

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310089

研究課題名(和文) 超分子ヒドロゲルライブラリーの構築と機能評価

研究課題名(英文) Construction of supramolecular hydrogel library and the functional evaluation

研究代表者

山中 正道 (YAMANAKA, MASAMICHI)

静岡大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10377715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：低分子化合物の自己集合により形成する超分子ヒドロゲルは、次世代の機能性材料として魅力的な研究対象である。様々な用途に適応できる超分子ヒドロゲルの創出のために、三回対称トリスウレア構造を基盤とする超分子ヒドロゲルライブラリーを構築した。構築されたライブラリーより、適切な超分子ヒドロゲルを選択することで、その用途展開が可能となった。本研究では、超分子ヒドロゲルを支持体とする酸性未変性タンパク質の電気泳動法の開発、超分子ヒドロゲルによる色素分子の脱吸着の制御に成功した。

研究成果の概要(英文)：Supramolecular hydrogels formed from self-assembly of small molecules are attractive targets as a next-generation functional material. Supramolecular hydrogel library based on tris-urea structure was constructed for creation supramolecular hydrogels applicable in various uses. Application researches became possible to choose appropriate supramolecular hydrogel from the library. In this research, we succeeded to develop a supramolecular hydrogel electrophoresis of acidic native proteins and controlled adsorption and desorption of dye molecules to a supramolecular hydrogel.

研究分野：超分子化学

キーワード：ゲル 自己集合 電気泳動 ウレア 超分子 水素結合

1. 研究開始当初の背景

低分子化合物の自己集合により形成する超分子ゲルは、次世代の機能性材料として魅力的な研究対象である。様々な用途に適合した超分子ゲルを自在に創出することができれば、その有用性は益々高まることとなる。我々は、高い自己集合能を有する三回対称トリスウレア構造の開発を達成しており、共通の骨格の官能基修飾により、有機溶媒および水をゲル化できることを見出している。本研究では、この構造を基盤に様々な誘導体を合成し、超分子ヒドロゲルライブラリーを構築することとした。さらに、超分子ヒドロゲルライブラリーより適切な化合物を選択し、ゲル電気泳動などの用途開拓に関する検討を行うこととした。

2. 研究の目的

超分子ヒドロゲルを機能性材料として利用するためには、用途に適合した性質を付与する必要がある。本研究では、低分子ヒドロゲル化剤となる分子を網羅的に合成し、超分子ヒドロゲルライブラリーを構築することを目的とする。さらに、ライブラリーの中から、用途に適合した性質を持った超分子ヒドロゲルを選択し、生体高分子の電気泳動や、ゲスト分子の吸脱着制御を実現する。

3. 研究の方法

本研究目的を達成するために、我々が独自に開発した、高い自己集合能を有する三回対称トリスウレア骨格を基本構造に、多種の誘導体を効率的に合成する。合成した化合物群のゲル化能を評価することで、ライブラリーを構築する。このライブラリーの中から、用途に適した性質を持った超分子ヒドロゲルを選択し、応用研究へと展開する。今回は用途として、未変性タンパク質の電気泳動と、色素分子の吸脱着制御に焦点を絞り研究を実施する。

4. 研究成果

(1) 我々のこれまでの低分子ゲル化剤の開発研究における知見に基づき、ウレイド基を有する低分子ゲル化剤候補分子を 42 種類合成した。これら分子群のゲル化能を評価したところ、11 種類の化合物が低分子ヒドロゲル化剤として機能した。また種々の有機溶媒のゲル化能についても併せて評価したところ、19 種類の化合物が、低分子オルガノゲル化剤として機能した。これらのうち、特に優れたゲル化能を示した化合物 (1,2) については、詳細なゲル化能の評価を行った。さらに、1 より形成する超分子ヒドロゲルを用いた酸性未変性タンパク質の電気泳動、2 より形成する超分子ヒドロゲルを用いた色素分子の吸脱着制御を行った。

