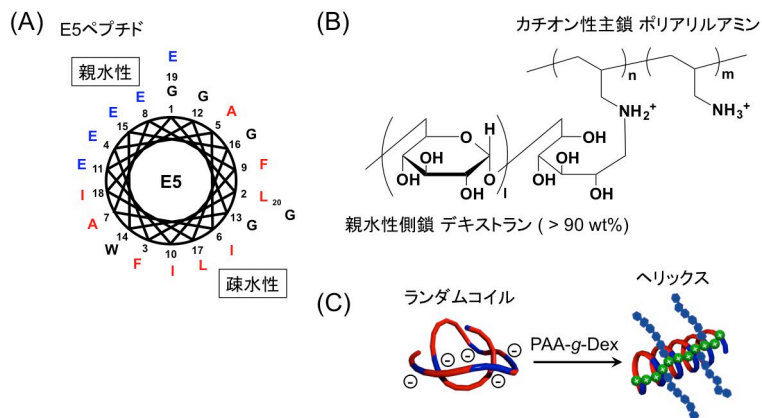


図 1. (A) E5 ペプチドの構造. (B) カチオン性くし型共重合体 PAA-g-Dex の化学構造式. (C) PAA-g-Dex との複合化による E5 の構造転移.

2. 研究の目的

本研究では、刺激応答性高分子と膜破壊ペプチドのナノ複合体を設計し、これを種々の脂質膜に作用させることで環境変化を認識した生体膜構造転移を制御することを目的とした。実際の細胞膜が複数の脂質から構成されることを考慮して、脂質膜は液体的な膜 (DOPC)、固体的な膜 (DPPC) およびこれらの混合膜について検討した。ペプチドを活性化するための高分子材料としては、カチオン性の高分子鎖を主鎖に、親水性高分子または親水性高分子・温度応答性高分子の両方を側鎖に持つカチオン性くし型共重合体を設計した。また、脂質膜自体に高分子を固定化する新規な手法についても検討した。

3. 研究の方法

カチオン性くし型共重合体に対する刺激応答性高分子鎖の導入および脂質膜自体に高分子を固定化する新規な手法において、高分子の精密ラジカル重合法のひとつである原子移動ラジカル重合を利用した。高分子、ペプチドおよびその複合体の構造解析は複合体の解析には NMR、GPC、光散乱、CD スペクトルを用いた。

脂質膜に対する高分子・ペプチド複合体の作用に関して、100 nm のリポソーム (脂質小胞) については、蛍光色素をリポソームに封入しておき、その漏出から評価した。10 μm 程度のリポソーム (ジャイアントリポソーム) については、蛍光標識した脂質膜を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) カチオン性くし型共重合体によるペプチドの活性化：脂質膜の効果

細胞膜は複数の脂質から構成されることから、E5/PAA-g-Dex の薬物送達システムへの応用を考慮すると液体的な膜 (DOPC)、固体的な膜 (DPPC) といった物性の異なる膜に対する作用を明らかにすることが重要である。そこで、DOPC, DOPC/cholesterol (80/20), DOPC/DPPC/cholesterol (40/40/20), DPPC/cholesterol (80/20) からなるリポソームについて、E5/PAA-g-Dex の作用を解析した。

E5 は pH 7.4 においてランダムコイルであるが、上記の脂質膜のうち DOPC, DOPC/cholesterol (80/20), DOPC/DPPC/cholesterol (40/40/20) の存在下で部分的にヘリックス構造への転移が誘起

された。これは E5 の疎水部とリボソームの相互作用による構造転移であると考えられ、固体的な DPPC/cholesterol (80/20)リポソームと E5 は相互作用しないことが示唆された。さらに PAA-g-Dex を添加したところ、ヘリックス構造への転移が強化された。脂質膜からの蛍光色素の漏出を調査したところ、DOPC, DOPC/cholesterol (80/20), DOPC/DPPC/cholesterol (40/40/20)からは pH 7.4 において E5 と PAA-g-Dex の添加により漏出が見られた。これより、E5 が活性を持つ構造を誘起するためには、脂質膜との相互作用による疎水性環境も重要であることが明らかになった (*ACS Biomater. Sci. & Eng.* **2019**, *5*, 5744 – 5751.)。

