

平成 30 年 8 月 22 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14083

研究課題名(和文) ペプチドの構造異性体に着目した非分解性の安全な抗菌性高分子材料の創製

研究課題名(英文) Creation of non-degradable and safe antibacterial polymer material using structural isomers of peptides

研究代表者

網代 広治 (Ajiro, Hiroharu)

奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機構・特任准教授

研究者番号：50437331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ペプチドの構造異性体を見立てて、安定性の高い非分解で安全性の高い抗菌性高分子材料を調製することを目的とした。まず、種々の新規N-ビニルアミド誘導体を利用可能とするために、新しい合成経路を確立した。さらに、種々のN-ビニルアミド誘導体の共重合体を合成し、RAFT法を用いれば副反応を抑えて構造制御を行うことが可能であることを示した。また、抗菌性が見込まれるカチオン性を有した共重合体においても、疎水性ユニットが導入されたN-ビニルアミド系ポリマーでは、細胞毒性を低く保つことが示された。以上の結果から、今後安全な非分解の抗菌性高分子材料としての利用を期待している。

研究成果の概要(英文)：In this study, the novel synthetic route was established regarding novel N-vinylamide derivatives, which resembled to structural isomers of peptides. Several N-vinylamide derivatives and their copolymers were also synthesized. For example, long alkyl chain and aromatic group were introduced into N-position at N-vinyl amides, although the monomers keep hydrogen atom at amide position, which expected important property. When RAFT method is applied, polymerization control without side reaction was achieved. Finally, the obtained copolymers were examined for their cell viabilities. The low cell toxicity was evaluated by the N-vinylamide polymers. The copolymers with hydrophobic moieties maintain the low cell toxicity, although the cation units was introduced, which was expected as high antibacterial properties. We expect the application of the novel polymers as non-biodegradable stable and safe antibacterial materials.

研究分野：高分子合成

キーワード：高分子材料合成 ペプチド構造異性体 抗菌性

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えて医療需要が高まる現在、抗菌性材料の開発が望まれる。抗菌性は、カチオン性化合物、銀、両親媒性化合物などが発揮することが知られている。合成高分子においても抗菌性材料の研究が行なわれている。一方、抗菌性ペプチドは様々な生物に存在する 10-50 残基程度のアミド化合物である (Zasloff, M. Nature 2002, 415, 389; Brogden, KA. Nat Rev Microbiol, 2005, 3, 238.等)。抗菌性ペプチドは、カチオン性および疎水性を有する両親媒性構造が多い。その抗菌性の作用機序は、細菌の細胞膜電位を消失させることに依る。一方、当該研究課題の研究代表者は合成高分子が専門であるが、生理活性機能を合成高分子でも実現したいと思ってきた。本研究課題では、ペプチドの構造異性体に着目し、天然高分子の有する生理活性機能を凌駕する材料を、合成的手法で達成することを検討してきた。

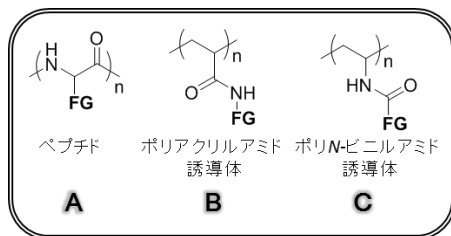


図 1. ペプチド構造異性体

例えば、ペプチド(図 1A)の構造異性体としてポリアクリルアミド(図 1B)が挙げられるが、側鎖が加水分解されると、毒性の高い低分子アミンの放出が避けられない。この観点から、低毒性で安全なポリ(N-ビニルアミド)(図 1C)を用い、研究を展開してきた(H. Ajiro et al., Macromolecules 2009; H. Ajiro et al., J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 2010; Y. Takemoto, H. Ajiro et al., Chem. Mater. 2010, 等 18 報)。しかし、ペプチドの生理活性を発現する構造異性体としてポリ(N-ビニルアミド)を利用するためには、誘導体の種類が不足している。その原因はモノマー合成法にある。既存の合成法では、550 の熱分解を伴う合成経路で調製されるため、側鎖の官能基(FG: Functional Group)導入が困難という課題があった。

