

研究課題別評価

1 研究課題名:情報変換・機能制御性を持つ分子刺激応答性ゲル

2 研究者氏名:宮田隆志

研究員:田中敏弘(研究期間 平成 15 年 2 月～平成 15 年 3 月)

研究員:大川香織(研究期間 平成 15 年 4 月～平成 18 年 3 月)

研究員:木口忠広(研究期間 平成 16 年 4 月～平成 17 年 3 月)

3 研究のねらい:

高分子ゲルは、高分子のネットワークと溶媒とからなるソフトマテリアルであり、食品・環境・エネルギー・医療分野などに広く利用されている。さらに、ゲルの体積が pH や温度などによって不連続に変化する体積相転移現象が見出され、外部環境の変化を感知して体積変化するゲルは、刺激応答性ゲルやインテリジェントゲルなどと呼ばれる次世代型ソフトマテリアルとして、センサーやドラッグデリバリーシステム(DDS)などへの応用が試みられるようになった。しかし、そのほとんどが pH や温度などの物理化学的な環境変化に応答するゲルであり、特定の分子を認識して体積変化するゲルはほとんど報告されていない。本研究では、医療分野や環境分野に利用できる刺激応答性ゲルの開発を目指して、シグナル生体分子や環境関連分子などに応答する様々な“分子刺激応答性ゲル”の合成を行った。特に、特異的分子間相互作用によって形成される分子複合体をゲルネットワークに導入することにより、特定分子に応答して体積変化する生体分子架橋ゲルと分子インプリントゲルを合成し、分子刺激応答性ゲルの基本概念とその一般的合成方法の確立を試みた。

4 研究成果:

4-1 生体分子架橋ゲルの合成(図 1(a))

(1) グルコース応答性ゲルの合成

側鎖にグルコースを有するモノマー(GEMA)を重合した水溶性ポリマー(Poly(GEMA))と糖結合タンパク質のレクチンとの複合体をゲル架橋点として利用することにより、グルコース濃度に応答して膨潤する分子刺激応答性ゲルを合成した。特に、重合性官能基を導入したレクチンと GEMA とを複合体形成させた状態で共重合することによって、外部グルコース濃度に応答して可逆的に膨潤収縮するグルコース応答性ゲルを合成した。その機構について詳細に調べた結果、グルコースの有無によって Poly(GEMA)-レクチン複合体が結合・解離して架橋密度が変化するために、Poly(GEMA)-レクチン共重合体ゲルは可逆的グルコース応答性を示すことがわかった。このように Poly(GEMA)-レクチン共重合体ゲルは可逆的グルコース応答性を示し、糖尿病患者に対するインスリン治療用デバイスとしての応用が期待できる。

(2) 抗原応答性ゲルの合成

抗体が抗原を特異的に認識して抗原抗体複合体を形成することに着目し、これをゲル架橋点として導入したゲルの合成を試みてきた。特に、直鎖状高分子と網目状高分子が入り組んだセミ相互侵入高分子網目(semi-IPN)構造を導入した抗原抗体 semi-IPN ゲルを合成し、その構造が抗原応答挙動に及ぼす影響について検討した。semi-IPN 構造を導入した抗原抗体ゲルは抗原濃度に応じて可逆的に膨潤-収縮を繰り返したが、semi-IPN 構造を持た

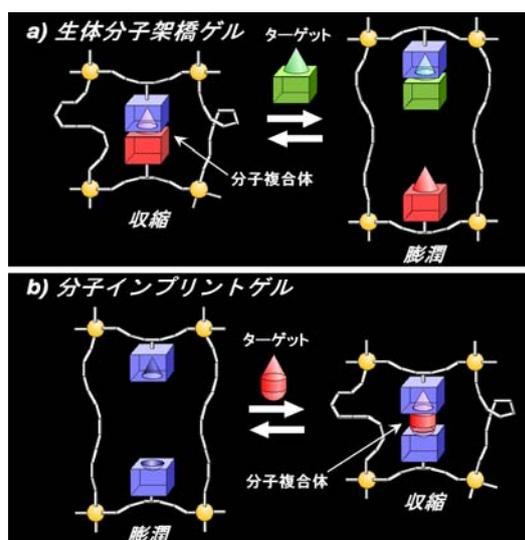


図 1 生体分子架橋ゲルと分子インプリントゲルの分子刺激応答挙動

ない抗原抗体ゲルは可逆性を示さなかった。さらに、これらのゲルを用いてモデル薬物の透過性を調べた結果、抗原抗体 semi-IPN ゲルは抗原濃度に応答して薬物放出を ON-OFF 抑制できることがわかった。この抗原に応答した薬物放出 ON-OFF 制御機能は semi-IPN 構造の導入によって向上し、薬物の分子量にも大きく影響された。このように抗原応答性ゲルは自律応答型 DDS 用材料として非常に有用であることが示された。

