

論文の内容の要旨

論文題目 水中で機能する高分子レセプターに関する研究

氏名 菱谷 隆行

【緒言】

タンパク質などのナノスケールの分子を水中で認識する人工レセプターは、目的化合物の分離やセンシングなど、工業から診断医療に至るまで、非常に幅広い範囲で重要な技術である。しかしながら、これまでに報告された人工レセプターの多くは、主に有機溶媒中でÅスケールの分子を認識するものであり、水中でナノメートルスケールの分子を認識する天然の抗体・受容体とは大きなギャップがあった。そこで本研究では、これらの人工レセプターによる分子認識で困難な課題、すなわち、①水中での相補的水素結合による分子認識②ナノスケールゲストを効率的に認識する人工レセプターの調製法、について主に検討を行った。

【実験・結果】

I. 相補的水素結合による分子認識

人工レセプターを用いた相補的水素結合による分子認識はこれまで多数報告されてきたが、水中では溶媒である水分子により阻害されるために非常に困難であった。そこで天然の系に倣い、高分子化することにより水素結合部位の近傍に疎水場を提供することで、水中での選択的分子認識を目指した。

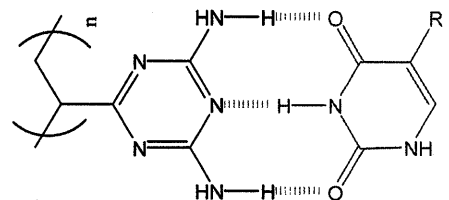


Fig.1. Hydrogen bond formation in water between PVDAT (poly(diaminotriazine)) and thymine derivatives.

①PVDAT(poly(vinyldiaminotriazine))による核酸塩基の分子認識

ターゲットに核酸塩基を選択し、これに対する認識部位として3点でチミン誘導体と水素結合形成が可能なジアミノトリアジン(DAT: Fig.1)を用いた。DATのホモポリマーであるポリジアミノトリアジン(PVDAT)は、ビニルジアミノトリアジンをラジカル重合させることにより合成した。得られた高分子は水に不溶であり、基質吸着活性は基質溶液中に高分子を懸濁させた後、上澄み液の濃度を定量することにより測定した。その結果、PVDATは3点の水素結合部位をもつチミン誘導体を選択的

に認識することが明らかとなった (Table 1)。対応するモノマーでは水中で認識能がないことから、高分子化によってはじめて水中で相補的水素結合が機能するようになったことが分かった。

Table 1. Recognition of nucleic acid bases by PVDAT^{a)}

Guest	n ^{b)}	In Water	In MeOH
Thymine	3	0.30	0.30
Uracil	3	0.26	0.24
Adenine	2	0.13	0.03
Cytosine	2	0.04	0.02

a) The ratio of the bound substrate to the fed one.

b) The number of hydrogen bonding sites toward diaminotriazine residue.

②疎水性モノマーとの共重合化による水素結合の強化

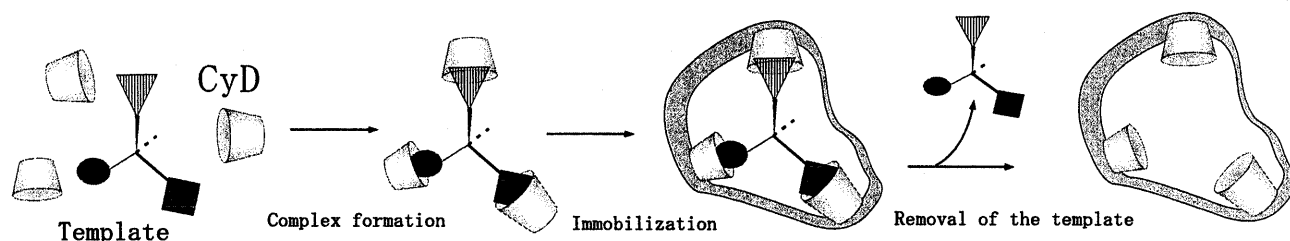
高分子化による水素結合の強化が明らかとなったので、さらに水素結合部位近傍の疎水性を向上させる目的で、DAT と疎水性モノマーとの共重合体を合成した。その結果、得られた共重合体は、PVDAT よりもチミン誘導体に対して強い認識能を示した。一方、アクリルアミドなどの親水性モノマーと共重合させた場合には、親和性の向上はみられなかった。つまり、水素結合部位近傍の疎水環境が相補的水素結合の形成に重要であることが分かった。

③均一水溶液中における水素結合による分子認識

上記の高分子レセプターは水に不溶なため、親水性モノマーとの共重合により水に可溶な高分子を合成した。得られた高分子の DAT 残基とチミンとの相互作用を直接 ¹H-NMR により分析したところ、ポリマーの添加によりチミンのイミノプロトンが低磁場シフトし、均一水溶液中においても相補的水素結合が形成していることが明らかとなった。対応するモノマーのホストでは、水素結合に基づく低磁場シフトがみられなかったことから、高分子化が水系での水素結合の形成に必須であることが明らかとなった。

