

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22680039

研究課題名（和文）高分子電解質水和水のダイナミクス解析に基づくバイオマテリアルの創製

研究課題名（英文）Design of biomaterials based on the analysis of hydration dynamics around polyelectrolytes

研究代表者

森本 展行 (MORIMOTO NOBUYUKI)

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：00313263

研究成果の概要（和文）：荷電性分子・高分子近傍の動的水和構造を誘電緩和分光法により評価した。温度を精密制御して測定を行い数学的に解析することで、溶質と作用しない水分子の緩和周波数よりも高い緩和周波数を示す水の存在を確認した。この緩和周波数の高い水は、官能基の種類や数に加え、高分子の構造にも依存することを見いだした。この運動性の高い水は、核磁気共鳴分光測定による拡散や、蛍光分光法による回転異方性からも確認することができた。

研究成果の概要（英文）：Dynamic hydration structures around charged molecules and polymers were evaluated by measurements of dielectric relaxation spectroscopy and the mathematical analysis. By accurate control of temperature, we could confirm water around the solutes with the higher relaxation frequency than that of bulk water. The existence of the water was depended on functional groups, number of the charged groups and also structures of the side chain. The higher motility of water could be confirmed by diffusion measurements of nuclear magnetic resonance spectroscopy, and rotation anisotropy by fluorescence spectroscopy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2012 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	8,200,000	2,460,000	10,660,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体医工学・生体材料学

キーワード：水和、高分子電解質、誘電緩和分光測定、ナノキャリア、蛍光異方性

1. 研究開始当初の背景

(1) 水は生体、バイオマテリアルを構成する分子の高次構造、物性や機能に多大な影響を与えている。水の重要性は認知されているものの、水自体の観測が容易ではないために多様な水構造についての理解は遅れている。なかでも高分子電解質は、タンパク質や

DNA などの生体分子として、また機能性材料として重要である。しかし高分子電解質は、高分子性、荷電、カウンターイオンの存在から複雑な特性を与えるため、水構造、ましてや水和水のダイナミクス解析は困難である。タンパク質表面での水和水の揺らぎが生理機能の発現に必須であることが理論的、実

験的に示されているが、その水和水の定量的なダイナミクス解析はなされていない。

(2) 多様な用途・要求に加え、高分子材料が濫立するバイオマテリアルを一律に正しく評価していくためには、評価法の標準化・体系化が必要不可欠であり、今後この分野におけるブレークスルーを見いだすためにも新規評価法の創出が重要であると考えられる。バイオマテリアル一般に対し、最も共有しえる物質は水と考えるのが自然であろう。このなかで水和水、特にその外層に存在する水分子の運動性に焦点をあて、定量的に評価を試みるのが今後のバイオマテリアル創製に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 高分子電解質近傍の水和水のダイナミクス解析を行い、官能基・分子量の面より定量的な評価を試みる。さらに核酸およびタンパク質の水和水のダイナミクスや構造・機能に与える影響を検証する。

(2) 高分子電解質の水和水ダイナミクス解析から新規バイオマテリアルの創製を、(1) 生体高分子のコンホメーション制御が必要な核酸やタンパク質キャリア(2) 高潤滑表面を必要とする人工軟骨、人工関節やカテーテル等として設計、調製し、その基礎特性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 誘電緩和分光測定：PLL シュウ酸塩は、 $M_w=18,800$ 、 $M_w/M_n=1.7$ のポリマーを用いた。また分岐型 PEI は、 $M_w=25,000$ 、 $M_w/M_n=1.5$ を、PAMAM デンドリマーは第 4 世代のものをそれぞれ購入した。ポリマー溶液の pH は 0.1 あるいは 0.01 M の HCl を滴下して終濃度が 3 mg/mL および 5 mg/mL となるように調製した。リファレンス溶液を水とし、測定にはアジレント社製のネットワークアナライザ

(E8364B) を用いて周波数 0.2–26 GHz、測定温度を $20.00 \pm 0.01^\circ\text{C}$ の条件下にて行った。誘電スペクトル解析：得られたポリマー溶液のスペクトルは、次の Hanai の混合理論式を用いて、ある体積分率 Φ を仮定する。

$$\epsilon_q^* = \left\{ \epsilon_w^* - (1-\Phi) \left(\frac{\epsilon_q^*}{\epsilon_w^*} \right)^{1/3} \right\} / \left\{ 1 - (1-\Phi) \left(\frac{\epsilon_q^*}{\epsilon_w^*} \right)^{1/3} \right\}$$

