

分子ピラミッドによる機能性ナノ組織体の創出

「組織化と機能」領域 青井 啓悟

要旨

ナノメートル間隔を隔てて機能素子を自在にレイアウトできれば、多くの機能材料を開発する糸口がつかめる。本研究では、両親媒性ピラミッド分子の頂点に機能素子を結合させ、その分子を組織化することで新しいナノ組織化材料を創出した。この方法により、分子認識・情報伝達機能を有する糖をナノサイズの間隔を隔てて二次元平面配列した糖鎖ナノマトリックスを得ることに成功した。ピラミッド分子のサイズや、疎水台座の種類をかえることで、機能分子の間隔を精密に制御することができ、薬物送達システムの担体や細胞培養基質などの生医学材料への応用が期待できる。糖を他の機能素子に置き換えれば、電子材料や光学材料など幅広い分野へ応用できる新素材の設計コンセプトとなる。

I. 研究のねらい

本研究は、ピラミッド状分子の頂点に分子認識機能素子としての糖を固定し、そのピラミッド分子を組織化することで、糖鎖の二次元精密レイアウトを行い、細胞培養基材などの新素材への応用展開に資する機能性ナノ組織体を自在に構築する新たな手法を確立することを目的としている(図1,2)。まず、精緻な細胞認識・情報伝達能をもつ糖を分子ピラミッド頂点に固定した新規両親媒性ピラミッド状分子の合成を行う。ピラミッド台座を組織化させることにより、二次元的に特定のナノ間隔を隔てて糖を精密配列させる手法を開拓する。分子ピラミッドの一次構造と、二次元配列した糖の間隔との相関を明確にして、ナノレベルでの糖鎖空間配列の制御を行う。そして、これらの新素材と小麦胚芽レクチンなどのタンパク質との相互作用を調べることにより、最適な糖鎖間隔を検討する。肝細胞標的型のガラクトース型ピラミッド状分子の合成を行い、薬物送達システムの担体や肝細胞培養基質などに応用する高性能生医学材料の開発をめざす。

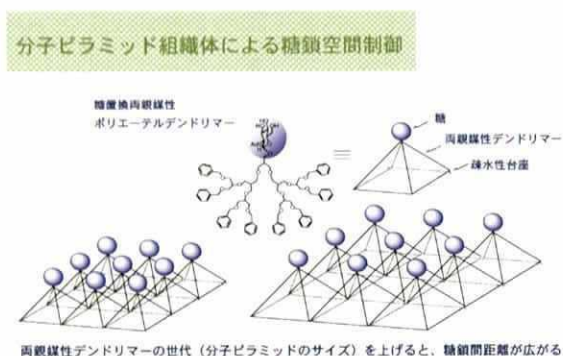


図1 両親媒性 dendリマーの組織化による機能原子団のナノレベル空間配置制御の概念図

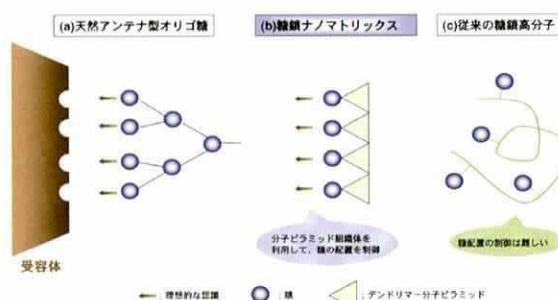


図2 糖をもつ両親媒性 dendリマーの組織化による高い細胞認識能の発現原理

II. 研究成果と考察

(1) 分子量が単一で、分岐鎖の欠損がない両親媒性分子ピラミッドの合成

複数の疎水基をもつ新しいタイプの両親媒性分子として、一連の新規両親媒性脂肪族ポリエーテル型 dendritic 分子の創出を行った。すなわち、コアが水酸基あるいは糖で、4個あるいは8個の疎水基をもつポリエチレングリコール型 dendritic 分子の合成を行った。Dendritic 分子の合成法は、表面末端の疎水基からコアに向かって段階的な合成を進める convergent 法により行い、分岐の欠損のない単一分子量の dendritic 分子を得ることができた。糖としては、分子認識能を評価するための *N*-アセチル-D-グルコサミン型と、肝細胞標的型のガラクトース型を合成した。疎水基としては、*n*-ヘキシル基、シクロヘキシル基、ベンジル基をもつ各種の dendritic 分子を合成した。

既存の両親媒性分子の概念からは、これらの疎水基はいずれも小さく、組織化には不十分と考えられてきた。ところが、次項で述べるように、本研究で合成した一連の両親媒性 dendritic 分子は二次元平面配列することが判明した。このことは、小さな疎水基でも、Dendritic 分子に、規則的に複数の疎水基を導入することで、疎水ゾーンとも呼ぶべき疎水台座を形成し、組織化に有効な疎水ブロックとなることを示しており画期的である。また視点をかえれば、本研究では分子形態が規制されたナノオブジェクトを創出することができたことに意義がある。自在にコア官能基と、疎水基を変換できるために、ナノ組織体を意のままに構築するための新しい素構造を開発できた。

