

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19550118
 研究課題名（和文） 多重刺激応答機能を有するアミノ酸系高分子の精密合成とキラル環境下での高次構造転移
 研究課題名（英文） Precise synthesis of amino acid-based polymers having multi stimuli-responsive properties and transformation of highly ordered structures under chiral environments
 研究代表者 森 秀晴（MORI HIDEHARU）
 山形大学・大学院理工学研究科・教授
 研究者番号：00262600

研究成果の概要：

本研究では、多重刺激応答機能と特異な高次構造及びその転移機能を併せ持つ新規アミノ酸系材料の創製を目的として、様々なアミノ酸含有多成分系高分子材料の精密合成手法を確立した。さらに、特異な機能を有するアミノ酸を精密に合成された高分子鎖中にブロック的に配列させることで、多重刺激応答性及びその高次構造の動的変換を実現した。これらの成果により、究極の生体高分子であるタンパク質に一段階近づくことに成功したと言える。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：高分子合成、ナノ材料、自己組織化、刺激応答性、アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

（1）生命のさまざまな現象をつかさどるタンパク質は、球状タンパク質、繊維状タンパク質、膜タンパク質に分類出来る。例えば、酵素は球状タンパク質に分類されるが、この酵素分子はポリペプチドが密に折りたたまれた水溶性のコンパクトな球状高分子であることが知られている。近年、ロシアの Khoklov らは、このような特異な高次構造を水溶液中で示す合成高分子の構築・分子設計を目指し、理論計算の観点からタンパク質類似共重合体 (Proteinlike

Copolymer, Physical Review Letters, 82, 3456, 1999) という概念を導き出した。この共重合体は、従来のランダム・ブロック共重合体とは異なる様々な高次構造や特性を有することが理論上報告されている。

（2）生体はpHや温度の変化など様々な環境変化に対応して、生体内に存在するタンパク質やリン脂質などの各種素子が協同的に作用し会合・解離が起こり、最終的には細胞全体として応答する。つまり、生体内部ではpH値や温度などの一般的外部刺激だけ

ではなく生体内に存在する多様な化学的内部刺激が作用し、物質の創製・変換、筋肉収縮、さらには情報伝達に至るまでの多種多様な現象を誘発している。このようなタンパク質の特異な2次～高次構造とその外部・内部刺激による高次構造転移を模倣することはモデルタンパク質・人工的なタンパク質類似体を設計・構築する上で必要不可欠である。

(3) これまで、究極の生体高分子であるタンパク質に匹敵する機能や構造を有する合成高分子の創製を目指し、アミノ酸を基盤とする高分子は様々な観点から研究されてきた。しかしながら、アミノ酸系高分子材料の一次構造の精密制御、特に配列制御は合成手法上困難であり、また高次構造制御も難しいことから天然高分子にみられる高度な機能を持たせることは不可能であった。本研究では、適切なアミノ酸系モノマーの可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合により、一次構造の精密制御が可能であり、多重刺激応答機能の付与とアミノ酸部位のある程度の配列制御が可能となる。

(4) 近年、リビングラジカル重合の進歩に伴い多成分系高分子の可能性が急速に拡大している。例えば、*N*-イソプロピルアクリルアミドとアクリル酸からなるブロック共重合体のように、温度とpHにそれぞれ応答するポリマーが初めて精密に合成され、その刺激応答性に関する研究も進められつつある。しかしながら、そのセグメントの組み合わせは限定されており、本研究のようにキラル分子を付与するシステムの構築は不可能であった。

2. 研究の目的

酵素や転写因子などのタンパク質が示す洗練された機能は各分子に特有なアミノ酸配列及び2次～高次構造に依存する。また生体では、pHや温度などの外部刺激と生体内に存在する化学的刺激(タンパク質、ペプチド、脂質など)が協同的に作用し様々な機能を発現する。本研究は、これら外部(pHと温度)と内部(キラル分子)刺激に協同的に作用し、且つ特異な高次構造及びその転移機能を併せ持つアミノ酸系高分子材料の創製を目的とする。

具体的には、リビングラジカル重合法を用いて多重刺激応答機能を有するランダム・ブロック共重合体を合成すると共に、球状タンパク質の特異な高次構造を模倣するタンパク質類似構造の獲得を目指す。さらには、水環境下での自発的な集合体の形成、及び多重外部刺激による高次構造転移について検討

