

背景

高分子はセラミックスや金属とならぶ三大材料の 1 つであり、我々は高分子でできた様々な製品に囲まれて生活している。高分子材料はソフトマターと呼ばれ、ハードマターと呼ばれるセラミックスや金属と比較して加工性が良くまた軽量であることからその利用が拡大している。高分子とは一般的に分子量が一万を超える高分子量の化合物であり、低分子量化合物とは異なる力学的・熱力学的性質を示す。高分子は大きく 2 種類に分けることができる。1 つは天然高分子であり、核酸 (DNA) やタンパク質、脂質、多糖類 (デンプン、セルロースなど)、天然ゴムなど、天然に産出されている高分子である。生体維持に大きく関与しているものが多く、天然高分子は生体高分子とも呼ばれる。もう 1 つは合成高分子あり、合成樹脂 (プラスチック) や合成ゴム、合成繊維などの人工的に合成された高分子である。

ところで、現代における社会的関心は【環境保全】と【機能性】である。ほとんどの製品が『エコ』をうたい、また衣類や家具、文具にいたるまで数多くの『機能性』製品があふれている。この時代の流れは高分子化学にとっても例外ではなく、【環境に優しい高分子】やある特定の機能を発現する【機能性高分子】に関する研究が盛んになっている。環境に優しい高分子としては、天然高分子や生物資源 (バイオマス) から作られたプラスチックであるバイオプラスチックなどが挙げられる。機能性高分子としては、電気伝導性を有する導電性高分子、吸水性を有する吸水性高分子、熱や光、pH、電気などの外部刺激に応答する刺激応答性高分子などがある。また、生体高分子も広義の意味で機能性高分子の一種であるとも考えられ、その立体構造や配向などを精密に制御することにより情報伝達などの機能を発現している。生命活動は生体高分子のボトムアップ化により発現している機能に支えられていると言え、より高機能な機能性高分子を合成するためには、生体高分子に倣い個々の機能を基に合目的にボトムアップ化し、機能からみた構造制御・調製が必須であると考えられる。

これまでの研究内容

～形態を制御した酵素を触媒に用いたセルロースの人工合成～

天然において最も多く存在する高分子はセルロースであり、繊維状であることから古くから紙や衣服として利用されている。セルロースは植物等の構成成分で、膜中に存在する膜タンパク質が複数個集合して複合体となった酵素、セルロース合成酵素複合体、の働きにより合成される。このセルロース合成酵素複合体には様々な形態のものが存在し、その形態に依存して生成されるセルロースの結晶型が異なることが知られている。

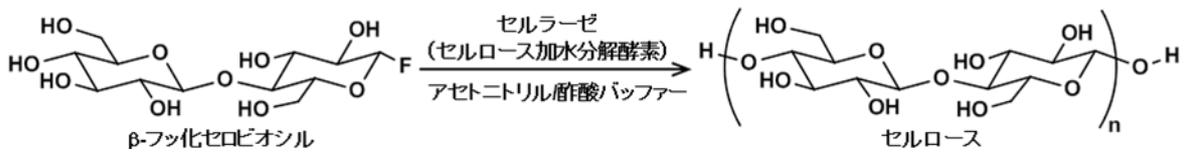


図 1. セルロースの酵素触媒重合のスキーム

一方、セルロースの有用な人工合成法として、セルラーゼを触媒に用いる酵素触媒重合法が提唱されている（図 1）。酵素触媒重合反応とは、本来はセルロースの加水分解酵素であるセルラーゼを触媒に用い、有機溶媒存在下、モノマーであるβ-フッ化セロビオシルに作用させるとセルロースが生成するという反応である。しかし、得られるセルロースの結晶型は天然型とは異なっている。天然型は熱力学的に準安定であり、人工合成においては熱力学的に安定な結晶型（＝人工型）のみが合成される。そこで、天然の合成酵素を模倣して様々な酵素の集合状態を人工的に再現することにより、天然型セルロースの人工合成および生成するセルロースの結晶型を制御した人工合成の達成を目指した（図 2）。

