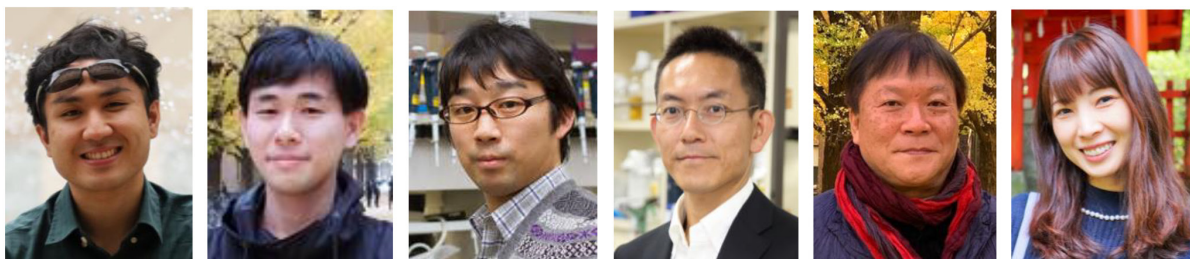


## 文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム 令和3年度秀でた利用成果

# 生体内分子機械シャペロニン GroEL によるナノ構造

<sup>a</sup> 東京大学, <sup>b</sup> 東京工業大学, <sup>c</sup> 理化学研究所 沈 皓<sup>a</sup>, 柏木 大樹<sup>a</sup>, 丹羽 達也<sup>b</sup>, 田口 英樹<sup>b</sup>, 相田 卓三<sup>ac</sup>

東京大学 微細構造解析プラットフォーム 木村 鮎美



(左から) 沈 皓, 柏木 大樹, 丹羽 達也, 田口 英樹, 相田 卓三, 木村 鮎美



## 1. はじめに

超分子重合は、モノマーの弱い可逆的な相互作用（非共有結合）によるもので、モノマーを簡単に高分子化することができ、重合体は分解したり再構築したりすることも容易である。超分子重合の研究分野 [1] は、その速度論的側面への理解が深まるとともに、さまざまな多価相互作用をモノマーの接続に利用することにより、過去 20 年間で著しい進歩を遂げた [2]。この進歩により、超分子重合の概念的拡張が可能になり、環境適合性、刺激応答性、自己修復性、または適応性を持つさまざまな革新的な機能性材料の開発が行われた [2c]。従来の共有結合重合に対し、超分子重合は従来とは異なるモノマーを使用できるという利点がある [3]。2009 年に、我々はアデノシン三リン酸 (ATP) 応答性生体内分子機械であるシャペロニン GroEL の超分子重合を報告した [3b]。

GroEL は、7つの同一のタンパク質サブユニットからなる 7 量体のリングを 2 つ備えた 2 層の中空円筒構造になっている。この中空円筒は、高さ 14.6nm、外径 13.7nm、分子量約 800kDa である [4]。GroEL の生化学的機能は、変性タンパク質を自身の空孔に取り込み、そのリフォールディングを促進することである。この過程で、ATP の作用による GroEL の機械的構造変化が重要な役割を果たすことが知られている [5]。

GroEL の超分子重合に関して、我々は 2009 年に、頂上ドメインにメロシアン (MC) ユニットを持つ GroEL (<sup>MC</sup>GroEL<sup>MC</sup>) がモノマーとして機能し、<sup>MC</sup>GroEL<sup>MC</sup> 間の多価 MC/Mg<sup>2+</sup> 相互作用を介して熱的に安定なナノチューブ

ポリマーを作製することを報告した [3b]。炎症性（腫瘍）部位では ATP が過剰発現により高濃度になる。このナノチューブポリマーは、ATP にさらされると短鎖オリゴマーに解離するため、腫瘍特異的薬物担体として機能する [6] [7]。近年、我々は頂上ドメインに DNA 鎖を持つ GroEL の合成にも成功し、さらにその二元交互超分子共重合を DNA 鎖の相補性を利用して実現した [8]。生体内分子機械

