

研究概論

組織デザイングループ

1. 研究目的

組織デザイングループでは、「界面での分子認識と新規超分子構造の開発」を基本テーマとして研究を進めている。核酸の複製、酵素の基質認識、タンパク質の高次構造形成など、水素結合をベースとした分子認識が生体機能の重要な働きをなしている。これを模倣するものとして種々の水素結合性の人工レセプター分子が検討されているが、その多くが生体系とは程遠い有機溶媒中におけるものであり、一般に水存在下では水素結合形成とそれによる分子認識は困難とされてきた。我々は、生体機能の多くが単なる水溶液中ではなく、細胞表面やタンパク質表面などの界面において行なわれていることに着目し、生体類似の水素結合性分子認識系を構築するためには認識部位を界面に置くことが重要であるという仮説を立てた。それを実証するために、種々の認識官能基を持つ両親媒性レセプター分子を合成し、それらの単分子膜への水相からのゲスト分子の認識を検討した。その結果、気-水界面では水素結合などの分子間相互作用が増幅され、水が存在するにもかかわらず、ヌクレオチド、核酸塩基、糖類、アミノ酸などが効率良く認識されることが実験的に見いだされた。この結果は、生体における水素結合性分子認識を人工的に再現したものであり、生体现象を理解する上でのモデルとして重要である。我々はこれらの知見に加えて、さらなる分子認識系を構築すること、界面での分子認識のメカニズムを解明すること、このような界面における認識や相互作用を用いて新規な超分子システムを開発することを目的として研究した。研究は、以下の3つのトピックに分類される。

- 1) 界面での分子認識
- 2) 二次元分子パターンと二次元分子ネットワーク
- 3) 交互積層法

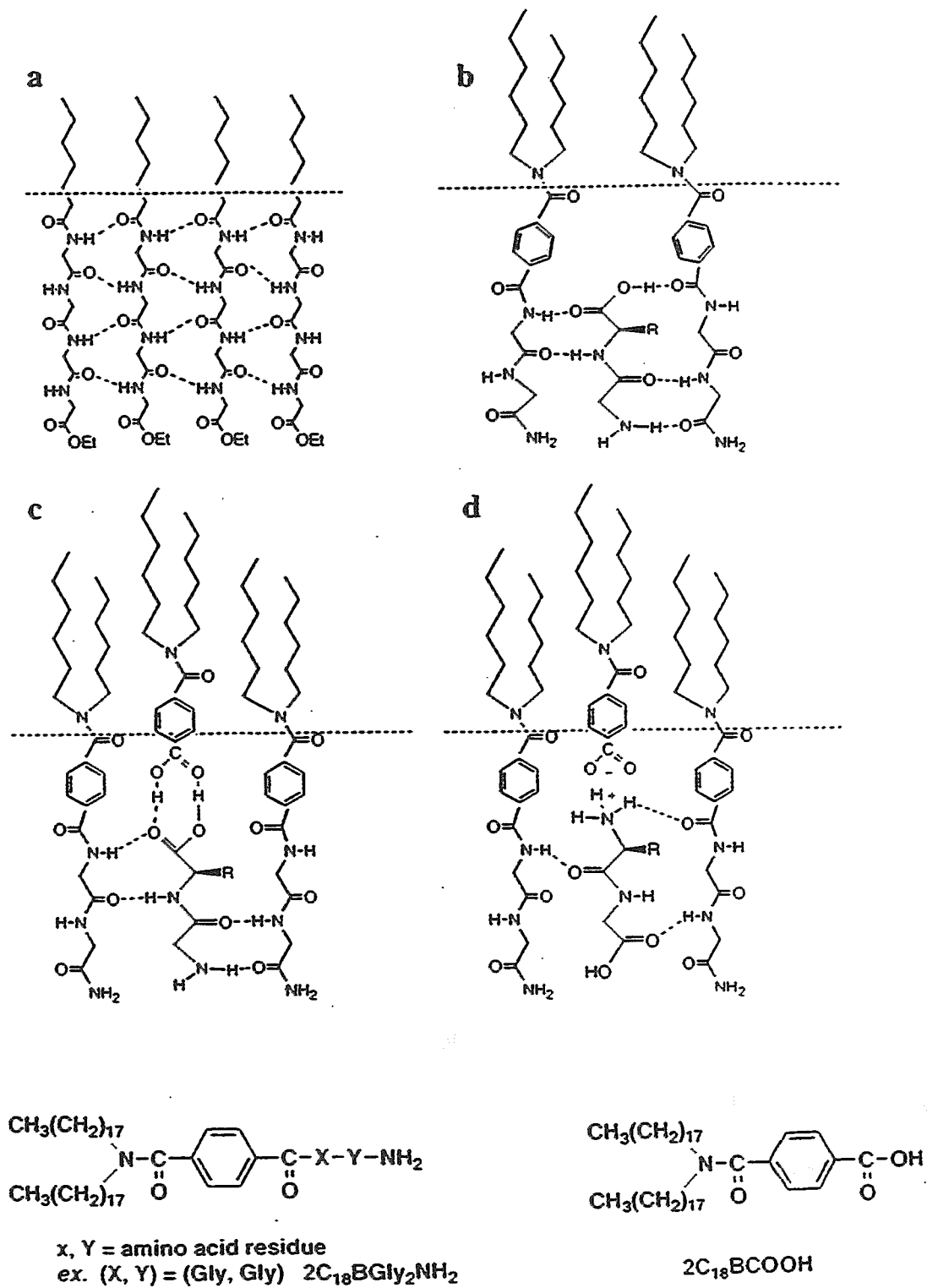
1) 界面での分子認識

界面での分子認識現象に対する理解を深めるために、次の研究を行った。まず、気-水界面での分子認識の新しい例として、水溶性ペプチド分子の認識を検討した。また、気-水界面における現象が他の界面において成立するかどうかを調べるため、ミセルや二分子膜表面などのメゾスコピックな界面を用いて分子認識を検討した。さらに、界面での分子認識のメカニズムを解明するために、溶媒効果理論により量子化学的に界面における分子認識を検討した。