(3) DNA 応答性ゲルの合成

近年、医療関連分野において標的 DNA を特異的に識別できる遺伝子診断法の開発が望まれている。そこで、相補的水素結合によって二本鎖形成された DNA をゲル架橋点として導入することによって、新規な DNA 応答性ゲルの合成を試みた。二本鎖 DNA を架橋点として導入したゲルは、標的 DNA 存在下で次第に膨潤する DNA 応答性を示した。このときのゲル架橋密度変化を調べた結果、標的 DNA とリガンド DNA との鎖交換によって架橋密度が減少するために、標的 DNA に応答して膨潤することが明らかとなった。さらに、二本鎖 DNA 架橋ゲルは、標的 DNA と一塩基ミスマッチ DNA に対して異なる膨潤挙動を示し、一塩基多型(SNP)認識応答性を示した。したがって、二本鎖 DNA 架橋ゲルは、テーラーメイド医療を支える遺伝子診断システムを構築するためのインテリジェント材料として有望である。

4-2 分子インプリントゲルの合成(図 1(b))

(1) 内分泌攪乱化学物質応答性ゲルの合成

ビスフェノール A (BPA)は、生体のホルモン作用を攪乱することによって悪影響を及ぼす内分泌攪乱化学物質の疑いが指摘されており、環境におけるその測定法や分離除去技術の開発が望まれている。そこで、BPA の芳香環を認識するシクロデキストリン(CD)をリガンドとして用い、分子インプリント法によって BPA 応答性ゲルの合成を試みた。まず、重合性官能基を導入した CD と鑄型 BPA の二つの芳香環を結合させた状態で親水性モノマーと架橋剤とを加えて重合し、さらに鑄型 BPA を除去することによって BPA インプリントゲルを合成した。この BPA インプリントゲルは BPA を認識して収縮する BPA 応答性を示した。このときのゲル構造変化を調べた結果、その BPA 応答性収縮挙動は、リガンド CD が BPA の二つの芳香環を認識して CD-BPA-CD 複合体からなる架橋点が形成されるためであることが明らかとなった。さらに、この BPA インプリントゲルは高い BPA 吸着特性を有していたことから、排水中などから BPA を選択的に吸着除去する環境改善用材料として利用できることも示唆された。

(2) 肝臓マーカー応答性ゲルの合成

リガンドとしてタンパク質を用いた生体分子インプリント法を提案し、シグナル生体分子を認識して収縮する分子刺激応答性ゲルの合成を試みた。まず、肝細胞癌の診断マーカーとして利用されている糖タンパク質(α-フェトプロテイン(AFP))をターゲット生体分子として選び、その糖鎖部位とペプチド部位を認識するリガンドとしてレクチンと抗体とを用いた生体分子インプリント法によって、新規な肝臓マーカー応答性ゲルの合成に成功した。この AFP インプリントゲルは AFP 濃度に応じて次第に収縮し、明確な AFP 応答性を示した。この AFP 応答性収縮挙動は、ゲルネットワークに結合しているレクチンと抗体とが AFP を認識してレクチン-AFP-抗体からなる複合体を形成し、これが架橋点として作用するためであった。また、AFP インプリントゲルは類似の糖タンパク質存在下で膨潤し、AFP の糖鎖部位とペプチド部位を同時に認識した場合にのみ収縮できる厳密な認識応答が可能であった。このようなシグナル生体分子はその僅かな分子構造変化によって様々な疾病などのシグナル情報を与えることから、AFP インプリントゲルの厳密な認識応答挙動を利用することによって、新しい診断センサーを構築できると期待される。

(3) DNA 応答性ゲルの合成

標的 DNA を特異的に識別できる遺伝子診断材料の開発を目的とし、標的 DNA の配列に対して相補的な DNA をリガンドとして用いた生体分子インプリント法によって、新規な DNA 応答性ゲルの合成を試みた。ここでは、アルツハイマー病に関連した DNA(16mer)を標的 DNA として選択し、その半分ずつを認識する二種類の DNA(8mer)をリガンドとして DNA インプリントゲルを合成した。この DNA インプリントゲルはターゲット DNA を認識して次第に収縮した。また、DNA イ

インプリントゲルの DNA 応答性収縮挙動は、リガンド DNA が標的 DNA と二本鎖形成し、これが架橋点として作用するためであることがわかった。さらに、標的 DNA に対して一塩基が異なるミスマッチ DNA 存在下では DNA インプリントゲルは膨潤し、SNP を検出して全く異なる応答挙動を示した。したがって、DNA インプリントゲルは SNP 検出などに利用できるインテリジェントデバイスとして有用である。