(2) 高分子・ペプチド複合体による脂質ナノシートの形成とその機構

10 μm 程度のジャイアントリポソームに対して、E5 ペプチドとカチオン性くし型共重合体 PAA-g-Dex が及ぼす効果を調査したところ、ベシクル形状からシートに、高効率に構造転移する現象が見出された (図 2(A))。蛍光標識した E5 を用いて膜上におけるペプチドの局在を観察したところ、PAA-g-Dex を添加した場合には、脂質シートの端 (エッジ) においてより強い蛍光が観察され、E5 ペプチドは脂質シートの端に局在することが示唆された (図 2(B))。

脂質二重膜の形状は、脂質膜における曲げの弾性エネルギーとシートエッジにおける親・疎水界面エネルギーの和を最小にするように定まると考えられる。従って、界面エネルギーは曲げの弾性エネルギーよりもはるかに大きいことから、一般的には脂質二重膜は疎水部を覆いかくすように水中で 3 次元的に閉じた小胞 (リポソーム) を形成する。ベシクルをシートに展開するために、界面エネルギーを大きく低下させることが必要である。これについて、自発曲率モデルに基づいて考察を行った。親・疎水界面エネルギーに対応する指標である線張力は、一般的に 10 pN 程度である。膜がシートとして展開するためには、線張力が 0.01 pN 程度まで下がることが必要であり、E5/PAA-g-Dex は親・疎水界面エネルギーを劇的に低下させることが示唆された (図 2(C))。

以上より、E5/PAA-g-Dex による脂質ナノシート形成において、PAA-g-Dex は 1) E5 ペプチドの活性な構造である両親媒性のヘリックス形成を誘導する、2) E5 ペプチドをイオンコンプレックス形成に伴い脂質膜のエッジに局在させる、3) 親水性のデキストラン側鎖がエッジの親・疎水界面エネルギーを大きく低下させる役割を担っていると考えられる。本成果は *Advanced Materials* **2020**, *31*, 1904032 に採録され、注目を集めた。

