

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	マラカイトグリーン誘導体を配したカチオン性くし型共重合体の調製と光応答性人工シャペロンとしての評価
Title(English)	
著者(和文)	竹村 晟也
Author(English)	Seiya Takemura
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12624号, 授与年月日:2023年12月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:丸山 厚,金原 数,清尾 康志,瀧ノ上 正浩,秦 猛志
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12624号, Conferred date:2023/12/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

2023 年度 博士論文

マラカイトグリーン誘導体を配した
カチオン性くし型共重合体の調製と
光応答性人工シャペロンとしての評価

東京工業大学 生命理工学院
生命理工学系 生命理工学コース

竹村 晟也

主査:

丸山 厚 教授

審査員:

金原 数 教授

清尾 康志 教授

瀧ノ上 正浩 教授

秦 猛志 准教授

目次

第1章 序論.....	1
1.1. 生体高分子の構造が与える影響.....	2
1.2. 分子シャペロン.....	3
1.3. 人工分子シャペロン	5
1.4. 光応答性材料	10
1.5. 本研究の目的	12
1.6. 参考文献	14
第2章 光応答性シャペロンを目指したマラカイトグリーン誘導体の設計 および光応答性評価 18	
2.1. 緒言	19
2.2. 実験項.....	20
2.2.1. 材料・機器.....	20
2.2.2. マラカイトグリーン誘導体の合成	20
化合物 2 の合成 (MG 2)	20
化合物 4 の合成.....	21
化合物 5 の合成.....	21
化合物 6 の合成 (MG 6)	22
化合物 7 の合成 (MG 7)	22
2.2.3. 吸収スペクトル測定による MG 誘導体の光応答性評価および 光変換率の算出 23	
2.3. 結果と考察	24
2.3.1. マラカイトグリーンカルボン酸誘導体の合成	24
2.3.2. MG 誘導体の光応答性評価.....	25
2.3.3. MG 誘導体の中性 pH 応答性評価	28
2.3.4. MG 7 の光応答性評価.....	30
2.4. 結言	33
2.5. 参考文献.....	34

第3章 MG 誘導体を配したカチオン性くし型共重合体の調製および

光応答性評価 . 35

3.1. 緒言	36
3.2. 実験項	37
3.2.1. 材料・機器	37
3.2.2. カチオン性くし型共重合体の合成	38
PAA- <i>g</i> -PEG の合成	38
MG-PAA- <i>g</i> -PEG の合成	38
3.2.3. MG-PAA- <i>g</i> -PEG の吸収スペクトル測定および光変換率の算出 ..	38
3.2.4. MG-PAA- <i>g</i> -PEG の光可逆性評価	39
3.3. 結果と考察	40
3.3.1. MG-PAA- <i>g</i> -PEG の合成	40
3.3.2. MG-PAA- <i>g</i> -PEG の光応答性評価	42
3.3.3. MG-PAA- <i>g</i> -PEG の光可逆性評価	44
3.4. 結言	45
3.5. 参考文献	46

第4章 MG 修飾カチオン性くし型共重合体の光応答シャペロン活性評価 . 47

4.1. 緒言	48
4.2. 実験項	50
4.2.1. 材料・機器	50
4.2.2. 円二色測定	50
4.2.3. 単層巨大リポソーム (GUV) の調製	51
4.2.4. リポソーム形態観察	51
4.2.5. MG-PAA- <i>g</i> -PEG のミセル形成評価	52
4.2.6. リポソーム膜の透過性評価	52
4.3. 結果と考察	53
4.3.1. MG-PAA- <i>g</i> -PEG が E5 の構造に与える影響	53
4.3.2. MG-PAA- <i>g</i> -PEG が E5 の膜破壊活性に与える影響	55
4.3.3. MG-PAA- <i>g</i> -PEG の疎水性・ミセル形成評価	59
4.3.4. MG-PAA- <i>g</i> -PEG と E5 の相互作用	61
4.3.5. MG-PAA- <i>g</i> -PEG/E5 の脂質膜への相互作用	64

4.3.6. MG-PAA- <i>g</i> -PEG による E5 の <i>in situ</i> 光応答活性	67
4.4. 結言	69
4.5. 参考文献	70
第 5 章 結論	72
研究業績	76
謝辞	77

第 1 章
序論

1.1. 生体高分子の構造が与える影響

細胞内や生体組織内で生じる生理現象は、複雑な化学反応が積み重なりで成り立っている。これらは分子レベルで言うと、遺伝子 DNA から情報を読み取り、細胞内でタンパク質が発現されるところに遡るであろう。遺伝子情報は、細胞分裂が起こる際に、次世代へと受け継がれていく。大量の遺伝子情報はゲノム DNA に収納されているため、ゲノム DNA、すなわち遺伝情報の維持は重要である。DNA の遺伝情報は塩基の配列によって様々であり、アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、チミン (T) の 4 種類から成り立っている。必要な DNA 配列を読み取り、対応する mRNA が転写され、リボソームへ運ばれる。リボソーム内ではアミノ酸は tRNA に運ばれ、mRNA 情報が翻訳され、タンパク質が合成される。

タンパク質は、酵素や細胞骨格の形成といった細胞において重要な役割を果たす。細胞内では、タンパク質は一次構造を取ることはなく、水素結合、静電相互作用、 π - π スタッキングといった弱い非共有結合を介して複雑な構造を形成している。タンパク質の機能発現には、正しいフォールディングが大きな役割を果たしている。高熱、高/低 pH やタンパク質の高濃度環境といったストレス下において、しばしばタンパク質のミスフォールディングや不可逆な凝集体形成が引き起こされる。ミスフォールディングしたタンパク質の異常な凝集または蓄積は、アルツハイマー病、パーキンソン病、II 型糖尿病、ハンチントン病といった深刻な病気を引き起こすことが知られている¹⁻³。

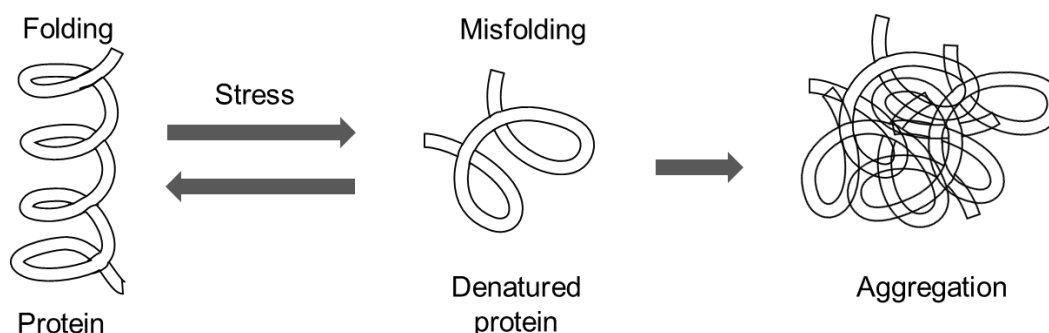


Figure. 1.1. タンパク質のフォールディング.



Figure 1.2. G-quadruplex と i-motif の構造.⁵

高次構造の異常によって生体に影響を与える因子は、タンパク質だけでなく、核酸もその一つであろう。核酸同士はワトソン-クリック塩基対を形成し、塩基対が内側に配置された二重らせん構造を示す。ヒトゲノムは二本鎖 DNA が約 30 億塩基対から構成されている。一方、DNA はワトソン-クリック塩基対だけでなく、フーグスティーン塩基対も存在し、二本鎖だけでなく、三重鎖や四重鎖といった非標準型構造をとる場合もある (Figure 1.2)。DNA 四重鎖では、G に富んだ配列による G-quadruplex や、その相補鎖の C に富んだ配列による i-motif が良く知られている。これらの配列は、ゲノム DNA 上に存在し、細胞内の特定条件下（金属イオン、pH、細胞周期、分子クラウディング）において四重鎖形成することが報告されている^{4,5}。四重鎖形成は DNA の複製を阻害しがんに化に影響を与える他⁶、特定のタンパク質の凝集を促し、神経疾患を引き起こす⁷。このように生体高分子の高次構造は、生理作用と密接に関わっている。

1.2. 分子シャペロン

前項で述べたように生体高分子の構造は、その機能発現において大きな役割を果たす。生体内では、生体高分子の構造や機能発現を手助けする分子シャペロンと呼ばれるタンパク質ファミリーが存在する。この「分子シャペロン」という言葉は、1978 年に Leskey らが初めに提唱した⁸。大量の遺伝子情報、ゲノム DNA はヒストンと呼ばれる正電荷を有するタンパク質に巻き付つくことでヌクレオソームを形成する。しかしながら、DNA とヒストンだけでは、巻き付きが不規則になり、凝集体形成を引き起こす。Leskey らは、ヌクレオプラスミン

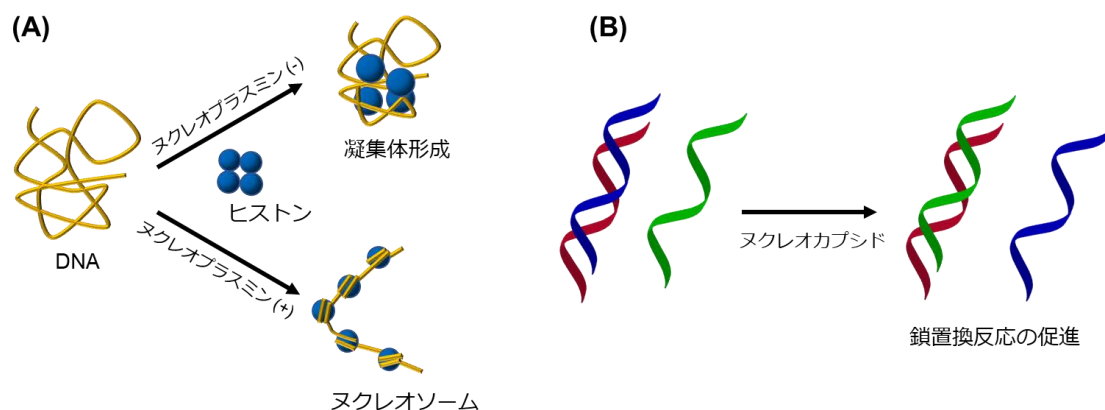


Figure 1.3. 分子シャペロンによる (A) ヌクレオソーム形成および (B) DNA 鎖置換反応の促進.

と呼ばれるタンパク質が、不規則な巻き付きや凝集を抑制し、正常なヌクレオソーム形成を補助することを発見した (**Figure 1.3A**)。

核酸に対して機能する分子シャペロンとしてもう一つ代表的なものはレトロウイルスのヌクレオカプシド (NC) タンパク質である。二本鎖 DNA がほどこけて、別の鋳型を持つ DNA にハイブリダイゼーションする DNA 鎖交換反応は、解離するエネルギーにより、通常では起こりづらい現象である。ウイルスの DNA は、感染後に逆転写反応を行うために、プライマー核酸鎖がテンプレート核酸鎖にハイブリダイゼーションする。その際に、NP タンパク質によってその鋳型スイッチが促進される (**Figure 1.3B**)⁹。このように二本鎖 DNA の不安定化、再安定化を担う役割を持っている。

タンパク質に対して機能する天然の分子シャペロンの中で最も研究されているのは、GroEL-GroES である。GroEL は、**Figure 1.4** に示すように円筒上の構造をしており、空洞の中心に向かって露出した疎水性残基を介して、ミスフォールディングしたタンパク質を捕捉する。更に GroEL は、ATP 存在下で補助因子である GroES と複合体を形成し、捕捉したタンパク質の凝集を防ぎ、正しいフォールディングを促す。ATP が加水分解により ADP に変化すると GroEL-GroES 複合体が解離し、最終的に正しくフォールディングされたタンパク質が放出される (**Figure 1.4**)¹⁰⁻¹²。GroEL や GroES 以外にも、同じヒートショックタンパク質である Hsp70、Hsp90 といったシャペロンが発見されている。

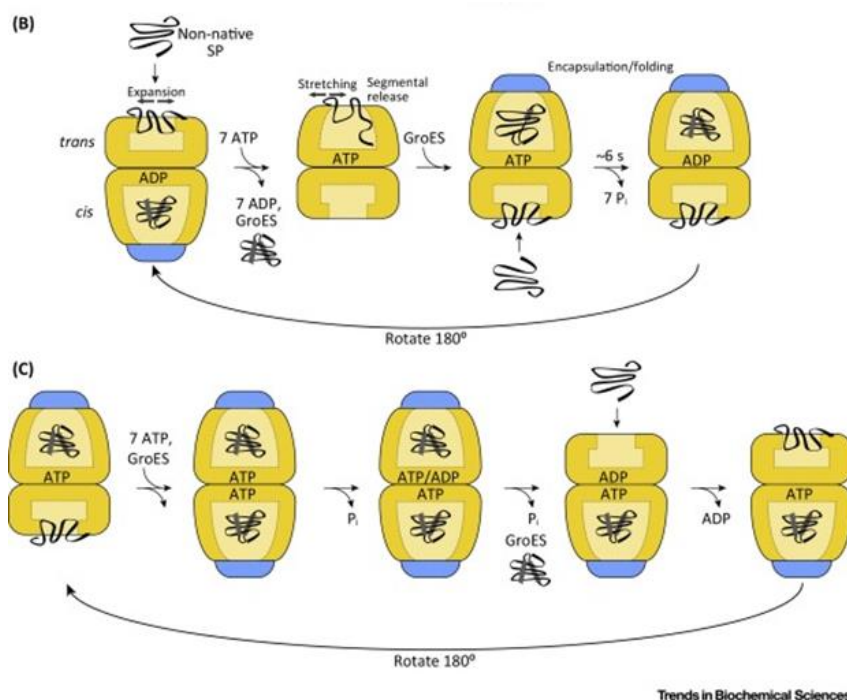


Figure 1.4. GroEL と GroES によるタンパク質に対するシャペロンシステム.¹²

1.3. 人工分子シャペロン

前項では、分子シャペロンは、生体内の核酸やタンパク質といった生体高分子の構造の安定化することを述べた。分子シャペロンは、タンパク質の安定化剤・リフォールディング剤として工業的な応用やペプチドの機能制御のための材料として医療的な応用が期待される。しかしながら、天然の分子シャペロンは、容易に失活する他、精製が煩雑であるといった課題が挙げられる。このような背景の中、天然の分子シャペロンの特性に着想を得て、人工的な分子シャペロンの開発に注目が置かれている。

GroEL-GroES によるタンパク質のリフォールディングシステムは良く参考にされている。例えば、界面活性剤はしばしばタンパク質のリフォールディングや凝集阻害の用途で使用される。ただ、界面活性剤だけではタンパク質の精製が困難であるため、シクロデキストリン誘導体と組み合わせて使用する方法も提唱された。シクロデキストリンは内部が疎水性で外部が親水性の環状グルコース化合物である。界面活性剤が非天然タンパク質を捕捉し、シクロデキストリンを含むリフォールディング溶液で希釈し、シクロデキストリンが界面活性剤を除去し、タンパク質のリフォールディングが可能になる (Figure 1.5)^{13,14}。

界面活性剤だけでなく高分子マテリアルも注目が集められている。秋吉らは、コレステリル基を有するプルラン(CHP) の自己集合によって形成されるナノゲルが、タンパク質の不可逆的な凝集を抑制することを見出した。CHP は熱変性タンパク質¹⁵や化学変性タンパク質¹⁶を捕捉し、ナノゲルの内部にトラップする。このナノゲルはコレステリル基の疎水性相互作用によって架橋されているため、シクロデキストリンの添加によって CHP 同士の疎水性相互作用を遮断しゲルを崩壊することができ、ナノゲルからタンパク質を遊離することが可能である (Figure 1.6)。

Two-step method

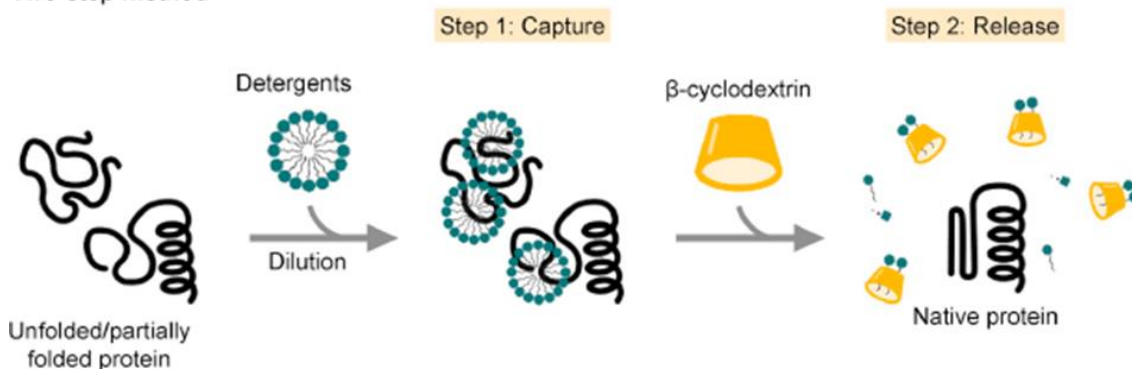


Figure 1.5. 界面活性剤とシクロデキストリンを用いた二段階タンパク質リフォールディングシステム.¹³

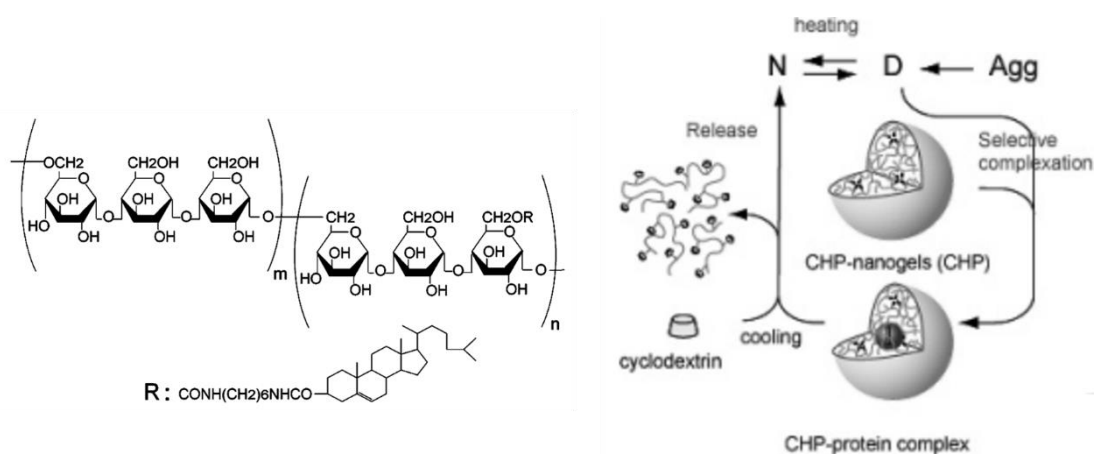


Figure 1.6. CHP ゲルとシクロデキストリンによるタンパク質の捕捉と遊離.¹⁵

先に述べた方法では、タンパク質の放出に添加剤が必要であったが、近年では、温度応答性ポリマーを用いて、添加剤なしでタンパク質の捕捉から放出まで行うことができるシステムが見いだされている。Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) のような下限臨界溶液温度 (LCST) 挙動をポリマーは、加熱することにより、親水性から疎水性へと相転移する。PNIPAAm と熱変性タンパク質は常温では相互作用しないが、熱を加えることで互いに疎水性の構造に変化し、疎水性相互作用によって PNIPAAm にタンパク質が吸着する。吸着によってタンパク質の凝集を阻害する。また、温度を下げることで疎水性相互作用が解除され、タンパク質のリフォールディングと遊離を誘導することができる (Figure 1.7) ^{17,18}。

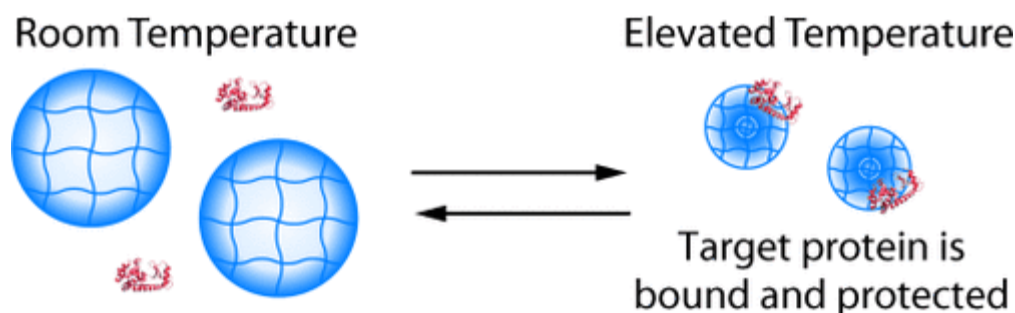


Figure 1.7. PNIPAAm によるタンパク質の捕捉とリフォールディング。¹⁷

ここまで疎水性相互作用を介した人工シャペロンの例を紹介してきた。それに対し、当研究室では、核酸のイオン性に着目して、核酸に対する人工分子シャペロンとしてカチオン性くし型共重合体を設計した。カチオン性くし型共重合体は、主鎖に poly(L-lysine) (PLL) や poly(allylamine) (PAA) といったカチオン性ポリマー、グラフト鎖に Dextran (Dex) や poly(ethylene glycol) (PEG) といった親水性高分子を持つ (Figure 1.8)。カチオン性くし型共重合体は、負電荷に帯びた DNA 鎖と可溶性の高分子電解質複合体 (IPEC) を形成する。この共重合体は DNA 鎖同士の静電反発を緩和し、DNA ハイブリダイゼーションを促進させ、熱的安定性を向上させる ^{19,20}。これは主鎖骨格によって安定化させる核酸の種類は異なり、主鎖骨格に PLL を持つカチオン性くし型共重合体 poly(L-lysine)-*graft*-dextran (PLL-*g*-Dex) は二本鎖、三重鎖および四重鎖 DNA を、主鎖骨格に PAA を持つ共重合体 poly(allylamine)-*graft*-dextran (PAA-*g*-Dex) は選択的に三重鎖 DNA を安定化させることがわかっている ²¹⁻²³。重要なことは、PLL-*g*-Dex は DNA 鎖交換反応の効率を大幅に加速することができ、

天然の核酸シャペロンタンパク質である NC タンパク質よりも高いシャペロン活性を有する^{24,25}。この共重合体のシャペロン活性は、DNA コンピューティング²⁶、ナノマシン²⁷、ハイブリダイゼーション連鎖反応²⁸、酵素²⁹⁻³²などの DNA 分子デバイスの機能を増強するために使用された (Figure 1.9)。

Figure 1.8. カチオン性くし型共重合体の化学構造。

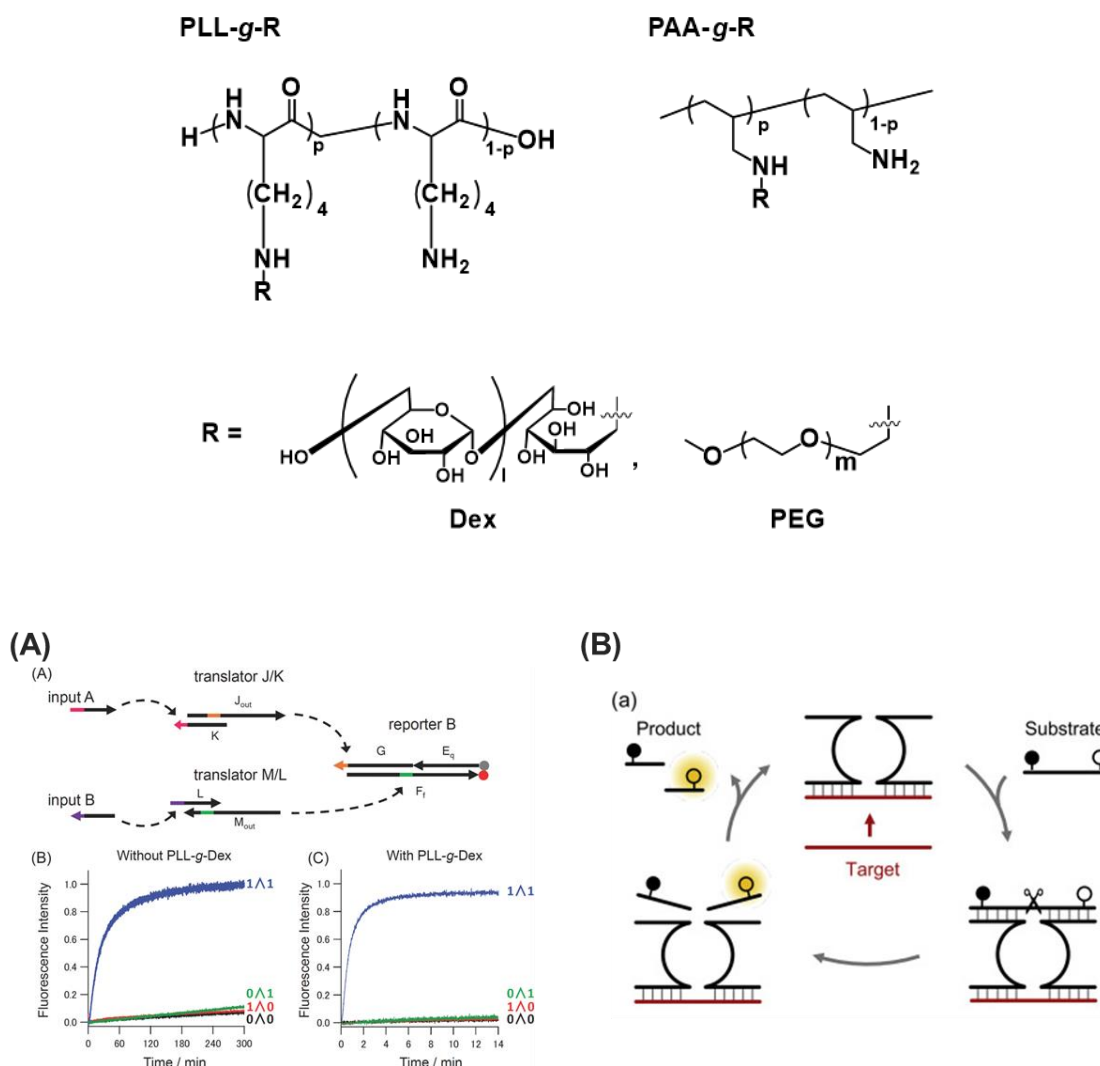


Figure 1.9. カチオン性くし型共重合体の (A) DNA コンピューティング²⁶ や (B) 核酸検出への応用.³⁰

近年、当研究室では、カチオン性くし型共重合体が、核酸だけでなく、アニオン性ペプチドに対してもシャペロン活性を示すことを見出した。E5 ペプチドは、インフルエンザウイルスの表面に存在するタンパク質であるヘマグルチニンの *N* 末端部分のアミノ酸配列を模倣したアニオン性・両親媒性ペプチドである。E5 ペプチドは、pH が中性から弱酸性に低下することで、グルタミン酸残基のプロトン化を介してランダムコイルから α -ヘリックスに構造転移を示し、膜融合や膜破壊といった膜不安定化能を発現する^{33,34}。しかしながら、E5 は、酸性条件下では疎水性が高い構造になるため、凝集して膜不安定化能が低下するという問題点があった。当研究室では、PAA-*g*-Dex が E5 ペプチドと可溶性 IPEC を形成し、酸性 pH だけでなく中性 pH においても α -ヘリックスへのフォールディングを促し、E5 の膜破壊活性を向上させることを証明した^{35,36}。更に興味深いことに、生理条件下で PAA-*g*-Dex は E5 存在下において、脂質二重膜の形態をベシクル構造からシート構造に転移させることを見出した(Figure 1.10B)³⁷。E5 の膜破壊活性の向上は、ドラッグデリバリーシステムへの応用が期待される。

