

## 研究シーズ探索プログラム 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

自己組織性糖鎖高分子による超分子ナノワイヤーの創製

### 2. 研究代表者

三浦 佳子(九州大学大学院工学研究院化学工学部門 教授)

### 3. 研究シーズ探索成果の概要

本研究では、糖鎖高分子の水溶液中での自己組織化を利用することで、共役高分子と超分子を調製して、ナノワイヤーの創製を検討した。糖鎖を側鎖に持つ高分子は、糖鎖によるかさ高い側鎖と水溶性のために、ロッド状の立体規則性の高分子となり、水溶性ミセルを形成した。このロッド状の高分子をホストとし、ゲストとしてポリチオフェンまたはチオフェンを取り込ませて、超分子による高分子複合体の作成や鑄型重合を行い、糖鎖高分子で被覆した共役高分子の調製を行った。構造解析の結果、得られた物質が、疎水性の空間に共役高分子を内包した超分子であることがわかった。スペクトル測定や電気化学測定によって、共役高分子の蛍光の量子収率が上昇していること、共役高分子の鑄型重合が可能であることを明らかにした。目論見通りに、複合体高分子は水溶性の共役高分子ナノワイヤーとなり、糖鎖高分子の持つタンパク質認識性を共役高分子ナノワイヤーに付与することができた。複合体高分子は分子認識性を持つため、それを利用した集積化が可能であることを明らかにした。また、リビング重合を用いて精密な糖鎖高分子のホスト化合物を調製し、ポリチオフェンとの複合体高分子の調製を行った。ホスト高分子の大きさによる超分子形成の違いについては定かではないが、精密なナノ構造を持つ複合体分子を得ることができた。

### 4. 研究シーズ探索のねらい

本研究のねらいは、特殊なナノ構造を持つ、ロッド状の糖鎖高分子を用い、超分子を作製することである。特に共役高分子をゲストとして利用することで、ナノワイヤーを創製し、糖鎖高分子の物理化学特性と生体認識特性を付与することを目指した。また、有機エレクトロニクス観点からは、糖鎖高分子と共役高分子の複合体を利用することで、ナノワイヤーを水溶化することができることから、ウェットプロセスを利用した簡便操作によって、自由に操作することを目指した。

### 5. 研究シーズ探索の方法と成果

#### 5.1 方法

##### ① 高分子複合体を用いた自己組織性ナノワイヤーの合成と機能解析

糖鎖高分子として、ラクトース置換ポリスチレン (poly(N-p-vinylbenzyl-4-o-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-D-gluc onamide, 以下 PVLA) をラジカル重合によって合成した。一方で、共役高分子として、Poly[3-(2-ethyl-isocyanato-octadecanyl)thiophene](以下 PT)を用いた (Figure 1)。PT を THF に溶解させ、PVLA は純水に溶解させた。それぞれの溶液から、溶媒比率 H<sub>2</sub>O:THF=9:1 になるように混合し、その後、このサンプルを攪拌した後に水で 12 時間透析した。得られた溶液を凍結乾燥して、赤色の固体を得た。これを PVLA-PT とした。

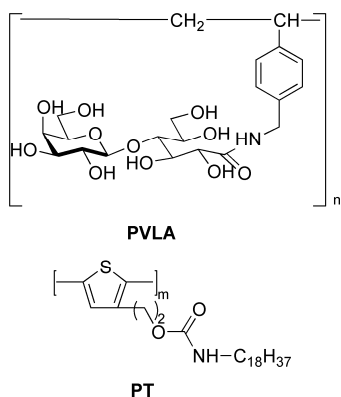


Figure 1. 実験①で用いた分子

PVLA-PT の構造は X 線構造解析によって行った。PT の蛍光スペクトルより発光の量子収率を測定した。また、PVLA-PT の生体認識性について、寒天ゲル内二重拡散法、蛍光スペクトルより、解析を行った。また、PVLA-PT を糖認識タンパク質の相互作用によって金基板上に積層した。

## ② 糖鎖高分子をテンプレートとした共役高分子の合成とその機能化

Acrylamidophenyl  $\alpha$ -D-mannose を RAFT リビングラジカル重合することで、種々の長さの糖鎖高分子(Poly(acrylamidophenyl  $\alpha$ -D-mannose)、(以下 PVMan))を調製した。RAFT 剤として、2-cyanopropan-2-yl buthyl trithiocarbonate (CPBTC)を用いた。糖鎖高分子の合成はサイズ排除クロマトグラフィー、 $^1\text{H}$ NMR によって確認し、高分子の立体規則性を解析した。得られた糖鎖高分子の疎水空間を蛍光色素(8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid magnesium salt, ANS)の発光より検討した。また、チオフェン誘導体として、3,4-ethylenedioxythiophene (EDOT)を用い、これを糖鎖高分子の溶液と混合することで水溶化した。その上で、PVMan-EDOT 複合体について、レドックス剤として  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  を選択して重合し、PVMan-PEDOT を調製した。PVMan-PEDOT の生成は蛍光スペクトル、電気化学測定法に依って検討した。その時の形態を原子間力顕微鏡によって、糖認識タンパク質を用いて分子認識性と集合化を検討した。