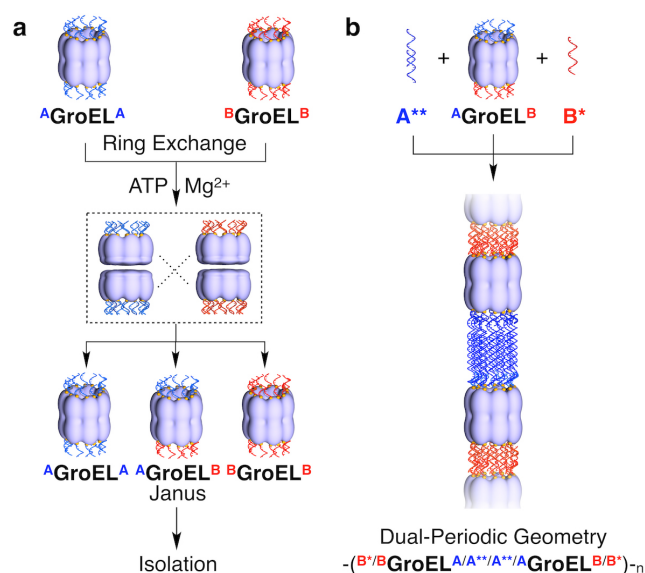


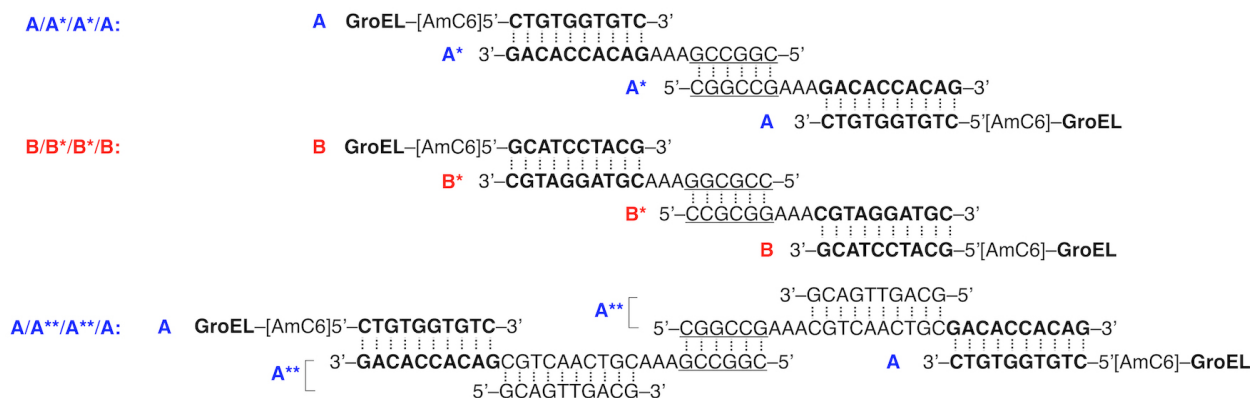
図1 (a) <sup>A</sup>GroEL<sup>A</sup> と <sup>B</sup>GroEL<sup>B</sup> の混合物から、ATP 加水分解による「リング交換」により DNA 付き Janus GroEL [<sup>A</sup>GroEL<sup>B</sup>] を合成する概略図。(b) <sup>A</sup>GroEL<sup>B</sup> が、<sup>A</sup>GroEL<sup>B</sup> の DNA 鎖 <sup>A</sup> および <sup>B</sup> にそれぞれ部分的に相補的で、反対側末端の 6 塩基で自己二量体化する DNA コモノマー <sup>A</sup>\*\* および <sup>B</sup>\* と精密三元超分子共重合する概略図。共重合体は、二重周期性配列構造であると期待される。<sup>A</sup>, <sup>B</sup>, <sup>A</sup>\*\*, および <sup>B</sup>\* の化学構造は表 1 に示す。[American Chemical Society の許諾を得て文献 [18] より転載]

表 1 本研究で採用した相補的 DNA 配列。[American Chemical Society の許諾を得て文献 [18] より転載]

#### DNA Pairs for SEC Separation and Purification



#### DNA Pairs for Ternary Supramolecular Copolymerization



Underlined Regions: Terminal Self-Dimerization, [AmC6]: Amino C6 Linker

を含むこのような配列特異的な超分子共重合体は、ナノバイオテクノロジーの進歩に貢献する可能性が高い [9]。

このような研究の背景には、東京大学微細構造解析プラットフォームの装置利用、技術支援が必要不可欠であった。東京大学微細構造解析プラットフォームは、2009 年 [3b] から相田研究室の様々な GroEL 関連プロジェクト [6] [7][8] に関わり、装置特性を理解した技術支援スタッフが特に透過型電子顕微鏡 (TEM) 計測において、個別かつ柔軟な解決策を見出してきた。本稿では、東京大学微細構造解析プラットフォームが音頭を取り、支援担当者の協力を得ることで、東京大学化学生命工学専攻の相田研究室への解析支援・共同研究を推進して得られた最近の成果について紹介する。



## 2. GroEL を使用した三元超分子共重合

本研究では、GroEL というプラットフォームを使用した精密な三元超分子共重合に取り組んだ。規則的な周期配列を持つ三元超分子共重合体の合成は、競合条件下で直交方向に結合する複数の分子間相互作用を適切に選択する必要があること [10] と、共重合体配列をどのように可視化し同定するかという問題にまだ普遍的な対処法がない [11] ため、依然として大きな課題 [12] となっている。我々は、両端の頂上ドメインにそれぞれ異なる DNA 鎖 A と B を持つ Janus GroEL (<sup>A</sup>GroEL<sup>B</sup>) に注目した。Janus タンパク質ナノ粒子は、その独自の二重表面機能がさまざまな用途に有用であることから、大きな注目を集めている [13]。24 年以上前、Horwich ら [14a] と我々の一

人 [14b] は、2 つの異なる GroEL 間の Mg<sup>2+</sup>/ATP を介するリング交換による Janus GroEL の形成を報告した [14]。つまり、機能化された <sup>A</sup>GroEL<sup>A</sup> と <sup>B</sup>GroEL<sup>B</sup> の混合物がこの反応にさらされると、起源の異なる 2 つのリングを持つ Janus <sup>A</sup>GroEL<sup>B</sup> が生成されるはずである (図 1a)。その独特の形状とナノバイオテクノロジーへの応用価値にもかかわらず、反応混合物から十分な量の Janus <sup>A</sup>GroEL<sup>B</sup> を分離することは本質的に困難であり、未解決の問題であった。試行錯誤の末、我々は、DNA ナノテクノロジーがこの問題の解決に有効ではないかと推論した。図 2 に示す手順に従い、我々は Janus <sup>A</sup>GroEL<sup>B</sup> の単離に成功し、さらに <sup>A</sup>GroEL<sup>B</sup> と 2 つの DNA コモノマー A\*\* および B\* の混合物との三元超分子共重合を試みた (図 1b)。A\*\* と B\* は、それぞれ <sup>A</sup>GroEL<sup>B</sup> の DNA 鎖 A および B に部分的に相補的であり、かつ反対側で自己二量体化するようにプログラムされている。後述するように、我々はまた、高度な配列制御を備えた精密な三元超分子共重合に成功し、二重周期配列を持つ層状集合体を生成した (図 4)。

### 2.1 Janus GroEL (<sup>A</sup>GroEL<sup>B</sup>) の合成と分離

<sup>A</sup>GroEL<sup>B</sup> の合成では、まず GroEL のシステイン付き変異体である CA-K311C/L314C (<sup>Cys</sup>GroEL<sup>Cys</sup>) を使用して、2 つの GroEL-DNA コンジュゲート <sup>A</sup>GroEL<sup>A</sup> と <sup>B</sup>GroEL<sup>B</sup> を合成した (表 1) [8]。反応混合物を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にかけたところ、DNA 鎖 A および B との結合収率は両方ともほぼ 80% であった。次に、<sup>A</sup>GroEL<sup>A</sup> と <sup>B</sup>GroEL<sup>B</sup> の間のリング交換を介して、DNA 付き Janus GroEL である <sup>A</sup>GroEL<sup>B</sup> の生成を試み

