

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23750119

研究課題名(和文) 任意の厚みを有する糖鎖高分子からなるグライコカプセルの作製と利用

研究課題名(英文) Preparation and application of glycocapsules with tailored wall thicknesses

研究代表者

桑折 道济 (KOHRI MICHINARI)

千葉大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：80512376

研究成果の概要(和文)：糖鎖含有材料の開発は、医療診断材料等への応用から重要な課題である。本研究では、糖鎖高分子からなるグライコカプセルの作製法の開発ならびに高感度なレクチン認識材料としての応用を検討した。結果として、カプセルの内部空間の大きさとシェル層の厚みを任意に可変な新規高分子カプセル材料の作製に成功した。また、糖鎖高分子シェル層がレクチン認識能へ与える影響を詳細に検討し最適構造を見いだした。

研究成果の概要(英文)： In this study, we have successfully demonstrated the preparation of polymer brush capsules that had tailored hollow core sizes and capsule wall thicknesses. In addition, we utilized surface-initiated living radical polymerization technique for surface modification of particles with glycopolymers, and effects of graft shell thickness and compositions on lectin recognition of glycoparticles were investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |

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：高分子カプセル, 糖鎖高分子, レクチン, 表面開始グラフト重合

1. 研究開始当初の背景

生体内で糖鎖は各細胞の表層、つまり界面に高密度に存在していることから、糖鎖を表面に有する材料は、レクチン(糖鎖を特異的に認識するタンパク質)や病原菌の検出材料として有用である。これまでに、基板・微粒子等の表面へ糖鎖を導入した糖鎖被覆材料の開発・応用研究が活発に行われている。また、高分子からなるカプセル材料は、医薬品用カプセルや光学材料などとして、さまざまな分野で利用されている。糖鎖高分子からなるカプセル材料を作製することで、新たなレクチン認識材料の作製や、標的志向型 DDS 担体としての利用が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、これまであまり議論されなかったことのない糖鎖高分子からなるグライコカプセルを作製し、高感度なレクチン認識材料としての応用を目指して実験を行った。この手法を確立するにあたり、カプセルの内部空間の大きさ、シェル層の厚みを任意にデザインした新規高分子カプセル材料の作製法の開発と、糖鎖高分子シェル層がレクチン認識能へ与える影響の詳細な検討を目的とした。また、より多機能なカプセル材料の作製を目指し、蛍光性カプセルの作製についても検討した。

3. 研究の方法

糖鎖高分子被覆微粒子の作製とレクチン認識挙動の解析

スチレン(St)と ATRP 開始基を含む 2-(2-クロロプロピオニル)エチルメタクリレート(CPEM)とのソープフリー乳化重合により、表面に ATRP 開始基を有するコア粒子を合成した。トリス[(2-ピリジルメチル)アミン]を配位子に有する銅錯体と、L-アスコルビン酸とを用いて、コア粒子表面からの 4-ビニルベンゼンスルホンアミドエチル 1-チオ-β-D-グルコピラノシドと 4-ビニルベンゼンスルホンアミドエチル 1-チオ-β-D-ラクトシド(1, Fig. 1)の ATRP により、コア-シェル粒子を調製した。導入した糖鎖の認識機能を評価するため、糖鎖に特異的に結合するタンパク質であるレクチンを用いて実験を行なった。レクチンには、グルコースやマンノースと特異的に結合するコンカナバリン A(Con A)ならびにガラクトースと特異的に結合するピーナツレクチン(PNA)を用いた。

高分子ブラシからなる高分子カプセル作製法の開発

テンプレートのポリスチレン微粒子とドーパミンならびに ATRP 開始基を導入したドーパミンを塩基性条件下で保つことで、粒子表面を、ATRP 開始基を導入したポリドーパミンで被覆した。その後、モノマーを重合し高分子ブラシを付与後、テンプレートを除去することで、ポリドーパミン薄膜を下地とする高分子ブラシからなるカプセル材料の作製を行った。また、導入した高分子ブラシ層のポスト機能化により蛍光性カプセルの作製を試みた。

4. 研究成果

糖鎖高分子シェル層がレクチン認識能へ与える影響

はじめに、高感度レクチン認識を達成するにあたり、糖鎖高分子シェル層の長さならびに組成がレクチン認識能へ与える影響の詳細な検討を行なった。グルコースならびにラクトースを導入した粒子は、それぞれ Con A ならびに PNA を添加した際にのみ粒子が凝集して沈殿が生じた。Con A ならびに PNA は水中で四量体を形成しているため、粒子間架橋により凝集が促進されたためと考えられる一方、対応しないレクチンを加えた場合は目視による凝集は確認されなかった。なお、コア粒子に Con A または PNA を加えた場合はいずれも凝集沈殿し、これは物理吸着による非特異的なタンパク質の吸着がおこったためである。これらより、親水性の高い糖鎖高分子グラフト鎖の構築により、糖鎖に対する特異的な認識能を付与できただけでなく、非特

