生体との多価相互作用を飛躍的に亢進する 超分子バイオマテリアルの設計

由 井 伸 彦

北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科 ☎ 923-1292 石川県能美郡辰口町旭台 1-1

(2003 年 9 月 11 日受理)

Design of Supramolecular Biomaterials Greatly Enhancing Multivalent Binding with Biological Systems

Nobuhiko YUI

School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology
1-1 Asahidai, Tatsunokuchi, Nomi, Ishikawa 923-1292

(Received September 11, 2003)

Supramolecular Science has become an important issue in constructing molecular architectures through intermolecular forces by mimicking molecular assemblies in nature. Polyrotaxane is defined as a molecular assembly in which many cyclic compounds are threaded onto a linear polymeric chain capped with bulky end-groups. In the last decade, a variety of polyrotaxanes has been extensively designed as to act as novel biomaterials in our group. In this article, enhanced multivalent binding with biological systems has been introduced throughout our systematic studies on ligand-immobilized polyrotaxanes. Our studies have revealed such an enhanced binding effect seen in the polyrotaxanes is due to the combination of introducing multiple copies of the ligands and their highly mobile nature due to the inter-locked structure. A new insight of designing functional biomaterials will emerge from such structural characteristics of the polyrotaxanes.

1. は じ め に

2000 年のナノテクノロジーに関する米国大統領声明¹⁾に代表されるナノサイエンス・テクノロジーの世界的な趨勢のもと、我が国でもナノ材料分野での研究振興が注目されている。こうした中において、ナノスケールでの構造的特徴に基づいて機能発現するバイオマテリアルの新規設計に寄せる期待も大きい。環状分子中を線状分子が貫通した骨格を有する構造体であるロタキサン²⁾の名称は車輪と車軸を意味するラテン語に由来するが、Fig. 1 のように多数の環状分子を貫通した線状高分子鎖の両末端を嵩高い官能基でキャップした構造を有するポリロタキサンには高分子系の超分子として新たな機能設計が各方面で期待されている。

1976 年に緒方らがシクロデキストリン (CD) の包接

挙動を利用して重縮合反応により CD 系の擬ポリロタキサンを世界で初めて調製して以来²⁾、多くの研究者によって CD をベースとしたポリロタキサンが合成されてきた。1990 年には原田らが CD と線状高分子とから直接に擬ポリロタキサンを調製し、環状分子である CD と線状高分子との組み合わせを系統的に明らかにして、CD をベースにしたポリロタキサン研究が加速した³⁾。この中で彼らは、 α -シクロデキストリン (α -CD) と分子量数千程度のポリエチレングリコール (PEG) とからなる擬ポリロタキサンが水中で簡便に調製でき、更に PEG の両末端に嵩高い置換基を導入してポリロタキサンを合成できることを報告した⁴⁾。

著者らは、医療目的での使用が承認されている α -CD と PEG の組み合わせからなるポリロタキサンにはバイオマテリアルとしての実現可能性が高いと考え、ポリロタキサンの超分子構造を利用したバイオ機能設計を研究してきた⁵⁾ (Fig. 1)。本稿では、環状分子と線状高分子

E-mail: yui@jaist.ac.jp

(a) Sliding function

(b) Multivalent binding function

Fig. 1 Functional design of polyrotaxanes as biomaterials.

鎖とが機械的に連結した構造を利用して生体との多価相互作用を飛躍的に亢進する設計戦略について解説する。

2. リガンド-レセプター間多価結合亢進ための分子設計

細胞内情報伝達系は、リガンドとなる情報伝達物質が細胞膜タンパク質レセプターに結合することによって細胞質内機能を制御しており、これを利用した細胞外からの細胞機能誘導が可能である。とりわけ、細胞膜上に分布しているレセプターとの多価相互作用は、リガンドの結合安定性を向上させるだけでなくレセプターの局在化（集合）を誘起する上でも効果的であり、新薬設計のアプローチとして多官能性の水溶性高分子やデンドリマーに数多くのリガンドを導入する試みが精力的に行われている⁶⁾。

リガンド-レセプター間の結合を熱力学的に考察すると、リガンド数の増加は結合におけるエンタルピー的利得に貢献するが、リガンドの高分子鎖への導入や密度増大は系におけるリガンド自体およびレセプターとの結合における重大なエントロピー的損失となりうるので、多価結合の効果が予想通りには期待できないことになる。また、こうした結合を速度論的に考察すると、リガンドあたりの結合定数は結合速度定数と解離速度定数によって決定されるが、リガンド数の増加は解離速度定数の低下をもたらすが立体的なりガンド配置の制限から結合速度定数は必ずしも向上せず、逆に低下することが報告されている。事実、水溶性高分子やデンドリマーの場合には、リガンド数の増大とともに相互作用の増強がリガンドあたりの結合定数向上として認められるが、過度のリガンド導入はリガンドあたりの結合定数を逆に低下させることが報告されている。このようなことから、リガンド-レセプター間の多価相互作用を飛躍的に亢進するためには、多数のリガンドを用いることによりエンタルピー的利得を獲得しつつ、いかにエントロピー的損失を回避するか、換言すればリガンドの立体的配置により制限されるレセプターとの多価結合の空間的ミスマッチをい