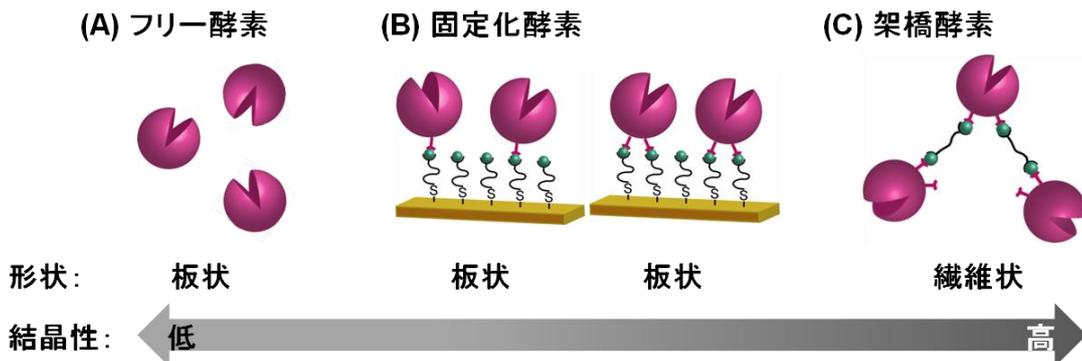


図 2. 触媒に使用した酵素の形態の模式図と、重合により得られたセルロースの形状および結晶性の結果。(A) フリー酵素、(B) 固定化酵素、(C) 架橋酵素。

触媒に用いるセルラーゼは、遺伝子工学的手法により固定化用のタグを導入し、酵母からの分泌タンパク質として回収した後、精製した¹⁾。得られた精製酵素を溶液中で用いて重合を行なったところ（フリー酵素、図 2A）、セルロースの生成が確認できた（図 3 左）。しかし、透過型電子顕微鏡（TEM）観察により確認できた結晶は板状であり、また電子線回折像により結晶型は人工型であると同定され（図 3 右）、生成したセルロースは天然型ではなく人工型であった^{1,2)}。

続いて、膜タンパク質でありその配向が揃っている天然の合成酵素にヒントを得、酵素を固体表面上に配向固定化した（図 2B）³⁾。1 点で固定した固定化酵素のみでなく、2 点で固定化してより配向を制御した固定化酵素も調製し、配向の違いによる影響についても検討した。得られた固定化酵素を用いて酵素触媒重合を行なったところ、いずれの固定化酵素の場合においても重合反応が進行し、セルロースが生成していることを確認した（図