異的なタンパク質の結合も抑制できることがわかった(文献 4)。

精密重合によるグラフト鎖構築のメリットとして、重合度の制御(糖鎖導入量)やブロック共重合体の構築が容易であることがあげられる。ATRP は優れた手法であるが、糖鎖モノマーを重合する際に使用する水媒体中では、しばしば銅触媒が失活するなどの問題が起こる。そこで、照射のみでリビング的に重合を制御可能な光イニフィーター重合によるグラフト鎖構築を検討した(Fig. 1)。上述の ATRP 開始基を有するコア粒子に *N,N*-ジエチルジチオカルバメートナトリウム塩(NaDC)を反応させ、表面の ATRP 開始基をイニフィーターに置換したコア粒子を作製した。ラクトース残基を有する糖鎖モノマー1の光イニフィーター重合(400 W, $\lambda=365$ nm)を行い、照射時間(重合時間)とモノマー濃度を制御することで、糖鎖高分子シェル層がそれぞれ 17, 32, 110 nm のコア-シェル粒子(GP(17), GP(32), GP(110))を調製した。アンスロン-硫酸法によりラクトースの導入量を算出したところ、それぞれ粒子 1 mg あたりに 16.3, 30.3, 57.5 μ g のラクトース残基が導入されていることがわかった。PNA 添加による特異的凝集実験を行ったところ、GP(17), GP(32), GP(110)の順番に、つまりシェル層の厚みの薄い粒子ほど、少量の PNA で凝集することがわかった。これはシェル層が薄いと PNA による粒子間架橋が効率よく形成されるためである(Fig. 2(a))。一方、シェル層が厚いと各粒子のグラフト鎖間で PNA が多点結合し、粒子間架橋が抑制されるためと考えられる(Fig. 2(b))。

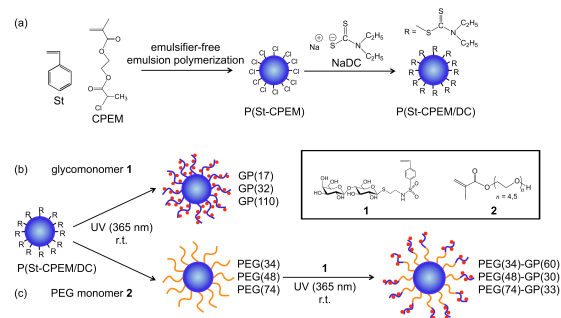


Fig. 1 Preparation methods for the (a) polystyrene particles bearing photoiniferter-initiating groups (P(St-CPEM/DC)) and for the (b) glycopolymer- and (c) di-block copolymer-grafted polystyrene particles using surface-initiated photoiniferter polymerization.

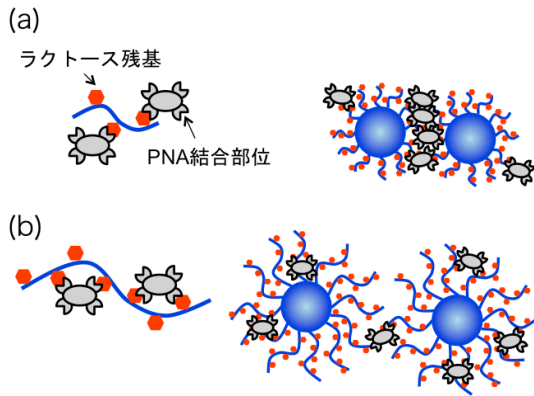


Fig. 2 Binding models of (a) short glycopolymer-lectin and (b) long glycopolymer-lectin.

