論文特集「高機能両親媒性化合物の合成とその高次構造」——総合論文——

(日本化学会誌, 1990, (10), p.1153~1161)

© 1990 The Chemical Society of Japan

ポリペプチドドメインをチャネルとしてもつ高分子膜

——安定な生体膜モデル——

(1990年5月29日受理)

前田 瑞夫**・井上 祥平*

生体膜のもついちじるしい特徴であるモザイク構造, ならびにそこで特異的な透過機能を司る膜タンパク質の立体構造とその変化に着目し, 新しい生体膜類似機能性高分子膜を設計した。ビニル-ペプチドグラフト共重合体を新たな手法で合成し膜とした。この膜は安定なビニルポリマー膜中に親水性ポリペプチドにより成る溶質透過経路(チャネル)を有していることが明らかとなった。IR, CD スペクトルによる検討から, チャネルを構成するポリペプチドは pH に応答して可逆的な立体構造変化を示すことがわかった。またこれに対応して, 膜透過性が可逆的に変化した。生体内で二次的メッセンジャーとして働くカルシウムイオンやタンパク質の変性剤として知られている尿素に対してもこの膜は応答した。また, ある種の界面活性剤に対しては, その構造を認識した応答挙動がみられた。糖質に対する選択的透過性を示すことも明らかにされた。ポリペプチドドメインをもつこの新しい生体膜モデルについて, その生体類似機能をまとめた。

1 緒 言

生体膜の主要な構成成分であるリン脂質は代表的な両親媒性物質であり, その集合体が形成する高次構造すなわち脂質二分子膜が生体膜の主体となっている。これにより細胞の内と外の仕切りが確立される。脂質膜内部は疎水性であり, 実質的に水溶性物質を透過させることはない。しかるに一方, 生体膜は特定の物質を膜内外で出し入れする仕組みをもっている。その中心的な役割を果たしているのは, 脂質二分子膜中に埋め込まれた膜タンパク質である。ゲートやチャネルと呼ばれるある種のタンパク質はその内部に親水性の「孔」を有しており, これが水溶性基質に対する膜透過経路となっている。このように, 生体膜の透過機能に関しては, 個々の構成分子の両親媒性よりも, 集合体・複合体として見た場合の親・疎水部の不均一性すなわち膜の高次構造上の「両親媒性」が重要であると言える。

著者らは生体膜のもつこの親水部・疎水部から成るモザイク構造に着目し, 新しい生体膜モデルを設計した¹⁾。親水性ポリペプチドのつくる透過孔(チャネル)をもった安定な高分子膜がそれである。この手法により人工膜に生体類似の機能を付与することを目的に, 一連の研究を進めてきた²⁾。本稿では通常の意味での両親媒性化合物とは異なり, 機能に直結した高次構造上の「両親媒性」を新しい生体膜モデルの設計に取り入れた著者らのアプローチについて紹介する。

本研究で合成された高分子膜は上述の構造的な類似性に加え,

東京大学工学部, 113 東京都文京区本郷

** 現在 九州大学工学部, 812 福岡市東区箱崎

1) M.Maeda, M.Kimura, Y.Hareyama, S.Inoue, J. Am. Chem. Soc., 106, 250(1984).

以下に述べるいくつかの点で生体膜類似の特徴を有している。

- 1) 膜タンパク質モデル: 生体膜の特異的な透過機能を司る膜タンパク質のモデルとして, 親水性の合成ポリペプチドを透過機能(チャネル)部位に用いている。
- 2) 機能の分業(マイクロドメイン構造): この合成ポリペプチドからなる集合体ドメインが丈夫な疎水性(非透過性)ビニルポリマーで取り囲まれており, 安定な膜となっている。すなわち, 膜透過機能と形態保持機能が分業化されている。
- 3) 特異的な刺激受容(レセプター)機能: この膜中において合成ポリペプチドはある種の化学物質に特異的に応答して可逆的な高次構造変化を示す。
- 4) ゲート機能: この高次構造変化に対応して, 膜透過性が可逆的に変化する。
- 5) 選択的透過機能: この膜は大きさの異なる糖質に対し, 透過選択性を有している。また, その選択性を外部刺激により制御することができる。