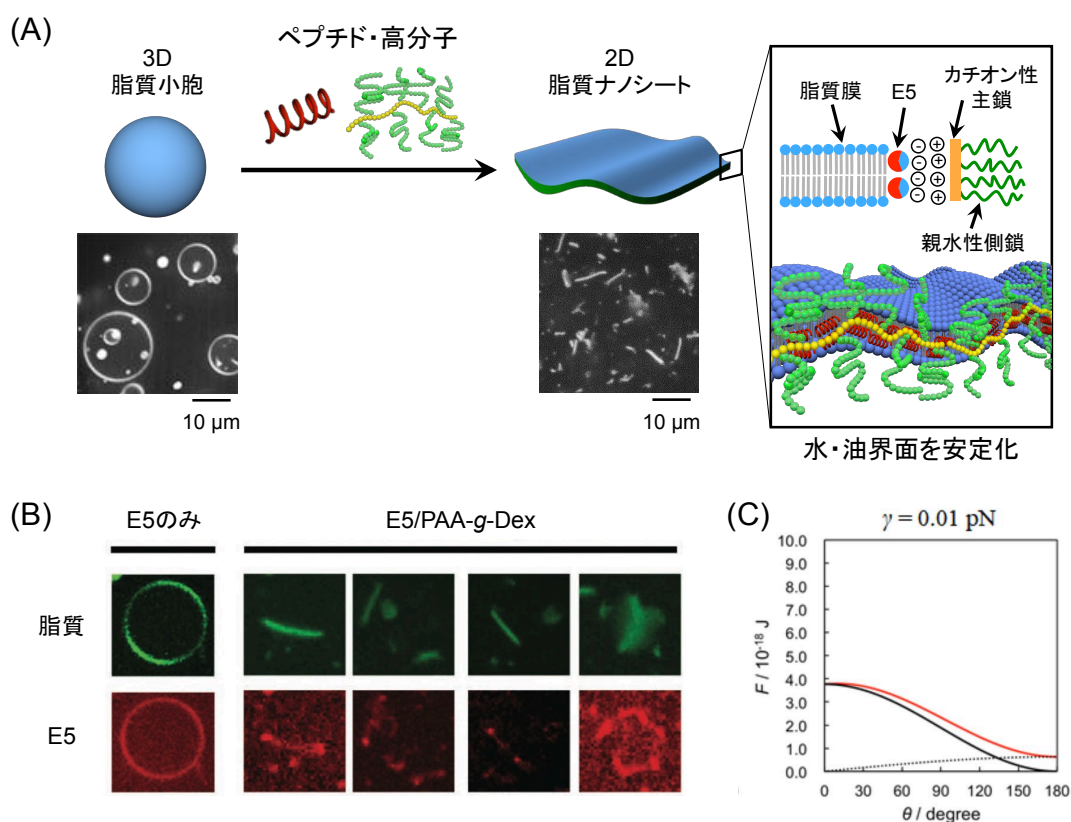


図 2. (A) カチオン性くし型共重合体・ペプチド複合体による脂質ナノシートの形成. (B) 蛍光ラベル化した E5 ペプチドを用いた膜上における局在の観察. (C) 自発曲率モデルにおけるエネルギー計算. 開口角とエネルギーの関係.

(3) 温度応答型カチオン性くし型共重合体による脂質ナノシート・ベシクル転移制御

脂質膜のシート・ベシクル転移を外部刺激により操作できれば、新しい生体材料への展開につながる考えられる。そこで、PAAに側鎖としてデキストランおよび親・疎水転移を示す温度応答性高分子 poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)を導入した混合グラフト共重合体(図3)を設計し、E5との複合体による脂質シート形成とその温度変化による制御を検討した。

共重合体とE5の複合化挙動についてE5のCDスペクトルを測定したところ、25℃および35℃ともに、208nmと222nmにダブルミニマムを持つスペクトルが得られた。これよりLCSTの前後ともに、E5は混合グラフト共重合体と複合化し、ヘリックスを形成することが確認できた。PNIPAAmの下限臨界溶液温度(LCST)以下においてリポソーム分散液にE5および共重合体を添加したところ脂質シート形成が観察された。さらに、温度応答性/親水性側鎖の導入率を適切に制御した共重合体を用いた場合、形成された脂質シートをLCST以上である35℃で10分インキュベートしたところ、混合グラフト共重合体では脂質膜のベシクル形状への復帰が見られた。すなわち、親水性側鎖・温度応答性側鎖を持つカチオン性くし型共重合体はE5と複合体を形成し、温度応答性高分子の相転移とカップリングして脂質膜形態を制御できる可能性が示された。本研究内容については、現在、論文投稿準備中である。

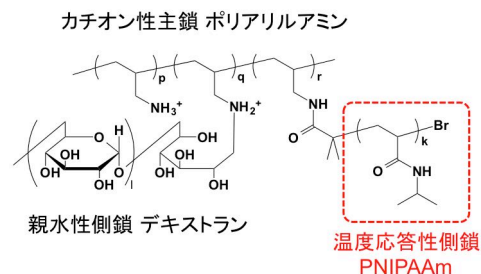


図3. 温度応答性側鎖を持つ混合グラフト共重合体の構造.