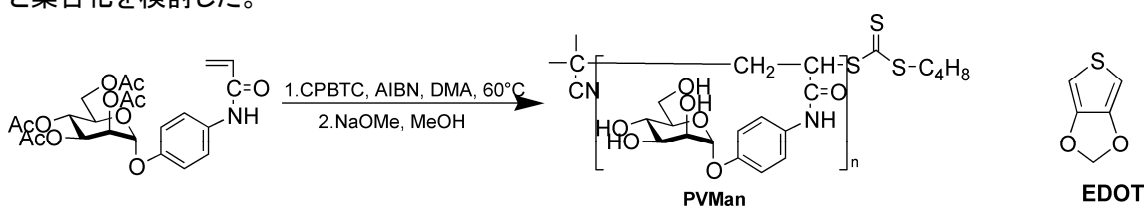


Figure 2 ②で用いた分子。糖鎖高分子(PVMan)の重合法、及び共役高分子モノマー(EDOT)

## 5. 2 成果

### ① 高分子コンプレックスを用いた自己組織性ナノワイヤーの合成と機能解析

#### (a) 超分子ポリマーの形成

PT は水に不溶であるが、PVLA-PT を調製すると水溶化することができた。PVLA の分子量は  $M_n = 2.1 \times 10^5$  ( $M_w/M_n = 1.28$ ) であるが、PVLA-PT は  $M_n = 4.3 \times 10^5$  ( $M_w/M_n = 1.02$ ) と増加することから、超分子の形成を示唆していた。また、PVLA-PT の溶液中でのコンフォメーションを 5% 重水溶液として X 線回折によって測定した。X 線回折の結果、PVLA が異方性のある筒状構造を持ち、短径が 1.60nm であることが分かった (Table 1)。PVLA-PT については短径が 2.00nm と増加することから、超分子形成が示唆された。PVLA-PT の蛍光スペクトルを測定すると、PVLA から 610nm 付近に蛍光が現れ、PVLA-PT にすることで、この蛍光強度が 1.5 倍程度に増強されることがわかった。これらのことから、PVLA と PT を混合することで、超分子ポリマーが生成する

Table 1 PVLA, PVLA-PT の 1.5wt% の SAXS の解析結果

Sample	Rg (nm)	Rgc(nm)
PVLA	17.4	1.60
PVLA-PT	17.4	2.00

ことがわかった。PVLA-PT の複合体では、蛍光スペクトル強度が上昇することから、共役高分子が PVLA に包摂されることで凝集が抑えられて、凝集による消光が抑えられ、量子収率が変化することが分かった。一方で、PVLA-PT の混合比を変化させると、蛍光スペクトルはレッドシフトを示すことから、包摂体は混合比によってやや多様な形態をとることが示唆された。

#### (b) 超分子ポリマーの生体認識能

PVLA-PT について、PVLA を特異的に認識するタンパク質である PNA との相互作用を解析した。ゲル寒天法を用いると、PVLA、及び PVLA-PT と PNA の組み合わせのところに、沈降線が見られて、認識性があることがわかった。一方で、ConA, BSA に対しては沈降線の形成が見られなかった。次に、蛍光法を用いて、レクチンとの相互作用を測定した。蛍光の変化は、Figure 3 の様に変化して、これを Scatchard Plot によって解析した。すると、PNA による結合が非常に強く、ConA, BSA の相互作用は推定できないことがわかった。

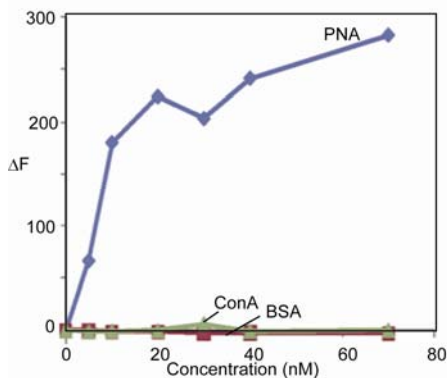


Figure 3 PVLA-PT のタンパク質の添加による蛍光値(520nm)の変化。PNA の時のみ蛍光の変化が表れる。

これより、PNA に対して特異的に強く結合し、結合定数は  $1.08 \times 10^6 (M^{-1})$  であることがわかった。また、PVLA-PT では、内包されている PT 部分のみが蛍光を発するが、包摂体の外部である、PVLA 部分の変化を蛍光変化で検出できることがわかった。