2 新しい生体膜モデルの設計

2.1 ミクロドメイン構造

複数種のセグメントから成るブロックあるいはグラフト共重合体(これらを総称して多相系高分子と呼ぶ)を溶液状態からキャスト製膜すると, 同種のセグメントが互いに凝集してドメインを

- 2) a) 前田瑞夫, “バイオ・高分子機能デザインと高分子化学”, バイオ・高分子研究会編, 学会出版センター(1989) p.69.
b) 前田瑞夫, “アミノ酸ポリマー”, 遠藤 剛編, シーエムシー(1988) p.180.
c) 前田瑞夫, 化学と工業, 42, 270(1989).

形成し、膜は両セグメントがマイクロに相分離した状態となることが知られている³⁾。形成されるマイクロドメイン構造は、例えば A, B 二成分系について考えてみると、A 成分の分率が増加するにしたがって B 成分の中に A の球状ドメインが分散した形から、シリンダー（円柱）状、ラメラ（層）状といった A の連続相を経て、ついには逆に A 成分が B の球状ドメインを取り囲むような形態へと変化することが知られている。したがって、親水性と疎水性の両成分から成る多相系高分子の膜は、生体膜の構造的モデルと見ることができよう。生体膜あるいは機能膜に関連したこのマイクロドメイン構造の応用例をいくつか挙げる。

親水性鎖と疎水性鎖からなるブロック共重合体が合成され、人工血管用材料としてその抗血栓性が調べられている⁴⁾。血中の血小板が材料表面に粘着する際、表面のマイクロドメインの化学構造や大きさがいちじるしい影響を与えることが明らかにされた。10² Å オーダーのマイクロドメイン構造がきわめて重要であることから、血小板の膜がもつ微細構造との対応が示唆されている。これはマイクロドメイン構造を有する材料の表面を利用した例である。

透過膜として用いる場合は、膜内部のドメイン構造が重要となる。藤本らはポリイソブレン (I), ポリスチレン (S), ポリ (N,N-ジメチル-4-ビニルベンジルアミン) (A) からなる三成分五元ブロック共重合体 ISIAI を合成し、A ドメインを四級化、S ドメインをスルホン化することによりモザイク荷電膜を調製した⁵⁾。この膜はカチオン性ドメインとアニオン性ドメイン（ともに親水性である）が電気的に中性の疎水ドメイン (I より成る) により互いに絶縁された構造を有している。篠原らはポリ (2-ヒドロキシエチル=メタクリレート) (H) とポリ (メチル=アクリレート) (M) から成るブロック共重合体膜を用い、ベンゼン-シクロヘキサンの共沸混合物の膜分離に成功している。ベンゼンは M ドメインに溶解するがシクロヘキサンはしない。しかし、単なる M の橋かけ膜では膨潤のためシクロヘキサンも透過してしまう。ブロック共重合体膜では H ドメインが M ドメインを取り囲みその膨潤を抑制するため、ベンゼンのみが選択的に透過すると考察されている。以上二つの例では溶質を透過させるべきドメインが膜中で連続的に形成されていると考えられている。

著者らは、膜タンパク質モデルである合成ポリペプチドと丈夫なビニルポリマーから成る多相系高分子を用い、安定な高分子膜中に親水性のポリペプチドドメインを形成させることにした¹⁾。ここで強調しておきたいのは、上述の 2 例が透過性ドメインのバルクとしての性質を利用しているのに対し、本研究では次節に述べるとおり、ポリペプチドのダイナミックな特性を活かすことを目的にこの様な設計がなされたという点である²⁾。

2.2 膜タンパク質モデルとしての合成ポリペプチド

合成ポリペプチドはタンパク質の構造的モデルとして古くから詳細に検討されてきたが、加えて合成皮革や繊維、機能材料への応用も盛に試みられてきた⁷⁾。また膜への応用も主にその立体構

