

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21223

研究課題名(和文) 酵素を架橋点としたゲルの力学刺激による基質特異性の変化

研究課題名(英文) Changes in substrate specificity due to mechanical stimulation of gel with enzyme as a cross-linking point

研究代表者

小林 裕一郎 (Yuichiro, Kobayashi)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：10739676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：酵素を架橋点とするゲル合成法を確立した。この際、酵素の触媒活性が減少する原因が共有結合による導入であることを突き止め、環状分子の空洞を線状分子が貫通するロタキサンという超分子を用いて、それを介して酵素をゲルの架橋点として導入することで、共有結合導入時よりも酵素の触媒活性を保ったまま導入することの出来る手法を確立した。この際、本研究のロタキサン形成の際の知見により、超分子硫黄ポリマーや2本差ロタキサン形成を経由した環状高分子合成という申請者の研究を発展させるシーズも発見した。本研究にて得られた環状高分子合成というシーズを将来的にはバイオマテリアルに発展させる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

触媒は均一触媒と不均一触媒に大別される。それぞれの利点と欠点は均一触媒は高い触媒活性と分離が困難な点、不均一触媒は分離が簡単な反面、低い触媒活性である。本研究では、ロタキサンを介した修飾法が固体支持体へ修飾する際に、共有結合で直接修飾する従来の方法よりも触媒活性の減少を抑えて、活性を保ったまま就職できることが分かった。工業利用には一般的に不均一触媒が使用されていることから、応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：I established a gel synthesis method using the enzyme as a cross-linking point. In this process, I found that the catalytic activity of the enzyme decreased due to covalent bond introduction, thus we used a supramolecule called rotaxane, in which a linear molecule penetrates the cavity of a ring molecule, and introduced the enzyme through it as a cross-linking point of the gel, thereby maintaining the catalytic activity of the enzyme better than when covalent bond introduction is performed. The method was established to enable the use of the same technology. The findings of this study on rotaxane formation also led to the discovery of the seeds for the synthesis of supramolecular sulfur polymers and cyclic polymers via double-differential rotaxane formation, which will be developed by the applicant. The cyclic polymer and supramolecular polysulfide polymer synthesis obtained in this research will be developed into biomaterials in the future.

研究分野：超分子 高分子 酵素

キーワード：ゲル 酵素 ロタキサン 超分子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

酵素は特定の化学反応を常温常圧で極めて効率的・高選択的にそして有機溶媒フリーで行うことができる究極の分子触媒である。これは我々の身体が水で出来ており、体温が一定であるのに加え、身体の中には数万種類の化合物が含まれており、これらの化合物間でたまたまに化学反応が起こると生命を維持するのは困難であるため、特定の化合物に対して必要な反応のみを行い、目的とする化合物に変える必要があったためである(基質特異性)。一方で汎用性という意味では基質特異性には物足りなさを感じる。触媒として使用する際にはあらゆる化合物を触媒する方が望ましい。酵素の基質特異性を可能にしているのは酵素の活性部位の構造で、その構造を変化させる方法としては遺伝子改変が一般的である(T. R. Ward et. al. Chem. Rev. 2018)。この方法により活性部位の構造を自在にデザイン可能となったが、特殊な技術、そして手間と時間がかかるため結局は汎用性に欠ける。そこで本研究では、最も簡便な刺激である力学的な圧力によって酵素の構造を変化させる手法を提案する。酵素をゲルの架橋点として導入し、そのゲルに負荷をかけることで架橋点である酵素に力が集中することで酵素の構造が変化し、基質特異性を変化させることが出来ると考えた。

### 2. 研究の目的

研究全体の構想は、まずゲルへの酵素の修飾法の確立にはじまり、修飾の際に酵素活性を損なわない方法の開発、そして力学応答による酵素活性の変化を達成する。本助成期間においては、酵素のゲルへの修飾と酵素活性を損なわないゲルへの修飾方法の確立に挑戦した。

### 3. 研究の方法

酵素を共有結合と非共有結合を介してゲルへ修飾し、その酵素活性を溶液中の酵素活性と比較することで評価する。当研究室ではこれまでにゲルへの糖の修飾方法を確立しており、それを本研究へ応用した。アクリルアミド(AAm)と AAm 基が修飾された西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP monomer)を水中で共重合することで HRP 修飾ゲルを得た。異なる手法として、アクリル酸 *N*-スクシンイミジルと AAm を共重合した後に、そのポリマー中のスクシンイミジル基と HRP 中のアミンを反応させることで、HRP 修飾ゲルを作製する方法を試みた。得られた HRP 修飾ゲルは残存する未反応のモノマーなどを除くために大量の溶媒で洗浄した。

