

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23240074

研究課題名(和文) 生体高分子の高次構造と機能制御のための高分子材料設計

研究課題名(英文) Polymer materials design to engineer assembly and function of biopolymers

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) 38,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、カチオン性くし型共重合体と核酸との完全可溶性高分子電解質複合体で見いだされた核酸シャペロン活性発現機序を追求するとともに、その知見をタンパク質・ペプチドの構造形成と機能制御に活用すべく、基礎的知見の集積とその発展を計った。その結果、DNAプローブやDNA酵素の活性化、ペプチド構造や溶解性の制御と機能促進がくし型共重合体で可能となることが見出された。

研究成果の概要(英文)：Proper folding and assembling are key processes for biopolymers to exhibit their inherent biological activities. Artificial materials that can manipulate biopolymer folding and assembling would have variety of applications in biomedical fields. We have designed ionic graft copolymers consisting of a polyion backbone and hydrophilic graft chains to engineer folding and assembling of biopolymers, such as DNA and peptides, having opposite ionic charges. The cationic copolymers formed soluble inter-polyelectrolyte complex with DNA and acidic peptides and enhanced their functions.

研究分野：生体機能性材料

キーワード：グラフト共重合体 高分子電解質複合体 高次構造 DNA ペプチド 自己組織化 脂質膜

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。核酸は、リン酸アニオンを高密度に有する高分子電解質である。核酸が高次構造形成、たとえば2重らせん形成する際には、静電的な相互作用が強く影響する。一方、高分子電解質は反対符号の高分子電解質と安定な複合体を形成する。申請者らは、核酸の高次構造形成を、高分子電解質複合体を利用し低濃度で効果的に制御することを目指し、カチオン性くし型共重合体(図1)を設計した。一般的に、ポリカチオンとDNAのようなポリアニオンから形成される高分子電解質複合体は、お互いに電荷を打ち消しあう形でコイル状態の溶存状態からコンパクトに凝縮し、凝集・不溶化する。一方で、このくし型共重合体は、豊富な親水性側鎖を有することで、完全可溶性な複合体を形成することが見いだされた。このようなカチオン性共重合体が、核酸間の静電反発を緩和し、2重鎖核酸や3重鎖核酸を顕著に安定化することが見いだされた。従来、核酸ハイブリッドの安定化は、非天然型核酸や核酸結合性リガンドなどの設計など、従来は合成化学的基盤からなされてきたが、本研究のように高分子材料科学に基づく例は世界的にも初めてである。さらに、共重合体のハイブリッド安定化機序を速度論的に検討した結果、くし型共重合体は核酸ハイブリッドの解離速度を低めるより、形成速度を2桁から3桁と顕著に高めることで、ハイブリッドの安定性を高めていることが見いだされた。

2. 研究の目的

本研究課題は、(1)共重合体のハイブリッド形成促進機構、鎖交換加速機構を明らかにし、さらに、(2)核酸以外の生体高分子の構造制御へ展開し、イオン性生体高分子の構造形成の機序とそれを制御するため

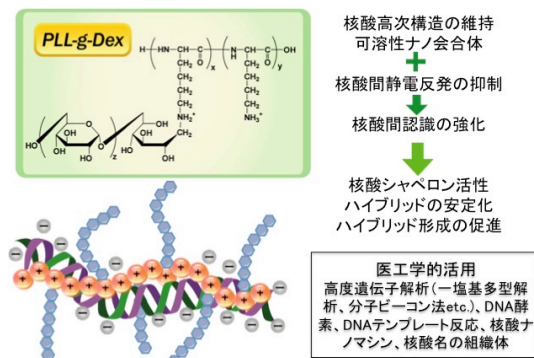


図1 カチオン性くし型共重合体(PLL-g-Dex)による核酸の構造操作と医工学的活用

の方法論を創出する上での普遍的な知見を提供することを目的とする。具体的には、特に共重合体に特徴的に見いだされた鎖交換加速機構について、蛍光共鳴エネルギー移動法などを駆使して解析する。さらに、その機能発現に必要な共重合体・核酸複合体の性状を一分子計測法等により静的のみならず動的に明らかにする。一方で、生理活性ペプチドやタンパク質の構造形成を制御する高分子材料の設計に知見を活用し、ペプチド・タンパク質、多糖の機能発現を効果的に支援する方法論を創出する。

3. 研究の方法

(1) フローストレッチング法による核酸・ポリカチオン共重合体相互作用の解析  
カバーガラス表面に、ポリエチレングリコール(PEG)およびビオチン化PEGを固定し、片末端にビオチン標識したλファージDNAを固定した。蛍光色素を含むバッファーを流し、DNAを伸張後、各共重合体を溶解したバッファーに切り替えDNAの形態変化を、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

