

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410132

研究課題名(和文) ペプチドのフォールディング機能を利用した多重応答ハイブリッドポリマーの設計

研究課題名(英文) Dual Stimuli-Responsive Self-Assemblies from Elastin-Synthetic Hybrid Graft-Copolymers

研究代表者

東 信行 (Higashi, Nobuyuki)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：10156557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチドと合成ポリマーをハイブリッド化させることによる新しい分子システムの構築が本研究の主たる目的である。ペプチド・セグメントとして温度にตอบสนองしてコンフォメーション変化(フォールディング)するエラスチン類似ペプチド(ELP)に着目し、これをpH応答型ポリマーであるポリアクリル酸やポリアリルアミンにグラフト鎖として導入することにより、二重刺激にตอบสนองする新しいタイプのペプチド・ポリマーハイブリッドの創成に成功した。また、これらポリマーから交互積層膜を調製し、温度変化によるELP部位の極性転移に基づいて構造色が可逆的に変化することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The main purpose of this research is to fabricate a novel molecular system, in which artificial polymers are conjugated with bio-related peptides as graft chains. An elastin-like peptide (ELP), which is known to take thermo-responsive conformational transition, has been employed as a peptide and attached to the pH-responsive poly(acrylic acid) and poly(allylamine) as graft chains. These conjugates have successfully shown LCST (lower critical solution temperature) behaviors responsive to dual stimuli of pH and temperature. The alternate layer-by-layer assembly prepared from such anionic and cationic conjugates has shown a reversible structural color variation based on thermo-induced polarity change of ELP chains.

研究分野：高分子化学

キーワード：ペプチド・ポリマーハイブリッド 多重応答ポリマー エラスチン類似ペプチド フォールディング
グラフトポリマー 下限臨界溶液温度 構造色

1. 研究開始当初の背景

外部刺激にตอบสนองして形状や物性が変化する高分子の開発は、新規高機能材料の創製につながる。特に、異種の刺激応答部位を有する高分子を設計し、それらを相互に作用させることで単一の刺激応答性のみでは生み出せない精密かつ多様な物性や構造の制御が可能となる。こうした背景から、近年多重刺激応答性高分子の研究が盛んに展開されており、ドラッグ・デリバリー・システム(DDS)や分子分離膜、アクチュエーターなどへの応用が期待されている。またこのような刺激応答性高分子をその特性を維持した状態で薄膜化できれば、表面コーティング剤やセンサー材料など応用領域を更に拡張することも可能となろう。高機能薄膜の開発のために、近年、交互積層(Layer-by-Layer, LbL)法を用いた高分子薄膜の調製が注目されている。Decher ら¹⁾によって初めて報告された交互積層法は、ポリイオンの静電相互作用を用いた積層型の超薄膜作成法である。交互積層法には静電相互作用の他に高分子の水素結合性や特異な架橋構造などを用いることができる。言い換えれば、交互積層法を用いれば、利用したい高分子の物性を考慮した薄膜が作成できることになる。本手法によって得られる薄膜は、利用する高分子を厳密に設計し利用することで、ゲルや多孔性といった新たな物性を固体表面に付与できる点や、支持基板から脱離させることで自己支持型の柔軟なフィルムとして活用できるなどの多くの利点をもつ。また、特殊な装置を用いることなく薄膜を調製できることから、高機能性材料の生産性の観点からも有用である。

2. 研究の目的

本研究では交互積層化した際に、外部環境の変化によって劣化しにくく、外部刺激の付加で制御できる新規多重刺激応答性高分子を調製することを目的とした。具体的には、ポリイオンに温度応答性ペプチドをグラフト化させることで、静電相互作用による交互積層化と刺激応答性を両立させる戦略である。そこで、ペプチドとして温度応答性を有するエラスチン類似ペプチド(ELP)の利用に着目した。エラスチンは種々の組織、臓器の弾性線維の主要タンパク質であり、大動脈をはじめ、靭帯、肺、皮膚、弾性軟骨などに存在し特徴的な粘弾性をもつ²⁾。エラスチンを構成している配列の中でも、特徴的な Val-Pro-Gly-Val-Gly の繰り返し配列が最も多く存在することが知られている。このペプチドからなる ELP は、合成高分子のポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAAm)³⁾と同様に水中で温度変化に伴い、可逆的な相転移(LCST 現象)を示す⁴⁾。これは、低温域ではペプチド鎖が不規則なランダムコイル構造をとり十分に水和されることで溶解しているが、温度上昇に伴い疎水性残基が脱水和し、ペプチド鎖が規則的なβ-