1-1) 水溶性ペプチド分子の認識

気-水界面での分子認識の新しい例として、オリゴペプチド鎖を親水頭部に持つレセプター脂質単分子膜への水溶性ゲストペプチドの結合を検討した。結果の概要を図1に示す。アルキル鎖が一本の単分子膜の場合には、レセプター間に十分な距離が存在せずレセプター分子間に水素結合が形成され、ゲスト分子の結合が起こらない (a)。一方、疎水部がジアルキルの単分子膜の場合には、親水部のレセプターペプチド鎖が適当な間隔を持ち、その間にゲストペプチドが挿入しうる。この場合、レセプターとゲストの間に安定な *anti-parallel* の水素結合が形成された際に、疎水側鎖が気相側へと向く GlyLeu のようなペプチド分子が選択的に認識される (b)。さらに、安息香酸型脂質を混合させた場合には、この脂質とゲストの C 末端および N 末端の相互作用により、GlyLeu や LeuGly のようなゲストがともに単分子膜に結合しうる (c および d)。この場合には、単分子膜中の 2 種の脂質分子はゲストの結合によって集合する *induced-fit* 型のレセプターサイトを提供している。

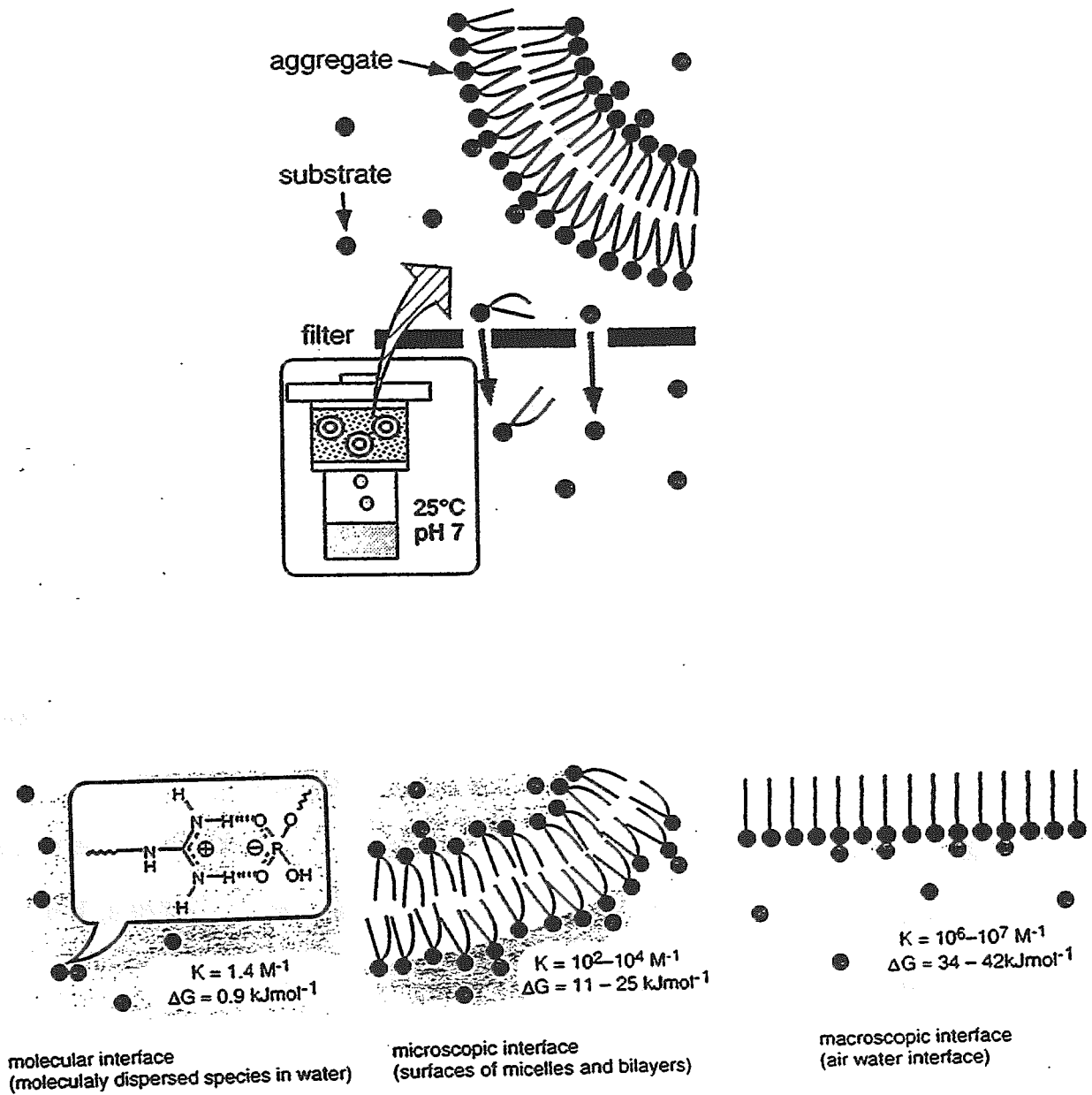
図1 脂質単分子膜に対する水溶性ペプチド分子の結合のモチーフ



1-2) メゾスコピック (ミクロスコピック) な界面での分子認識

水中に比べて気-水界面では水素結合が有効であり、水素結合に基づく分子認識がなされることが実験的に証明されている。これが、気-水界面という特殊な場が与える効果であるか、あるいは、様々な界面に共通する現象であるのかを検討するため、水中に分散したミセル表面や二分子膜表面のメゾスコピック (ミクロスコピック) な界面で分子認識現象を検討した。生体系では、このように水中に分散した界面において分子認識が行なわれていると考えられ、本系は生体系により近いモデルと考えることができる。実験系と結果の概要を図2に示す。認識系としては、グアニジニウム/リン酸あるいはメラミン/バルビツール酸の組み合わせを用いた。レセプター分子のミセルあるいは二分子膜の水分散液を作成し、ゲスト分子と混合した。