

# 研究報告書

## 「タンパク質疾患治療技術を指向した、タンパク質機能を肩代わりする合成分子の開発」

研究タイプ: 通常型

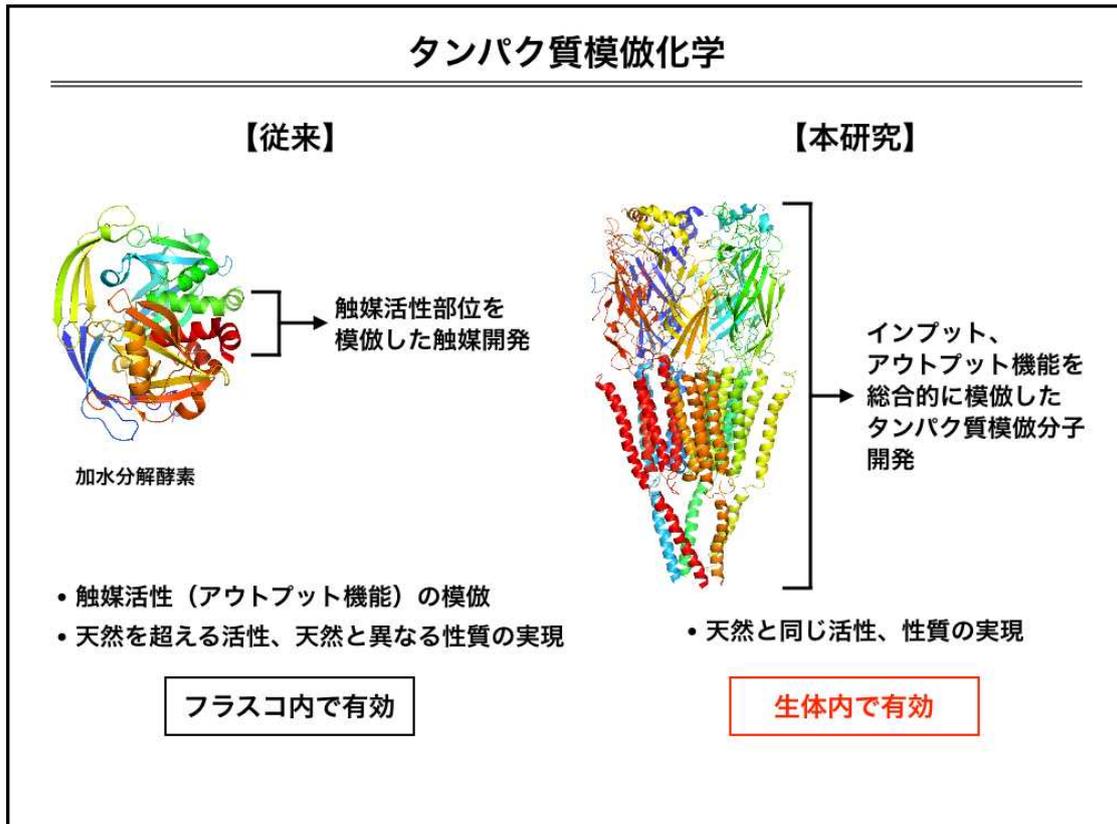
研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 村岡 貴博

### 1. 研究のねらい

タンパク質の機能を、アウトプットだけでなくインプットも含めて、総合的に合成分子で模倣する分子技術の開発を目指す。タンパク質の機能を合成分子で再現することにより、異常を有するタンパク質の代役となる合成分子を得ることができる。この合成分子を、異常タンパク質を発現している疾患細胞・臓器に導入することで、本来そのタンパク質が行うべき機能が、合成分子の働きで回復され、疾患治療につながると考えられる。

本研究では、特に膜タンパク質を模倣ターゲットとする。膜タンパク質の異常により発症するイオンチャネル病など、膜タンパク質の遺伝的異常に由来する疾患に対する一つのアプローチとして、タンパク質機能を肩代わりする合成分子を開発する、というコンセプトの下、疾患を有するタンパク質の代役となり得る合成分子を開発し機能回復を実現する分子技術の確立を目指す。



