

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25620099

研究課題名(和文) 巨視的機能発現を目指した金属ポルフィリン・配位子導入ゲル集積システムの構築

研究課題名(英文) Establishment of Gel-Assembly System with Metalloporphyrins and Ligands towards the Creation of Macroscopic Functions

研究代表者

山口 浩靖 (YAMAGUCHI, Hiroyasu)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00314352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：金属ポルフィリンとアミノ酸の配位結合により高分子ヒドロゲルが自己集積するシステムを構築した。鉄ポルフィリン(Fe-Por)とL-ヒスチジン(L-His)をそれぞれポリアクリルアミドゲルに導入した。Fe-PorゲルとL-Hisゲルを緩衝液中で振とうすると、接触すると同時に2種類のゲルが接着した。Fe-PorゲルとL-Hisゲルの集積体にL-Hisの水溶液を添加すると、個々のゲルに解離した。これらのゲルを洗浄すると再びゲルが自己集積した。このゲル着脱は可逆的なpH応答性を示した。

研究成果の概要(英文)：A gel assembly was formed via metal-ligand interactions using polyacrylamide modified with iron-porphyrin (Fe-Por) and L-histidine (L-His) moieties. The Fe-Por gel and the L-His gel immediately adhere to each other upon agitation in an 80 mM Tris-acetate buffer (pH 9.0). The assembly of the Fe-Por gel with L-His gel showed a pH dependency. The L-His gel formed an assembly with the Fe-Por gel at pH 9.0, however, no assembly of gels was observed at pH 2.0. Agitation in an aqueous solution containing an 60 mM L-His causes the assembly of the Fe-Por gel and L-His gel to dissociate, then washing with a fresh buffer reassembles the gel pieces. The binding and dissociation of the Fe-Por gel with the L-His gel are found to be reversible.

研究分野：高分子化学

キーワード：配位結合 金属ポルフィリン アミノ酸 分子認識 高分子ヒドロゲル 接着 可逆性 pH応答性

### 1. 研究開始当初の背景

自己修復材料や刺激応答性材料の創製、持続可能な社会に貢献できる環境に配慮した材料の創製に関心が寄せられている。これらの材料創製では、非共有結合を介した物質集積システムが最適であると考えられる。しかし、非共有結合の科学・超分子科学において実用に耐えうる機能性材料を創製することは最も重要な課題の一つである。2011年、ホスト分子とゲスト分子をそれぞれゲルに導入し、2種類のゲルがホスト-ゲスト相互作用により特異的に自己集積するシステムが開発された。分子レベルで起こっている「分子認識」をマクロスケールのゲルの接着として可視化することに成功している。水中でゲルを振とうするだけで集積させることができる。これらの巨視的ゲル接着はホスト-ゲストの相互作用により実現したものであるが、ホスト-ゲルト相互作用のみならず、その他様々な相互作用に基づいて材料を集積させることができると考えた。例えば、DNAやタンパク質における水素結合、解離基を有する分子間に働く静電相互作用、金属と配位子との配位結合、さらには疎水性相互作用(ファンデルワールス力に基づく集合系)など、あらゆる非共有結合で人工材料を自己集合させるシステムが可能になると予想される。本研究課題では、これらの非共有結合系の中で、金属-配位子の相互作用に注目した。特に、天然の金属ポルフィリンを補因子として活性・反応部位に持つ酵素を手本として、金属ポルフィリンと軸配位子をそれぞれゲルに導入することで、2種類のゲルが金属ポルフィリンと軸配位子との配位結合により接着し、この配位結合形成によりゲルが接着するとともに酸素脱着、酸化還元触媒、電子移動など、種々の機能を誘発するシステムが構築できると考えた。

### 2. 研究の目的

目で見える大きさの物体を接着させたり離したりしてマクロスケールで触媒活性のオン-オフを制御したい。この目的を達成するために、補因子を活性部位に有するタンパク質をモデルとした人工系高分子材料を設計する。この高分子材料が「金属-配位子相互作用」により接着することにより触媒機能をオンにするシステムを構築する。目で見える物体を溶液から引き上げるだけで触媒を反応系から取り除くことができ、接着していた物体を外すだけで触媒活性をオフにできる。有機金属触媒化学と高分子/超分子化学の概念を融合することにより新規機能性材料を開発する。「分子認識に基づくマクロスケールでの材料集積化」と「金属ポルフィリンと生体高分子との錯体形成による機能発現」を融合した新しい構想のもと、新材料を開発する。

