

機関番号：12701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21750117

研究課題名(和文) アミノ酸含有ポリマーの動的結合再編成によるモノマー配列の制御と高次構造の創出

研究課題名(英文) Control of monomer unit sequences and creation of high-order structures by dynamic reorganization of polymers with amino acid structures

研究代表者

大山 俊幸 (OYAMA TOSHIYUKI)

横浜国立大学・工学研究院・准教授

研究者番号：30313472

研究成果の概要(和文)：

アミノ酸含有ジアミンモノマーを二硫化炭素と反応させたのちにジハロゲン化物モノマーと重縮合することにより、ジチオカルバメート基を主鎖中に有するポリペプチド類似ポリマーを合成した。このポリマーに光照射を行った結果、ジチオカルバメート基を介した動的な主鎖結合組換えが可能であることが明らかとなった。また、ポリ(L-リシン)の側鎖にイミン結合を導入し、低分子量アルデヒド存在下においてポリマー側鎖の組換え反応を行ったところ、比較的速やかな組換えの進行が確認された。

研究成果の概要(英文)：

Reaction of amino-acid-containing diamine monomers with carbon disulfide and the following polycondensation of the products with dihalide monomers afforded the corresponding polypeptide-like polymers with dithiocarbamate bonds in their main chains. Photo-irradiation to these polymers induced dynamic main-chain exchange through dithiocarbamates. Exchange reaction of imines introduced at side chains of poly(L-lysine) with low-molecular-weight aldehydes was also examined, and relatively fast imine-aldehyde exchange was observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：機能性高分子の合成と応用

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：動的共有結合、アミノ酸、ポリペプチド、ジチオカルバメート、結合組換え、高次構造

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は可逆的に天然状態までフォールディングし機能を発現することが知られている。フォールディングに必要な情報はモノマーであるアミノ酸の配列として記憶されているが、可逆的なフォールディングを可能にするモノマー配列の設計原理は分かっ

ていない。一方、フォールディングの理論的解析によると、エネルギー的に安定な単一のコンホメーションにフォールディング可能なポリマーはフォールディング・ファネルと呼ばれる漏斗状のエネルギー曲面をもつ。ポリマーがファネル型のエネルギー曲面をもつためには、以下の条件が必要とされている。

- ・ 様々な相互作用が可能な多種のモノマー（ヘテロモノマー）からなるヘテロポリマーである。
- ・ フラストレーションが最小となる配列でモノマー単位がヘテロポリマー中に配列している（フラストレーションとは、ヘテロポリマー鎖がフォールディングした時にモノマー単位間で生じる相互作用の矛盾）。

Pandeらは、ヘテロモノマー群を最も安定に相互作用できる状態に保持し速やかに重合すると、元のモノマーの相互作用状態がポリマー配列および最安定コンホメーションとして記憶され、可逆的フォールディングが可能なヘテロポリマーが得られることを理論的に示している。この理論考察に基づき、我々はビニルモノマーである種々のN-アクリロイルペプチドをターゲット分子存在下において光ラジカル重合し、ターゲット分子の情報がモノマー配列および配列に基づく高次構造として記憶されたポリマーの合成を試みたが、明確な情報刷り込み効果は観測されなかった。これは、主に以下の原因によると考えられる。

- a) Pandeらは、熱力学的に最も安定な状態で強く相互作用したモノマー同士がその位置関係を変化させることなく重合しポリマー鎖を形成する系を提案しているが、実際のポリマー合成でこのような系を再現することは困難である。
- b) ビニルポリマーでは高分子主鎖が $-\text{CH}_2-\text{CH}-$ の繰り返りで構成されており、側鎖のペプチド部位の相互作用だけでは主鎖C-C結合の自由な回転によるコンホメーション変化が十分には抑えられない。

従って、これらの問題点の克服のためには、

- (i) 熱力学的に最安定なモノマー単位配列を確実に実現できる系の構築
- (ii) 主鎖内および主鎖近傍における相互作用部位の存在
- (iii) 剛直性のある主鎖の構築