この混合液を、ウルトラフィルターを通してろ過することにより、ミセル等に結合したゲストと未結合のゲストを分離した。グアニジニウム/リン酸系の結合定数を図中にまとめて示した。水中に分子分散したグアニジニウム/リン酸系の結合定数は 1.4 M^{-1} であり、気-水界面においては 10^6 — 10^7 M^{-1} にまで増大する。それらの値に対して、メゾスコピック (ミクロスコピック) な界面では 10^2 — 10^4 M^{-1} という値が得られた。つまり、気-水界面にはおよばないものの、メゾスコピック (ミクロスコピック) な界面においても、グアニジニウム/リン酸間の分子間相互作用は増大していることが確かめられた。同様な結果は、メラミン/バルビツール酸分子認識系においてもみられたが、この場合には、気-水界面での結合定数との間に大きな差は見られなかった。レセプター/ゲスト間に働く分子間相互作用の特性が、結合定数の界面間の差に反映されているものと推察される。

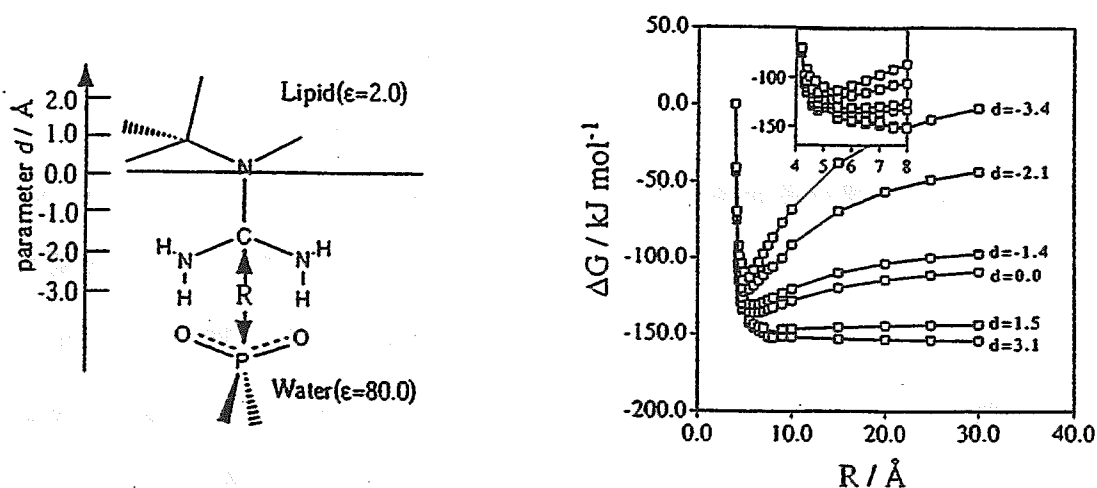
図2 メゾスコピック（ミクロスコピック）な界面での分子認識の検討手法と界面におけるグアニジニウム／リン酸系の結合定数の比較



1-3) 界面での分子認識のメカニズムの計算化学による解明

界面において水素結合などの分子間相互作用が増大し、それらに基づく分子認識が効率よくなされることが実験的に示された。この界面における分子認識のメカニズムを解明するために、ゲアニジニウム／リン酸分子認識系に対し溶媒効果理論を用いた計算化学の手法を展開した。計算モデルを図3に示した。ゲアニジニウム、リン酸アニオン分子を誘電率の異なる2媒体の境界付近に位置させた。界面の位置 (d) を固定した状態で、2分子間の距離 R を変化させて、エネルギー計算を行なった。エネルギープロファイルから結合エネルギーを求めたところ、結合部位自体が水相中に存在しても疎水相近傍に存在するならば、十分に大きい値が得られることが明らかとなった。つまり、界面付近の水相に存在する分子は、隣接する低誘電率相からの影響を受け、あたかも極性の低い媒体中に存在するかのよう振る舞うことがわかった。