### 3. 研究の方法

鉄ポルフィリン又はL-ヒスチジンを導入したポリアクリルアミドゲルを合成した。これら2種のゲルは、同一のプレカーサーゲルを経て合成した。プロトポルフィリン鉄錯体内の2つのカルボン酸の片方にアルキルジアミンを反応させて末端にアミノ基を導入し、N-ヒドロキシスクシンイミジルを側鎖に有するプレカーサーゲルと縮合反応を行うことにより鉄ポルフィリンゲルを合成した。同様に、L-ヒスチジンをプレカーサーゲルと反応させてL-ヒスチジンゲルを合成した。合成した2種類のゲルを水中で振とうさせて、2種類のゲルが接着するか否かを確認した。鉄ポルフィリンと軸配位子(L-ヒスチジン)のゲルへの導入率を変えて、それぞれのゲル間の接着挙動を観察するとともに、接着したゲルに関してはレオメーターによる応力測定により接着特性を定量化した。種々の金属イオンをポルフィリンヘメタレーション反応させて、生成する金属ポルフィリンとL-ヒスチジンとの配位に基づくゲル接着の可否を観察した。

接着したゲルが天然のカタラーゼやペルオキシダーゼのような酸化還元酵素と同様の触媒能を有するか、天然酵素とは異なる触媒能を有するかを検討した。

接着した2種類のゲル界面での金属 - 配位子の相互作用は外部刺激・化学物質応答性を示すと予想されるため、ポルフィリンの中心金属に配位可能なリガンド（競争的に軸配位する化学種）をゲル外部から添加して、ゲルの接着・解離を観察した。加温・冷却条件下でゲルの接着状況を観察した。ポルフィリンの中心金属を鉄から亜鉛に替え、本ゲル集積システムを比較検討した。また、L-ヒスチジンの代わりに、天然酵素ペルオキシダーゼのアポタンパク質を固定したゲルも合成し、鉄ポルフィリンゲルとの相互作用観察を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 配位結合を介した高分子ヒドロゲルの自己集積

鉄ポルフィリン(Fe-Por)と L-ヒスチジン(L-His)をそれぞれポリアクリルアミドゲルに導入した(図1)。Fe-Por ゲルと L-His ゲルを緩衝液中で振動すると接着した<sup>1</sup>。Fe-Por ゲル同士あるいは L-His ゲル同士ではこのようなゲルの接着は見られなかった。

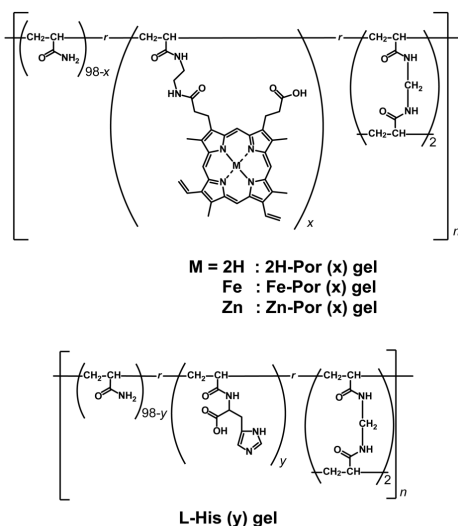


図1. 鉄ポルフィリンゲル (Fe-Por ゲル) とヒスチジンゲル (His ゲル) の化学構造

Fe-Por ゲルと L-His ゲルの集積体に L-His

の水溶液を添加すると、個々のゲルに解離した。これらのゲルを洗浄すると再びゲルが自己集積した。このゲル着脱は pH 応答性を示し、pH 9.0 では接着、pH 2.0 では解離した。鉄の代わりに亜鉛が配位した Zn-Por のゲルも合成し、Fe-Por、Zn-Por、L-His の3種ゲルを同時に振とうすると、L-His ゲルは強く配位する Fe-Por のゲルとのみ特異的に集積体を形成した(図2)。