2. 研究の目的

前述の研究背景を受けて、本研究課題では、ペプチドの構造異性体として、安全性の高いビニルポリマー骨格に着目した。中でも、N-ビニルアミド系ポリマーの多様性を実現するために、まず N-ビニルアミド誘導体の新しい合成経路を確立することを目的とした。つまり合成経路として、アミド化と脱保護反応を連続して行う新しい手法を構築する。

ペプチド構造異性体の前駆体として N-ビニルアミド誘導体を新規に複数合成する。これらのモノマーを用いて、高分子構造制御を行い、抗菌性や細胞毒性を評価し、構造と機能の関連性を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

図 2 に本研究課題で考案したポリ(N-ビニルアミド誘導体)の新規合成経路を示す。研究課題を開始する当時、1 に相当する化合物は 9 種類しか存在しなかった。しかもこれらはいずれもペプチド異性体には該当しない。一方、研究代表者らは既にパルミトイルクロリドを用いて 1 を単離していた。また、ポリ(NVF)およびポリ(NVA)は酸性またはアルカリ性条件下において側鎖の加水分解挙動が詳細に調べられている(K. Yamamoto et al., J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 2000, 38, 3574 等)。さらに、1 から 2 の変換が数例知られている(US2014/378461 A1, 2014 等)。したがって、これらの予備的知見を基にすると、NVF または NVA を出発物質としてアシル化合物との反応を利用すれば、N-ビニルアミド骨格を有するペプチドの構造異性体を合成できる、と考えた。

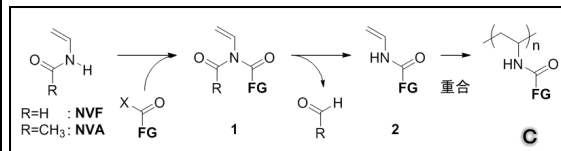


図 2. ポリ(N-ビニルアミド誘導体)の新規合成経路

一方、抗菌性ペプチドは、疎水性、親水性、およびカチオン性のアミノ酸が配列した構造に由来することが知られている。したがって、当研究課題の目的を達成するためには、まず図 2 から合成されるペプチド異性体前駆体のビニルモノマー群を重合し、その一次構造および高次構造を制御する方法をとる。ここで得られたポリマーについて細胞接着や細胞毒性を調べることで、安全な抗菌性材料としての評価を行う。

4. 研究成果

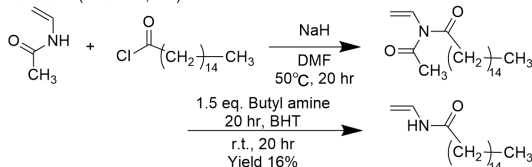
(1) 新規合成経路によるモノマー合成

ペプチドを構成する様々なアミノ酸構造が考えられるが、親水性アミノ酸のモデルとして市販の NVF を用い、カチオン性モデルとしては、NVF を重合した後に加水分解することで得られるポリビニルアミンユニットを用いることとした。

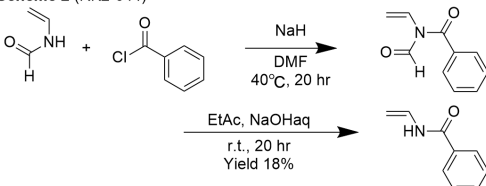
そこで、疎水性アミノ酸モデルとして、長鎖アルキル基および芳香環を有する N-ビニルアミド誘導体を本研究課題で合成するこ

とにした。まず提案に従って、対応するカルボン酸アシル化合物を用いて、NVF および NVA を用いて、新規 N-ビニルアミド誘導体の合成を試みた。長鎖アルキルおよび芳香環を有する 2 つの N-ビニルアミド誘導体の合成スキームを Scheme 1 および Scheme 2 に示す。

Scheme 1 (RK1-110,111)



Scheme 2 (RK2-044)



いずれも、既存法 500 という条件を経ずに 2 ステップで合成を達成した。収率はそれぞれ 16% および 18% であったが、当研究課題で設定した新しい合成法を適用し、ペプチドの構造異性体をモデルとした新規 N-ビニルアミド誘導体の合成を達成した。他にもイソプロピル基 (3.7% yield) や *t*-ブチル基 (2.2% yield) も達成し、汎用性の高い手法であることを示した。たとえば例として、図 3 にアルキル鎖を導入したモノマーの ¹H NMR スペクトルを示す。