図3 計算モデルとエネルギープロファイル



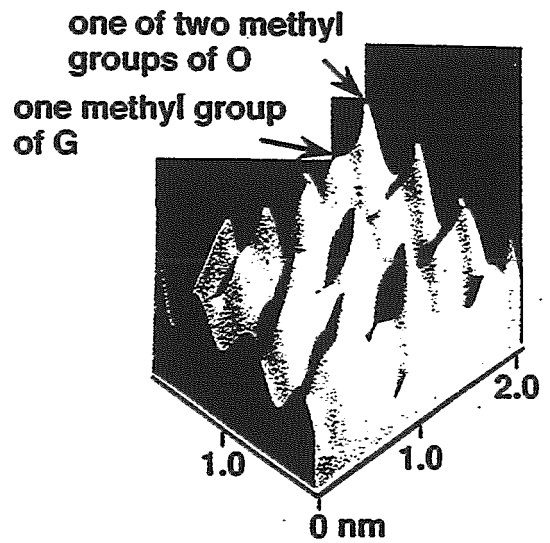
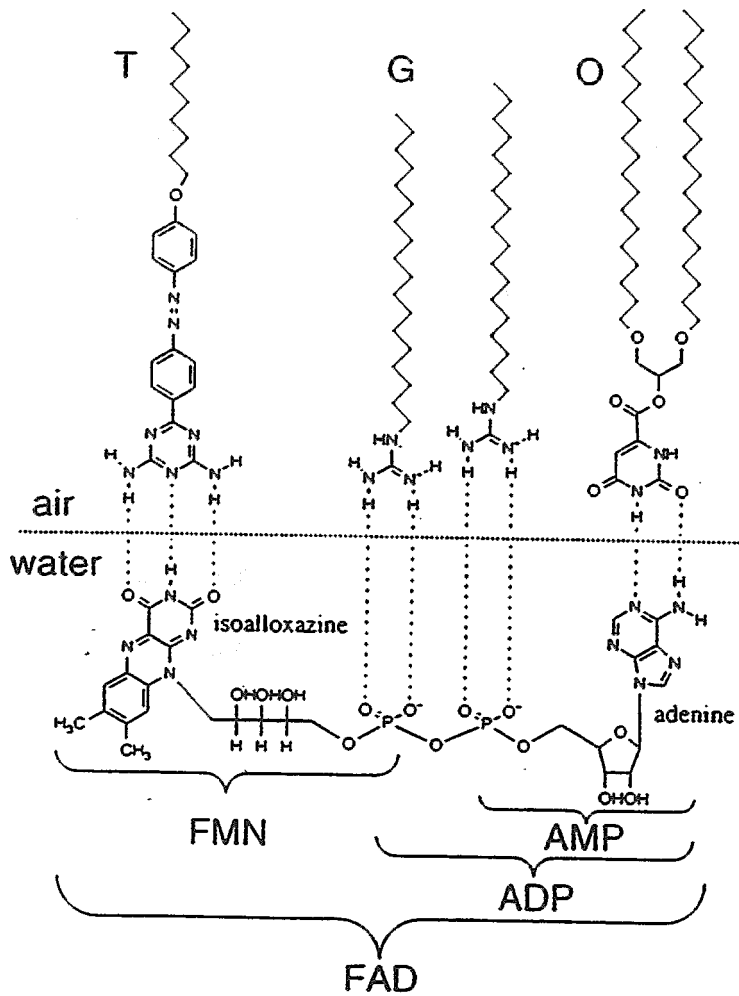
2) 二次元分子パターンと二次元分子ネットワーク

情報の高度集積化を目指して、フォトレジスト技術やレーザーマニピュレーションなどの超微細加工技術の開発がなされている。しかしながら、これらの手法では、加工に用いる道具や力の精度が加工精度そのものに反映される。加工に用いる道具の精度が分子レベルではない現状では、これらの手法で分子レベルの加工精度を得ることは難しい。我々は、外部から精度の悪い力を加えることなしに、分子が自発的に集合してできる超分子構造を制御することによって分子レベルの構造が人為に得られるのではないかと考えた。気-水界面においては効率のよい分子認識が行なわれるという知見に基づき、界面における分子認識による単分子膜面内での分子配列制御（二次元分子パターンと二次元分子ネットワーク）を検討した。具体的には、複数種の認識点を持つゲスト分子を用いて脂質の特異配列を生み出す方法、同種の複数認識点を有するゲスト分子を用いて脂質分子のパッキングとそれに伴う膜の結晶性を制御する方法、相補的な水素結合対の形成を利用して二次元面内にネットワーク構造を形成する方法、の3つを行なった。

2-1) FAD をテンプレートとした多点分子認識による脂質分子の二次元面内配列制御

フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) は、リン酸 (2つ)、アデノシン、イソアロキサジン環の三種の官能基を持ち、それぞれ独立に、グアニジニウム (G あるいは DG)、オロテート (O)、メラミンあるいはジアミノトリアジン (T) を認識することができる (図4)。我々は、これらの脂質の混合単分子膜を調製し、水相からの FAD の結合を検討した。 π -A カーブ、FT-IR、XPS による分析により、図4の結合構造が得られていることが示された。このうち、G と O の混合単分子膜を純水上および FAD 水溶液上からマイカ板上に移しとり、その分子像を AFM によって観察した。その結果、純水上からのサンプルでは均一な高さの分子像が得えられたが、FAD 上から移しとった単分子膜には規則的なオングストロームレベルの凹凸構造が得られた。後者では、FAD 分子に結合した際に、G 分子と O 分子の分子長差に基づく規則的な凹凸構造が得られたものと考えられる。