といった条件を満たす系を実現する必要がある。

条件(i)について、Shakhnovichらは、各モノマーユニット間の相互作用が最小になるようにモノマーユニットの交換を繰り返していくと、フラストレーションが最小化された熱力学的に最安定な配列を持ち可逆的フォールディングが可能なヘテロポリマーが得られることを理論的に示している。従来は

「モノマーユニットの交換」は現実には不可能であるとされ、この系は生物進化のモデルとして捉えられてきたが、「動的共有結合」を主鎖中に有するポリマーを利用することにより、本モデルの実現は可能であると考えられる。

タンパク質モデルとしてのビニルポリマー型合成高分子はかつて盛んに研究されたが、モノマー配列に基づくフォールディングなどタンパク質の本質的な機能は実現されていない。また、Pandeらの考察に基づくポリマー合成も検討されているが、大きな効果は観察されていない。一方、動的共有結合は最近研究が活発化しているが、本研究で提案する「動的共有結合によるモノマー配列への高次構造情報の刷り込み」については国内外で報告例はない。

2. 研究の目的

本研究では、前項「1」の条件(i)~(iii)を満たすポリマーとして、主鎖中にアミノ酸ユニットおよび動的共有結合部位を有するホモポリマーを合成することを第一の目的とした。そして、異なるアミノ酸ユニットを有するホモポリマー間での動的な主鎖組換え反応を繰り返すことにより、主鎖中のアミノ酸ユニット間のフラストレーションを最小化し、熱力学的に最安定なアミノ酸配列およびその配列に基づく高次構造を有するコポリマーを創出することを目指した。動的共有結合部位としては、モノマーユニット間の相互作用を熱的に乱さず、かつアミノ酸中の官能基との副反応が起こらないように、光刺激によってラジカル機構での可逆的開裂・再結合を起こすジチオカルバメート基を利用した。

また本研究では、主鎖としてポリペプチド自体を使用し、側鎖に動的共有結合を導入した系を用いることにより、側鎖での動的組換えによるフラストレーションの最小化の可能性を確認することも企図した。

3. 研究の方法

本研究においては、アミノ酸ユニット間の相互作用を乱さないために室温以下での可逆的開裂・再結合が望まれる。よって、主鎖に導入する動的共有結合としては、iniferter重合における「炭素-ジチオカルバメート基間共有結合の光刺激型ラジカル開裂・再結合」を用いる。

まず、ジチオカルバメート基を主鎖中に有するポリペプチド類似ホモポリマーの合成を行う。具体的には、アミノ酸エステルを過剰のジアミンと反応させジアミンモノマーを合成し、得られるジアミンモノマーを二硫化炭素と反応させ、さらにジハロゲン化物モノマーと重縮合することにより、ジチオカルバメート基含有ホモポリマーを合成する。ポ

リマー中のアミノ酸部位の構造や合成条件などについて最適化を進める。

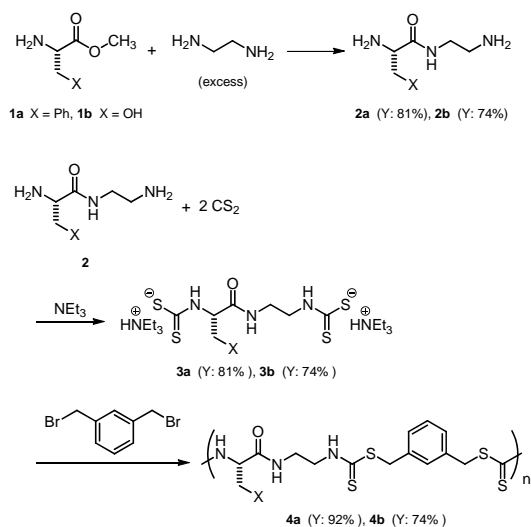
次に、ジチオカルバメート基を光刺激型動的共有結合として用いた結合組換えを検討する。ホモポリマーと低分子ジチオカルバメートを溶解・混合し、光照射時の分子量低下を追跡することにより結合組換えの進行を検証する。ホモポリマーへの光照射による、分子量分布の変化についても調査を行う。