た. 具体的には,  $^A\text{GroEL}^A$  と  $^B\text{GroEL}^B$  の混合物 (それぞれ  $1.5\mu\text{M}$ ,  $50\text{mM}$  Tris-HCl,  $100\text{mM}$  KCl,  $20\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ , pH 7.6) を  $5\text{mM}$  ATP (総量 =  $52\mu\text{L}$ ) で処理し, その後  $37^\circ\text{C}$  でインキュベートした. 10 分後, 3 種類の流体力学的体積が互いに類似している GroEL は, サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) において, 単一の溶出ピークを示した (図 2a). 続いて, DNA 鎖 A のみに相補的になるように設計された 30 当量の 100 塩基 DNA 鎖 A' (表 1) を, Tris バッファー中の  $^A\text{GroEL}^A$ ,  $^A\text{GroEL}^B$ , および  $^B\text{GroEL}^B$  (図 2a) の混合物に添加した.  $25^\circ\text{C}$  で 1 時間インキュベートした後, 反応混合物の SEC プロファイルは,  $^{A'/A}\text{GroEL}^{A/A'}$ ,  $^{A'/A}\text{GroEL}^B$ , および  $^B\text{GroEL}^B$  に帰属できる 3 つの特徴的な溶出ピークを示した (図 2b).  $^{A'/A}\text{GroEL}^{A/A'}$  と  $^{A'/A}\text{GroEL}^B$  の混合物を含む画分を収集し,  $25^\circ\text{C}$  で A'' [ $2.8\text{nmol}$ ] と B' [ $1.2\text{nmol}$ ] (表 1) で処理した. A'' (表 1) は  $^{A'/A}\text{GroEL}^{A/A'}$  および  $^{A'/A}\text{GroEL}^B$  からの Toehold DNA 交換により A' を除去する役割を果たす. B' (表 1) は, B に相補的な 60 塩基の DNA 鎖である. 1 時間インキュベートした後, 反応混合物は SEC で  $^A\text{GroEL}^{B/B'}$  と  $^A\text{GroEL}^A$  に帰属できる 2 つの溶出ピークを示した (図 2c). ここで, 図 2b の  $^{A'/A}\text{GroEL}^B$  と図 2c の  $^A\text{GroEL}^{B/B'}$  のピーク溶出量の違いは, DNA 鎖 B' が DNA 鎖 A' よりも 40 塩基短いことを反映している. 次に,  $^A\text{GroEL}^{B/B'}$  を含む画分を収集し,  $25^\circ\text{C}$  で DNA 鎖 B'' (表 1) [ $1.4\text{nmol}$ ] で処理した. B'' は, B' と安定した二重鎖を形成し,  $^A\text{GroEL}^{B/B'}$  から B' を除去するように設計されている (図 2d). 1 時間後, 反応混合物は Janus  $^A\text{GroEL}^B$  の形成により単一の溶出ピークを示した.  $^A\text{GroEL}^B$  は 2.5% の総収率で単離された (図 2d).

## 2.2 三元超分子共重合

その Janus 構造 [13] を利用することにより, 我々は  $^A\text{GroEL}^B$  と 2 つの異なる DNA コモノマーとの精密三元超分子共重合に成功した. 共重合では,  $^A\text{GroEL}^B$  の Tris-HCl 緩衝液 ( $0.1\mu\text{M}$ ,  $50\text{mM}$  Tris-HCl,  $100\text{mM}$  KCl,  $100\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ , pH 7.6, 図 3b) に DNA コモノマー A\* (19 塩基) および B\* (19 塩基) の混合物を添加した. A\* と B\* は, それぞれ  $^A\text{GroEL}^B$  の DNA 鎖 A および B に部分的に相補的であるが, 残りの末端領域で自己二量体化するようにプログラムされている (表 1). 続いて, 混合物を  $45^\circ\text{C}$  から  $20^\circ\text{C}$  まで  $0.03^\circ\text{C}/\text{分}$  の速度で徐々に冷却し, TEM で観察した. 驚くことに, 我々が観察したのは, 以前の研究 [8] で報告された単鎖共重合体 (図 1b) ではなく, 周期的な層状集合体 (図 3e) であった. しかしながら, 図 3e で観察された縦方向の周期性は, 層状集合体が, 目的の周期配列  $-(^B/^B\text{GroEL}^{A/A*/A*/A}\text{GroEL}^{B/B*})-$  を持つ共重合体鎖が横方向に結合したものであることを示唆する (図 3a). A\* または B\* のいずれかを  $^A\text{GroEL}^B$  に加えても短鎖オリゴマー (おそらく二量体) のみが形成されたという追加実験の結果 (図 3c および図 3d) は, それを裏付ける. 高