### 4. 研究成果

HRP monomer 溶液(32 mg/mL)を AAm 溶液(2 M)へ所定量添加し、そこへペルオキシ 2 硫酸アンモニウムと *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミンを添加した後にモールドへ素早く注ぎ、4 °C にて 1 晩静置し、重合した。HRP monomer 溶液 260  $\mu$ L 以上添加した際にゲル化が確認された。このゲルは 2 日間大量のバッファーで洗浄してもゲルのままであった。また、タンパク質を編成させることで知られるメルカプトエタノールとドデシル硫酸ナトリウムを添加すると、ゲルの膨潤が確認された。これは架橋点となっている HRP の構造がメルカプトエタノールとドデシル硫酸ナトリウムの添加により折りたたみ構造から直鎖構造になったことにより架橋点間距離が増大したため、膨潤したのだと考えられる。これらの結果から、HRP ゲルの合成が確認された。

AAm と *N*-スクシンイミジルを共重合したポリマーを得た後に、そのポリマーと HRP を反応させた。ポリマーの溶解度が最も高い条件において、反応物が逆さにしても落下しない状態になったが、2 日間洗浄操作を行うと、溶解した。この結果から、本手法においては HRP を架橋点としたゲルを得ることは出来なかった。

これらの結果から、HRP monomer を用いて共重合する手法が HRP を架橋点とするゲルを作製する方法として適していることが確認された。

HRP ゲルの触媒活性を調査した。HRP ゲルは過酸化水素水存在下で HRP の基質の 1 つである 2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)二アンモニウム塩の酸化反応を促進した。この際、酸化反応の速度が溶液中よりも 1/10 に減少していた。このまま調査を行った際の誤差が大きくなるため、触媒活性を保ったままゲルへ修飾する方法の開発が必要であることが分かった。

目的達成のためには、酵素活性を低下させずに高分子を修飾する必要がある。そこで、申請者はロタキサンという環状分子の空洞部を線状分子が貫通し、その末端を環状分子の空洞よりも大きい分子でキャップした構造の超分子に着目した。この分子の特徴は線状分子と環状分子間に共有結合が存在しないため、環状分子が線状分子を自由に運動できることである。ロタキサン中の環状分子に酵素を修飾出来れば、酵素活性を保ったまま人工高分子を修飾できると考えた。

グルコース 7 つが連結した環状分子である  $\beta$ -シクロデキストリン( $\beta$ CD)に重合基を修飾した(AAm $\beta$ CD)。AAm $\beta$ CD とアゼライン酸を水中で混合して擬ロタキサンを形成させた後に、水系縮合剤である 4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリドとプロパルギル基を修飾した *Z*-チロシンを添加して室温で攪拌することでロタキサンを得た。得られたロタキサンのビニル基と HRP 中の SH 基をチオールエン反応で連結することで、ロタキサ

ン修飾 HRP を得た。合成の確認は MALDI-TOF MS 測定にて native HRP と比較して高分子量側に分子量のピークトップがシフトしたことから確認した。末端をアジド化したポリ AAm と得られたロタキサン修飾 HRP のクリック反応を水中にて行った。GPC 測定にて、ポリ AAm 修飾後に高分子量側へピークシフトが観測されたことからポリ AAm の修飾が確認された。

得られたロタキサンを介してポリ AAm を修飾した HRP と、ロタキサンを介さずポリ AAm を修飾した HRP、そして native HRP の触媒活性の評価を行った。すると、native HRP とくらべてロタキサンを介さずポリ AAm 修飾 HRP の触媒活性は 1/8 まで減少していたのに対し、ロタキサンを介してポリ AAm を修飾した HRP は触媒活性の減少が 1/2 程度であった。これらの結果から、ロタキサンを介した高分子修飾法は、酵素活性を保ったまま高分子を修飾する方法として有効であることが示された。