する。最終的には、キラル分子存在下で外部刺激に協同的・特異的に応答するアミノ酸系材料の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、アミノ酸系高分子を精密に構築する手法として、リビングラジカル重合法の一種である可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT, reversible addition-fragmentation chain transfer)重合を用いた。具体的には各種アミノ酸含有アクリルアミド類(図1)を合成し、その精密重合手法を確立した。次に、温度応答性やpH-応答性などの特異的な機能を有する各セグメントから成るブロック共重合体をRAFT重合法により合成した。実際のブロック共重合体の合成は、一つ目のモノマーを重合し、生成ポリマーを単離精製した後、これをマクロ連鎖移動剤として2つ目のモノマーを重合することより行なった。また、異なる刺激応答機能を同一の分子内に有し、且つ各高分子鎖が共有結合で結ばれているブロック共重合体の特異性を確認するため、対応するランダム共重合体も合成し、比較検討した。得られた共重合体の一次構造はNMR、GPC、GPC-RALLS、MALDI-TOF MS等で解析した。

(2) 温度、pH、塩濃度などの複数の外部刺激に応答する多重刺激応答性共重合体の応答性を生理的条件に近い水環境下で評価した。この際、刺激応答性の測定は主に水溶液の濁度測定により行なった。また、水溶液中の集合構造の形態やサイズの解析は、動的光散乱(DLS)、レーザゼータ電位計等を用いて行った。一方、得られた高次構造体は原子間力顕微鏡(AFM)、円二色分散計(CDスペクトル)により評価した。

4. 研究成果

本研究では、多重刺激応答機能と特異な高次構造及びその転移機能を併せ持つ新規アミノ酸系材料の創製を目的として、様々なアミノ酸含有多成分系高分子材料を合成した。具体的には、フェニルアラニン(Phe)、アラニン(Ala)、プロリン(Pro)、ヒドロキシプロリン(Hyp)部位を有するモノマー類(図1)の可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合を用いて、(1)温度応答性ブロック・ランダム共重合体、(2)異なる親水性・キラリティーから成るブロック共重合体、(3)プロリン誘導体のみから構成されるランダム共重合体、(4)pH-温度応答性ブロック共重合体、(5)2重温度応答性ブロック共重合体、(6)電子・光機能を持つブロック共重合体の精密合成にそれぞれ成功した。さらに、各

ブロック・ランダム共重合体の化学構造、各セグメントの鎖長、組成、塩の添加等により高次構造や多重刺激応答機能を制御することも見出した。さらには、厳密に制御された一次構造・高次構造とキラリティーとの相関についても明らかにした。

以上のように、特異な機能を有するアミノ酸を精密に合成された高分子鎖中にブロック的に配列させることで、多重刺激応答性及びその高次構造の動的変換を実現した。これらの成果により、究極の生体高分子であるタンパク質に一段階近づくことに成功したと言える。今後、多重刺激応答機能及びその高次構造変換を自由自在に操作する技術を確立し、汎用性の高いアミノ酸系ナノ構造体の設計論が提供できれば、医用材料や環境調和型材料などの新規機能性材料・分子デバイスとしての応用が期待できる。以下に各結果をそれぞれ詳細に示す。

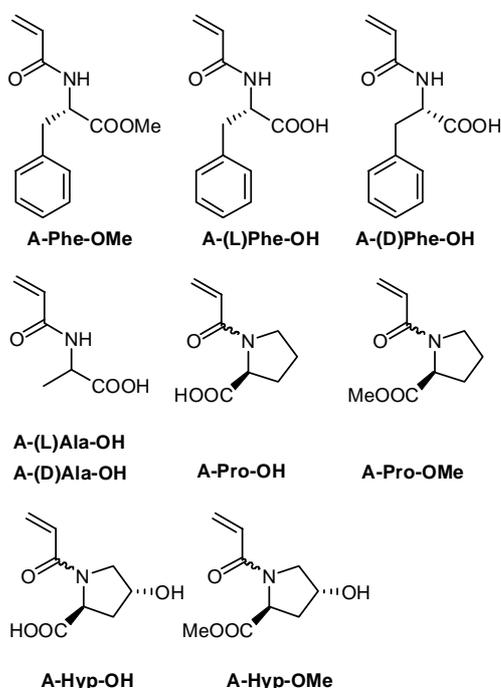


図1 使用したアミノ酸含有モノマー類

(1) 温度応答性ブロック・ランダム共重合体

多重刺激応答性高分子材料を創製する第一歩として、温度応答性セグメントを形成するアミノ酸系モノマー (A-Pro-OMe等) の精密重合手法を確立した。次に、温度応答性セグメントを有するアミノ酸系ブロック共重合体をRAFT重合法を用いて合成した。この際、構造の規制されたブロック共重合体を構築するために、一段目の重合で得られる連鎖移動剤の構造を末端に有するマクロ連鎖移動剤の反応性を考慮し、モノマーの種類や重合条件等を検討し最適条件を