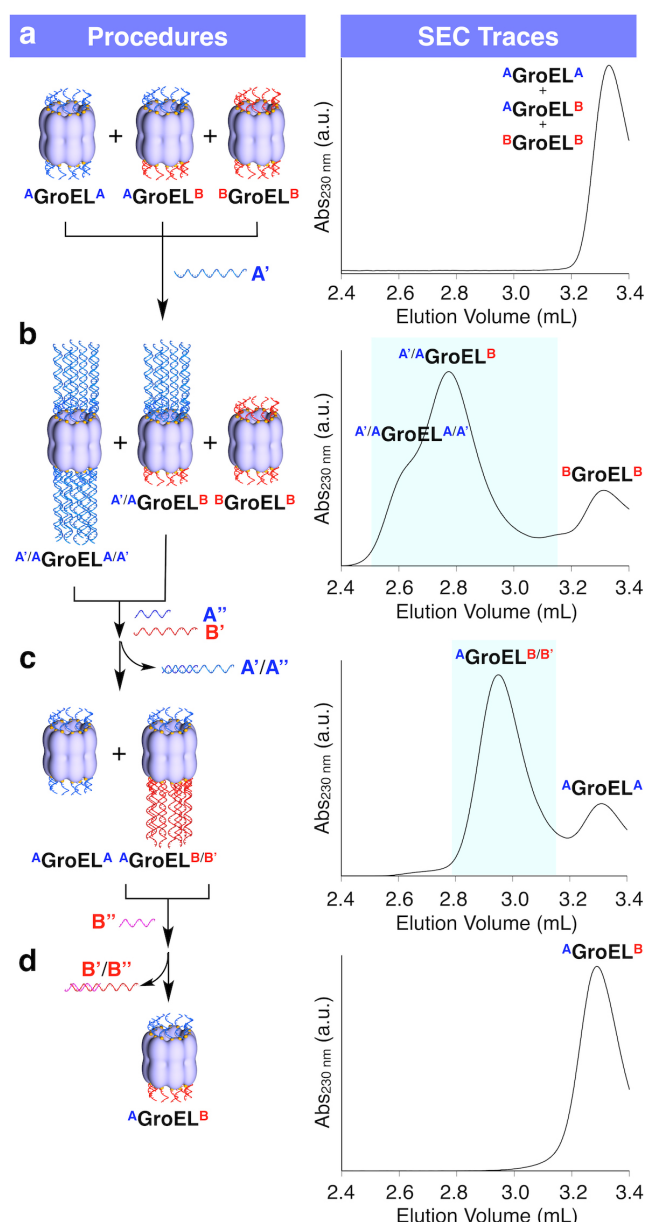


図 2 DNA 付き Janus GroEL  $^A\text{GroEL}^B$  を分離する概略図, および個々のステップの SEC トレース: (a)  $^A\text{GroEL}^A$  と  $^B\text{GroEL}^B$  の混合物に ATP を添加してリング交換を起こし, Janus  $^A\text{GroEL}^B$  を生成させた. (b) 反応混合物を  $^A\text{GroEL}^B$  の DNA 鎖 A に相補的な 100 塩基の DNA 鎖 A' とインキュベーションし, 3 つの異なるハイブリダイゼーション産物  $^{A'/A}\text{GroEL}^{A/A'}$ ,  $^{A'/A}\text{GroEL}^B$ , および  $^B\text{GroEL}^B$  を生成した. (c-d)  $^{A'/A}\text{GroEL}^{A/A'}$  と  $^{A'/A}\text{GroEL}^B$  を含む画分を収集し, 15 塩基の DNA 鎖 A'' と 60 塩基の DNA 鎖 B' の混合物で処理することで,  $^{A'/A}\text{GroEL}^{A/A'}$  と  $^{A'/A}\text{GroEL}^B$  から A' を除去し, 得られた  $^A\text{GroEL}^B$  の B に B' をハイブリダイズさせた. 最後に,  $^A\text{GroEL}^{B/B'}$  を含む画分を収集し, 15 塩基の DNA 鎖 B'' で処理することで  $^A\text{GroEL}^{B/B'}$  から B' を除去した. [American Chemical Society の許諾を得て文献 [18] より転載]

倍率の TEM 像 (図 3e) から判断すると, 明るい層の平均幅は  $15.0 \pm 0.6\text{nm}$  であり, GroEL の両端の頂上ドメイン間の距離 ( $14.6\text{nm}$ ) に近い. 暗い層も均一で, 平均幅は  $4.8 \pm 0.4\text{nm}$  である. ところが,  $^A\text{GroEL}^A$  と A\* の二元超分子共重合でも, 図 3e と同様の周期性を持つ層状集合体を与えた (図 5). したがって, この段階では, 高度な配列制御を持った精密三元超分子共重合が実際に行われたかどうかは明らかではなかった.

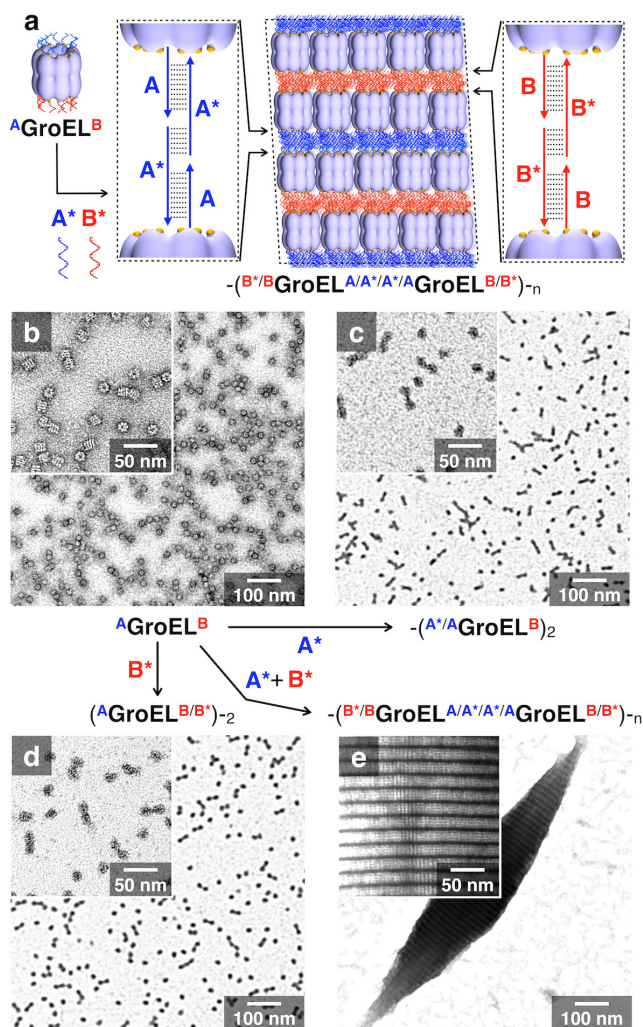


図3 (a)  $^A\text{GroEL}^B$  と DNA コモノマー  $A^*$  および  $B^*$  (表1) の混合物を三元超分子共重合し、周期的な層状集合体を生成する概略図。GroEL ユニットの長さが異なる DNA リンカー  $-A/A^*/A^*/A-$  および  $-B/B^*/B^*/B-$  によって接続されている。(b-e) 酢酸ウラニルで染色された (b)  $^A\text{GroEL}^B$  のみ、(c)  $^A\text{GroEL}^B$  と  $A^*$  の混合物、(d)  $^A\text{GroEL}^B$  と  $B^*$  の混合物、および (e) 共重合混合物の TEM 像。共重合では、 $^A\text{GroEL}^B$  (0.1  $\mu\text{M}$ )、 $A^*$  (10  $\mu\text{M}$ )、および  $B^*$  (10  $\mu\text{M}$ ) の混合物を Tris バッファー (50mM Tris-HCl, 100mM KCl, 100mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.6) 中で 0.03°C/分の速度で 45°C から 20°C まで徐々に冷却した。[American Chemical Society の許諾を得て文献 [18] より転載]

