

研究課題別評価

1 研究課題名：巨視的応答性を有する超分子ポリマーの創製

2 研究者氏名：浜地 格

研究員：王子田 彰夫（研究期間 H. 16. 4～H. 17. 6）

研究員：山口 哲志（研究期間 H. 16. 4～H. 18. 3）

研究員：堤 浩（研究期間 H. 16. 4～H. 17. 9）

3 研究のねらい：

本研究の目的は、自発的組織化によって形成される超分子ポリマーの創製とその機能材料化である。これまでに申請者は、固相合成利用したコンビナトリアルケミストリーを駆使して構築した糖アミノ酸を基本骨格とする小分子化合物ライブラリーから超分子ポリマー型のヒドロゲルを発見した。これらは小分子を基本骨格とするため、ナノメートルレベルの精度で構造・機能を制御出来る可能性がある。実際に超分子ヒドロゲルは、非共有結合的相互作用の集積によって従来のポリマー類似の繊維状構造を形成し、そのいくつかは感温性の体積相転移挙動というマクロ動的特性を有する世界で初めての超分子ポリマーであった。本研究では、固相合成法による超分子形成能を持った小分子化合物ライブラリーの構築とその超分子構造の精密な構造解析を行ない、得られた知見を基にした合理的デザイン指針を確立することによって、ナノメートルレベルの分子設計によってマクロ動的功能を制御できる新機能材料としての超分子ポリマーの探索・創製を目指した。得られる超分子ポリマーは刺激応答性キャリアや生体高分子のソフトな固定化ナノマトリックス（バイオ超分子ゲルチップ）など既存の高分子とは異なる革新的なナノバイオ材料として大きな展開が期待できる。

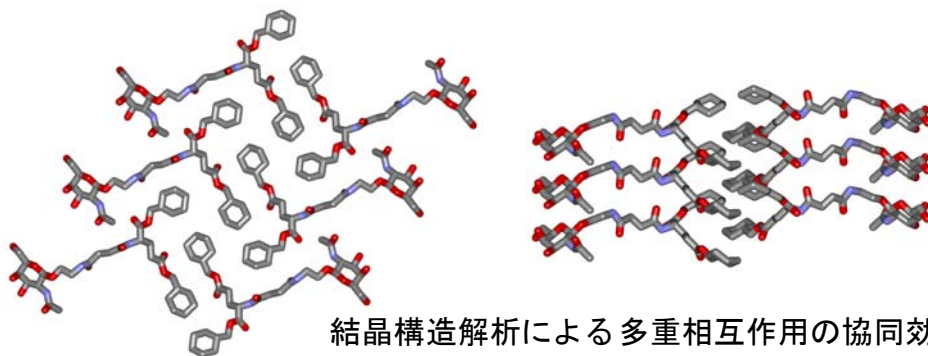
4 研究成果：

4- 1 超分子化合物ライブラリー

はじめに我々は、既に発見していた糖脂質を基本骨格とする低濃度で水をゲル化することのできる小分子ヒドロゲル化剤をリード化合物として、固相合成法および液相合成法の両方を用いて、超分子形成能をもった分子ライブラリーの拡張を行なった。特にモジュールに分けて構造の多様性を確保する戦略をとり、例えば糖親水部、疎水テール部だけでなくそれらをつなぐスペーサー部分に二重結合を導入するなどによって構造多様性を付与した。得られた化合物群の単独での超分子ヒドロゲル形成能力については、既に申請者らが確立したスクリーニング手法を用いて網羅的に評価し、ヒドロゲルを形成する糖脂質誘導体を新たに10種類以上見いだすことに成功した。

4- 2 超分子ヒドロゲルの構造解析

次に、ヒドロゲル形成能をもつ糖脂質誘導体の中で、最も低濃度で透明なヒドロゲルを与える分子1を用いて得られる超分子ヒドロゲルの構造解析を行なった。超分子型ゲルの形成は熱可逆的であり、加熱操作により一旦均一溶液としたゲル化剤水溶液（ゾル）を室温で静置することでゲルとなる。各種顕微鏡観察から、ゲル化剤1は水をゲル化する過程で自己組織的に繊維状の会合体（非共有結合によって形成された高分子類似の繊維と見なせば、超分子ポリマーと呼ぶこともできる）を形成する事が確認された。興味深いことに、環境応答性色素をプローブとした共焦点レーザー顕微鏡観察により、この繊維状会合体は明確な連続的疎水場を有することが明らかとなった。すなわち1のヒドロゲルは、疎水的内部を持つ繊維状会合体が絡み合うことで水の流動性を極度に抑制した結果形成したものである。