II. インプリント・シクロデキストリンによるナノスケールゲストの分子認識

生体関連分子などのナノスケールゲストの認識のためには、これまで数多く報告されている Å サイズのゲスト分子に対する人工レセプターとは異なり、疎水部をゲストに相補的に配置する方法が必要となる。そこで、テーラーメイドなレセプター合成法である分子鋳型法に注目した。分子鋳型法は、目的化合物と機能性モノマーを会合させ、これを固定化することによりゲストに対して選択性をもつ高分子を簡便に合成する方法である。この手法をシクロデキストリン (CyD) の架橋高分子の合成に応用し、ナノスケールのゲストを水系で捕捉する人工レセプターの合成を目指した (Scheme 1)。



Scheme 1. Molecular Imprinting of CyDs for the preparation of tailor-made receptors

①インプリント・シクロデキストリン高分子の合成とその分子認識能

コレステロール・インプリント CyD 高分子の合成は、 β -CyD を鋳型分子 (コレステロール) 存在下、乾燥 DMSO 中でトルエンジイソシアナート (TDI) により架橋した後、鋳型を除去することにより得た。比較のため、鋳型分子不在下で同一条件で架橋反応を行い、吸着活性を比較した。得られた

高分子を基質溶液中に懸濁させ、上澄み液の基質濃度を定量することにより吸着率を算出し、これを吸着活性とした。その結果、鋳型存在下で合成したインプリント CyD 高分子は鋳型不在下で合成した高分子よりも高い基質吸着活性を示した(Fig.2)。また、ヘキサメチレンジイソシアナート (HMDI) を架橋剤とした場合にもさらに高い鋳型効果が確認された。すなわち、CyD が複数結合するような疎水部をもつ分子に対して高い認識能を有する人工レセプターの合成に成功した。

インプリント高分子中に生成した基質結合部位の構造を調べるため、様々なサイズのゲスト分子に対する吸着活性を測定した。その結果、鋳型分子であるコレステロール (18Å) に対して最も大きな鋳型効果を示し、8 Å以下のゲストに対しては吸着活性の向上は見られなかったことから、2量化した CyD が基質結合サイトであることが示唆された (Table 2)。

さらに、アミノ酸誘導体を鋳型として用いた場合にも上記と同様に鋳型効果が確認され、本手法が様々なナノスケールのゲスト分子の認識に有効であることが分かった。

②インプリント CyD の生成機構と鋳型の役割

インプリント法により基質認識能が上昇した要因を検討するため、物理化学的手法によりインプリント

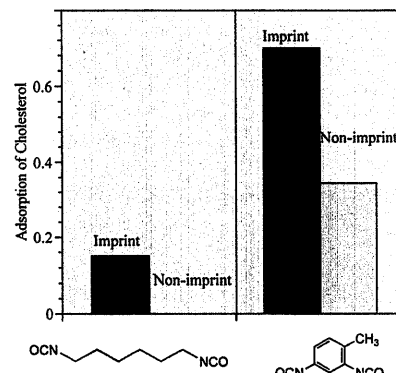









Fig.2. Imprinting effect of the template (cholesterol) on the binding activities of CyD polymers crosslinked with HMDI (left) and TDI (right).

Table 2. Effect of guest size on the binding activities of β -CyD polymers cross-linked with TDI

Substrate	Molecular size Å	Binding activity		I.P.B. (%)
		Imp	Non	
	18	0.70	0.34	110
	11	0.23	0.16	44
	10	0.44	0.34	29
	8	0.68	0.65	5
	7	0.58	0.56	4
	4	0.35	0.32	9
	40	0	0	-

I.P.B. = (Imp-Non)/Non

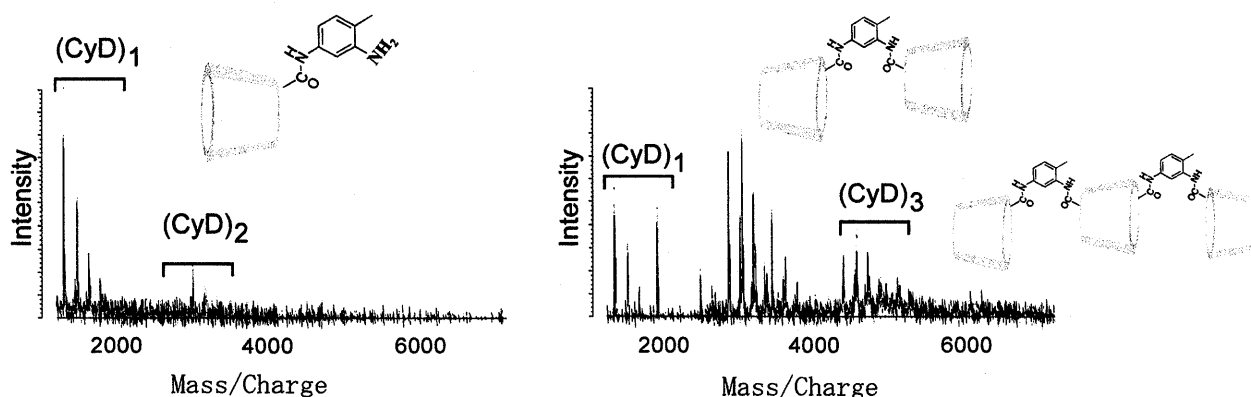


Fig.3. MALDI-TOFMS of (left) non-imprinted and (right) cholesterol-imprinted β -CyD.