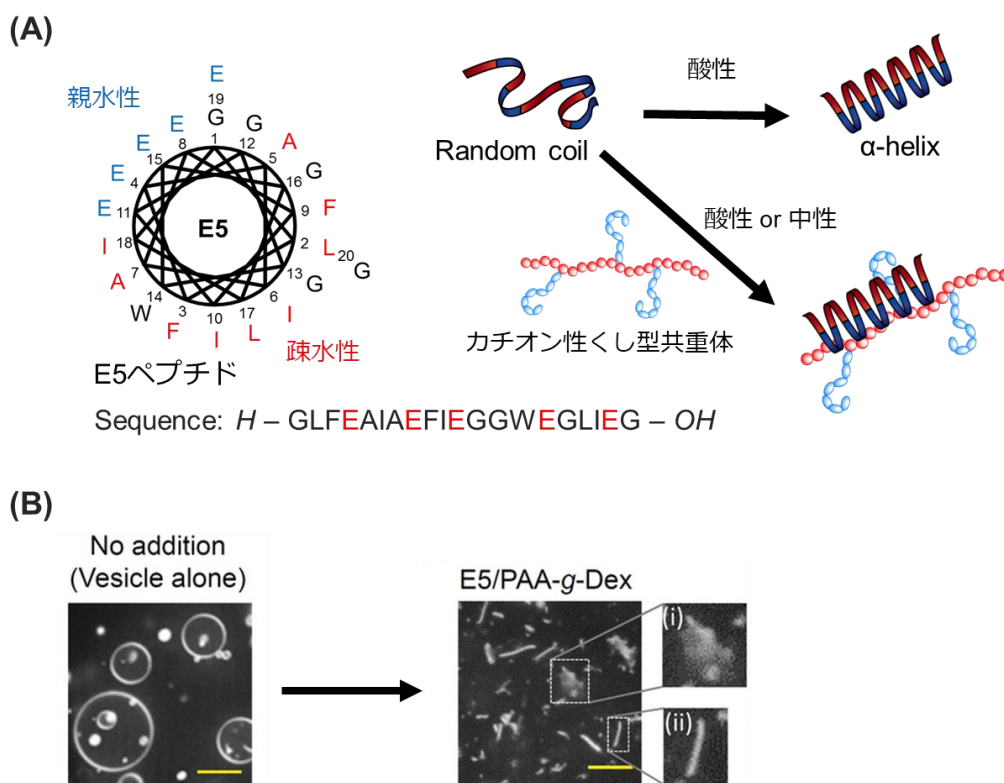


Figure 1.10. (A) E5 ペプチドの構造変化, (B) カチオンくし型共重合体と E5 ペプチド複合体によるリポソーム形態変化.³⁷

1.4. 光応答性材料

当研究室では、カチオン性くし型共重合体が核酸や E5 ペプチドといったアニオン性高分子に対してシャペロン活性を示すことを証明してきたが、その機能を任意に操作できないため応用に制限がある。外部シグナルによってシャペロン活性を時空間的にリモート操作できるスマート人工シャペロンは、更なるアプリケーションに繋がるであろう。放射線、光、超音波や温度といった外部刺激が存在するが、その中でも “光” は最も操作性が優れており、その照射強度、範囲、時間など容易に制御することが可能である。フォトクロミック化合物は、その構造や物理的性質を光照射によってスイッチすることが可能であり、光応答機能性材料の調製において幅広く使われてきた。代表的な例としてアゾベンゼン、スピロピランやジアリールエテンが挙げられる (Figure 1.11)。

アゾベンゼンは 2 個のベンゼン環がアゾ基で連結されており、光照射によってトランス体からシス体に変換される。この構造変化を用いたミセル形成³⁸、脂質二重膜の形態³⁹の光制御が報告されている。当研究室では、上限臨界溶液温度 (UCST) 挙動を示す poly(vinylamine-co-vinylurea) (PVU) にアゾベンゼンが修飾された Azo-PVU が、アゾベンゼンの光構造変換を介して、水素結合などの相互作用に影響を与えることで、相転移温度を切り替えることに成功している⁴⁰。

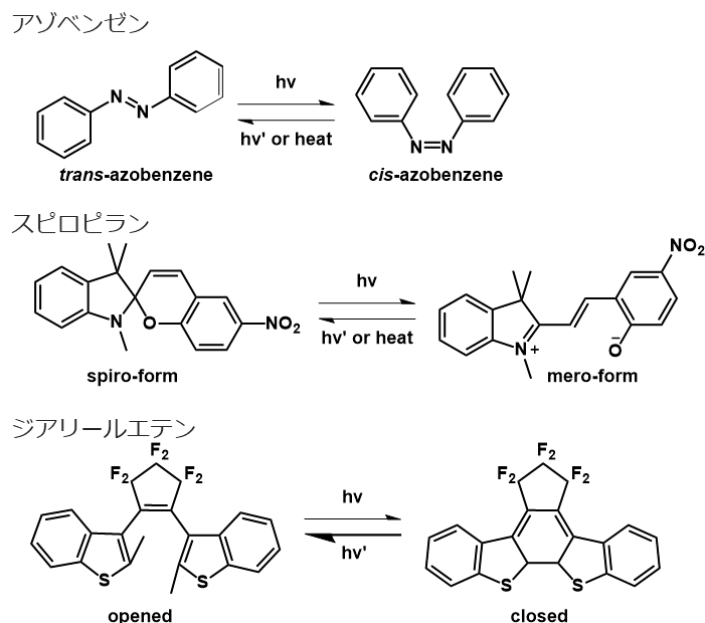


Figure 1.11. フォトクロミック化合物の光による構造転移.

スピロピランは、光照射によって疎水性の **spiro** 型から親水性の **mero** 型に変換されるフォトクロミック化合物である。スピロピランに基づくスマートマテリアルは、細胞接着^{41,42}や核酸医薬の放出⁴³の光制御で利用される。また、人工シャペロンとしても注目されており、秋吉らは人工シャペロンである **CHP** ゲルにスピロピランを修飾した光応答性ナノゲルの溶液特性を光で調整することで、捕捉した変性タンパク質のリフォールディングや放出を制御できることを見出した (**Figure 1.12**)⁴⁴。フォトクロミック化合物は、光によって構造変化と共に物理的性質が変換され、疎水性相互作用や静電相互作用などの非共有結合を調整することができる。人工シャペロンのシャペロン活性は、様々な非共有結合が関与しているため、フォトクロミック化合物はシャペロン活性を光制御できる材料になり得る。

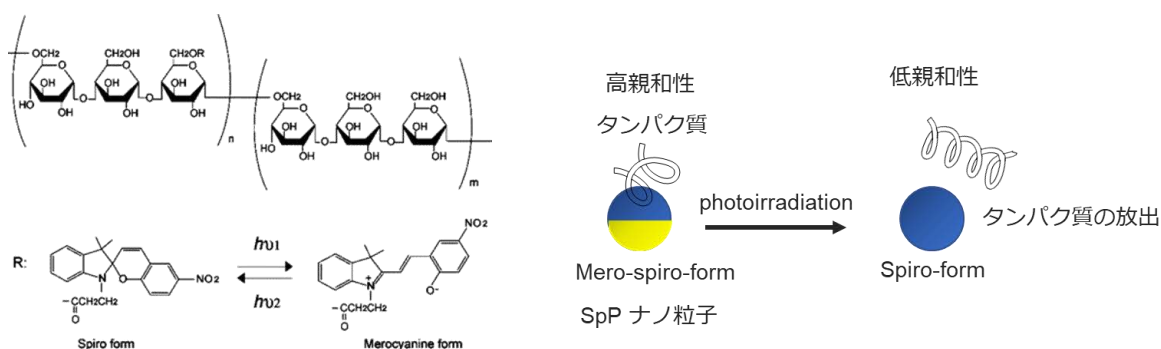


Figure 1.12. スピロピラン含有 **CHP** ゲルによるタンパク質のリフォールディングと放出の光制御.⁴⁴

1.5. 本研究の目的

先行研究で、カチオン性くし型共重合体のシャペロン活性を pH³⁶ や温度⁴⁵ といった外部刺激で制御することに成功している。しかし、これらの刺激では時空間的な制御が困難であるため、本研究では、リモート操作でシャペロン活性が制御可能な光応答性カチオン性くし型共重合体の調製を目指すことにした。カチオン性くし型共重合体のアニオン性高分子に対するシャペロン活性には、可溶性の高分子電解質複合体 (IPEC) 形成が必要不可欠である。そこでイオン性を制御できるフォトクロミック化合物、マラカイトグリーン誘導体に着目した。マラカイトグリーン誘導体は、光照射によって脱離反応が起こり、ノニオン構造からカチオン構造に変換される (**Figure 1.13A**)⁴⁶。これまでマラカイトグリーン (MG) を有する共重合体 (acrylamide^{47,48}, N,N-dimethylacrylamide⁴⁹, vinyl alcohol^{50,51}) の核酸との光依存相互作用はいくつか報告されている。MG を備えた共重合体は、光照射前では核酸と相互作用しないが、光照射によって MG 部位のカチオン化し、核酸と静電的な複合体を形成する (**Figure 1.13B**)。

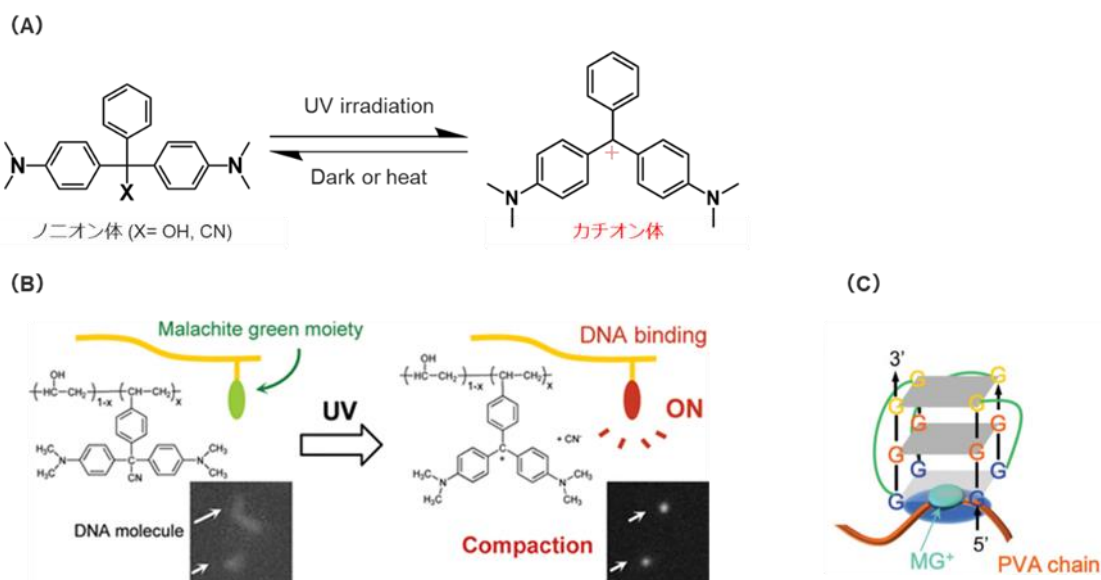


Figure 1.13. (A) MG 誘導体の光反応, (B) MG 誘導化共重合体の光による DNA 結合制御⁵⁰ と (C) 四重鎖 DNA への結合様式.⁵²

また、宇田らの報告によると光照射された MG 誘導化ビニルアルコール共重合体が、一本鎖 DNA だけでなく、G-quadruplex DNA に静電相互作用や π - π スタッキングを介して結合し、熱的安定化を向上させることがわかっている (Figure 1.13C)⁵²。このようにアニオン性の生体高分子に対して、MG 誘導体はシャペロン材料として有用であると言える。

MG 誘導体の特性を利用して、カチオン性くし型共重合体の一部のイオン性を光で制御し、アニオン性高分子に対するシャペロン能を光制御できると考え、本研究では、光応答性シャペロンとして駆動する MG 修飾カチオン性共重合体の調製を目指した。

第 2 章では、カチオン性くし型共重合体に容易にコンジュゲート可能な MG 誘導体の設計を行った。また、合成した MG 誘導体の光応答性や pH 応答性などを評価し、コンジュゲートに適した MG 誘導体の模索を行った。

第 3 章では、第 2 章で合成した MG 誘導体を用いて、MG 修飾カチオン性くし型共重合体を調製した。MG 修飾量の異なる共重合体を 3 つ調製し、それぞれの光応答性を評価した。

第 4 章では、MG 修飾カチオン性くし型共重合体のシャペロン活性を評価した。シャペロン能を評価するため、膜破壊能を有する E5 ペプチドをモデルとし、MG 修飾共重合体が E5 ペプチドの構造や膜破壊活性に与える影響を調査した。

最後に第 5 章では、本研究の結論をまとめた。

外部刺激によるシャペロン機能をオンにできるスマートシャペロンの開発は、医療分野へ応用が期待される。また、コンジュゲートのためのマラカイトグリーン誘導体に関する調査が、把握している限りでは非常に数少ない。本研究では、様々な機能性マテリアルにコンジュゲート可能なマラカイトグリーン誘導体の設計し、容易にマテリアルに光応答性の付与することに成功した。この MG 誘導体によるコンジュゲートによって、機能性マテリアルの用途を広げることができると期待している。

1.6. 参考文献

1. Radford, S. E.; Dobson, C. M. *Cell* **1999**, *97*, 291–298.
2. Stefani, M.; Dobson, C. M. *J. Mol. Med.* **2003**, *81*, 678–699.
3. Knowles, T.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 384–396.
4. Takahashi, S.; Yamamoto, J.; Kitamura, A.; Kinjo, M.; Sugimoto, N. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 2586–2590.
5. Zeraati, M.; Langley, D. B.; Schofield, P.; Moye, A. L.; Rouet, R.; Hughes, W. E.; Bryan, T. M.; Dinger, M. E.; Christ, D. *Nature chemistry* **2018**, *10*, 631–637.
6. Takahashi, S.; Brazier, J. A.; Sugimoto, N. *PNAS* **2017**, *114*, 9605–9610.
7. Ash, P. E.; Bieniek, K. F.; Gendron, T. F.; Caulfield, T.; Lin, W. L.; Dejesus-Hernandez, M.; van Blitterswijk, M. M.; Jansen-West, K., Paul 3rd, J. W.; Rademakers, R.; Boylan, K. B.; Dickson, D. W.; Petrucelli, L. *Neuron* **2013**, *77*, 639–646.
8. Laskey, R. A.; Honda, B. M.; Mills, A.D.; Finch, J. T. *Nature* **1978**, *275*, 416–420.
9. Tsuchihashi, Z.; Brown, P. O. *J. Virol.* **1994**, *68*, 5863–5870.
10. Hayer-Hartl, M.; Hartl, F. U. *Nature Structural & Molecular Biology* **2009**, *16*, 574–581.
11. Lopes, T.; Dalton, K.; Frydman, J. *Journal of Molecular Biology* **2015**, *427*, 2919–2930.
12. Hayer-Hartl, M.; Bracher, A.; Hartl, F. U. *Trends Biochem Sci.* **2016**, *41*, 62–76.
13. Rozema, D.; Gelman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2373–2374.
14. Rozema, D.; Gelman, S. H. *J. Bio. Chem.* **1996**, *271*, 3478–3487.
15. Akiyoshi, K.; Sasaki, Y.; Sunamoto, J. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 322–324.
16. Nomura, Y.; Ikeda, M.; Yamaguchi, N.; Aoyama, Y.; Akiyoshi, K. *FEBS lett.* **2003**, *553*, 271–276.
17. Beierle, J. M.; Yoshimatsu, K.; Chou, B.; Mathews, M. A.; Lesel, B. K.;

- Shea, K. J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 9275–9279.
18. Liu, X.; Liu, Y.; Zhang, Z.; Huang, F.; Tao, Q.; Ma, R.; An, Y.; Shi, L. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 7437–7442.
19. Maruyama, A.; Katoh, M.; Ishihara, T.; Akaike T. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 3–6.
20. Maruyama, A.; Watanabe, H.; Ferdous, A.; Katoh, M.; Ishihara, T.; Akaike T. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 292–299.
21. Torigoe, H.; Maruyama, A.; Obika, S.; Imanishi, T.; Katayama, T. *Biochemistry* **2009**, *48*, 3534–3553.
22. Yamayoshi, A.; Miyoshi, D.; Zouzumi, Y.; Matsuyama, Y.; Ariyoshi, J.; Shimada, N.; Murakami, A.; Wada, T.; Maruyama, A. *J. Phy. Chem. B* **2017**, *121*, 4015–4022
23. Mriyama, R.; Shimada, S.; Kano, A.; Maruyama, A. *Biomaterials* **2011**, *32*, 7671–7676.
24. Kim, W. J.; Sato, Y.; Akaike, T.; Maruyama, A. *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 815–820.
25. Kim, W. J.; Sato, Y.; Akaike, T.; Maruyama, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12676–12677.
26. Shimada, N.; Saito, K.; Miyata, T.; Sato, H.; Kobayashi, S.; Maruyama, A. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1707406.
27. Makita, N.; Inoue S.; Akaike, T.; Maruyama, A. *Nucleic Acids Symposium Series* **2004**, *48*, 173–174.
28. Wang, J.; Shimada, N.; Maruyama, A. *Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14*, 39396–39403.
29. Gao, J.; Shimada, N.; Maruyama, A. *Biomater. Sci.* **2015**, *3*, 308–316.
30. Hanpanich, O.; Oyanagi, T.; Shimada, N.; Maruyama, A. *Biomaterials* **2019**, *225*, 119535.
31. Rudeejaroonrungs, K.; Hanpanich, O.; Saito, K.; Shimada, N.; Maruyama, A. *Biomaterials Science* **2020**, *8*, 3812–3818.
32. Hanpanich, O.; Saito, K.; Shimada, N.; Maruyama, A. *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *165*, 112383.

33. Takahashi, S. *Biochemistry* **1990**, *29*, 6257–5264.
34. Murata, M.; Takahashi, S.; Shirai, Y.; Kagiwada, S.; Hishida, R.; Ohnishi S. *Biophys. J.* **1993**, *64*, 724–734.
35. Shimada, N.; Kinoshita, H.; Tokunaga, S.; Umegae, T.; Kume, N.; Sakamoto, W.; Maruyama, A. *J. Controlled Release* **2015**, *218*, 45–52.
36. Sakamoto, W.; Ochiai, T.; Shimada, N.; Maruyama, A. *J BIOMAT SCI-POLYM E.* **2017**, *28*, 1097–1108.
37. Shimada, N.; Kinoshita, H.; Umegae, T.; Azumai, S.; Kume, N.; Ochiai, T.; Takenaka, T.; Sakamoto, W.; Yamada, T; Furuta, T; Masuda, T; Sakurai, M.; Higuchi, H.; Maruyama, A. *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1904032.
38. Itagaki, T.; Kurihara, R.; Tanabe, K. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 3112–3115.
39. Hamada, T.; Sugimoto, R.; Vestergaard, M. C.; Nagasaki, T.; Takagi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *132*, 10528–10532.
40. Ikeuch, N.; Komachi, T.; Murayama, K.; Asanuma, H.; Maruyama, A.; Shimada, N. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 5652–5659.
41. Higuchi, A.; Hamamura, A.; Shindo, Y.; Kitamira, H.; Yoon B.O.; Mori, T.; Uyama, T.; Umezawa, A. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1770–1774.
42. He, D.; Arisaka, Y.; Masuda, K.; Yamamoto, M.; Takeda, N. *Acta Biomaterialia* **2017**, *51*, 101–111.
43. Xiao, X.; Hu, J.; Wang, X.; Huang, Lei.; Chen, Y.; Wang, W.; Li, J.; Zhang, Y. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 12517–12520.
44. Hirakura, T.; Nomura, Y.; Aoyama, Y.; Akiyoshi, K. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1804–1809.
45. Masuda, T.; Shimada, N.; Maruyama, A. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 1333–1339.
46. Herz, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 6777–6785.

47. Irie, M.; Kunwatchakun, D. Photoresponsive polymers. *Macromolecules* **1986**, *19*, 2476–2480.
48. Kito, H.; Suzuki, F.; Nagahara, S.; Nakayama, Y.; Tsutsui, Y.; Tsutsui, N.; Nakajima, N.; Matsuda, T. *ASAIJ Journal* **1994**, *40*, 260–266.
49. Nakayama, Y.; Umeda, M.; Uchida, K. *Current Drug Delivery* **2005**, *2*, 207–214.
50. Uda, R.M.; Ohshita M. *Bio macromolecules* **2012**, *13*, 1510–1514.
51. Uda, R.M; Marsui, T. *Soft Matter* **2015**, *11*, 8246–8252.
52. Uda, R.M.; Nishimoto, N.; Matsui T.; Takagi, S. *Soft Matter* **2019**, *15*, 4454–4459.

第 2 章

光応答性シャペロンを目指した
マラカイトグリーン誘導体の設計および
光応答性評価

2.1. 緒言

光応答性材料は、時空間的にその機能を制御できることから、幅広い分野で良く使用される。フォトクロミック化合物は、光によって構造変化だけでなく、親/疎水性やイオン性といった性質を転換することが可能である。アゾベンゼンを有するマテリアルは、シス型ートランス型の構造変化によって配向性を変化させ、ミセル、脂質二重膜の形態を制御できる^{1,2}。また、スピロピランは、光によってノニオン体から双生イオンを有する構造に変化するため、静電相互作用に影響を与えることができる。本研究では、カチオン性くし型共重合体のイオン性を光で制御することを目的としているが、スピロピランではカチオン部位だけでなくアニオン部位も備えているため適していない。そこでカチオンだけを制御できるマラカイトグリーン (MG) に着目した。MG 誘導体は、310 nm 付近の UV 光によってノニオン体からカチオン体に変換される³。第1章で述べたように、マラカイトグリーンを備えた共重合体は入江、松田、宇田らによってよく研究されている。しかし、把握している限りでは、MG を備えた共重合体の合成法は、マラカイトグリーンビニル誘導体を用いたラジカル重合がほとんどである^{4,6}。機能性マテリアルに導入可能な MG 誘導体が設計できれば、導入量が容易に設定でき、調製もしやすくなる。カルボン酸誘導体は、N-Hydroxysuccinimide (NHS)、N,N-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC)、や 1H-Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidino-phosphonium Hexafluorophosphate (PyBOP) などの縮合剤を用いることで、アミノ基 (NH₂) を有するマテリアルに、簡便にコンジュゲートできる^{7,8}。

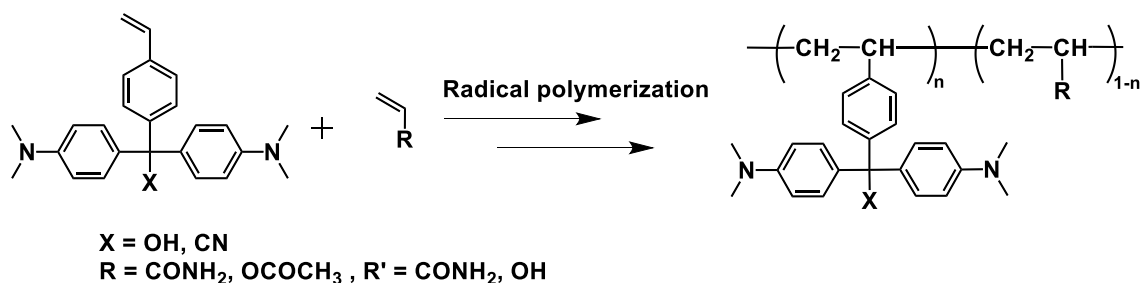


Figure 2.1. ラジカル重合による MG を備えた共重合体の合成.