結晶構造解析による多重相互作用の協同効果・

図1 ヒドロゲルの精密構造解析

1 は高濃度条件下 ($[1] > 2 \text{ wt\%}$)、しばしば結晶へ相転移して単結晶を形成する。この単結晶の X 線構造解析結果を図 1 に示す。1 は結晶状態で、疎水部位間の疎水的相互作用とシクロヘキシル基間の van der Waals 相互作用、スパーサー部位のアミド基間および糖親水部位の水酸基間の水分子を介した水素結合のそれぞれが分子間で協同的に作用し、3.8nm の膜厚を持つ二分子膜状の分子配列を構築している。原子間力顕微鏡観察からも、最も細いゲル繊維の太さは 4nm 程度と確認されており、単結晶においてみられる二分子膜構造の厚みと良く一致する。これらの実験結果はあくまで結晶・固体状態のものであるが、1 が形成する超分子ゲル組織は二分子層の繊維状会合体を基本構成単位とし、これが集まりながら絡み合うことで水をゲル化すると類推できる。

4- 3 巨視的な刺激応答特性

これまでに我々は、糖脂質類似体からなる超分子ヒドロゲルが、加熱によってゾル化したり収縮したりするという特徴的な熱相転移を示すことを見いだしていた。ここでは上記で得られた構造的な知見を基に、異なる外部刺激に対する巨視的な応答特性を組み込むことが出来るかどうかを検討した。具体的には、二つの異なる戦略を用いて、光応答性超分子ヒドロゲルと pH 応答性の超分子ヒドロゲルの開発に成功した。

4- 3- 1 光応答性ヒドロゲル

スパーサー部分に二重結合を有するヒドロゲル化剤では、トランス体ではゲル化剤分子間の発達した水素結合が維持できるが、シス体に変性化すると水素結合帯が発達できなくなると予想される。実際に、トランス体からなるヒドロゲルを化合物ライブラリーから見だし、紫外光照射によってシス体に変性化させると、90%以上が変性化した時点で、巨視的なゲルは崩壊し、ゾルへと相転移した。長波長の光を臭素存在化で用いるとゾルからゲルへの逆方向の転移も起こることが見いだされ、光誘導ゲルゾル転移は可逆であることが分かった。また光マスクなどによって特定の場所にだけ紫外光を照射すると、部分的にゲル中にゾル部分を書き込むことが可能であった (図 2)。

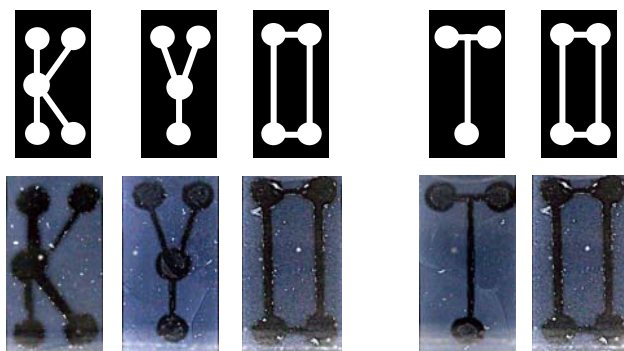


図 2 光ゲルゾルパターンニング

4- 3- 2 pH 応答性ヒドロゲル

上記のように単一分子中に応答ユニットを有機合成的に組み込む手法の他に、刺激応答性を示す分子をヒドロゲル繊維中に混合して組織化させる手法も可能であった。即ち単一成分からなるホモ超分子ポリマーに、他の成分を混合することによってコポリマー超分子ともいふべきヒドロゲルを構築する戦略である (図 3)。例えば pH 変化によって極性が変化するカルボン酸やピリジンなどの酸塩基ユニットを親水部に有する疑ゲル化剤を添加して、pH 刺激に応じて巨視的に収縮するようなマクロな相転移を示す超分子コポリマーヒドロゲルが構築できた。

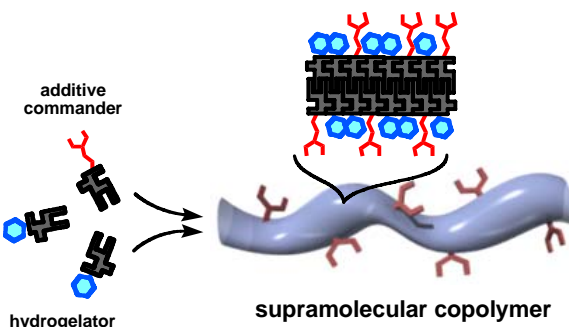


図 3 超分子コポリマー繊維の構築

このようにランダムライブラリーでのスクリーニングと合理的に設計された分子の組み合わせ手法によって、超分子ヒドロゲルへの刺激応答特性の付与がかなり自在に実現できることが明らかになった。