## 2.3 高度な配列制御

以上を踏まえ、我々は  $^A\text{GroEL}^B$  と DNA コモノマー  $A^{**}$  および  $B^*$  との三元超分子共重合を試みた (図 4a)。新たに採用された  $A^{**}$  は、 $A^*$  と同じ役割を果たすよう設計した。ただし、 $A^{**}$  は中央で部分的な二重構造を形成する 2 つの DNA 鎖から構成され、 $A^*$  よりも顕著に長い (表 1)。したがって、 $^A\text{GroEL}^B$ 、 $A^{**}$ 、および  $B^*$  間の三元超分子共重合が理想的に高精度で進行し、同様に層状集合体を与える場合、GroEL 間を繋ぐ  $-A/A^{**}/A^{**}/A-$  は  $-B/B^*/B^*/B-$  よりも顕著に長いので、目的の共重合体配列  $-(B^*/B\text{GroEL}^A/A^{**}/A^{**}/A\text{GroEL}^B/B^*)_n$  から期待される二重周期構造 [15] が観察されるはずである。図 3 と同様の条件下で得られた反応混合物の低倍率 TEM 観察を行ったところ、数マイクロメートルの繊維状束の形成を示した (図 4b)。反応混合物の高

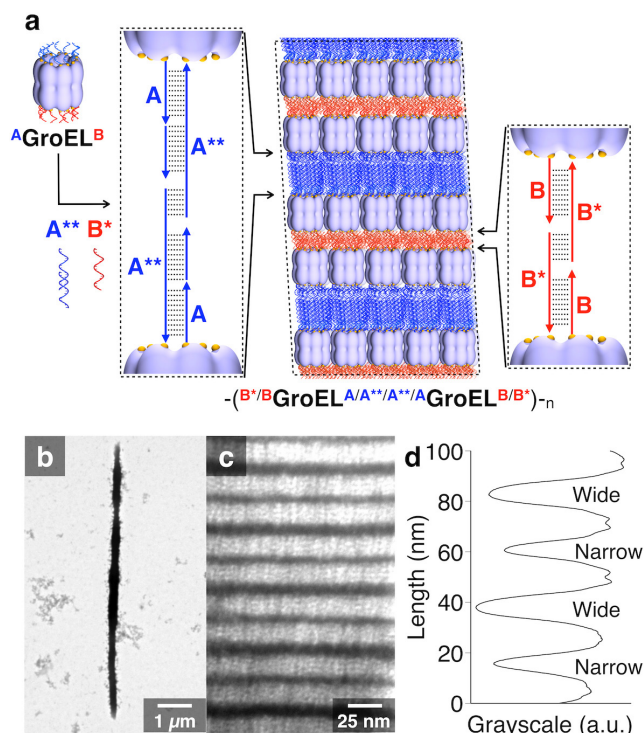


図4 (a)  $^A\text{GroEL}^B$  と DNA コモノマー  $A^{**}$  および  $B^*$  (表1) の混合物を三元超分子共重合し、二重周期性層状集合体を生成する概略図。GroEL ユニットの長さが異なる DNA リンカー  $-A/A^{**}/A^{**}/A-$  および  $-B/B^*/B^*/B-$  によって接続されている。(b-d) 酢酸ウラニルで染色された (b) 低倍率および (c) 高倍率の共重合混合物の TEM 像、および (d) 層状集合体の平均 TEM 強度プロファイル。共重合では、 $^A\text{GroEL}^B$  (0.1  $\mu\text{M}$ )、 $A^{**}$  (10  $\mu\text{M}$ )、および  $B^*$  (10  $\mu\text{M}$ ) の混合物を Tris バッファー (50mM Tris-HCl, 100mM KCl, 100mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.6) 中で 0.03°C/分の速度で 45°C から 20°C まで徐々に冷却した。[American Chemical Society の許諾を得て文献 [18] より転載]

倍率での TEM 観察を行ったところ、 $^A\text{GroEL}^B$  と DNA にそれぞれ由来する明るい層と暗い層が交互に積層する特徴を持った層状集合体を示した (図 4c)。明るい層の平均幅は  $15.4 \pm 0.7\text{nm}$  であり、これは GroEL の 2 つの頂上ドメイン間の距離 (14.6nm) に近い (図 4c および図 4d)。重要なことは、暗い層は  $8.2 \pm 0.7\text{nm}$  と  $4.9 \pm 0.7\text{nm}$  の 2 つの異なる幅で交互に積層していることである。ここで、2 つの暗い層の幅の比率 (1.7) は、2 種類の DNA リンカー  $-A/A^{**}/A^{**}/A-$  および  $-B/B^*/B^*/B-$  の塩基数の比率 (1.6) に近い。これらの観察結果は、三元超分子共重合の生成物が、高度に配列制御された二重周期性の層状集合体であることを明確に示している。ここで Janus  $^A\text{GroEL}^B$  の非対称性が重要な役割を果たしている。

図 3e と図 4c の両方の TEM 像は 7.6nm の横方向の周期性を示したことも注目値する。これは、GroEL の円筒直径の半分に近く、GroEL ユニットの面内六角形パッキングを取ることを示唆している。また、もう 1 つ言及すべきことは、単鎖共重合体ではなく、層状集合体が形成された理由である。二元超分子共重合に関する以前の報告 [8] では、2 つの短い相補的 DNA 鎖 (10 ~ 15 塩基) が GroEL の頂上ドメインに直接結合していた。ところが、本研究の三元超分子共重合体は、2 種類の DNA リンカー (図 3 の  $-A/A^*/A^*/A-$  と  $-B/B^*/B^*/B-$ 、または図 4 の

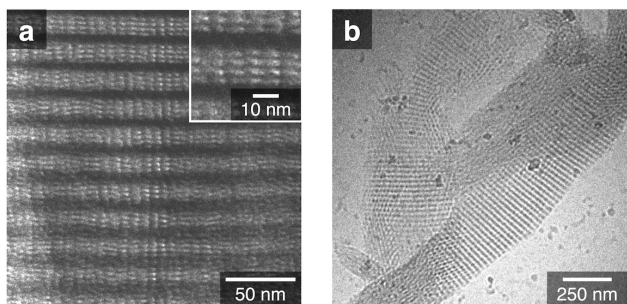


図5 (a)  $^A\text{GroEL}^A$  と DNA コモノマー  $A^*$  の共重合混合物  $-(^A\text{GroEL}^A/A^*)_n$  を酢酸ウラニルで染色した TEM 像。 (b) 染色せず溶液のまま凍らせて観察したクライオ TEM 像。 共重合では、 $^A\text{GroEL}^A$  (0.05  $\mu\text{M}$ ) および  $A^*$  (a では 5  $\mu\text{M}$ , b では 50  $\mu\text{M}$ ) の混合物を Tris バッファー (50mM Tris-HCl, 100mM KCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.6) 中で 0.03°C / 分の速度で 45°C から 20°C まで徐々に冷却した。 [American Chemical Society の許諾を得て文献 [18] より転載]

