

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410170

研究課題名(和文) 多次元分子PEGの開発とタンパク質安定化への応用

研究課題名(英文) Development of structured PEGs and applications to protein stabilization

研究代表者

村岡 貴博 (Muraoka, Takahiro)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：70509132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多角形型に構造化した一連のPEG類縁体として、二角形から六角形PEGを合成し、物性を比較した。室温では鎖状PEGと比べ、多角形型PEGは疎水性が高いことが示された。環サイズ増大に伴い疎水性が増加することも示された。70度ではトポロジー効果が示唆され、環状PEGは、その分子構造に対し不連続的に機能や物性が変化することがわかった。

両親媒性構造を有するPEGについて、片末端にフェニル基を有するテトラエチレングリコール、オクタエチレングリコールを開発した。フェニルオクタエチレングリコールの方が、フェニルテトラエチレングリコールに比べ高い凝集抑制効果を示した。

研究成果の概要(英文)：As a series of polyethylene glycol (PEG) analogues with structured macrocyclic morphology, PEGs with digonal to hexagonal structures were synthesized and their properties were evaluated. At room temperature, the macrocyclic PEG analogues showed higher hydrophobicity than the corresponding linear PEGs, and the hydrophobicity continuously increased with the ring size. At 70 °C, on the other hand, a topological effect was observed in the relationship between the molecular structure and hydrophobicity. Amphiphilic PEGs bearing phenyl group at the end of PEG with different chain length were also developed. Phenyl octaethylene glycol showed higher protein aggregation suppression effect than phenyl tetraethylene glycol.

研究分野：生体関連化学

キーワード：ポリエチレングリコール 凝集抑制効果 熱応答性 両親媒性分子 大環状分子

## 1. 研究開始当初の背景

水酸基とエチレンオキシド基から成る PEG は、高い生体親和性に加え、タンパク質化学においてステルス化剤や沈殿剤として有効であるなど多くの特徴を持つ。この機能は、水溶性で物質として安定であり、電荷を持たないという PEG 独特の特徴に由来すると考えられる。通常用いられる PEG はポリマーであるため分子量分布が存在する。精密な機能評価を行うには分子量分布の無い「純物質」であることが求められるが、意外にも純物質としての PEG (分子 PEG) の合成例は極めて少ない。従って、分子 PEG の融点などの基本物性評価や、タンパク質操作に関連した機能評価、PEG の立体構造が持つ効果、などに関する検討はほとんど行われていなかった。

このように「PEG 化学」が手付かずのままである原因の一つは、合成の困難さにある。PEG は高極性で水溶性であると共に、ほとんどの有機溶媒にも可溶である。さらに可視、中・近紫外域に吸収を持たない。従って、有機合成化学で通常行われる分液操作やシリカゲルカラム精製が極めて困難である。これが障壁となり、長鎖分子 PEG の合成は、最近まで達成されなかったと言える。

それに対し申請者らは最近、この合成の困難さを克服し、二次元的な形を持つ分子 PEG の開発に初めて成功した (ACIE 2013, VIP)。三角形に構造化した分子 PEG (三角形 PEG) を開発し、三角形 PEG が PEG1000 では見られない、タンパク質凝集抑制効果を有することを見出した。さらに三角形 PEG は、水中で LCST 挙動を示す。これも PEG1000 では見られない特徴である。詳細な検討の結果、構造化することで PEG の脱水和温度が 30 °C 程度低下することが明らかとなった。PEG のエチレン部は、温度上昇により gauche から anti へコンフォメーション変化し、これに伴い疎水性を増す。構造化することで、この温度応答性が変化し、その結果、凝集抑制効果や LCST 挙動へと結びついていると考えられる。このように形を持たせた PEG を精密合成することで、通常の直鎖 PEG とは異なる性質を見出し、かつ正確に評価することが可能となる。これは、高い生体親和性などの付加価値を有する PEG の応用可能性をさらに広げ、精密な機能制御を可能にする重要かつ有効な方法論であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、系統的に分子 PEG の形のバリエーションをさらに広げ、PEG の構造と機能の関係を広く深く精密に理解すると共に、基本物性評価で得られる知見を基に、工業、医薬品開発分野でタンパク質の安定化技術として特に重要な凝集抑制やステルス化について、有効な構造化分子 PEG を戦略的に設計、開発し、PEG の構造化技術を実用面でも