(2) これまでの低分子ヒドロゲル化剤として機能したトリスウレア化合物の構造評価

より、低分子化合物中の親水部位と疎水部位のバランスが重要であることが明らかとなった。そこで、低分子ヒドロゲル化剤として親水性-疎水性のバランスが良い 1 を設計した (図 1)。この両親媒性を有する三回対称トリスウレアは、グルコースとトリスプロモメチルベンゼンを出発原料に、効率的に合成することが出来た。合成した 1 は、期待した通り優れたゲル化能を有し、純水に対する最小ゲル化濃度は 0.25 wt% (1.9 mM) であった。一般に、低分子ヒドロゲル化剤による超分子ヒドロゲルの形成は、水溶液の性質に強く影響されるが、本化合物では、様々な水溶液をゲル化できることが明らかとなった。例えば、水溶液の pH には影響を受けにくく、強酸性である 8 M 塩酸から強塩基性である 7 M 水酸化カリウム水溶液までの酸性及び塩基性水溶液をゲル化した。また、水溶液の塩濃度にも影響を受けにくく、飽和食塩水であっても超分子ヒドロゲルの形成が進行した。さらには形成した超分子ヒドロゲルは、超分子ゲルに一般的に見られる熱可逆性に加え、チキソトロピー性を有し、振動を加えることでゲルからゾルへの相変化が進行し、得られたゾルは室温で静置することで速やかにゲルを再形成した。

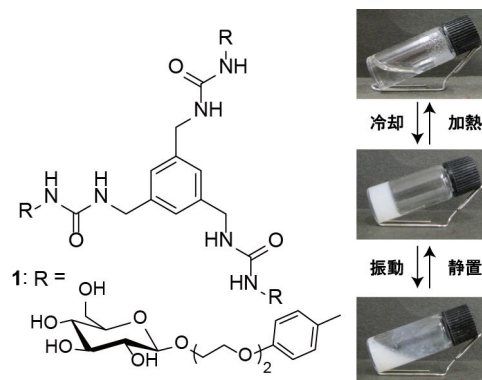


図 1. チキソトロピー性を有する超分子ヒドロゲル

(3) この 1 の Tris-Glycine 緩衝液ゲルを支持体とした酸性未変性タンパク質の電気泳動を検討した。まず、タンパク質試料としてオパールブミン (OVA: 45 kDa, pI = 4.7) を用い、電気泳動の実験手順を検討し、以下の手順で電気泳動が可能であることが明らかにした (図 2)。I) 内径 2 mm のガラスキャピラリーに 1 の Tris-Glycine 緩衝液ゲル (2 wt%) を 8 cm 充填する。II) ゲルの一端にタンパク質試料 (6 μg) を充填した後、サブマリン型電気泳動装置を用い電気泳動を行う。標準的な条件として、pH = 8.3 の Tris-Glycine 緩衝液を移動相とし、100 V で 100 分間電気泳動する。III) 電気泳動後のゲルを 8 分割し、それぞれのゲルを -20 °C で 3 時間冷却した後に、超純水を加え 2 分間遠心分離する。IV) 上清に変性剤を加えた後、SDS-PAGE にて分離様式を解析する。また、この抽出操作によるタンパク質試料 (OVA) の回収率は、58% であ