さらに、2種類のポリペプチド類似ホモポリマーを混合・溶解し、光照射下での結合組換えを行い、生成物の分子量や高次構造の変化を観測する。

側鎖に動的共有結合を導入した系の設計としては、合成の簡便さを考慮し、ポリ(L-リシン)の側鎖に存在するアミノ基とアルデヒドとの反応により、ポリペプチド側鎖に動的共有結合であるイミン結合を導入する。イミン結合はアルデヒドの存在下において、特別な外部刺激を加えることなしに動的結合組換えが可能であることが知られている。よって、側鎖にイミン結合を有するホモポリペプチドを種々の低分子量アルデヒドと共存させることにより、側鎖の動的組換えを実現する。

4. 研究成果

L-フェニルアラニンメチルエステルとエチレンジアミンとのエステル-アミド交換反応によりペプチド誘導体ジアミンモノマー**2a**を合成した。ジアミンモノマー**2a**をトリエチルアミン存在下において二硫化炭素と反応させたのち、得られたジチオカルバミン酸塩**3a**を α,α' -ジブromo-*m*-キシレンと重縮合させることにより、ジチオカルバメート結合含有ペプチド誘導体ポリマー**4a**を合成した(Scheme 1)。また、同様の操作によりL-セリン構造含有ポリマー**4b**を合成した。ポリマ



Scheme 1

ー**4a**の数平均分子量(M_n)は8,300、ポリマー**4b**の M_n は6,900であった。

得られたL-フェニルアラニン構造含有ポリマー**4a**のDMSO溶液をジチオカルバメート結合濃度が1.0 Mとなるように調製し、窒素雰囲気下、室温で高圧水銀灯(100W)を用いてUV光を照射した。この系におけるポリマーの分子量分布の変化をGPCにより追跡したところ、光照射時間の増加に伴い分子量分布が減少し、最確分布における分子量分布(2.0)に近づくことが確認された(Fig. 1)。光照射前後の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルに変化が見られないことから、この結果は高分子鎖間での主鎖組換え反応の進行を示唆していると考えられる。

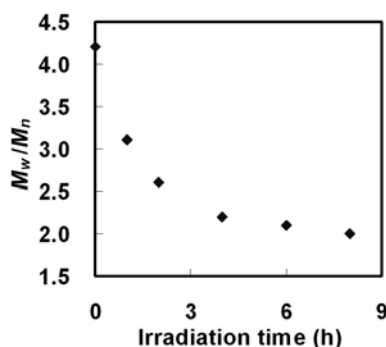
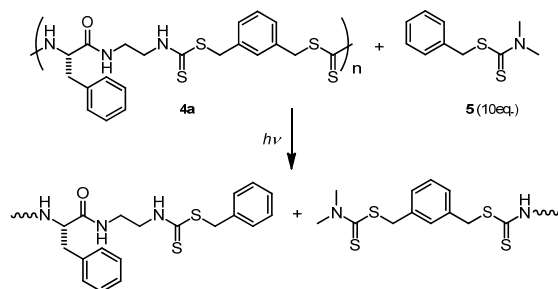


Fig.1 ポリマー**4a**への光照射における露光時間と M_w/M_n との関係

次に、**4a**とジチオカルバメート結合を持つ低分子化合物(**5**)をジチオカルバメート結合比1:10で混合したDMSO溶液を調製し、UV光を照射した(Scheme 2)。



Scheme 2

この系の分子量の変化をGPCにより追跡したところ、光照射時間の増加に伴い M_n が大きく低下した(Fig. 2)。これは、ポリマーと低分子化合物との間で動的共有結合に基づく組換え反応が起こり高分子鎖の鎖長が短くなったためであると考えられる。また、光照射時のGPC曲線の変化から、照射時間の増加に伴いポリマーのピークが低分子量側へシフトしていき、高分子成分の含有量も減少して行くことが明らかとなった(Fig. 3)。

