

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26810113

研究課題名(和文) アミロースハイブリッドライブラリーの構築による次世代人工シャペロンの創製

研究課題名(英文) Construction of amylose hybrid polymer library for next-generation chaperone system.

研究代表者

西村 智貴 (Nishimura, Tomoki)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：60648070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：多分岐PEGを基本骨格とした両親媒性アミロースハイブリッドポリマーのライブラリを銅触媒1,3双極子環化付加反応を用いて作成した。得られたライブラリを用いて加熱変性した炭酸脱水素酵素のシャペロン活性について評価し、スクリーニングにより構造の最適化を行なった。合わせて、光応答性システムの構築を行ない、タンパク質パターンニング材料としての有用性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：We prepared a library of amphiphilic amylose-based star copolymers using a copper catalyzed click reaction. We then evaluated chaperon function of a series of these molecules for heat denatured carbonic anhydrate and optimized chemical structure for chaperon functioning polymer. We also synthesized a novel light-sensitive nanogel using cholesterol modified with an ortho-nitrobenzyl unit on the hydroxyl group of pullulan. The use of light-sensitive components makes it possible to create patterned nanogel films that can immobilize proteins. The preparation of patterned materials is important for the construction of micro- or nanodevices such as MEMS and biomolecular chips.

研究分野：生体高分子

キーワード：アミロース 酵素重合 シャペロン

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質がその高度な機能を発現するには、正しい立体構造を取る必要が有る。熱変性や合成途中のタンパク質は、疎水性アミノ酸が露出し疎水性相互作用によって分子間で凝集を引き起こす。細胞内では、この凝集体を分子シャペロンと呼ばれるタンパク質群が適切に折り畳み、機能の発現を介助している。

近年の遺伝子工学の進展により、細胞内合成装置を利用して様々な生理活性タンパク質を自在に設計し大量に合成できる時代となった。しかし、細胞内での目的タンパク質の発現において、過剰発現に伴いタンパク質の多くは正しく折り畳まれずに凝集してしまい、その再生が大きな課題となっている。また、得られたタンパク質の運搬・貯蔵の過程での凝集が、医薬品としての製品化を妨げる事もある。従って、タンパク質の凝集を防ぐ人工分子を創成できれば、タンパク質科学や産業の進展に貢献できる。

これまでに様々な人工シャペロンが開発されてきたが、目的のタンパク質と人工シャペロン間の相互作用が強すぎるためにタンパク質の活性を下げたり、弱すぎるために凝集を抑制できないなどの問題があった。この様な背景からより優れた人工シャペロン分子の開発が強く望まれている。しかし、どのような分子が優れたシャペロン活性を持つのか分からない、つまり"シャペロン活性を有する分子の設計指針がない"ために開発が進んでいないのが現状であった。

### 2. 研究の目的

本研究はシャペロンシステム開発における問題点の解決のため分子構造を変化させた化合物ライブラリの構築とタンパク質のフォールディングに最適な分子の特性の解明を完成させた。また、次世代のシャペロンシステムとして包接化合物の添加を不要とした、光応答性シャペロンシステムの構築も合わせて行った。

### 3. 研究の方法

#### A ライブラリの構築とフォールディング剤として最適な分子特性の解明

##### A-1 アミロースハイブリッドライブラリの構築

1、4、8本鎖のPEGを基本骨格として導入する疎水基(アルキル鎖、コレステリル基)及びその修飾率を変化させた。加えてホスホリラーゼを用いた酵素重合反応によるアミロース鎖の親水性の調整も行ない(Fig. 1)、アミロースハイブリッドライブラリを構築した。これらライブラリを用いてウシ由来炭酸脱水素酵素(CAB)の熱変性に対するシャペロン機能の評価を行なった。