また、PVLA-PT が PNA と結合することから、PVLA-PT に PNA を加えると大きな高分子凝集体を形成することが蛍光顕微鏡によって確認された。

#### (c) 成果

PVLA をホスト、PT をゲストとすることで、超分子集合体 PVLA-PT を調製することができた。PVLA-PT は PT 自体にはない水溶性、高い発光性、分子認識性を有していた。また、分子認識性を利用することで、PVLA-PT を積層することができた。

## ②糖鎖高分子をテンプレートとした共役高分子の合成とその機能化

### (a) 糖鎖高分子のリビングラジカル重合

*p*-(*N*-Acrylamido) phenyl penta-*O*-acetyl-D- mannoside(Ac-PVMan)に CPBTC を RAFT 剤として加えて、AIBN を開始剤として重合したところ(Figure 2)、DMA を溶媒としたときに効率のよいリビングラジカル重合を達成することができた。分子量分布は 1.3 以下で、 $M_n = 2.2 \times 10^5$  となり、だいたい 50 量体のポリマーが生成していることがわかった(Table2)。この時得られた高分子について、 $^1H$ NMR,  $^{13}C$ NMR で、立体構造を解析したところ、重合した化合物ではアイソタクティック優勢に重合が進んでおり、72%のタクティシティーを有することがわかった。CD スペクトルを測定すると、240nm にコットン効果が観察されて、実際にポリマー中のフェニル基がキラルに配置しており、ロッド状ポリマーの生成を示唆していた。

Table 2 PVMan の重合の結果

Run No.	Time (h)	Conv. (%) <sup>b</sup>	$M_n^c$	Mw/Mn
1	6	5	---	---
2	12	15	---	---
3	14	31	5800	1.3
4	16	70	14000	1.1
5	25	92	22000	1.2
6	48	92	22000	1.2

<sup>a</sup>Monomer 0.30 mmol, CPBTC 0.006 mmol, AIBN 0.002 mol%, 60°C;

<sup>b</sup>determined by 400MHz  $^1H$ NMR, <sup>c</sup>determined by relative to polystyrene standard.

### (b) 糖鎖高分子を用いたチオフェンのテンプレート重合

作成した精密糖鎖高分子 PVMan が疎水部を内側に持つらせん構造であるかの検証を行うと同時に、複合体が形成できるかを蛍光色素 ANS で 検討した。その結果、ANS の 515 nm であったピーク波長が、PVMan との混合させた場合 467 nm にピークがシフトし、蛍光強度が増加していることから、疎水性コアが存在して超分子形成が可能であることがわかった。次に、3,4-ethylenedioxythiophene(EDOT)と混合すると、水に不溶の EDOT が可溶化されて糖鎖高分子と複合体を形成することがわかった。PVMan-EDOT 複合体の水溶液中でレドックス重合を行ったところ、340nm から 450nm に蛍光スペクトルの発光波長が変化したことから、PVMan-PEDOT の生成が確認された。この時に用いるテンプレートの PVMan の分子量を  $2.2 \times 10^5$ ,  $1.4 \times 10^5$ ,  $5.8 \times 10^4$  として長さを変化させても、PEDOT 由来の蛍光は 450nm の蛍光を示すことから、テンプレートの長さ依存的な重合にはなっていないことが分かった。そして、共役長はこ

れ以上長くなることはなく、PEDOT オリゴマーによるワイヤーとなっていることがわかった。また、PVMan-PEDOT の形態を AFM によって観察したところ、一様な楕円球体が観察され、実際に異方的なナノワイヤーが生成していることがわかった。一方で、この楕円球体は PVMan のみでは観察されず、PVMan-PEDOT となることで、分子が剛直なロッド様になっていることが示唆された。また、分子認識性を蛍光消光によって確認したところ、ConA との結合が  $1.0 \times 10^5 (\text{M}^{-1})$  となったが、タンパク質を利用して糖鎖高分子を集積させることはできなかった。

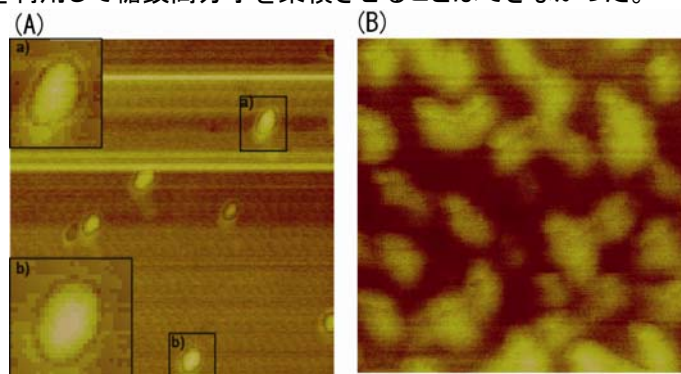


Figure4 PVMan-PEDOT の AFM 像による観察。(A)PVMan-PEDOT 像、(B)PVMan の原子間力顕微鏡

#### (b) 成果

RAFT リビングラジカル重合によって糖鎖高分子を精密に重合することで一様な長さを持つ高分子のナノロッドを生成することができた。このロッドは①の研究と同じように疎水性のコアを持っていて、ポリチオフェンモノマーの集積化が可能であった。レドックス重合することによって、この高分子を糖鎖高分子テンプレートの中で重合できることがわかった。