-A/A\*/A\*/A- と -B/B\*/B\*/B- (表 1) で構成される。これらは、以前の報告 [8] よりも明らかに長いことから、コンフォメーションの自由度が高くなっていると推測できる。したがって、DNA 鎖の非共有結合による  $^A\text{GroEL}^B$  の横方向の結合は、その縦方向の接続と同時に発生する可能性があり、隣接された共重合体鎖が束ねられて層状集合体が得られたと考えられる。

## 2.4 TEM による構造解析

本研究では TEM による構造の可視化・同定が必要不可欠であった。使用した装置を図 6 に示す。TEM で観察する場合、タンパク質は軽元素しか含まれていないため、コントラストがつきにくく、また電子線によって損傷しやすい。そこで重元素による染色剤を使用して、コントラストを高め、電子線によるダメージを防ぐことで容易に観察することができる (図 3b-e, 図 4b-c, 図 5a)。しかしながら、電子顕微鏡の中は高真空であり、試料を乾

燥させて観察するため、乾燥により試料が凝集や変形したり、染色剤と反応したりすることで、観察した構造が本来とは異なっている可能性がある。そこで本研究では、クライオ TEM でも観察を行った (図 5b)。自動浸漬凍結装置 (Leica EM GP) により溶液試料を染色せずにそのまま凍らせて、TEM で観察した結果、乾燥・染色した場合と同様の結果を得ることができ、その構造の確定に至った。



## 3. おわりに

本研究では、GroEL 独自の「リング交換」反応 [14] と DNA ハイブリダイゼーション技術 [16] を利用することで、両端の頂上ドメインにそれぞれ異なる DNA 鎖 A と B をもつ  $^A\text{GroEL}^B$  を合成、単離し、更に DNA を介した精密三元超分子共重合を行った。高度な配列制御により、我々はこの研究で得られた二重周期タンパク質 / DNA 層状集合体の特性評価に成功した [15]。このような秩序だった構造が三元超分子共重合により正確に構築されたことは、3 成分が厳密に組み立てプログラムに従う必要があるため、注目に値する。GroEL がゲストを内包し ATP に応答して放出する生体内分子機械であることも考慮すれば、Janus GroEL はナノバイオテクノロジーのツールとしてその大きな有用性を見出すと考えられる [6][7][17]。本研究の詳細については、文献 [18] も参照されたい。



## 謝辞

本研究の一部は、ナノテクノロジープラットフォーム事業 (東京大学微細構造解析プラットフォーム) の支援

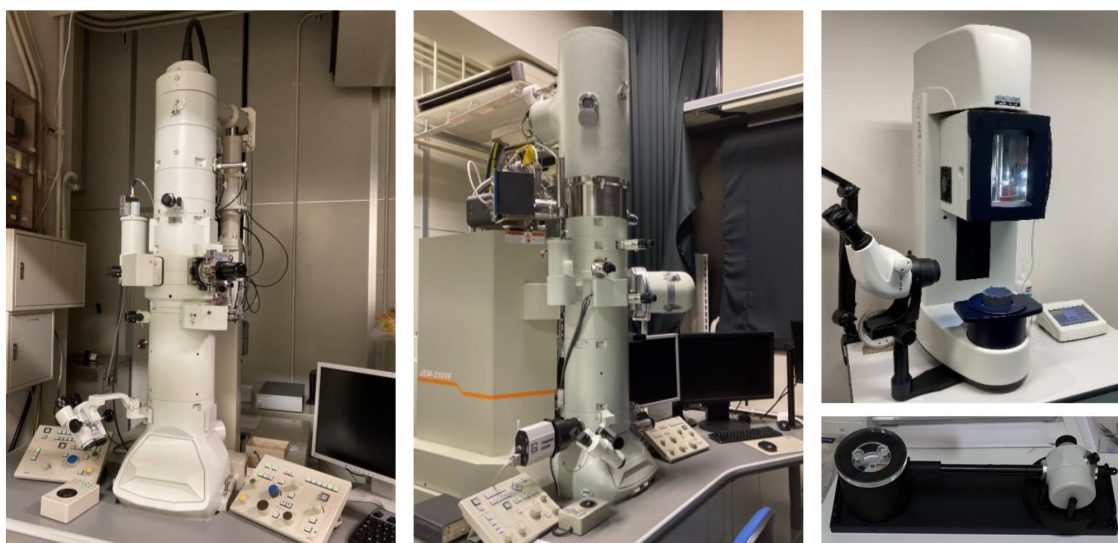


図6 本研究で使用された透過型電子顕微鏡及び試料作製装置。左から、有機材料ハイコントラスト透過型電子顕微鏡 (JEM-1400)、クライオ透過型分析電子顕微鏡 (JEM-2100F)、自動浸漬凍結装置 (Leica EM GP) およびクライオトランスファーホルダー (Gatan Model 914)。