ターン構造に折りたたまれることで親水性から疎水性へと極性がスイッチし、凝集するためである。PNIPAAm と異なり、ELP はアミノ酸配列を変えることで 0 ~ 100 °C 間で幅広い LCST の調節が可能である⁵⁾。また、ELP は高い生体適合性を有しており、生体関連材料への応用を目指す場合にも有利である。そこで、鋭敏な温度応答性部位と pH 応答性部位を共に有する高分子鎖を設計するために、塩基性のポリアリルアミン(PAAm)に ELP (20 量体) を様々なグラフト率で導入した PAAm-g-ELP(m) を新規に設計した(図 1)。具体的には、Val-Pro-Gly-Val-Gly の繰り返し配列からなる ELP にスパーサーを介してカルボキシル基を導入し、PAAm 側鎖アミン部位と縮合させることで合成した。また、酸性のポリアクリル酸(PAAc)をベースとした ELP ハイブリッド PAAc-g-ELP(m) を用いて、基板上に静電相互作用による交互積層膜の調製も行った。ここではこれら多重刺激応答性ペプチド-ポリマーハイブリッドの LCST 挙動と、PAAc-g-ELP(2I)/PAAm-g-ELP(2I) 交互積層膜のキャラクタリゼーションの結果を中心に述べる。

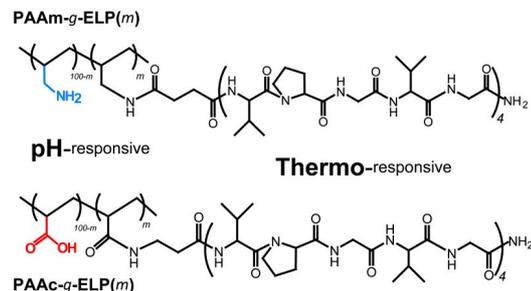


図 1. 本件研究で合成したグラフト型ハイブリッドの分子構造(PAAm-g-ELP(m)、PAAc-g-ELP(m)).

3. 研究の方法

(1) 試薬 ペプチド合成に用いた Fmoc-NH-SAL-MBHA 樹脂, Fmoc-Pro はペプチド研究所社, Fmoc-Val, Fmoc-Ile, Fmoc-Ala, Fmoc-Gly, 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)は渡辺化学工業株式会社から、無水コハク酸, N,N-ジイソプロピルカルボジイミド(DIPC), トリエチルアミン(TEA), N,N-ジメチルホルムアミド(DMF), ジクロロメタン(DCM), トリフルオロ酢酸(TFA), は和光純薬工業株式会社からそれぞれ購入し、特に精製することなくそのまま用いた。ポリ(アリルアミン塩酸塩)(M.w. 150,000)はニッポーメディカル株式会社から戴いた。ピペリジンはナカライテスク株式会社から、縮合剤の 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(DMT-MM)は国産化学株式会社からそれぞれ購入した。

(2) PAAm-g-ELP, PAAc-g-ELP の合成 2 種

の ELP は Fmoc 固相合成法により合成した。末端に COOH 基をもつ ELP は、ペプチド合成の最後に無水コハク酸で処理したのち、樹脂から切り出して合成した。末端にアミノ基をもつ ELP は、ペプチド合成の最後に Fmoc- β -アラニン を反応させた後、樹脂から切り出して合成した。これら ELP をそれぞれ PAAm または PAAc に DM-TMM を縮合剤に用いて反応させ、目的のグラフトポリマーを得た。構造(グラフト率 m)は $^1\text{H NMR}$ により評価した。