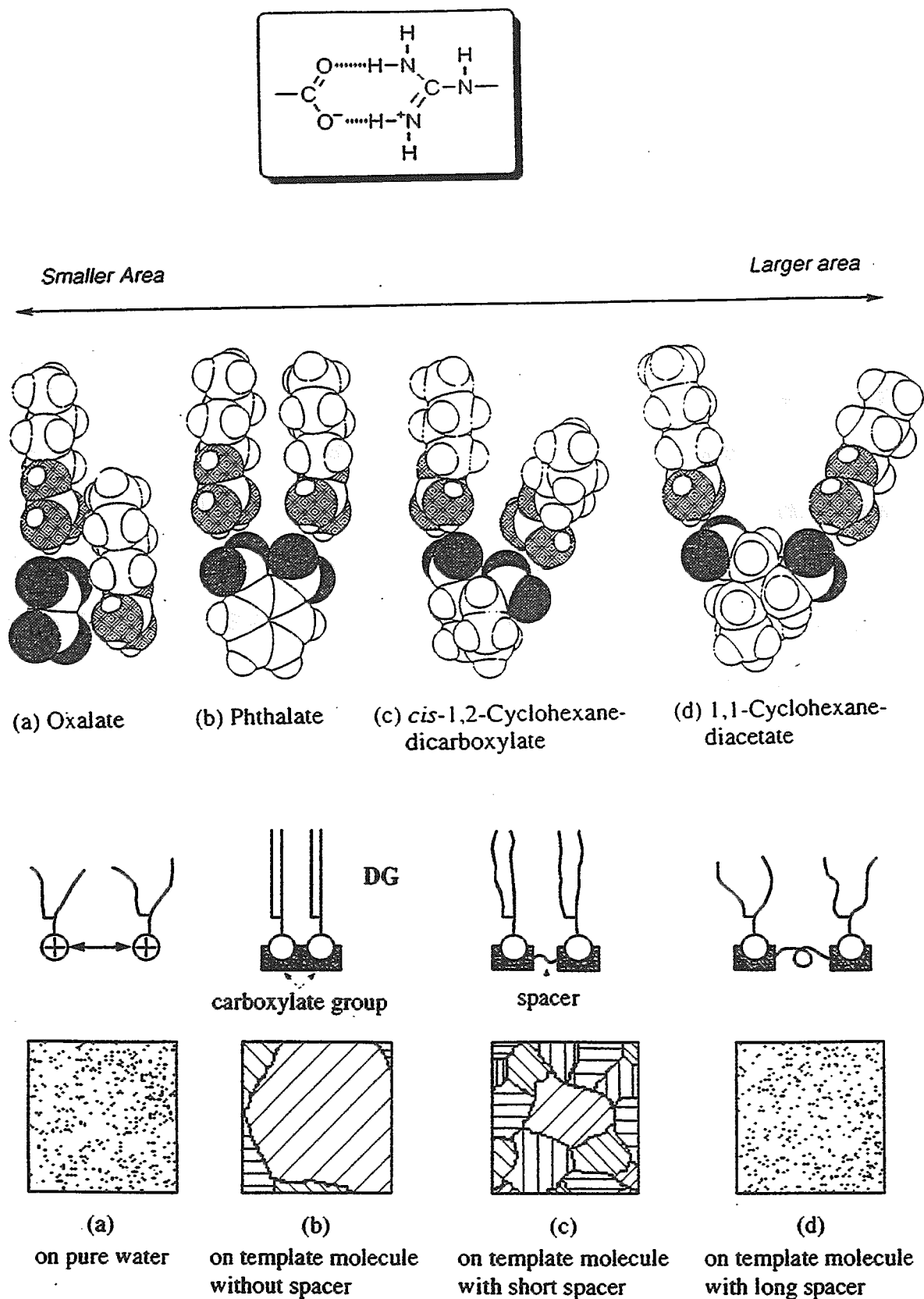
図4 混合脂質単分子膜による FAD の認識と FAD 水溶液上から累積された G/O 混合単分子膜の分子パターン



2-2) ポリカルボキシレートテンプレートによるグアニジニウム単分子膜の結晶性制御

グアニジニウム基は、カルボキシレートと強く結合することが知られている。我々は、水相中に種々の骨格を有するポリカルボキシレート分子をテンプレートとして溶かし、グアニジニウム単分子膜との相互作用を検討した。 π -Aカーブ、FT-IR、XPSによる分析により、図5の例に示されるように、テンプレート分子のカルボキシレート基間の距離や配置によって、単分子膜中のグアニジニウム脂質のパッキングが制御されることが示された。これらの例のうち、直鎖状のジカルボキシレートテンプレートを用いた場合について、EDとAFMによる分析を行なった。テンプレートがない場合には、単分子膜はアモルファス状になった。それに対し、oxalateのようなカルボキシレート間の間隔が短いテンプレートが結合した場合には、単分子膜は規則的な分子配列の結晶相となることがわかった。さらに、テンプレート分子のスペーサーメチレン数が増大するに対して単分子膜は再びアモルファス状になり、テンプレート分子の構造によって、単分子膜の集合構造が制御されていることがわかった。