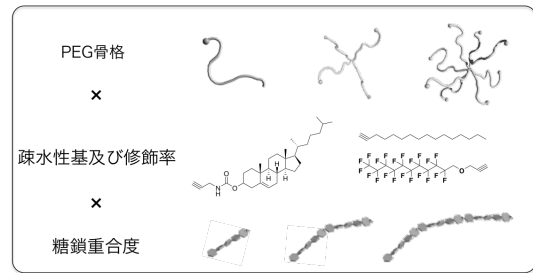


Fig.1 糖鎖ライブラリの組み合わせ

#### A-2 分子の特性とシャペロン活性の相関の解明

上記で合成したライブラリ中の化合物の物理化学的性質(臨界ミセル濃度、疎水領域の極性、疎水場の流動性、会合数)の測定を行った。

#### B 光応答性人工分子シャペロンシステムの構築

従来の人工シャペロンと包接化合物を用いる2段階人工シャペロン系では、タンパク質の取り出しが煩雑となる問題点があった。そこで、本研究では光によって人工シャペロンの機能を失活させ、タンパク質を放出させるシャペロン系の構築を行った。

光解離性保護基であるニトロベンジル基に疎水基を導入し、ポリマー分子へ修飾を行った(Fig. 2)。光照射による疎水基の解離挙動は、NMR及びHPLCによって追跡し、光分解速度・タンパク質放出速度などの測定を行なった。また、光照射による疎水基の解離に伴うタンパク質の放出およびシャペロン活性の評価を試みた。

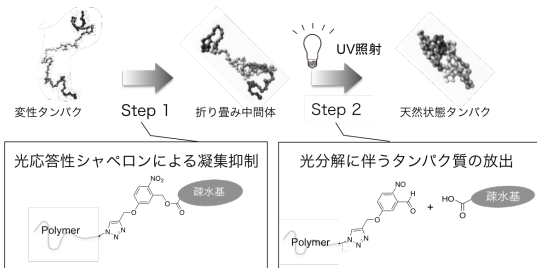


Fig. 2 光応答性シャペロンシステムの概要

### 4. 研究成果

#### A-1 アミロースハイブリッドライブラリの構築

1、4、8本鎖のアジド基修飾PEGを基本骨格として、click反応によりアルキン修飾コレステロールを付加した。コレステリル基の修飾率は全てポリマー当たり1個とした。得られたポリマーを用いて、加熱変させたCarbonic anhydrase(Cab)の活性回復能について評価を行った(Fig. 3)。具体的には、各ポリマー(終濃度  $2 \times 10^{-4} \text{M}$ )を  $0.06 \text{mg/ml}$  のCab水溶液に添加後、 $70^\circ\text{C}$ で10分間加熱し、15分間室温で冷却した。その後、 $124 \text{mM}$ メチルβシクロデキストリンを( $13.3 \mu\text{L}$ , 終濃度  $4 \text{mM}$ )添加し20時間室温で静置後、Cabの活性測定を行なった。Cabの活性評価は、上記サンプル( $400 \mu\text{L}$ )に  $50 \text{mM}$ 酢酸 4-

ニトロフェニル溶液(13.3 $\mu$ L)を添加し攪拌後に UV-Vis 測定 (400nm, 120 秒)を行なった。活性の回復は、非加熱の Cab の初速度と比較して算出を行った。

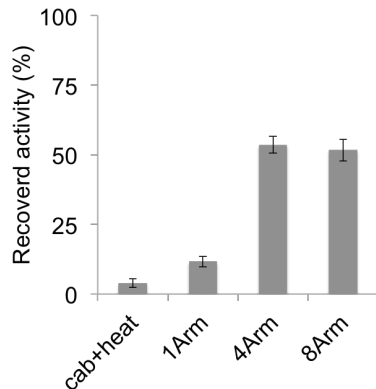


Fig. 3 ポリマー鎖の違いがシャペロン活性に与える影響

その結果、1 本鎖ポリマー存在下で 10%、4 本鎖・8 本鎖ポリマー存在下で約 60%程度まで活性が回復した。ポリマー鎖の増大により活性の回復が見られることから、ある程度の親水性が必要である事がわかる。1 本鎖ポリマーは、4、8 本鎖ポリマーに比べ疎水的であり強くタンパク質中間体を相互作用したために天然状態への巻き戻りを阻害したと考えられる。