そこで、本章ではカチオン性くし型共重合体にコンジュゲートするための 2 種類 MG カルボン酸誘導体の合成を行った。合成した MG 誘導体のノニオン体からカチオン体への光変換を吸収スペクトルで評価し、MG 誘導体の光応答性について調査を行った。

2.2. 実験項

2.2.1. 材料・機器

本章で使用された全ての試薬は東京化成工業株式会社、富士フイルム和光純薬株式会社、関東化学株式会社、Sigma Aldrich から購入した。化合物 **1**⁹、bis(4-(dimethylamino)phenyl)(phenyl)methanol (MG-OH)¹⁰ および bis(4-(dimethylamino)phenyl)(4-phenyl)methyl cyanide (MG-CN)³ を過去に報告された方法に従って合成した。化合物の合成において、反応の経過をシリカゲルプレートでの薄層クロマトグラフィー (TLC Sillica gel 60 F₂₅₄, Sigma Aldrich) により確認した。化合物の精製を Wakogelgel 60 により行った。NMR スペクトルを、Bruker biospin・AVANCE II 400C (¹H: 400 MHz, ¹³C: 100 MHz) により記録した。ESI mass スペクトル測定を、microTOF II (Brucker) により行った。UV-VIS スペクトル測定は、JASCO V-730 UV/vis spectrophotometer を用いて行った。UV LED 照明器 (波長: 310 ± 5 nm, LSP7NUV310-0024、アイテックシステム株式会社) を用いて光照射を行った。

2.2.2. マラカイトグリーン誘導体の合成

化合物 2 の合成 (MG 2)

化合物 **1** (104 mg, 0.281 mmol)、4-azidobenzoic acid (53.1 mg, 0.321 mmol)、L-ascorbic acid (10 mg, 0.0568 mmol) および copper sulfate (15.6 mg, 0.0624 mmol) を N,N-dimethylformamide に溶解し、その混合溶液を 24 時間攪拌した。反応溶液をクロロホルムで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。その後、anhydrous magnesium sulfate で乾燥し、エバポレーターを用いて濃縮した。粗生成物はゲルカラムクロマトグラフィー (chloroform/methanol/acetic acid,

100 : 10 : 1) により精製し、化合物 **2** (98 mg, 65%) を深緑色のオイルとして得た。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.25 (s, 1H), 8.06 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.90 (m, 4H), 7.46 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.31 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.14 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.01 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.65 (m, 4H), 5.97 (brs, 1H), 2.93 (s, 1H), 2.86 (d, J = 6.5 Hz, 12H). HRMS (ESI[+], CH_3OH) m/z for $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_2$ calcd. $[\text{M}-\text{OH}]^+$: 516.2394; found: 516.2402.

化合物 4 の合成

丸底ナスフラスコ中で、化合物 **3** (3.01 g, 15.0 mmol) を anhydrous tetrahydrofuran (THF) (40 ml) に溶解し、メタノール/ドライアイス槽で $-65\text{ }^\circ\text{C}$ にした。反応溶液に hexane solution of *n*-butyllithium (11 mL, 17.3 mmol) を滴下し、 $-65\text{ }^\circ\text{C}$ で 30 分間攪拌した。反応溶液に anhydrous THF (20 ml) に溶解した methyl-4-bromobenzoate (1.5 g, 6.98 mmol) 溶液をゆっくり滴下し、 $-65\text{ }^\circ\text{C}$ から室温までゆっくり戻し、16 時間攪拌した。その後、飽和塩化アンモニウム水溶液で反応をクエンチし、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。その後、anhydrous magnesium sulfate で乾燥し、エバポレーターにより濃縮した。粗生成物をヘキサンによって再結晶し、化合物 **4** (2.77 g, 92%) を薄緑色の固体として得た。

Melting point of $176\text{--}178\text{ }^\circ\text{C}$. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.44 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.13 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.94 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 6.61 (d, J = 8.9 Hz, 4H), 6.00 (brs, 1H), 2.84 (s, 12H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 149.6, 147.0, 134.9, 130.7, 129.6, 128.7, 120.7, 111.7, 81.2, 40.5. HRMS (ESI[-], CHCl_3) m/z for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{BrClN}_2\text{O}$ calcd. $[\text{M}+\text{Cl}]^-$: 461.0818; found: 461.0828.

化合物 5 の合成

化合物 **4** (502 mg, 1.18 mmol)、tetrakis(triphenylphosphine)palladium (140 mg, 0.121 mmol)、4-(methoxycarbonylmethyl)phenylboronic acid pinacol ester (1.684 mmol)、および potassium carbonate (670 mg, 4.85 mmol) を anhydrous THF (30 ml) に溶解し、その混合溶液を窒素下、加熱還流で 24 時

間攪拌した。反応溶液を酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。その後、anhydrous magnesium sulfate で乾燥し、エバポレーターにより濃縮した。粗生成物はゲルカラムクロマトグラフィー (hexane/ethyl acetate, 1:2) により、化合物 **5** (266 mg, 46%) を緑色の固体として得た。

Melting point of 68–70 °C. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.59 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.27 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.00 (d, J = 8.9 Hz, 4H), 6.63 (d, J = 9.0 Hz, 4H), 5.93 (s, 1H), 3.70 (s, 2H), 3.61 (s, 3H), 2.85 (s, 12H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 172.1, 149.5, 147.1, 139.9, 138.9, 135.5, 132.8, 129.6, 128.8, 128.2, 127.3, 126.3, 111.7, 81.4, 52.1, 40.8, 40.6. HRMS (ESI, CH_3CN) m/z for $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}_3$ calcd. $[\text{M}-\text{H}]^-$: 493.2491; found: 493.2482.

化合物 **6** の合成 (MG 6)

DMSO (4 ml) に溶解させた化合物 **5** (70 mg, 0.142 mmol) に NaOH 水溶液 (1 mL, 0.566 mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応溶液をクロロホルムで抽出し、anhydrous magnesium sulfate で乾燥し、エバポレーターにより濃縮し、化合物 **6** (60 mg, 87%) を緑色の固体として得た。

Melting point of 154–156 °C. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6 : \text{D}_2\text{O} = 5 : 1$, (1% NaOD)) δ 7.50–7.45 (m, 4H), 7.28 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.98 (d, J = 8.9 Hz, 4H), 6.61 (d, J = 9.0 Hz, 4H), 3.14 (s, 2H), 2.82 (s, 12H); ^{13}C NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6 : \text{D}_2\text{O} = 5 : 1$, (1% NaOD)) δ 175.2, 149.5, 148.2, 139.0, 138.6, 137.2, 136.5, 130.2, 128.9, 128.6, 126.3, 125.7, 111.9, 80.3, 49.0, 40.6. HRMS (ESI $[-]$, CHCl_3) m/z for $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{ClN}_2\text{O}_3$ calcd. $[\text{M}+\text{Cl}]^-$: 515.2101; found: 515.2100.

化合物 **7** の合成 (MG 7)

DMSO (4 ml) に溶解させた化合物 **6** (31 mg, 0.0645 mmol) に 3 M HCl (250 μl) を加え、60 °C で 30 分間攪拌した。その後、混合溶液に KCN 水溶液 (1 ml, 50 mg, 0.762 mmol) を滴下し、混合溶液を 60 °C で 5 時間攪拌した。反応溶液はクロロホルムで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。その後、anhydrous

magnesium sulfate で乾燥し、エバポレーターにより濃縮した。粗生成物を純水により再結晶し、化合物 **7** (13 mg, 37%) を緑色の固体として得た。

Melting point: 228–229 °C. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.33 (s, 1H), 7.69 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.21 (J = 8.5 Hz, 2H), 6.94 (d, J = 9.0 Hz, 4H), 6.73 (d, J = 9.0 Hz, 4H), 3.61 (s, 2H), 2.89 (s, 12H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 175.7, 149.9, 140.8, 139.9, 139.5, 132.6, 129.8, 129.5, 129.1, 128.2, 127.3, 127.0, 124.2, 112.1, 55.7, 40.5, 40.4. HRMS (ESI $^-$, CHCl_3) m/z for $\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{ClN}_3\text{O}_2$ calcd. $[\text{M}+\text{Cl}]^-$: 524.2105; found: 524.2098.

2.2.3. 吸収スペクトル測定による MG 誘導体の光応答性評価および光変換率の算出

MG 誘導体の光変換反応は紫外可視近赤外分光光度計 (JASCO V-730) によりモニタリングした。40 mM Britton-Robinson buffer (40 mM boric acid, 40 mM phosphoric acid, 40 mM acetic acid) (pH 9.0 or 7.0, 1% DMSO) 中の光非照射または光照射 (λ = 310 nm, 10 mW) された 10 μM MG 誘導体の吸収スペクトルを測定した。光照射前のそれぞれの誘導体の 620 nm の吸光度を $Abs(0)$ 、MG カチオン体への変換率 0%と定義した。また、40 mM Britton-Robinson buffer (pH 4.0, 1% DMSO) に溶解した 10 μM MG 誘導体の 620 nm の吸光度を $Abs(\infty)$ 、MG カチオン体への変換率 100%とした。MG 誘導体の光変換率は以下の式から算出した。

$$\text{Fraction of MG cationic form (\%)} = \frac{Abs(t) - Abs(0)}{Abs(\infty) - Abs(0)} 100$$

MG **7** および MG-CN の光変換率の計算において、40 mM Britton-Robinson buffer (pH 4.0, 1% DMSO) に溶解した MG **6** および MG-OH の 620 nm の吸光度を、それぞれの $Abs(\infty)$ とした。MG **7** の光可逆性評価においては、2 分間光照射された MG **7** 溶液 (10 mM Britton-Robinson buffer (pH 7.0, 1% DMSO)) を 25 °C で暗所下に静置し、経時的に測定を行い、一晩静置した MG **7** 溶液に再光照射し測定を行った。

MG 誘導体の中性 pH 応答性評価では、化合物を 40 mM Britton-Robinson buffer (pH 7.0, 1% DMSO) に溶解させ、経時的に吸収スペクトル測定を行った。

2.3. 結果と考察

2.3.1. マラカイトグリーンカルボン酸誘導体の合成

マラカイトグリーンをカチオン性くし型共重合体に導入するために、本章では容易にアミノ基に導入できるカルボキシ基を有する 2 種類の MG 誘導体を設計した (**Figure 2.2**)。化合物 **2** (MG **2**) を、化合物 **1** と 4-azidobenzoic acid のクリック反応によって合成した。化合物 **6** (MG **6**) を化合物 **3** から 3 ステップで合成した。化合物 **4** を化合物 **3** からグリニャール反応によって合成し、化合物 **5** を化合物 **4** と 4-(methoxycarbonylmethyl)phenylboronic acid pinacol ester の鈴木・宮浦カップリングによって得た。化合物 **5** のエステル基の加水分解によって化合物 **6** (MG **6**) を合成した。

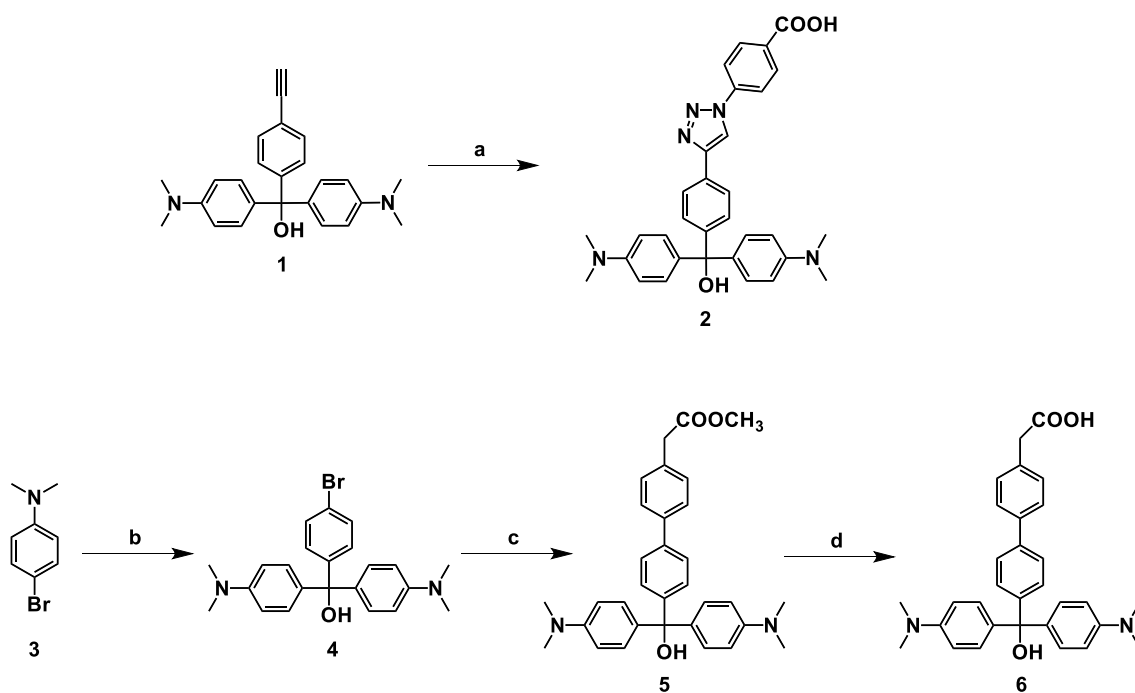


Figure 2.2. Synthesis of MG derivatives functionalized with carboxylic acid. (a) 4-Azidobenzoic acid, DMF/water (2:1), room temperature, 65%; (b) *n*-BuLi, methyl 4-(bromomethyl)benzoate, THF, -65 °C, 92%; (c) 4-(methoxycarbonylmethyl)phenylboronic acid pinacol ester, Pd(PPh₃)₄, THF, reflux, 46%; (d) NaOH, DMSO/water (4:1), 40 °C, 87%.

2.3.2. MG 誘導体の光応答性評価

MG 誘導体の光応答性を評価するために、紫外可視近赤外分光光度計による吸収スペクトル測定を行った。MG はノニオン体からカチオン体に変換されると、共役系の拡張によって赤外領域に吸収を示すことが知られている。⁵ **Figure 2.3** に示したように通常の MG 化合物 (MG-OH) は、光照射する前は紫外領域 (260 nm) にのみに吸収を示す。これは MG ノニオン体に起因する吸収バンドである。一方、光照射によって 430 nm および 620 nm に新たな吸収バンドが出現する。これらのピークは MG カチオン体に由来する。ここでは、この吸収スペクトル変化を観察することで、合成した MG 誘導体の光応答性を評価した。まず、MG カルボン酸誘導体である MG 2 および MG 7 の pH 9.0 水溶液中での光応答性を評価した。**Figure 2.4A,B** に MG 2 および MG 7 の吸収スペクトルを示した。両 MG 誘導体は、光照射前では 260 nm 付近にノニオン体に由来するピークが観測された。310 nm の光照射によって、ノニオン体由来のピークの減少とカチオン体由来の 430 nm および 620 nm のピークの増加が見られた。これらの吸収スペクトルの変化は MG-OH と類似している (**Figure 2.3**)

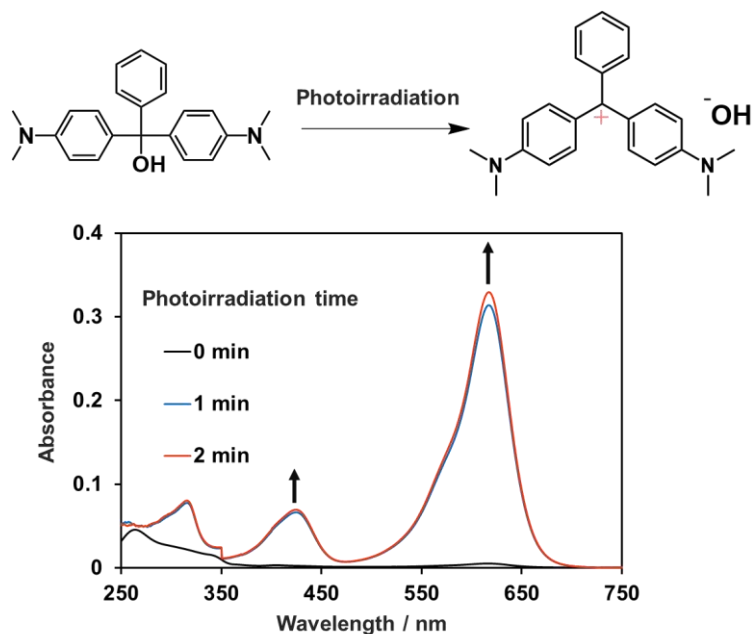


Figure 2.3. Absorption spectral changes of 10 μM MG-OH in Britton-Robinson buffer (pH 9.0, 1% DMSO) upon photoirradiation at 310 nm. Arrows indicate direction of absorbance change as a function of irradiation time.

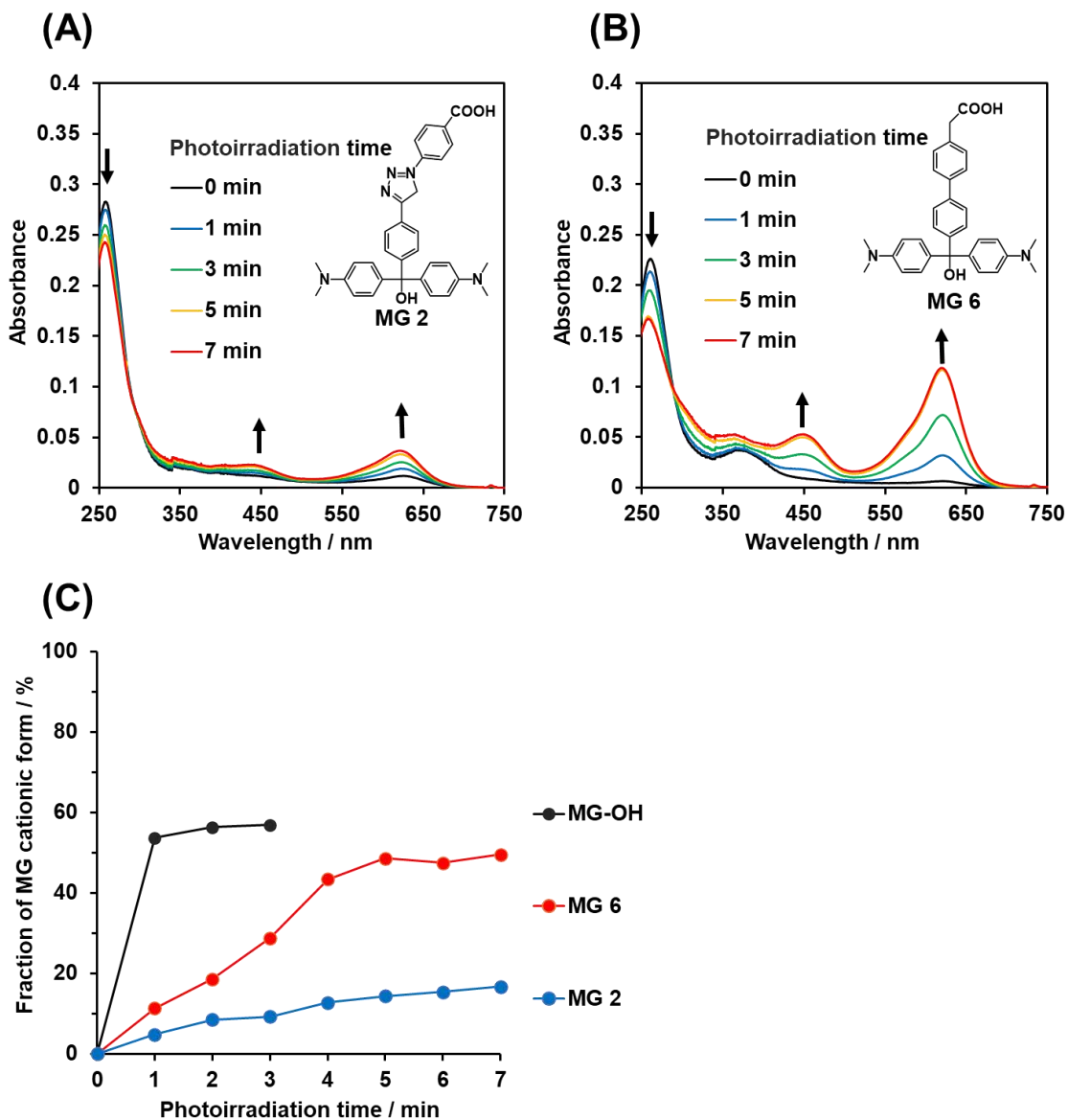


Figure 2.4. Photoresponsive properties of MG derivatives. (A and B) Absorption spectral changes of 10 μM A) MG 2 and B) MG 6 in Britton-Robinson buffer (pH 9.0, 1% DMSO) upon photoirradiation at 310 nm. Arrows indicate direction of absorbance change as a function of irradiation time. (C) Fractions of MG cationic as a function of photoirradiation time.

Figure 2.4C に光照射時間に対する MG 誘導体のカチオン体への変換率をプロットした。この光変換率の算出において、OH 基を脱離基とする MG 化合物は pH 応答性を有しており、酸性条件下では全ての MG ノニオン体がカチオン体に変換されるため、pH 4.0 での測定時における 620 nm のカチオン由来のバンドの吸光度を変換率 100%と見なしている。MG 2、6 の光変換反応は 7 分ほどで平衡に達していることがわかった。MG 2、6 および MG-OH の最大の光変換率は、それぞれ 19%、49%および 59%であった (Figure 2.4C)。MG 2 の低い光変換率は、MG 6 や MG-OH と比較して、MG 部位がトリアゾール基やカルボン酸基といった電子吸引基と共役的に結合されているためであると推測される。一方、MG 6 は、MG 部位とカルボキシ基がメチレンリンカーを介して連結された構造になっているため、電子吸引基の影響を受けない。そのため、MG 6 は MG 2 より 2 倍以上の光変換率を有していると考えられる。

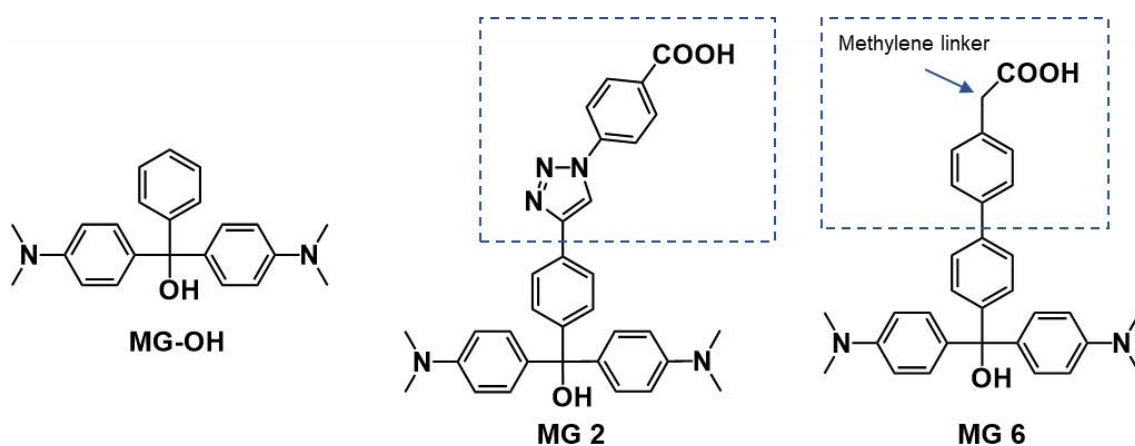


Figure 2.5. MG 2 および MG 6 の化学構造の比較

2.3.3. MG 誘導体の中性 pH 応答性評価

前項で、MG 6 の光変換率が MG 2 より優れていることが確認された。しかしながら、脱離基にヒドロキシ基 (OH 基) を持つ MG 誘導体は pH 応答性を示すことが知られており^{11,12}、中性条件下においても光照射に関わらず、MG 誘導体はカチオン体へ変換される。**Figure 2.6** には、MG 6 および MG-OH を pH 7.0 の水溶液に溶解させ、各時間に測定した吸収スペクトルを示した。MG 6 および MG-OH の吸収スペクトルでは、時間経過に伴って、260 nm 付近の吸収バンドが減少し、カチオン体由来の 620 nm の吸収バンドの増加が観察された。MG 6 は、pH 7.0 の水溶液中において 2 時間ほどでカチオン体に 50% 変換される。この結果は、中性条件下で MG 6 が光照射なしでノニオン体からカチオン体に

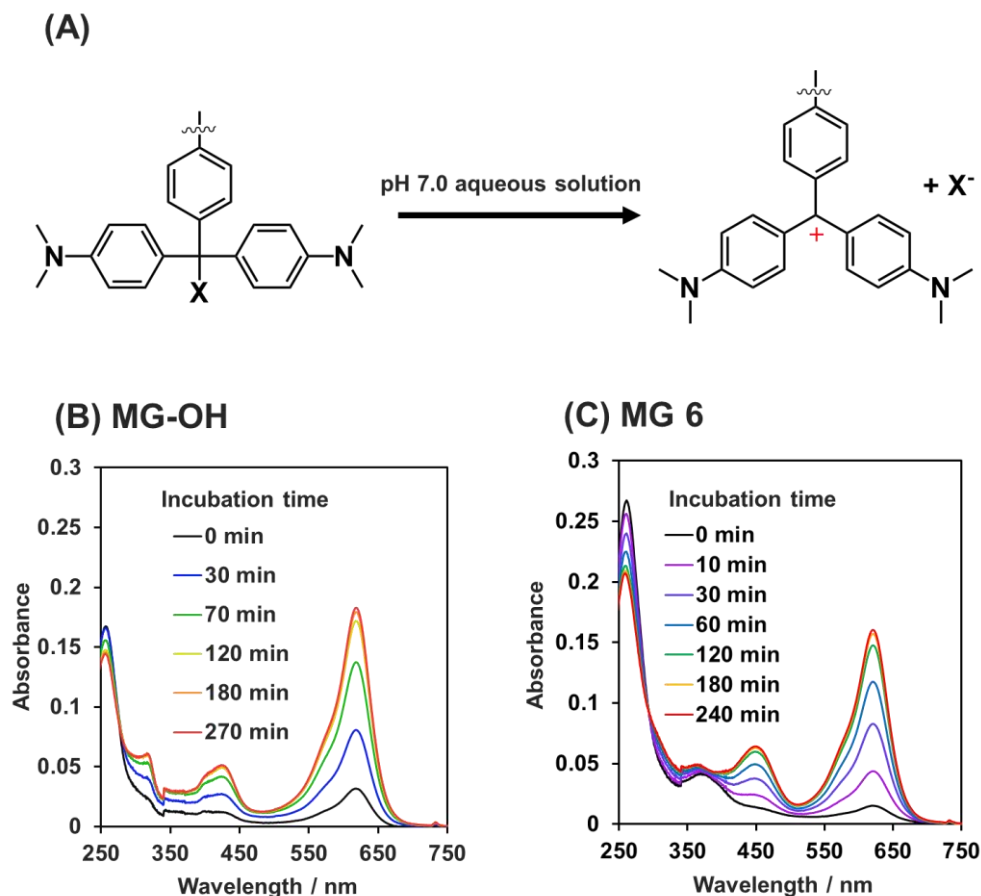


Figure 2.6. (A) Schematic of conversion of MG derivative to cationic form. (B and C) Absorption spectral changes of 10 μ M B) MG-OH and C) MG 6 as a function of time of incubation in Britton-Robinson buffer (pH 7.0, 1% DMSO) at 25 °C in the dark.