4- 4 セミウエットなナノバイオ材料への展開

0.25 wt% (400 mLの水に対して 1 gのゲル化剤) のヒドロゲルは、ゲル化剤の繊維に対して数百倍体積 (分子数の比では 10^4 倍以上) の水が存在することになる。従ってヒドロゲルの内部には、ゲル繊維の絡み合いによって形成された数十 μm 直径の内水相が存在する。また 1 をはじめとする人工糖脂質型ゲル化剤はいずれも非イオン性型の界面活性剤であり、タンパク質を変性しにくいと期待できる。事実、構造変化に極めて敏感なミオグロビン酸素錯体ですら 1 のヒドロゲル中において水溶液系で観測されるものと同等の安定性を保持していることが確認された。このような特長に着目し、ヒドロゲルを用いた酵素の高効率アッセイ系の構築を目指して、まず超分子ヒドロゲル中での酵素反応について検討し、酵素反応が水溶液系と同様に進行することを確認した。つまりヒドロゲルの内水相では酵素が安定に存在できるだけでなく、酵素反応自体も阻害

されないことが確認された。

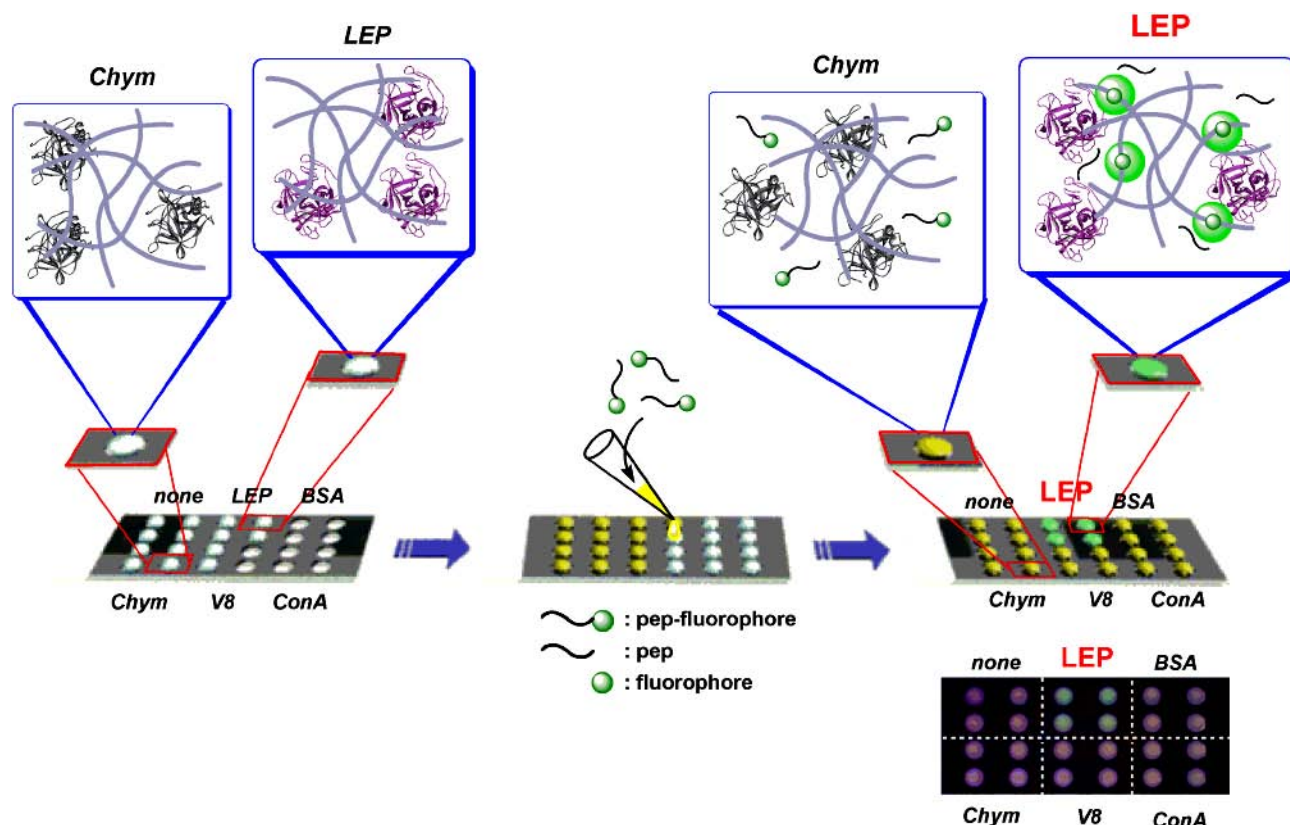


図4 超分子ヒドロゲルをマトリックスとしたセミウエット蛋白質アレイ

以上の知見を基に、超分子ヒドロゲルをダウンサイジングしたタンパク質のマイクロアレイ化に成功した。超分子ゲル形成は熱可逆であることから、タンパク質やペプチドのゲル中への導入は特別な操作を必要としない。このためプロテイン・ペプチド導入ゲルのアレイ化は極めて簡便に行うことができる（図4）。このようなタンパク質・酵素アレイは、ヒドロゲルというセミウエットな環境に非共有結合によって固定化されており、その活性がほぼ完全に保持されている。従って、酵素活性を指標として各種阻害剤のスクリーニングや特定糖鎖の認識検出などに幅広い応用が可能となった。これらの成功例から、これまでの欠点を克服した超分子ヒドロゲルポリマーを基盤とするセミウエットなナノバイオチップという全く新しいアイデアを実証することが出来た。

5 自己評価：

3年間の研究によって自己組織的に形成される超分子ポリマーからなるヒドロゲルの基本的な構造解析および機能特性の幾つかを明らかにすることが出来た。中でも超分子ゲルの結晶構造解析は世界初めての例であり、セミウエットナノバイオ材料の提案も全く新規なものである。また当初の計画時点では考えていなかったヒドロゲル中での分子のユニークな動的挙動を実証できた。今後、この刺激や外部環境に柔軟に応答し、分子設計次第によって巨視的な機能を制御できる可能性を秘めた新ナノバイオ材料の発展をささえる足がかりが出来たと考えている。

6 研究総括の見解：

自己組織化は、ナノ科学の重要課題の一つであり、すでに多くの研究が行われているが、実際に新しい材料を生み出すレベルで行われている研究は少ない。この意味で本課題の研究は、画期的な数々の分子集積手法を生み出し、また指導原理に迫っている。特に、低分子から巨視的巨大構造の形成に至る過程で、プログラムされた自己組織化とプログラムされた自己組織化への道筋が示されたことは、この分野の研究を世界的に先導するものといえる。

7 主な論文等：

< 発表論文 >

Ibuki Yoshimura, Yoshifumi Miyahara, Noriyuki Kasagi, Hiroki Yamane, Akio Ojida, Itaru Hamachi
Molecular Recognition in a Supramolecular Hydrogel to Afford a Semi-wet Sensor Chip
Journal of the American Chemical Society, 126, 12204–12205, 2004

Shigeki Kiyonaka, Kazuki Sada, Ibuki Yoshimura, Seiji Shinkai, Nobuo Kato, Itaru Hamachi
Semi-wet peptide/protein array using supramolecular hydrogel
Nature, Materials, 3, 58–64, 2004

Satoshi Yamaguchi, Ibuki Yoshimura, Takhiro Kohira, Shunichi Tamarui, Itaru Hamachi
Cooperation between Artificial Receptor and Supramolecular Hydrogels for Sensing and Discriminating Phosphate Derivatives
Journal of the American Chemical Society, 127, 11835–11841, 2005

Yoichiro Koshi, Eiji Nakata, Hiroki Yamane, Itaru Hamachi
A Fluorescent Lectin Array Using Supramolecular Hydrogel for Simple Detection and Pattern Profiling for Various Glycoconjugates
Journal of the American Chemical Society, 128, 10413–10422, 2006

< 受賞 >

日本化学会学術賞(2005)

蛋白質機能制御のための化学生物学的新手法の開発

< 招待講演 >

Semi-wet Supramolecular Hydrogel as Nano-biomaterials
I. Hamachi, ICMAT 2005, Singapore (Singapore)

Self-assembled Nanofiber Scaffold for Peptide/Protein Array
I. Hamachi, 4th Multidisciplinary Workshop on Self-assembled Peptide/Protein 2005, Crete (Greece)

Semi-wet Supramolecular Materials for Nano-biotechnology
I. Hamachi, Pacficchem 2005, Hawaii (USA)

蛋白質機能制御のための化学生物学的新手法の開発
浜地 格 日本化学会第86春季年会, (船橋)2006

超分子ヒドロゲルによるバイオ材料創製
第28回日本バイオマテリアル学会シンポジウム、(東京)2006
など合計17件