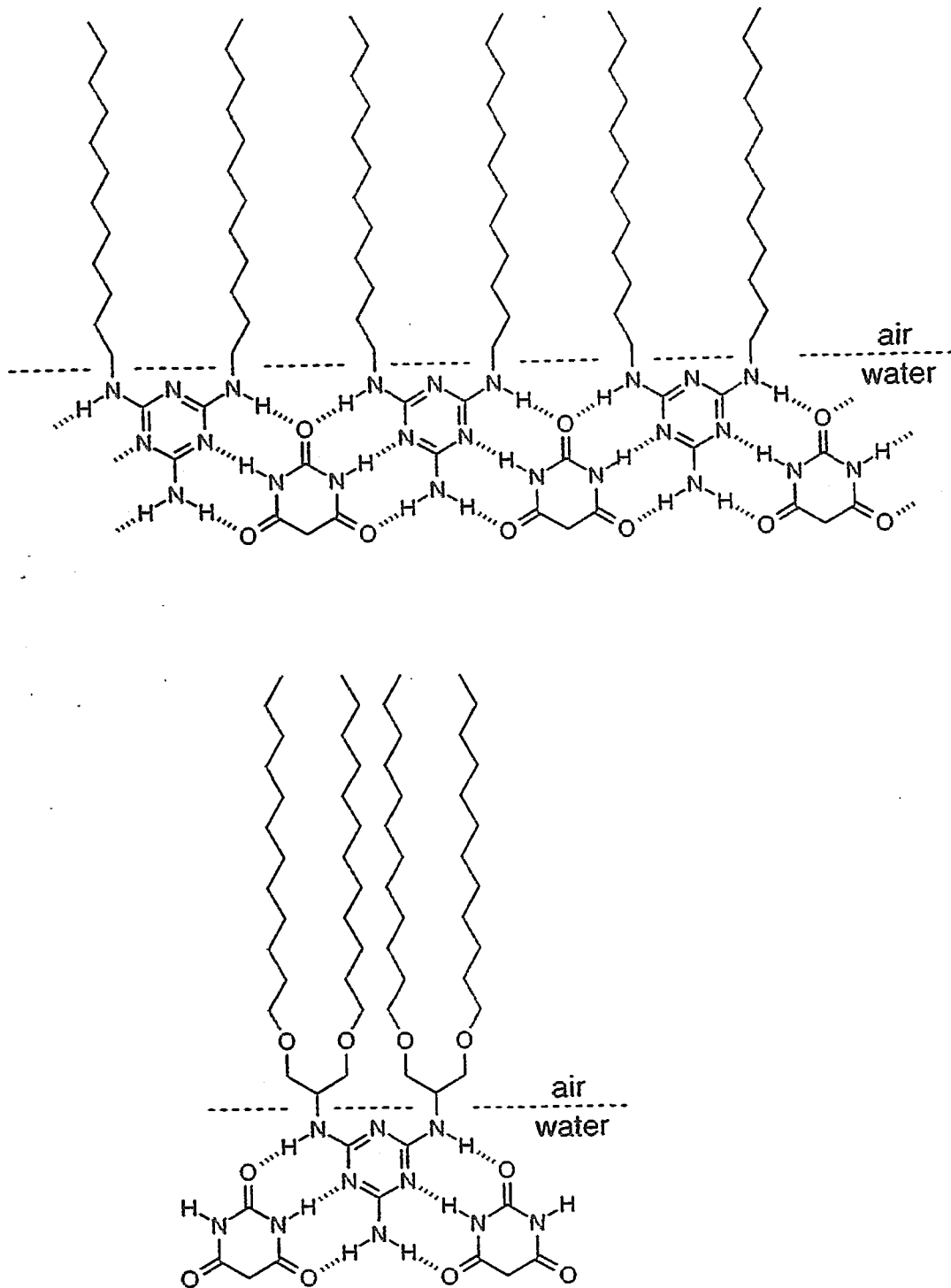
図5 ポリカルボキシレートテンプレートによるグアニジン単分子膜のパッキングコントロールとそれに伴う単分子膜の結晶性制御



2-3) メラミン/バルビツール酸類の分子認識と二次元分子ネットワークの作成

メラミンとバルビツール酸類は相補的な水素結合で、交互に分子が連なったネットワークを形成することが知られている。我々は、メラミン単分子膜と水相中のバルビツール酸あるいはチオバルビツール酸分子の結合による二次元平面内の分子ネットワーク形成について検討した。ジアルキル、トリアルキル、テトラアルキル型のメラミン単分子膜に対するバルビツール酸の結合挙動を検討したところ、前二者に対してはメラミンとバルビツール酸が1:1で結合したネットワーク構造をとるが、テトラアルキルメラミン分子に対しては2つのバルビツール酸分子が結合した非ネットワーク構造となることがわかった(図6)。つまり、気-水界面でネットワーク構造を形成するためには、適正な水素結合距離が必要であることがわかった。このほかに、様々なメラミン誘導体やトリスメラミン型の脂質単分子膜に対するバルビツール酸あるいはチオバルビツール酸分子の結合を検討した。ジアルキルメラミン単分子膜を純水上およびバルビツール酸上からマイカ板上にうつしとり、AFMによって分子像を観察した。その結果、バルビツール酸の結合によりジアルキルメラミン単分子膜のアルキル鎖は整列し、二次元分子ネットワークの形成が示された。