自発的に変換されることを示唆する。MG 6 は、中性条件下でカチオン性くし型共重合体のイオン性を光制御するという目的に適していないため、改善が必要である。そこで次に、脱離基としてシアノ基 (CN 基) を有する MG 誘導体に着目した。宇田らの報告により、シアノ基を有する MG 誘導体、bis(4-(dimethylamino)phenyl)(4-phenyl)methyl cyanide (MG-CN) は、pH 7.4 – pH 5.0 の範囲においてカチオン由来の吸光度の上昇がない、すなわち pH 応答性がないことがわかっている¹²。そこで中性 pH での自発的なカチオン化を抑制するために、MG 6 のシアノ化を行った。酸性条件で MG 6 を過剰のシアニ化カリウム (KCN) で処理することで OH 基をシアノ基に置換し、MG 7 を合成した (Figure 2.7)。先ほど同様に、MG 7 を pH 7.0 の水溶液に溶解させ、経時的に反応を追跡するために、各時間で吸収スペクトルを測定した。4 時間以上インキュベートしても、MG 7 の吸収スペクトル上に 620 nm の MG カチオン体由来の吸収バンドは見られなかった。この結果は、MG 7 は中性条件下において、自発的なカチオン化が起こらないことを示唆する (Figure 2.8)。

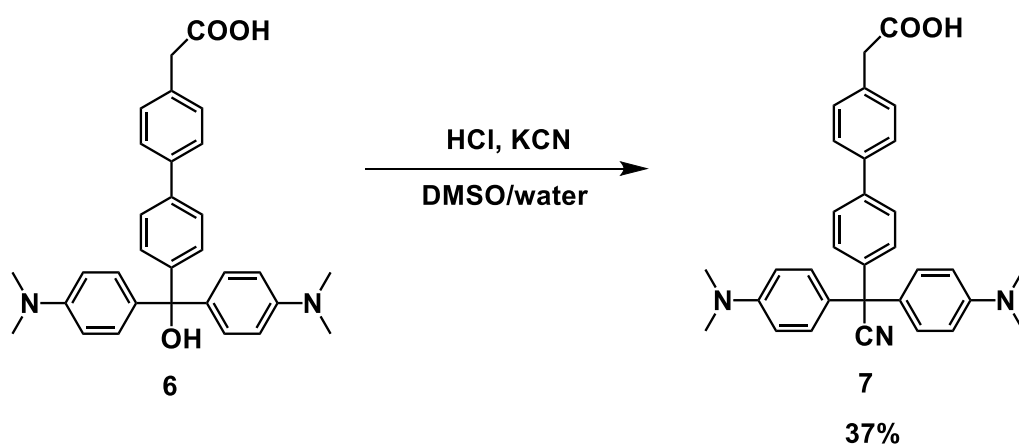


Figure 2.7. Synthesis of MG 7.

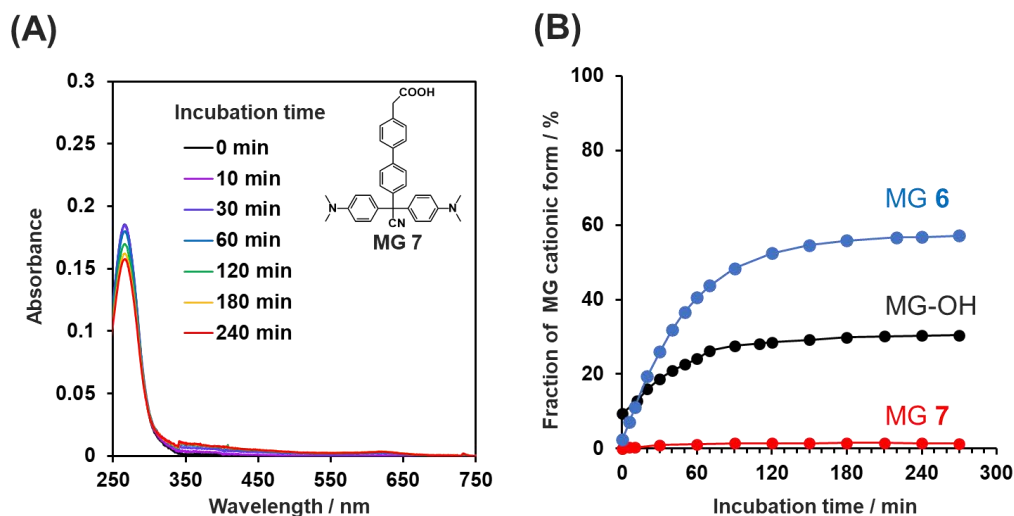


Figure 2.8. (A) Absorption spectral changes of 10 μM MG 7 as a function of time of incubation in 10 mM Britton-Robinson buffer (pH 7.0, 1% DMSO) at 25 °C in the dark. (B) Fraction of cationic form of MG derivatives as a function of time of incubation.

2.3.4. MG 7 の光応答性評価

前項で合成した MG 7 の光応答性を評価した。Britton-Robinson buffer (pH 7.0, 1% DMSO) に溶解させ、光照射 ($\lambda = 310 \text{ nm}$) を行った。**Figure 2.9B** に示したように、光照射によって、260 nm の吸光度の減少、620 nm の吸光度の増加が見られ、MG 7 がカチオン体に変換されていることを確認した。MG 7 は中性条件下で 1 分間の光照射によって、89% がカチオン体に変換され、MG-CN に 1 分間光照射した際の光変換率と一致している (**Figure 2.9C**)。また、OH 基を有する MG 誘導体 (MG-OH, MG 6) より、CN 基を有する MG 誘導 (MG-CN, MG 7) の方が、光変換率が高いことから、マラカイトグリーンによる脱離反応は脱離基にも依存することが分かった。MG の脱離反応のメカニズムは詳しく調査されていないが、OH 基のような電子供与基より CN 基のような電子吸引基の方が、脱離能が高いと思われる。

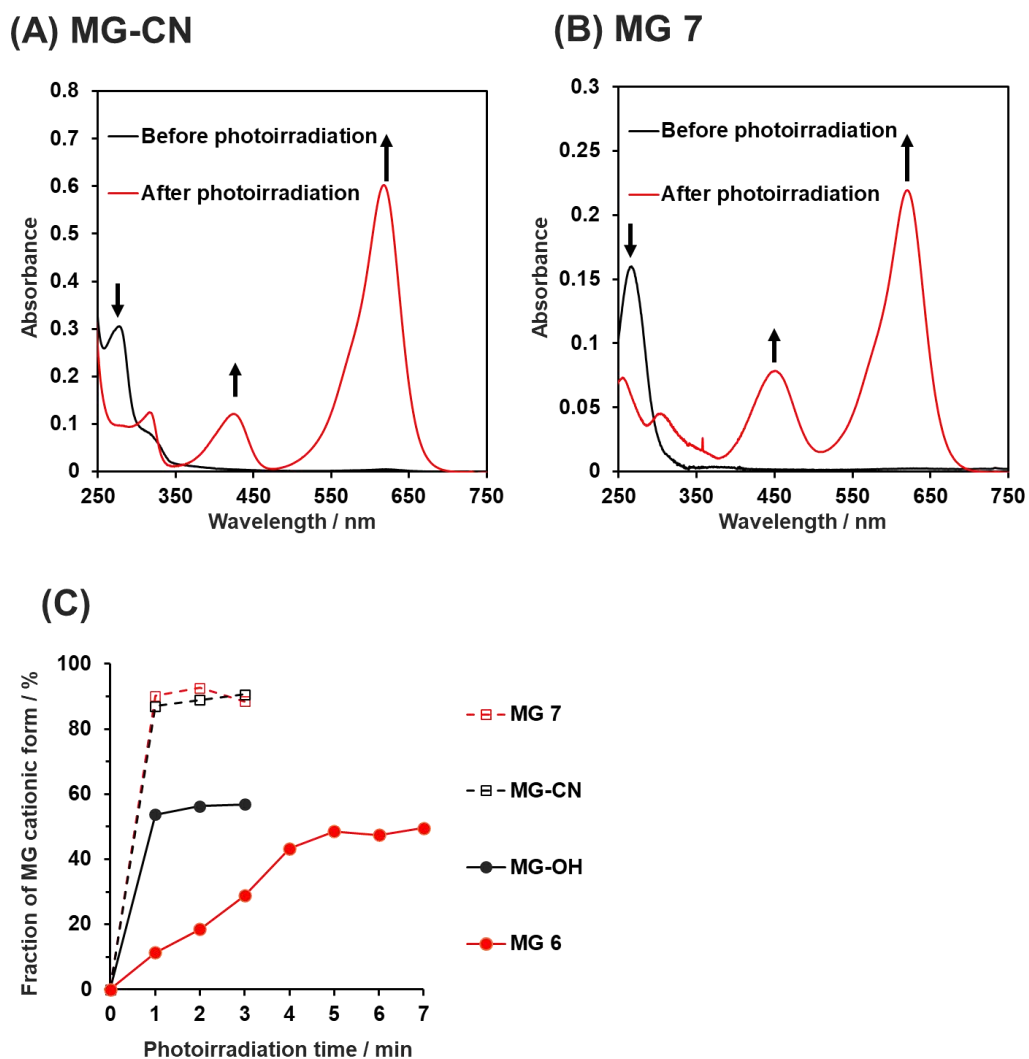


Figure 2.9. (A and B) Absorbance spectra of 10 μ M A) MG-CN and B) MG 7 before and after photoirradiation at 310 nm for 2 min. (C) Fraction of MG derivatives in cationic form as a function of photoirradiation time.

MG カチオン体は暗闇下でノニオン体に戻ることが知られているため¹³、最後に MG 7 の光反応の可逆性を評価することにした。まず、MG 7 に 2 分間の光照射を行い、その後暗闇下で静置し、各時間で吸収スペクトルを測定した。

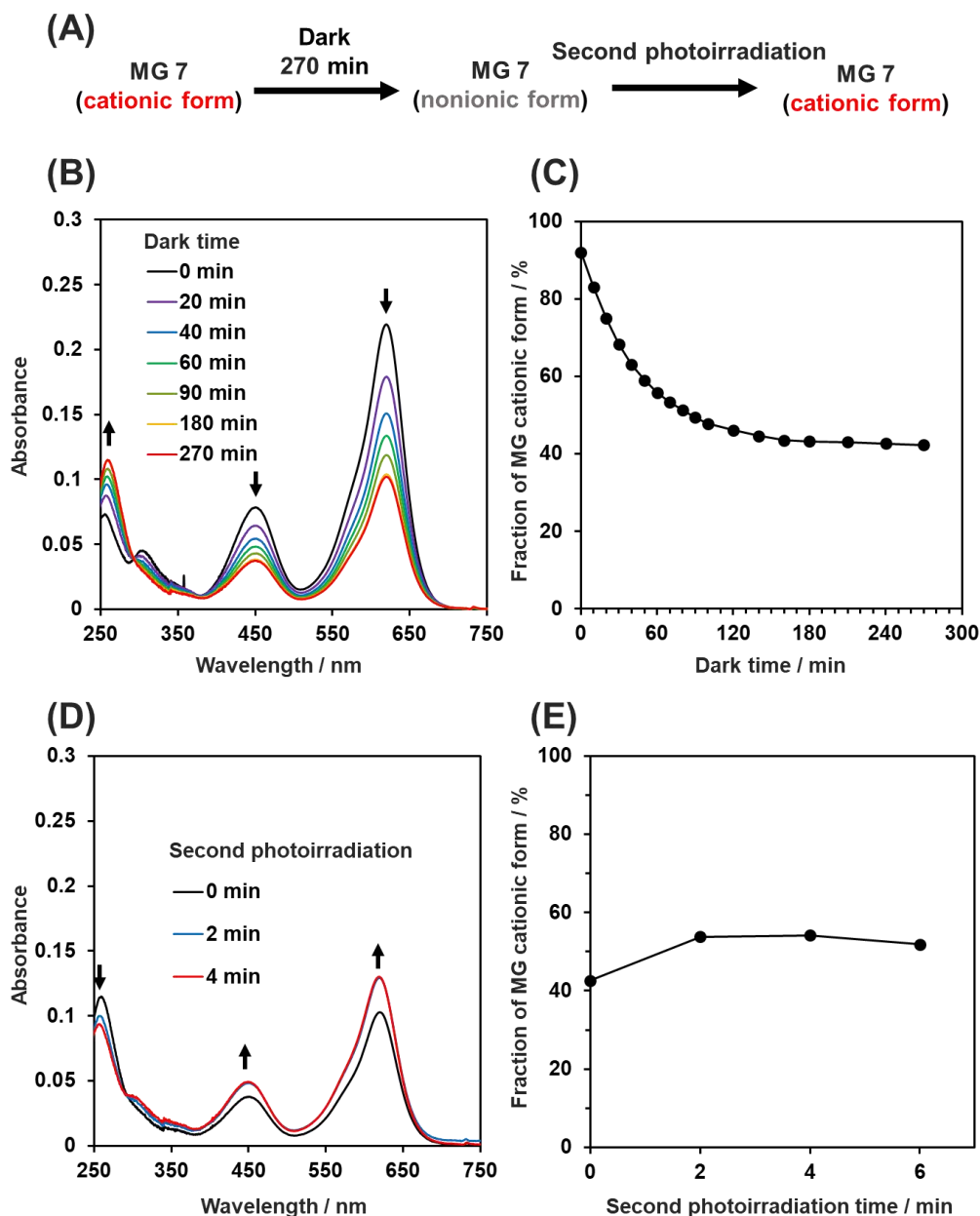


Figure 2.10. (A) Illustration of reversible reaction of MG 7. (B) Absorption spectral changes of 2 min photoirradiated MG 7 incubated in the dark at 25 °C. (C) Fraction of cationic form when photoirradiated MG 7 incubated in the dark at 25 °C. (D) Absorption spectra of the cationic form of MG 7 as a function of time of second photoirradiation at 310 nm. (E) Fraction of cationic form of MG 7 as a function of time of second photoirradiation.

Figure 2.10 に示したように、徐々に MG カチオン体由来の吸収バンド (450 nm, 620 nm) が減少していく様子が観測された。約 3 時間暗闇下で静置したところ、MG カチオン体の割合は 91% から 43% に減少した。4 時間以上、暗闇下で静置させたが完全にノニオン体に戻ることはなかった。MG 7 は光照射によって CN 基が脱離するが、系内には CN^- だけでなく OH^- も存在するため、MG カチオン体は CN 体および OH 体になる可能性がある。OH 体すなわち MG 6 に変換された場合、自発的なカチオン化が引き起こされるため、完全にカチオン体由来の吸収バンドが消失しないのではないかと考えられる。2 分間光照射した MG 7 溶液を 270 分間暗闇下で静置させた後、再度光照射を行った。2 分間の再光照射によって MG カチオン体の割合が 43% から 54% まで増加した。しかし、それ以上光照射してもカチオン体の増加は見られなかった。この結果は、光照射された MG 7 が OH 体になり、光変換率が減少したことに起因していると推測される。以上より、MG 7 の光可逆性は乏しいことが確認された。

2.4. 結言

本章では、カチオン性くし型共重合体にコンジュゲート可能な MG カルボン酸誘導体の設計を行った。カルボキシ基を有する 2 種類の MG 誘導体、MG 2 および MG 6 を合成し、ノニオン体からカチオン体への光変換を吸収スペクトルで評価したところ、MG の光変換が化学構造の共役系に関与していることが確認され、MG 6 の光応答性が MG 2 より優れていることがわかった。しかし、脱離基に OH 基を持つ誘導体は中性 pH で自発的にカチオン化するために、OH 基を CN 基に置換した MG 7 を合成した。中性 pH で、MG 7 は自発的なカチオン化が起こらず、光によって迅速かつ定量的にカチオン体に変換された。把握している限りでは、MG 誘導体の設計に関して報告が少なく、またコンジュゲート用の MG 誘導体はこれまで報告がない。本章ではカルボキシ基を有する新規の MG 誘導体の開発に成功した。MG 7 はアミノ基を有する材料に容易に導入されることが期待される。CN 基を持つ MG 誘導体は水溶液中で可逆性が乏しいため、化学構造の最適化は今後の課題であろう。

2.5. 参考文献

1. Itagaki, T.; Kurihara, R.; Tanabe, K. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 3112–3115.
2. Hamada, T.; Sugimoto, R.; Vestergaard, M. C.; Nagasaki, T.; Takagi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *132*, 10528–10532.
3. Herz, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 6777–6785.
4. Kito, H.; Suzuki, F.; Nagahara, S.; Nakayama, Y.; Tsutsui, Y.; Tsutsui, N.; Nakajima, N.; Matsuda, T. *ASAIJ Journal* **1994**, *40*, 260–266.
5. Uda, R.M.; Ohshita M. *Bio macromolecules* **2012**, *13*, 1510–1514.
6. Irie, M.; Kunwatchakun, D. *Macromolecules* **1986**, *19*, 2476–2480.
7. Valeur, E.; Bradley, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606–631.
8. El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557–6602.
9. Oßwald, S.; Breimaier, S.; Linseis, M.; Winter, R.F. *Organometallics* **2017**, *36*, 1993–2003.
10. Tachikawa, T.; Handa, C.; Tokita, S. *J. PHOTOPOLYM. SCI. TECHNOL.* **2003**, *16*, 187–190.
11. Culp, S. J.; Beland F. A. *J. Am. Coll. Toxicol.* **1996**, *15*, 219.
12. Uda, R. M.; Yoshida, N.; Iwasaki, T.; Hayashi, K. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 8242–8248.
13. Jiang, Y.; Wan, P.; Xu, H.; Wang, Z.; Zhang, X. *Langmuir* **2009**, *25*, 10134–10138

第 3 章

MG 誘導体を配した

カチオン性くし型共重合体の調製および
光応答性評価

3.1. 緒言

MG を備えた共重合体の合成法は、主に MG ビニル誘導体を用いたラジカル重合法がほとんどである¹⁻³。MG 誘導化共重合体の DNA との相互作用はしばしば研究されている^{2,4}。宇田らは MG を備えた poly(vinyl alcohol) 共重合体 (PVAMG) の DNA への結合能が、共重合体の分子量に依存することを報告しているが、MG 修飾量や光変換率についての議論はなされていない⁴。分子量だけでなく、修飾量や光変換率もまたアニオン性分子への相互作用を考慮した際に重要な因子になり得る。しかしながら、ラジカル重合で MG を有する共重合体を調製する場合、分子量および MG 部位の修飾量の調整を同時に行わなければならないため、細かい調節が困難である。分子量や MG 修飾量が容易に調整できるようになれば、アニオン性分子への相互作用の最適化の調査が簡便になるはずである。

本研究では、共重合体へ容易に MG 誘導体を導入する方法を確立した。後から MG 誘導体を共重合体に導入する方法では、① 同じ共重合体を用いることにより分子量が統一でき、② 容易に MG 修飾量が異なる共重合体の調製ができるといった利点がある。第2章では、カチオン性くし型共重合体へのコンジュゲートを指向した MG カルボン酸体誘導体の設計を行い、光応答性や pH 応答性において MG 7 が優れていることがわかった。そこで本章では、MG 7 を用いて、カチオン性くし型共重合体に MG ユニットを導入し、主鎖骨格の同じ分

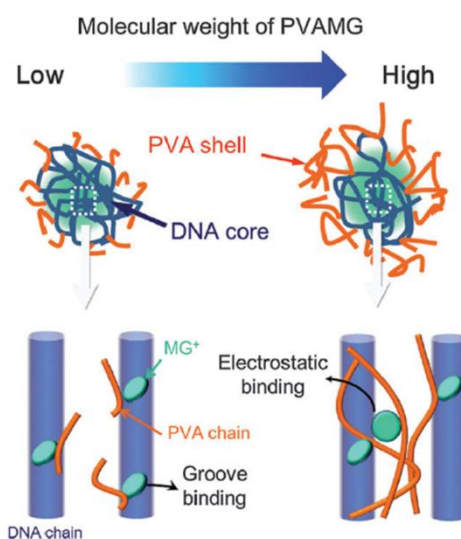


Figure 3.1. DNA/ PVAMG 複合体相互作用における PVAMG の分子量依存性.⁴

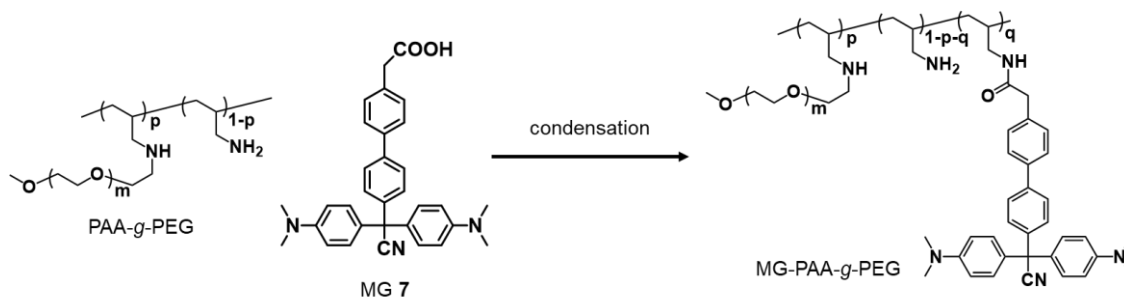


Figure 3.2. MG 修飾カチオン性くし型共重合体の構造および合成

分子量で MG 修飾の異なるコンジュゲート共重合体を合成した。カチオン性くし型共重合体である PAA-*g*-PEG の主鎖骨格 PAA は日東紡績株式会社から購入でき、様々な分子量のものが用意可能であり、今回は分子量 5k の PAA を用いて合成を行った。予め PAA-*g*-PEG を合成し、共重合体に対する MG 7 仕込み量によって MG 導入量を調整した。また、ここでは MG 修飾量の異なる MG 修飾カチオン性くし型共重合体の光応答性についての調査も行った。

3.2. 実験項

3.2.1. 材料・機器

Poly(allylamine) hydrochloride (PAA · HCl) ($M_w: 5 \times 10^3$) 水溶液は、日東紡績株式会社によって提供され、冷メタノールで再沈殿を行うことにより精製した。末端にアルデヒドを有する poly(ethylene glycol) (PEG) ($M_w: 5 \times 10^3$) は日油株式会社から購入した。N,N-diisopropylethylamine (DIPEA) はナカライテスク株式会社から購入した。Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) は渡辺化学工業株式会社から購入した。その他の試薬は、東京化成工業株式会社、富士フィルム和光純薬株式会社、Sigma Aldrich から購入した。NMR スペクトルを、Bruker biospin・AVANCE II 400C (^1H : 400 MHz) を用いて測定した。合成ポリマーの精製では、陽イオン交換体 (TOYOPEARL SP-650) によるカラムクロマトグラフィーおよびセルロース膜 (MWCO: 3,500) による透析を行った。UV-VIS スペクトル測定を、JASCO V-730 UV/vis spectrophotometer を用いて行った。UV LED 照明器 (波長: 310 ± 5 nm, LSP7NUV310-0024、アイテックシステム株式会社) を用いて光照射を行った。

3.2.2. カチオン性くし型共重合体の合成

PAA-*g*-PEG の合成

カチオン性くし型共重合体である poly(allylamine)-*graft*-poly(ethylene glycol) (PAA-*g*-PEG) を過去の報告に従って合成した⁵。簡潔に説明すると、PAA-HCl と PEG アルデヒド誘導体を 0.1 M borate buffer (pH 8.5) に溶解した。混合溶液に sodium cyanoborohydride を加え、40 °C、4 日間振とう攪拌を行った。粗共重合体を、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーおよび透析により精製した。精製された共重合体溶液を凍結乾燥により乾燥され、白色粉末として PAA-*g*-PEG を得た。PAA-*g*-PEG の組成を ¹H NMR により決定し、10 wt% PAA、90 wt% PEG であった。PAA のアミノ基に対して 9 mol% PEG が修飾されていた。

MG-PAA-*g*-PEG の合成

MG 修飾 PAA-*g*-PEG を以下のように合成した。DMSO に溶解させた PAA-*g*-PEG に、DIPEA (PAA-*g*-PEG のアミノ基に対して 3 等量)、様々な濃度の MG 7 および PyBOP (MG 7 に対して 3 等量) を加え、40 °C、24 時間攪拌した。粗共重合体を、セルロース膜を用いて DMSO で 2 日間、その後純水で 2 日間、透析し精製した。精製された共重合体溶液は凍結乾燥にて乾燥され、緑色粉末として MG-PAA-*g*-PEG を得た。MG 部位の修飾率を ¹H NMR により決定した。

3.2.3. MG-PAA-*g*-PEG の吸収スペクトル測定および光変換率の算出

光照射 ($\lambda = 310$ nm) された 40 mM Britton-Robinson buffer (pH 7.0) 中の MG-PAA-*g*-PEG (MG unit 10 μ M) の吸収スペクトルを、紫外可視近赤外分光光度計 (JASCO V-730) により測定した。光照射する前の MG-PAA-*g*-PEG の 630 nm の吸光度を、 $Abs(0)$ 、MG カチオン体への変換率 0% と定義した。また、40 mM Britton-Robinson buffer (pH 4.0, 1% DMSO) に溶解した 10 μ M MG 6 の 620 nm の吸光度を $Abs(\infty)$ 、MG カチオン体への変換率 100% とした。 $Abs(t)$ は、 t 秒光照射した時の MG-PAA-*g*-PEG の 630 nm の吸光度である。MG-PAA-*g*-PEG の MG 部位の光変換率を以下のように算出した。

$$\text{Fraction of MG cationic form (\%)} = \frac{Abs(t) - Abs(0)}{Abs(\infty) - Abs(0)} 100$$

3.2.4. MG-PAA-*g*-PEG の光可逆性評価

40 mM Britton-Robinson buffer (pH 7.0) 中の MG-PAA-*g*-PEG (MG unit 10 μM) に光照射 1 分間行い、暗闇下で静置し、各時間において吸収スペクトルを測定した。その後、一晩暗闇下で静置させた MG-PAA-*g*-PEG 水溶液に再度光照射 ($\lambda = 310 \text{ nm}$) を行い、吸収スペクトルを測定した。

3.3. 結果と考察

3.3.1. MG-PAA-*g*-PEG の合成

まず光応答性カチオン性くし型共重合体を合成するために、カチオン性くし型共重合体に MG **7** を導入した (**Figure 3.3**)。カチオン性くし型共重合体である Poly(allylamine)-*graft*-poly(ethylene glycol) (PAA-*g*-PEG) は、報告されている手順に従って調製された。⁵ MG **7** は、縮合剤として PyBOP を使用し、PAA-*g*-PEG のアミノ基と MG **7** のカルボキシル基間のアミド縮合によって PAA-*g*-PEG に導入された。本研究では、9 mol% (9MG9P)、21 mol% (21MG9P) および 41 mol% (41MG9P) の MG モル分率を有する 3 つの PAA-*g*-PEG/MG コンジュゲート (MG-PAA-*g*-PEG) を調整した。合成したサンプルは X MG Y P と表記され、 X と Y はそれぞれ MG ユニットと PEG ユニットの mol%を表す。**Figure 3.4** に PAA-*g*-PEG および 9MG9P の ^1H NMR を示した。MG-PAA-*g*-PEG の ^1H NMR では、PAA-*g*-PEG には存在しないベンゼン環由来のプロトンのピークが PAA-*g*-PEG には存在しないベンゼン環由来のプロトンのピークが 6-8 ppm で観測されたことから、MG 部位が導入されていることがわかる。

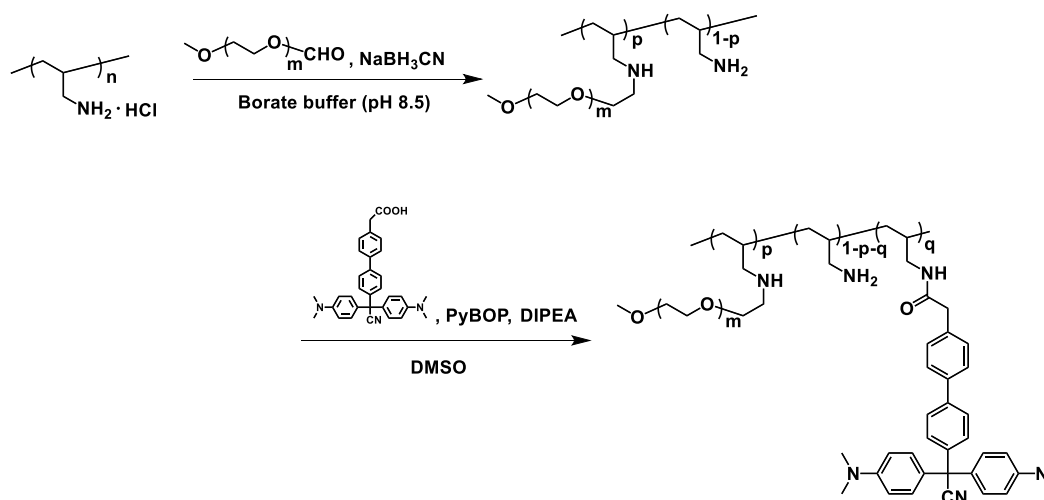
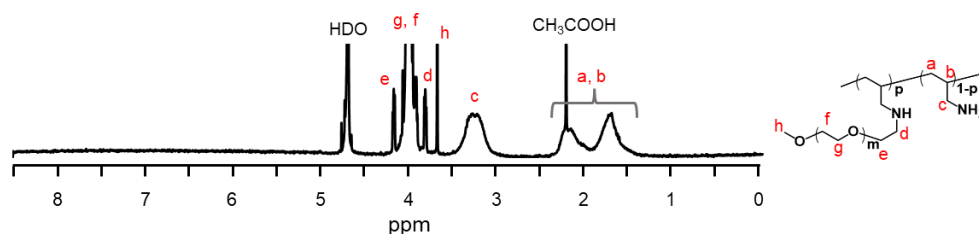


Figure 3.3. Preparation of MG-modified cationic comb-type copolymers.

PAA-*g*-PEG の PEG ユニットの mol% は、PAA-*g*-PEG の ^1H NMR 上の a-c のピーク (PAA の $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-NH}_2$) と h のピーク (PEG 末端の OCH_3) の積分値から算出した。MG-PAA-*g*-PEG の MG 含有量は、MG-PAA-*g*-PEG の ^1H NMR 上の h のピーク (PEG 末端の OCH_3) と j-o のピーク (MG 部位のベンゼン環) の積分値から算出された。MG-PAA-*g*-PEG の合成において、MG 7 カップリング効率は 80% 以上であり、求めている MG 含有量を導入できることが確認された。

^1H NMR of PAA-*g*-PEG (solvent: D_2O)



^1H NMR of MG-PAA-*g*-PEG (9MG9P) (solvent: D_2O)

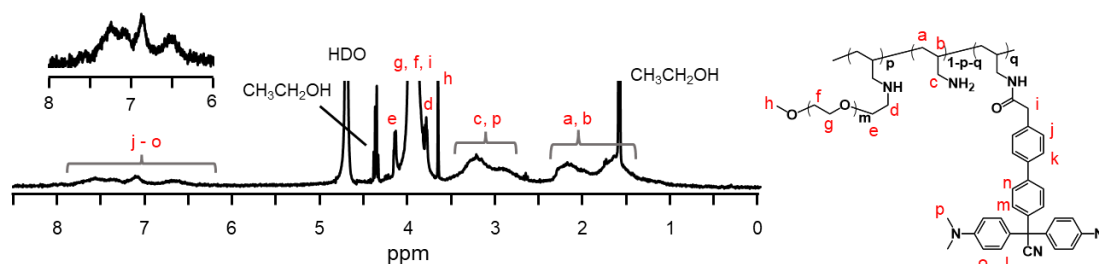


Figure 3.4. ^1H NMR of PAA-*g*-PEG and MG-PAA-*g*-PEG (9MG9P) in D_2O .

3.3.2. MG-PAA-*g*-PEG の光応答性評価

合成した 3 つの MG-PAA-*g*-PEG の光応答性を吸収スペクトル測定により調査した。第 2 章同様に、MG 誘導体が光照射された際に観測される 620 nm 付近の MG カチオン体由来の吸収バンドから MG-PAA-*g*-PEG の光応答性を評価した。光照射する前の MG-PAA-*g*-PEG の吸収スペクトルでは、269 nm に MG ノニオン体起因の吸収バンドが観測された。光照射によって MG ノニオン体由来のバンドが減少し、新たなバンドが 450 nm および 630 nm に観測された (**Figure 3.5**)。この結果は、MG-PAA-*g*-PEG の MG 部位が光照射によってノニオン体からカチオン体に変換されたことを示唆する。MG 7 と MG-PAA-*g*-PEG の光照射前後の吸収スペクトルを比較すると、MG 7 は PAA-*g*-PEG に導入されることでノニオン体およびカチオン体の吸収バンドはそれぞれ、3 nm および 10 nm のレッドシフトを示した(**Figure 3.6A,B**)。これは、MG 7 が PAA-*g*-PEG に導入されたことによる MG 部位の周囲環境変化や MG 部位同士の π - π スタッキングなどに起因したと推測される。

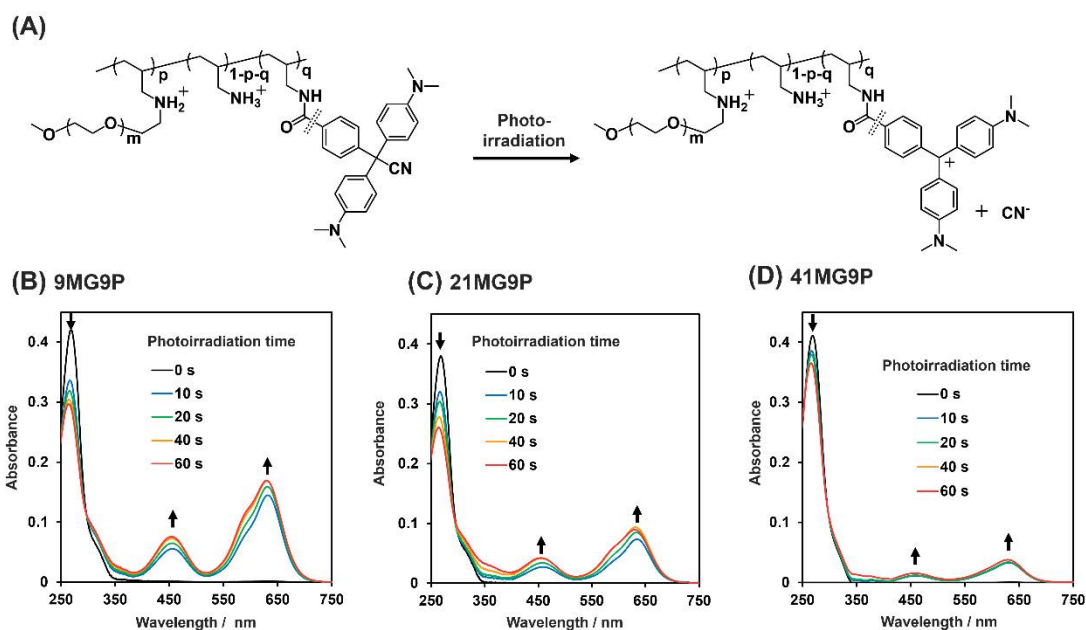


Figure 3.5. The photoresponsive properties of MG-PAA-*g*-PEG. (A) Illustration of the photo-mediated conversion of MG-PAA-*g*-PEG to the cation form. (B-D) Absorption spectra of 10 μ M MG-PAA-*g*-PEGs (in MG units), B) 9MG9P, C) 21MG9P, and D) 41MG9P as a function of time of photoirradiation at 310 nm. Buffer for all experiments was 40 mM Britton-Robinson buffer (pH 7.0).

Figure 3.6C に MG-PAA-*g*-PEG と MG 7 の光照射時間における MG カチオン体への変換率を示した。MG-PAA-*g*-PEG の MG カチオン体は 630 nm に極大吸収を持つため MG-PAA-*g*-PEG の変換率において、630 nm の吸光度を用いた。MG-PAA-*g*-PEG の MG 部位の光変換は約 40 秒で平衡に達した。9MG9P、21MG9P と 41MG9P のカチオン体への最大光変換は、それぞれ 71%、39%、と 16%であった。MG 7 と比較して、MG-PAA-*g*-PEG の光誘導カチオン化率は MG 修飾量の増加に応じて減少した。MG 修飾率の増加による共重合体の溶解性の低下や MG 部位同士の相互作用に起因すると思われる。また、3 種類の共重合体において、主鎖骨格に対して約 7 mol%の MG 部位がカチオン化していた。よって共重合体内でカチオン化できる MG 部位数があるとも考えられる。

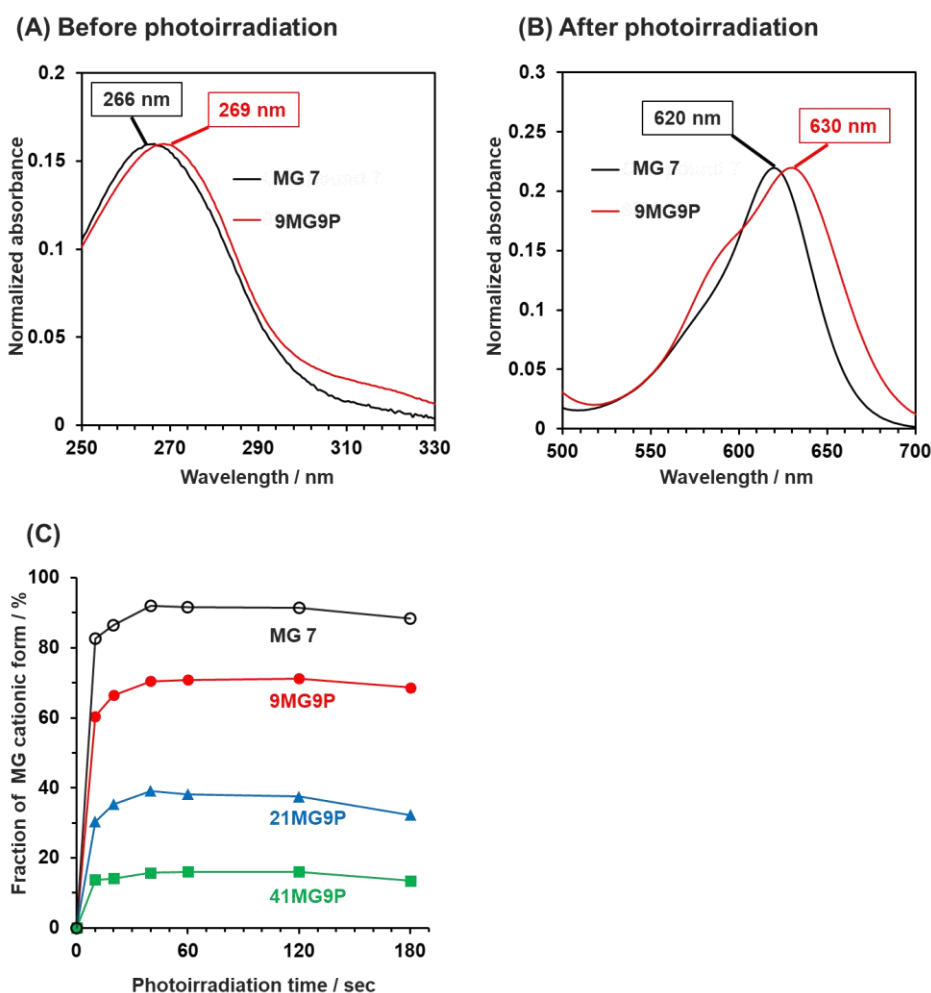


Figure 3.6. Absorption spectra of MG 7 and 9MG9P (A) before and (B) after photoirradiation. (C) Fraction of MG derivatives in cationic form as a function of photoirradiation time.

3.3.3. MG-PAA-*g*-PEG の光可逆性評価

次に MG-PAA-*g*-PEG (9MG9P, 21MG9P) 中の MG 部位の可逆応答を調査した。9MG9P および 21MG9P 溶液 (10 μ M, MG ユニット) に 1 分間光照射を行い、暗闇下で静置し各時間で吸収スペクトルを測定した。MG-PAA-*g*-PEG のカチオン体由来のピークが徐々に減少した (**Figure 3.7A,B**)。これは共重合体の MG 部位がカチオン体からノニオン体に変換されたことを示唆する。9MG9P および 21MG9P の MG 部位のカチオン化率は、暗闇下で 16 時間の静置によって 63%から 16%、33%から 8%にそれぞれ減少した。MG 7 は光変換されたカチオン体の約 50%が暗闇下でノニオン体に変換され、MG-PAA-*g*-PEG では光変換された MG 部位の約 75%がノニオン体に変換された。

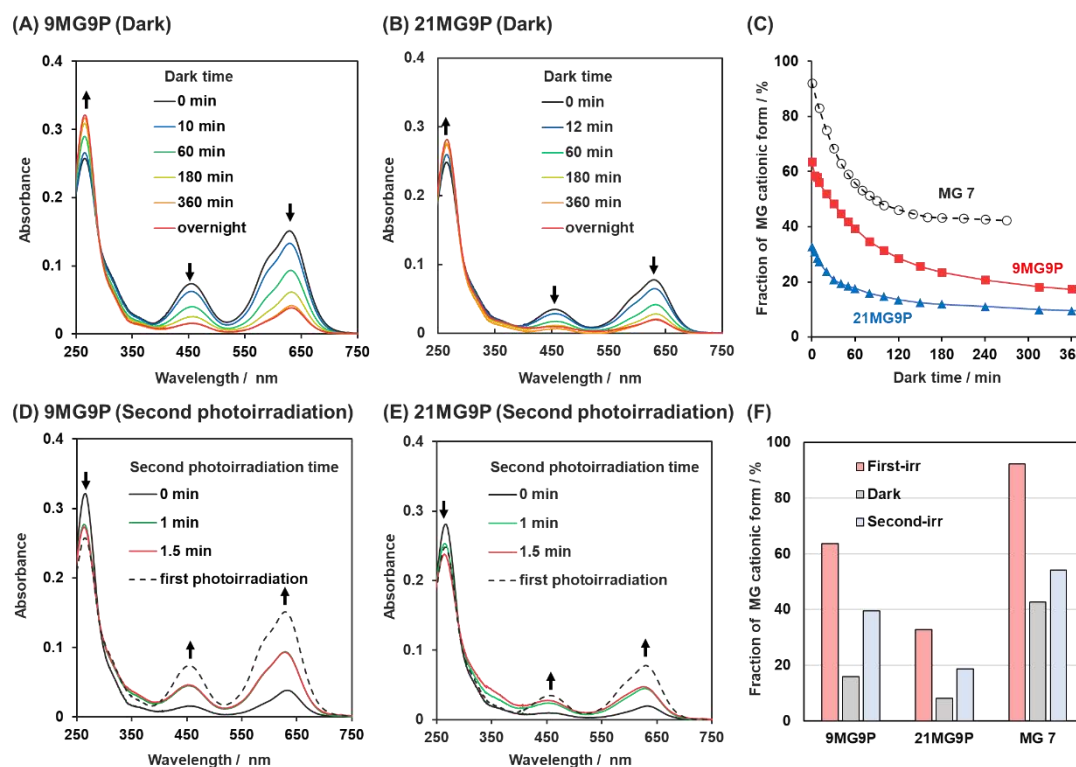


Figure 3.7. (A and B) Absorption spectral changes of 1 min photoirradiated A) 9MG9P or B) 21MG9P incubated in the dark at 25 °C. (C) Fraction of cationic form of MG unit when photoirradiated MG derivatives were incubated in the dark at 25 °C. (D and E) Absorption spectra of the cationic form of D) 9MG9P and E) 21MG9P as a function of time of second photoirradiation. (F) Fraction of cationic form of MG derivatives in each situation.

MG 7 同様、MG-PAA-*g*-PEG の MG 部位も CN 基ではなく、OH 基になっており、MG-PAA-*g*-PEG のアミノ基によって溶液内の pH が増加し、MG 部位の自発的なカチオン化が起こりにくいため、暗闇下におけるノニオン体への変換が高かったと考えられる。続いて、再度光照射を行ったところ、カチオン体由来の吸収バンドの増加が見られたが (Figure 3.7D,E)、初めの光照射と比較して、その変換率は低かった。そのため、MG 7 同様に MG-PAA-*g*-PEG の可逆性が乏しいことを確認された。

3.4. 結言

本章では、カルボキシ基を有する MG 誘導体である MG 7 とカチオン性くし型共重合体 PAA-*g*-PEG のコンジュゲート、MG-PAA-*g*-PEG の合成と光応答性の評価を行った。MG 7 は縮合反応によって効率的に PAA-*g*-PEG のアミノ基に導入され (カップリング効率 80%以上)、MG 含有量が容易に調整できることを確認した。調製した MG 導入量の異なる 3 つの MG-PAA-*g*-PEG は、光照射によって MG 部位がノニオン体からカチオン体に変換されることを吸収スペクトル測定から確認した。共重合体に導入する前の MG 7 の吸収スペクトルと比較して MG-PAA-*g*-PEG の吸収スペクトルはレッドシフトを示しているため、MG 部位の周囲環境の変化や MG 部位同士の相互作用が生じたことが考えられる。興味深いことに、MG 修飾によって MG-PAA-*g*-PEG 中の MG 部位の光変換率は異なり、MG 修飾量の増加に伴って減少することがわかった。この原因は、MG 部位同士の π - π 相互作用や MG 修飾による共重合体の水溶性の低下が考えられる。これらの知見は今後の MG コンジュゲートの研究において大いに参考になるであろう。この光変換率の低下は改善する必要がある、MG 部位と共重合体の間に親水性リンカーを配することで MG 部位同士の凝集が防げると考えられる。本論文では改善について触れないが、第 2 章で合成した化合物 4 の MG ブロモ誘導体は鈴木・宮浦カップリングにより容易に様々なリンカーを設定できるため、多様なタイプのコンジュゲート用 MG 誘導体の設計が期待できる。

3.5. 参考文献

1. Kito, H.; Suzuki, F.; Nagahara, S.; Nakayama, Y.; Tsutsui, Y.; Tsutsui, N.; Nakajima, N.; Matsuda, T. *ASAIJ Journal* **1994**, *40*, 260–266.
2. Uda, R.M.; Ohshita M. *Bio macromolecules* **2012**, *13*, 1510–1514.
3. Irie, M.; Kunwatchakun, D. *Macromolecules* **1986**, *19*, 2476–2480.
4. Uda. R.M; Marsui, T. *Soft Matter* **2015**, *11*, 8246–8252.
5. Shimada, N.; Kinoshita, H.; Umegae, T.; Azumai, S.; Kume, N.; Ochiai, T.; Takenaka, T.; Sakamoto, W.; Yamada, T; Furuta, T; Masuda, T; Sakurai, M.; Higuchi, H.; Maruyama, A. *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1904032.

第 4 章

MG 修飾カチオン性くし型共重合体の 光応答シャペロン活性評価

4.1. 緒言

ペプチド医薬は、広い接触面によって生体高分子相互作用を制御でき、生物医学から注目が集められてきた¹。しかしながら、細胞膜透過性が低く、実際の適用が制限されており、膜破壊活性ペプチドは細胞質へ直接輸送するツールとして注目が集められている^{2,3}。序論で述べたように、E5 ペプチドはインフルエンザウイルスの表面上に存在するヘマグルチニンの N 末端配列を模倣した 20 アミノ酸残基からなる両親媒性膜破壊活性ペプチドである。酸性 pH でグルタミン酸残基のカルボキシ基のプロトン化を介して静電反発が抑制され、ランダムコイルから α -ヘリックス構造に転移し、膜破壊活性を発現する^{4,5}。膜破壊活性ペプチドは細胞内へのドラッグデリバリーにおいて注目が集められているが、高い疎水性により溶解性が乏しく、酸性 pH では凝集体が形成し、膜破壊活性が低下するという問題点がある⁶。当研究室では、カチオン性くし型共重合体 PAA-*g*-Dex がペプチドの構造転移を、可溶性を保ちながら促進し、本来よりも高い膜破壊能を誘導することを見出した^{6,7}。更に PAA-*g*-Dex/E5 複合体は、脂質小胞（リポソーム）に穴を開けるだけでなく、リポソーム形態そのものを変化させることもわかった⁸。外部刺激によって E5 の膜破壊活性が制御できれば、細胞膜透過や脂質キャリアの開閉といった DDS への応用が見込まれる。

当研究室ではこれまでに化学修飾による機能化カチオン性くし型共重合体が、pH⁸や温度^{9,10}といった外部刺激によって E5 の膜破壊活性を制御できることを見出した。しかしながら、これらの外部刺激は時空間的制御の観点から使用が

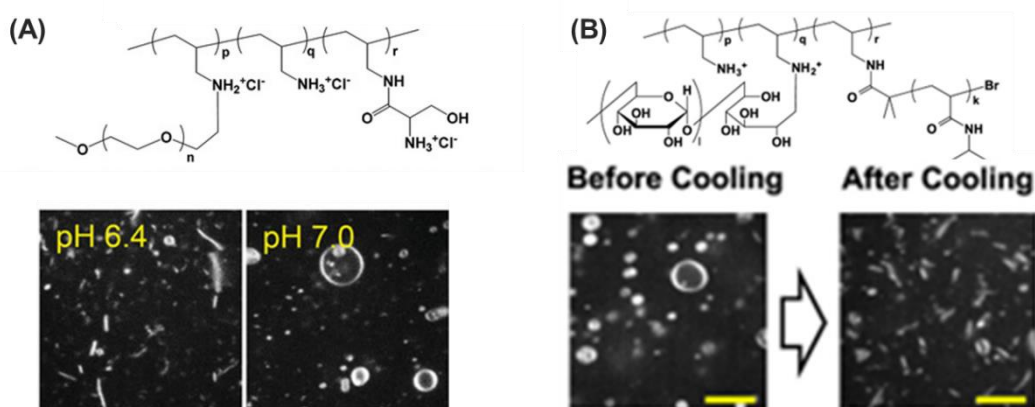


Figure 4.1. 機能性カチオン性くし型共重合体による E5 の膜破壊活性の A) pH³ および B) 温度制御.⁵

制限されるため、光をトリガーとした活性制御が求められている。膜破壊能を示すペプチドの光制御では、しばしばアゾベンゼン誘導体が用いられ、アゾベンゼン誘導化両親媒性 LK ペプチドのヘリックス含有量が、光照射によるアゾベンゼンの構造変化に伴って増加し、膜の透過性が向上することが確認されている¹²。これらはペプチドの活性を操作可能であるが、ペプチド内に光応答性分子を組み込まなければならないため、設計が複雑かつ困難である。

本章では MG-PAA-*g*-PEG による E5 ペプチドの膜破壊活性の光制御を試みた。既存の光制御と異なり、ペプチドの構造変更をせず、煩雑な合成が必要ないという利点がある。第3章より、MG-PAA-*g*-PEG の MG 部位が光照射によってノニオン体からカチオン体に変換されることがわかっており、共重合体のイオン性や親/疎水性が調整できると言える。よって MG-PAA-*g*-PEG の性質を光で変換することで E5 との相互作用を調整し、膜破壊活性の光制御ができると考えた。ここでは、MG-PAA-*g*-PEG が E5 の構造転移や膜破壊活性に与える影響、MG-PAA-*g*-PEG/E5 によるリポソーム形態の光制御を報告する。

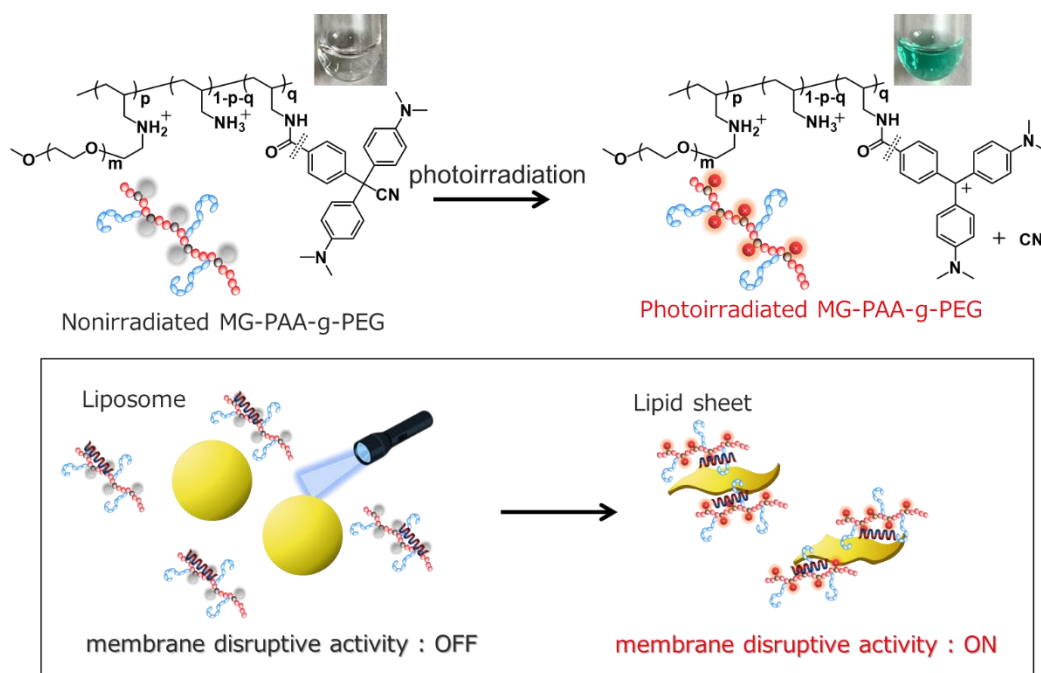


Figure 4.2. MG-PAA-*g*-PEG による E5 ペプチドの膜破壊活性の光制御.

4.2. 実験項

4.2.1. 材料・機器

E5 ペプチドは株式会社ハイペップ研究所から購入した。E5 の配列は、*H*-GLFEAIAEFIEGGWEGLIEG-*OH* である。1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC) と N-(carboxymethoxypolyethyleneglycol)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (PEG2KDSPE) は日油株式会社から購入した。N-(Lissamine rhodamine B sulfonyl)-1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (LR-DOPE) は Avanti Polar Lipids, Inc. から得た。その他の試薬は、東京化成工業株式会社、富士フィルム和光純薬株式会社、関東化学株式会社、ナカライテスク株式会社から購入した。E5 濃度をトリプトファンのモル吸光係数 ($\epsilon_{280\text{ nm}} = 5500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) を使用して UV-1650PC (島津製作所) での UV/Vis スペクトル測定によって算出した。円二色性 (CD) スペクトル測定を JASCO J-820 CD 分光計により行った。UV LED 照明器 (波長: $310 \pm 5\text{ nm}$, LSP7NUV310-0024、アイテックシステム株式会社) を用いて光照射を行った。リポソームの画像は共焦点スキャナユニット (CXU-X1, 横河電機) でスキャンされた。共焦点顕微鏡 (IX71, Olympus) には、EMCCD カメラ (iXon+ 893, Andor) と 100 倍の対物レンズ (UPlanSApo NA 1.4, Olympus) が備えられている。

4.2.2. 円二色測定

10 mM Tris-HCl (pH 7.4, 140 mM NaCl) 中で E5 ($5\text{ }\mu\text{M}$) を共重合体 ($50\text{ }\mu\text{M}$, allylamine unit) と $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 分間インキュベートした。MG-PAA-g-PEG を 1 分間光照射した後、E5 溶液に加えた。CD スペクトルを JASCO J-820 CD で記録した。示されている各スペクトルは、 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 1 nm の帯域幅、 100 nm/min で取得され、 1 nm の解像度で 8 回のスキャンの平均を表す。E5 のヘリシティを、先行研究に従って計算した¹³。

$$\text{helicity (\%)} = -\frac{\theta_{222} + 2340}{30300} 100$$

4.2.3. 単層巨大リポソーム (GUV) の調製

GUV (Giant unilamellar vesicle) は湊元らによって報告された逆相法により調製した¹⁴。ジエチルエーテルに溶解した DOPC、クロロホルムに溶解した DSPE-PEG と LR-DOPE をそれぞれ、98.4 mol%、1.4 mol% と 0.2 mol% (total 500 μ L) となるように調整し、脂質溶液に内水相として 10 mM HEPES buffer (pH 7.4, 90 mM NaCl, 100 mM sucrose) を 500 μ L 加えた。激しく混合した後 (ボルテックス 1 分間→超音波 4 分間→ボルテックス 1 分間)、得られた water/oil エマルジョンを 20 °C で 1 分間遠心分離 (20000 $\times$ g) を行った。上層の有機層を取り除き、得られたベシクルを、外水相として buffer A (10 mM HEPES buffer (pH 7.4, 140 mM NaCl)) で 3 回以上洗浄した後、buffer A 中に懸濁した。懸濁液中のベシクルの濃度を、LabAssay™ Phospholipid (和光純薬工業株式会社) を用いて決定した。

4.2.4. リポソーム形態観察

E5 ペプチド (3 μ L, 120 μ M) を GUV 懸濁液 (6 μ L, 1mM) に加え、続いて非照射および光照射された MG-PAA-*g*-PEG (3 μ L, 0.6 – 3.6 mM, allylamine units) を加え、37 °C で 10 分間インキュベートした。その後、カバースリップに混合溶液を滴下し、リポソーム形態を共焦点顕微鏡で観察した (励起波長: 561 nm)。Poly(vinyl sulfonate) (PVS) による 9MG9P と E5 の解離実験 (Figure 4.12) では、上記同様に GUV に E5 を加え、光照射された 9MG9P (1.5 μ L, 2.4 mM, allylamine unit) を加え、37 °C で 10 分間インキュベートした。混合溶液に poly(vinylsulfonic acid) (PVS) (1.5 μ L, 4.8 mM, sulfonate unit) を加え、37 °C で 1 分間インキュベートした後リポソーム形態を観察した。

in situ 実験 (Figure 4.18) においては、GUV 懸濁液 (12 μ L, 1mM) に E5 ペプチド (6 μ L, 120 μ M) を 37 °C で 5 分間インキュベートした。GUV と E5 の混合溶液を非照射 MG-PAA-*g*-PEG (6 μ L, 0.6 – 3.6 mM, allylamine units) と 37°C で 5 分間インキュベートした。混合溶液を半分に分け、1 つは 310 nm で 1 分間光照射し、5 分間インキュベートした。もう 1 つは光照射なしで 6 分間インキュベートした。処理したリポソーム形態を観察した。

脂質シートの割合は、10 視野の画像から全脂質集合体 (≥ 300 個) と脂質シートの数をカウントして算出された (脂質シート数/全ての脂質集合体数 $\times 100$)。リポソーム形態観察に関して、全て buffer A 中で行われた。

4.2.5. MG-PAA-*g*-PEG のミセル形成評価

Buffer A に溶解させた MG-PAA-*g*-PEG (198 μL) に DMSO に溶解させたピレン (2 μL) を加え、ボルテックスで激しく攪拌させた後に、JASCO-FP6500 により蛍光スペクトルを測定した (励起波長: 336 nm, 励起バンド幅: 5 nm, 蛍光バンド幅: 1nm, 測定波長範囲: 350 – 500 nm)。 I_1/I_3 において、 I_1 は 373 nm、 I_3 は 384 nm の蛍光強度を用いた。臨界ミセル濃度は、 I_1/I_3 の減少を示さない濃度のプロットを用いて引いた近似直線と、 I_1/I_3 の減少を示す濃度のプロットを用いて引いた近似直線の接点である。

4.2.6. リポソーム膜の透過性評価

E5 ペプチド (3 μL , 120 μM) を GUV 懸濁液 (6 μL , 1mM) に加え、続いて非照射および光照射された MG-PAA-*g*-PEG (1.8 μL) を加え、Lucifer yellow CH dilithium salt (LY) (1.2 μL , 10 mg/ mL) を加え、37°C で 10 分間インキュベートした。共焦点顕微鏡を用いて、561 nm の励起光で脂質膜を、488 nm の励起光で LY を観察した。Buffer は全て buffer A を用いた。

4.3. 結果と考察

4.3.1. MG-PAA-*g*-PEG が E5 の構造に与える影響

第4章では、MG-PAA-*g*-PEG の膜破壊活性 E5 ペプチドに対する光応答性シャペロンとしての機能を調査した。まず、MG-PAA-*g*-PEG が E5 ペプチドの高次構造に与える影響を円二色測定 (CD 測定) により評価した。中性 pH で、E5 は静電反発によりランダムコイル構造をとる⁴。カチオン性くし型共重合体、PAA-*g*-Dex の添加によって、E5 のヘリックス構造へのフォールディングを促進することが明らかになっている⁶。本項では、MG 修飾カチオン性くし型共重合体の E5 のフォールディング能と MG 部位の光誘導イオン化が E5 の高次構造に与える影響を調査した。Figure 4.3 に示したように、pH 7.4 では E5 は非構造であるが、PAA-*g*-PEG の存在下では、先行研究と同様に E5 はらせん構造をとっていた。⁶ PAA-*g*-PEG または非照射 MG-PAA-*g*-PEG の存在下 (cation/anion (C/A) = 1.67) において、E5 の CD スペクトル上に 210 nm ~ 230 nm の波長領域に負の CD シグナルが観測された。このバンドは、 α -ヘリックス構造由来に帰属される。PAA-*g*-PEG、非照射 9MG9P と非照射 21MG9P の添加時の E5 のヘリシティは、15%、13%および 5%であった。共重合体の MG 修飾量に応じて E5 のヘリシティが減少しており、MG 修飾は共重合体の E5 に対するフォールディング能を低下させることがわかった。

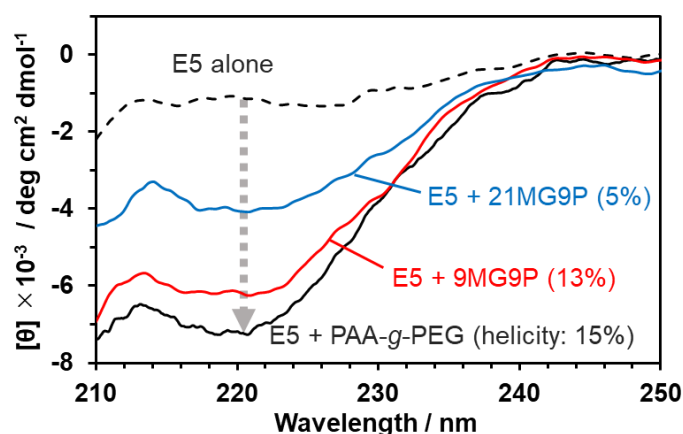


Figure 4.3. CD spectra of 5 μ M E5 peptide incubated without or with PAA-*g*-PEG, nonirradiated 9MG9P and 21MG9P (50 μ M, allylamine units) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, 140 mM NaCl) for 10 min at 37 $^{\circ}$ C.

光誘導イオン化による E5 の構造の影響を調べるために、E5 に光照射された MG-PAA-*g*-PEG を添加した際の CD スペクトル測定を行った。9MG9P および 21MG9P において、非照射共重合体と光照射した共重合体の添加した際の CD スペクトルの間に明らかな違いは観察されなかった (Figure 4.4)。これらの結果は MG-PAA-*g*-PEG の MG ユニットのカチオン化が E5 のフォールディングに関与しないことを示唆している。

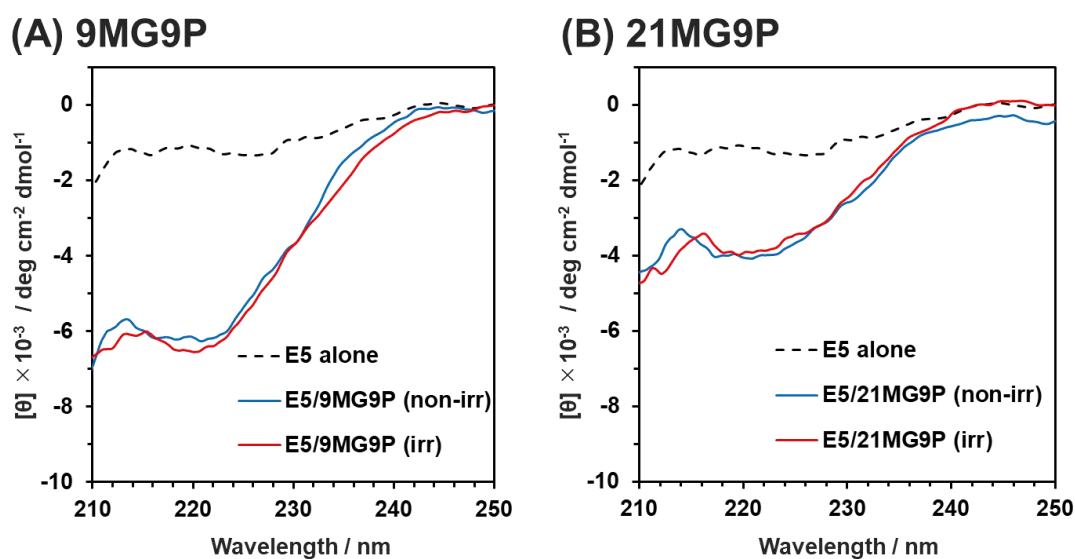


Figure 4.4. CD spectra of 5 μ M E5 peptide incubated with nonirradiated or photoirradiated (A) 9MG9P and (B) 21MG9P (50 μ M, allylamine units) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, 140 mM NaCl) for 10 min at 37 $^{\circ}$ C.

4.3.2. MG-PAA-*g*-PEG が E5 の膜破壊活性に与える影響

前項では、MG-PAA-*g*-PEG の MG 部位の光変換が E5 の構造に影響を与えないことを確認した。次に単層巨大リポソーム (GUV) をモデル膜として、MG-PAA-*g*-PEG の E5 ペプチドの膜破壊活性に対するシャペロン活性を調査した。先行研究より PAA-*g*-Dex (または PAA-*g*-PEG) と E5 の複合体がリポソーム形態を球状のベシクル構造からシート状に転移させることを報告した⁸。そこで本項では GUV の形態変化の観察により、E5 の膜破壊活性を評価することにした。蛍光ラベルされた GUV に E5 と共重合体 (C/A:0.83–5) を添加し、10 分間インキュベートした後に、共焦点顕微鏡により脂質膜形態を観察した (Figure 4.5)。PAA-*g*-PEG の添加では 300 μ M 以上の濃度 (allylamine unit) において全ての脂質膜がベシクルからシート構造に変換される (Figure 4.6A)。Figure 4.6B-D の上段には、非照射 MG-PAA-*g*-PEG と E5 を GUV 懸濁液に加えた時の脂質膜形態を示した。PAA-*g*-PEG と比較し、非照射 MG-PAA-*g*-PEG の添加時ではベシクル構造が多く存在した。光照射 (310 nm, 1 分間, 10 mW) された MG-PAA-*g*-PEG と E5 を GUV 懸濁液に添加した際の脂質形態の画像を Figure 4.6B-D の下段に示した。興味深いことに、光照射された 9MG9P ではベシクルからシートへの構造転移を誘導し ($\geq 300 \mu$ M, allylamine unit)、光照射された 21MG9P および 41MG9P では、観察した濃度範囲脂において質膜のシートへの形態変化は観察されなかった。E5 濃度 30 μ M に対して様々な共重合体濃度を添加した際に観察されたシートの割合を Figure 4.7 に示した。MG 修飾に依存してシート形成率の低下が見られ、MG 修飾によって E5 の膜破壊活性が阻害されることが確認された。一方、9MG9P のみ光照射によって PAA-*g*-PEG に近い活性を示した。

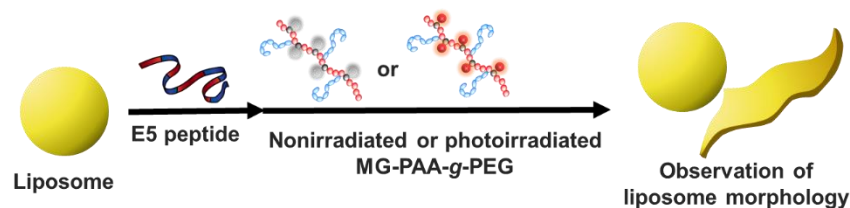


Figure. 4.5. Schematic of the morphological conversion of lipid membranes induced by MG-PAA-*g*-PEG.

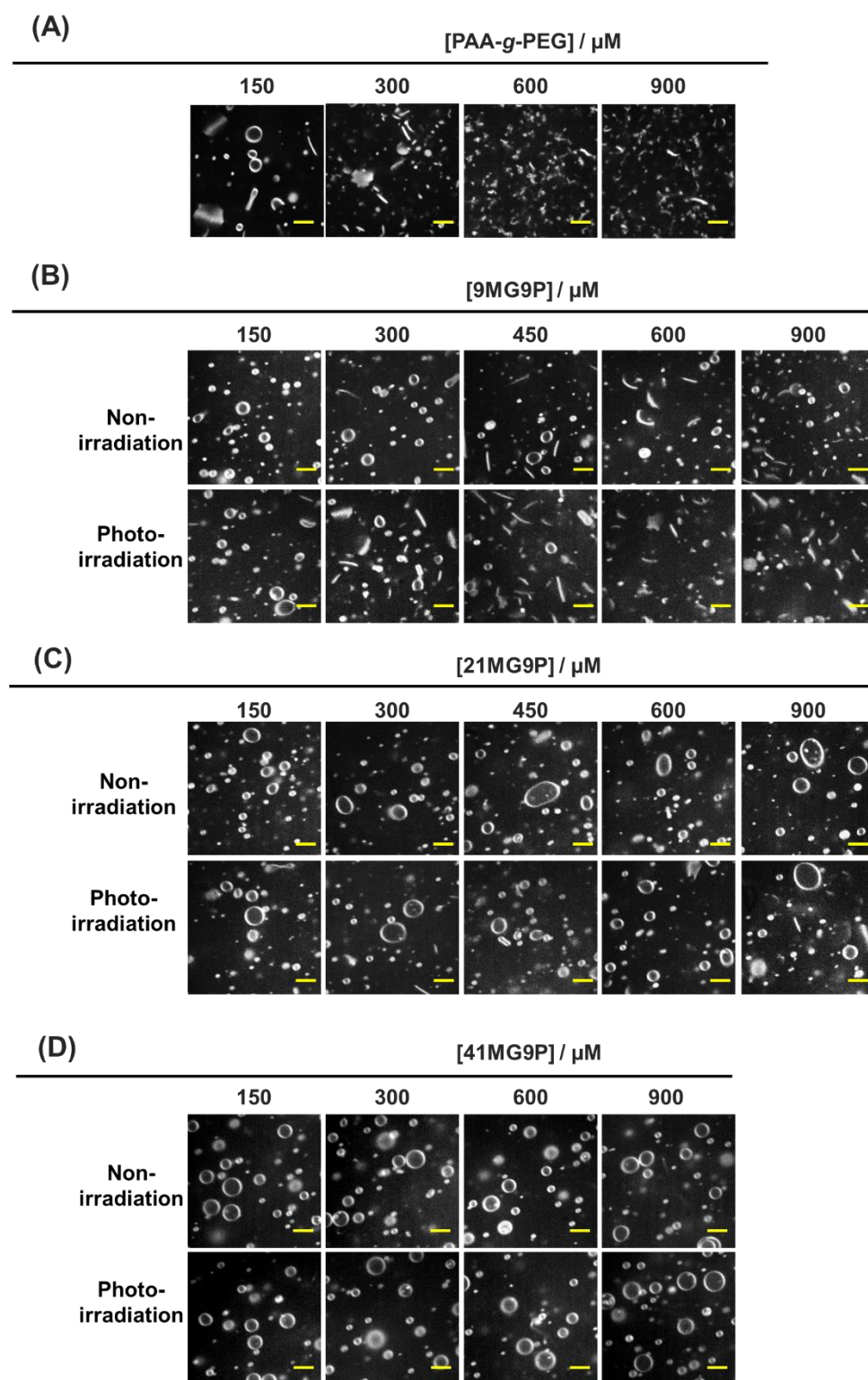


Figure 4.6. Confocal microscopic images of GUVs treated 30 μM E5 and indicated concentrations of (A) PAA-*g*-PEG, nonirradiated or photoirradiated (310 nm, 1 min, 10 mW) (B) 9MG9P, (C) 21MG9P, or (D) 41MG9P in 10 mM HEPES buffer (pH 7.4, 140 mM NaCl) for 10 min at 37 °C. Scale bars: 5 μm .

特に、9MG9P 濃度が 300 μM では、光照射によってシート形成率が約 60%と大幅に増加した。9MG9P 単体や E5 単体では、光照射によって大きな形態変化は見られないため (Figure 4.8)、9MG9P/E5 による脂質膜の形態変換は光照射に起因することがわかる。

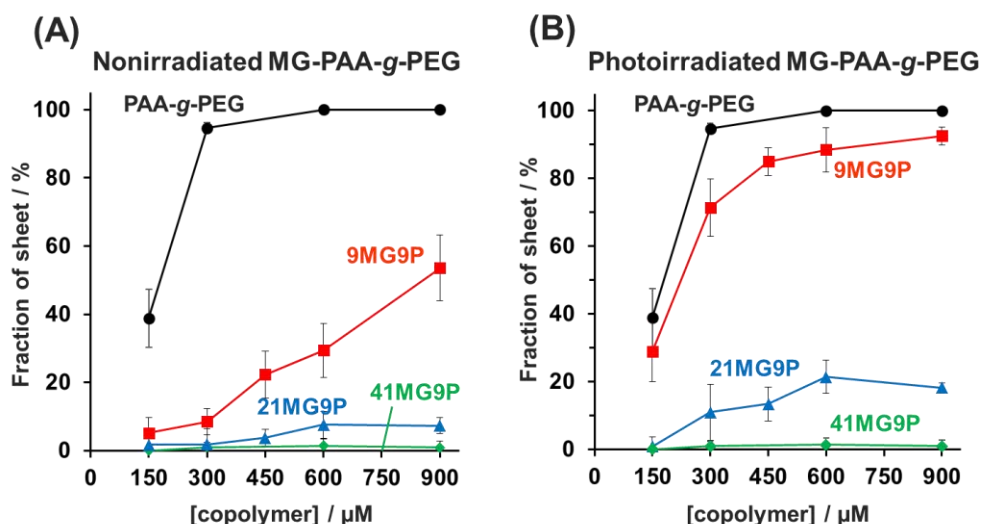


Figure 4.7. Percent lipid in sheets when GUVs were treated with 30 μM E5 over a range of concentrations of (A) nonirradiated or (B) photoirradiated MG-PAA-g-PEG in 10 mM HEPES (pH 7.4), 140 mM NaCl for 10 min at 37 °C.

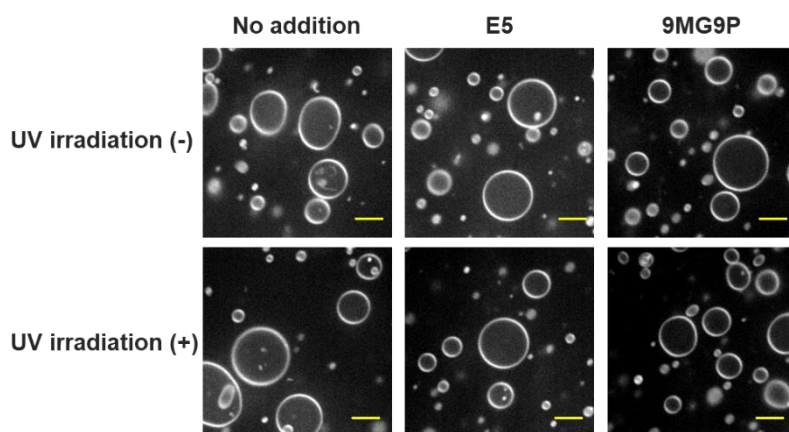


Figure 4.8. Confocal microscopic images of GUVs mixed without and with 30 μM E5 alone or 900 μM 9MG9P alone (in allylamine unit) in 10 mM HEPES buffer (pH 7.4, 140 mM NaCl) were nonirradiated or irradiated at 310 nm for 1 min. Scale bars: 5 μm .

次に 9MG9P による E5 の膜破壊活性を光照射条件で制御できるかを検討した。E5 で処理された GUV 懸濁液に、様々な時間 (0-60 秒, 10 mW) および強度 (60 秒, 0-10 mW) で光照射された 9MG9P を添加し、リポソーム形態を観察した。**Figure 4.9** に示したように照射時間や照射強度に応じて脂質シート割合の増加が見られた。これらの結果は 9MG9P が光照射条件によって、E5 活性を操作可能であることを示唆する。

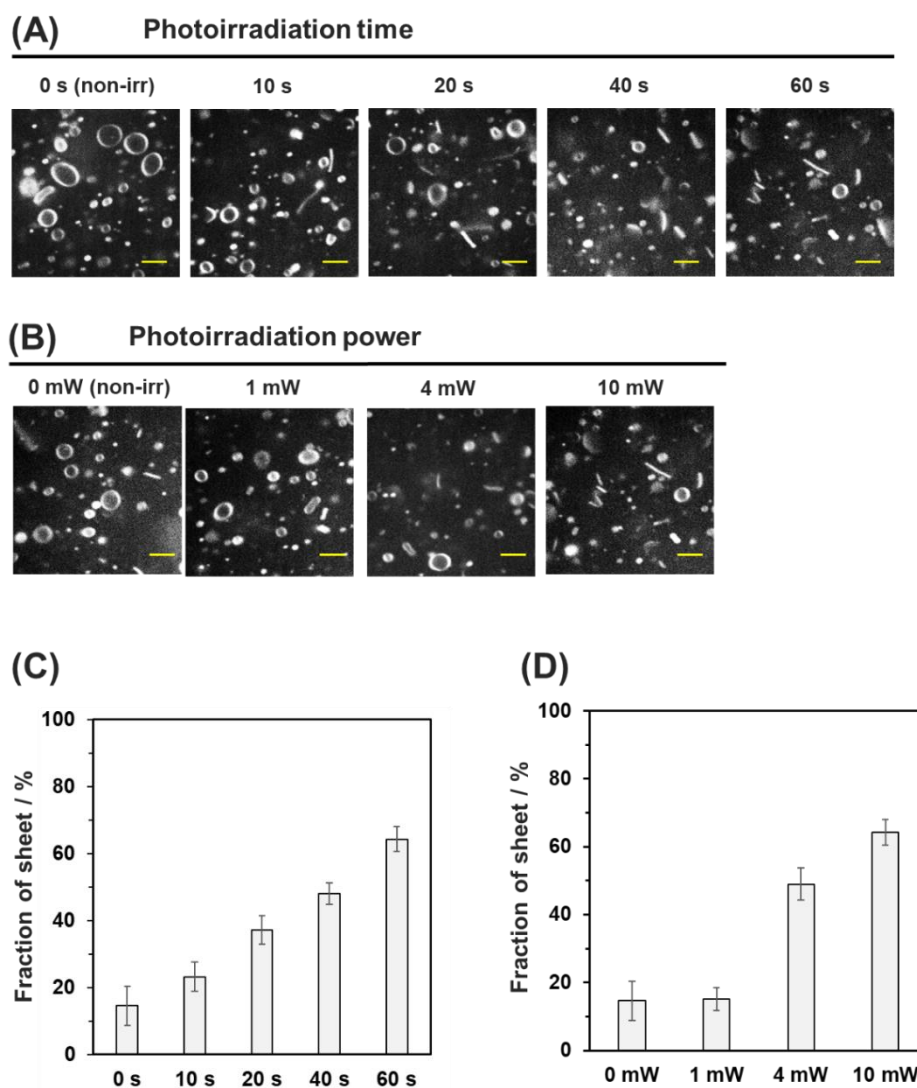


Figure 4.9. (A and B) Confocal microscopic images of GUVs treated 30 μ M E5 and 300 μ M 9MG9P photoirradiated at various A) times or B) powers in 10 mM HEPES buffer (pH 7.4, 140 mM NaCl) for 10 min. Scale bars: 5 μ m. Percent lipid in sheets as a function of (C) photoirradiation time or (D) photoirradiation power.

4.3.3. MG-PAA-*g*-PEG の疎水性・ミセル形成評価

MG-PAA-*g*-PEG による脂質膜の形態変化のメカニズムを調査した。まず、9MG9P、21MG9P および 41MG9P の挙動の違いについて着目した。MG-PAA-*g*-PEG の中で、9MG9P が光照射の有無に関わらず、濃度依存的にシャペロン活性が増加するが、21MG9P と 41MG9P では濃度増加させてもシャペロン活性は増加しなかった (Figure 4.7)。この挙動の違いには、疎水性度が関与していると推測した。そこで、MG-PAA-*g*-PEG の疎水性度を評価するために、ピレンの蛍光特性を利用した。ピレンの蛍光スペクトルにおいて、第 1 ピークの蛍光強度 (I_1) と第 3 ピークの蛍光強度 (I_3) の比 I_1/I_3 は、ピレン周囲の溶液極性に依存しており、 I_1/I_3 値が低いほど疎水性環境であることを示す¹⁵。ピレンの I_1/I_3 は、両親媒性マテリアルの会合・凝集評価でよく用いられる^{16,17}。

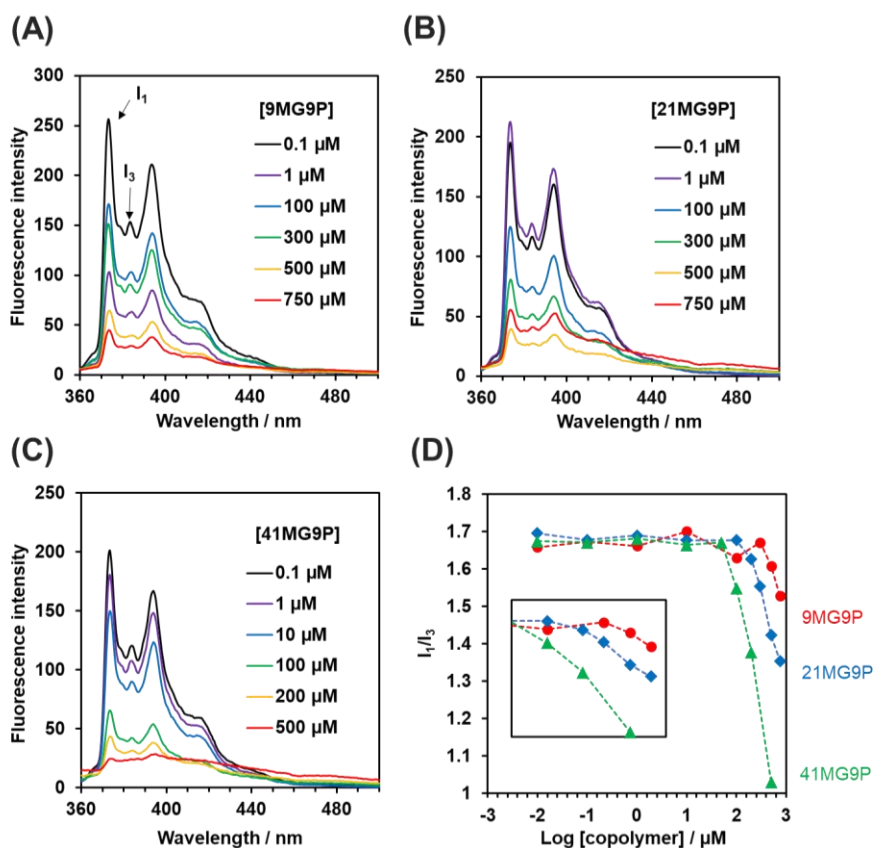


Figure 4.10. (A-C) Fluorescence emission of 0.5 μM pyrene in the presence of MG-PAA-*g*-PEGs in 10 mM HEPES buffer (pH 7.4, 1% DMSO, 140 mM NaCl). Excitation at 336 nm. (D) Plot of the ratio of fluorescence intensity at 373 and 384 nm ($I_{373}/I_{384} = I_1/I_3$) vs the concentration of MG-PAA-*g*-PEGs (allylamine unit).

Figure 4.10A-C に MG-PAA-*g*-PEG の存在下におけるピレンの蛍光スペクトルを示した。21MG9P と 41MG9P 存在下でのピレンの蛍光スペクトルでは、共重合体の高濃度 (500~750 μM) において 450-500 nm の範囲にわずかにエキシマー蛍光が観測された。エキシマー蛍光もまたピレンの周囲環境が疎水性を示す指標であり¹⁸、21MG9P や 41MG9P が MG 部位を疎水コアとしてミセル形成することを示唆する。共重合体濃度 (allylamine unit) の対数に対してピレンの I_1/I_3 をプロットしたところ、濃度増加により I_1/I_3 の減少が見られた (Figure 4.10D)。 I_1/I_3 のプロットの変曲点から、臨界ミセル濃度 (CMC) を算出したところ、9MG9P、21MG9P と 41MG9P の CMC は、それぞれ 395 μM 、163 μM と 72 μM であり、MG 修飾量に依存した。リポソーム形態観察の実験において、21MG9P または 41MG9P のミセル形成を介して、E5 が凝集し、膜破壊活性が低下したと考えられる。9MG9P の高濃度 (750 μM) における I_1/I_3 の減少量は、21MG9P や 41MG9P と比較すると小さい。そのため、先の実験条件では 9MG9P はミセル形成しづらく、E5 の膜破壊活性を誘導したと考えられる。

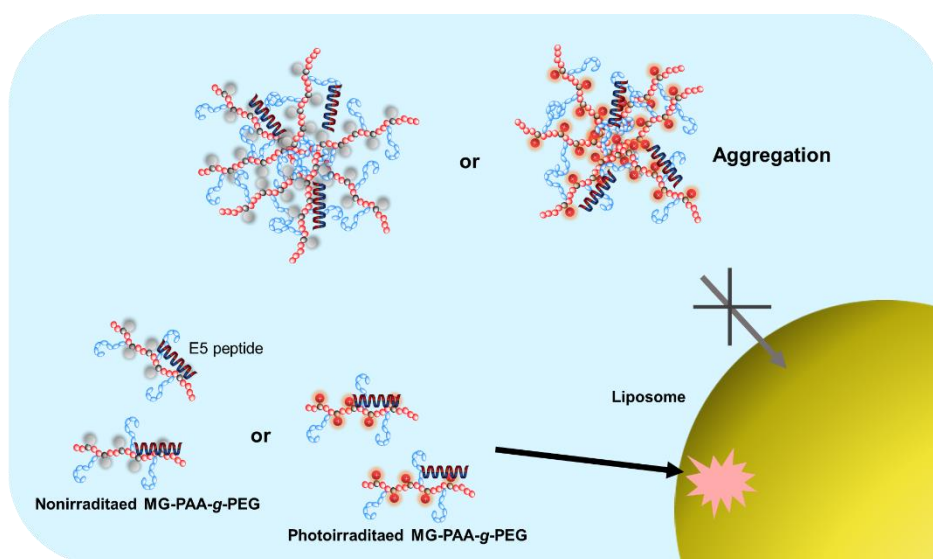


Figure 4.11. Illustration of interaction of MG-PAA-*g*-PEG/E5 with lipid membrane.

4.3.4. MG-PAA-*g*-PEG と E5 の相互作用

次に 9MG9P によるリポソーム形態変化について考察した。まず、光照射された 9MG9P によるリポソーム形態変化には、9MG9P と E5 の静電的な複合体形成が重要であると予想される。そこで共重合体と E5 の複合体形成の駆動力である静電相互作用を解消するために、阻害剤としてアニオン性ポリマーである poly(vinylsulfonic acid) (PVS) を用いた。GUV 懸濁液に E5 と光照射された 9MG9P を加え脂質をシートへ変換した後に、共重合体に対して過剰量の PVS を添加したところ、シートからベシクルへの復帰が観察された (Figure 4.12)。この結果は、共重合体が PVS にトラップされ、E5 が共重合体から解離したことに起因する。そのため、リポソーム形態変化には 9MG9P と E5 と複合体を形成することが必須であることがわかる。

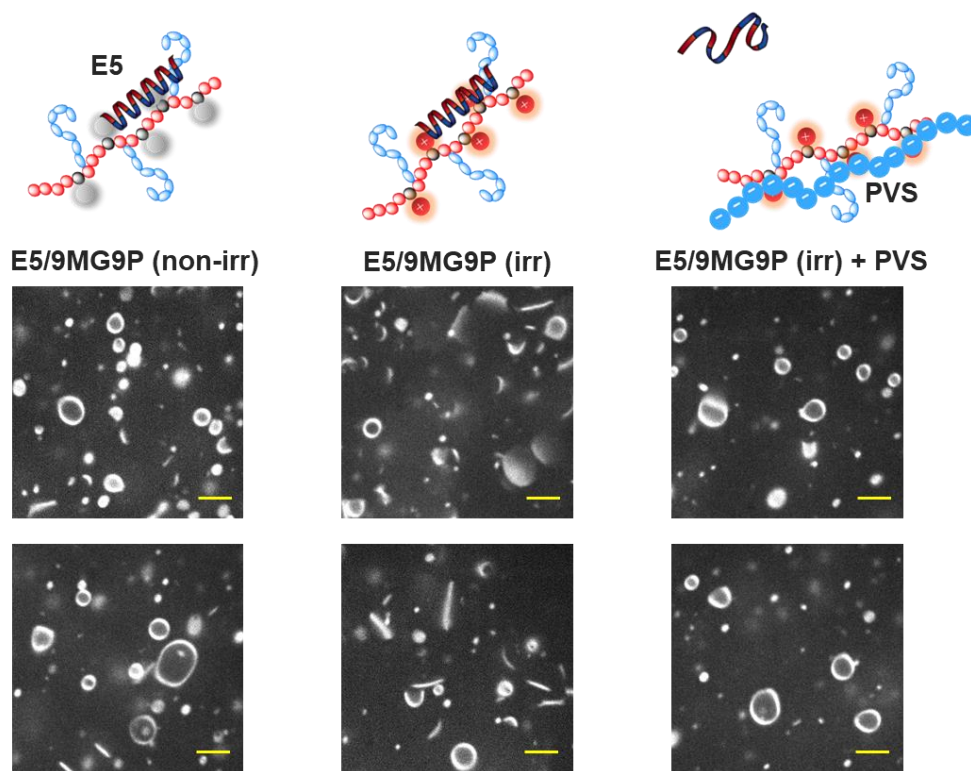


Figure 4.12. Confocal microscopic images of GUVs treated with (A) nonirradiated 9MG9P/E5, (B) photoirradiated 9MG9P/E5, or (C) photoirradiated 9MG9P/E5 and PVS in 10 mM HEPES buffer (pH 7.4, 140 mM NaCl).

リポソーム形態変化観察 (**Figure 4.8**) では、9MG9P の 300 μM において、光照射された共重合体が、非照射共重合体よりも顕著に E5 の膜破壊活性が見られた。興味深いことに、9MG9P と E5 の濃度比 ($C/A = 1.67$) が同じ条件における CD 測定から、光照射に有無に関わらず 9MG9P が E5 の α -ヘリックスへの転移を促進することがわかった (**Figure 4.4A**)。光照射による E5 の膜破壊活性の向上には、E5 の構造転移が関係していないことから、MG 構造変化は、9MG9P とヘリックス構造の E5 の相互作用に影響を与えていると推測した。そこで、9MG9P および E5 の相互作用を E5 のトリプトファン残基 (Trp¹⁴) の蛍光から分析することにした。高次構造形成によって Trp が残基が内部に潜りこみ、Trp の周囲が疎水性環境になることで Trp の蛍光スペクトルがブルーシフトすることが知られている¹⁹。E5 の Trp 残基の蛍光波長から E5 と 9MG9P の相互作用を調査できると考えた。**Figure. 4.13A** に示したように、PAA-*g*-PEG の添加によって、E5 の Trp の蛍光波長は 354 nm か 343 nm へ短波長側にシフトした。この Trp 残基の蛍光スペクトルのブルーシフトは、ランダムコイルからヘリックスへの E5 の構造転移に起因する。一方、非照射 9MG9P を添加

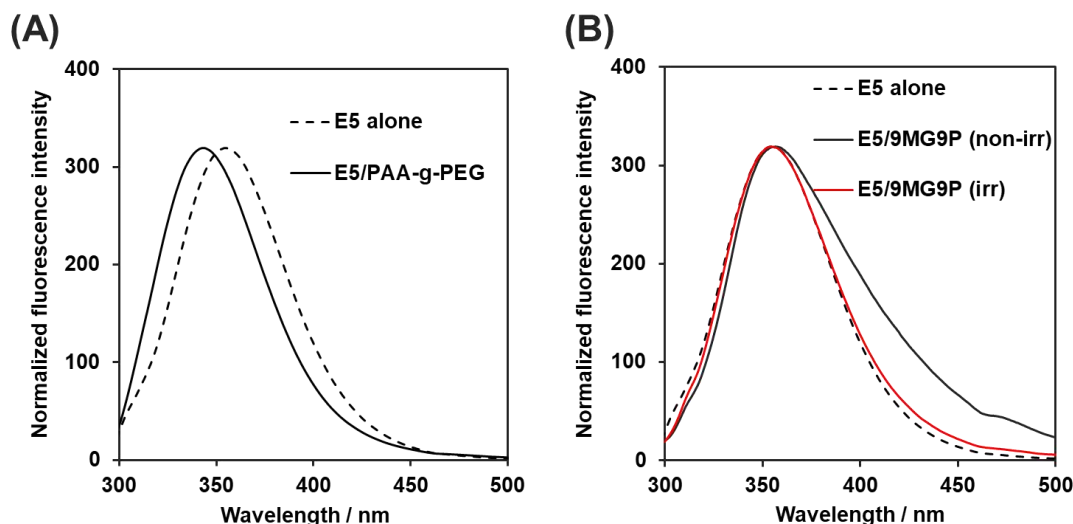


Figure 4.13. Fluorescent spectra of tryptophan of E5 (30 μM) in the absence or presence of copolymers (300 μM , allylamine unit) in 10 mM HEPES buffer (pH 7.4, 140 mM NaCl). (A) PAA-*g*-PEG and (B) nonirradiated or photoirradiated 9MG9P.

したところ、ブルーシフトは見られず、長波長側にブロードした蛍光スペクトルが観測された (**Figure 4.13B**)。CD 測定から E5 は非照射 9MG9P によってヘリックス構造に誘導されることがわかっているため、Trp 残基の蛍光の長波長への広がりには周囲の極性によるものではなく、Trp 残基と MG 部位の π - π スタッキングや疎水性相互作用といった相互作用によるものではないかと考えられる。光照射された 9MG9P の添加では、蛍光スペクトルのブロードは見られず、E5 単体の蛍光波長 (354 nm) と同じであった。この結果は、光照射によって MG の構造変換が MG 部位と Trp 残基の相互作用に何らかの影響を及ぼしたことを示唆する。これらの結果から 9MG9P/E5 複合体の膜破壊活性は、MG 部位と E5 の Trp 残基の相互作用が関与しており、MG 部位のカチオン化が相互作用に影響を与え、E5 の活性が変化すると考えられる。

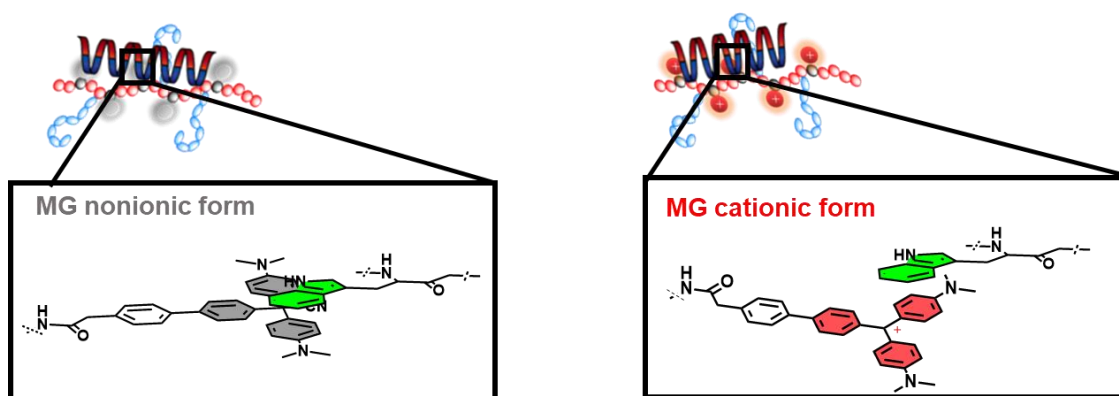


Figure 4.14. Illustration of the interaction of MG-PAA-*g*-PEG with E5 peptide.

4.3.5. MG-PAA-*g*-PEG/E5 の脂質膜への相互作用

MG-PAA-*g*-PEG の E5 膜破壊活性発現には、ミセル形成の有無、静電相互作用、 π - π 相互作用が関わっていることがわかった。次に、MG-PAA-*g*-PEG/E5 と脂質膜の相互作用に着目した。9MG9P (300 μ M) は光照射されることで、E5 の膜破壊活性を高めリポソーム形態変化を促すが、非照射では起こらない。非照射 9MG9P/E5 が脂質膜に作用しないのか、または作用するにも関わらずシートへ変換しないのかが明らかではない。これを確認するために、リポソーム膜の透過性を、蛍光色素である Lucifer yellow CH dilithium salt (LY) を用いて評価した。リポソーム懸濁液に LY を加えた場合、リポソーム内に LY は透過しないため、内側が黒くぬける (Figure 4.15A)。一方、非照射 9MG9P と E5 の添加では

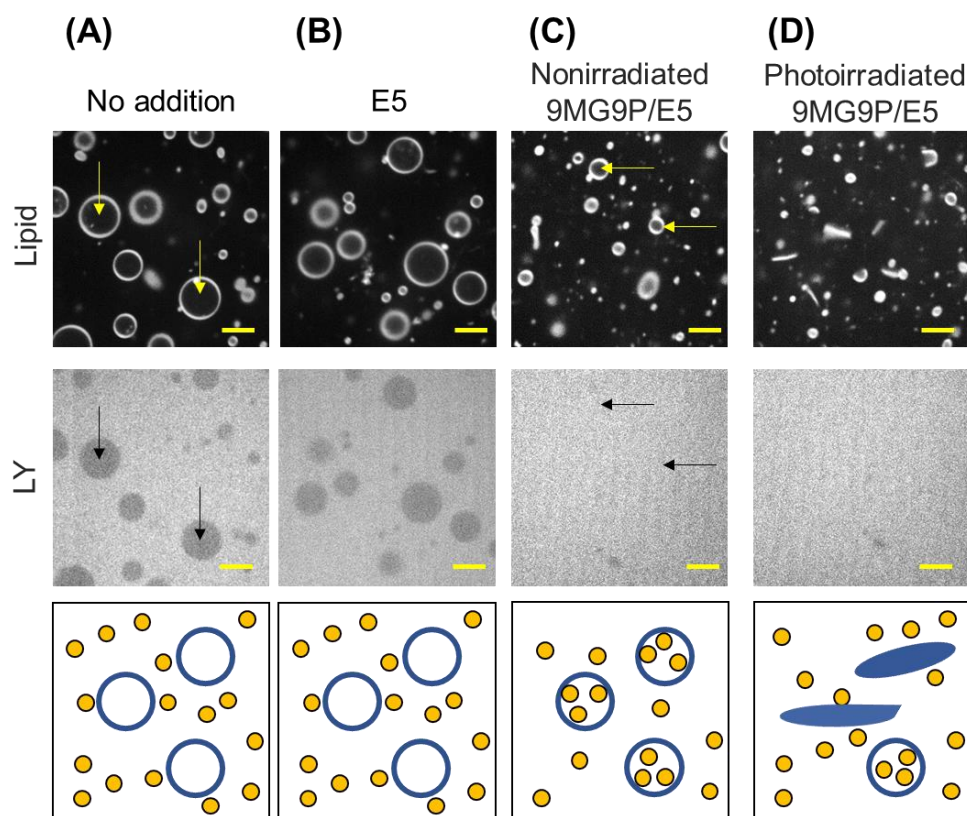


Figure 4.15. (A-D) Confocal microscopic images of A) GUVs in a buffer containing LY. Images of GUVs treated with B) E5 alone, C) nonirradiated 9MG9P/E5 or D) photoirradiated 9MG9P/E5. Buffer for all experiments was 10 mM HEPES (pH 7.4), 140 mM NaCl. Lipid: excitation at 561 nm, LY: excitation at 488 nm. Scale bar: 5 μ m.

黒ぬけがないため LY がリポソーム膜を透過していることがわかる (Figure 4.15C)。リポソームに E5 のみを加えても透過性を示さないため (Figure 4.15B)、LY の透過は非照射 9MG9P/E5 によって引き起こされたといえる。無処理のリポソームの粒径と比較して、9MG9P/E5 で処理したリポソームの粒径は小さいことから、複合体が脂質膜に作用し、ポア形成していることが考えられる。すなわち、非照射 9MG9P/E5 はリポソーム形態転換を誘導しないが、脂質膜に作用し不安定化する。他の 2 つの MG-PAA-*g*-PEG 存在下におけるリポソームの透過性を評価したところ、41MG9P は全く透過性が見られず、21MG9P は濃度増加によって透過性を示した (Figure 4.16)。

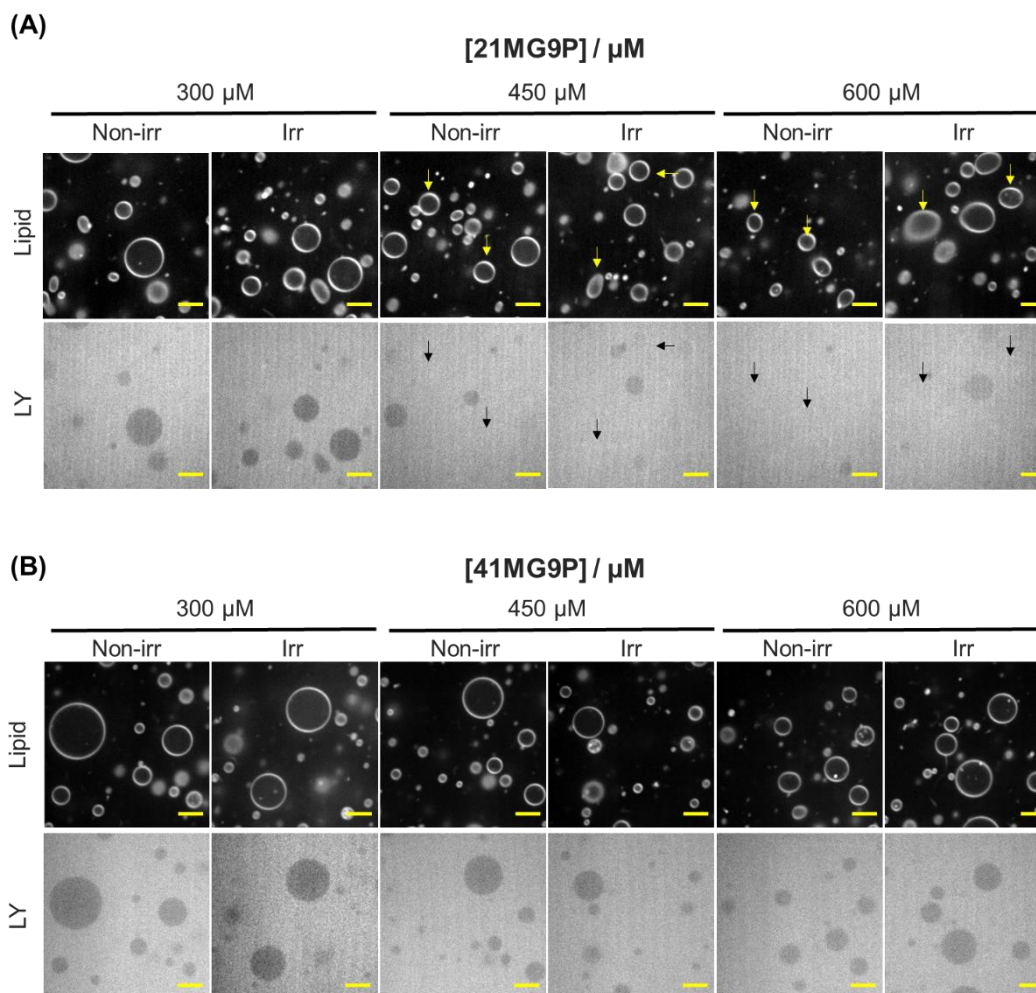


Figure 4.16. Confocal microscopic images of GUVs treated with E5 and nonirradiated or photoirradiated MG-PAA-*g*-PEGs in a buffer containing LY. Buffer for all experiments was 10 mM HEPES (pH 7.4), 140 mM NaCl. Lipid: excitation at 561 nm, LY: excitation at 488 nm. Scale bar: 5 μm .

シート状の脂質二重層は、シートの端の疎水性の脂質尾部（エッジ）が水にさらされるため、水溶液中では熱力学的に不安定であり、自発的にベシクルに折りたたまれる。先行研究では、E5 がカチオン性くし型共重合体によって膜破壊構造に誘導され、ポアを形成し、脂質膜エッジに集積することで、シート構造を安定化することを報告した^{8,10}。CD 測定、Trp 残基の蛍光分析およびリポソーム膜の透過性評価の結果から、9MG9P/E5 の光照射によるリポソームのシートへの変換において以下のことが考えられる。9MG9P は光照射の有無に関わらず、E5 の膜破壊活性を誘導し、リポソーム膜にポア形成を促す。光非照射の場合、ポア形成によって生じた脂質膜のエッジに、9MG9P/E5 が集積せず、シート構造を形成しない。一方、MG 部位の光誘導カチオン化によって 9MG9P/E5 は脂質膜のエッジに集積し、脂質膜のエッジと水との界面を安定化させ、シート形成を誘導する（Figure 4.17）。すなわち、MG 部位のカチオン化によって 9MG9P/E5 の脂質膜エッジへの集積を促す。詳しいメカニズムは分からないが、脂質膜上の E5 の局在変化には、MG 部位と Trp 残基の相互作用が関わっていると推測している。9MG9P は、光を介して E5 の脂質膜エッジへの集積を手助けする光応答性シャペロンであると言える。

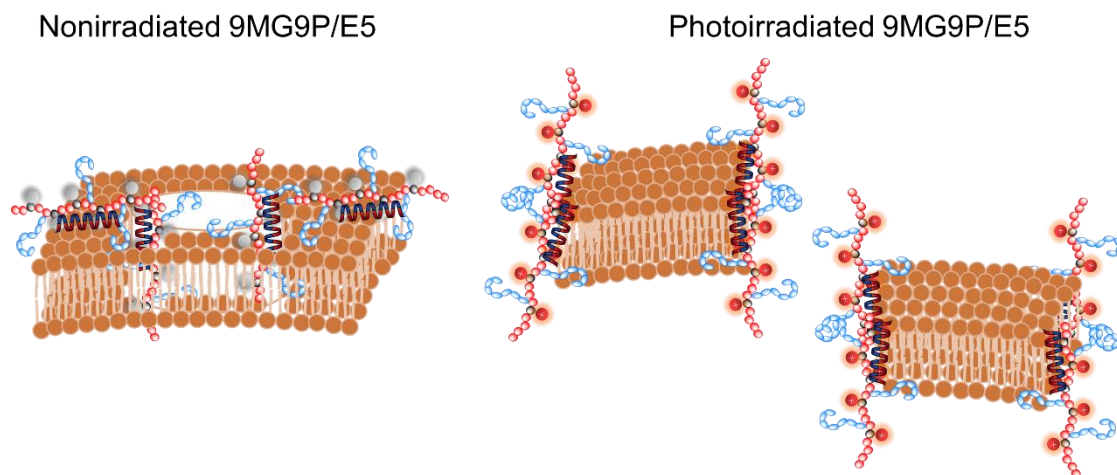


Figure 4.17. Localization on the lipid membrane of nonirradiated and photoirradiated 9MG9P/E5.

4.3.6. MG-PAA-*g*-PEG による E5 の *in situ* 光応答活性

最後に MG-PAA-*g*-PEG による E5 活性の *in situ* 光制御を検討した。これまでの実験では、予め光照射された MG-PAA-*g*-PEG を、E5 で処理されたリポソームに添加していたため、ここではリポソームを E5 と非照射 MG-PAA-*g*-PEG で処理し、混合溶液に 1 分間光照射を行った後に、共焦点顕微鏡でリポソーム形態を観察した。試験した濃度範囲の 9MG9P (300-900 μ M, allylamine unit) の存在下で、光照射による脂質シートの形成率の優位な増加が観察されたが、21MG9P または 41MG9P の存在下では脂質膜の形態変換は観察されなかった (Figure 4.19A-C)。これらのデータは先の実験結果 (Figure 4.6) と一致した。特に、300 μ M の 9MG9P では、光照射によってシートの割合が 40%増加した (Figure. 4.19D)。従って、9MG9P が光応答性シャペロンとして機能することがわかった。

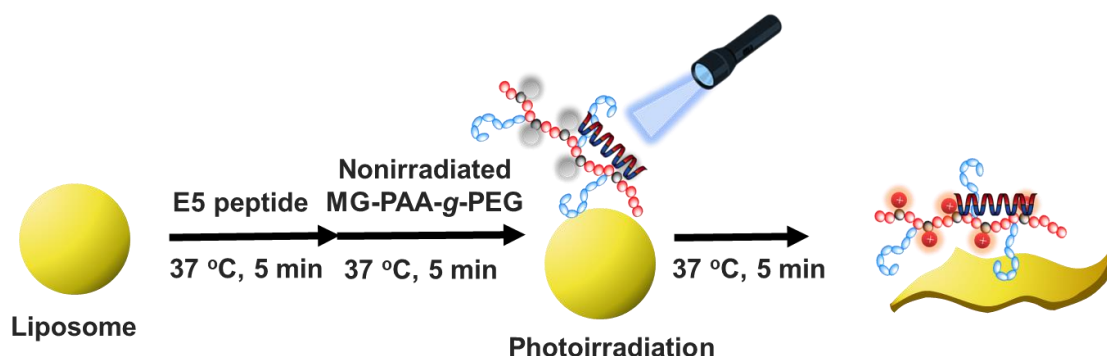


Figure 4.18. Schematic of the morphological photoconversion of lipid membranes induced by MG-PAA-*g*-PEG.

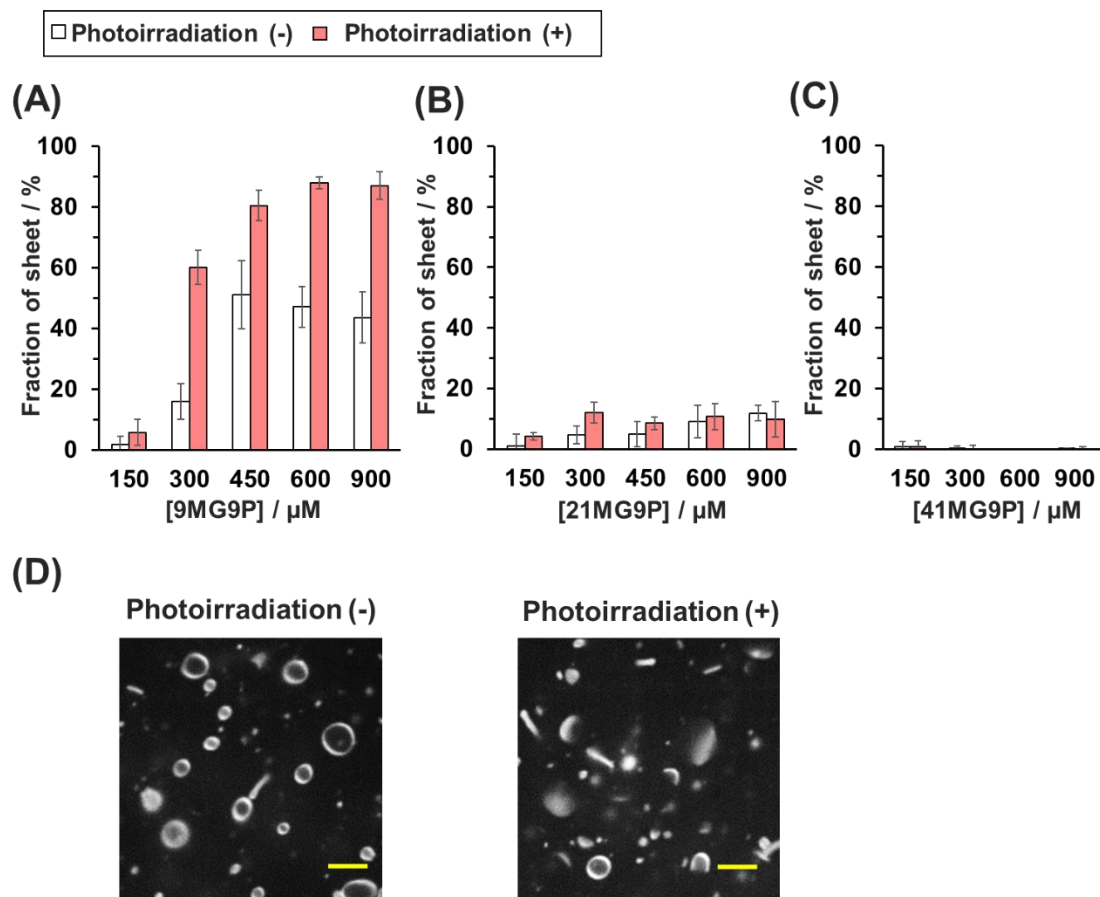


Figure 4.19. (A-C) The percentage of lipid in sheets when GUVs were treated with 30 μM E5 peptide and indicated concentrations of A) 9MG9P, B) 21MG9P, and C) 41MG9P were nonirradiated or photoirradiated at 310 nm for 1 min. (D) Confocal microscopic images of GUVs mixed with 30 μM E5 and 300 μM 9MG9P (in allylamine units) and photoirradiated at 310 nm or not for 1 min. Scale bars: 5 μm . Buffer for all experiments was 10 mM HEPES (pH 7.4), 140 mM NaCl.

4.4. 結言

本章では、第 3 章で合成した MG-PAA-*g*-PEG の光応答性シャペロンとしての機能を、膜破壊活性 E5 ペプチドを対象にして評価を行った。CD スペクトル測定により MG-PAA-*g*-PEG の E5 の高次構造への影響を調べたところ、MG 修飾によって共重合体のフォールディング能が減少することや、MG 部位の光誘導カチオン化が E5 のフォールディングに影響を与えないことがわかった。E5 の膜破壊活性を評価するためにリポソーム形態変化の観察を行ったところ、3 つの MG-PAA-*g*-PEG の中で 9MG9P のみが MG 部位の光誘導カチオン化を介して E5 の膜破壊活性に影響を与え、リポソーム形態をベシクルからシートへ転換した。その他の共重合体では光照射に関わらずシートへの転換は見られなかった。これはミセル形成によって E5 の膜破壊活性が低下することに起因すると考えられる。CD 測定やリポソームの透過性評価から、非照射 9MG9P は、E5 のヘリックス構造を誘導し、膜破壊活性によりリポソームにポアを形成する。しかし、その際に露出する脂質膜の疎水部エッジに集積しない、または安定化しないため、シート形成が引き起こされない。一方、光照射によって MG 部位がカチオン化することで、脂質膜上における 9MG9P/E5 の局在分布が変化し脂質膜のエッジに集積し、シート形成を促したと考えられる。9MG9P は、*in situ* での E5 の膜破壊の光活性も可能にし、ペプチドの活性を光制御できるスマートマテリアルであることを実証した。また、9MG9P と E5 を組み合わせることでリポソーム形態を光制御できることもわかった。このようなシステムは、DDS キャリアからの薬剤放出の時空間的制御が可能にするため、DDS 分野への応用も期待される。

4.5. 参考文献

1. Fosgerau, K.; Hoffmann, T. *Drug Discovery Today* **2015**, *20*, 122–128.
2. Kim, S.; Hyun, S.; Lee, Y.; Lee, Y.; Yu, J. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 3007–3015.
3. Subbarao, N. K.; Parente, R. A.; Szoka, F. C.; Nadasdi, L.; Pongracz, K. *Biochemistry* **1987**, *26*, 2964–2972.
4. Takahashi, S. *Biochemistry* **1990**, *29*, 6257–6264.
5. Murata, M.; Takahashi, S.; Kagiwada, S.; Suzuki, A.; Ohnishi, S. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1986–1992.
6. Shimada, N.; Kinoshita, H.; Tokunaga, S.; Umegae, T.; Kume, N.; Sakamoto, W.; Maruyama, A. *J. Control. Release* **2015**, *218*, 45–52.
7. Sakamoto, W.; Ochiai, T.; Shimada, N.; Maruyama, A. *J BIOMAT SCI-POLYM E.* **2017**, *28*, 1097–1108.
8. Shimada, N.; Kinoshita, H.; Umegae, T.; Azumai, S.; Kume, N.; Ochiai, T.; Takenaka, T.; Sakamoto, W.; Yamada, T.; Furuta, T.; Masuda, T.; Sakurai, M.; Higuchi, H.; Maruyama, A. *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1904032.
9. Masuda, T.; Shimada, N.; Maruyama, A. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 1333–1339.
10. Masuda, T.; Takahashi, S.; Ochiai, T.; Yamada, T.; Shimada, N.; Maruyama, A. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2022**, *14*, 53558–53566.
11. Prestel, A.; Heiko M. Möller, H. M. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 701–704.
12. Kim, G. C.; Ahn, J.H.; Oh, J. H.; Nam, S.; Hynn, S.; Yu, J.; Lee, Y. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 2863–2869.
13. Sakamoto, W.; Masuda, T.; Ochiai, T.; Shimada, N.; Maruyama, A. *ACS Biomater* **2019**, *5*, 5744–5751.
14. Tsumoto, K.; Hayashi, Y.; Tabata, J.; Tomita, M. *Colloid Surface A* **2018**, *546*, 74–82.
15. Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2039–2044.

16. Babinot, J.; Guigner, J. M.; Renard, E.; Langlois, V. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5364–5366.
17. Itagaki, T.; Kurihara, R.; Tanabe, K. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 3112–3115.
18. Farhangi, S.; Weiss, H. *Macromolecules* **2013**, *46*, 9738–9747.
19. Christiaens, B.; Symoens, S.; Verheyden, S.; Engelborghs, Y.; Joliot, A.; Prochiantz, A.; Vandekerckhove, J.; Rosseneu, M.; Vanloo, B. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 2918–2926.

第 5 章
結論

本論文では、マラカイトグリーン誘導体を配したカチオン性くし型共重合体を設計し、光応答性人工シャペロンとしての機能を調査した。カチオン性くし型共重合体は核酸や E5 ペプチドといったアニオン性生体高分子の構造変換や機能発現を手助けする人工シャペロンであり、核酸ナノデバイスや DDS への応用が期待されている。共重合体のシャペロン活性を時空間的に操作可能になれば、更なる用途が見出されるであろう。カチオン性共重合体の性質を光制御するため、光によってノニオン体からカチオン体に変換される MG 誘導体を共重合体に組み込み、共重合体のシャペロン活性を時空間的に操作できると考えた。

第 2 章では、カチオン性くし型共重合体に導入可能な MG 誘導体を設計・合成し、MG 誘導体の光応答性を評価した。カチオン性くし型共重合体のアミノ基に容易に導入するために、2 種類の MG カルボン酸誘導体を合成した。MG 誘導体の光変換能は共役構造に依存しており、MG 部位とカルボキシ基が共役系で連結されていない MG 6 の方が優れていた。中性 pH 下における自発的なカチオン化を避けるため MG 6 の OH 基を CN 基に置換した MG 7 を合成し、光応答性を評価したところ、通常の MG 誘導体 (MG-CN) 同様に、高い光変換能を示し、カチオン性くし型共重合体のイオン性を光制御に適していることがわかった。

第 3 章では、MG 7 をカチオン性くし型共重合体に導入し、共重合体の MG 部位の光応答性を評価した。MG 7 は縮合剤である PyBOP によって共重合体に導入でき、カップリング効率 80% と高い修飾率であった。これまで MG 誘導体を備えた共重合体の合成では、MG ビニル誘導体を用いたラジカル重合法がほとんどであり、MG 含有量の調節が困難であったが、MG カルボン酸誘導体である MG 7 を用いることで可能になった。MG 修飾量が異なる 3 つの MG 修飾カチオン性くし型共重合体 (MG-PAA-*g*-PEG) は、光照射によって MG 部位のカチオン体へ変換され、共重合体のイオン性が制御できることがわかった。その光変換率は MG 修飾量に依存して低下した。共重合体内の MG 部位の光応答性に関する知見は少なく、今回新たな知見が得られた。

第 4 章では、MG-PAA-*g*-PEG のシャペロン活性を、膜破壊活性 E5 ペプチドをモデル生体分子として評価した。MG-PAA-*g*-PEG の MG 部位のカチオン化は E5 の構造変化に影響を与えなかった。MG 修飾率が 9 mol% の MG-PAA-*g*-PEG、9MG9P は MG 部位の構造によらず E5 の α -ヘリックス構造への誘導を

促す。興味深いことに、9MG9P の MG 部位のカチオン化は E5 のフォールディングに対して影響を与えないが、E5 の脂質膜への相互作用に関与することがわかった。リポソームに E5 と非照射 9MG9P を加えると、リポソームの形態は変化しないものの、ポア形成が確認された。一方、E5 と光照射された 9MG9P の添加はベシクルからシート構造への転換が確認された。9MG9P/E5 は脂質膜にポアを形成するだけだが、光照射された 9MG9P/E5 はポア形成するだけでなくシート構造を誘導する。MG 部位のカチオン化が E5 の膜破壊型構造を促すのではなく、光照射の有無に関わらず 9MG9P は E5 の活性を促進する。光照射によって MG 部位と活性型 E5 の相互作用が変化し、E5 の脂質膜上の局在が変化したと推測している。 *in situ* でのリポソーム形態の光制御にも成功しており、9MG9P は E5 の膜破壊活性様式を光調整するスマート材料であることがわかった。光によってペプチドのフォールディングに関わらないが、ペプチドの集積を調整するという点で光応答性人工シャペロンと言える。カルボキシ基を有する MG 誘導体は生体高分子や無機材料などの様々な材料に光応答性を付与することが可能であることがわかり、材料のイオン性や親水性を光制御できるツールとして期待される。

付録

研究業績

【投稿論文】

1. Seiya Takemura, Naohiko Shimada and Atsushi Maruyama, “Malachite green-derivatized cationic comb-type copolymer acts as a photoresponsive artificial chaperone”, *J Biomater Sci Polym Ed.*, **2023**, *in press*.
2. Seiya Takemura, Hikaru Watanabe, Tatsuya Nishihara, Akimitsu Okamoto and Kazuhito Tanabe, “Monitoring intracellular metal ion complexation with an acetylene-tagged ligand by Raman spectroscopy”, *RSC Adv.*, **2020**, *10*, 36119-36123.

【国内学会・シンポジウムにおける発表】（査読なし）

1. ○ 竹村 晟也、嶋田 直彦、丸山 厚、「光照射をトリガーとしたリポソーム形態光制御システムの構築」、『第 38 回日本 DDS 学会学術集会』、2020 年 6 月、口頭
 2. ○ 竹村 晟也、嶋田 直彦、丸山 厚、「マラカイトグリーンを有するカチオン性くし型共重合体によるリポソーム形態の光制御」、『第 71 回高分子学会年次会』、2022 年 5 月、口頭
 3. 竹村 晟也、嶋田 直彦、丸山 厚、「光応答性分子マラカイトグリーンを備えたカチオン性くし型共重合体の合成」、『第 70 回高分子学会年次会』、2020 年 5 月、英語口頭
- 他 5 件（2020 年以前、ポスター発表：3 件、口頭発表：2 件）

謝辞

本研究を行うにあたって、丁寧な御指導ならびに貴重な御助言を賜りました東京工業大学 生命理工学院 丸山 厚教授、嶋田 直彦助教に深く感謝を申し上げます。東京工業大学博士課程 3 年間と短い期間でしたが、様々な学会や会議などの貴重な経験をさせて頂きました。研究者として未熟である自分に対して、真剣に研究について意見・議論して頂いたことは私にとってかけがえのない財産となりました。改めて深く感謝いたします。

テクニカルスタッフである斎藤 美奈子氏、秘書の坂 道子氏には、実験のサポートはもちろんのこと、健康面においてもきにかけて頂きました。心より御礼申し上げます。

本研究を行うにあたって、共に充実した研究室生活を過ごした小町 卓也氏、Orakan Hanpanich 氏、Wang Jun 氏、Zhang Wancheng 氏、Niu Chun Hao 氏、Krittika Rudeejaroonrung 氏、Huang He 氏、野村 昌平氏、阿部 陽太氏、小林 涼也氏、山田 卓祥氏、高橋 周太郎氏、田中 大和氏、吉田 直樹氏、上井 悠大氏、林 来翔氏、平山 裕基氏、金子 奈央氏、宮坂 綾乃氏、藤井 健太氏、町田 泰人氏、森岡 優佳氏に厚く御礼を申し上げます。

最後に、研究生活を支えていただいた両親に心より御礼申し上げます。

令和 5 年 10 月 15 日

竹村 晟也