決定した。また、適切な下限臨界溶液温度 (LCST) を有する共重合体を構築するため、親水性や疎水性の異なるセグメントを用い、且つ組成やブロック鎖長の異なるブロック共重合体を合成した。これらの共重合体の温度応答性を水環境下で評価した結果、ブロック共重合体とランダム共重合体で温度応答性が大きく異なることが明らかになった。また、温度応答性ポリマーに疎水性を付与すると低温側に、親水性を付与すると高温側に転移温度が変化することが見出された。

(2) 異なる親水性・キラリティーから成るブロック共重合体

新規アミノ酸系機能材料の合成と高分子ナノ構造体への展開を目的として、キラリティー (L体, D体) や親水性 (Phe: フェニルアラニン, Ala: アラニン) の異なるブロック共重合体の合成を試みた。その結果、RAFT重合法を用いることで親水性-疎水性/親水性-親水性やキラル-キラル/アキラル-キラルの組み合わせからなる様々なアミノ酸系ブロック共重合体の合成に成功した。また、それらブロック共重合体のカイロオプティカル特性は、それぞれのセグメントのキラリティー、鎖長、組成比、選択溶媒に誘発される高次構造に大きく依存することが見出された。この結果より、アミノ酸系ブロック共重合体の一次構造と自己組織化により形成される高次構造、及びキラリティーの相関を明らかにした。

(3) プロリン誘導体のみから構成されるランダム共重合体

コラーゲンのトリプルヘリックスの重要な構成単位であるプロリン誘導体 (プロリン: Pro、ヒドロキシプロリン: Hyp) に着目し、プロリン成分のみから構成される新規ランダム共重合性の構築にも成功した。具体的には、分子内にカルボン酸部位を有するA-Pro-OHと水酸基とカルボン酸部位を有するA-Hyp-OHのRAFT重合を検討し、最適な連鎖移動剤と重合条件を確立した。精密に合成されたPoly(A-Pro-OH)はpH-応答性セグメント、poly(A-Hyp-OH)はいずれの条件でも水に可溶性水溶性ポリマーであった。また、体温付近でのLCSTを有する高分子構造体の構築を目指し、A-Hyp-OHとA-Pro-OHのRAFT共重合、続いてカルボン酸部位の選択的エステル化を行うことで温度応答性ランダム共重合体の精密合成に成功した。本来、室温付近にLCSTを持つプロリンメチルエステル誘導体 (A-Pro-OMe) と親水性の高いヒドロキシプロリンメチルエステル誘導体 (A-Hyp-OMe) の組成により相転移温度を任意に制御することが可能となった。

(4) pH-温度応答性ブロック共重合体

pH と温度といった異なる刺激にそれぞれ応答する多重刺激応答性ブロック共重合体の構築にも成功した。具体的には、プロリンのカルボン酸部位を保護した構造を有し、水溶液中でLCSTを示すPoly(A-Pro-OMe)を温度応答性セグメントに選択し、高分子弱電解質であるPoly(A-Pro-OH)をpH 応答性セグメントとして組み合わせることで、pH と温度に応答するブロック共重合体を構築した。一方、ランダム共重合体の場合は温度応答性を示すことなくpH 応答性のみ確認された。次に、カイロオプティカル特性をCD測定により評価した。ホモポリマー、ブロック共重合体、ランダム共重合の比較を行った所、ピークのシフトやコットン効果の大きな変化は観察されなかった。以上の結果より、本ブロック共重合体では、その組成によりカイロオプティカル特性を保持したまま刺激応答性を任意に制御できることを明らかにした。

(5) 2重温度応答性ブロック共重合体

温度応答性のPoly(A-Pro-OMe)と水溶性のPoly(A-Hyp-OH)セグメントとから成るブロック共重合体が20 付近でLCST、40 付近で上限臨界溶液温度(UCST)を示す2重温度応答性を有することを見出した。また、各セグメントの鎖長、組成、塩の添加等によりそれらの刺激応答性が制御できることも見出した。一方、ランダム共重合体では同様の組成比にもかかわらず、相転移挙動は全く観察されなかった。このことから本2重温度応答性はブロック共重合体に特有の挙動であることが明らかとなった。またDLS測定により、それぞれの温度で、 $d_h = 21 \text{ nm} \sim 2530 \text{ nm}$ と大きく異なった粒子径が観察された。さらに、この集合構造に対する温度、組成、pH、置換基の影響について検討を行い、2重温度応答性と高次構造との相関を詳細に評価した。

(6) 電子・光機能を持つブロック共重合体

特異な電子・光機能を有するカルバゾール部位を有するアミノ酸系ブロック共重合体の構築にも成功した。合成したアミノ酸系ブロック共重合体の各種溶液中における自己組織化、特異なカイロオプティカル挙動及び電子・光特性について検討した。その結果、合成したブロック共重合体は選択溶媒であるメタノールやアセトン中でミセルが形成されカルバゾール部位の局所濃度が増加し、そのため電子・光機能が大きく異なることが示唆された。また、カイロオプティカル特性も生成ポリマーが溶液中で形成する高次構造に大きく依存することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