かに解消して結合速度定数を向上させるかに対する抜本的な分子設計が重要かということになる。著者らが研究対象としている生体内分解性ポリロタキサンでは、水酸基数 18 の α -CD が数十から数百にわたって PEG 鎖の貫通によって配列している。この水酸基に細胞や蛋白質との特異的相互作用が期待されるリガンドを導入すれば、Fig. 1 のようにレセプターの結合サイトにあわせてリガンドが CD とともに移動可能なので、生体との多価相互作用による細胞機能制御が飛躍的に向上する可能性があると考えた⁷⁾。

3. リガンド導入ポリロタキサンによるタンパクとの多価相互作用

著者らは辻らと共同して、ヒト小腸上皮細胞ペプチドトランスポーターである hPEPT 1 に認識されるジペプチド (ValLys) 基を導入したポリロタキサンを合成し、小腸からのオリゴペプチド (GlySar) 吸収阻害剤としての有効性を検討した⁸⁾。hPEPT 1 発現 Hela 細胞では、ValLys 導入ポリロタキサンが ValLys を導入した CD やデキストリンに比較して桁違いの低 ValLys 濃度で GlySar 吸収阻害効果を発揮することがわかった。このことは、リガンドとレセプターとの多価相互作用において、ポリロタキサンの超分子構造が効果的であることを示している。とりわけ ValLys 導入デキストリンでは ValLys 基が疎水効果によって集合し、その周囲をデキストランが覆うようなミセル状会合体が形成するために ValLys が hPEPT 1 と効果的に結合できにくいのに対し、ポリロタキサンでは屈曲性の低い棒状分子に沿って ValLys 基が運動性をもって配列している特徴を反映した結果と考えている。

しかしながら、上記の研究例ではもともとリガンドとレセプターとの相互作用が強い（結合定数大きい）ので、得られた多価相互作用亢進は 10 倍程度であり、ポリロタキサンを用いることの利点が現れにくいとも考えられた。一方、糖レセプターと糖鎖との結合は弱く特異性も低いので、糖鎖認識には多価相互作用が不可欠といわれている。そこで著者らは、種々のマルトース導入ポリロタキサンを用いてレクチンであるコンカナバリン A (Con A) による赤血球凝集阻害を検討した (Fig. 2)。するとマルトース導入ポリロタキサンは、マルトース単位で 3000 倍もの阻害効果を発揮した。この値は、ポリロタキサン分子単位に換算すると、実にマルトースの百万倍にも相当する。更に導入リガンド数だけでなくリガンド運動性の見地から貫通 CD 数も変化させて検討を行ったところ、凝集阻害が導入マルトース数だけでなく貫通 CD 数の程度によっても大きく影響を受けることがわ

かった (Fig. 3)⁹。そこで、これと並行してマルトース運動性に関してパルス NMR 解析により種々のポリロタキサンに導入したマルトース C1 プロトンのスピン-スピン緩和時間 (T_2) を測定したところ、一連のポリロタキサンの凝集阻害効果と T_2 により相関が見られ、最も凝集阻害効果の高かったポリロタキサンでは T_2 値がマルトース単独時とほぼ同様であった (Table 1)。このことは、CD 数を制御することによってポリロタキサン中に導入したマルトース基の運動性をきわめて高くすることができることを示している。対照として検討したポリアクリル酸の場合、凝集阻害効果も 200 倍程度と低く T_2 値もマルトースの 1/6 程度に低下していたことから、

Fig. 2 Interaction of maltose-immobilized polyrotaxane with Con A.

PEG 鎖に沿ったマルトース導入 CD の移動や回転が Con A との結合を飛躍的に亢進した要因と考えられる¹⁰。別途 FITC 導入 Con A を用いて結合定数を算出し、マルトース導入ポリロタキサンの Con A との結合定数がマルトース単独と比べて 4000 倍も増大していたことも明らかとなった (Table 1)¹¹。こうした結果を総合すると、ポリロタキサンの場合には導入時や結合時のエントロピー的損失を回避し、リガンド数に応じたエンタルピーの利得に基づいた多価相互作用の亢進が可能になったものと解釈される。以上よりポリロタキサンは、その特徴的な超分子構造によって生体との多価相互作用を亢進するツールとしてきわめて有用であり、医薬のみならず検査診断など幅広い応用が期待される。

ポリロタキサン戦略の一環として著者らは、Y.H. Kim, K.D. Park らと共同してスルホン基導入ポリロタキサンの血液適合性についても研究している。既に著者らが設計したポリロタキサンは血小板の活性化を積極的に抑制する機能を有していることを明らかにしているが¹²、Kim らが行ってきたスルホン化 PEG 表面の凝固因子活性阻害¹³に着目し、より優れた抗凝固活性を狙った試みである。スルホン基はアンチトロンビン III を多点結合により活性化して血液凝固因子系の活性化を阻害することから、スルホン基を導入したポリロタキサンによってアンチトロンビン III との効果的な結合による高い抗凝固活性が期待される。スルホン化ポリロタキサ

Fig. 3 Enhanced inhibitory effect of maltose-immobilized polyrotaxanes in Con A-induced erythrocyte agglutination assay.