(2) 核酸ハイブリッド形成に及ぼす共重合体効果

消光基および蛍光基でそれぞれ修飾した相補的オリゴヌクレオチド(ODN)を合成し、ハイブリッド形成に伴う蛍光の消光を経時的に計測した。

また、4重鎖形成性ODNとしてTGGGGTおよびTGGGGGTを合成し、両者を混合後、90℃に加熱後、急冷することで様々な組成を持つヘテロ4重鎖混合物を得た。この溶液を共重合体存否下、25℃でインキュベーションし、経時的に高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により解析した。

(3) 共重合体のデオキシリボザイム活性化機能の評価

10-23 デオキシリボザイム(DNAzyme)に対する効果を、シングルターンオーバー、およびマルチプルターンオーバー条件下で評価した。DNAzyme反応の追跡は、蛍光ラベルした基質核酸のゲル電気泳動による解析または消光基と蛍光基で二重ラベルした基質の切断による蛍光の回復により経時的に評価した。また、二価カチオン依存性および温度依存性も解析した。

(4) 共重合体のペプチド構造および機能に与える影響

生体膜破壊機能をもつアニオン性両親媒性ペプチドであるE5およびその類似体を対象に、その構造に及ぼす共重合体の効果を円二色性スペクトルにより解析した。また、生体膜との相互作用を、ペプチド内のトリプトファン残基に基づく蛍光により解析した。ペプチドの膜破壊活性は、脂質小胞(リポソーム)からの内容物の放出により評価した。

4. 研究成果

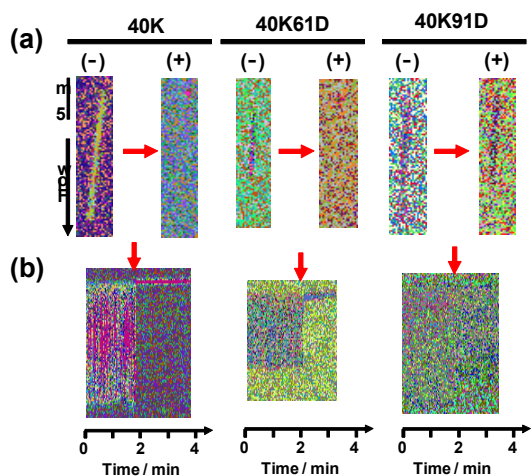
(1) カチオン性くし型共重合体による非凝

縮性ポリカチオン・DNA 複合体の形成  
 核酸の高次構造形成を、高分子電解質複合体  
 を利用し低濃度で効果的に制御することを  
 目指し、カチオン性くし型共重合体を設計し  
 た。一般的に、ポリカチオンと DNA のよう  
 なポリアニオンから形成される高分子電解  
 質複合体は、お互いに電荷を打ち消しあう形  
 でコイル状態の溶存状態からコンパクトに  
 凝縮し、凝集・不溶化する。一方で、このく  
 し型共重合体は、豊富な親水性側鎖 (80 wt%)  
 を有することで、DNA 凝縮を伴わない完全  
 可溶性な複合体を形成することを一分子観  
 察とりわけフローストレッチング法により  
 明確に示した (図2)。

(2) 共重合体による DNA ハイブリダイゼ  
 ーション、自己組織化の加速

すでにカチオン性共重合体は、核酸間の静  
 電反発を緩和し、2重鎖核酸や3重鎖核酸を  
 顕著に安定化することを申請者らは見いだ  
 していたが、さらに速度論的に検討し、くし  
 型共重合体は核酸ハイブリッドの解離速度  
 を低めるより、形成速度を2桁から3桁と顕  
 著に高めることでハイブリッドの安定性を  
 高めていることを見いだした。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  
 能することが強く示唆された。共重合体のシャ  
 ペロン活性は、分子内構造から分子間ハイ  
 ブリッドへの転移、また金属イオンへの塩基  
 の配位により安定化されるグアニンカルテ  
 ットからなる4重鎖核酸にも有効であること  
 も見いだした。さらに、通常高いイオン強度  
 を必要とするB-Z転移もくし型共重合体が効  
 率よく誘起することを明らかにした。つまり、  
 天然の核酸シャペロンタンパク質には見出  
 されていない特性を持つことを明らかにした。

(3) 共重合体はデオキシリボザイム  
 (DNAzyme) の機能を著しく向上



→ : Addition of PLL(40K) or PLL-g-Dex(40K61D, 40K91D)  
 図2 フローストレッチング法による共重合体・核酸間相互作用の観察

