

## 論文の内容の要旨

Precise synthesis of water-soluble polymer by photo-induced living radical solid phase polymerization and characterization of bioconjugates using its polymer  
(光リビングラジカル固相重合法による水溶性ポリマーの精密合成とそれを用いたバイオコンジュゲートの特性)

宮本大輔

近年のバイオテクノロジーの進歩に伴い、高い生理活性を有するタンパク質などのバイオ分子が大量かつ高純度で入手できるようになり、これらを効果的に広範囲で応用することに大きな期待がかかっている<sup>1)</sup>。応用例の一つとして、バイオ分子に合成ポリマーを修飾しハイブリッド体を形成することにより、バイオ分子の高機能性を維持したまま安定性および耐久性を高めることがある。このハイブリッドタンパク質のポリマーには(1)分子量分布が狭いこと(2)末端基を含めて構造が明確であること(3)反応性官能基を有すること(4)水溶性であること(5)ハイブリッド体とした際にバイオ分子に対して悪影響を与えないことが要求される。一般にポリエチレンオキサ이드 (PEO) など水溶性ポリマーが利用されてきた。一方で、高度に機能化されたハイブリッド体を創製するためには利用するポリマーのバリエーションを増やすことも重要である。PEG は末端に官能基を担持させる合成法が最近開発されてきているものの分子中に任意の官能基を導入する合成が難しい。そこで、本研究では様々な化学構造を有するビニルモノマーに利用するために、ポリマー鎖の末端反応性基とポリマーを構成するモノマーユニットのシークエンスを同時に制御して合成する方法を新たに開拓し、バイオハイブリッド用ポリマーのバリエーションを増やすことを目的とする。すなわち、本研究では光リビングラジカル重合法と固相重合法を組み合わせて精密に構造が制御されたポリマーを作製した。

バイオ分子を合成ポリマーにより化学修飾し安定性や耐久性などバイオ分子に欠落している性質を付与することができれば、高い生理活性を有しているバイオ分子の応用性が飛躍的に高まり、薬学、医学、工学、農学、バイオ分野全体に大きな福音をもたらすものと思われる。

### 1)光リビングラジカル固相重合法

末端に官能基を有し、精密、容易に合成できるバイオコンジュゲート用水溶性ポリマーの合成を試みた。イニフィータを固相担体表面にアミド結合とエステル結合を介して結合させた。その後、光リビングラジカル重合を行い MPC ポリマーを固相担体上に導入した。さらに、ポリマーと固相担体間のアミド、エステル結合を切断した。それぞれの反応は、固相担体表面の ESCA、FT-IR 測定により、進行していることが確認された。

### 2)MPC ポリマーの修飾によるバイオ分子に与える影響

バイオ分子に修飾するための MPC ポリマーを光リビングラジカル重合法により合成した。このポリマーは末端にカルボキシル基を有しており、分子量 (5k) もイニフィータとモノマーの仕込み濃度と一致し、さらに分子量分布も狭かった。そして、このポリマーをアミド結合を介してパパインに修飾した。その修飾率 (パパインのアミノ基の総数に対する) は 22% と 42% であった。これらのバイオコンジュゲートの 25, 40 °C における安定性を pH 6.1, PBS 中で評価した。いずれのバイオコンジュゲートにおいても 25, 40 °C いずれの条件下でも 28 日間、初日のヘリックス含量を維持し続けた。さらに 40 °C では、28 日間、初日の 75% 以上の酵素活性を維持し続けた。これらの結果より、MPC ポリマーをパパインに修飾することにより、パパインの自己消化とコンフォメーション変化を抑制されることが確認された。25 °C においては、初

期段階においてバイオコンジュゲートの酵素活性は減少するが、その後、徐々に回復し、最終的には初日の酵素活性値まで戻ることが観察された。これはバイオコンジュゲートの溶存状態の変化によるものであると考えられた。

### 3) パパインに修飾する MPC ポリマーの至適修飾率と分子量の検討

末端にカルボキシル基を有し、狭い分子量分布を持つ、様々な分子量の MPC ポリマーを光リビングラジカル重合法により作製した。これらの MPC ポリマーをアミド結合を介してパパインに修飾した。修飾率一定の条件下で、修飾したポリマーの分子量の増加（5k-20k）に伴って、修飾後のバイオコンジュゲートのヘリックス含量、酵素活性共に減少した。さらにこれらのバイオコンジュゲートの 40 °C における保存安定性も修飾したポリマーの分子量の増加に伴って減少した。しかし、修飾率を減少させた条件下で、分子量 40k のポリマーを修飾したとき、修飾後のバイオコンジュゲートのヘリックス含量はほとんど減少しなかった。さらに、40 °C で 28 日間、初日の酵素活性を維持し続けた。

修飾するポリマーの分子量の増加に伴いバイオコンジュゲートの保存安定性は低下するが、修飾率を制御すれば、バイオコンジュゲートの安定性を保つことが示された。

### 4) パパインに修飾するポリマーの分子設計

末端にカルボキシル基を有し、分子量分布の狭い、水溶性、両親媒性のリン脂質ポリマー、poly(MPC-random-BMA)、poly(MPC-block-BMA)（分子量 10k）を光リビングラジカル重合法により作製した。これらのポリマーをアミド結合を介してパパインに修飾し、ポリマー中の BMA ユニット量の違いによる酵素活性と安定性に及ぼす影響を調べた。これらのバイオコンジュゲートの修飾率は 16-19 %で、一定であった。いずれの場合においても、修飾後のヘリックス含量は維持されていたが、残存酵素活性はポリマー中の BMA ユニットの増加に伴い減少した。これらの残存酵素活性は MPC ホモポリマーを修飾した場合と比べ減少したが、BMA ユニット 50 %の poly(MPC-random-BMA)とパパイン側に BMA ユニットが存在する BMA ユニット 5 %の poly(MPC-block-BMA)を修飾したバイオコンジュゲートは 40 °C において、他のポリマーを修飾した場合よりも高い酵素活性を 28 日間維持し続けた。さらに、これらのバイオコンジュゲートのヘリックス含量は、40 °C において、28 日間、初日のヘリックス含量を維持し続けた。

モノマーのシーケンスと BMA の組成を制御することにより、BMA を含む MPC ポリマーは効果的にバイオコンジュゲートの安定性を高めることが確認された。