上記の実験では、ポリマーの疎水性が高いとシャペロン活性の低下が確認された。そこで、8 本鎖ポリマーでコレステリル基の置換率が、1 個/ポリマーと 2 個/ポリマーを比較して同様の傾向が観察されるか実験を行なった。また、同時にコレステリル基からアルキル鎖(C16)に置換したのもシャペロン活性の評価を行った(Fig. 4)。

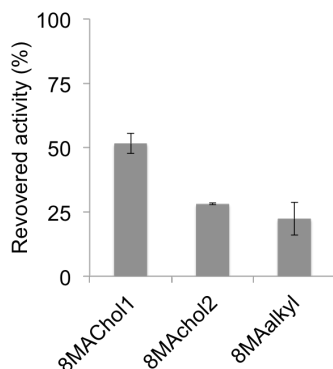


Fig. 4 コレステリル基の修飾量の違い及びアルキル鎖(C16)に置換した場合のシャペロン活性

その結果、コレステリル基の修飾率が 2 個/ポリマーとなったものは、シャペロン活性が 1 個/ポリマーに比べ、約半分程度となった。この結果からも疎水性の高いポリマーは、シャペロン活性の低下を引き起こす事が判明した。また、疎水基をアルキル鎖に置

換したポリマーは、コレステリル基修飾ポリマーに比べ、シャペロン活性が、55%ほど低下した。アルキル鎖ではタンパク質の巻き戻り中間体の疎水部を覆い隠す事ができなかったために、シャペロン活性の回復がみられなかったと考えられる。

次に、糖鎖の重合度の違いがシャペロン活性に与える影響について調べた。コレステリル基置換 8 本鎖 PEG をマクロプライマーとして、phosphorylase を用いてアデノシン 3 リン酸の存在下、グルコース 1 リン酸を基質として酵素重合により糖鎖を伸長させ、糖鎖重合度が、7 および 15 のものを得た。これらのポリマー及び重合前のポリマーを用いてシャペロン活性の評価を行った(Fig. 5)。

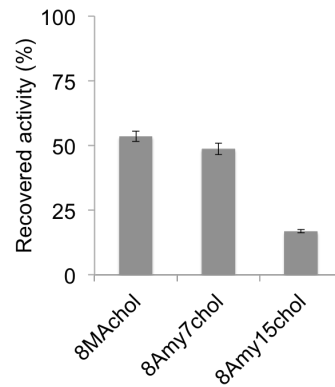


Fig. 5 糖鎖重合度がシャペロン活性に与える影響

その結果、糖鎖重合度の増大につれてシャペロン活性の低下が見られた。糖鎖伸長に伴って親水性が増大し、ポリマーの界面活性が低下したために巻き戻り中間体との相互作用が弱まったためと考えられる。このことを利用すれば、過去に報告しているよう(ref; journal of biotechnology, 2009 140 246)に 1 ステップでのシャペロンシステム系としての応用は可能であると考えられる。

#### A-2 光応答性人工分子シャペロンシステムの構築

人工シャペロンとして、高い活性を示すコレステリルプルランを基本骨格として、コレステリル基とプルランとの間に光応答性グループを導入し、光にตอบสนองし、タンパク質の巻き戻り中間体をリリースするシステムの構築を行なった(Fig. 6)。

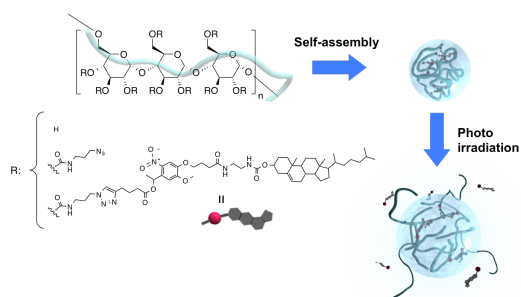


Fig. 6 光応答性コレステリルプルラン

光応答性グループとして *o*-nitrobenzyl 基を用いて、以下のスキームに従いプルランへの修飾を行なった。

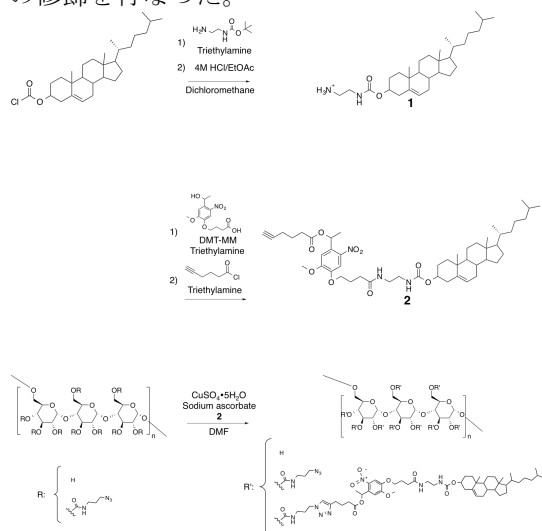


Fig. 7 光応答性コレステリルプルランの合成スキーム

得られた光応答性コレステリルプルランは、水溶液中で自己組織化し、直径  $17.5 \pm 5.9 \text{ nm}$  の球状集合体(ナノゲル)を形成する事を DLS および TEM 観察から確認した。また、SEC-Mals からナノゲルの分子量を算出したところ、 $5.1 \times 10^5 \text{ g/mol}$  であり、約 5 分子の光応答性コレステリルプルランが会合している事がわかった。これらの値は、コレステリルプルランによるナノゲルとほぼ同程度の値であった。

次に、光応答性ナノゲルの光照射による分解挙動を UV-Vis および SEC により評価を行った。 $365 \text{ nm}$  の UV 光 ( $17 \text{ mW/cm}^2$ ) を一定時間照射したところ、 $340 \text{ nm}$  の UV 吸収スペクトルが減少した。また、UV-vis スペクトルの変化は、10 分の光照射でほぼ変化は収束した。一次の指数減衰関数でフィッティングしたところ、速度定数が  $0.22 \pm 0.06 \text{ min}^{-1}$ 、半減期が  $3.2 \text{ min}$  であった。光照射前後のサンプルのサイズを SEC により評価したところ、光照射後のサンプルは、照射前のサンプルに比べより早い溶出時間にピークがシフトする事がわかった。これは、光照射に伴うコレステリル基の解離により、カルボン酸を持つプルランへと変化し、カルボン酸間の水素結合により弱く会合した集合体を形成したも

のと考えられる。

上記の光応答性ナノゲルを用いて、A-1 の項で実施したシャペロン活性の評価を行なった。アッセイの方法は同様に行ない Cab の活性回復の評価を行った。その結果、コレステリル基修飾 8 本鎖 PEG に比べても低い活性を示し、照射時間やポリマー濃度を変化させても、その活性はいずれも低いままであった。光照射により遊離したコレステリル基がタンパク質の巻き戻り中間体と疎水性相互作用により会合し、タンパク質の折り畳みを防いだ為に、活性の向上が見られなかった物と考えられる。

一方で、光応答性ナノゲルは、通常のナノゲルと同様にタンパク質を混合するのみで、ナノゲル中に取り込ませる事ができることを見いだした。この事を利用したタンパク質パターンニング材料の構築を目指した。光応答性ナノゲル水溶液を、スライドガラス上に滴下し、 $40^\circ\text{C}$  で一晩乾燥させナノゲルフィルムを得た。得られたフィルム上に遮光マスクを乗せ、 $365 \text{ nm}$  の UV 光を 50 分間照射した。その後、 $30 \text{ mg/ml}$  の FITC-insulin を滴下し、30 分間静置した。ナノゲルフィルムを超純水で洗浄後に、蛍光顕微鏡で観察を行なった。その結果、マスクで遮光していない部分新において FITC 由来の蛍光シグナルが、観察されており、 $\mu\text{m}$  スケールでのパターンニングが可能である事が判明した(Fig. 8)。

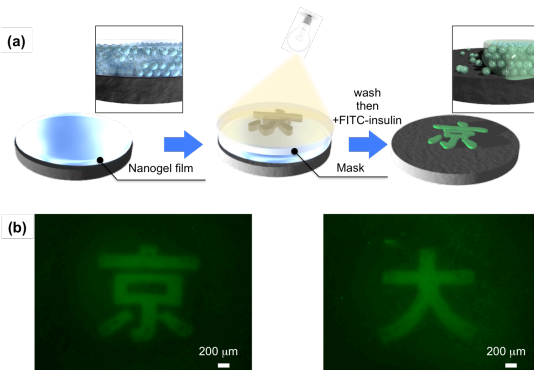


Fig. 8 光応答性ナノゲルフィルムによるタンパク質パターンニング

## 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 4 件)

① Tomoki Nishimura, Masahiro Takara, Sada-atsu Mukai, Shin-ichi Sawada, Yoshihiro Sasaki and Kazunari Akiyoshi, A light sensitive self-assembled nanogel as a tecton for protein patterning materials., *Chemical Communications*, 2016, 52, 1222-1225  
<http://dx.doi.org/10.1039/C5CC08416D>

② Tomoki Nishimura, Sada-atsu Mukai, Shin-ichi Sawada, Yoshihiro Sasaki and

Kazunari Akiyoshi, Glyco Star Polymers as Helical Multivalent Host and Biofunctional Nano-Platform., *ACS Macro Letters*, 2015, 4, 367-371.

<http://dx.doi.org/10.1021/acsmacrolett.5b00049>

③ Tomoki Nishimura, Kaori Umezaki, Sada-atsu Mukai, Shin-ichi Sawada, Yoshihiro Sasaki and Kazunari Akiyoshi, Amylose-based cationic star polymers for siRNA delivery., *Biomed Research International*, 2015

<http://dx.doi.org/10.1155/2015/962941>

④ Minnie Chan, Jacques Lux, Tomoki Nishimura, Kazunari Akiyoshi, and Adah Almutairi, Long-Lasting and Efficient Tumor Imaging Using a High Relaxivity Polysaccharide Nanogel MRI Contrast Agent., *Biomacromolecules*, 2015, 16, 2964-2971

<http://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00867>

[学会発表] (計 19 件)

①西村 智貴、向井 貞篤、澤田 晋一、秋吉 一成、機能性アミロースグライコスターポリマーの設計とバイオ応用、第 63 回高分子学会年会、2014 年 5 月

②シクラ 駿、西村 智貴、澤田 晋一、佐々木 善浩、秋吉 一成、酵素応答性分子集合体の設計と機能、第 63 回高分子学会年会、2014 年 5 月

③犬塚 佑希浩、西村 智貴、澤田 晋一、佐々木 善浩、秋吉 一成、近赤外蛍光分子導入多糖ナノゲル微粒子の設計とバイオイメージング、第 63 回高分子学会年会、2014 年 5 月

④吉村 貴大、西村 智貴、澤田 晋一、佐々木 善浩、秋吉 一成、ビタミン B6 置換ポリマーによる酵素ハイブリッドの設計と機能、第 64 回高分子学会年会、2014 年 5 月

⑤Tomoki Nishimura, Sada-atsu Mukai, Shinichi Sawada, Kazunari Akiyoshi, Amylose based glycol star copolymers: A platform for new glycol-biomaterials, The 41st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2014 年 7 月