った。

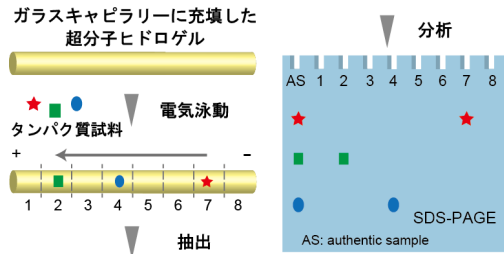


図2、超分子ヒドロゲルを支持体としたタンパク質電気泳動の実験手順

確立した実験条件にて、D-乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH: 146 kDa, pI = 4.0) β-ガラクトシダーゼ (β-Gal: 540 kDa, pI = 4.6) OVA の分離を検討した。LDH と β-Gal の電気泳動において、LDH は 4 から 5 レーンに、β-Gal は 5 から 6 レーンに観測された (図 3-a)。すなわち、分子量および等電点の小さな LDH がより陽極側に移動した。続いて、LDH と OVA の電気泳動を行った。LDH は 3 から 4 レーンに、OVA は 5 から 6 レーンに観測された (図 3-b)。分子量が大きく、等電点の小さな LDH がより陽極側に移動した。最後に、β-Gal と OVA の電気泳動を行ったところ、β-Gal は 4 から 5 レーンに、OVA は 5 から 6 レーンに観測された (図 3-c)。この組み合わせにおいても、分子量が大きく、等電点の小さな β-Gal がより陽極側に移動していた。以上の結果より、1 の自己集合により形成する超分子ヒドロゲルを支持体とした電気泳動において、酸性未変性タンパク質試料は、分子量に影響される事無く、等電点に依存した分離が進行することを明らかにした。

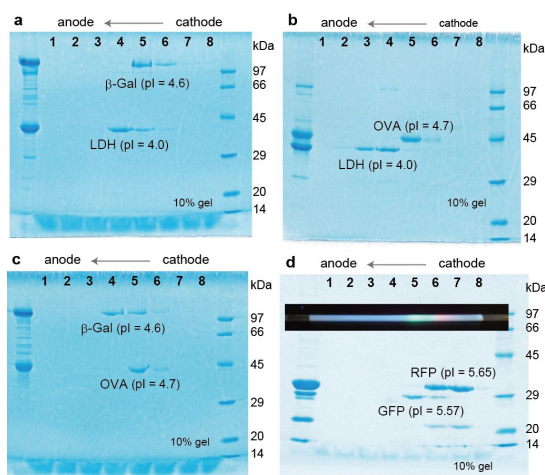


図3、超分子ヒドロゲルによる酸性未変性タンパク質の電気泳動、a) D-乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) と β-ガラクトシダーゼ (β-Gal) b) LDH とオブアルブミン (OVA) c) β-Gal と OVA、d) 緑色蛍光タンパク質 (GFP) と赤色蛍光タンパク質 (RFP)

続いて、緑色蛍光タンパク質 (GFP: 27 kDa, pI = 5.57) と赤色蛍光タンパク質 (RFP: 27 kDa, pI = 5.65) の電気泳動による分離を検討した (図 3-d)。電気泳動中または電気泳動後のガ

ラスキャピラリーに紫外線を照射したところ、いずれの場合にも緑色および赤色の蛍光が帯として観測された。SDS-PAGE による解析結果と、これら帯の位置には良い一致が見られたことから、タンパク質は変性することなく電気泳動されていることが支持される。また、GFP と RFP は非常に性質の類似したタンパク質であるにも関わらず分離が進行した。

両親媒性三回対称トリスウレア分子 (1) は、親水基としてグルコシド (グルコース) を有する。このグルコシドは、自己集合により超分子ヒドロゲルを形成した際、ナノサイズの繊維状集合体表面に高密度に集積している。したがって、このグルコシドと親和性のあるレクチンを電気泳動したとき、その移動度に特異性が発現すると考えた。そこで、代表的なレクチンであるコンカナバリン A (ConA: 112 kDa, pI = 4.4-5.5) のアフィニティー電気泳動を検討した。ConA の等電点から考え、十分にタンパク質が移動できる条件 (100 V, 100 min) にて電気泳動を行ったが、ConA はほぼ原点に留まっていた (図 4-a)。未変性の ConA は、超分子ヒドロゲルのグルコシドと会合により、電気泳動による移動が妨げられたと考えられる。そこで、Native-SUGE の前に変性処理をした ConA を用い電気泳動を行ったところ、タンパク質の移動が観測された (図 4-b)。変性した ConA は、超分子ヒドロゲルのグルコシドとの親和性を有さないため、先に示した酸性未変性タンパク質と同様の等電点に依存した移動を示したと考えられる。さらに、未変性の ConA の電気泳動を行う際、移動相となる Tris-Glycine 緩衝液に、ConA と強く会合するメチル α-D-マンノピラノシドを加えたところ、タンパク質の移動が観測されたことから、未変性 ConA と超分子ヒドロゲルのグルコシドとの親和性が、ConA の低い移動度の要因であることが支持された。