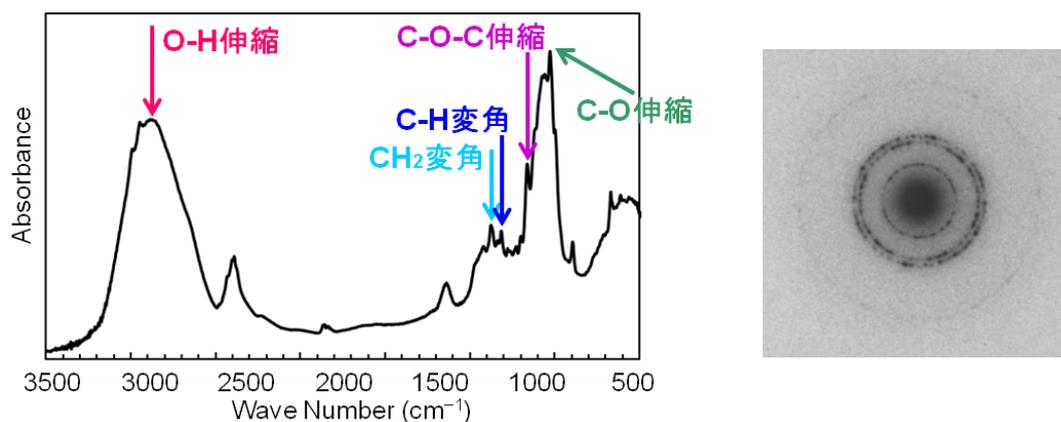


図 3. フリー酵素を用いた酵素触媒重合により生成したセルロースのキャラクタリゼーションの結果。(左) IR スペクトル、(右) 電子線回折像。

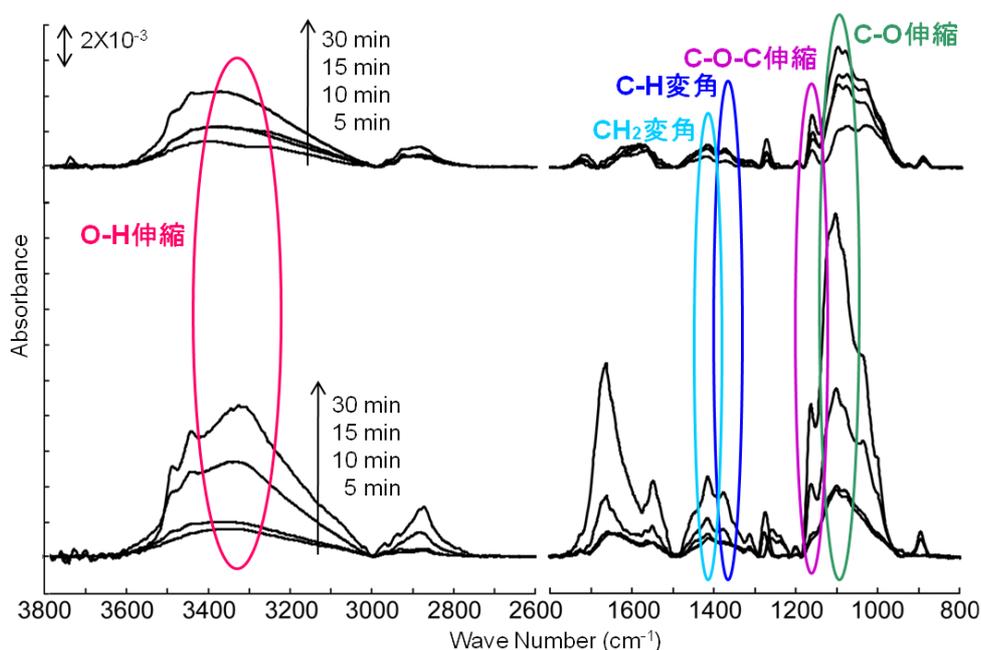


図 4. 固定化酵素を用いた酵素触媒重合により生成したセルロースの IR スペクトル。(上) 1 点で固定化、(下) 2 点で固定化した酵素による結果。

4) 4)。得られたセルロースの結晶性はフリー酵素を用いた場合よりも高かった。また、結晶性の高さに比例して出現する 3500 cm^{-1} 付近の 2 つのすどいピークが、2 点で固定化した酵素の方がより早い重合時間中出现していることから、酵素の配向に比例して生成されるセルロースの結晶性が高くなることを明らかにした。しかし、その結晶型はやはり人工型であった。この原因として、固定化した酵素の密度が小さかったために、局所的に見た場合に酵素の配向を揃えることができていなかったことが考えられる。

つまり、酵素同士が隣接していることも重要であると考えられる。そこで、架橋により強制的に酵素同士を結合させて酵素触媒重合を行なったところ (図 2C)、天然と同様の織

維状セルロースが得られた (図 5) 5)。

以上のように、触媒として用いる酵素は同じであるにも関わらず、その集合状態を変化させることで生成するセルロースの結晶性や形態が変化した。また、天然を模倣することで天然と同じ繊維状セルロースの合成に成功した。この様に、酵素の集合状態を制御することにより、酵素の集合状態に依存した結晶性や形態を有するセルロースの合成、つまりボトムアップによるセルロースの人工合成を達成した。