を受けて実施されました。この紙面をお借りして厚く御礼申し上げます。



## 参考文献

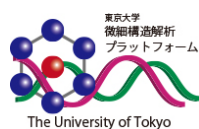
- [1] (a) Aida, T.; Takemura, A.; Fuse, M.; Inoue, S. Synthesis of a Novel Amphiphilic Porphyrin Carrying Water-Soluble Polyether Side Chains of Controlled Chain Length. Formation of a Cofacial Molecular Assembly in Aqueous Media. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, *5*, 391–393. (b) Kato, T.; Fréchet, J. M. J. A New Approach to Mesophase Stabilization Through Hydrogen Bonding Molecular Interactions in Binary Mixtures. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8533–8534. (c) Fouquey, C.; Lehn, J. M.; Levelut, A. M. Molecular Recognition Directed Self-Assembly of Supramolecular Liquid Crystalline Polymers from Complementary Chiral Components. *Adv. Mater.* **1990**, *5*, 254–257. (d) Sijbesma, R. P.; Beijer, F. H.; Brunsveld, L.; Folmer, B. J. B.; Hirschberg, J. H. K. K.; Lange, R. F. M.; Lowe, J. K. L.; Meijer, E. W. Reversible Polymers Formed from Self-Complementary Monomers Using Quad-ruple Hydrogen Bonding. *Science* **1997**, *278*, 1601 – 1604.
- [2] (a) Aida, T.; Meijer, E. W.; Stupp, S. I. Functional Supramolecular Polymers, *Science* **2012**, *335*, 813 – 817. (b) Aida, T.; Meijer, E. W. Supramolecular Polymers – We’ve Come Full Circle. *Isr. J. Chem.* **2020**, *60*, 33–47. (c) Hashim, P. K.; Bergueiro, J.; Meijer, E. W.; Aida, T. Supramolecular Polymerization: A Conceptual Expansion for Innovative Materials. *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *105*, 101250. (d) Wehner, M.; Würthner, F. Supramolecular Polymerization through Kinetic Pathway Control and Living Chain Growth. *Nat. Rev. Chem.* **2020**, *4*, 38 – 53.
- [3] (a) Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. A DNA-Based Method for Rationally Assembling Nanoparticles into Macroscopic Materials. *Nature* **1996**, *382*, 607–609. (b) Biswas, S.; Kinbara, K.; Oya, N.; Ishii, N.; Taguchi, H.; Aida, T. A Tubular Biocontainer: Metal Ion-Induced 1D Assembly of a Molecularly Engineered Chaperonin. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7556–7557. (c) Wang, Q.; Mynar, J. L.; Yoshida, M.; Lee, E.; Lee, M.; Okuro, K.; Kinbara, K.; Aida, T. High-Water-Content Mouldable Hydrogels by Mixing Clay and a Dendritic Molecular Binder. *Nature* **2010**, *463*, 339–343. (d) Liu, M.; Ishida, Y.; Ebina, Y.; Sasaki, T.; Hikima, T.; Takata, M.; Aida, T. An Anisotropic Hydrogel with Electrostatic Repulsion between Cofacially Aligned Nanosheets. *Nature* **2015**, *517*, 68–72.
- [4] (a) Xu, Z.; Horwich, A. L.; Sigler, P. B. The Crystal Structure of the Asymmetric GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub> Chaperonin Complex. *Nature* **1997**, *388*, 741 – 750. (b) Takeshita, A. K.; Arakawa, T.; Taguchi, H.; Shimamura, T. Crystal Structure of a Symmetric Football-Shaped GroEL: GroES<sub>2</sub>-ATP<sub>14</sub> Complex Determined at 3.8 Å Reveals Rearrangement Between Two GroEL Rings. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 3634 – 3641.
- [5] (a) Lorimer, G. H. GroEL Structure: A new Chapter on Assisted Folding. *Structure* **1994**, *2*, 1125 – 1128. (b) Taguchi, H. Chaperonin GroEL Meets the Substrate Protein as a “Load” of the Rings. *J. Biochem.* **2005**, *137*, 543–549. (c) Taguchi, H. Reaction Cycle of Chaperonin GroEL via Symmetric “Football” Intermediate. *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 2912 – 2918.
- [6] Biswas, S.; Kinbara, K.; Niwa, T.; Taguchi, H.; Ishii, N.; Watanabe, S.; Miyata, K.; Kataoka, K.; Aida, T. Biomolecular Robotics for Chemomechanically Driven Guest Delivery Fuelled by Intracellular ATP. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 613–620.
- [7] (a) Ishii, D.; Kinbara, K.; Ishida, Y.; Ishii, N.; Okochi, M.; Yohda, M.; Aida, T. Chaperonin-Mediated Stabilization and ATP-Triggered Release of Semiconductor Nanoparticles. *Nature*, **2003**, *423*, 628–632. (b) Muramatsu, S.; Kinbara, K.; Taguchi, H.; Ishii, N.; Aida, T. Semibiological Molecular Machine with an Implemented “AND” Logic Gate for Regulation of Protein Folding. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3764 – 3769. (c) Sendai, T.; Biswas, S.; Aida, T. Photoreconfigurable Supramolecular Nanotube. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11509 – 11512. (d) Sim, S.; Miyajima, D.; Niwa, T.; Taguchi, H.; Aida, T. Tailoring Micrometer-Long High-Integrity 1D Array of Superparamagnetic Nanoparticles in a Nanotubular Protein Jacket and its Lateral Magnetic Assembling Behavior. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 4658 – 4661. (e) Sim, S.; Niwa, T.; Taguchi, H.; Aida, T. Supramolecular Nanotube of Chaperonin GroEL: Length Control for Cellular Uptake Using Single-ring GroEL Mutant as End-Capper. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 11152 – 11155. (f) Sim, S.; Aida, T. Swallowing a Surgeon: Toward Clinical Nanorobots. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 492 – 497.
- [8] Kashiwagi, D.; Sim, S.; Niwa, T.; Taguchi, H.; Aida, T. Protein Nanotube Selectively Cleavable with DNA: Supramolecular Polymerization of “DNA-Appended Molecular Chaperones”. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*,