4-3 ゲル体積の光学特性への情報変換システム

分子刺激応答性ゲルを実際にセンサーなどに利用するためには、ゲルの体積変化をより取り扱いきる情報に変換する必要がある。そこで、このような刺激応答性ゲルの体積変化を蛍光強度変化として情報変換するシステムを検討した。まず、蛍光発色団を導入したゲルの相対蛍光強度が膨潤率の $-2/3$ 乗に比例するという理論的な関係式を導くことができた。そこで、実際に蛍光発色団を導入したポリアクリル酸ゲルを合成し、その膨潤率と蛍光強度との関係を検討した。その結果、ゲルの膨潤率と相対蛍光強度との両対数プロットは明確な直線関係を示し、その傾きは -0.65 となって理論式をよく再現した。また、BPA 応答性ゲルに対しても蛍光発色団を導入し、その BPA 応答挙動と蛍光強度との間に相関関係を見出した。したがって、刺激応答性ゲルに蛍光発色団を導入するだけで、ゲル体積変化を蛍光強度変化として情報変換できることがわかった。この方法はあらゆる刺激応答性ゲルをセンサー素子等に応用する際に利用でき、様々な分子刺激応答性ゲルの分子応答挙動を蛍光強度変化に情報変換することが可能である。

5 自己評価:

本研究では、分子複合体を架橋点として利用することによって、多種多様な分子刺激応答性ゲルの合成に成功した。特に、生体分子インプリント法といった新しいゲル設計方法を提案することができ、その成果の一部は *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* に掲載された。このように、本研究によって合成した分子刺激応答性ゲルはいずれも世界に類のないユニークな材料であり、さきがけ研究の申請段階で目標としていた分子刺激応答性ゲルという全く新しいソフトマテリアルの概念とその一般的合成方法を提案できたと考えている。このさきがけ研究を通して合成してきた分子刺激応答性ゲルは、いずれも生体のもつセンサー機能やプロセッサ機能、エフェクター機能を併せ持っており、環境、エネルギー、医療分野などに利用できる 21 世紀型材料としての実用化が期待できる。さらに、このような分子刺激応答性ゲルを実用化するための重要な技術として、ゲル体積変化を蛍光強度変化に情報変換できるシステムも提案することができた。研究期間内には実用化までに至らなかったが、当初の目標である様々な分子刺激応答性ゲルの合成に成功し、さらに研究を通して思いがけない成果も得ることができた。

一方で、分子刺激応答性ゲルを実用化するためにはまだ多くの課題が残っており、今後は応答性などの向上を目指す必要がある。例えば、高分子ゲル特有の遅い応答速度を改良するために、ゲル微粒子やセンサーチップ上での微細ゲルを合成する必要がある。現在、これらの研究にも着手することができ、少しずつ成果が得られ始めている。今後は、分子刺激応答性ゲルの実用化を目指して、具体的に材料設計およびシステム設計を行っていきたい。また、分子間相互作用はナノレベルでの現象であり、分子刺激応答性ゲルはその網目構造を介して生体ナノ現象をマクロレベルへと情報変換・機能制御できるスマートマテリアルであり、これらを用いて医療分野や環境分野、エネルギー分野に貢献できる技術の開発を目指す予定である。

このさきがけ研究はポスドク参加型ということで、教育に比重が大きい私立大学で、かつ教養化学という基礎教育を担当している研究者にとって、非常に有益な制度であった。今回のさきがけ研究では、世界的に類のない多種多様な分子刺激応答性ゲルの合成に成功し、研究者としてのライフワークとなる研究の芽を見つけることができた。このさきがけ研究に採択されていなければ、このように多くの研究成果と研究の芽を見出すことができなかった。このような機会を与えて頂き、広い視野からアドバイスを頂戴した研究総括およびアドバイザーの先生方に心から感謝したい。当初はゲルの合成などに非常に手間取り、なかなか原著論文としてまとめられる成果が出なかったが、後半に入って様々なゲルの合成に成功し始めた。そのため、この

研究期間中には十分に原著論文として発表できなかったが、上記のような数多くの新しい成果を得ることができたので、早急に原著論文として公表したい。

6 研究総括の見解:

分子刺激応答ゲルというユニークな発想のもとに研究を展開しており成果も大変多く出ている。分子複合体を架橋点とするゲルのコンセプトはユニークであり発展が期待されるものである。現時点で、このコンセプトをあらゆる面から十分に検討するのは必要なことであり、また十分に有意義なことである。今後、さらにくわしく検討をすすめるにあたって、応答の感度について知見の蓄積が望ましい。同時に、体積の変化とそれに起因する変化のみでなく他の特性の変化も考慮すべきであろう。また応用面を考えると、相当多くの分子(化学種)が結合して変化するのであれば比較的多量の成分による変化を検討の対象とすることになろう。ごく微量の成分を対象とする場合は、体積変化よりはむしろ特異的(非常に広く考える方が良いが)変化の方が有望かもしれない。いずれにしても非常に面白い分野に発展する可能性があり、マトリックス中の架橋点の配置一つをとっても種々の可能性が考えられ、今後の発展に期待したい。ただし、材料としてはまだ生まれたばかりのもので、今後多方面での研究が必要となろう。