ここで、 ϵ_w^* ：溶媒の誘電率、 ϵ_{ap}^* ：溶液の誘電率、 ϵ_q^* ：水和水の誘電率である。この Φ を小さくすることで水和水の誘電特性を強調することが可能となる。一方で、誘

電率は純水といくつかの成分のデバイ関数の足しあわせより計算し得る。

$$\epsilon_q^*(f) = \epsilon_{\text{mix}} + \alpha(\epsilon_q^*(f) - \epsilon_{\text{mix}}) + \sum_{j=1}^n \frac{\delta_j}{1+i(f/f_j)^2}$$

ここで f_j は j 成分の周波数、 δ_j は j 成分の緩和強度を表す。このとき α が最も 0 に近い場合に取りえる Φ が水和層とバルク水の境界と見積もられ、この時の誘電パラメータの算出を行った。

(2) 親水性多糖であるプルランにアジドプロピルアミンを付加することによりアジド化プルランを合成した。次に、構造内に pH 応答分解能を示すビニルエーテル基を有したコレステリル基を合成し、Cu(I) 触媒下で click 反応によってアジド化プルランと反応させ、酸分解性コレステリル基置換プルラン (AcLCHP) を合成した。acLCHP を pH7.4 のバッファーに各 2 mg/ml になるように溶解し、1 日攪拌した。これらの溶液を氷浴中でプローブ型超音波照射器を用いて 30 W、15 分間超音波処理を行い、フィルター (0.22 μm) 濾過することで溶液を調製した。それぞれの溶液を動的散乱測定、透過型電子顕微鏡観察し、微粒子の形成および粒径について評価した。ナノゲル溶液を pH7.4 のまま、あるいは 0.1M クエン酸水溶液を添加して pH4.0 に調製した。これらの溶液について 24 時間後まで経時的に動的散乱測定とともに、サイズ排除クロマトグラフィー測定を行い、クロマトグラムの変化を追跡することで加水分解挙動を観察した。

4. 研究成果

(1) 各測定において、リファレンス（ここでは純水）との差スペクトルをとり、その各周波数での標準誤差が 0.03 以下であることから各ポリマー溶液を精度良く測定できたことを確認している。また、差スペクトル

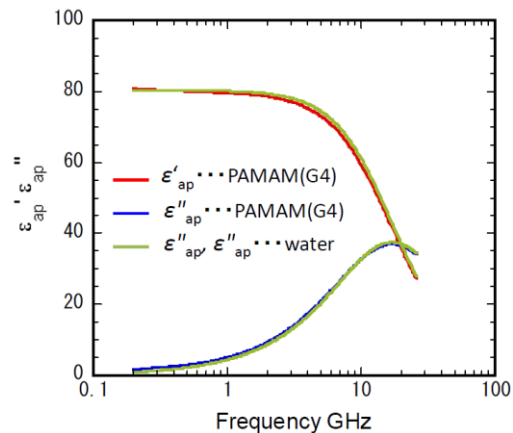


Figure 1 PAMAM デンドリマーの誘電スペクトル (pH7.5)

Table 1 PLL の誘電パラメータ

pH	f_{c3} (GHz)	δ_3	f_{c2} (GHz)	δ_2	f_{c1} (GHz)	δ_1	ϕ_B
4.42	0.20	105.7	6.1	11.5	19.1	52.3	0.058
7.61	0.21	103.8	6.7	14.6	18.6	51.1	0.055

Table 2 b-PEI の誘電パラメータ

pH	f_{c3} (GHz)	δ_3	f_{c2} (GHz)	δ_2	f_{c1} (GHz)	δ_1	ϕ_B
4.00	0.11	570.5	5.5	17.17	19.51	44.10	0.052
7.50	0.14	229.0	4.62	18.11	18.89	38.57	0.039

Table 3 PAMAM デンドリマーの誘電パラメータ

pH	f_{c3} (GHz)	δ_3	f_{c2} (GHz)	δ_2	f_{c1} (GHz)	δ_1	ϕ_B
4.00	0.20	124.3	9.0	56.2	-	-	0.030
7.50	0.26	27.2	9.32	59.7	-	-	0.033