価値のあるものへと発展させることを目標とした。

## 3. 研究の方法

PEG の構造と機能の関係を調べるために、二次元的な分子形状を有する環状多角形 PEG と、両親媒性構造を有する PEG に注目し、多角形形状や、PEG 鎖長が異なる分子群を網羅的、かつ分子量分布なく精密に開発した。水中での熱物性、自己集合性、タンパク質安定化効果などを比較検討することで、PEG の構造と機能の関係を探索した。

## 4. 研究成果

多角形型に構造化した一連の PEG 類縁体として、二角形、三角形、四角形、五角形、六角形 PEG を合成し、特に水中での物性 (自己集合性など) と熱応答性を比較した。室温において、鎖状 PEG と比べ、多角形型 PEG はいずれも水中で低い表面張力を与えたことから、疎水性が高いことが示された。また、一連の多角形型 PEG 内においては、環サイズが大きくなるほど表面張力が低下し、疎水性が増加することも示唆された。これに対応するように、動的散乱測定において、二角形、三角形、四角形 PEG は水中でほぼ分子レベルで分散しているが、五角形、六角形は分子集合体を形成していることが示された。以上のように、水中において、室温では主に環サイズに依存した傾向が見られたが、70 度では連続的な環サイズ依存性が見られず、トロロジ効果が見られた。動的散乱測定において、二角形、四角形、五角形は室温とほぼ同じ結果が示され顕著な熱応答性は見られなかったが、三角形と六角形では熱応答性が見られた。まず三角形では、室温での分散状態から、70 度ではマイクロメートルサイズの分子集合体が形成されることが示され、温度上昇によって疎水性が増加する傾向が見られた。また六角形では、室温での多分散な集合体形成から、70 度では単分散性の集合体へと変化が見られた。このように環状 PEG は、その分子構造に対し不連続的に機能や物性が変化することがわかった。

両親媒性構造を有する PEG について、特に鎖長の効果を調べた。片末端にフェニル基を有するテトラエチレングリコール、オクタエチレングリコールを開発した。いずれも水中で集合体を形成し、さらに加熱によって集合体サイズが大きくなる熱応答性を示した。中でもフェニルオクタエチレングリコールは、加熱によって集合体サイズを著しく増大させた。さらに両者のタンパク質凝集抑制効果を調べたところ、フェニルオクタエチレングリコールの方が、フェニルテトラエチレングリコールに比べ高い凝集抑制効果を示した。このことから、フェニルオクタエチレングリコールのタンパク質凝集抑制効果には、顕著な熱応答性との関連が示唆される。また、オクタエチレングリコールのような短鎖

PEG でもタンパク質安定化効果が示された点も興味深く、短鎖 PEG の新たな応用性を示す成果でもある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1) Protein Stabilization by an Amphiphilic Short Monodisperse Oligo(ethylene glycol)  
Nabanita Sadhukhan, Takahiro Muraoka, Mihoko Ui, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto, and Kazushi Kinbara 査読有  
*Chem. Commun.* **2015**, *51*, 8457–8460.

2) Bioinspired Multi-block Molecules  
Takahiro Muraoka and Kazushi Kinbara 査読有  
*Chem. Commun.* **2016**, *52*, 2667–2678.

3) Synthesis and Thermal Responses of Polygonal Poly(ethylene glycol) Analogues  
Shunichi Kawasaki, Takahiro Muraoka, Tsutomu Hamada, Kazuki Shigyou, Fumi Nagatsugi and Kazushi Kinbara 査読有  
*Chem. Asian J.* **2016**, *11*, 1028–1035.

4) Chromatography-Free Synthesis of Monodisperse Oligo(ethylene glycol) Mono-p-toluenesulfonates and Quantitative Analysis of Oligomer Purity  
Adam M. Wawro, Takahiro Muraoka, and Kazushi Kinbara 査読有  
*Polym. Chem.* **2016**, *7*, 2389–2394.

5) Multigram Chromatography-free Synthesis of Octa(ethylene glycol) p-Toluenesulfonate  
Adam M. Wawro, Takahiro Muraoka, Maho Kato, and Kazushi Kinbara 査読有  
*Org. Chem. Front.* **2016**, *3*, 1524–1534.

