

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03816

研究課題名(和文)人工シャペロン工学に立脚した生体分子の機能創発

研究課題名(英文)Generation of novel bimolecular functions with artificial chaperone engineering

研究代表者

丸山 厚 (Maruyama, Atsushi)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：40190566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、生体高分子の機能を飛躍的に高め、さらに新たな機能を創出する高分子ナノ材料の構築とそれにより医工学デバイスを革新的に発展させることを目的とした。生体高分子の機能発現にはその高次構造形成・組織化が重要となる。さらに、異なる構造間の転移が、シグナル伝達、物質輸送、物質合成などの高度な生体機能の基幹となっている。申請者らは、生体分子のイオンの性質に着目し、核酸、ペプチドに対して優れた構造形成促進能「シャペロン活性」を発現する合成高分子の設計法に世界に先駆けて構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生体分子の高次構造を制御し得る人工シャペロン高分子材料を、様々な生体機能の強化手法として先鋭かつ広く展開するとともに、高い次元で厳密かつ柔軟に組織化可能な特徴を活用し、生体分子のみでは実現不可能な新たな機能創出につなげ、診断・治療の革新的発展の促す基盤材料として発展させた。例えば、診断・治療法のツールとして期待されている核酸酵素の活性や核酸分子コンピューターや核酸自己組織化反応も迅速化に人工シャペロン材料が有用である事を見いだした。また、人工シャペロン材料は、膜活性ペプチドなどの機能性ペプチドの高機能化に有用である事も見いだした。

研究成果の概要(英文)：The objective of this research project is to significantly enhance the functions of biopolymer and create new functions through the construction of polymer nano-materials, thereby innovatively advancing medical engineering devices. The expression of biopolymer functions relies heavily on their higher-order structural formation and organization. Furthermore, transitions between different structures play a fundamental role in advanced biological functions such as signal transduction, substance transport, and substance synthesis. We have pioneered a method for designing synthetic polymers that promote structural formation and functions of biopolymers, known as "chaperone activity," focusing on the ionic properties of biomolecules such as nucleic acids and peptides.

研究分野：生体機能性材料

キーワード：artificial chaperone oligonucleotides peptides lipid membrane folding molecular assembly graft copolymer

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体高分子の機能発現には、その高次構造形成が重要な役割を果たす。さらに、高次構造の転移がシグナル伝達、物質輸送など高度な生体分子機能の基幹となっている。我々は、核酸の高次構造形成を、高分子電解質複合体 (IPEC) を利用し低濃度で効果的に制御することを目指し、親水性グラフト鎖を配したカチオン性くし型共重合体を設計した。共重合体は、核酸間の静電反発を緩和し、核酸の自己組織化構造を顕著に安定化した。安定化機序を速度論的に検討した結果、意外にもくし型共重合体は核酸ハイブリッドの形成速度を 2 桁以上顕著に高めた。核酸ハイブリッドの安定化を目的に、化学修飾核酸、人工核酸が種々検討されているが、解離速度の抑制がその速度論的效果であり、形成速度を顕著に高める例は無い。このような速度論的效果の差異から、共重合体は人工核酸と共同的に機能し、ハイブリッドの安定性を相乗的に高められる事もわかった。さらに、共重合体は核酸鎖交換反応を 4 桁と著しく加速することを見いだした。つまり、共重合体は、核酸塩基対の解離・再結合を活性化する構造転移触媒、いわゆる核酸シャペロンとして機能することが見いだされた。その活性は天然の核酸シャペロンタンパク質よりも数百倍高い。共重合体のシャペロン活性は、分子内と分子間構造の転移、四重鎖核酸の構造収束、さらに、B-Z 転移にも有効であった。最近では、共重合体の構造と機能相関を追求し、三重鎖核酸を特異的にかつ強固に安定化する共重合体や二重鎖 B-A 転移を効果的に誘起する共重合体も見いだした。