の濃度依存性を周波数の代表点を取ってプロットしたところ、いずれも直線上であることから、単分散な水和層を形成していることを確認している。例として、Figure 1 に PAMAM デンドリマーの誘電スペクトルを示す。それぞれのポリマーにおいてデバイ関数の足しあわせによるフィッティング曲線から誘電パラメータを算出した。この結果を Table 1 から 3 に示す。Table 1 では PLL の誘電パラメータを示している。PLL は側鎖に第一級アミンを有し、中性以下の状態ではこの荷電基はプロトン化していると考えられる。PLL は pH=4.42、7.61 の場合においてバルク水に加え 3 つの成分が検出された。これらは、0.2 GHz 付近にイオンペアの回転由来の緩和、6-7 GHz 付近における拘束水由来の緩和、さらに 19 GHz 付近にバルク水よりも緩和周波数が高い水 (HMW) 由来の緩和を確認することができた。pH の低い方が HMW の周波数がやや高い傾向がみられるが、総じて pH 低下により大きな変化は見られなかった。次に b-PEI について解析を行った。b-PEI は末端の一級アミンに加え、主鎖に二級アミン、分岐部に三級アミンを有した構造を有している。この b-PEI は pH7.5 では一級アミンのみがプロトン化している状態、また pH4.0 では二級、三級アミンもプロトン化している状態であると考えられる。Table 2 に b-PEI の誘電パラメータを示す。これより、b-PEI も 3 つの緩和成分からなり、HMW の存在が確認された。pH7.5 と pH4.0 における水和状態を比較すると、pH が高くなることで HMW 由来の周波数が高くなり、かつ緩和強度も増加していた。これは二級、三級アミンのプロトン化に起因していると考えられた。これは水和層の大きさを示す ϕ_B が、pH の低下により 30%以上増加しているところからも支持される。プロトン化に伴い静電反発が強くなり、ポリマーがより伸長したコンホメーションをとるため水和

層も増加したと考えられた。次に PAMAM デンドリマーの誘電パラメータを示す。この場合、pH が中性、酸性いずれの場合においても、この測定温度におけるバルク水の示す緩和周波数 (20°C、17 GHz) よりも高い緩和周波数を有する HMW は確認されなかった。この原因としては、1) デンドリマーの枝側鎖の運動性が束縛されるため HMW を形成しえない。あるいは 2) 荷電性基の密度が高いため、HMW 層が形成されると考えられる拘束水層の外殻においても水分子の回転運動性が制限されるためと考えられる。2) の場合、拘束水は測定周波数域 (0.2GHz~) よりも低い周波数で緩和されると考えられる。一方で pH の変化により誘電パラメータのみならず ϕ_B の変化も確認できなかった。PAMAM デンドリマーは、pH が低下することで樹状構造分岐部に位置する三級アミンがプロトン化するが、その構造が故に分子の運動性が制限され、水和層の大きさに変化がないものと考えられた。これら 3 種のカチオン性ポリマーの毒性と遺伝子発現の特性は、細胞毒性が、PAMAM << PLL ~ b-PEI、一方、遺伝子発現効率は、PLL < PAMAM < b-PEI と一般には理解されている。当然のことながら、低い細胞毒性、かつ高い遺伝子発現効率が望まれる。ポリマー鎖の構造と各ポリマー近傍における水和水の誘電パラメータの比較から、側鎖の運動性が高く HMW 層が形成されると毒性が高く、pH 低下によりプロトン化が起こると遺伝子発現効率が低い、あるいは水和層の大きさが増加すると遺伝子発現しやすいことが示唆される。これらの変化はおそらくカチオン性ポリマー/DNA 複合体のエンドソームからの脱出に影響しえると考えられた。

