

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15617

研究課題名(和文)高分子ゲル網目を活用した分子クラウディングモデルの構築

研究課題名(英文)Construction of the molecular crowding model utilizing the polymer hydrogels

研究代表者

呉羽 拓真(Kureha, Takuma)

弘前大学・理工学研究科・助教

研究者番号：60836039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体分子の機能を向上させる分子クラウディング効果を発揮する高分子ゲルネットワークを構築し、ゲル内部で生じる生体現象を評価する技術の開発を狙った。ゲル骨格には生体親和性が高く、温度応答性を有する高分子を選択し、内部の高分子密度とダイナミクスが異なるゲルを創製することができた。また、ゲルの物性や構造を動的な光散乱法や動的粘弾性測定により評価し、生体分子の拡散性や相互作用を制御するための設計指針を確立した。得られたゲル内部でRNAのダイナミクスを測定し、RNAの拡散性が低下したことを確認でき、分子クラウディング効果を発揮するゲルのモデル化を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内ではタンパク質や核酸が混み合った細胞内で機能している。この混み合った環境では希薄条件に比べ、タンパク質などの生体分子の活性度が向上し、我々の生命活動を支えており、この効果は分子クラウディング効果と呼ばれている。このメカニズムを解明または生体分子機能をさらに向上させるため、生体分子に高濃度の人工(合成)高分子を添加し、生体外で分子クラウディング効果を確かめる手法が適用されているが、実際に生体内で起きている現象は再現できていない。本研究では、合成高分子が架橋されたハイドロゲルを合成し、その内部で生体分子の運動や機能を評価する手法を開発した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the research project is to build a polymer gel network that exerts a molecular crowding effect and improves the function of biomolecules. In addition, to evaluate the biological phenomena that occur inside the gel, we developed the device that can measure dynamics of biomolecules. We prepared the gels having high biocompatibility and temperature responsiveness, and thus the gels with different polymer densities and dynamics were created. Moreover, the physical properties and structure of the gels were evaluated by dynamic light scattering and dynamic viscoelasticity measurements. As a result, the design guideline for controlling the diffusivity and interaction with biomolecules was established. Finally, the dynamics of RNA were measured inside the obtained gels, and it was confirmed that the diffusivity of RNA was reduced.

研究分野：化学

キーワード：ゲル 光散乱法 タンパク質 高分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内のタンパク質や核酸は、高濃度で混み合った分子クラウディング環境に存在する。この分子クラウディング環境下では、生体分子の活量とそれに付随する酵素反応活性や自己組織化挙動等の機能が劇的に向上する。

(2) 高分子ゲルは高分子が架橋された網目構造を有しており、自身の体積の多くが水であるため、生体親和性が高くバイオ・医療応用が期待される。申請者らは生体適合性が高く、外部刺激にตอบสนองするゲルを開発してきた。

2. 研究の目的

刺激応答性を有する高分子ゲルの構造とダイナミクスが制御された分子クラウディング環境を構築し、ゲル内部の生体分子機能を評価するための技術を開発する。

3. 研究の方法

(1) 構造とダイナミクスを制御した高分子ゲルの合成

生体適合性が高く、温度応答性を有する高分子であるポリ(オリゴエチレングリコール)メチルエーテルメタクリレート(以下、pOEG)を基本骨格として選択し、フリーラジカル重合により合成した。pOEGは側鎖のエチレングリコールのユニット数が変化することでตอบสนอง温度(LCST)が変化するため、エチレングリコールユニット数が異なる2種のOEGモノマーを共重合することで、ゲル全体の応答温度(体積相転移温度)を制御した。

(2) 高分子ゲルの構造・物性評価

上記(1)で合成したpOEGゲルの物性・構造評価を通じてモデル化を行った。まず動的光散乱法(DLS)により温度変化に伴うゲルの濃度ゆらぎの変化を測定し、体積相転移温度とゲル内部で形成する高分子鎖の凝集挙動を評価した。また、動的粘弾性測定により合成したゲルの貯蔵弾性率および損失弾性率を測定した。