図6 種々のメラミン単分子膜に対するバルビツール酸の結合様式



3) 交互積層法

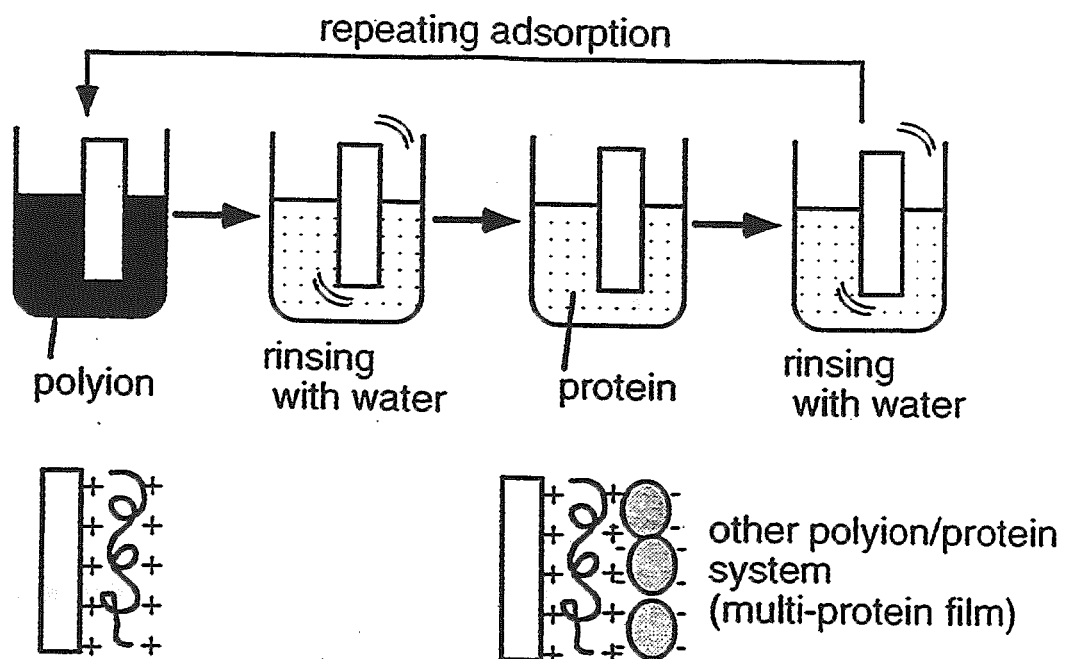
機能性分子を任意の順番に配置させた超薄膜を形成することは、分子デバイスなどの開発において重要である。従来、任意の層構造の超薄膜を作成する技術としては、LB法が知られていたが、この手法では一般的に界面活性剤様の安定な水面単分子膜を形成する分子のみにしか適用されない。それに対して、近年、交互積層法という超薄膜作成法が提案されている。この手法は、以下のような原理に基づいている。荷電表面に対して反対荷電のポリイオンが電荷の中和を伴って吸着する際に、過剰吸着による電荷の反転が起こり、表面は反対荷電で覆われる。この後者の過程は電荷の再飽和と呼ばれ、この再飽和にともなって吸着は自発的に終了する。この過程をポリカチオンとポリアニオンで繰り返せば、積層過程が任意の回数、任意の順番で繰り返される。積層薄膜の厚さは分子レベルであることが示されている。さらに、この手法はLB法等の従来の手法に比べて、はるかに簡便であり、低コストにて行なわれうる。したがって、交互積層法は次世代の超薄膜作成法となることが期待されている。我々は、この交互積層法が水溶性の荷電分子に広くて起用されるものと考え、種々の機能性薄膜の作成およびそれらが示す機能について検討した。

3-1) 交互積層法によるタンパク質超格子の作成

機能性物質の交互積層化として、タンパク質とポリイオンとの間の交互積層（タンパク質超格子）を水晶発振子法およびUVスペクトルによって検討した（図7）。生体においては、タンパク質が特異配列することによって、様々な高次機能を果たしており、タンパク質を任意の順番で並べた超薄膜を作成することはタンパク質工学の重要なターゲットの一つである。まず、我々はグルコースオキシダーゼ（GOD）やミオグロビン（Mb）など数十種のタンパク質の積層化を検討した。その結果、タンパク質を等電点から十分に離れたpH条件の水溶液に溶かし、反対荷電のポリイオンを積層のパートナーとして選べば、タンパク質は普遍的に交互積層されることが示された。さらに、Mbとリゾチーム（Lys）を適当なポリイオンをはさんで積層した薄膜の作成や、異なる荷電

状態のヘモグロビン (Hb) を同一薄膜内に積層することにも成功した。これらの結果から、交互積層法によればほとんどのタンパク質が任意の順番で任意の層数だけ積層されることが明らかとなった。