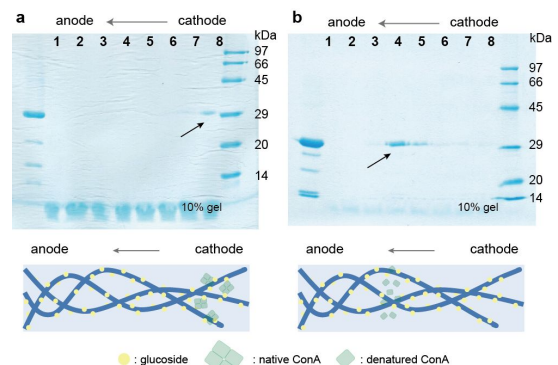
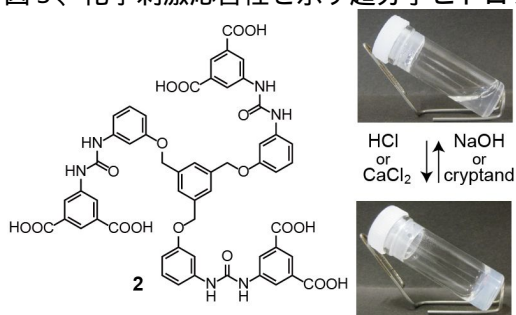


図4、超分子ヒドロゲルを用いたアフィニティー電気泳動、a) 未変性コンカナバリン A (ConA) の電気泳動と推定される機構、b) 変性 ConA の電気泳動と推定される機構

(4) 親水基としてカルボキシル基を有する三回対称トリスウレア 2 を低分子ヒドロゲル化剤として設計した (図 5)。カルボキシル

基を導入することで、脱プロトン化や金属塩との配位によりゲル化が制御できる超分子ヒドロゲルの形成を期待した。2 は、水酸化ナトリウム水溶液と混合し加熱溶解させると、均一な粘性溶液となった。ここに塩酸を添加すると、速やかに透明な超分子ヒドロゲルを形成した（最小ゲル化濃度：3 mM）。このゲルに水酸化ナトリウム水溶液を加えると、均一な粘性溶液に変化し、続いて塩酸を加えるとゲルが再生した。これらゲルからゾルへの可逆的な相転移は、酸および塩基の種類に依存することなく進行したことから、2 のカルボキシル基のプロトン化、脱プロトン化により制御されていると考察している。2 と水酸化ナトリウム水溶液より得られる粘性溶液のゲル化は、塩化カルシウム水溶液の添加によっても進行した。カルシウムイオンを含むゲルは、カルシウムイオンと強く会合するホスト分子として知られている[2,2,2]クリプタンドを添加することで、ゾルへと相転移した。塩酸を添加して形成した超分子ヒドロゲル、および塩化カルシウムを添加して形成した超分子ヒドロゲルの動的粘弾性測定を行った。いずれの超分子ヒドロゲルにおいても、4–6 kPa の貯蔵弾性率 (G') を示した。2 と水酸化ナトリウム水溶液より得られる粘性溶液に、希土類錯体を添加することで、超分子ヒドロゲルが形成した。形成した超分子ヒドロゲルのうち、テルビウムトリフラートを添加することで形成したヒドロゲルは、緑色の蛍光発光を示した。種々のスペクトル測定より、2 からテルビウムイオンへの電子移動により発光していることが明らかとなった。

図5、化学刺激応答性を示す超分子ヒドロゲル



ル

(5) 両親媒性トリスウレア 2 より形成する超分子ヒドロゲルは、水中においてもその形状を変化させることなく、ゲルとして存在する。そこで、この超分子ヒドロゲルを用いて、分子の吸脱着制御を検討した。まず、ローダミン 6G を含む水溶液に、2 の超分子ヒドロゲルを添加し、その吸着挙動を観測した。超分子ヒドロゲルは徐々に色素分子であるローダミン 6G を吸着し、約 7 日後に定常状態に達した。低分子ヒドロゲル化剤 1 分子に対し、およそ 1 分子のローダミン 6G を吸着した。吸着量は、低分子ヒドロゲル化剤の濃度には依存して増加した。一方で、吸着速度は

