プロダクト イノベーション

化学刺激応答超分子ヒドロゲルの開発 分子設計と機能発現

京都大学大学院工学研究科
吉井達之, 浜地 格

刺激に応答して硬さや流動性が変化するヒドロゲルは、目視によって判別可能な診断材料や、薬剤放出担体、あるいは細胞の運動性などを人為的に制御するためのマトリクスとして期待される。一般にヒドロゲルは、水中で高分子鎖が物理的あるいは化学的に架橋されることによって網目を形成することで形成される。これに対しわれわれは、分子量が500程度の低分子化合物が非共有結合性の相互作用を駆動力として自己組織化することによって繊維状の構造を形成し、それらがネットワーク化することによって形成される“超分子ヒドロゲル”の開発を行っている⁽¹⁾ (図1A)。高分子ゲルは、架橋点の数や部位によって物性が大きく変化するが、一般に分子構造が一義的に決まらない(分布がある)ために、精密な制御は困難である。一方で超分子ヒドロゲルでは構成単位であるゲル化剤分子を一分子レベルで設計し、合成することによって、物性をチューニングすることが可能である。このような性質を利用することで、われわれはこれまでにさまざまな刺激に応答してゲル-ゾル転移を示すような超分子ヒドロゲルの開発を行っている。超分

子ヒドロゲルの形成に最も重要なのは、繊維状の構造体の形成およびネットワーク化である。したがって、刺激応答性のゲルを得るためには、外部から加わる刺激によって構造体形成やネットワーク化に寄与する相互作用が阻害されるような戦略が必要となる。たとえば、ほとんどの超分子ヒドロゲルは熱応答性をもち、加熱することでサラサラの溶液へと変化する。これは、熱によって分子運動が大きくなり、水素結合や疎水性の相互作用など、ナノ構造体形成に必要な分子間の相互作用が効かなくなるためである。また、特定のイオンやpH変化によって、分子のもつ電荷が変化することで崩壊するような超分子ヒドロゲルも多数報告されている⁽²⁻⁴⁾ (図1B)。しかしながら、このような単純な刺激に対し、生体内に存在するような複雑な構造をもつ分子に“特異的に”応答するような超分子ヒドロゲルの設計は困難であった。たとえば、グルコースとガラクトースを見分けるといえるのは、いわゆる分子認識の観点からも困難であり、仮にそのようなホスト分子を見つけ出したとしても、ゲル化剤分子の骨格に導入するのは有機合成上困難

図1 ■ (A) 超分子ヒドロゲルの形成メカニズム；(B) これまでに開発された刺激応答性超分子ヒドロゲルの例

図2 ■ (A) BPmoc-F₂の過酸化水素による分解；(B) BPmoc-F₂の自己組織化と過酸化水素による構造体の崩壊；(C) BPmoc-F₂ゲルの過酸化水素によるゾル化；(D) グルコースオキシダーゼを内包したBPmoc-F₂ゲルのグルコース添加によるゾル化

であることに加え、ゲル化を阻害してしまうといった問題が生じる。そこでわれわれは発想を変え、高い基質特異性をもつ酵素反応と化学反応性の超分子ヒドロゲルとを組み合わせることによって、生体内に存在し、疾病の指標となるような分子（バイオマーカー分子）に応答する超分子ヒドロゲルの作製を目指した。

具体的に、われわれは以下のような仕掛けを考案した。酸化酵素（オキシダーゼ）は、基質を酸化する際に副生成物として過酸化水素を生成する。そこで、過酸化水素と反応する超分子ヒドロゲルにオキシダーゼを内包することとした。ここに、オキシダーゼの基質を添加すると、基質の酸化→過酸化水素の放出→ゲル化剤の分解→ゲルの崩壊へとつながるのではないかと考えた。そこでまず必要となるのが、過酸化水素に応答する超分子ヒドロゲルである。われわれは、過酸化水素応答性の保護基として知られている、ボロノフェニルメトキシカルボニル (BPmoc) 基をゲル化剤分子に導入することとした。このBPmoc基は過酸化水素によって酸化され、フェノールへと変換される。さらに、脱離反応と脱炭酸を経て、キノンメチドとアミンに分かれる。このような劇的な分子構造の変化によって、ファイバー形成に必要な分子間相互作用が失われ、ゲルが崩壊すると考えた。スクリーニングを行った結果、フェニルアラニン (F) を導入した分子 (BPmoc-F₂) が最初にゲル化剤として得られた⁽⁵⁾ (図2A)。このゲル化剤は水中でゲルを形成し、過酸化水素に応答して崩壊することがわかった (図2B, C)。また、ゲル調製の際にグルコースオキシダーゼ (GOx) を添加すると、活性を失うことなく内包することができ、さらにグルコース添加することによってゲル

が崩壊することも明らかとなった (図2D)。しかしながら、この第一世代のゲル化剤BPmoc-F₂は弱酸性下 (pH 5~6)、高濃度条件でのみゲル化することから、グルコースオキシダーゼ以外のオキシダーゼの活性を保ったまま内包することはできなかった。また、生体内に存在するよりも圧倒的に高い濃度のグルコースを加えないとゲル-ゾル転移が起こらないという課題もあった。そこで、低濃度・中性条件下でもゲルを形成する化合物の探索を行った。数多くの化合物の中から、フェニルアラニンの一つ増やした化合物 (BPmoc-F₃) が得られた⁽⁶⁾ (図3A)。興味深いことに、フェニルアラニンの一つ増やしただけにもかかわらず、38倍低濃度でもゲルを形成することが明らかとなった。これにより、グルコースオキシダーゼを内包したゲルは第一世代のゲルよりも大幅に低濃度のグルコースに応答するようになった。また、中性条件下でゲルを形成するために、グルコースオキシダーゼ以外にもサルコシンオキシダーゼ (SOx)、コリンオキシダーゼ (COx)、尿酸オキシダーゼ (UOx) などの活性を保持したまま内包することができた。そして、内包したオキシダーゼに対応する基質分子に特異的に応答してゲル-ゾル転移を起こすことが明らかとなった (図3B)。すなわち、用いるゲル化剤は1種類であるが、内包する酵素を変更するだけで、さまざまな生体分子（いずれもバイオマーカー）に対する応答性をもたせることができた。さらに、低濃度でゲルを形成するため、ゲルを崩壊させるのに必要なH₂O₂の量も少量で済むようになり、バイオマーカー分子を検出する感度も向上した。実際にBPmoc-F₃をチップ上にアレイ化し、血漿サンプルを添加し、洗浄すると、12mM以上

図3 ■ (A) BPmoc-F₃の構造式；(B) オキシダーゼを内包したBPmoc-F₃ゲルのバイオマーカー応答；(C) グルコースオキシダーゼを内包したBPmoc-F₃ゲルによる血漿グルコース検出

のグルコースを含む血漿サンプルをのせた場合にゲルは洗い流され、将来的には目視による簡便な診断ツールへと応用できる可能性が見いだされた（図3C）。

われわれは、この化学反応性のペプチドゲルと酵素反応とを組み合わせるというアイデアがほかの酵素反応に対しても適用できるのではないかと考えて、*p*-ニトロフェニル基を導入したゲル化剤（NPmoc-F₂）を作製した（図4A）。得られたゲルは還元剤であるチオ硫酸ナトリウムに反応して崩壊することが明らかとなった。また、ニトロ基還元酵素（NR）を内包することによって、その補因子であるNADHに対する応答性を示すことも

図4 ■ (A) NPmoc-F₂の構造式；(B) NRを内包したNPmoc-F₂ゲルのNADH添加によるゾル化

見いだされた（図4B）。生体内ではさまざまな酵素がNAD⁺をNADHへと還元することが知られている。これを利用することで、NPmoc-F₂の刺激応答性も拡張することができる。たとえば、乳酸脱水素酵素（LDH）をNAD⁺、NRと一緒にNPmoc-F₂に内包することで、乳酸に反応しゲルが崩壊することがわかっている。これは、乳酸がLDHによって酸化されるのと同時にNAD⁺をNADHへと還元し、そのNADHを利用することでNRがNPmoc-F₂を還元するということである。このように、酵素反応を段階的に利用することによって、単純な分子認識ではなしえないような応答性を実現することができた。

われわれが今回考案した刺激応答性ゲルの設計戦略は、酵素反応だけでなく、ほかの反応にも応用できると期待された。われわれは、ペプチドのN末端に二光子励起に反応し、脱離するDMACmoc基を導入した化合物を設計・合成した⁷⁾（図5A）。作製したペプチドライブラリーの中から、ゲルを形成する化合物（DMACmoc-FF(CF₃））を見いだした。このDMACmoc-FF(CF₃）