より詳細なレクチン吸着挙動を検討するため、動的光散乱法(DLS)によるレクチン添加前後のラクトースを有するラテックス粒子の粒子径変化を測定した。その結果、目視による実験と同様に、PNA添加にともなう凝集が観測された。また、目視の実験では凝集が認められなかったCon Aを添加した場合も、DLS測定では一部の粒子が凝集している様子が観測された。これは、マイクロな領域ではタンパク質の非特異的凝集を抑制しきれていないためである。そこで、高い水和能と排除体積効果に基づくタンパク質の吸着抑制能の高いPEG鎖と、糖鎖高分子のジブロックグラフト鎖を構築した。PEG₄MA(2)の光イニフィーター重合により48 nmのPEGグラフト層(PEG(48))を作製後、糖鎖モノマー1の光イニフィーター重合で30 nmの糖鎖高分子グラフト層を作製した(PEG(48)-GP(30))。このPEG(48)-GP(30)粒子もPNA添加により凝集が観測された。一方、Con Aを添加した際、非特異的凝集に起因する粒子の凝集はDLSによっても観測されなかった。ラテックス粒子表面を精密にデザインし望みの機能を付与出来る可能性が示された(文献1, 3)。

新規高分子カプセル材料の作製法の開発

糖鎖高分子ブラシからなるカプセル材料作製のため、カプセル材料作製のための新たな手法の開発を試みた(Fig. 4)。ドーパミン(DA)と ATRP 開始基を導入したポリドーパミン(DA-BiBB)の比率を変化し実験を行なったところ、PDAの膜厚と ATRP 開始基導入量が制御でき、かつほとんど着色のないPDAによるPSt微粒子表面被覆が可能であることがわかった(Fig. 5)。さらに、モデルモノマーとして選択したヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)の ATRP によりポリマーブラシを付与後、コア粒子を除去した。ATRP前はPDA薄膜が薄いためカプセル構造を維持できない

一方、高分子ブラシを付与することで、PDA薄膜を下地とするPHEMAからなるカプセルが得られることがわかった(Fig. 6)。

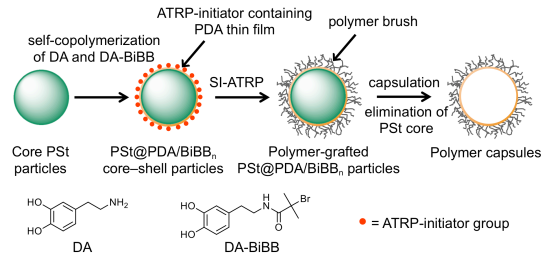


Fig. 4 Schematic representation of the preparation of polymer capsules using a PDA thin layer as a foundation for polymer brushes.

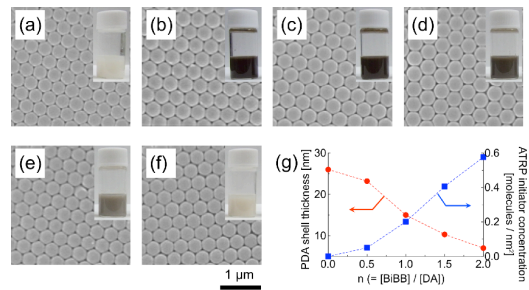


Fig. 5 Photographs of PSt@PDA/BiBB_n core-shell particles with $n =$ (a) 0, (b) 0.5, (c) 1, (d) 1.5, and (e) 2, and (f) PSt core particles in water. Solid content: 0.25 wt%. (g) PDA shell thickness and ATRP-initiator concentration with different n values ($[BiBB]/[DA]$). PDA shell thickness was determined by SEM micrographs. ATRP initiator concentrations were measured by conductometric titration.

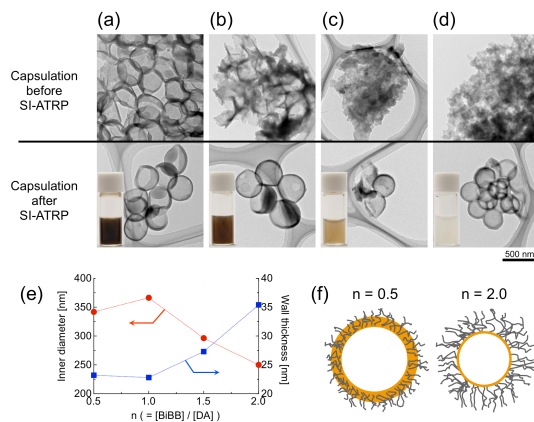


Fig. 6 TEM micrographs of (upper row) PDA capsules and (lower row) PHEMA capsules

based on PDA thin layers prepared from PSt@PDA/BiBB_n core-shell particles with (a) 0.5, (b) 1, (c) 1.5, and (d) 2. Insets show photographs of the dispersed solution of capsules in water. Solid content: 0.10 wt%. (e) Capsule inner diameter and wall thickness with different n values determined using TEM. (f) Schematic illustration of PHEMA capsules with different n.