(4) リポソーム表面開始 ATRP：脂質膜表面への”grafting from”法による高分子修飾

リポソームは両親媒性の脂質分子が水系で自己集合して構成されるベシクルであり、生体膜のモデルや薬物送達のキャリアとしても注目されている。リポソーム表面への高分子鎖修飾・複合化は種々の機能化において有効であり、その新規手法の開発はリポソームの構造・機能制御において重要であると考えられる。精密ラジカル重合のひとつである activators regenerated by electron transfer for atom transfer radical polymerization (ARGET ATRP)法は水中で不活性ガス雰囲気が必要とせず重合が進行することが知られており、水系における材料表面修飾に極めて有効である。そこで、ARGET ATRPによりリポソーム表面に提示した開始基からの”grafting from”法によるリポソームへの高分子修飾を試みた(図4(A))。

親水部に ATRP 開始基を持つリン脂質 DOPE-I と 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)から混合比 DOPC/DOPE-I = 90/10 (mol/mol)でリポソームを調製した。さらに、リポソームを

モノマー *N,N*-dimethylacrylamide (DMAAm) 及び ATRP の触媒 Cu(II)/Me₆TREN を含む水溶液に分散し、還元剤としてアスコルビン酸を添加することでグラフト重合を行った。動的光散乱法により重合の進行を確認し、¹H NMR から修飾した高分子鎖の数平均分子量を得ることができた。分子量はモノマー濃度によって系統的に制御可能であった。以上より、表面に ATRP 開始剤を提示したリポソームから ARGET ATRP による”grafting from”法を用いて高分子鎖をリポソーム表面に修飾ができることが明らかになった (Langmuir 2019, 35, 5581 – 5586.)。