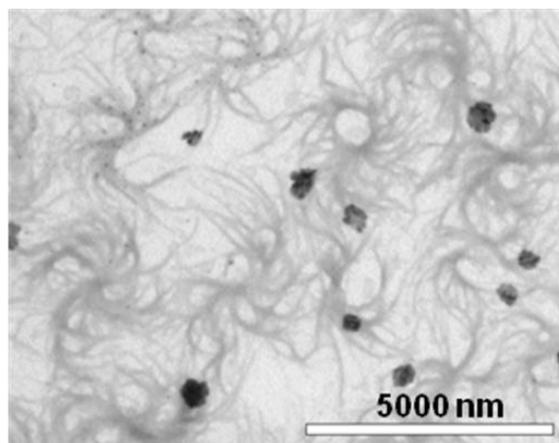


図 5. 架橋酵素を触媒に用いて得られたセルロースの電子顕微鏡写真。天然型と同様の繊維状のセルロースが確認できる。

今年度以降の研究内容

～構造を高度に制御した機能性高分子の合成～

立体構造を緻密に制御することにより特有の優れた機能を発現している生体高分子に倣い、合成高分子においても高機能性の発現を目的として配向や構造を精密に制御させるという動き (=ボトムアップによる機能の創出) が活発になっている。その中心を担っているのが、複数の高分子鎖が集合状態を形成している『分子集合体』である。分子集合体は、水に可溶性親水性部位と水に不溶性疎水性部位から成る両親媒性高分子を利用すると、疎水性相互作用により自発的に形成される (自己組織化)。分子集合体の応用例として、内部に低分子化合物を内包することが可能なナノキャリアが挙げられる。ナノキャリアが外部刺激への応答性を有していれば内包した化合物を放出することも可能となり、目標とする患部への選択的な薬物輸送・放出が達成されることが考えられ (ドラッグデリバリーシステム: DDS)、特に医療用材料への応用が注目されている。ナノキャリアの研究は現在までのところ化合物の観点からの内包・放出の検討がメインであり、ナノキャリア自体の形態変化挙動、すなわちナノキャリアの構成成分自体の構造変化挙動に関してはほとんど検討されていない。

そこで、高分子から成る分子集合体の形態変化を高分子鎖の構造変化という観点から蛍光プローブ法により詳細に検討することを目的とする (図 6)。蛍光プローブ法とは、高分子鎖に蛍光プローブを組み込み、その蛍光プローブの蛍光特性を測定することで高分子鎖

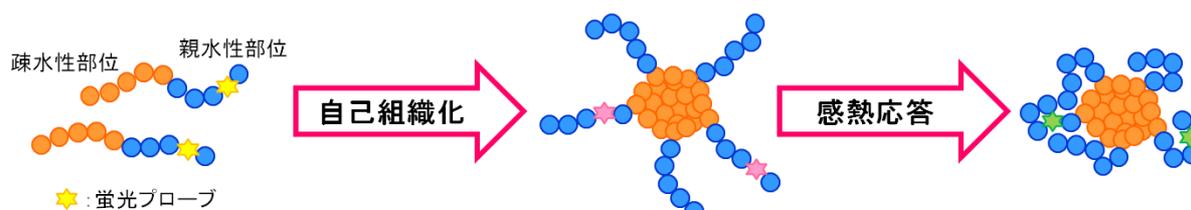


図 6. 分子集合体の調製および感熱応答による構造変化の模式図。高分子鎖の状態の変化に伴い、蛍光プローブの蛍光特性が変化する。

の情報を間接的に得る手法である。蛍光プローブ 1 分子による微小領域での測定となり、詳細な検討が可能となる。さらに、リアルタイム観察ができるという利点もある。

分子集合体を形成する両親媒性高分子として、親水性部位にポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAM)、疎水性部位にポリ乳酸 (PLA) を選択した (図 7)。PNIPAM は熱刺激に応答する感熱応答性高分子であり、水中において下限臨界溶液温度 (lower critical solution temperature : LCST) と呼ばれる 32°C 以下では水和により伸長して溶解しているが、32°C 以上になると脱水和により PNIPAM 鎖が収縮し、収縮した PNIPAM 鎖同士が凝集する。感熱応答性高分子を構成要素とするナノ

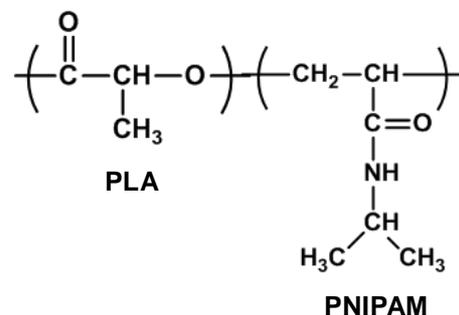


図 7. 両親媒性高分子の構造。

キャリアは温度応答を発現が可能であることから注目されており、特に PNIPAM は LCST が 32°C と生理温度に近いことから医療用材料として有用である。一方、PLA は植物などから抽出される乳酸が多数結合した高分子であり、生分解性を示す。また生体適合性を有しており、医療用材料としての応用が可能であるとして既に手術用縫合糸などとして利用されている。これら 2 つの特長ある高分子から成る両親媒性高分子は、生分解性および生体適合性を有する環境に優しい高分子であり、また感熱応答性を示す機能性高分子であるため、時代のニーズにあった理想的な高分子であると考えられる。