7 主な論文等:

論文(国際 3 件)

1. T. Miyata, A. Jikihara, K. Nakamae, A. S. Hoffman, Preparation of Reversibly Glucose-Responsive Hydrogels by Covalent Immobilization of Lectin in Polymer Networks Having Pendant Glucose, *J. Biomaterials Sci., Polym. Ed.*, **15**, 1085-1098 (2004).
2. K. Nakamae, T. Nishino, K. Kato, T. Miyata, A. S. Hoffman, Synthesis and Characterization of Stimuli-Sensitive Hydrogels Having a Different Length of Ethylene Glycol Chains Carrying Phosphate Groups: Loading and Release of Lysozyme, *J. Biomaterials Sci., Polym. Ed.*, **15**, 1435-1446 (2004).
3. T. Miyata, M. Jige, T. Nakaminami, T. Uragami, Tumor Marker-Responsive Behavior of Gels Prepared by Biomolecular Imprinting, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 1190-1193 (2006).

他 国際 2 件(投稿中)

著書・総説・解説(国内 15 件)

1. 宮田隆志, バイオコンジュゲートゲルのインテリジェント機能, ナノバイオエンジニアリングマテリアル, フロンティア出版, 187-198 (2004).
2. 宮田隆志, 生体分子応答性ゲルの合成, 高分子ゲルの最新動向, シーエムシー出版, 114-128 (2004).
3. 宮田隆志, バイオゲル, 高分子材料・技術総覧, 産業技術サービスセンター, 591-603 (2004).
4. 宮田隆志, 刺激応答性高分子ゲルの設計と応用, *日本ゴム協会誌*, **78**, 135-141 (2005).
5. 宮田隆志, 分子に応答するスマートマテリアル—分子刺激応答性ゲル—, *現代化学*, **415**, 31-37 (2005).

特許(国内 2 件)

1. 宮田隆志, 浦上 忠, 大川香織; 光学特性分子導入刺激応答性ゲルおよびこれを用いた外部刺激測定装置並びに外部刺激の測定方法, 特願 2005-133431, 2005 年 4 月 28 日
2. 宮田隆志, 浦上 忠, 大川香織; 核酸応答性ゲルおよびその製造方法ならびにその利用, 特願 2006-6712, 2006 年 1 月 13 日

受賞

平成 15 年度 日本接着学会進歩賞

招待講演(国際 4 件、国内 4 件)

1. T. Miyata, N. Asami, M. Jige, T. Uragami, Design of Biomolecular Responsive Gels Using Biomolecular Interactions, A Symposium in Honor of the 70th Birthday of Prof. Allan S. Hoffman: Gels, Genes, Grafts & Giants; Transitioning Biomaterials in the 21st Century, Maui, December, 2002.
2. T. Miyata, Smart Gels That Respond to Signal Molecules, 8th International Symposium, Polymers for Advanced Technologies, Budapest, Hungary, September, 2005.
3. T. Miyata, Smart Gels that Respond to Biomolecules, The 8th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, Hawaii, Maui, December, 2005.
4. 宮田隆志, シグナル分子に応答するバイオコンジュゲートゲルの合成, 平成 15 年度繊維学会年次大会 第 19 回膜—その基礎科学と技術—に関するシンポジウム, 京都, 2003 年 6 月.
5. 宮田隆志, 生体分子間相互作用を利用した刺激応答性ゲルの創製, 名古屋大学 Nature COE オープンクラスターシンポジウム 2004, 名古屋, 2004 年 12 月.

研究会・講演会(国内 7 件)

1. 宮田隆志, 分子間相互作用を利用した機能性バイオコンジュゲート材料の創製, 第 7 回バイオデザインの活用による新機能物質の開発研究会, 名古屋, 2003 年 12 月.
2. 宮田隆志, 分子複合体ゲルの分子刺激応答挙動, 関東高分子若手研究会 2004 ミニシンポジウム, 札幌, 2004 年 9 月.
3. 宮田隆志, 特定分子に応答するスマートマテリアルの開発, 第 1 回分離プロセス最新技術講座, 東京, 2004 年 10 月.
4. 宮田隆志, 分子を認識する刺激応答性ゲルの創製, 平成 16 年度北陸地区高分子若手研究会, 福井, 2004 年 11 月.
5. 宮田隆志, 分子認識能をもつスマートゲルの設計, 第 65 回高分子若手研究会(関西), 大阪, 2005 年 11 月.

口頭発表

国際会議 14 件

国内会議 32 件