(3) 測定 CD スペクトルの測定は日本分光社製 J-820 型を用いて行った。光路長 1 mm の石英セルを用いて測定した。積算回数は 4 回、走査速度は 100 nm/min で行った。温度依存性を測定する場合は、日本分光社製 PTC-423L 型ペルチェ式恒温装置と LAUDA 社製 E200 を用い、温度勾配 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ で、その温度に達してから 50 秒後に測定を行った。濁度測定は日本分光社製 J-820 型を用いて行った。光路長 1 cm の石英セル、温度変化は日本分光社製 PTC-423L 型ペルチェ式恒温装置と LAUDA 社製 E200 を用いて温度勾配 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ で行った。700 nm の吸光度が 50% 変化したときの温度を LCST とした。LbL 法による積層プロセスは、島津製作所製 UV-2100 分光光度計と日本分光社製 J-820 型を用いて、UV-vis スペクトルの 230 – 195 nm に見られる各ハイブリッドのペプチド結合由来の吸収と、CD スペクトルの 224 nm に見られる β -ターン由来の負の極大吸収の増加を追跡することによって検討した。また、膜厚の検討には、AFM (ピーコインストルメンツ社製 Nanoscope a)を用いて、コンタクトモードで測定した。

4. 研究成果

(1) PAAm-g-ELP(m) の二次構造の温度依存性：まず PAAm-g-ELP(m) の希薄水溶液中での二次構造特性について、グラフト率 m の影響も踏まえて検討することにした。なお、ペプチドセグメント濃度は、超純水で 180 μM 程度として CD スペクトルを測定した。図 2(a) に、一例として PAAm-g-ELP(24) の水中における CD スペクトルの温度依存性を示した。低温域 (5°C) において ELP セグメントは、198 nm 付近にペプチド結合の π - π^* 遷移に基づく負の極大吸収が観察され、ランダムコイル構造を形成していることがわかる。温度上昇に伴ってランダムコイルに基づく 198 nm 付近の吸収が正に増加しており、ランダムコイル構造が減少したことが確認できた。また、高温域では 220 nm 付近に型の β -ターン特有の負に凸の吸収が確認でき、温度上昇に伴った構造変化を示すことがわかった。また、このときの昇温および降温過程におけるランダムコイルに基づく 198 nm のモル楕円率 ($[\theta]_{198}$) の変化をプロットし (図 2 (b))、構造転移の熱可逆性について

検討した。 5°C では $[\theta]_{198} = -8500$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) と高いモル楕円率を示したものが、温度上昇に伴いゆるやかに減少していき、 80°C では $[\theta]_{198} = -2800$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) となった。 80°C に達してから再び 4°C まで下降させていくと、 $[\theta]_{198}$ は昇温過程の軌跡をたどるように再び負に増加して $[\theta]_{198} = -8000$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) にまで戻り、ほぼ完全に熱可逆的であることがわかった。グラフト

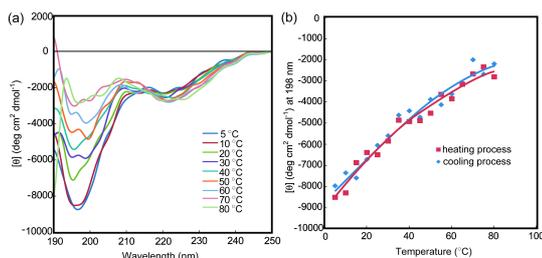


図 2. PAAm-g-ELP(24)水溶液(pH 6.0)の CD スペクトル(a)ならびに 198 nm におけるモル楕円率(b)の温度依存性。

率が変わっても $[\theta]_{198}$ 値には多少の違いは認められるが基本的には図 2 (b)と同様の傾向が観察された。酸性型の PAAc-g-ELP(m) についても同様の検討を行ったところ、やはり $[\theta]_{198}$ 値の温度依存性は緩やかなものであった。すなわち、昇温に伴ってランダムコイルから β -ターンへと徐々に folding した。