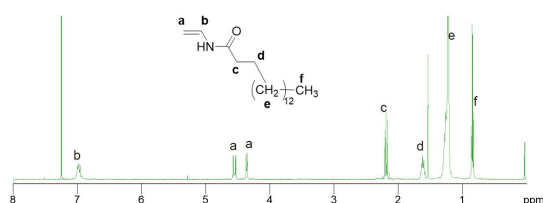


図 3. N-ビニルアミド誘導体の ¹H NMR.

(2) N-ビニルアミド誘導体の共重合体合成

次に、上述の項目から得られた N-ビニルアミド誘導体を用いて、NVF と共重合体の調製を試みた。当該研究課題の目的に即して、抗菌性ペプチドの構造異性体となりうる高分子構造を考えて、モノマーが与えるポリマーの親水性、疎水性、およびカチオン性に着目し、適切なモノマーを検討した。

そこで、親水性ユニットとして NVF を、カチオン性ユニットとしてビニルアミンユニットおよびこれをアルキル化した 4 級アミンユニットを、そして疎水性ユニットとしてフェニル基を導入した N-ビニルアミンユニットを選択し、共重合の組成比を 10% および 20% のものをそれぞれ合成した。

Scheme 3 (RK2-048,051,052)

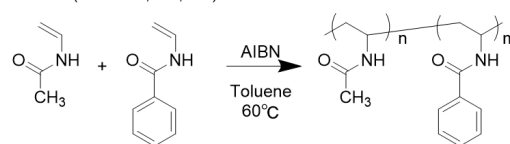


Table 1. Copolymerization of N-vinyl amide derivatives.

Sample	<i>n:m</i>	Yield	Concentration	<i>M_n</i> ($\times 10^3$)	PDI
RK2-48	0:100	78%	0.5M	15.1	2.3
RK2-51	17:83	87%	0.5M	19.0	1.9
RK2-52	5:95	87%	0.5M	16.6	3.4

^a Polymerization conditions: Solvent=toluene, Initiator=AIBN. Temp.=60°C.

^b Diethyl Ether insoluble part. ^c determined by SEC with polystyrene standard in DMF.

Scheme 3 に共重合反応式を、Table 1 に共重合体の分析結果をそれぞれ示す。数平均分子量は 2 万程度で、NVF ユニートをそれぞれ 17% および 5% 導入された共重合体を得た。

これらのポリマーをアルカリ処理することで、NVF ユニートをビニルアミンユニットへ変換し、さらにハロゲン化アルキルと反応させることで 4 級アミンユニットを導入したポリマーを合成した。図 4 に、本研究で調製した一連のポリマー群の化学構造を示す。

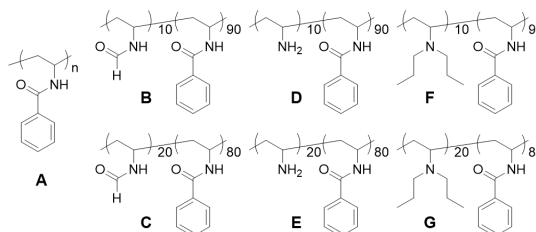
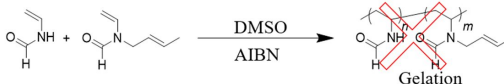


図 4. ポリ(N-ビニルアミド誘導体)の化学構造.

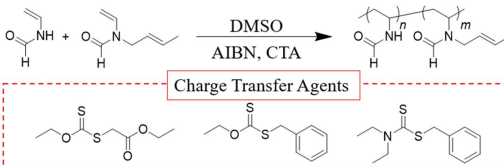
(3) N-ビニルアミド誘導体の構造制御

N-ビニルアミド誘導体では、RAFT 法によりリビング重合が期待される。申請書に従って、高分子構造制御を行う手法を明確とするため、RAFT 法によるポリマー合成を試みた。ここでは、重合メカニズムを考察するために、側鎖に二重結合を導入したモノマーを選択した。スキームを下記に示す。

Scheme 4-1.