ゲルの表面性に依存せず、ゲルを細分化した場合でも吸着速度に変化は見られなかった。このローダミン 6G を吸着した超分子ヒドロゲルは、酸性から中性の水溶液中では、安定に存在した。ところが、塩基性水溶液中では、超分子ヒドロゲルの緩やかな崩壊に伴い、吸着されたローダミン 6G を、ゆっくりと放出できることが明らかとなった。

以上本研究では、様々な性質を有する超分子ヒドロゲルライブラリーの構築を実現し、用途に適した超分子ヒドロゲルの選択を可能にした。その結果、超分子ヒドロゲルを支持体とする未変性タンパク質の電気泳動、超分子ヒドロゲルによる色素分子の吸脱着制御を達成した。

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)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Masamichi Yamanaka, Kazushige Yanai, Yusuke Zama, Junko Tsuchiyagaito, Masaru Yoshida, Ayumi Ishii, Miki Hasegawa Cation-Tuned Stimuli-Responsive and Optical Properties of Supramolecular Hydrogels

Chem. Asian J., 査読有, **10**, 1299-1303 (2015). DOI 10.1002/asia.201500274

Kanako Munenobu, Takayuki Hase, Takanori Oyoshi, Masamichi Yamanaka

Supramolecular Gel Electrophoresis of Acidic Native Proteins

Anal. Chem., 査読有, **86**, 9924-9929 (2014). DOI 10.1021/ac5026539

Hideo Shimazu, Masamichi Yamanaka

Solvent-Modulated Self-Assembly of C_3 -Symmetric Tris-Urea into Discrete Dimer and Supramolecular Gel

Asian J. Org. Chem., 査読有, **3**, 847-850 (2014). DOI 10.1002/ajoc.201402079

Daisuke Higashi, Masaru Yoshida, Masamichi Yamanaka

Thixotropic Hydrogel Formation in Various Aqueous Solutions through Self-Assembly of an Amphiphilic Tris-Urea

Chem. Asian J., 査読有, **8**, 2584-2587 (2013). DOI 10.1002/asia.201300779

Masamichi Yamanaka

Urea Derivatives as Low-Molecular-Weight Gelators

J. Incl. Phenom. Macrocy. Chem., 査読有, **77**, 33-48 (2013). DOI 10.1007/s10847-013-0299-9

〔学会発表〕(計 38 件)

山中正道

超分子ゲルの開発と機能開拓

日本薬学会第 135 年会、神戸学院大学 兵庫 (2015 年 3 月 26 日)

Masamichi Yamanaka

Supramolecular Hydrogel Formation through Self-assembly of Amphiphilic Tris-urea and Application for Protein Electrophoresis
China-Japan Joint Symposium on Functional Supramolecular Architectures, Tianjin University Tianjin (China) (2014年12月12日)

山中正道

超分子ヒドロゲルによるタンパク質電気泳動法

第65回日本電気泳動学会総会シンポジウム、横浜情報文化センター 神奈川 (2014年10月24日)

Masamichi Yamanaka, Kanako Munenobu, Daisuke Higashi

Supramolecular Hydrogel Formation through Self-assembly of Amphiphilic Tris-urea and Application for Protein Electrophoresis
IUMRS-ICA 2014, 福岡大学 福岡 (2014年8月27日)

山中正道、東大輔

両親媒性トリスウレア分子の自己集合による超分子ゲルの形成

第10回ホスト・ゲスト化学シンポジウム、和歌山大学 和歌山 (2013年5月25日)

〔図書〕(計1件)

山中正道

ゲルの安定性と機能性付与・次世代への応用開発, (株)技術情報協会, 542-544 (2013).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~smyaman/welcome.html>

6. 研究組織

研究代表者

山中 正道 (YAMANAKA MASAMICHI)

静岡大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 10377715