6) G-quadruplexes with Tetraethylene Glycol-modified Deoxythymidines Are Resistant to Nucleases and Inhibit HIV-1 Reverse Transcriptase  
Hisae Tateishi-Karimata, Takahiro Muraoka, Kazushi Kinbara, and Naoki Sugimoto 査読有  
*ChemBioChem* **2016**, *17*, 1399–1402.

7) Newly Characterized Interaction Stabilizes DNA Structure: Oligoethylene Glycols Stabilize G-quadruplexes CH- $\pi$  Interactions  
Hisae Tateishi-Karimata, Tatsuya Ohyama, Takahiro Muraoka, Peter Podbevsek, Adam M. Wawro, Shigenori Tanaka, Shu-ichi Nakano, Kazushi Kinbara, Janez Plavec, and Naoki Sugimoto 査読有  
*Nucleic Acids Res.* accepted.

[学会発表] (計 20 件)

1) Li, R, Muraoka, T. and Kinbara, K., “Topological Study of Bola- and Cyclic-Amphiphiles” 2015.9.1, 15th International Conference on Chiroptical Spectroscopy, Sapporo, Japan.

2) Wawro, A. M., Muraoka, T. and Kinbara, K., “Monodispersed PEG Derivatives: Straightforward Synthesis and Analysis Revisited” 2015.11.11, 16th Tetrahedron Symposium Asia Edition, Shanghai, China.

3) Li, R, Muraoka, T. and Kinbara, K., “Chiroptical Study on Topological Effect of Self-Assembling Amphiphiles” 2016.4.22, Molecular Chirality Asia 2016, Osaka, Japan.

4) (招待講演) Muraoka, T., Kawasaki, S. and Kinbara, K., “Development of Stimuli-Responsive Multi-Block Amphiphiles” 2015.6.26, 32nd International Conference of Photopolymer Science and Technology (ICPST-32), Chiba, Japan.

5) (招待講演) Muraoka, T., “Bioinspired Multi-Block Molecules” 2016.6.24-25, JSPS Japan-Taiwan Joint Seminar on Energy and Environment, Gaoxiong, Taiwan.

6) (招待講演) Muraoka, T. and Kinbara, K., “Structured PEGs for Bio-related Functions” 2016.7.7, 甲南大学 FIBER シンポジウム, 神戸, 日本.

7) (招待講演) Muraoka, T., “Bioinspired Multi-Block Amphiphiles for Functionalization of Membrane and Crystal” 2016.10.5, 14th International Congress of Young Chemists (YoungChem 2016), Czestochowa, Poland.

8) (招待講演) 村岡貴博, “自己組織化マルチブロック分子の動的機能” 2016.5.20, 高分子学会 超分子研究会, 東京, 日本.

9) (招待講演) 村岡貴博, “タンパク質操作に向けた有機化学的アプローチ” 2017.3.4, 最先端光計測とライフサイエンスの未来 -Bio. Phys. Chem.三重点の探索, 仙台, 日本.

10) 大山達也、建石寿枝、田中成典、村岡貴博、金原数、杉本直己 “テトラエチレングリコール修飾による DNA 四重鎖の安定化機構の解明” 2016.9.13-15, 第 10 回分子科学討論会, 神戸, 日本.

11) 建石寿枝、大山達也、村岡貴博、Peter Podbevsek、田中成典、金原数、Janez Plavec、杉本直己 “テトラエチレングリコール修飾塩基をもつ四重鎖構造を用いた逆転写反応制御”

2016.11.15-17, 日本核酸医薬学会第2回年会, 東京, 日本.

12) 建石寿枝、大山達也、村岡貴博、Peter Podbevsek, Adam M. Wawro, 田中成典、金原数、Janez Plavec, 杉本直己 “分子クラウド環境における相互作用を活用した新規の逆転写反応阻害法の開発”

2017.7.12-14, 日本核酸医薬学会第3回年会, 札幌, 日本.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計5件)

名称: ヘテロ型単分散ポリエチレングリコール、ヘテロ型単分散ポリエチレングリコール製造用中間体及びそれらの製造方法、並びに、ヘテロ型単分散ポリエチレングリコール結合体

発明者: 金原数、村岡貴博、マリシンアダム、外4名

権利者: 同左

種類: 特許

番号: 特願 2015-131744

出願年月日: 2015年9月10日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<https://www.muraoka-lab.com>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村岡 貴博 (Muraoka Takahiro)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号: 70509132

### (2) 研究分担者

無し ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
無し ( )

研究者番号:

(4) 研究協力者  
無し ( )