CyD の分析を行った。MALDI-TOFMS、及び $^1\text{H-NMR}$ 測定のために、架橋度の低いインプリント CyD を上記と同様に合成し、得られた水溶性の CyD を分析した。その結果、鋳型不在下で合成した CyD はほぼ単量体のみが得られたが、鋳型としてコレステロール存在下で得られた CyD では 2 量体、及び 3 量体が多く生成した (Fig.3)。つまり、鋳型分子が CyD の集合化を促進し、この鋳型分子に対して相補的な構造が生成したと考えられる。一方、鋳型効果を示さなかった分子を鋳型とした場合には、このような集合化の促進はみられなかったことから、鋳型効果と CyD2 量体生成反応との相関が明らかとなった。さらに、 β -CyD の架橋反応を $^1\text{H-NMR}$ スペクトルで追跡した結果、鋳型 (コレステロール) 不在下では 2 級水酸基とはほとんど反応しなかったのに対し、鋳型存在下では 2 級水酸基の反

応が見られたことから、2級水酸基がインプリント効果に寄与していることが示された。

③インプリント CyD 高分子の HPLC 固定相への応用

コレステロール・インプリント高分子の分離機能材料への応用を目指し、HPLC 固定相としてのゲスト保持能を検討した。その結果、インプリント高分子は鑄型不在下で合成した高分子と比較して、鑄型であるコレステロールに対して強い保持能を有することが分かった。また本手法は、ステロイドだけでなく、他の剛直な鑄型を用いた場合にも、鑄型分子に対する選択性を付与することができた。

④水中でのインプリンティングによる選択的分子認識

強固な包摂複合体を形成させた状態で固定化反応を行うために、水中でのインプリンティングを行った。 β -CyD のアクリル酸エステルを合成し、水中で鑄型と複合体形成させた後、これと架橋剤をラジカル重合させることにより水中での架橋反応を行った。鑄型には、複数の疎水性残基をもつペプチド (Phe-Phe) を用いた。これにより得られた CyD 高分子は、D 体でインプリントした場合には D 体を、L 体でインプリントした場合には L 体を強く吸着することが判明し、エナンチオ選択的な分子認識に成功した。この事実は、ゲストに対する立体選択性も本手法により自由に制御可能であることを示している。

III. 分子集合化を利用した CyD 多量体生成の促進

分子鑄型法の問題点である選択性をさらに向上させるために、基質と相補的な構造体が優先的に生成する系の構築を目指した。すなわち、架橋反応に平衡反応を用いることにより、複合化した CyD のみが固定化される系を設計した(Fig.4)。架橋分子としてジアルデヒドを用い、アミノ CyD との水中でのカップリング反応において、複合体形成により2量化反応が促進されるかどうかを調べた。その結果、鑄型の存在下で架橋反応を行った方が、鑄型不在下で反応させた場合よりも CyD 2量体が多く生成した。本手法は、複数の疎水部をもつ鑄型を用いることにより、CyD 多量体を合成できる可能性を示している。

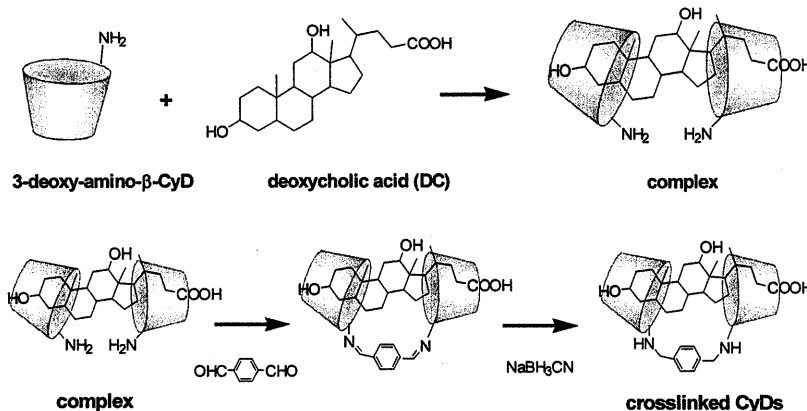


Fig. 4. Accelerated dimerization of CyD by deoxycholic acid used as template.

【結論】

ジアミノトリアジンを高分子化することにより、水中での相補的水素結合による選択的分子認識に成功した。また、分子鑄型法を CyD 架橋高分子の合成に応用することにより、ナノスケールゲストに対して相補的な構造体の合成が可能となった。さらに、種々の物理化学的分析により、インプリンティングが CyD の多量体構造の生成を促進していることが証明された。このようなテーラーメイドな鑄型合成法は集合化ホストの新規合成法として期待される。