(3) ゲル相図の作成と生体分子評価

pOEGゲルを合成するにあたり、ゲル化する条件を精査する必要がある。そこで、ゲル化に重要なパラメータであるOEGモノマー・架橋剤濃度を変更し、ゲル化相図を作成することでゲルネットワークの密度・ダイナミクス・温度応答性を制御する指針を立てることとした。また、分子クラウディング効果を評価するモデル生体分子として、がん細胞内で遺伝子発現を抑制するRNAを適用するため、動的光散乱法を適用し、ゲル内部でのダイナミクス評価が可能かを判断した。

4. 研究成果

(1) 温度応答性が異なるpOEGゲルの合成

pOEGゲルをエチレングリコールユニット数が異なる2種のOEGモノマーを水系フリーラジカル共重合により合成した(図1)。側鎖のエチレングリコール数が2つのp(MeO₂MA)(LCST: ~20)と4または5つ有するpOEGMA(LCST: ~64)を選択した。得られたゲルは、昇温

により高分子鎖が脱水和し、白濁することから温度応答性を示すことがわかった（図1）。

また、合成した一連のゲルを DLS により評価した。DLS 測定から得た自己相関関数から 2 種の運動モードを観測した（図2）。2 種の運動モードを記述する式によりフィッティングを行うことで得られるパラメータからゲル物性を解析した。自己相関関数で生じる最初モードはゲルの濃度ゆらぎを表す Fast モードであり、フィッティングから並進拡散係数を算出した。また、拡散係数から相関長を計算したところ、一連のゲルにおいて温度変化に対し相関長が発散する挙動を観察した（図2）。これは温度応答性ハイドロゲルに観測される典型的な挙動であり、発散する温度を体積相転移温度として定義した。その結果、LCST が低く、側鎖が短い p(MeO₂MA) のみからなるゲルや p(MeO₂MA) を多く含むゲルの体積相転移温度が低く、p(OEGMA) が多いゲルが高いことがわかった。実際に、体積相転移温度（臨界温度, T_c ）は共重合比に対して直線関係を示した。

続いて、2 つ目の運動モードは昇温により散乱寄与が増加し、緩和時間も増加したことからゲル内部で脱水和した高分子鎖同士が会合した疎水性ドメインの運動を反映していると考えた。また、共重合比の変化によって昇温による疎水性ドメイン由来の散乱寄与の増加量も変化した。p(MeO₂MA) が多いゲルは疎水性ドメインの散乱寄与の増大量が多く、p(OEGMA) ゲルはほとんど変化しなかった。これは p(OEGMA) の長い側鎖が立体障害となり高分子鎖の会合を抑制していると考えられた。