(2) ポリマーの合成は、Tebbe 反応によるビニルエーテル結合を有したコレステロールリンカーの合成と、クリック反応を用い

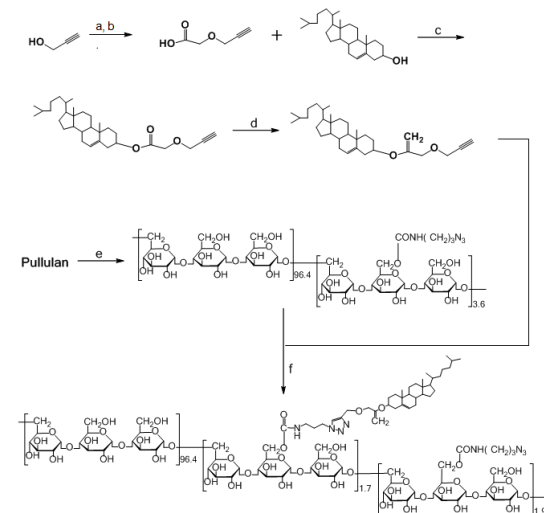


Figure 2 酸加水分解型ナノゲルの合成

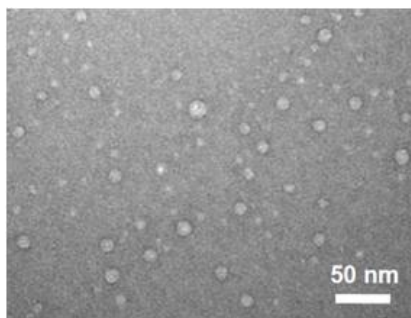


Figure 3 酸加水分解ナノゲルの透過電子顕微鏡増

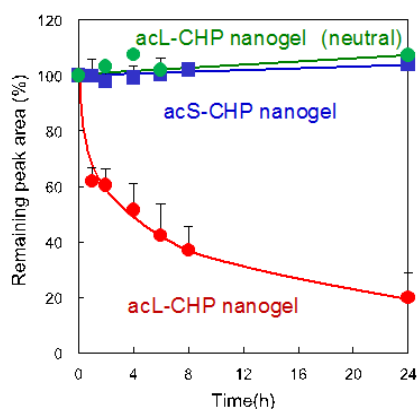


Figure 4 酸性条件下におけるナノゲルの崩壊挙動

たプルランへの修飾など5つのステップを用いて行った (Figure 2)。このポリマーをバッファー中にて分散し、超音波照射させることで、ナノゲルが形成されることが確認できた (Figure 3)。このナノゲルは比較的単分散な 20-30 nm の粒子であり、中性 (pH=7.0) では安定なナノ粒子であった。一方で pH4.0 まで低下させると、サイズ排除クロマトグラフィーによる測定では、24 時間後に約 80% のナノゲルは崩壊した (Figure 4)。また、動的光散乱測定よりナノゲルの粒径は 35% 増加したことがわかった。さらにこのナノゲルにタンパク質 (ここではモデルタンパク質として牛血清アルブミン) を内包させ、溶液の pH を低下させるとナノゲル中のコレステロールの加水分解に伴って、タンパク質を放出し得ることに成功した。以上のことは、新たなタンパク質の放出システムを創製しえたといえる。その一方で、以前の研究においてビニルエーテル結合は酸性条件下で 1 時間以内に加水分解することが示されてきたが、本研究ではその酸応答性は鋭敏ではなかった。その理由として、プロトン化したビニルエーテル基とアセタール中間体との平衡反応となることで加水分解の進行を遅らせていると考えられた。この中間体の形成は、コレステロールの高い疎水性による運動性の低い安定し

た水和層の形成が、加水分解に必要な水分子の供給を妨げているためとも考えられるため、今後の分子設計につなげていきたい。また、この酸分解性ナノゲルはノニオン性であるため、今後カチオン性基を修飾することで、酸分解型カチオン性ナノゲルを調製し、タンパク質の細胞内へのデリバリーについても検討していきたい。

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)