図5 ■ (A) DMACmoc-FF(CF₃）の光反応；(B) DMACmoc-FF(CF₃）ゲルの二光子励起によるマイクロ加工、スケールバーは20μm；(C) ゲルに内包した大腸菌の遊走の光制御

で作製したゲルは、近赤外光 (740nm) を用いたフェムト秒パルスレーザーによって、10マイクロメートルスケールでの光加工が可能であった (図5B)。さらに、ゲルに大腸菌を内包し、レーザー照射を行ったところ、ゾル化させた空間のみにおいて遊走が起こることが明らかとなった (図5C)。すなわち、この二光子励起応答性超分子ヒドロゲルは“局所的”かつ“低毒性”な光加工が可能なマトリクスであることを実証した。最近では、細胞が自らの周囲の力学的な環境を認識することが知られてきている。そのため、本系のように外部刺激によって局所的に硬さや流動性を制御することのできる材料は、細胞機能の解明や組織工学などへの応用が期待される。

以上のように、われわれは超分子ヒドロゲルに化学反応を組み込むことによって、さまざまな刺激に対する応答性を付与することに成功した。われわれの考案した分子設計指針は汎用性が高く、N末端に導入する反応基を変更することで、応答する刺激を変更することが期待できる。また、超分子ヒドロゲルに内包する酵素の選択によって化学反応からバイオマーカー分子への応答性へと拡張することができた。このような超分子ヒドロゲルはバイオマーカー分子の目視による簡便な検出や周囲の環境に依存した“能動的”な薬剤放出が期待される。しかしながら応用に関しては、超分子ヒドロゲルは一般に力学的強度が低いことやゲル-ゾル転移に必要なバイオマーカーの濃度が高いことなど、課題もある。前者に関しては超分子ヒドロゲルを他材料とハイブリッドすることによって高強度を実現した例などがあり、克服されつつある⁽⁸⁾。後者に関しても、シグナル増幅系などをゲルに内包するなど、今後の検討で改善されうると考えられる。

文献

- 1) 日本化学会編：“驚異のソフトマテリアル”，化学同人，2010.
- 2) S. Matsumoto, S. Yamaguchi, S. Ueno, H. Komatsu, M. Ikeda, K. Ishizuka, Y. Iko, K. V. Tabata, H. Aoki, S. Ito *et al.*: *Chemistry*, **14**, 3977 (2008).
- 3) H. Komatsu, S. Matsumoto, S. -i. Tamaru, K. Kaneko, M. Ikeda & I. Hamachi: *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 5580 (2009).
- 4) J. P. Schneider, D. J. Pochan, B. Ozbaz, K. Rajagopal, L. Pakstis & J. Kretsinger: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 15037 (2002).
- 5) M. Ikeda, T. Tanida, T. Yoshii & I. Hamachi: *Adv. Mater.*, **23**, 2819 (2011).
- 6) M. Ikeda, T. Tanida, T. Yoshii, K. Kurotani, S. Onogi, K. Urayama & I. Hamachi: *Nat. Chem.*, **6**, 511 (2014).
- 7) T. Yoshii, M. Ikeda & I. Hamachi: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 7392 (2014).
- 8) D. Kiriya, M. Ikeda, H. Onoe, M. Takinoue, H. Komatsu, Y. Shimoyama, I. Hamachi & S. Takeuchi: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 1553 (2012).

プロフィール

吉井 達之 (Tatsuyuki YOSHII)

＜略歴＞2014年京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻博士課程修了／同年日本学術振興会特別研究員 (PD) ＜研究テーマと抱負＞超分子バイオ材料＜趣味＞野球観戦とトレーニング＜所属研究室ホームページ＞<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/hamachi-lab>

浜地 格 (Itaru HAMACHI)

＜略歴＞1988年京都大学大学院工学研究科博士課程修了／同年九州大学助手／1992年同助教授／2001年同教授／2005年京都大学教授，現在に至る＜研究テーマと抱負＞生命化学，生細胞有機化学，超分子バイオ材料＜趣味＞ホークスの応援と神社仏閣巡り＜所属研究室ホームページ＞<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/hamachi-lab>

Copyright © 2015 公益社団法人日本農芸化学会