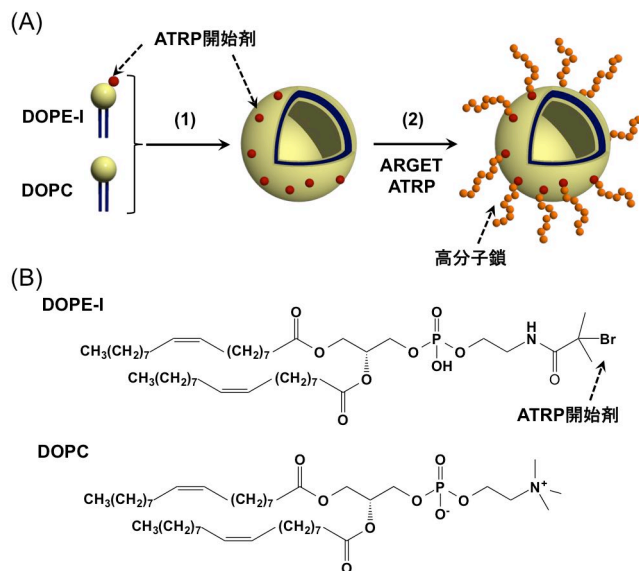


図4. (A) リポソーム表面開始 ATRP の概念図. (1) 開始剤を表面に提示したリポソームを調製し、(2) グラフト重合を行う. (B) 開始剤結合脂質 DOPE-I および DOPC の化学構造.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimada Naohiko, Kinoshita Hirotaka, Umegae Takuma, Azumai Satomi, Kume Nozomi, Ochiai Takuro, Takenaka Tomoka, Sakamoto Wakako, Yamada Takayoshi, Furuta Tadaomi, Masuda Tsukuru, Sakurai Minoru, Higuchi Hideo, Maruyama Atsushi	4. 巻 31
2. 論文標題 Cationic Copolymer Chaperoned 2D?3D Reversible Conversion of Lipid Membranes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advanced Materials	6. 最初と最後の頁 1904032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adma.201904032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masuda Tsukuru, Shimada Naohiko, Maruyama Atsushi	4. 巻 35
2. 論文標題 Liposome-Surface-Initiated ARGET ATRP: Surface Softness Generated by "Grafting from" Polymerization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 5581 - 5586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.9b00450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Wakako, Masuda Tsukuru, Ochiai Takuro, Shimada Naohiko, Maruyama Atsushi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Cationic Copolymers Act As Chaperones of a Membrane-Active Peptide: Influence on Membrane Selectivity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.8b01582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 増田造・落合拓郎・嶋田直彦・丸山厚
2. 発表標題 Sheet/vesicle transformation of lipid membranes by thermoresponsive cationic comb-type copolymer/peptide complexes
3. 学会等名 第68回 高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田造・嶋田直彦・丸山厚
2. 発表標題 リポソーム表面開始ATRP： "grafting from" 法によるリポソーム表面への高分子修飾
3. 学会等名 第68回 高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田造・嶋田直彦・丸山厚
2. 発表標題 リポソーム表面開始ATRP： "Grafting from" 法によるソフトな高分子修飾表面を持つリポソームの調製
3. 学会等名 第68回 高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田造
2. 発表標題 高分子の精密重合法を利用した生体分子修飾及び生体材料設計
3. 学会等名 次世代医療技術研究会 2019年 第3回情報交換会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田造・嶋田直彦・丸山厚
2. 発表標題 リポソーム表面開始精密ラジカル重合： "grafting from" 法によるソフトな高分子表面を持つリポソームの調製
3. 学会等名 第29回 MRS-J年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田造・落合拓郎・嶋田直彦・丸山厚
2. 発表標題 自律応答型脂質デバイスの創製：温度応答型カチオン性くし形共重合体/ペプチド複合体による脂質膜形態の操作
3. 学会等名 第67回 高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田造・落合拓郎・嶋田直彦・丸山厚
2. 発表標題 温度応答型カチオン性くし型共重合体/ペプチド複合体による脂質膜形態の操作
3. 学会等名 第40回 バイオマテリアル学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田造・落合拓郎・嶋田直彦・丸山厚
2. 発表標題 温度応答型カチオン性くし型共重合体/ペプチド複合体による脂質膜のシート・ベシクル転移制御
3. 学会等名 第28回 日本MRS年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田造・落合拓郎・嶋田直彦・丸山厚
2. 発表標題 自律応答型脂質デバイスの創製：高分子/ペプチド複合体による生体膜形態操作
3. 学会等名 第28回 インテリジェント・ナノ材料シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田 造・落合拓郎・嶋田直彦・丸山厚
2. 発表標題 自律応答型脂質デバイスの創製：温度応答型カチオン性くし形共重合体/ペプチド複合体による生体膜形態操作
3. 学会等名 第30回 高分子ゲル研究討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masuda Tsukuru, Ochiai Takuro, Shimada Naohiko, Maruyama Atsushi
2. 発表標題 Smart lipid membrane devices: Control of lipid membrane morphology by thermoresponsive cationic comb-type copolymer/peptide complex
3. 学会等名 International Polymer Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masuda Tsukuru, Ochiai Takuro, Shimada Naohiko, Maruyama Atsushi
2. 発表標題 Smart lipid membrane devices: Lipid membrane morphology control by a thermoresponsive cationic comb-type copolymer/peptide nano-assembly
3. 学会等名 1st Glowing Polymer Symposium in KANTO (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takenaka Tomoka, Ochiai Takuro, Sakamoto Wakako, Masuda Tsukuru, Shimada Naohiko, Maruyama Atsushi
2. 発表標題 Vesicle-to-sheet Transition of Copolymer Modified Liposomes with Membrane Disruptive Peptide
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋田直彦・落合拓郎・増田造・山田卓・祥丸山厚
2. 発表標題 ペプチドシャペロン機能を持つカチオン性高分子による脂質膜構造制御
3. 学会等名 第69回 高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 増田造・坂本和歌子・嶋田直彦・丸山厚	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 -
3. 書名 月刊 機能材料 (2020年5月号 スマートポリマーの最新展望)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

人工シャペロンにより脂質二重膜の2次元/3次元構造の高効率で可逆的な変換に初めて成功 https://www.titech.ac.jp/news/2019/045898.html

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