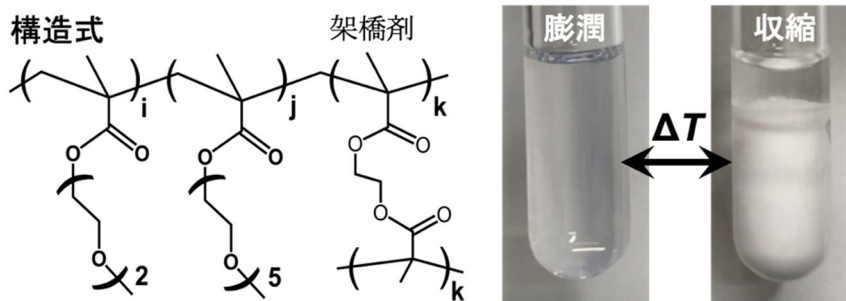


図1. pOEG ゲルの構造式と温度変化させた際の外観写真

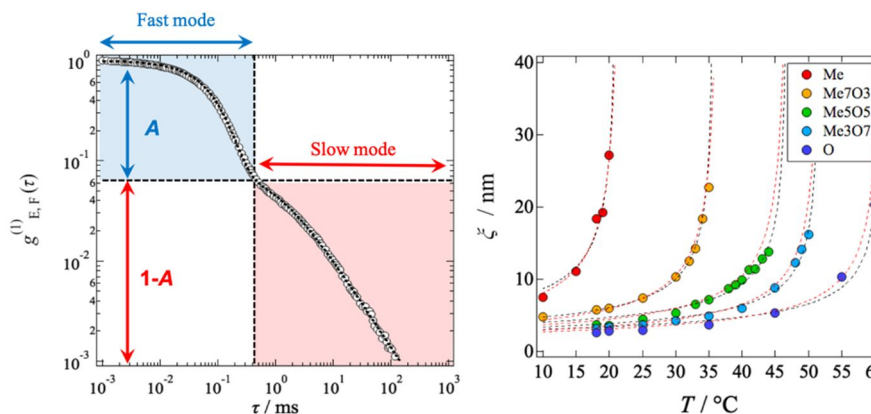


図2. DLS 測定から得た pOEG ゲルの自己相関関数と相関長の温度依存性

(2) pOEG ゲルの力学的特性の評価

上記(1)をさらに補足し、分子クラウディング環境として適した構造を見出すために、pOEG ゲルの力学的特性の温度依存性を評価した。これまでと同様に共重合比を変化させて合成した一連の pOEG ゲルに対し、動的粘弾性評価を実施した。その結果、昇温に伴い側鎖が短い p(MeO₂MA)成分が多いゲルの貯蔵弾性率が大きく増加するのに対し、p(OEGMA)成分が多いとほ

とんど変化が無いことがわかった(図3)。DLS 測定から得られた知見も統合すると、この結果は疎水性ドメインが形成し、一種の物理架橋点となることを示唆した。従って、(1)、(2)を踏まえた検討から分子クラウディング環境として pOEG ゲルが機能する際に、生体分子との相互作用や拡散性を制御するために重要な知見を見出すことができた。本成果はすでに学术论文として受理された。