さらに、本手法では、コア材料の大きさによりカプセル内径を 100 nm から 3 μm に、高分子ブラシの重合度によりカプセル厚みを 20 nm から 100 nm の間で制御でき、用途に応じて大きさを可変なことがわかった (Fig. 7) (文献 2)。

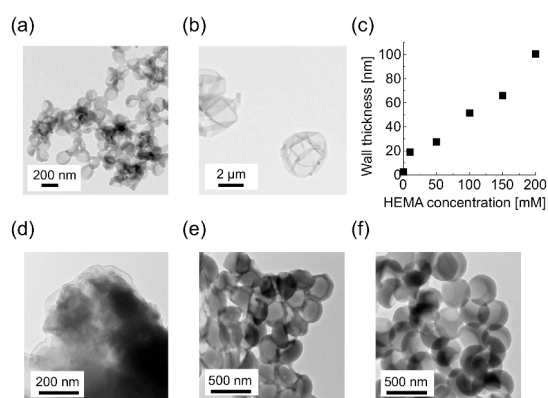


Fig. 7 TEM micrographs of PHEMA capsules prepared by (a) small template (particle diameter: 188 nm) and (b) large template (particle diameter: 3,120 nm). (c) Wall thickness as a function of HEMA concentration at the SI-ATRP from PSt@PDA/BiBB₂ core-shell particles. Wall thickness was measured using SEM. TEM micrographs of PHEMA capsules. (d) HEMA concentration: 10 mM, (e) 100 mM, and (f) 200 mM.

上記のように、架橋高分子である透明ポリドーパミン薄膜を下地とする高分子ブラシからなる新しいタイプのカプセル材料の作製に成功した。今後、ブラシに用いる高分子を前述の糖鎖高分子に変えることで、様々な大きさの糖鎖高分子ブラシからなるカプセル材料を作製し、レクチン認識挙動の詳細な検討を行う予定である。

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 13 件)

(1) ラテックス粒子の生化学的分野への応

用, 桑折道済, 谷口竜王, 日本接着学会誌, 2013, 49, 164-170.

doi:10.1016/j.eurpolymj.2011.09.016

(2) A colorless functional polydopamine thin layer as a basis for polymer capsules, M. Kohri, H. Kohma, Y. Shinoda, M. Yamauchi, S. Yagai, T. Kojima, T. Taniguchi, and K. Kishikawa, Polym. Chem., 2013, 4, 2696-2702.

doi: 10.1039/C3PY00181D

(3) Effects of graft shell thickness and compositions on lectin recognition of glycoparticles, M. Kohri, F. Abo, S. Miki, T. Fujii, M. Kasuya, and T. Taniguchi, J. Colloid Sci. Biotechnol., 2013, 2, 45-52. doi.

org/10.1166/jcsb.2013.1028

(4) Preparation and lectin binding specificity of polystyrene particles grafted with glycopolymers bearing S-linked carbohydrates, M. Kohri, M. Sato, F. Abo, T. Inada, M. Kasuya, T. Taniguchi, and T. Nakahira, Eur. Polym. J., 2011, 47, 2351-2360.

他 9 件

[学会発表] (計 41 件)

(1) カラーレスなポリドーパミン薄膜を下地とする高分子ブラシカプセルの作製, 桑折道済・高麗寛人・篠田義弘・谷口竜王・岸川圭希, 日本化学会第 93 春季年会 (2013 年 3 月 22 日 (金)~25 日 (月), 滋賀)

(2) 高分子薄膜を下地とする高分子ブラシからなるカプセル材料, 高麗寛人・桑折道済・谷口竜王・岸川圭希, 第 17 回高分子ミクロスフェア討論会 (2012 年 11 月 7 日 (水)~9 日 (金), 仙台)

(3) 表面開始イニフーター重合を用いた糖鎖高分子グラフト化高分子微粒子の調製とレクチン認識能の評価, 阿保英美奈・三木翔・春谷昌克・桑折道済・谷口竜王・中平隆幸, 第 1 回 CSJ 化学フェスタ (2011 年 11 月 13 日 (日)~15 日 (火), 東京)

(4) 高分子微粒子表面でのイニフーター重合による糖鎖高分子シェル層の構築, 阿保英美奈・三木翔・藤井誠子・桑折道済・谷口竜王・中平隆幸, 第 60 回高分子討論会 (2011 年 9 月 28 日 (水)~30 日 (金), 岡山)

他 37 件

[その他]

ホームページ等

<http://chem.tf.chiba-u.jp/gacb03/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑折 道濟 (KOHRI MICHINARI)
千葉大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：80512376

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：