Scheme 4-2.



まず、NVF との共重合において、通常のラジカル重合条件で行うと (Scheme 4-1)、反応系全体がゲル化してしまった。これは、側鎖に導入された二重結合も一部反応し、架橋剤の役割を果たしてしまったものと思われる。

これに対して、RAFT 法で用いられる連鎖移動剤(CTA)を用いると(Scheme 4-2)、有機溶媒に可溶なりニアポリマーを得ることができた。図 5 にモノマーとリニアポリマーの ^{13}C NMR スペクトルを示す。

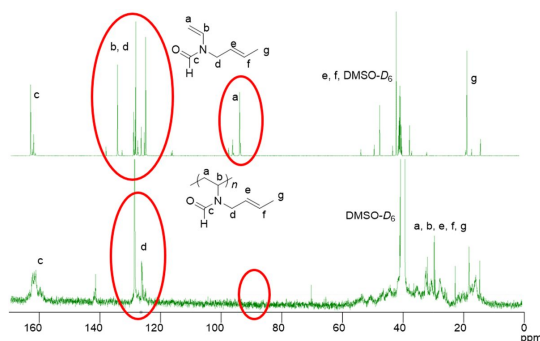


図 5. N-ビニルアミド誘導体の NMR スペクトル.

(4). 細胞接着評価

最後に安全な抗菌性高分子材料としての評価を行うために、和久友則助教の協力の下、細胞接着実験と細胞毒性試験(WST-8)を行った。

図 4 に示す 7 種類のポリマーを用いて評価を行った。まずこれらのポリマーをメタノールに溶解させ、10mg/mL の溶液を調製した。これを直径 15mm の円状ガラス基板上に 20 μL のせて 4000rpm, 30 秒の条件でスピンコートを行った。

まず、D および E のサンプル上に 1.5×10^4 cell/well で NIH3T3 細胞を播種し、48 時間後の細胞増殖を観測した(図 6)。

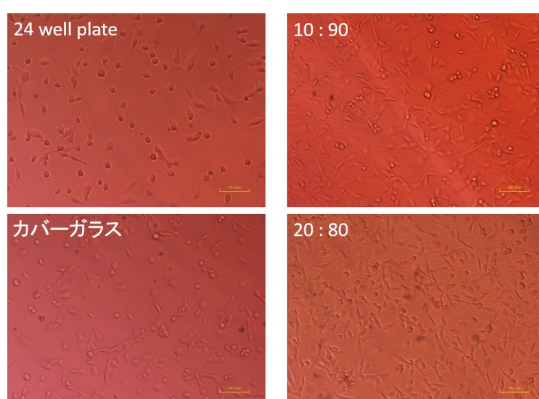


図 6. 細胞増殖の様子.

無血清培地および血清培地ともに、コントロールである 24 well プレートやカバーガラス状と比較すると、細胞数は増加する傾向があり、組成比 10:90 の共重合体の方が細胞数は多い傾向が認められた。したがって、細胞毒性は低く、細胞接着や増殖を促進することが示唆された。

さらに詳細に調べるために、WST-8 を使用して、細胞毒性を検討した。

まず、スピンコート薄膜の表裏をクリーンベンチ内で UV 照射(表裏 10 分づつ)した。また、細胞播種数を 1.0×10^4 cells/well とした。48 時間後に一度 WST-8 を加えて、その上澄の吸光度を測定し、培地交換後さらに 48 時間培養した後に、再度 WST-8 アッセイを行った。Cell Viability は以下の式より算出した。

$$\frac{(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \times 100}{(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})}$$

細胞接着の実験結果から、ホモポリマー A はコントロール基板と比べて細胞増殖を促進する効果があることが分かった。また、水溶性ユニット(NVF)およびカチオン性ユニット(ピニルアミン)が導入された B~E では、導入量が 10%から 20%になると、細胞増殖が抑えられる傾向が認められた。しかしながら、それでもコントロール基板と遜色ない細胞生存率を示したことから、毒性は低く保たれると示唆された。