- [9] (a) Giljohann, D. A.; Seferos, D. S.; Daniel, W. L.; Massich, M. D.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3280–3294. (b) Gonen, S.; DiMaio, F.; Gonen, T.; Baker, D. Design of Ordered Two-dimensional Arrays Mediated by Noncovalent Protein-Protein Interfaces. *Science* **2015**, *348*, 1365–1368. (c) Bailey, J. B.; Subramanian, R. H.; Churchfield, L. A.; Tezcan, F. A. Metal-Directed Design of Supramolecular Protein Assemblies. *Method. Enzymol.* **2016**, *580*, 223–250. (d) Sato, K.; Hendricks, M. P.; Palmer, L. C.; Stupp, S. I. Peptide Supramolecular Materials for Therapeutics. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 7539 — 7551.
- [10] (a) Hirao, T.; Kudo, H.; Amimoto, T.; Haino, T. Sequence-Controlled Supramolecular Terpolymerization Directed by Specific Molecular Recognitions. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 634. (b) Wang, Q.; Chen, Y.; Liu, Y. Supramolecular Ternary Polymer Mediated by Cucurbituril and Cyclodextrin. *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 4192–4198.
- [11] (a) Albertazzi, L.; van der Zwaag, D.; Leenders, C. M. A.; Fitzner, R.; van der Hofstad, R. W.; Meijer, E. W. Probing Exchange Pathways in One-Dimensional Aggregates with Super-Resolution Microscopy. *Science* **2014**, *344*, 491–495. (b) da Silva, R. M. P.; van der Zwaag, D.; Albertazzi, L.; Lee, S. S.; Meijer, E. W.; Stupp, S. I. Super-Resolution Microscopy Reveals Structural Diversity in Molecular Exchange among Peptide Amphiphile Nanofibres. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11561.
- [12] Adelizzi, B.; Zee, N. J. V.; de Windt, L. N. J.; Palmans, A. R. A.; Meijer, E. W. Future of Supramolecular Co-polymers Unveiled by Reflecting on Covalent Copolymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 6110–6121.
- [13] (a) Hayes, O. G.; McMillan, J. R.; Lee, B.; Mirkin, C. A. DNA-Encoded Protein Janus Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 9269 — 9274. (b) Kang, S.; Suci, P. A.; Broomell, C. C.; Iwahori, K.; Kobayashi, M.; Yama-shita, I.; Young, M.; Douglas, T.; Janus-Like Protein Cages. Spatially Controlled Dual-Functional Surface Modifications of Protein Cages. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2360 — 2366.
- [14] (a) Burston, S. G.; Weissman, J. S.; Farr, G. W.; Fenton, W. A.; Horwich, A. L. Release of Both Native and Non-Native Proteins from a Cis-Only GroEL Ternary Complex. *Nature* **1996**, *383*, 96 — 99. (b) Taguchi, H.; Amada, K.; Murai, N.; Yamakoshi, M.; Yoshida, M. ATP-, K<sup>+</sup>-Dependent Heptamer Exchange Reaction Produces Hybrids between GroEL and Chaperonin from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 18155 — 18160. (c) Yan, X.; Shi, Q.; Bracher, A.; Miličić, G.; Singh, A. K.; Hartl, F. U.; Hayer-Hartl, M. GroEL Ring Separation and Exchange in the Chaperonin Reaction. *Cell* **2018**, *172*, 605 — 617.
- [15] (a) Ruokolainen, J.; Mäkinen, R.; Torkkeli, M.; Mäkelä, T.; Serimaa, R.; ten Brinke, G.; Ikkala, O. Switching Supramolecular Polymeric Materials with Multiple Length Scales. *Science* **1998**, *280*, 557 — 560. (b) Ruokolainen, J.; ten Brinke, G.; Ikkala, O. Supramolecular Polymeric Materials with Hierarchical Structure-Within-Structure Morphologies. *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 777 — 780. (c) Masuda, J.; Takano, A.; Nagata, Y.; Noro, A.; Matsushita, Y. Nanophase-Separated Synchronizing Structure with Parallel Double Periodicity from an Undecablock Terpolymer. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *97*, 098301. (d) Estevez, J. O.; Arriaga, J.; Reyes-Ayona, E.; Agarwal, V. Chirped Dual Periodic Structures for Photonic Bloch Oscillations and Zener Tunneling. *Opt. Express* **2015**, *23*, 16500 — 16510. (e) Behera, S.; Joseph, J. Single-Step Optical Realization of Bio-Inspired Dual-Periodic Motheye and Gradient-Index-Array Photonic Structures. *Optics Letters*. **2016**, *41*, 3579 — 3582.
- [16] (a) Lo, P. K.; Karam, P.; Aldaye, F. A.; McLaughlin, C. K.; Hamblin, G. D.; Cosa, G.; Sleiman, H. F. Loading and Selective Release of Cargo in DNA Nanotubes with Longitudinal Variation. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 319–328. (b) Genot, A. J.; Zhang, D. Y.; Bath, J.; Turberfield, A. J. Remote Toehold: A Mechanism for Flexible Control of DNA Hybridization Kinetics. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2177–2182. (c) Zhang, D. Y.; Seelig, G. Dynamic DNA Nanotechnology Using Strand-Displacement Reactions. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 103–113. (d) Seeman, N. C.; Sleiman, H. F. DNA Nanotechnology. *Nat. Rev. Mater.* **2018**, *3*, 17068. (e) Rothemund, P. W. K. Folding DNA to Create Nanoscale Shapes and Patterns. *Nature* **2006**, *440*, 297–302. (f) Edwardson, T. G. W.; Lau, K. L.; Bousmail, D.; Serpell, C. J.; Sleiman, H. F. Transfer of Molecular Recognition Information from DNA Nanostructures to Gold Nanoparticles. *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 162–170. (g) Ke, Y.; Castro, C.; Choi, J. H. Structural DNA Nanotechnology: Artificial Nanostructures for Biomedical Research. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2018**, *20*, 375–401.
- [17] (a) Kinbara, K.; Aida, T. Toward Intelligent Molecular

Machines: Directed Motions of Biological and Artificial Molecules and Assemblies. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1377–1400. (b) Heuvel, M. G. L.; Dekker, C. Motor Proteins at Work for Nanotechnology. *Science* **2007**, *317*, 333 – 336. (c) Goel, A.; Vogel, V. Harnessing Biological Motors to Engineer Systems for Nanoscale Transport and Assembly. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 465 – 475. (d) Agarwal, A.; Hess, H. Biomolecular Motors at the Intersection of Nanotechnology and Polymer Science. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 252 – 277. (e) Jia, Y.; Li, J. Molecular Assembly of Rotary and Linear Motor Proteins. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 1623–1631. (f) Gadiel Saper

and Henry Hess, Synthetic Systems Powered by Biological Molecular Motors. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 288–309. (g) Keya, J. J.; Kabir, A. M. R.; Kakugo, A. Synchronous Operation of Biomolecular Engines. *Biophys. Rev.* **2020**, *12*, 401–409. [18] Kashiwagi, D.; Shen, HK.; Sim, S.; Sano, K.; Ishida, Y.; Kimura, A.; Niwa, T.; Taguchi, H.; Aida, T. Molecularly Engineered “Janus GroEL”: Application to Supramolecular Copolymerization with a Higher Level of Sequence Control. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 13310 – 13315.

(理化学研究所 相田 卓三)



#### 【お問い合わせ】

微細構造解析プラットフォーム  
東京大学

☎ 03-5841-6372

E-mail [nanoplat@sogo.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:nanoplat@sogo.t.u-tokyo.ac.jp)

ホームページ

<https://lcnet.t.u-tokyo.ac.jp/>