- (1) N. Morimoto, M. Yamazaki, J. Tamada, K. Akiyoshi Polysaccharide-hair cationic polypeptide nanogels: Self-assembly and enzymatic polymerization of amylose primer modified cholesteryl poly(L-lysine) *Langmuir* 査読あり in press. DOI: 10.1021/la3047774
- (2) N. Morimoto, S. Hirano, H. Takahashi, S. Loethen, D. H. Thompson, K. Akiyoshi. Self-assembled pH-sensitive cholesteryl pullulan nanogel as a protein delivery vehicle. *Biomacromolecules* 査読あり 14, 2013, 56-63. DOI: 10.1021/bm301286h
- (3) K. Nagano, N. Alles, A. H. Mian, A. Shimoda, N. Morimoto, Y. Tamura, H. Shimokawa, K. Akiyoshi, K. Ohya, K. Aoki. The tumor necrosis factor type 2 receptor plays a protective role in tumor necrosis factor- α -induced bone resorption lacunae on mouse calvariae. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 査読あり 29, 2011, 671-681. DOI: 10.1007/s00774-011-0270-z
- (4) G. Mogami, T. Wazawa, N. Morimoto, T. Kodama, M. Suzuki Hydration properties of adenosine phosphate series as studied by microwave dielectric spectroscopy. *Biophysical Chemistry* 査読あり 154, 2011, 1-7. DOI: 10.1016/j.bpc.2010.11.006
- (5) T. Wazawa, T. Sagawa, T. Ogawa, N. Morimoto, T. Kodama, M. Suzuki. Hyper-mobility of water around actin filaments revealed using pulse-field gradient spin-echo ^1H NMR and fluorescence spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 査読あり 404, 2011, 985-990. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.12.096

〔学会発表〕(計 21 件)

- (1) 村松かんな、森本展行、戸井田さやか、鈴木誠、Winnik Françoise スルホベタインを内殻に有するナノ粒子の調製 日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム2012 2012年11月26日 仙台
- (2) N. Morimoto, X.-P. Qiu, K. Akiyoshi, F. M. Winnik Design of poly(NIPAM)s for Thermoresponsive Nanoassemblies International Conference on Emerging Advanced Nanomaterials-2012 (ICEAN2012) October23, 2012 Brisbane, Australia.
- (3) 和沢鉄一、最上譲二、森本展行、石田誠宜、鈴木 誠 時間分解蛍光偏光法によるタンパク質周囲の水和層の局所粘性測定 第50回日本生物物理学会年会 2012年9月22日 名古屋
- (4) 森本展行、村松かんな、鈴木誠 重合制御したスルホベタインブロックコポリマーの調製と会合特性 第61回高分子討論会 平成24年9月20日 名古屋
- (5) N. Morimoto, K. Muramatsu, M. Suzuki, A. Moquin, S. Toita, F. M. Winnik. Preparation of Biocompatible and Thermoresponsive polybetaine nanoparticles. International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference (IACIS2012) May14, 2012 Sendai, Japan.
- (6) 森本 展行、小川 翼、最上 譲二、鈴木 誠 誘電緩和分光法による各種カチオン性ポリマーの水和構造解析 第33回日本バイオマテリアル学会大会 平成23年11月22日 京都
- (7) 森本 展行、小川 翼、最上 譲二、鈴木 誠 精密誘電分光測定によるカチオン性ポリマーの水和構造解析 第60回高分子討論会 平成23年9月30日 岡山
- (8) 森本 展行、小川 翼、最上 譲二、鈴木 誠 ポリ(アミドアミン) デンドリマーの水和状態解析 第60回高分子学会年次大会 平成23年5月26日 大阪
- (9) N. Morimoto, S. Hirano, H. Takahashi, DH. Thompson, K. Akiyoshi Acid labile self-assembled nanogel by hydrophobized polysaccharide for drug carrier. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PacifiChem2010) 平成22年12月18日 Hawaii.
- (10) 土子哲、田中好幸、和沢鉄一、森本展行、鈴木誠 誘電緩和分光法によるDNA・RNAオリゴマーの水和状態解析 日本生物物理学会第48回年会 平成22年9月23日 仙台
- (11) 和沢鉄一、佐川貴志、小川翼、森本展行、

鈴木誠 アクチン周囲の水の運動性はアクチンの重合によって増加する 日本生物物理学会第48回年会 平成22年9月23日 仙台

- (12) 森本展行、徳田夏樹、土子哲、鈴木誠 ポリ(L-リジン)のコンホメーション変化に伴う動的水和水の解析第59回高分子討論会平成22年9月15日 札幌.

〔図書〕(計1 件)

- (1) N. Morimoto, K. Akiyoshi. Self-assembled nanogel Engineering. Biomedical Applications of Hydrogels Handbook. Springer, pp339-350, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 展行 (MORIMOTO NOBUYUKI)
東北大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：00313263