合成分子でのタンパク質機能模倣は、機能性分子開発の有効な方法論としてこれまでも活発に研究されている。しかしその多くの場合、触媒能などタンパク質の主要機能、主にアウ

トプットのみが模倣される。しかしタンパク質は、リガンド(情報伝達分子)との結合など様々な刺激をインプットとし、アウトプットのスイッチングを可逆的に制御している場合が多い。このタンパク質機能を可逆的に制御するリガンドとの結合能など、アウトプットだけでなくインプットも含めた形で、タンパク質機能を総合的に模倣することで、タンパク質を合成分子で置き換えることが可能となると期待される。この点で本研究が、戦略目標で掲げられた「機能性医療材料などの革新的な治療方法の確立」に貢献できると考える。「タンパク質機能を全合成し、医療分子技術につなげる」というコンセプトに本研究の独創性・挑戦性があり、本研究が世界的に見ても先駆けとなると確信している。本研究は、分子生物学・生物物理学によるタンパク質構造と機能の理解の上に成り立つ。それらの知見と評価技術を化学と融合し、バイオ、医療へアプローチする分子技術を開発することが、本研究の特徴である。

## 2. 研究成果

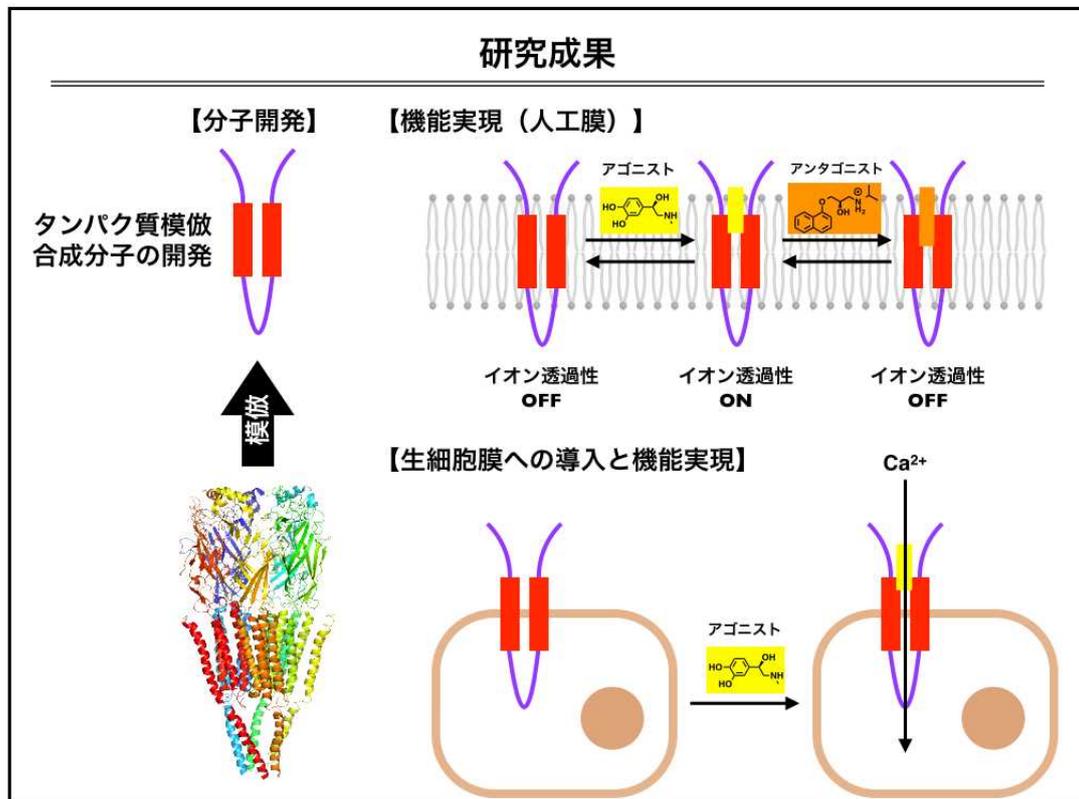
### (1) 概要

模倣する膜タンパク質として、 $\beta$ アドレナリン受容体に着目した。 $\beta$ アドレナリン受容体は、アドレナリンなどの芳香族性アミン類をアゴニストとして認識することでカルシウムイオン透過性を活性化する。一方、プロプラノロールなどをアンタゴニストとして認識し、イオン透過性を非活性化する。このような複数の分子認識機構と、それに伴う可逆的なアウトプットを同様に示す合成分子の開発を目指した。

一般に、タンパク質の機能と分子立体構造は密接な関係がある。そこで、 $\beta$ アドレナリン受容体の機能模倣を目指し、その立体構造を模倣することを目指した。 $\beta$ アドレナリン受容体は、複数回膜貫通型の構造を、脂質二分子膜中で形成している。ここで、膜を貫通しているドメインは疎水的、膜外に位置するドメインは親水的であることに着目し、疎水部と親水部の繰り返しから成るマルチブロック型分子として、剛直で疎水的な芳香族性部と、柔軟で親水的なオリゴエチレングリコールとの繰り返しを基本骨格とする分子を設計した。さらに、芳香族性アミン類をリガンド認識することを狙い、芳香族性部の近傍にリン酸エステル基を導入した。顕微鏡観察や分光測定などの結果、このマルチブロック型分子が脂質二分子膜中に、膜貫通する形で局在することが示された。さらに期待通り、フェネチルアミンなどの芳香族性アミンを、膜局在化認識することも確認された。そこで、このリガンド認識に伴うイオン透過性の変化について詳細に解析した結果、リガンド非存在下ではイオン透過性は見られなかった一方、フェネチルアミンと複合化することでイオン透過性が発現することが明らかとなった。更に興味深いことに、フェネチルアミンと解離させるだけでなく、プロプラノロールと複合化させることに依ってもイオン透過性を非活性化させることができた。このリガンド応答性は、まさに天然の $\beta$ アドレナリン受容体と同様であり、機能の総合的模倣に成功した。また、このマルチブロック型分子は人工脂質二分子膜中だけでなく、生細胞膜中にも挿入され、さらにフェネチルアミンに対するリガンド応答性を示すことも明らかとなり、分子機能だけでなく、働く場も、膜タンパク質を模倣することに成功した。

### (2) 詳細

「タンパク質機能を肩代わりする合成分子を開発する」ことを目指し、分子開発、機能実現、細胞膜への導入、の3段階で目的達成を目指した。



#### テーマ1「リガンド認識能を有する膜貫通分子の開発」

マルチブロック型分子構造によって構築した複数回膜貫通型立体構造を基盤として、芳香族性アミン類を認識する分子の開発を目指した。そのために、芳香族性相互作用と静電相互作用による多点認識を可能にする構造として、膜を貫通する芳香族性部の近傍に、カチオン性のアミノ基と静電相互作用可能な、アニオン性部位を導入した。溶液中、ならびに膜に挿入された状態での詳細な分光解析の結果、膜貫通分子が芳香族性アミン類と相互作用形成することが示され、その相互作用に芳香族性部が関与していることも示唆された。

#### テーマ2「リガンド認識に伴うイオン透過性制御の実現」

芳香族性アミンの認識によって、膜貫通部位である芳香族性部のコンフォメーションが大きく変化することが、円偏光二色性スペクトルなどによる解析から示唆された。膜貫通部位はイオン透過性に直接的に寄与することから、コンフォメーション変化によるイオン透過性スイッチが期待された。平面膜系での伝導度測定などを用いて詳細に調べた結果、膜貫通分子単独ではイオン透過性は見られなかった。ここで、フェネチルアミンと1:1複合体を形成させることにより、イオン透過性が発現することが示された。伝導度測定の波形解析から、イオンチャネルを介したイオン透過であることが示唆された。さらに、 $\beta$ アドレナリン受容体に対するアンタゴニストであるプロプラノロールを添加することによって、イオン透過性が非活性化することも示され、開発した膜貫通分子が、 $\beta$ アドレナリン受容体と同様のリガンド応答性を示すことが確認された。

### テーマ3「細胞膜中での機能発現」

目的とする機能構築に成功したことを受け、応用へ向けて細胞膜への挿入と機能発現を検討した。 $\beta$ アドレナリン受容体を持たない細胞に対し、バッファー中に分散させた膜貫通分子を細胞培養液へ添加したところ、細胞膜への挿入が全反射照明蛍光顕微鏡観察によって確認された。ここに芳香族性アミンを添加したところ、カルシウムイオンの細胞内への流入も確認された。従って、開発した膜貫通分子が、人工膜系だけでなく、生細胞膜中でもリガンドに応答したイオン透過性スイッチを示すことが確認され、対象とした $\beta$ アドレナリン受容体と同様の機能を生体環境下でも発揮することが示された。

以上より、さきがけ研究期間における研究目的を十分に達成することができた。

### 3. 今後の展開

本さきがけ研究で開発した膜貫通分子による細胞活動制御へと展開する。膜貫通分子によって、 $\beta$ アドレナリン受容体の機能を人工的に回復、付与することを目指す。また、他の膜タンパク質の機能模倣分子の開発にも挑戦し、本さきがけ研究で掲げるコンセプトの一般性を確立することを目指す。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

目的としたタンパク質機能を肩代わりする合成分子の開発に関し、その合成と人工膜系での機能発現、さらには細胞膜での機能発現という大きな挑戦を含む研究目的を十分に達成することができた。研究補助員を雇用することで効果的に研究を進めることが出来、研究期間内に成果を得ることが出来た。当初の、1~2年目でターゲット化合物の合成を行い、3年目で人工膜系での評価と化合物の構造最適化、4年目で細胞膜への導入との計画を立てた。本研究は、化合物合成に多くの時間が必要となると予想された。研究補助員の雇用に依る効果もあり、計画より先行して2年目半ばで合成を完了し、2年目内で人工膜系での評価を前倒して完了することができた。最初に合成した化合物群の中から、期待通りの性質を示す合成分子を得ることができ、3年目で類縁体を含めた更なる合成と評価を詳細に行うことで、構造最適化と構造機能相関の深い理解につながった。その過程の中で、アドバイザーコメントを有効に利用した。その詳細な解析と物性評価を基盤として、4年目での細胞膜への導入を開始し、研究期間内でのその実現を達成することができた。

本研究を通して、国際シンポジウムでの発表や国際強化支援を利用した海外の研究者との共同研究を行い、自分の専門を超えた広い分野にまたがる成果を上げることが出来たとともに、国際的なネットワークを構築することができた。これは、さきがけ研究後につながる大変有意義な研究者としての財産である。本研究は、戦略目標で掲げられた「機能性医療材料などの革新的な治療方法の確立」に貢献できるものであり、「タンパク質機能を全合成し、医療分

子技術につなげる」という新技術の確立につながる点で、今後社会・経済に波及するものと期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

医療分子技術につながる、生体同様の機能を、生体環境下で示す合成分子の開発、という非常に挑戦的な目的に対し、村岡研究員は積極的に挑戦し、国際強化支援を含む研究費を効果的、効率的に使用した結果、その目的を十分に達成するに至った。「機能性医療材料などの革新的な治療方法の確立」に貢献する本研究成果は、科学のみならず、社会経済への高い波及効果も期待されるものである。この研究過程において、さきがけ「細胞機能の構造的な理解と制御」領域の田端和仁研究員とも共同研究を行うなど、多分野にまたがる研究展開は、研究者としての幅を広げた。また、本さきがけ研究の成果が認められ、日本化学会進歩賞(平成27年)、科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞(平成28年)を立て続けに受賞し、生体関連化学分野の若手トップランナーの一人として注目されるようになった。さらにこうした実績が認められ、平成29年2月から、東京農工大学准教授へと昇進し、研究者としての飛躍につながった。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Takahiro Muraoka, Takahiro Endo, Kazuhito V. Tabata, Hiroyuki Noji, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto, Rui Li and Kazushi Kinbara. Reversible Ion Transportation Switch by a Ligand-Gated Synthetic Supramolecular Ion Channel. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 15584-15595.
2. Tatsuya Shima, Takahiro Muraoka, Norihisa Hoshino, Tomoyuki Akutagawa, Yuka Kobayashi and Kazushi Kinbara. Thermally Driven Polymorphic Transition Prompting a Naked-Eye-Detectable Bending and Straightening Motion of Single Crystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 7173-7178.
3. Shunichi Kawasaki, Takahiro Muraoka, Haruki Obara, Takerou Ishii, Tsutomu Hamada and Kazushi Kinbara. Thermally Driven Micrometer-Scale Aqueous-Phase Separation of Amphiphilic Oligoethylene Glycol Analogues. *Chem. Asian J.* 2014, 9, 2778-2788. Back Cover に選出
4. Nabanita Sadhukhan, Takahiro Muraoka, Mihoko Ui, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto, and Kazushi Kinbara. Protein Stabilization by an Amphiphilic Short Monodisperse Oligo(ethylene glycol). *Chem. Commun.* 2015, 51, 8457-8460.
5. Shunichi Kawasaki, Takahiro Muraoka, Tsutomu Hamada, Kazuki Shigyou, Fumi Nagatsugi and Kazushi Kinbara. Synthesis and Thermal Responses of Polygonal Poly(ethylene glycol) Analogues. *Chem. Asian J.* 2016, 11, 1028-1035. Very Important Paper (VIP), Front Cover に選出, ChemistryViews にてハイライト

## (2)特許出願

研究期間累積件数:4件

## (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

### 主な学会発表

#### 国際

1. (基調講演)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
2. (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
3. (招待講演)Muraoka, T., “Bioinspired Multi-Block Molecules”, 2016.6.24, JSPS Japan-Taiwan Joint Seminar on Energy and Environment, Gaoxiong, Taiwan
4. (招待講演)Muraoka, T., “Bio-inspired Supramolecular Chemistry in Solution, Membrane and Crystals”, 2016.3.22, Seminar at Otto-Diels-Institut für Organische Chemie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, Germany
5. (招待講演)Muraoka, T., “Short and Monodispersed PEGs as a Stimuli-responsive Unit for Protein Stabilization and Crystalline Polymorphism”, 2016.3.21, Seminar at Organic and Macromolecular Chemistry, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, Germany

### 受賞

1. 2016年8月5日:平成28年度 東京工業大学挑戦的研究賞  
(村岡貴博、マルチブロック型分子を基盤とする動的機能開発)
2. 2016年6月25日:Japan-Taiwan Joint Seminar on Energy and Environment for Young Chemists ポスター賞  
(鍋谷光太、村岡貴博、金原数、Polymorphic Transition of Multi-Block Macrocycles)
3. 2016年4月20日:平成28年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞  
(村岡貴博、生体から着想した刺激応答性機能性分子開発に関する研究)
4. 2015年3月28日:日本化学会進歩賞  
(村岡貴博、生体模倣から着想した刺激応答性機能性分子の開発)

5. 2014年9月12日:第8回バイオ関連化学シンポジウム講演賞  
(村岡貴博、PEGの構造修飾によるタンパク質関連機能の展開)
6. 2014年4月10日:日本化学会第94春季年会 優秀講演賞(学術)  
(村岡貴博、外部刺激応答性膜挿入分子の開発)
7. 2013年12月6日:「籾野奨学基金」第8回多元物質科学研究奨励賞  
(村岡貴博、生体から学び、生体への応用を指向した水中での超分子化学の展開)
8. 2013年10月17日:積水化学「自然に学ぶものづくり」研究助成プログラム奨励賞  
(村岡貴博、タンパク質同様の熱応答性を示す水溶性機能分子の開発とタンパク質安定化への応用)

著作物

村岡貴博, “交互両親媒性化合物の機能開拓”, 自己組織化マテリアルのフロンティア(中西尚志 編集代表).