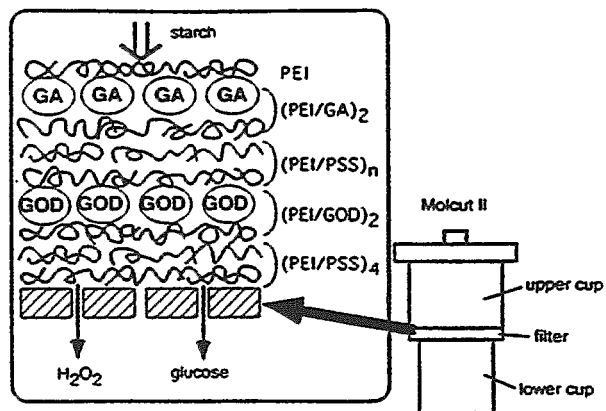
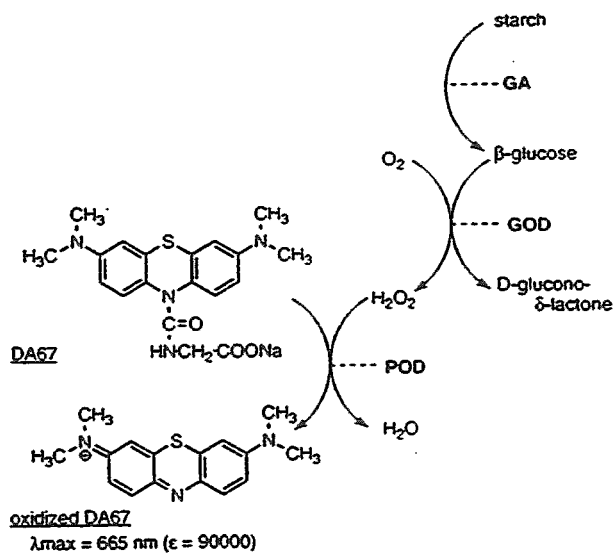
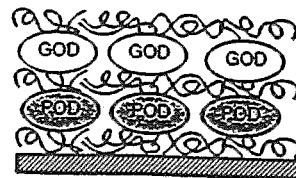
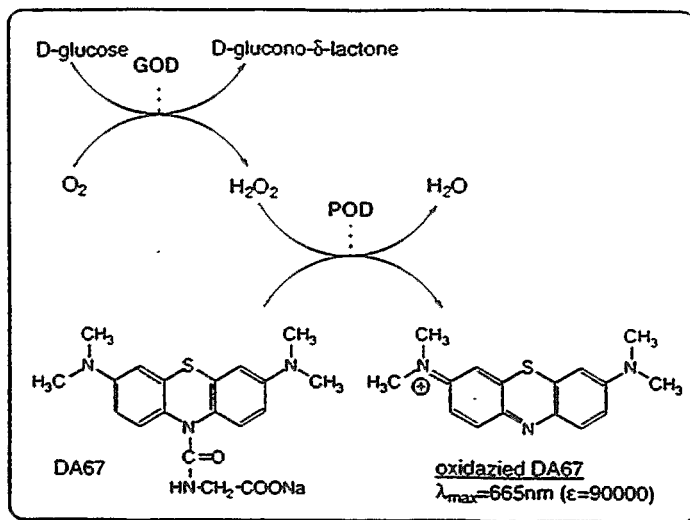
図7 タンパク質超格子の作成法



3-2) タンパク質超格子による酵素連続反応

交互積層法によれば、様々な機能性分子が任意の順番で薄膜化される。この薄膜構造に基づく、機能発現を実証するため、複数種の酵素を積層したタンパク質超格子による酵素連続反応について検討した。まず、GODとペルオキシダーゼ (POD) を積層した薄膜を石英板上に作成し、この薄膜における連続酵素反応を測定した。基質であるグルコースと指示薬 DA67 を含む水溶液にこの薄膜を浸漬すると、図8に示した反応スキームにしたがって反応が進み、DA67酸化体の生成に伴うスペクトル変化が観測された。この結果は、両酵素が積層膜中で活性を保持していることと、両酵素が連続的に働いていることを示す。また、ウルトラフィルター上にグルコアミラーゼ (GA) と GOD を積層し、デンプン溶液を一方向から流し、その加水分解挙動を検討した。図中に示した反応スキームと同じ積層順序に2種類の酵素が並んだ場合にのみ効率のよい反応が起こり、積層順序を反対にした場合には基質の逆拡散を必要とするために反応率の大幅な減少が観測された。この例では、積層膜中の酵素の積層順序の重要性が示されている。これは、交互積層法では任意の積層順序が任意にコントロールできることのメリットが表されたものでもある。また、この場合には、未反応のデンプン分子はウルトラフィルターによって除かれ、ろ液中には混入しないことが明らかになった。これは、交互積層法では様々な形状、材質の基板や担体を用いることができるというメリットを示すものである。

図8 タンパク質超格子による酵素連続反応



3-3) 交互積層法による種々の機能性分子の超薄膜化

我々は、タンパク質以外の機能性高分子の交互積層化についても検討した。まず、無機の高分子アニオンであるモンモリロナイト (Mont) あるいはシリカコロイド粒子をポリカチオンである PEI や PDDA と交互積層した。水晶発振子による解析の結果、これらの積層は再現性よく繰り返し行なわれることが明らかとなった (図9)。この結果は、有機/無機ハイブリッド薄膜の作成に交互積層法が有効であることを示している。

これまで、交互積層は荷電高分子に対して主に検討されてきたが、色素などの機能性低分子に対しても有用性が確認されれば、その応用範囲は広がる。我々はコンゴレッド (CR) 等の色素とポリイオンとの交互積層法を水晶発振子法および UV スペクトルによって検討した。その結果、多くの色素分子が膜中での会合を伴って交互積層されることが明らかとなった。また、積層膜中での分子配向は色素分子中の荷電官能基の配置によって決定されることが明らかとなった。

図9 モンモリロナイト、シリカコロイド、色素とポリイオンとの交互積層に伴う水晶発振子の振動数変化

