

研究課題別評価

1 研究課題名:分子ピラミッドによる機能性ナノ組織体の創出

2 研究者氏名:青井 啓悟

3 研究の狙い:

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。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。

4 研究成果:

(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 dendrimer 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 dendrimer の合成を行った。Dendrimer 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 dendrimer 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 dendrimer 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 dendrimer 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、Dendrimer に、規則的に複数個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 dendrimer 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 dendrimer 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 dendrimer 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、分岐鎖がベンジレーテルの芳香族ポリエーテル dendrimer (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、Dendrimer 骨格自体が両親媒性である脂肪族ポリエーテル dendrimer 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 dendrimer 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 dendrimer 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。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 dendrimer 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分かった。

この dendrimer に対応するコアが水酸基の dendrimer の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。

16 末端型の第 4 世代脂肪族ポリエーテル型 dendrimer (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。

また、両親媒性 dendrimer 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 dendrimer (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 dendrimer 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) 生医学材料としての性質

両親媒性 dendrimer の生医学材料としての応用に向けて、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 dendrimer のコアにポリカプロラクトンを導入し、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、ポリカプロラクトンと比較して明らかに高い分解性を示すことがわかった。また、ベンジル末端脂肪族ポリエーテル dendrimer 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 dendrimer 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 dendrimer 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。

5 自己評価:

これまでの研究で、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、新しいタイプの機能性材料として有望であることを明らかにしてきた。今後、肝細胞標的型のガラクトース型の糖鎖間制御の評価を行う必要がある。また、レクチンを用いた細胞認識能の評価、ならびに細胞培養基質としての性能評価をさらに推進したい。

6 研究総括の見解:

青井啓悟研究員は、両親媒性ピラミッド分子の合成において、dendrimer 世代及びピラミッド頂点の置換基(糖鎖)に依存してパッキング状態を制御することを実現した。着眼点の面白さを実証した点の評価したい。生分解性の評価も良好な結果を示したことから、今後の生物学的応用に期待したい。

7 主な論文等:

- 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).