Table 1 Enhanced multivalent binding of maltose-immobilized polyrotaxane with Con A.

Sample	The number of ligands	T_2 (msec)	K_a (M^{-1})	Relative potency
Polyrotaxane	244	230	6×10^6	3×10^3
Polyacrylic acid	240	40	8×10^4	2×10^2
Cyclodextrin	3	240	2×10^4	10
Maltose	1	>240	1×10^3	1

ンには血小板活性化抑制効果と抗凝固活性が認められたが^{14, 15)}、興味深いのはスルホン基数だけでなくスルホン基を導入する CD 数を変化させることにより抗凝固活性が向上した点である。このことは、貫通 CD 数の調節によってアンチトロンビン III との結合に有利なスルホン基の運動性を確保することが抗凝固活性亢進に反映されたものと考えられる。このように、ポリロタキサンを用いた生体との多価相互作用は血液適合性表面にも有望な設計指針となりうることが示された。

4. お わ り に

リガンドを導入したポリロタキサンでは、細胞膜上レセプターの分布状態や流動性、あるいは各レセプター上の結合部位の分布状態に対応してリガンドが移動可能であることが多価相互作用の亢進に貢献しているものと結論できる。NMR によるリガンド分子運動性に関する解析と並行して、表面プラズモン共鳴分析による速度論的解析、滴定型熱量分析による熱力学的解析によりリガンド導入ポリロタキサンとタンパク質との多価結合性を検討しており、著者らの超分子のアプローチの有効性を多角的に証明しつつある。このように、ポリロタキサンをベースとしたバイオマテリアル設計は新しい展開を迎えつつあり、広く生命科学に貢献するバイオマテリアル設計の重要な指針を与えるものと考えている¹⁶⁻¹⁸⁾。

謝 辞

本稿で紹介した内容は、金沢大学・辻 彰教授、玉井郁己教授（現：東京理科大学）、崔 吉道助手、韓国科学技術研究院・金 泳夏博士、亞洲大学・朴 基東教授、朴 亨達博士、北陸先端科学技術大学院大学・大谷 亨助手、李 遠揆助手（現：パデュー大学）、江口 優君との共同研究成果であり、この場を借りて深謝致します。

文 献

- 1) “National Nanotechnology Initiative: Leading to the Next Industrial Revolution” (National Science and Technology Council, USA, 2000).
- 2) N. Ogata, K. Sanui and J. Wada: *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* **14**, 459 (1976).
- 3) A. Harada and M. Kamachi: *Macromolecules* **23**, 2821 (1990).
- 4) A. Harada, J. Li and M. Kamachi: *Nature* **356**, 325 (1992).
- 5) T. Ooya and N. Yui: *Crit. Rev. Ther. Drug Deliv. Syst.* **16**, 289 (1999).
- 6) M. Mammen, S.-K. Choi and G.M. Whitesides: *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 2754 (1998).
- 7) 大谷 亨, 江口 優, 由井伸彦: *高分子論文集* **59**, 734 (2002).
- 8) N. Yui, T. Ooya, T. Kawashima, Y. Saito, I. Tamai, Y. Sai and A. Tsuji: *Bioconj. Chem.* **13**, 582 (2002).
- 9) N. Yui and T. Ooya: *Mater. Sci. Forum* **426-432**, 3243 (2003).
- 10) T. Ooya, M. Eguchi and N. Yui: *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13016 (2003).
- 11) T. Ooya, M. Eguchi and N. Yui: in preparation.
- 12) N. Yui, T. Ooya and T. Kumeno: *Bioconj. Chem.* **9**, 118 (1998).
- 13) Y.H. Kim, D.K. Han, K.D. Park and S.H. Kim: *Macromol. Symp.* **118**, 565 (1997).
- 14) H.D. Park, W.K. Lee, T. Ooya, K.D. Park, Y.H. Kim and N. Yui: *J. Biomed. Mater. Res.* **60**, 186 (2002).
- 15) H.D. Park, W.K. Lee, T. Ooya, K.D. Park, Y.H. Kim and N. Yui: *J. Biomed. Mater. Res.* **66 A**, 596 (2003).
- 16) N. Yui: “Supramolecular Design for Biological Applications” (CRC Press, Boca Raton, 2002).
- 17) N. Yui, R. Mrsny and K. Park: “Reflexive Polymers and Hydrogels: Understanding and Designing Fast-responsive Polymeric Systems” (CRC Press, Boca Raton, 2003) in press.
- 18) 有賀克彦, 国武豊喜: “超分子化学への展開” (岩波書店, 2000).