以上より本研究課題では、ペプチドの構造異性体を見立てて、新規 N-ビニルアミド誘導体の新しい合成経路を確立した。種々の N-ビニルアミド誘導体の共重合体を合成し、RAFT 法を用いれば副反応を抑えて構造制御を行うことが可能であることも示した。さらに、抗菌性が見込まれるカチオン性を有した共重合体においても、疎水性ユニットが導入された N-ビニルアミド系ポリマーでは、細胞毒性を低く保つことが示され、今後安全な非分解の抗菌性高分子材料としての利用を期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Hiroharu Ajiro*, Kai Kan, Mitsuru Akashi*, "Thermal Treatment of Poly(N-vinylformamide) Produced Hydrogels without the Use of Chemical Crosslinkers" J. Nanosci. Nanotechnol. **2017**, 17(1), 837-841.

DOI: 10.1166/jnn.2017.12451 【査読有り】

Ryo Kawatani, Yasuhiro Nishiyama, Hironari Kamikubo, Kiyomi Kakiuchi, Hiroharu Ajiro*

"Aggregation control by multi-stimuli-responsive poly(N-vinylamide) derivatives in aqueous system"

Nanoscale Res. Lett. **2017**, 12, 461.

DOI: 10.1186/s11671-017-2221-7 【査読有り】

〔学会発表〕(計 8 件)

Ryo Kawatani, Hiroharu Ajiro,

“ Synthesis of thermosensitive poly(N-substituted-N-vinylamide) derivatives bearing ethylene glycol chain for kinetic hydrate inhibitor ”, PACCON 2018, P0-0-001, 7th-9th February 2018, International Convention Center, Hat Yai (Thailand).

川谷諒・**網代広治**「ガスハイドレート生成防止剤の開発を目指した二種類の感熱応答性部位を設計したポリ(N-ビニルアミド)誘導体の合成」第7回化学フェスタ、P5-090、2017年10月17日 19日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)。

Choi Jaeyeong・川谷諒・**網代広治**「N-位に光応答性置換基を導入した両親媒性ポリ(N-ビニルアミド)誘導体の合成とその光応答挙動」第7回化学フェスタ、P4-085、2017年10月17日 19日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)。

カン凱・**網代広治**「N-ビニルアミド誘導体による感熱応答性相互侵入網目ゲルを利用した薬物吸着と脱着」第66回高分子討論会、3Pc023、2017年9月20日 22日、愛媛大学城北キャンパス(愛媛県松山市)。

川谷諒・**網代広治**「ガスハイドレート生成防止剤を目的としたN位にアルキル鎖またはエチレングリコール鎖が導入されたポリ(N-ビニルアミド)誘導体の合成と感熱応答性」第66回高分子討論会、2Y04、2017年9月20日 22日、愛媛大学城北キャンパス(愛媛県松山市)。

川谷諒・**網代広治**「アジポイルクロライドおよびアジピン酸を用いたポリ(N-ビニルアミド)誘導体の架橋と双性イオンの導入」第66回高分子討論会、3Pa023、2017年9月20日 22日、愛媛大学城北キャンパス(愛媛県松山市)。

川谷諒・カン凱・**網代広治**“塩化アジポイルを用いたポリ(N-ビニルアミド)誘導体のゲル調製”第63回高分子研究発表会、Pa-22、兵庫県民会館(兵庫県神戸市) 2017年7月14日。

川谷諒・カン凱・明石満・**網代広治**“抗菌性ペプチド構造異性体を目指したカチオン性ポリ(N-ビニルアミド)誘導体の合成の設計”第66回高分子年次大会、3Pc025、幕張メッセ(千葉県千葉市) 2017年5月29日 31日。

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称:感熱応答性高分子化合物、並びに該化合物を用いた徐放性生体内分解性医用材料
発明者:**網代広治**、川谷諒
権利者:国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学
種類:国内特許出願
番号:特願 2017-103673
出願年月日:2017年5月25日
国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://mswebs.naist.jp/LABs/ajiro/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

網代 広治 (AJIRO, Hiroharu)
奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機構・特任准教授
研究者番号: 50437331

(2) 研究協力者

和久 友則 (WAKU, Tomonori)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・助教
研究者番号: 30548699