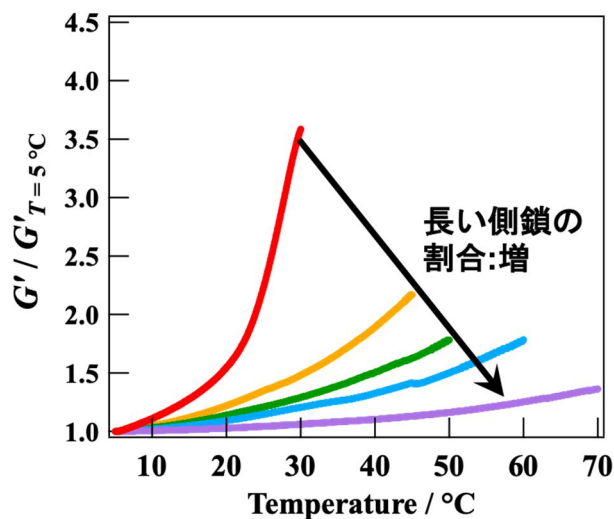


図3. pOEG ゲルの貯蔵弾性率(G')の温度依存性

(3) pOEG ゲルのゲル化相図と生体分子評価

ゲル内部で生体分子の機能を評価するため、pOEG ゲルのネットワーク密度とダイナミクスを制御する必要がある。そこで、低モノマー・架橋剤濃度のゲルの合成を試みた。しかし、条件によってはゲル化せず、ポリマー溶液(ゾル)が得られる結果となった。そこで、pOEG ゲルのゲル化相図を作成し、設計指針に取り入れる必要があると考えた。現状は、ゲル化できる最低モノマー濃度と架橋剤を決定することに成功し、本研究課題の目的である分子クラウディング効果を発現できる環境だけでなく、pOEG ゲルを応用するための研究にも有益な情報であると考えている。また、モデル生体分子である RNA の評価として、DLS を適用し、サイズ・サイズ分布を評価した。この結果を活用し、ゲル内部で RNA のダイナミクスを評価した結果、ゲルが無い場合に比べ RNA の拡散係数が減少し、RNA がゲルにより混み合った環境に存在するを確認することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7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 Honda Kenshiro, Sazuka Yuka, Iizuka Kojiro, Matsui Shusuke, Uchihashi Takayuki, Kureha Takuma, Shibayama Mitsuhiro, Watanabe Takumi, Suzuki Daisuke	4. 巻 58
2. 論文標題 Hydrogel Microellipsoids that Form Robust String Like Assemblies at the Air/Water Interface	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 7294 ~ 7298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201901611	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 Nishizawa Yuichiro, Matsui Shusuke, Urayama Kenji, Kureha Takuma, Shibayama Mitsuhiro, Uchihashi Takayuki, Suzuki Daisuke	4. 巻 58
2. 論文標題 Non Thermoresponsive Decanano sized Domains in Thermoresponsive Hydrogel Microspheres Revealed by Temperature Controlled High Speed Atomic Force Microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 8809 ~ 8813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201903483	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 Kureha Takuma, Minato Haruka, Suzuki Daisuke, Urayama Kenji, Shibayama Mitsuhiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Concentration dependence of the dynamics of microgel suspensions investigated by dynamic light scattering	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Soft Matter	6. 最初と最後の頁 5390 ~ 5399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9sm01030k	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 呉羽拓真、柴山充弘	4. 巻 68
2. 論文標題 光から観たゲル微粒子	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 高分子	6. 最初と最後の頁 497 ~ 498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 呉羽拓真	4. 巻 59
2. 論文標題 周囲の温度に応答する高分子ハイドロゲルの物性評価	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 物性研だより	6. 最初と最後の頁 7~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Kureha Takuma, Hiroshige Seina, Suzuki Daisuke, Sawada Jun, Aoki Daisuke, Takata Toshikazu, Shibayama Mitsuhiro	4. 巻 36
2. 論文標題 Quantification for the Mixing of Polymers on Microspheres in Waterborne Latex Films	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 4855 ~ 4862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.0c00612	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 Hiroshige Seina, Minato Haruka, Nishizawa Yuichiro, Sasaki Yuma, Kureha Takuma, Shibayama Mitsuhiro, Uenishi Kazuya, Takata Toshikazu, Suzuki Daisuke	4. 巻 53
2. 論文標題 Temperature-dependent relationship between the structure and mechanical strength of volatile organic compound-free latex films prepared from poly(butyl acrylate-co-methyl methacrylate) microspheres	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 345 ~ 353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41428-020-00406-6	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 Kureha Takuma, Hayashi Kyohei, Li Xiang, Shibayama Mitsuhiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Mechanical properties of temperature-responsive gels containing ethylene glycol in their side chains	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Soft Matter	6. 最初と最後の頁 10946 ~ 10953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0SM01436B	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 Nishizawa Yuichiro, Minato Haruka, Inui Takumi, Saito Ikuma, Kureha Takuma, Shibayama Mitsuhiro, Uchihashi Takayuki, Suzuki Daisuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Nanostructure and thermoresponsiveness of poly(N-isopropyl methacrylamide)-based hydrogel microspheres prepared via aqueous free radical precipitation polymerization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 13130 ~ 13137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1RA01650D	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9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 呉羽拓真、林恭平、Li Xiang、柴山充弘
2. 発表標題 感温性ハイドロゲルの物性評価
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林恭平、呉羽拓真、Li Xiang、柴山充弘
2. 発表標題 側鎖にエチレングリコールを有する温度応答性ゲルの力学特性
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 呉羽拓真、林恭平、Li Xiang、柴山充弘
2. 発表標題 動的光散乱法によるゲル材料のダイナミクス評価
3. 学会等名 第18回関東ソフトマター研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林恭平、呉羽 拓真、Li Xiang、柴山充弘
2. 発表標題 側鎖にエチレングリコール誘導体を有する温度応答性ゲルの力学評価
3. 学会等名 つくばソフトマター研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 呉羽拓真
2. 発表標題 臨界温度変調型ハイドロゲルの熱応答物性
3. 学会等名 第66回高分子研究発表会(神戸)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 呉羽拓真、広重聖奈、鈴木大介、澤田隼、青木大輔、高田十志和、柴山充弘
2. 発表標題 放射光X線散乱法による水系ラテックスフィルムのナノ構造解析
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 呉羽拓真、永瀬靖久、鈴木大介
2. 発表標題 高い再利用性を有する有機無機複合コアシェル型ゲル微粒子触媒
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 呉羽拓真
2. 発表標題 放射光X線散乱法による水系ラテックスフィルムの相互貫入解析
3. 学会等名 溶液化学若手の会オンラインシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 呉羽拓真、平山拓杜、高橋佑季、木田光、須田尚季
2. 発表標題 特異なナノドメインを有する温度応答性ハイドロゲルの構造物性解析
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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