⑥高良 昌宏、西村 智貴、向井 貞篤、澤田 晋一、佐々木 善浩、秋吉 一成、光分解性物理架橋ナノゲルの設計と機能、第 63 回高分子討論会、2014 年 9 月

⑦吉村 貴大、西村 智貴、澤田 晋一、

佐々木 善浩、秋吉 一成、バイオクロスリンカーによるタンパク質ナノゲルの調製と機能、第 63 回高分子討論会、2014 年 9 月

⑧吉村 貴大、西村 智貴、澤田 晋一、佐々木 善浩、秋吉 一成、アミロース工学:酵素重合法によるグライコハイブリッドポリマーの構築、第 63 回高分子討論会、2014 年 9 月

⑨シクラ 駿、西村 智貴、澤田 晋一、佐々木 善浩、秋吉 一成、酵素応答性界面活性剤を用いた新規プロテオリポソーム調整法の構築、第 63 回高分子討論会、2014 年 9 月

⑩吉村 貴大、西村 智貴、澤田 晋一、佐々木 善浩、秋吉 一成、ビタミン B6 置換ポリマーによる酵素ハイブリッドの設計と機能、第 64 回高分子学会年会、2015 年 5 月

⑪西村 智貴、向井 貞篤、澤田 晋一、秋吉 一成、タンデム酵素重合法によるハイパーランチ糖鎖ハイブリッドの創製、第 64 回高分子学会年会、2015 年 5 月

⑫Tomoki Nishimura, Sada-atsu Mukai, Shinichi Sawada, Kazunari Akiyoshi, Glyco star polyers for Novel Bio-functional Glyco-biomaterials., 5th Asian Biomaterials Congress, 2015 年 5 月

⑬西村 智貴、向井 貞篤、澤田 晋一、秋吉 一成、糖鎖プライマー酵素重合によるグライコスターポリマーの創製とバイオ応用、第 34 回日本糖質学会、2015 年 7 月

⑭吉村貴大、河崎 陸、西村智貴、澤田晋一、佐々木善浩、秋吉 一成、ビタミン B6 置換ポリマーによる酵素ハイブリッドの設計と機能、第 64 回高分子討論会、2015 年 9 月

⑮Shen Sishi, 西村 智貴、澤田 晋一、佐々木 善浩、秋吉 一成、新規両親媒性グラフト多糖の設計と機能、第 64 回高分子討論会、2015 年 9 月

⑯山田 安己奈、西村 智貴、澤田 晋一、佐々木 善浩、秋吉 一成、酵素重合法による糖鎖-ポリペプチドナノハイブリッドの設計とバイオ機能、第 64 回高分子討論会、2015 年 9 月

⑰Tomoki Nishimura, Sada-atsu Mukai, Shinichi Sawada, Kazunari Akiyoshi, Amylose-based glycol star polymers: A bio-functional platform for glycol-biomaterials, Pacifichem 2016, 2015 年 12 月

⑱西村 智貴、向井 貞篤、澤田 晋一、佐々木 善浩、秋吉 一成、物質透過性グライコカプセルの設計とナノバイオリアクターへの応用、第 25 回インテリジェント材料/システムシンポジウム、2016 年 1 月

⑲西村 智貴、向井 貞篤、澤田 晋一、佐々木 善浩、秋吉 一成、自己組織化グライコカプセルの設計と人工ナノオルガネラへの応用、日本化学会第 96 春季年会、2016 年 3 月

〔図書〕(計 1 件)

① 西村 智貴 秋吉 一成、NTS 出版、糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック 創薬・医療から食品開発まで、第 4 章、第 5 説、ブロックコポリマーの酵素合成、2014

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：両親媒性ブロック共重合体、分子集合体及びその製造方法並びにタンパク質の内包剤

発明者：秋吉 一成、西村 智貴

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：特願 2015-187148

出願年月日：平成 27 年 9 月 24 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

西村 智貴 (NISHIMURA, Tomoki)

京都大学・大学院工学研究科・特定研究員

研究者番号：60648070