H. Mori, S. Okabayashi, Synthesis, assembled structure, and chiroptical properties of amino acid-based amphiphilic block copolymers containing carbazole moiety, *Reactive and Functional Polymers*, 69, 441-449 (2009) 査読有

H. Mori, M. Matsuyama, T. Endo, Double-Hydrophilic and amphiphilic block copolymers synthesized by RAFT polymerization of monomers carrying chiral amino acids, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 210, 217-229 (2009) 査読有

H. Mori, M. Matsuyama, T. Endo, Assembled structures and chiroptical properties of amphiphilic block copolymers synthesized by RAFT polymerization of *N*-acryloyl-L-alanine, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 209, 2100-2112 (2008) 査読有

H. Mori, I. Kato, M. Matsuyama, T. Endo, RAFT Polymerization of acrylamides containing proline and hydroxyproline moiety: controlled synthesis of water-soluble and thermoresponsive polymers, *Macromolecules*, 41, 5604-5615 (2008) 査読有

森秀晴、遠藤剛、RAFT重合による機能性高分子の精密合成、*高分子論文集*、Vol. 64、No. 10、655-664 (2007) 査読有

H. Mori, H. Iwaya, T. Endo, Structures and chiroptical properties of thermoresponsive block copolymers containing L-proline moieties, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 208, 1908-1918 (2007) 査読有

H. Mori, H. Iwaya, T. Endo, Controlled synthesis of thermoresponsive polymer via RAFT polymerization of an acrylamide containing L-proline moiety, *Reactive and Functional Polymers*, 67, 916-927 (2007) 査読有

[学会発表](計 11件)

岡林佐和、森秀晴、カルバゾール基とプロリン部位を有する両親媒性ブロック共重合体の合成、2008 高分子学会東北支部研究発表会、仙台、2008年11月14日、B13

加藤育巳、森秀晴、遠藤剛、プロリンから誘導される刺激応答性ブロック共重合体の合成とカイロオプティカル特性、第 57 回高分子討論会、大阪、2008 年 9 月 25 日、2D16

加藤育巳、森秀晴、遠藤剛、プロリン含有モノマー類の RAFT 重合による二重応答性ブロック共重合体の精密合成とその刺激応答性、第 57 回高分子年次大会、横浜、2008 年 5 月 30 日、3F07

庄司高、森秀晴、界面活性剤類似構造を有するアクリルアミド誘導体の RAFT 重合、第 57 回高分子年次大会、横浜、2008 年 5 月 29 日、2C02

岡林佐和、森秀晴、Alain Deffieux、Redouane Borsali、カルバゾール部位を有するアミノ酸系ブロック共重合体の合成と解析、第 57 回高分子年次大会、横浜、2008 年 5 月 30 日、3F04

H. Mori, T. Endo, Controlled synthesis of polyacrylamides containing amino acid moieties via RAFT and their stimuli-responsive properties, International Symposium on Advanced Macromolecules and Nano-materials with Precisely Designed Architectures (ISAMN '07), Sapporo, Japan (October 4, 2007), PP.61-62.

加藤育巳、森秀晴、遠藤剛、RAFT 重合によるヒドロキシプロリン部位を側鎖に有する温度応答性ポリマーの精密合成、第 56 回高分子討論会、名古屋、2007 年 9 月 19 日、1Pd018

松山元信、森秀晴、遠藤剛、キラリティー及び特性の異なるアミノ酸から成るブロック共重合体の精密合成と高次構造解析、第 56 回高分子討論会、名古屋、2007 年 9 月 21 日、3Pa005

加藤育巳、松山元信、森秀晴、遠藤剛、側鎖にヒドロキシプロリン部位を有するアクリルアミド誘導体の RAFT 重合と生成ポリマーのコンホメーション、第 56 回高分子年次大会、京都、2007 年 5 月 29 日、1Pc027

松山元信、森秀晴、遠藤剛、親水性及びキラリティーの異なるアミノ酸から成るブロック共重合体の精密合成、第 56 回高分子年次大会、京都、2007 年 5 月 30 日、2Pa035

岩谷英之、森秀晴、遠藤剛、温度応答性を有するアミノ酸系ブロック共重合体の精密合成と自己組織化構造、第 56 回高分子年次大会、京都、2007 年 5 月 30 日、2Pb036

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://polyweb.yz.yamagata-u.ac.jp/~morilab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 秀晴 (MORI HIDEHARU)

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：00262600

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者