なお、本項の両親媒性分子ピラミッドの構築については、初期の計画より充実し発展した内容の分子構築ができた。すなわち、次項の二次元レイアウトによりナノレベルの精密糖鎖配列制御ができることがわかったので、ファインチューニングが可能な一次構造設計にフィードバックし、多彩な分子ピラミッドの作製を行った。

(2) 糖鎖二次元精密レイアウト技術の確立

両親媒性脂肪族 dendritic 分子を空気-水界面に展開し、単分子膜を調製することで糖の二次元配列を行った。上述の一連の dendritic 分子からは単分子膜「糖鎖ナノマトリックス」が得られた。技術的には、圧縮速度を低くするなどの工夫を施しているものの、小さな疎水基にもかかわらず両親媒性 dendritic 分子の単分子膜が形成できたことは特筆に値し、ピラミッド状分子のモチーフを活かして平面組織体を具現化することができた。

なお、分岐鎖がベンジルエーテルの芳香族ポリエーテル dendritic 分子（第2世代、末端4分岐ベンジル型、コア水酸基型）は、安定な膜を形成しなかった。ピラミッド型両親媒性分子による二次元精密レイアウトには、Dendritic 分子骨格自体が両親媒性である脂肪族ポリエーテル dendritic 分子が好ましいことが明確となり、本研究での考案が適切であったことが裏付けられた。

両親媒性脂肪族ポリエーテル dendritic 分子単分子膜の糖鎖間隔は2nmに近い値で系統的に制御することができた。例えば、コア（すなわちピラミッド分子頂点）が *N*-アセチル-D-グルコサミンで、疎水基（ピラミッド台座）が *n*-ヘキシル基の8末端型（第3世代）の dendritic 分子単分子膜の糖質間隔（すなわち分子間距離）は、1.7nmであった(図3)。ある哺乳類の肝細胞の糖結合部位は2nm前後の間隔であることが知られており、本研究の dendritic 分子を用いて理想的な細胞標的材料や細胞培養材料を設計どおりに作製できる道筋がついた。

この dendritic 分子に対応する、コアが水酸基の dendritic 分子単分子膜の頂点間隔（分子間距離にあたる）は、1.8nmであった。このことは、ピラミッド分子を組織化することで、その頂点に配した分子をナノ間隔を隔てて配列できることを示している。

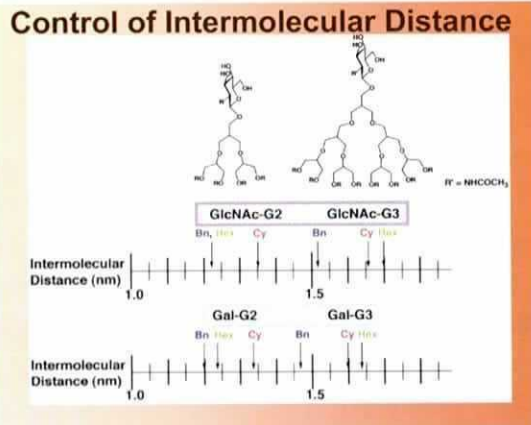


図3 両親媒性 dendリマー単分子膜による分子間隔制御(コア糖置換体、第2,3世代)

Control of Intermolecular Distance

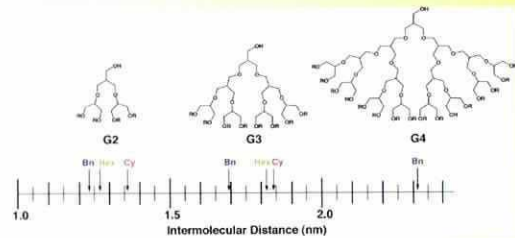


図4 両親媒性 dendリマー単分子膜による分子間隔制御(コア水酸基型、第2-4世代)

16 末端型の第4世代脂肪族ポリエーテル型 dendリマー(コア:水酸基、疎水性台座:ベンジル型)の単分子膜の形成にも成功した。ピラミッド頂点間距離は、2.31nm となり、目標とする肝細胞の受容体結合部位の間隔 2nm をカバーすることができた(図4)。

また、両親媒性 dendリマーの一次構造を変換すること、つまり末端基の数と、疎水基の組み合わせを変えることで、二次元組織体のコア間隔を次のように精密制御できるとわかった。

ピラミッド分子の一次構造と二次元組織体の頂点ナノ間隔の対応

ピラミッド分子の一次構造	頂点のナノ間隔
末端基の数: 4 末端型 (第2世代) → 8 末端型 (第3世代)	小 → 大
疎水基: ベンジル → ヘキシル → シクロヘキシル	小 → 大
コアの置換基: 水酸基 → 糖	ほぼ同じ

本研究では、本来集合しやすい糖などの機能素子を一定のナノ間隔をあけて並べることができる手法を開発することができた。従来法では、糖が会合してしまうために、糖をもたない両親媒性分子と混合するなどの方法をとったとしても、初期の目的を達することはできていなかった。本法では、生体分子である糖に限らず、各種の機能分子を頂点に容易に導入できるので、生医学材料のみならず、ひろく電子材料や触媒などの機能性材料に新しい材料設計概念を提供できたと考えている。

なお、この精密レイアウトは当初の計画より充実した結果が得られ、前項の分子ピラミッドの設計にフィードバックした。

(3) ドラッグデリバリーシステムや遺伝子デリバリーシステムに好ましい糖鎖ピラミッド被覆ナノ粒子の創製

糖置換脂肪族ポリエーテル dendリマー(第2世代、ベンジル末端型)は、水には溶解しにくかったが、超音波照射により分散させることができた。レーザー光散乱装置により、ナノ粒子を測定した結果、平均直径は 260nm ほどであった。表面が二分子膜で覆われていると仮定して 13 万分

子以上の dendriマーにより形成されていると見積もられる。水中で調製しているため、表面は糖鎖が二次元に配列した構造からなっていると考えられる。薬物送達システム用の輸送担体としては、100~400nm ほどのサイズが望ましいが、ピラミッド状分子を用いて理想的なサイズのナノ粒子を調製することができた。

(4) ナノバイオマテリアルとしての性質

両親媒性 dendriマーのナノバイオマテリアルとしての応用に向けて、レクチンを用いた細胞認識能の評価を行い、良好な細胞認識能を示すことを明らかにした。また、生体親和性や生分解性などの性質を調べた。コレステロールエステラーゼを用いて、生分解性を評価した。ベンジル末端脂肪族ポリエーテル dendriマーのコアにポリカプロラク톤を導入し、その酵素分解性を全有機炭素量(TOC)測定で評価したところ、ポリカプロラク톤と比較して明らかに高い分解性を示すことがわかった。さらに、ベンジル末端脂肪族ポリエーテル dendriマー部分の生物化学的酸素要求量(BOD)試験を行った結果、良好な分解性が認められ、菌体により分解資化され代謝されることが明らかになった。疎水基をはずした脂肪族ポリエーテル dendriマー骨格自体の生分解性も BOD 試験により評価したところ、ベンジル型より分解速度は低いものの良好な分解性を確認することができた。この dendriマーは、生医学材料として工業的にも利用されているポリエチレングリコールの分岐型にあたり、新素材として望ましい性質を具備していることがわかった。

III. 展 望

これまでの研究から、分子ピラミッドの一次構造を設計することで、その二次元組織体の糖鎖間隔を、理想とするナノレベルで精密制御できることを明らかにした。また、分子ピラミッドに基づくナノ組織体が新しいタイプの機能性材料として有望であることを示すことができた。今後、肝細胞標的型のガラクトース型 dendriマーの細胞認識能の評価、ならびに細胞培養基質などとしての性能評価をさらに推進したい。本研究では、糖が置換した両親媒性 dendriマーのナノ組織体について研究を進めたが、このコンセプトは、集合しやすい機能原子団を望ましいナノ間隔をへだててレイアウトできるため、生医学材料のみならず電子材料・光学材料などひろく新しいナノ材料の基本的な設計指針として応用できるであろう。

発表論文

- 1) Ito, M., Imae, T., Aoi, K., Tsutsumiuchi, K., Noda, H. and Okada, M. In Situ Investigation of Adlayer Formation and Adsorption Kinetics of Amphiphilic Surface-Block Dendrimers of Solid Substrates. *Langmuir*, **18**(25), 9757-9764 (2002).
- 2) Manna, A., Imae, T., Yogo, T., Aoi, K. and Okazaki, M. Synthesis of Gold Nanoparticles in a Winsor II Type Microemulsion and Their Characterization. *Journal of Colloid Interface Science*, **256**, 297-303 (2002).
- 3) Aoi, K., Katsube, M., Tsutsumiuchi, K. and Okada, M. Controlled Architecture of Nano-Structures Based on Star Dendrimers. *Kobunshi Ronbunshu*, **59**(12), 742-752 (2002).
- 4) Aoi, K., Takasu, A., Okada, M. and Imae, T. Nano-Scale Molecular Shapes of Water-Soluble Chitin Derivatives Having Monodisperse Poly(2-alkyl-2-oxazoline) Side Chains. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **203**(18), 2650-2657 (2002).
- 5) Aoi, K., Miyamoto, M., Chujo, Y. and Saegusa, T. A New Type of Block Copolymerization with One-Shot Feeding of Two Monomers. *Macromolecular Symposia*, **183**, 53-64 (2002).
- 6) Aoi, K., Aoi, H. and Okada, M. Synthesis of a Poly(vinyl alcohol)-Based Graft Copolymer Having Poly(ϵ -caprolactone) Side Chains by Solution Polymerization. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **203**(7), 1018-1028 (2002).
- 7) Nomura, N., Ishii, R., Akakura, M. and Aoi, K. Stereoselective Ring-Opening Polymerization of Racemic Lactide Using Aluminum-Achiral Ligand Complexes: Exploration of a Chain-End Control Mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, **124**(21), 5938-5939 (2002).
- 8) Tsurugi, K., Nomura, N. and Aoi, K. Palladium-Catalyzed Allylic Substitution Reaction: Oxidative Addition versus Dissociation in an Olefin-Palladium(0) Complex. *Tetrahedron Letters*, **43**(3), 469-472 (2002).
- 9) Sato, H., Mizutani, S., Ohtani, H., Tsuge, S., Aoi, K., Seki, T. and Okada, M. Determination of Degree of Substitution in *N*-Carboxyethylated Chitin Derivatives by Pyrolysis-Gas Chromatography in the Presence of Oxalic Acid. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **64**, 177-185 (2002).
- 10) Tanaka, K., Dai, S., Kajiyama, T., Aoi, K. and Okada, M. Aggregation States and Molecular Motion in Amphiphilic Poly(amido amine) Dendrimer Monolayers on Solid Substrates. *Langmuir*, **19**(4), 1196-1202 (2003).
- 11) Funayama, K., Imae, T., Seto, H., Aoi, K., Tsutsumiuchi, K., Okada, M., Nagao, M. and Furusaka, M. Fast and Slow Dynamics of Water-Soluble Dendrimers Consisting of Amido-Amine Repeating Units by Neutron Spin-Echo. *Journal of Physical Chemistry B*, **107**(6), 1353-1359 (2003).
- 12) Funayama, K., Imae, T., Aoi, K., Tsutsumiuchi, K., Okada, M., Furusaka, M. and Nagao, M. Small-Angle Neutron Scattering Investigations of Layer-Block Dendrimers in Aqueous Solutions. *Journal of Physical Chemistry B*, **107**(7), 1532-1539 (2003).
- 13) Imae, T., Hirota, T., Funayama, K., Aoi, K. and Okada, M. Binding of Poly(amido amine) Dendrimer to Sodium Hyaluronate in Aqueous NaCl Solution. *Journal of Colloid and Interface Science*, **263**, 306-311 (2003).
- 14) Manna, A., Imae, T., Aoi, K. and Okazaki, M. Gold Nanoparticles Surface-Confined by Hybrid Self-Assembled Monolayers of Dendrimer and Dodecanethiol. *Molecular Simulation*, **29**(10-11), 661-665 (2003).
- 15) Nomura, N., Yoshida, N., Tsurugi, K. and Aoi, K. Versatile Carbon-Carbon Bond-Forming Polycondensation between Terpene Derivatives and Malonic Esters via Palladium-Catalyzed Allylic Substitution Reaction. *Macromolecules*, **36**(9), 3007-3009 (2003).

- 16) Nakamura, R., Aoi, K. and Okada, M. Interactions of Enzymes and a Lectin with a Chitin-Based Graft Copolymer Having Polysarcosine Side Chains. *Macromolecular Bioscience*, 4(6), 610-615 (2004).

総説

- 1) 青井啓悟、岡田鉦彦 シュガーボールー生医学ナノ材料の新設計ー. 未来材料, 2(8), 12-19 (2002).
- 2) 青井啓悟、岡田鉦彦 ナノ微粒子としてのデンドリマー. 高分子, 52(9), 682-686 (2003).
- 3) 田中敬二、長村利彦、梶山千里、青井啓悟、岡田鉦彦 デンドリマー超薄膜の凝集状態と分子運動特性. 表面, 41(10), 337-345 (2003).

著書

- 1) Aoi, K., Okazaki, M. and Okada, M. A Sugar Cylinder - Molecular Design and Functions. "Biomolecular Chemistry - A Bridge for the Future", Baba, Y. Ed., Maruzen, pp. 102-103 (2003).
- 2) Aoi, K., Aoi, H., Kawahito, R., Ohtani, H. and Sato, H. Dendrimer Induced Acceleration of Enzymatic Degradation of Polycaprolactone. "Biomolecular Chemistry - A Bridge for the Future", Baba, Y. Ed., Maruzen, pp. 286-287 (2003).
- 3) 青井啓悟、岡田鉦彦 デンドリマーのバイオ機能. "超分子科学ーナノ材料創製に向けてー", 中嶋直敏編著, 化学同人, pp. 301-308 (2004).