### 6. 自己評価

本研究では、糖鎖高分子という複合体を通じたナノワイヤーの形成を利用してウェットプロセスを利用した材料設計を目指した。本課題では、糖鎖高分子と共役高分子の複合体の形成について、2 種類の方法を開発し、超分子ナノワイヤーを形成できることを明らかにした。また、糖鎖高分子の精密重合を取り入れることで、内包される共役高分子のナノワイヤーを制御することも狙いとし、超分子ポリマーの制御への道を拓いた。また、高分子の構造解析について、溶液中での X 線構造解析、AFM によって詳細に明らかにした。タンパク質との特異的な認識を示し、超分子ポリマーが蛍光変化によって生体機能を解析できる、高分子が積層可能であることを明らかにした。最終的に電気化学応答までを解析することを目指していたが、基本的な酸化還元応答については検討を行ったが、デバイス化を目指した高度な電気化学測定を行うことができなかった。逆に当初計画では微細加工は視野に入れていなかったが、微細加工化も可能であることを見出した。以上より、当初の目的であった、糖鎖高分子による超分子の創製やナノワイヤーの制御については、改善の余地はあるものの、当該期間での研究はほぼ予定通りに行うことができた。

### 7. PO の見解

コイル状の糖鎖分子の内部に低分子を包含させて、センサー機能を持たせようという目論見であったが、そこまで達するには時間が足らなかった。しかし生体高分子、または生体高分子様の人工系と、有機エレクトロニクスで用いられる分子のハイブリッド系については今後生体適合性や、バイオセンサーを広く開発していくために重要なアプローチといえる。三浦教授は合成生体高分子が専門であり、疾患マーカー検出等の専門に近い分野での研究を主とし、そのうえで、有機エレクトロニクスを専門とする工学系の研究者とのコラボを進め、面白い展開に発展することように計画されることがよいと思われる。そういう観点から、まずは近隣の研究者とのディスカッションを手始めとすることが望まれる。

## 8. 研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

なし(投稿中、2報)

### (2)特許出願

研究期間累積件数： 件

発 明 者：  
発明の名称：  
出 願 人：  
出 願 日：

### (3)口頭発表

#### ①学会

国内 4 件, 海外 0 件

1. RAFT-リビングラジカル重合を用いた精密糖鎖高分子の合成と生体認識能、豊島雅幸、三浦佳子、第 59 回高分子学会年次大会、2010 年 5 月 28 日、横浜
2. 精密糖鎖高分子を用いた複合材料の設計とその生体認識能、豊島雅幸、三浦佳子、FCCA 糖質若手の会、2010 年 8 月 7 日、東京
3. 糖鎖高分子を用いた複合材料の設計とその生体認識能検討、豊島雅幸、由井伸彦、三浦佳子、第 59 回高分子討論会、2010 年 9 月 16 日
4. 自己組織性糖鎖高分子による機能性材料の創製、三浦佳子、豊島雅幸、松岡真未、第 59 回高分子討論会、2010 年 9 月 17 日

#### ②その他

国内 0 件, 海外 0 件

### (4)その他の成果(受賞、著書、招待講演、特記事項等)

#### 受賞

BCSJ 賞受賞 2010 年 9 月

#### 著書

バイオマテリアルの基礎、日本医学館、pp156-159, 糖鎖機能界面

#### 招待講演

1. 糖鎖高分子を利用した生体ナノ材料、三浦佳子、高分子学会北陸支部福井地区講演会、2010 年 11 月 1 日
2. 生理活性糖の不思議、そしてその応用、三浦佳子、第 47 回化学工学コロキウム、2010 年 11 月 29 日
3. トレハロース誘導体によるタンパク質凝集形態の制御、三浦佳子、第 14 回トレハロースシンポジウム、2010 年 10 月 12 日
4. 樹状高分子を利用した糖鎖の集積化と生体機能の制御、三浦佳子、第 4 回バイオ関連シンポジウム、2010 年 9 月 24 日

#### 特記事項等

雑誌掲載、ヘルスライフビジネス、2010 年 11 月 15 日号