(2) PAAm-g-ELP(m) の LCST 特性：図 3 (a) に、pH 10 の水中における様々な濃度の PAAm-g-ELP(24) の 700 nm における濁度変化 (昇温過程) を示す。濃度が 0.05 から 1.0 wt% へと高くなるにつれて濁度が上昇し始める温度が低温側へシフトしていき、さらにより狭い温度範囲で急激に濁度が増加していることがわかる。また、1.0 wt% 以上の濃度ではほぼ同様の温度応答性を示した (LCST)。ELP の二次構造転移は、先述の通り緩やかであったが、濁度の変化はこのように極めて急峻であることは重要である。

次に PAAm-g-ELP(m) の多重刺激応答性を検討するため、pH を変化させて PAAm-g-ELP(m) の水中での会合特性を検討した。一例として図 3 (b) に、異なる pH の水中における PAAm-g-ELP(24) (1.0 wt%) の

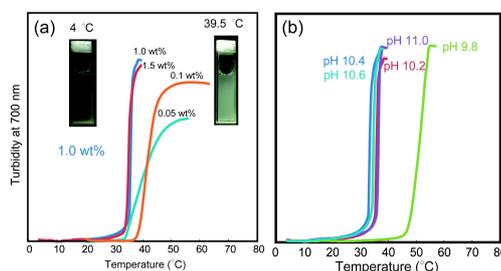


図 3. PAAm-g-ELP(24)水溶液(pH 10)の様々な温度における濁度測定の結果 (a). LCST(1 wt%) の pH 依存性 (b)。

濁度変化を示す．中性及び酸性条件下では温度上昇に伴う濁度変化を示さないが，pH 9.8 以上では LCST 挙動を示すことがわかる．また，pH を 9.8 から上昇させると LCST の低温側への急激なシフトが観察された．pH 10.4 以上の pH 領域では LCST 挙動の鋭敏さと LCST の値にほとんど変化が見られない．この傾向はグラフト率が変わっても類似していた（図 4）．図 4 には，酸性型の **PAAc-g-ELP(m)** の結果と以前報告した dendritic 型 ELP⁶⁾ の結果も含めて比較した．とくに，酸性型の PAAc に PNIPAM をグラフト化した Hoffmann ら⁷⁾ の二重応答性 ($\Delta\text{pH} = 3$ の変化で $\Delta\text{LCST} \sim 18^\circ\text{C}$) と比較してわれわれの **PAAc-g-ELP(m)** は $\Delta\text{pH} = 3$ の変化で $\Delta\text{LCST} \sim 40^\circ\text{C}$ となり，LCST の pH 応答範囲が格段に拡張されている事がわかる．これは先に述べた ELP の緩やかなコンフォメーション変化の結果であると考えている．また，この図よりわかるように，種々のポリマー骨格に ELP をグラフト鎖として導入したペプチド・ポリマー・ハイブリッドを用いることで，およそ pH 3 から pH 11 におよぶ広範囲の pH 領域において自在に LCST を制御できる ($20 \sim 80^\circ\text{C}$) ことが明らかとなった．

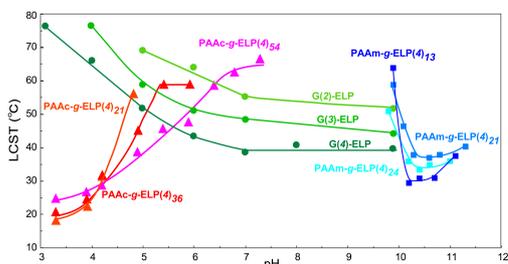


図 4 . 3 種の ELP-ポリマーハイブリッドの LCST と pH の関係 .

(3) LbL 膜の調製とその構造：まず，積層に用いた石英基板をスチレン・アクリル酸コポリマーでディップコートしたのち，塩基性 **PAAm-g-ELP(21)** 水溶液 (0.1 mg/mL) に 60 分浸漬した．洗浄の後，今度は酸性の **PAAc-g-ELP(21)** (0.1 mg/mL) 水溶液への浸漬と洗浄を行うことで 2 層積層させた．この操作を交互に繰り返すことで積層膜数の異なる様々な **PAAc-g-ELP(21)/PAAm-g-ELP(21)** LbL 膜を調製した．なお，積層は，ELP 部位のコンフォメーションや極性状態を考慮して 4°C (水和コイル状態) または 45°C (脱水した folding 状態) の水中で行った．石英基板上にそれぞれの温度で調製した **PAAc-g-ELP(21)/PAAm-g-ELP(21)** LbL 膜の UV-vis スペクトルにもとづく 195 nm の吸光度と積層膜数の関係を図 5 (a) にプロットした．いずれの積層条件で調製した LbL 膜でも吸光度は積層回数に対してほぼ直線的に増