#### 研究成果のまとめ

ロタキサンを介して酵素へ高分子を修飾することで、従来の直接高分子を酵素へ修飾するよりも酵素活性を保ったまま高分子を修飾することが可能であった。また、酵素を架橋点とするゲルを作成する手法は、高分子間を酵素で修飾するよりも、複数の重合基を有する酵素モノマーを合成した後に共重合する方法の方が有効であることが示された。本研究のロタキサン作製は溶液中のものに加えてバルク重合にでも行った。これらの知見から、ロタキサンを介した環状高分子合成や硫黄ポリマー合成へのシーズが発見された。今後、酵素のテーマに加えて、これらのテーマも発展させていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Yuichiro, Murata Keisuke, Harada Akira, Yamaguchi Hiroyasu	4. 巻 56
2. 論文標題 A palladium-catalyst stabilized in the chiral environment of a monoclonal antibody in water	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 1605 ~ 1607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9CC08756G	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Yuichiro, Kohara Kenji, Kiuchi Yusuke, Onoda Hiroki, Shoji Osami, Yamaguchi Hiroyasu	4. 巻 56
2. 論文標題 Control of microenvironment around enzymes by hydrogels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 6723 ~ 6726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CC01332C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Yuichiro, Harada Akira, Yamaguchi Hiroyasu	4. 巻 56
2. 論文標題 Supramolecular complex formation of polysulfide polymers and cyclodextrins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 13619 ~ 13622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CC06571D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Yuichiro	4. 巻 53
2. 論文標題 Precise synthesis of polyrotaxane and preparation of supramolecular materials based on its mobility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 505 ~ 513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41428-020-00455-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamagishi Yuki, Kobayashi Yuichiro, Horiguchi Akiyoshi, Kitano Daiki, Yamaguchi Hiroyasu	4. 巻 7
2. 論文標題 Supramolecular Polysulfide Polymers with Metal Ligand Interactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ChemistrySelect	6. 最初と最後の頁 e202103991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/slct.202103991	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 木内佑輔・山崎誠司・小原健司・牧野早恵・小林裕一郎・山口浩靖
2. 発表標題 熱応答性高分子を用いた酵素反応制御
3. 学会等名 第14回バイオ関連シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田佳祐・小林裕一郎・山口浩靖・原田明
2. 発表標題 パラジウム錯体に結合するモノクローナル抗体を利用した不斉触媒システムの創製
3. 学会等名 第30回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林裕一郎・原田明・山口浩靖
2. 発表標題 超分子硫黄ポリマー：硫黄とスチレンの共重合ポリマーとメチル化 シクロデキストリンを有するポリロタキサンの合成と今後の展望
3. 学会等名 第3回 高分子化学構造・物性相関研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林裕一郎・原田明・山口浩靖
2. 発表標題 超分子硫黄ポリマー：硫黄ポリマーを線状分子とするポリロタキサン
3. 学会等名 第9回JACI/GSCシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林裕一郎・原田明・山口浩靖
2. 発表標題 硫黄とスチレンの共重合ポリマーとメチル化 シクロデキストリンを有するポリロタキサンの合成とその特性評価
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田佳祐・安達琢真・小林裕一郎・原田明・山口浩靖
2. 発表標題 遷移金属錯体とモノクローナル抗体で構成される高度なエナンチオ選択的反応場
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀口顕義・山岸 佑輝・小林 裕一郎・山口浩靖
2. 発表標題 硫黄単体からなる直鎖分子とヘテロ分子含有化合物との反応生成物のキャラクタリゼーション
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀口顕義・山岸佑輝・小林裕一郎・山口浩靖
2. 発表標題 環状硫黄を原料としたポリチオウレタンの合成
3. 学会等名 第70回高分子年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岸佑輝・小林裕一郎・山口浩靖
2. 発表標題 2-ウレイド-4(1H)-ピリミジノンの水素結合を用いた超分子硫黄ポリマーの合成
3. 学会等名 第70回高分子年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木内佑輔・後藤亜希・小林裕一郎・原田明・山口浩靖
2. 発表標題 ルテニウムイオン存在下でのポリアクリルアミドの凝集およびゲル接着挙動
3. 学会等名 第70回高分子年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岸佑輝・北野大輝・堀口顕義・小林裕一郎・山口浩靖
2. 発表標題 2,2'-ピピリジン-銅( )錯体を用いた主鎖型超分子硫黄ポリマーの合成
3. 学会等名 第18回ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林裕一郎・原田明・山口浩靖
2. 発表標題 硫黄含有ポリマーを線状分子としたポリロタキサンの合成とその特性評価
3. 学会等名 第37回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻佳弘・小林裕一郎・山口浩靖・原田明
2. 発表標題 -シクロデキストリンとポリエチレングリコールからなる擬ポリロタキサンを利用した環状高分子の合成
3. 学会等名 第37回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岸佑輝・北野大輝・堀口顕義・小林裕一郎・山口浩靖
2. 発表標題 金属錯体を用いた主鎖型超分子硫黄ポリマーの合成
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口浩靖・安達琢真・村田佳祐・山崎誠司・小原健司・小林裕一郎・原田明
2. 発表標題 生体/合成分子のハイブリッド化による機能性人工金属酵素の創製
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 辻佳弘・小林裕一郎・山口浩靖・原田明
2. 発表標題 -シクロデキストリンとポリエチレングリコールからなる包接錯体を利用した環状高分子合成
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 裕一郎・山岸 佑輝・堀口顕義・北野大輝・山口浩靖
2. 発表標題 水素結合や配位結合を用いた超分子硫黄ポリマーの合成
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林裕一郎
2. 発表標題 超分子錯体による機能性ポリマー材料の開発と超分子硫黄ポリマーの合成
3. 学会等名 第68回高分子研究発表会(神戸)(招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 硫黄含有高分子材料及びその製造方法	発明者 小林裕一郎、原田明、山口浩靖	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-082858	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 硫黄含有化合物及び高分子材料	発明者 小林裕一郎、山岸佑輝、堀口顕義、北野大輝、山口浩靖	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-080034	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------