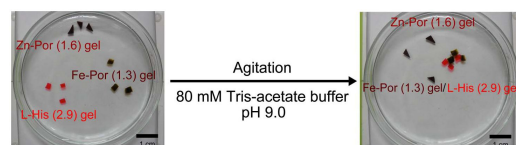


図2. His ゲル、Fe-Por ゲルと Zn-Por ゲルをバッファー中で振とうしたときの2種ゲル間での選択的自己集積

##### (2) アポタンパク質導入ゲルと補因子固定ゲルとの接着現象と触媒活性制御

ヘム酵素の一つである西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)から補因子を抜き出したアポタンパク質(apo-HRP)をポリアクリルアミドゲルに導入した。apo-HRP ゲルと Fe-Por ゲルを 4 °C にて接触させたところ、ゲルが接着した。種々の比較実験より、これらのゲルの接着が apo-HRP と Fe-Por の錯体形成に基づいていることがわかった。Apo-HRP ゲルと Fe-Por ゲル存在下、HRP の基質となる 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)の酸化反応を観察した。Apo-HRP ゲルと Fe-Por ゲルを接着させると ABTS の酸化反応速度が加速された。これに対し、apo-HRP ゲルと blank ゲル、blank ゲルと Fe-Por ゲルの組み合わせではこのような酸化反応は起こらなかった。ABTS の酸化反応速度は apo-HRP 及び Fe-Por のゲルの導入量および2種ゲルの接触面積に比例することがわかった。Apo-HRP ゲルと Fe-Por ゲルを接着させると ABTS の酸化反応が加速され、2種ゲルを離すと反応が進行しなくなった。ゲルの接着 - 解離によって触媒反応を制御で

きることがわかった。

<引用文献>

(1) Kobayashi, Y.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Reversible Self-Assembly of Gels through Metal-Ligand Interactions, *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1243.

#### 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8件)

(1) Kobayashi, Y.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Manual Control of Catalytic Reactions: Reactions by an Apoenzyme Gel and a Cofactor Gel, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16254 (査読有).

DOI: 10.1038/srep16254

(2) Kakuta, T.; Takashima, Y.; Sano, T.; Nakamura, T.; Kobayashi, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Adhesion between Semihard Polymer Materials Containing Cyclodextrin and Adamantane Based on Host-Guest Interactions, *Macromolecules* **2015**, *48*, 732-738 (査読有).

DOI: 10.1021/ma502316d

(3) 中畑雅樹, 高島義徳, 橋爪章仁, 山口浩靖, 原田明, 高分子側鎖におけるホスト-ゲスト相互作用を利用した酸化還元応答性超分子材料の創製, *高分子論文集* **2015**, *72*, 573-581 (査読有).

DOI: 10.1295/koron.2015-0019

(4) 関根智子, 高島義徳, 橋爪章仁, 山口浩靖, 原田明, ソフトマテリアル界面における共有結合形成を利用した接着, *高分子論文集* **2015**, *72*, 590-596 (査読有).

DOI: 10.1295/koron.2015-0040

(5) Nakamura, T.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Harada, A. A Metal-Ion-Responsive Adhesive Material via Switching of Molecular Recognition Properties,

*Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4622 (査読有).

DOI: 10.1038/ncomms5622

(6) Nakahata, M.; Mori, S.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Harada, A. pH- and Sugar-Responsive Gel Assemblies Based on Boronate-Catechol Interactions, *ACS Macro Lett.* **2014**, *3*, 337-340 (査読有).

DOI: 10.1021/mz500035w

(7) 山口浩靖, 生体分子と人工化合物の融合による超分子錯体の機能化, *高分子* **2014**, *63*, 43-44 (査読無).

<http://main.spsj.or.jp/c5/kobunshi/kobu2014/1401.html#43>

(8) Kakuta, T.; Takashima, Y.; Nakahata, M.; Otsubo, M.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Preorganized Hydrogel: Self-Healing Properties of Supramolecular Hydrogels Formed by Polymerization of Host-Guest-Monomers that Contain Cyclodextrins and Hydrophobic Guest Groups, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 2849-2853 (査読有).

DOI: 10.1002/adma.201205321

[学会発表](計30件)

下記21件とその他9件

(1) 内田雅之, 高島義徳, 山口浩靖, 原田明, シクロデキストリン修飾ポリマーを介したゲル接着, 日本化学会第96春季年会, 2016年3月24日 - 27日, 同志社大学京田辺キャンパス(京都府京田辺市).

(2) 内田雅之, 山口浩靖, 原田明, シクロデキストリン修飾タンパク質を介したゲル接着, 第64回高分子学会年次大会, 2015年5月27日 - 29日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市).

(3) 後藤亜希, 中村貴志, 高島義徳, 山口浩靖, 原田明, 塩化ルテニウム存在下における高分子ゲルの接着, 日本化学会第95春季年会, 2015年3月26日 - 29日, 日本大学船橋キャンパス(千葉県船橋市).

(4) 山口浩靖, 分子認識に基づく機能開拓 - 生体系と人工系のコラボレーション -, 国際高等研研究会「分子基盤に基づく生体機能への揺らぎとダイナミックネットワークの解明」2014年度第1回研究会, 2014年12月14日 - 15日, 国際高等研究所 (京都府木津川市). [招待講演]

(5) 後藤亜希, 中村貴志, 高島義徳, 山口浩靖, 原田明, 塩化ルテニウムが高分子ゲルを接着させる, 第63回高分子討論会, 2014年9月24日 - 26日, 長崎大学 (長崎県長崎市).