加した．しかしながら 45°C で積層した場合， 4°C よりも 1 層あたりの吸光度の増大は著しい．図 5 (b) には CD スペクトルの β ターン構造由来の $[\theta]_{224}$ 値の関係をプロットした． 4°C および 45°C で調製した薄膜は共に積層回数の増加に伴うほぼ直線的なモル楕円率の負の増大が見られたが UV-vis スペクトルの結果と同様に， 45°C 下で調製した積層膜の 1 層あたりの $[\theta]_{224}$ の絶対値の増加は 4°C 条件下よりも著しいことがわかる．そこで，**PAAc-g-ELP(21)/PAAm-g-ELP(21)** LbL 膜の膜厚の直接測定を試みた．膜厚は AFM のコンタク

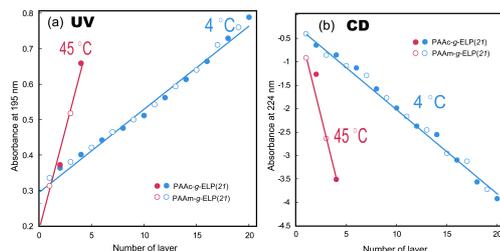


図 5 . 4°C と 45°C における交互積層プロセスの UV (a) および CD (b) スペクトルによる追跡結果 .

トモードを用い，カンチレバーで LbL 膜をスクラッチして高さ分析をすることで評価した．その結果， 45°C で調製した 4 層 LbL 膜の膜厚は $41 \sim 44 \text{ nm}$ で， 4°C で調製した 20 層 LbL 膜の膜厚は $57 \sim 65 \text{ nm}$ であった．すなわち， 45°C で調製した場合，薄膜膜厚は 1 層あたり 10 nm であり， 4°C では 2.9 nm であることになる．これは，温度によってグラフト鎖 ELP の状態が異なることを意味している．すなわちコンフォメーションの変化とそれに伴う極性変化が反映した結果であると考えている．

最後にこれら LbL 膜の構造色について検討した．図 6 (a) はシリコンウエハーにことなる温度で積層した時の色調変化を示した．いずれの温度においても明らかな構造色が認められ，興味深いことに， 45°C で 3 層 (または 5 層) 積層した膜と 4°C で 10 層 (または 20 層) 積層した膜が同一色を示すことがわかる．すなわち，図 5 の結果と

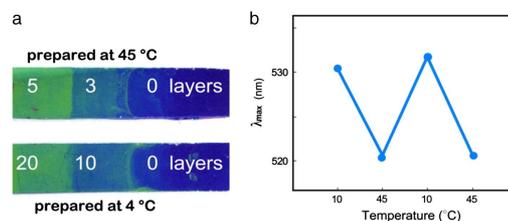


図 6 . 交互積層膜の積層数と構造色 (a) . 温度変化による極大吸収波長 (λ_{max}) の可逆的返歌 (b) .

対応して，一層当りの膜厚 (層間隔) が 45°C で積層した方が 4 倍程度大きいことになる．図 6 (b) は， 4°C で 10 層積層した LbL 膜の温度変化による λ_{max} の変動を示したもので

ある .10°C と 45°C の水中に膜基板を浸漬したときに、明らかに膜厚の変化にともなって 10 nm もの λ_{max} のシフトが可逆的に生じることが明らかとなった。

(4) 結言：ELP を合成高分子のグラフト鎖に導入することで特徴ある多重応答特性を付与でき、ELP, 合成高分子の単体での利用では確認できないような、pH 変化に応じた LCST 挙動を示すことを明らかにした。次いで、ELP を側鎖に有するポリイオンの特性を活かし、静電相互作用を利用することで温度応答性積層膜の調製に成功し、この薄膜は積層回数と温度条件を制御することで膜厚を変化させることができた。また、このハイブリッド積層膜は構造色を呈し、温度によって ELP の folding を誘起して可逆的な色調変化を示すことを明らかにした。