目的の両親媒性高分子は 3 段階で合成する。まず開環重合により PLA を合成する (1 段階目)。得られた PLA の末端に反応性基を導入し (2 段階目)、これを開始剤として PNIPAM のリビングラジカル重合を行なう (3 段階目)。リビングラジカル重合とは、分子量分布の狭い高分子が得られる精密重合法である。分子集合体は高分子鎖の親疎水バランスに依存してその形態が決定されるため、構成成分である高分子鎖の分子量分布を狭くする必要がある。

これまでに、目的とする両親媒性高分子の参照化合物として、構成成分である PNIPAM の合成を行なった。得られた PNIPAM 鎖の温度応答挙動について、温度変化による高分子鎖の水和の状態変化を水溶液の濁度により検討した (濁度法)。結果、38°C で急激な濁度の上昇が観察され、感熱応答性を有していることがわかった (図 8)。

今後、目的の両親媒性高分子を合成し、自己組織化により分子集合体を調製し、その形態および感熱応答挙動について詳細に検討する。また、両親媒性高分子に蛍光プローブを導入し、蛍光法によりその分子集合体の形成

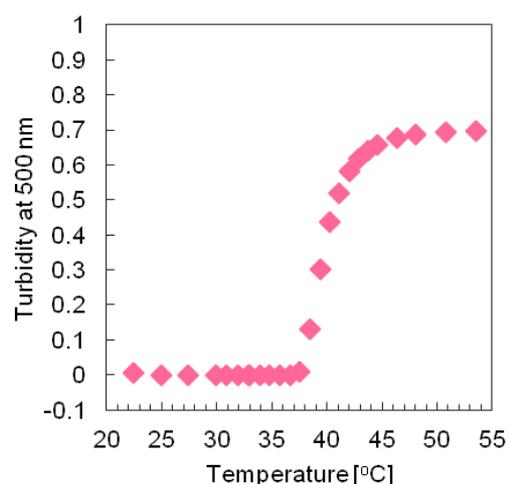


図 8. 合成した PNIPAM の感熱応答挙動の様子 (濁度法)。

過程や刺激応答挙動を詳細に検討する。さらに、構成要素である高分子鎖の親疎水バランスを変える、高分子鎖の構造を直鎖型以外にするなどした両親媒性高分子を合成し、それにより得られる分子集合体の特性について詳細に検討を行なう予定である。

[文献]

- 1) Itsuko Nakamura, Hisanari Yoneda, Toshifumi Maeda, Akira Makino, Masashi Ohmae, Junji Sugiyama, Mitsuyoshi Ueda, Shiro Kobayashi and Shunsaku Kimura, “Enzymatic Polymerization Behavior Using Cellulose-Binding Domain Deficient Endoglucanase II”, *Macromolecular Bioscience*, 5, 623–628 (2005).
- 2) Itsuko Nakamura, Akira Makino, Junji Sugiyama, Masashi Ohmae and Shunsaku Kimura, “Enzymatic Activities of Novel Mutant Endoglucanases Carrying Sequential Active Sites”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 226–231 (2008).
- 3) Itsuko Nakamura, Akira Makino, Masashi Ohmae and Shunsaku Kimura, “Immobilization of His-tagged Endoglucanase on Gold via Various Ni-NTA Self-Assembled Monolayers and Its Hydrolytic Activity”, *Macromolecular Bioscience*, 10, 1265–1272 (2010).
- 4) Itsuko Nakamura, Yoshiki Horikawa, Akira Makino, Junji Sugiyama and Shunsaku Kimura, “Enzymatic Polymerization Catalyzed by Immobilized Endoglucanase on Gold”, *Biomacromolecules*, 12, 785–790 (2011).
- 5) Itsuko Nakamura, Akira Makino, Yoshiki Horikawa, Junji Sugiyama, Masashi Ohmae and Shunsaku Kimura, “Preparation of Fibrous Cellulose by Enzymatic Polymerization using Cross-linked Mutant Endoglucanase II”, *Chemical Communications*, 47, 10127–10129 (2011).