(6) 山口浩靖, 「生体」と「合成」の接点 - ハイブリッド化による高分子の機能化 -, 生物医工学サロン第56回集会, 2014年8月20日, 大阪大学豊中キャンパス (大阪府豊中市). [依頼講演]

(7) Yamaguchi, H.; Kobayashi, Y.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Harada, A. Self-Assembly of Polymer Gels through Metal-Ligand Interactions, International Symposium on Polymer Chemistry (PC2014), 2014年6月4日 - 7日, Shanghai, China. [招待講演]

(8) 山口浩靖, 生体高分子と合成高分子のハイブリッド触媒の開発, 産学高分子研究会, 2014年6月2日, 大阪大学豊中キャンパス (大阪府豊中市). [依頼講演]

(9) 山口浩靖, 超分子科学的アプローチによる階層制御型機能性材料の開発, 日本化学会第94春季年会, 2014年3月30日, 名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市). [特別講演]

(10) 小林裕一, 高島義徳, 橋爪章仁, 山口浩靖, 原田明, アポタンパク質/補因子導入ヒドロゲルを用いた不均一触媒システムとその反応制御, 日本化学会第94春季年会, 2014年3月29日, 名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市).

(11) 後藤亜希, 中村貴志, 高島義徳, 山口浩靖, 原田明, 金属塩溶液への浸漬による高分子ヒドロゲルの接着現象, 日本化学会第94

春季年会, 2014年3月29日, 名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市).

(12) 山口浩靖, 高分子を用いた見える化・機能化, 東工大資源研講演会, 2014年3月7日, 東京工業大学資源化学研究所 (神奈川県横浜市). [特別講演]

(13) Kobayashi, Y.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Control of Peroxidase Activity by Self-Assembly of Gels Bearing Apo-proteins and Co-Factors, The 1st. Kansai Nanoscience and Nanotechnology International Symposium, 2014年2月3日 - 4日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市).

(14) 小林裕一郎, 高島義徳, 橋爪章仁, 山口浩靖, 原田明, アポタンパク質と補因子を導入したゲルの自己組織化に基づく触媒活性制御, 第22回ポリマー材料フォーラム, 2013年11月28日, タワーホール船堀 (東京都江戸川区).

(15) Kobayashi, Y.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Control of Peroxidase Activity by Self-Assembly of Gels Bearing Apo-Proteins and Co-Factors, The 13th Pacific Polymer Conference, 2013年11月17日 - 22日, Kaohsiung, Taiwan.

(16) 山口浩靖, 自然から学ぶ高分子機能化学, 第81回高分子若手研究会[関西], 2013年11月16日, 大阪工業大学大宮キャンパス (大阪府大阪市). [招待講演]

(17) 小林裕一郎, 高島義徳, 橋爪章仁, 山口浩靖, 原田明, アポタンパク質ゲルと補因子ゲルからなる集積体の触媒活性のコントロール, 第7回バイオ関連化学シンポジウム, 2013年9月28日, 名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市).

(18) 山口浩靖, 接着・剥離の光スイッチング技術, 日本接着学会次世代接着材料研究会第6回例会, 2013年9月24日, 大阪市工業研究所 (大阪府大阪市). [招待講演]

(19) 小林裕一郎, 高島義徳, 橋爪章仁, 山口浩靖, 原田明, アポタンパク質と補因子の錯体形成を利用したゲルの自己集積と触媒活性制御, 第62回高分子討論会, 2013年9月11日, 金沢大学角間キャンパス (石川県金沢市).

(20) 竹田早波, 高島義徳, 山口浩靖, 原田明, 分子認識を介してゲルが集積することにより誘起される物質輸送, 第59回高分子研究発表会, 2013年7月12日, 兵庫県民会館 (兵庫県神戸市).

(21) Kobayashi, Y.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Reversible Self-Assembly of Gels through Metal-Ligand Interactions, 5th Gratama Workshop, 2013年5月30日, 東工大蔵前会館 (東京都目黒区).

〔図書〕(計3件)

(1) 山口浩靖, 元素ブロック導入ソフトマテリアルの自己組織化, *元素ブロック高分子 - 有機 無機ハイブリッド材料の新概念 -*, 中條善樹監修, シーエムシー出版, **2015**, 246-251.

(2) 山口浩靖, 自己組織化・自己集合性, *超分子材料の設計と応用展開*, 原田明監修, シーエムシー出版, **2014**, 10-20.

(3) 山口浩靖, 人工金属酵素の超分子的機能化, *超分子材料の設計と応用展開*, 原田明監修, シーエムシー出版, **2014**, 238-248.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 浩靖 (YAMAGUCHI Hiroyasu)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 00314352