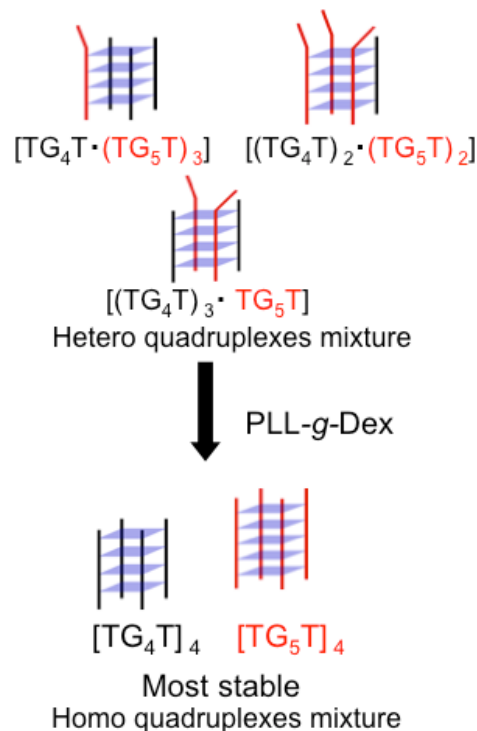


図3 くし型共重合体による4重鎖核酸の構造転移促進

デオキシリボザイムは酵素活性を持つ  
 DNA 配列で有り、タンパク質やリボザイムに  
 次ぐ第三の酵素活性分子である。タンパク質  
 酵素やリボザイムより安定でかつ合成が容  
 易である点、化学修飾等により様々な機能を  
 容易に付加できる点で有利で有り、近年多様  
 な DNAzyme が設計され多くの注目を集めて  
 いる。一方、酵素機能の向上には、ターンオ  
 ーバー活性、つまり一分子の酵素が反応でき  
 る基質数の向上が、共通の課題となっている  
 (図4)。共重合体は、ターンオーバー活性  
 を挙げることで、これまでの DNAzyme のボ  
 トルネックを緩和し、活性の大幅な向上に有  
 用である事が見出された。これまで、ターン  
 オーバー活性を向上することで DNAzyme 活  
 性を高める方法論は見られず、本手法が初め  
 てである。

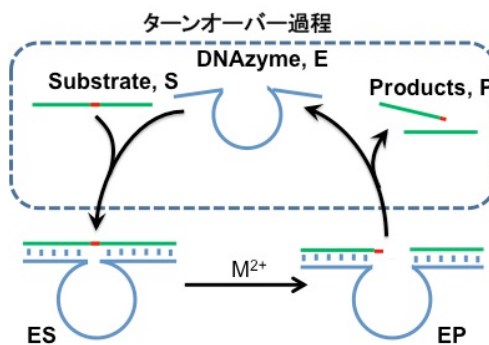


図4 リボヌクレアーゼ活性を持つ DNAzyme の反応過程

## ペプチド機能を高める材料設計

### 高次構造の形成誘導と安定化 溶溶性の向上、凝集抑制 標的分子との相互作用強化



図5 ペプチド機能強化のための高分子

#### (4) ナノ会合体によるイオン性ペプチドの構造・機能操作

ナノ会合体形成による生体高分子の構造・機能操作は、核酸のみならずイオン性ペプチドにも展開可能である事が、最近見出された。インフルエンザウィルスのヘマアグリ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が見出された (図5, 図6)。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と考えられる。

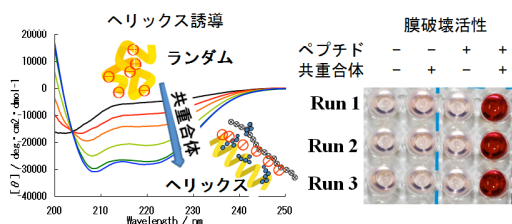


図6 くし型共重合体によるペプチド構造の制御と活性強化

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計29件)

1. J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, MNzyme-catalysed nucleic acid detection enhanced by a cationic copolymer, *Biomater. Sci.*, accepted (Feb 23, 2015), DOI: 10.1039/C4BM00449C、査読有
2. 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
3. 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
4. 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
5. D. Miyoshi, Y. M. Ueda, N. Shimada, S. I. Nakano, N. Sugimoto, A. Maruyama, Drastic stabilization of parallel DNA hybridizations by a polylysine omb-type copolymer with hydrophilic graft chain, *ChemMedChem.*, 9, 2156-63 (2014), DOI: 10.1002/cmdc.201402157、査読有
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
  12. 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
  13. 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 3 6 件）

1. Atsushi Maruyama, Keynote speaker, Enhancement of DNAzyme Sensor Functions by Cationic Copolymers, The 6<sup>th</sup> Taiwan-Japan Symposium on nanomedicine, Jan 8, 2015, Academia Sinica, Taipei
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. Atsushi Maruyama, Invited speaker, Cationic Comb-Type Copolymer Enhances DNAzyme Activity, International Symposium on Smart Biomaterials~2nd Hoffman Family Symposium ~Date: March 24-25, 2014, NIMS, Tsukuba
7. Atsushi Maruyama, Plenary lecture, Novel thermo-responsive polymers for biomedical application, 2<sup>nd</sup> International Conference on Biomaterials Science in Tsukuba (ICBS2013), , March 21, 2013, Tsukuba
8. Atsushi Maruyama, Invited speaker, Soluble

polyelectrolyte complex to engineer biopolymer assembly and functions, The 9<sup>th</sup> 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・ティー・エヌ (2012)、2 ページ
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
丸山 厚 (ATSUSHI, MARUYAMA)  
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