くし型共重合体の活性を利用することで、迅速、簡便な一塩基変異解析法としてポリカチオン加速型鎖交換法 (PASE) 法を開発した。また、共重合体の活性は、分子ビーコン法など既存の核酸解析法の迅速、簡便化にも有用であった。核酸はナノマシン、ナノ構造体を構成するナノ材料として近年さらに注目が増している。核酸ナノマシンの迅速化、核酸ナノ構造体の形成制御、DNA テンプレート反応や DNA 酵素反応の促進に、共重合体は添加するだけで顕著な効果を示した。

### 2. 研究の目的

本研究は、上記したようにこれまで蓄積された人工シャペロン材料の概念を先鋭化し、核酸、タンパク質、脂質を含め自己組織化特性を厳密且つ柔軟に制御する材料設計で生体分子だけでは実現不可能な機能を、創発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

くし型共重合体のシャペロン機能発現には、1) 生体分子活性構造の安定化、2) 構造形成・組織化の動的制御および 3) 生体分子の柔軟で臨機応変な多分子組織化が背景にある。本研究では、これらの発現原理を分子レベル、集合体レベルで追求しつつ以下の検討を行った。

#### (1) 機能性核酸に対する共重合体の機能強化効果

核酸自己組織化過程に基づく核酸酵素、核酸ロジック回路、核酸恒温シグナル増幅回路に対するくし型共重合体の効果を検討し、様々な機能性核酸に対する共重合体機能の一般性を確認した

#### (2) スマートシャペロン高分子の設計とペプチド・脂質膜の機能・構造制御

種々の環境因子やシグナルに対し自立的にシャペロン活性をオン・オフするスマートシャペロンを設計し、膜活性ペプチドの活性や脂質膜の形態変化に連携させる脂質分子デバイスの構築に挑戦した。

### 4. 研究成果

#### (1) 機能性核酸に対する共重合体の機能強化効果

上述したように、酵素活性を持つ核酸が RNA および DNA で見いだされそれぞれ Ribozyme および DNAzyme (あるいは Doxyribozyme) と称されている。タンパク質酵素に比べて構

造がシンプルで人工的に容易に合成出来る点、変性しにくいなどのメリットがある。核酸酵素の中には、第3の物質（エフェクター、T）により酵素活性が調整されるアロステリック型核酸酵素も見いだされている。Multicomponent nucleic acid enzyme（MNAzyme）はアロステリック型核酸酵素の代表例であり、エフェクターとなる核酸配列の存在下で二本の核酸酵素断片から活性型の酵素が再構成されRNA切断活性を発現する。エフェクターの存否を恒温、タンパク質フリーで増幅できることで、核酸医薬、核酸センサーとしての応用が期待されている。このMNAzyme活性を高めるには、エフェクター、核酸酵素断片および基質の4本の核酸鎖からなる複合体の形成を促す必要がある。さらに、増幅活性を高めるには生成物（と基質との交換速度を高めターンオーバーを促す必要がある。共重合体は、核酸鎖間のハイブリッド形成や鎖交換を顕著に促進する効果があるので、MNAzymeの活性を高めるのに有用と推測した。実際に、共重合体を反応液に加え酵素活性を調べた。蛍光色素と消光剤でラベルした基質を用い、基質の切断に伴う蛍光の回復により酵素反応を蛍光光度計で追跡した。基質過剰のマルチプルターンオーバー条件下で共重合体が顕著に酵素活性を高めることがわかった。さらに、マイクロRNA(miRNA)をエフェクターとして、その検出限界を調べた結果、共重合体は3桁以上感度を向上した。DNAのみならずRNAに対しても簡便な操作で増幅検出できる点は、魅力である。共重合体は、その他の核酸酵素に対しても活性を高める効果があることも明らかにした。

ハイブリッド形成の塩基配列特異性と可逆性を利用する核酸カスケード反応は、バイオセンシング、ナノ組織体形成や分子コンピューティングに活用されている。カスケード反応で盛んに研究されているのがHybridization Chain Reaction(HCR)である。HCRでは二つのヘアピン型核酸が開始剤となる短鎖核酸との対合を引き金に、高分子量の核酸集合体が生成される。シンプルなカスケード反応であるが、反応速度が遅いことが課題である。共重合体はHCRの迅速化にも有効と考えられた。実際に、共重合体を反応系に添加するのみでHCR反応が顕著に促進した。共重合体は核酸を核酸分解酵素から保護する効果も有しており、これらの核酸分子デバイスの堅牢性を高める上でも有用である。例えば、RNA分解酵素であるRNaseの存在下でもMNAzymeによるRNA検出が可能であった。

## （2）スマートシャペロン高分子の設計とペプチド・脂質膜の機能・構造制御

バイオ医薬やバイオツールとしてペプチドが注目されているが、活性な構造の安定化と凝集性の抑制は、共通の課題である。塩基性ペプチドに対しては、核酸同様に共重合体による構造制御と溶存性の向上が期待された。実際、脂質膜破壊活性を有するE5ペプチドをモデルに検討した結果、E5を活性な構造で溶存させていることで、共重合体はE5活性を高めることを見いだした。また、E5のみでは不活性とされる中性pHでも共重合体共存下では活性が見られた。言い換えれば、共重合体はE5の膜破壊活性をOn-Off制御するコファクターとして機能することがわかった。

共重合体/E5複合体が極めて高い活性を示すことから、細胞膜に対してどのように作用するか人工細胞膜モデルであるジャイアントリポソーム(GUV)を対象に、顕微鏡により複合体の作用を観察した。小胞状のGUVを共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)で観察すると円状に観察される。ここに共重合体とE5を加えると、脂質膜が大きく揺らぎはじめ、小胞が開裂を始めた。一分後には円状の像は見られず線状のイメージのみが観察された。小胞が定量的に開裂しシート状の脂質膜に形態変化したことを示す。細胞膜を構成する脂質は疎水部を内部に隠すように脂質二分子膜を形成する。しかしながら、シート状態ではシート

周縁部でエネルギー的に不利な疎水部と水との界面が残る。この親疎水界面を減らすように脂質シートは自発的に閉じ、小胞（リポソーム）となる。つまり、小胞状態がエネルギー的に安定な状態である。一方で、共重合体と E5 を加えたことでシート状の脂質が定量的に観察されたことは、共重合体/E5 複合体が脂質シートを小胞より安定にしていることを示す。シート周縁部に E5 ヘリックスが疎水面を内側、親水面を外側に配向し、E5 親水面のグルタミン酸残基との相互作用を介して共重合体が E5 の集合を促していると推測した。E5 のみでは小胞からシートへの形態変化は見られず、共重合体と共同的にシート周縁部の界面を安定化していることがわかる。実際、共重合体と E5 の相互作用を、過剰量のアニオン性高分子を加えることで遮蔽すると、脂質シートは瞬く間に小胞化した。このことは、環境応答的にシャペロン活性をスイッチングする共重合体を分子設計すれば、小胞状態とシート状態を自律的に転換する脂質デバイスが構築できることを意味する。そこで、共重合体のアミノ基の塩基性を  $\alpha$ -アミノ酸を化学修飾することで調整した。その結果、生理的 pH 近傍で小胞状態とシート状態を自律制御できることがわかった。また、構造転移 pH はアミノ基の  $pK_a$  に依存して制御できることがわかった。一方、温度に自律応答する応答する脂質デバイスは、くし型共重合体のグラフト鎖に温度応答性高分子鎖を導入したヘテログラフト共重合体を設計することで実現出来ることがわかった。さらに、光応答性基でくし型共重合体を修飾することで、光応答的に脂質構造が自律変化する脂質デバイスが構築できる事が見いだされた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8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 Wang Jun, Shimada Naohiko, Maruyama Atsushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Cationic Copolymer-Augmented DNA Hybridization Chain Reaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials Interfaces	6. 最初と最後の頁 39396 ~ 39403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.2c11548	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 Tanaka Yamato, Niu Chun Hao, Sasaki Taira, Nomura Shouhei, Maruyama Atsushi, Shimada Naohiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Smart Protein Refolding System Based on UCST-Type Ureido Polymers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 3860 ~ 3865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.2c00694	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, Takahashi Shutaro, Ochiai Takuro, Yamada Takayoshi, Shimada Naohiko, Maruyama Atsushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Autonomous Vesicle/Sheet Transformation of Cell-Sized Lipid Bilayers by Hetero-Grafted Copolymers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials Interfaces	6. 最初と最後の頁 53558 ~ 53566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.2c17435	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 Lomae Atchara, Preechakasedkit Pattarachaya, Hanpanich Orakan, Ozer Tugba, Henry Charles S., Maruyama Atsushi, Pasomsub Ekawat, Phuphuakrat Angsana, Rengpipat Sirirat, Vilaivan Tirayut, Chailapakul Orawon, Ruecha Nipapan, Ngamrojanavanich Nattaya	4. 巻 253
2. 論文標題 Label free electrochemical DNA biosensor for COVID-19 diagnosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Talanta	6. 最初と最後の頁 123992 ~ 123992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.talanta.2022.123992	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 Hanpanich Orakan, Lomae Atchara, Maruyama Atsushi, Palaga Tanapat, Chailapakul Orawon, Ngamrojanavanich Nattaya	4. 巻 221
2. 論文標題 Label-free detection of HPV mRNA with an artificial chaperone-enhanced MNAzyme (ACEzyme)-based electrochemical sensor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 114352 ~ 114352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2022.114352	査読の有無 無
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 Kojima Atsuhiko, Nakao Juki, Shimada Naohiko, Yoshida Naoki, Abe Yota, Mikame Yu, Yamamoto Tsuyoshi, Wada Takehiko, Maruyama Atsushi, Yamayoshi Asako	4. 巻 -
2. 論文標題 Selective Photo-Crosslinking Detection of Methylated Cytosine in DNA Duplex Aided by a Cationic Comb-Type Copolymer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.2c00048	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 YOSHIDA Naoki, HANPANICH Orakan, HAYASHI Raito, SHIMADA Naohiko, MARUYAMA Atsushi	4. 巻 3
2. 論文標題 Simple and rapid RNA detection using cationic copolymer-chaperoned MNAzyme (ACEzyme)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational and Regulatory Sciences	6. 最初と最後の頁 102 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.33611/trs.2021-026	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 Araki Haruka, Hagiwara Shota, Shinomiya Ryosuke, Momotake Atsuya, Kotani Hiroaki, Kojima Takahiko, Ochiai Takuro, Shimada Naohiko, Maruyama Atsushi, Yamamoto Yasuhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 A cationic copolymer as a cocatalyst for a peroxidase-mimicking heme-DNAzyme	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 6142 ~ 6152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1BM00949D	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 Xu Jie, Fan Shuya, Xu Lei, Maruyama Atsushi, Fujitsuka Mamoru, Kawai Kiyohiko	4. 巻 60
2. 論文標題 Control of Triplet Blinking Using Cyclooctatetraene to Access the Dynamics of Biomolecules at the Single Molecule Level	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 12941 ~ 12948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202101606	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7件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 丸山厚
2. 発表標題 合成ポリマーを用いた生体高分子操作
3. 学会等名 九州大学理学部最新化学談話シリーズ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山厚
2. 発表標題 弱い相互作用でアーズをねらえ!
3. 学会等名 学術変革領域研究 (A) 「物質共生」 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山厚
2. 発表標題 生体高分子に " 喝 (活) " を入れる合成高分子
3. 学会等名 北九州市立大学バイオマテリアル研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsushi Maruyama
2. 発表標題 Stimuli-responsive vesicle/sheet transformation of lipid membranes mediated by smart chaperone polymers
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Maruyama
2. 発表標題 Engineering of nucleic acid and peptides functions with ionic copolymers having chaperone-like activities
3. 学会等名 International Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山厚
2. 発表標題 核酸酵素型核酸センサーを機能強化するシャペロン高分子
3. 学会等名 第4回TRSシンポジウム新型コロナウイルス感染症対策関連研究開発事業の成果報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Maruyama
2. 発表標題 Ionic polymers for biomolecular engineering
3. 学会等名 Spring Seminar 2021, KAIST (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京工業大学・生命理工学院・丸山研究室  
<http://mlab.bio.titech.ac.jp>

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
---------	---------