<引用文献>

- G. Decher, *Science*, **277**, 1232-1237 (1997).
D.W. Urry, T. Hugel, M. Seitz, H. E. Gaub, L. Sheiba, J. Xu and T. Parker, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **357**, 169-184 (2002).
H. G. Schild, *Prog. Polym. Sci.*, **17**, 163-178 (1992).
D.W. Urry, *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **57**, 23-57 (1992).
D. W. Urry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32**, 819-841 (1993).
T. Koga, M. Iimura and N. Higashi, *Macromol. Biosci.*, **12**, 1043-1047 (2012).
G. Chen, A. S. Hoffman, *Nature*, **373**, 49-52 (1995).

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6件)

- 西村 慎之介・古賀 智之・東 信行, Coiled-coil型三分岐ペプチドの自己組織化によるナノ構造形成, *高分子論文集*, **査読有**, Vol. 73, No. 2, 175-182 (2016). DOI:10.1295/koron.2015-0060
T. Koga, K. Nakamoto, K. Odawara, T. Matsuoka, N. Higashi “Fabrication of Thermo-Responsive Molecular Layers from Self-Assembling Elastin-Like Oligo-peptides Containing Cell-Binding Domain for Tissue Engineering,” *Polymers*, **査読有**, **7**, 134-146 (2015). DOI:10.3390/polym 7010134
N. Higashi, R. Sonoda, T. Koga, Thermo-Responsive Amino Acid-Based Vinyl Polymers Showing Widely Tunable LCST/UCST Behavior in Water, *RSC Adv.*, **査読有**, **5**, 67652-67657 (2015). DOI: 10.1039/c5ra13009c
T. Koga, K. Mima, T. Matsumoto, N. Higashi, “Amino Acid-Derived Polymer with

Changeable Enzyme Degradability based on pH-Induced Structural Conversion from Polyester to Polyamide,” *Chem. Lett.*, **査読有**, **44**(12), 1720-1722 (2015). DOI: 10.1246/cl.150880

N. Higashi, K. Yasufuku, Y. Matsuo, T. Koga, “Thermo-Responsive Multilayer Films from Ionic Polymers with *Elastin*- Like Peptide as Graft Chains,” *Colloid Interface Sci. Commun.*, **査読有**, **1**, 50-53 (2014). DOI: 10.1016/j.colcom.2014.07.002

[学会発表](計15件)

- 「グラフト型アミノ酸由来ビニルポリマーの合成と温度応答性表面の設計」平田 絢葉・古賀 智之・東 信行 [日本化学会第96 春季年会(2016) (同志社大学,京田辺キャンパス)3/24-27, 2016]
「様々なイオン性ポリマーの相互積層法を利用した自己支持性ナノフィルムの創製」大野 雅未・古賀 智之・東 信行 [第 64 回高分子学会年次大会 (札幌コンベンションセンター)5/27-29, 2015]
「スパイダーシルクをモデルとしたペプチド・マルチブロックポリマーの調製力学・自己修復特性」森下 友亮・古賀 智之・東 信行 [第 63 回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場)5/28-30, 2014]
「アラニン由来のビニルモノマーを用いた二重温度応答性ブロックコポリマーの合成と特性」関根 大輝・古賀 智之・東 信行 [第 60 回高分子研究発表会(神戸) (兵庫県民会館)7/ 24-25, 2014]
”Time-limitable Hydrogels Controlled by Peptide Self-Assembly” N. Higashi, Y. Nikaido, T. Koga, [27th Conference of European Colloid and Interface Society (ECIS2013) (Sofia, Bulgaria), 9/1-6, 2013]
「ペプチド・ミメティクスの自己組織化を利用したナノ構造材料の創成」東 信行 [第 62 回高分子討論会 (金沢), 9/11-13, 2013] (招待講演)

6. 研究組織

(1)研究代表者

東 信行 (HIGASHI, Nobuyuki)
同志社大学・理工学部・教授
研究者番号：10156557