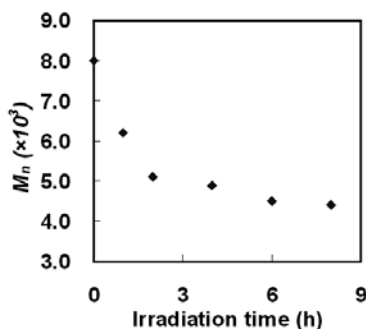


Fig.2 ポリマー4a / 5 混合系への光照射における露光時間と M_n との関係

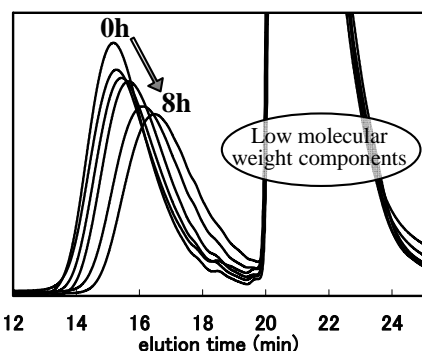
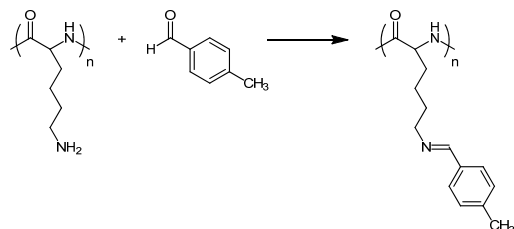


Fig.3 ポリマー4a / 5 混合系への光照射における GPC 曲線の変化

さらに、4a と 4b を溶解した DMSO 溶液に UV 光を 6 時間照射とこ、CD スペクトルに変化が現れることが確認された。

以上の結果から、ジチオカルバメート結合を有するペプチド誘導体型ポリマーは動的共有結合ポリマーとして振舞うことが確認された。

一方、ポリ(L-リシン)の側鎖に存在するアミノ基と *p*-トルアルデヒドとの反応により、ポリペプチド側鎖に動的共有結合であるイミン結合が導入されたポリマーを合成した (Scheme 3)。



Scheme 3

このポリマーと様々な官能基を持つ低分子量アルデヒドとを 2,2,2-トリフルオロエタノール (TFE) 中で混合し、 $^1\text{H-NMR}$ スペクト

ルにより構造変化を追跡した。その結果、反応時間の進行に伴い、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおける低分子量アルデヒド由来のピーク比が変化し、側鎖組換え反応の進行が確認された。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 大山俊幸 (他 3 名), “Side-chain shuffling and higher-order structure modification of imine-functionalized poly(L-lysine)”, 2010 環太平洋国際化学会議, 2010 年 12 月 17 日, ハワイコンベンションセンター (ホノルル, アメリカ合衆国)
- ② 大山俊幸 (他 3 名), “側鎖にイミン結合を有するポリペプチドの合成と側鎖組み換え反応による高次構造変化”, 第 59 回高分子討論会, 2010 年 9 月 16 日, 北海道大学高等教育機能開発総合センター (札幌市北区北 17 条西 8 丁目)
- ③ 大山俊幸 (他 2 名), “Synthesis of imine-functionalized poly(L-lysine) and recombination reaction of the side chains”, 11th Pacific Polymer Conference, 2009 年 12 月 8 日, ケアンズコンベンションセンター (ケアンズ, オーストラリア)
- ④ 大山俊幸 (他 2 名), “イミン結合を導入したポリ(L-リシン)の合成と側鎖組み換え反応”, 第 58 回高分子討論会, 2009 年 9 月 17 日, 熊本大学黒髪キャンパス (熊本市黒髪 2 丁目 39 番 1 号)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 俊幸 (OYAMA TOSHIYUKI)
横浜国立大学・工学研究院・准教授
研究者番号: 30313472

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: