

## 標的分子を吸着・放出する動的分子認識ゲルの創成

研究代表者

宮田隆志 関西大学 化学生命工学部 教授

共同研究者

河村暁文 関西大学 化学生命工学部 准教授



### 1. 研究の背景と達成目標

ヘモグロビンなどのタンパク質は、そのコンフォメーション変化によって標的分子に対する結合能を変化させることにより、高効率に分子の運搬や反応などを行っている。そこで、タンパク質のアロステリック制御を模倣した動的分子認識ゲルを設計し、外部刺激に応答したゲル構造変化に基づく分子結合能の変化により、標的分子の吸着と放出の制御を試みた。特に、標的分子として汚染物質や薬物、生体分子などを用い、刺激に応答した標的分子の分離回収システムや放出制御システムの構築を目指した。具体的には、以下の4項目を達成目標として研究を進めた。

- 1) リガンド導入による動的分子認識ゲルの設計: 温度や pH などに応答したゲルのコンフォメーション変化を確認する。リガンドを導入した刺激応答性ゲルの形成を確認し、ゲル網目形成のための合成条件を決定する。
- 2) 動的分子認識ゲルの動的分子結合能の検討: 異なるコンフォメーションを有するゲルの分子結合能がコンフォメーションに依存して異なることを確認する。
- 3) 動的分子認識ゲルによる物質分離濃縮: 温度や pH でゲルのコンフォメーション変化により標的分子の吸着量が3倍以上変化する pH や温度などの条件を決定する。
- 4) 動的分子認識ゲルによる薬物放出制御: 動的分子認識ゲルへの薬物の効率的な結合を実現し、コンフォメーション変化により薬物放出速度が3倍以上変化する pH や温度などの条件を決定する。

### 2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・ シクロデキストリン(CD)をリガンドとした分子インプリント法により、動的分子結合サイトを有する温度応答高分子ゲルを合成した。この CD 導入温度応答性ゲルは、温度に応答したコンフォメーション変化により標的分子の吸着量が3倍ほど変化し、放出速度が15倍以上も増加した。僅かな温度変化での分子の吸着・放出により高効率な分子回収システムや分子センサーへの応用が可能であり、持続可能社会実現のための有用分子のリサイクルシステムに繋がる成果である。また、従来の拡散支配型ではなく、結合支配型の薬物放出制御を提案でき、温度による時空間的な薬物放出制御の新概念として学術的にも意義深いと考えられる。
- ・ CD をリガンドとした分子インプリント法により、動的分子結合サイトを有する pH 応答性ポリペプチドゲルを合成した。この CD 導入 pH 応答性ポリペプチドゲルは、pH に応答したコンフォメーション変化により標的分子の吸着量が3倍以上変化し、放出速度も3倍以上変化した。僅かな pH 変化での分子の吸着・放出により高効率な分子回収システムや分子センサーへの応用が可能であり、持続可能社会実現のための有用分子のリサイクルシステムに繋がる成果である。また、従来の拡散支配型ではなく、結合支配型の薬物放出制御システムを提案でき、pH による時空間的な薬物放出制御の新概念として学術的にも意義深いと考えられる。
- ・ 付随的な研究成果として、CO<sub>2</sub> を吸着する金属有機構造体(MOF)を架橋点としたゲルも合成し、力学刺激による CO<sub>2</sub> 脱着に成功した。力学刺激による CO<sub>2</sub> 脱着は、カーボンニュートラルの実現のために重要な省エネルギー的 CO<sub>2</sub> 回収システムとして期待できる。
- ・ 付随的な研究成果として、変性タンパク質を検知して分離できる刺激応答性ポリマーの設計に成功した。排

水や廃薬品などに含まれる変性タンパク質を除去して良質なタンパク質を安価な方法で分離回収するための生体分子リサイクルシステムなどの提案に繋がる成果である。

- 付随的な研究成果として、ゲルの力学強度を飛躍的に向上できる汎用的方法を見出し、ゲルシステムの実用化のために重要な成果が得られた。ゲル材料の弱点はその低い力学強度であり、繰り返し使用が要求されるゲルの実用化にはその力学強度の向上が不可欠である。ゲルの力学強度を飛躍的に向上させる本技術は、上記のような分離回収システムだけではなく、幅広いゲルの応用分野に広く活用できる。

### 3. 研究成果

#### 1) 動的分子結合サイトを有する温度応答性ゲルの設計と分子吸着・放出制御

標的分子(薬物ダブソン)に対するリガンドとしてシクロデキストリン(CD)を用いた分子インプリント法により、ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAAm)ゲル内に動的分子結合サイトを形成させた。CD 導入 PNIPAAm ゲルは、温度上昇に伴って PNIPAAm 鎖の下限臨界溶液温度(LCST)付近で膨潤状態から収縮状態へとコンフォメーション変化した。LCST 以下ではゲルは標的分子に対して高い吸着量を示したが、LCST 以上になると急激に吸着量が減少した。LCST 以上への温度上昇によってゲル内の分子結合サイトがコンフォメーション変化したため、分子結合能が低下するために分子の吸着量が低下したと考えられる。さらに、標的分子を吸着させた CD 導入 PNIPAAm ゲルは、体温付近の僅かな温度変化でその放出速度を 15 倍以上も増加させた(Fig. 1)。したがって、温度で結合能を変化できる分子結合サイトの形成に成功し、温度変化により標的分子の吸着・放出を制御することに成功した。また、吸着・放出効率を向上させるため、乳化重合による CD 導入 PNIPAAm ゲル粒子の合成も着手し、動的結合サイトを有するゲル粒子の設計も行った。

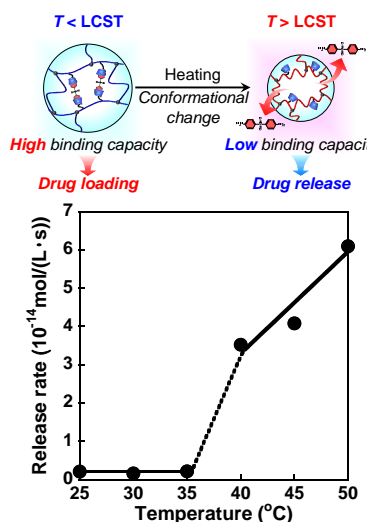


Fig. 1. Effect of temperature on the release rate of dapsone from the dapsone-loaded hydrogel in water at various temperatures.

#### 2) 動的分子結合サイトを有する pH 応答性ポリペプチドゲルの設計と分子吸着・放出制御

リガンドとして CD を用いた分子インプリント法により、内分泌かく乱化学物質の疑いのあるビスフェノール A(BPA)に対する動的分子結合サイトを、CD を導入したポリ(L-リシン)(CD-PLL)ゲル内に形成させた(Fig. 2)。分子インプリント CD-PLL ゲルは pH の増加に伴って、ランダムコイルから  $\alpha$ -ヘリックスへとコンフォメーション変化した。低 pH でランダム構造を有する分子インプリント CD-PLL ゲルは低い BPA 吸着量を示したが、高 pH で  $\alpha$ -ヘリックスになると吸着量は 3 倍以上も増加した(Fig. 3)。高 pH 条件で分子インプリント法によって形成された分子結合サイトには BPA が結合するのに対し、低 pH になると分子結合サイトのコンフォメーション変化によって結合能が低下するために吸着量が低下すると考えられる。したがって、 $\alpha$ -ヘリックスからランダムコイルへとコンフォメーション変化するポリペプチドゲル内に pH で結合能を変化できる分子結合サイトを形成させ、pH 変化により標的分子の吸着・放出を制御することに成功した。また、モデル薬物(ダブソン)を鋳型として使い、CD-PLL とポリエチレングリコールで修飾したポリアクリル酸(mPEG-g-PAAc)からポリイオンコンプレックスを形成させて架橋した後、鋳型を除去することにより分子インプリントナノ粒子を調製した。このナノ粒子への薬物吸着量は、 $\alpha$ -ヘリックス構造を形成し

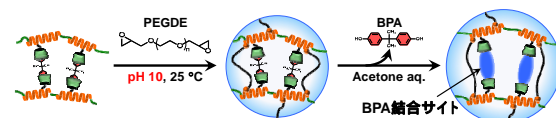


Fig. 2. Preparation of a molecularly imprinted gel.

い BPA 吸着量を示したが、高 pH で  $\alpha$ -ヘリックスになると吸着量は 3 倍以上も増加した(Fig. 3)。高 pH 条件で分子インプリント法によって形成された分子結合サイトには BPA が結合するのに対し、低 pH になると分子結合サイトのコンフォメーション変化によって結合能が低下するために吸着量が低下すると考えられる。したがって、 $\alpha$ -ヘリックスからランダムコイルへとコンフォメーション変化するポリペプチドゲル内に pH で結合能を変化できる分子結合サイトを形成させ、pH 変化により標的分子の吸着・放出を制御することに成功した。また、モデル薬物(ダブソン)を鋳型として使い、CD-PLL とポリエチレングリコールで修飾したポリアクリル酸(mPEG-g-PAAc)からポリイオンコンプレックスを形成させて架橋した後、鋳型を除去することにより分子インプリントナノ粒子を調製した。このナノ粒子への薬物吸着量は、 $\alpha$ -ヘリックス構造を形成し

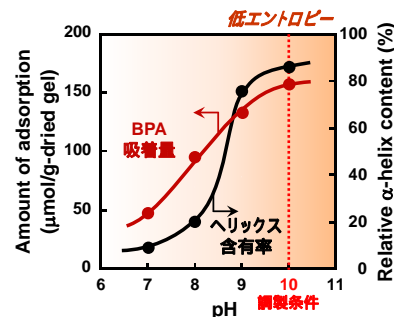


Fig. 3. Amount of BPA adsorption (●) and relative  $\alpha$ -helix content (●) of BPA-imprinted CD-PLL gels at various pHs.

ている pH 7 で最も多く、コンフォメーション変化により吸着量を制御できることがわかった。

#### 【付随的な研究成果】

#### 3) MOF 架橋ゲルの設計と CO<sub>2</sub> 吸着・脱着挙動

CO<sub>2</sub>を吸着する MOF を調製した後、アミノ基を導入した MOF-NH<sub>2</sub>を合成した。これを架橋剤として用い、ポリメタクリル酸(PMAc)を架橋させて MOF 架橋ゲルを合成した (Fig. 4)。この MOF 架橋ゲルに CO<sub>2</sub>を吸着させた後、力学刺激を加えた際の CO<sub>2</sub>放出を評価した。その結果、応力の増加に伴って MOF 架橋ゲルからより多くの CO<sub>2</sub>の脱着が観察された。ポリマー鎖を介して架橋部の MOF に応力が掛かり、その細孔サイズが変化することにより MOF 内部に貯蔵されていた CO<sub>2</sub>が放出されたと考えられる。CO<sub>2</sub>回収には吸着だけではなく、省エネルギーな脱着システムも不可欠であり、MOF 架橋ゲルは重力などを用いた力学刺激による脱着システムへの応用が期待できる。

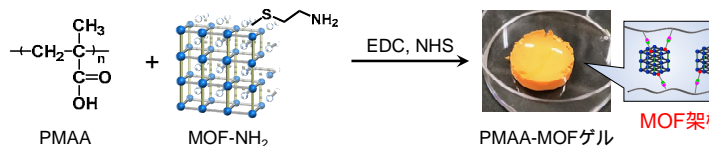


Fig. 4. Preparation of a PMAc-MOF gel.

#### 4) 変性タンパク質を検出して分離できる刺激応答性ポリマーの設計

CD を導入した各種温度応答性高分子を合成し、ネイティブタンパク質と変性タンパク質の存在下での下限臨界溶液温度(LCST)を調べた。特定の温度では CD 導入温度応答性高分子はネイティブタンパク質が存在しても沈殿しなかったが、少量の変性タンパク質の存在で沈殿することを見出した (Fig. 5)。さらに、ネイティブタンパク質と変性タンパク質の混合系に CD 導入温度応答性高分子を添加すると沈殿し、その沈殿を除去した上澄にはネイティブタンパク質のみが存在した。したがって、CD 導入温度応答性高分子の添加だけで、簡便に変性タンパク質を分離除去でき、ネイティブタンパク質を高効率に回収するシステムへの応用が期待できる。

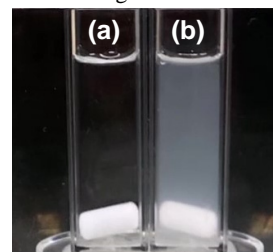


Fig. 5. Photo of a phosphate buffer solution with temperature-responsive polymer with CDs after the addition of (a) native and (b) denatured

#### 5) ゲルの力学強度を飛躍的に向上できる汎用的方法の開拓

ゲルの実用化において、その低い力学強度が大きな障壁となっている。ゲルを用いた分子リサイクルシステムの構築には、簡便な方法でゲルの力学強度を向上させることが不可欠である。優れた力学強度を有するゲルは数多く報告されているが、われわれはより簡便で汎用なタフゲルの合成方法を検討した。特に、ゲルの粘弾性に着目して弾性項と粘性項とのバランスを最適化することにより、エネルギー散逸が可能な物理架橋として高分子鎖の絡み合いを導入したゲルの調製を試みた。その結果、高いモノマー濃度と低い架橋剤量の重合条件でゲルを合成すると、優れた力学物性を示すタフゲルになることを明らかにした。これらのゲルは、高分子鎖の絡み合いによる物理架橋を数多く有しており、そのエネルギー散逸に基づいて高靱性を示すことを明らかにした。

### 4. 今後の展開

本研究では、温度や pH に応答したコンフォメーション変化により分子結合能を変化させる動的分子認識ゲルの設計に成功した。この動的分子認識ゲルは、持続可能社会実現のためのリサイクルシステム開発で重要な分子回収プロセスへの応用が期待できる。特に、ケミカルリサイクルだけではなく、医療・食品関連で廃棄される医薬品やタンパク質等の回収システムにもつながり、より広い範囲をカバーする新たな分子リサイクルシステムの構築につながる。これらを実現するためには、様々な分子やイオン等が存在する夾雑系での標的分子に対する選択性を向上させることが重要である。今後は、夾雑系で駆動できる動的分子認識ゲルの設計と応用、さらに実用化に必要なシステム設計にも挑戦する。一方、分離回収の効率を向上させるためには粒子状やフィルム状、繊維状への成形も必要になるので、材料構造の設計も進める予定である。一方、動的分子認識ゲルは分離回収システムだけではなく、センサーや薬物キャリアとしての応用も可能である。特に、従来の拡散支配型とは異なり、結合支配型の薬物放出が可能になり、時空間的な刺激での薬物放出によって治療や再生医療などへの応用も検討する。このように動的分子認識ゲルは環境・エネルギー・医療分野等への多彩な応用が期待できるため、新しいリサイクルシステムや医療技術として新産業を生み出せるように、引き続き材料開発とシステム開発を目指す。

## 5. 発表実績

### 【論文】

1. C. Norioka, Y. Inamoto, C. Hajime, A. Kawamura, T. Miyata, A Universal Method to Easily Design Tough and Stretchable Hydrogels, *NPG Asia Mater.*, **13**, 34–1/10 (2021).
2. M. Okihara, K. Okuma, A. Kawamura, T. Miyata, Photoresponsive Gelation of Four-Armed Poly(ethylene glycol) with Photodimerizable Groups, *Gels*, **8**, 183–1/12 (2022).
3. T. Noguchi, N. Akioka, Y. Kojima, A. Kawamura, T. Miyata, Photoresponsive Polymer Films with Directly Micropatternable Surface Based on the Change in Free Volume by Photo-crosslinking, *Adv. Mater. Interfaces*, **9**, 2101965–1/9 (2022). (Inside back cover)
4. T. Miyata, T. Namera, Y. Liu, A. Kawamura, T. Yamaoka, Photoresponsive Behaviour of Zwitterionic Polymer Particles with Photodimerizable Groups on Their Surfaces, *J. Mater. Chem. B*, **10**, 2637–2648 (2022).
5. Y. Toyoshima, A. Kawamura, Y. Takashima, T. Miyata, Design of Molecularly Imprinted Hydrogels with Thermoresponsive Drug Binding Sites, *J. Mater. Chem. B*, **10**, 6644–6654 (2022). (Inside back cover)
6. Y. Inoue, K. Takada, A. Kawamura, T. Miyata, Amphiphilic Liquid Crystalline Polymer Micelles That Exhibit a Phase Transition at Body Temperature, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **14**, 31513–31524 (2022). (Supplementary cover art)
7. C. Norioka, A. Kawamura, T. Miyata, Relatively Homogeneous Network Structures of Temperature-Responsive Gels Synthesized via Atom Transfer Radical Polymerization, *Soft Matter*, **19**, 2505–2513 (2023). (Back cover)

### 【著書】

1. 宮田隆志, 刺激応答性高分子の研究動向, 刺激応答性高分子の研究動向(荏原充宏 監修), シーエムシー, 第2章, 9–23 (2021).
2. T. Miyata, Target Molecule-responsive Hydrogels, *Chemoresponsive Materials: Smart Materials for Chemical and Biological Stimulation: Edition 2* (Ed. H.-J. Schneider), RSC, Smart Materials Series, Chapter 7, 223–261 (2022).

### 【総説・解説】

1. 宮田隆志, 分子間相互作用を利用したスマートポリマー, *高分子*, **69**, 461–464 (2020).
2. 宮田隆志, 分子応答性ゲルの設計と応答挙動—研究の発想と戦略—, *繊維学会誌*, **76**, 365–371 (2020).
3. 宮田隆志, 強いゲルー常識を覆す優れた力学物性を示すソフトマテリアル, *化学*, **78**, 66–67 (2023).

### 【特許】

1. 宮田隆志, 河村暁文, 椿本恵大, 金属有機構造体に包接される化学種の放出方法ならびに高分子ゲルおよびその製造方法, 特願 2020-200945 (2020.12.3).

### 【招待講演】

1. 宮田隆志, 分子応答性ゲルの設計と応答挙動に関する研究, 2020 年度繊維学会年次大会, 紙上開催 (2020.6.10). (学会賞受賞講演)
2. 宮田隆志, 分子間相互作用に基づく高分子膜およびゲルの設計と応用, 第70回高分子学会年次大会, オンライン開催 (2021. 5. 28). (学会賞受賞講演)
3. T. Miyata, Design of Biomolecularly Stimuli-responsive Microgels and Nanogels Using Dynamic Crosslinks, The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2021), Virtual Congress Symposium (2021. 12. 18).
4. T. Miyata, Design of Stimuli-responsive Polymeric Materials with Dynamic Structures, The Japan-Taiwan Bilateral Polymer Symposium 2022 (JTBPS2022), Virtual Congress Symposium (2022. 3. 7).
5. 宮田隆志, 動的な界面材料の設計と応用に関する研究, 第60回日本接着学会年次大会, オンライン開催 (2022. 6. 23). (学会賞受賞講演)