造の寄与を調べる目的で研究が進められている⁸⁾。

しかし、ポリペプチドのもつ最もいちじるしい特徴のひとつである、外部環境に応じた可逆的な高次構造変化を膜の機能制御に利用する研究はほとんどなかった。

木下らは、pH による可逆的な高次構造変化を起こすことが知られているポリ (L-グルタミン酸) (PGA) に着目し、これを橋かけして得た膜について塩化カリウムやショ糖の透過性におよぼす pH の影響およびその高次構造変化との関係について報告している⁹⁾。木下らはまた、多孔膜の細孔内に PGA を安定に吸着させることに成功している¹⁰⁾。この場合も、外部 pH に応じて PGA が高次構造変化を起こし、それに応じて透水性が変化したという。これらの研究は、合成ポリペプチドの立体構造変化を用いて膜透過性を制御しうることを示した点で重要である。しかし、ペプチド鎖間の橋かけあるいは多孔膜への（おそらく多点での）吸着という様式でポリペプチドを膜に固定化しているため、溶液中で観察される自由な構造変化は、膜中においてはかなり制限を受けることになると思われる。

これに対し、前節で述べた多相系高分子のつくるマイクロドメイン構造を利用した著者らの方法では、膜タンパク質モデルである親水性ポリペプチド鎖はその末端で膜に結合しているだけなので、主鎖の運動性はある程度自由を保っていると期待される。

2.3 ポリペプチドを含む多相系材料

ポリペプチドを一成分としたブロック共重合体について Gallot らの広範な研究がある¹¹⁾。特に親水性のポリペプチドと疎水性のビニルポリマーから成るブロック共重合体は生体膜中の内在性タンパク質と関連して興味深いとの指摘がなされている。膜タンパク質は両親媒性物質であり、疎水性アミノ酸残基の集まった部分は脂質二分子膜中に埋め込まれているのに対し、親水性の部分は膜表面から突き出ている。したがって、親水-疎水のブロック共重合体は膜タンパク質のモデルとなりうると述べられている。しかし、彼らの研究は合成とキャラクタリゼーションが中心であり、生体膜モデルに関しての具体的な展開は行われていない。

中島らはポリペプチドを一成分とする一連のブロック共重合体を合成し、主にマイクロドメイン構造に関連した物性を詳しく調べている¹²⁾。膜としての特性も力学的性質、水透過性、表面特性などの観点から研究されているが、そこでは疎水性のポリペプチドのみが用いられており著者らの研究とは興味が異なっている。加えて以上の 2 例においてはペプチド鎖の可逆的な立体構造変化には関心がはられていない。

これに対し著者らの設計した膜では、疎水性のビニルポリマー膜中に親水性ポリペプチドの連続相が形成される。このポリペプチドドメインは水系で溶質透過経路（チャンネル）として作用する。しかも、チャンネル内のポリペプチドは本来水溶性のうえ、末端がビニルポリマーに結合しているだけなので、ほとんど水に溶けた状態として比較的自由な高次構造変化が可能である。疎水性で丈夫なビニルポリマーはこれを取り囲む形で膜の構造保持に寄

3) “ポリマーアロイ”，高分子学会編，東京化学同人（1981）。

4) 岡野光夫，片岡一則，“バイオマテリアルサイエンス”，第 2 集，鶴田慎二，桜井靖久編，南江堂（1982）p. 57。

5) 宮木義行，藤本輝雄，膜，8，212（1983）。

6) J. Terada, T. Hohjoh, S. Yoshimasu, M. Ikemi, I. Shinohara, *Polym. J.*, 14, 347（1982）。

7) 藤本康夫編，“ポリアミノ酸”，講談社（1974）。

8) 前田瑞夫，井上祥平，膜，10，328（1985）。

9) 木下隆利，滝澤 章，辻田義治，日化，1983，868。

10) 木下隆利，滝澤 章，表面，22，217（1984）。

11) B. R. M. Gallot, *Adv. Polym. Sci.*, 29, 85（1978）。

12) 林 寿郎，中島章夫，“機能性有機薄膜”，日本化学会編，学会出版センター（1984）p. 39。

3 ビニル/ペプチドグラフト共重合体膜

ビニルポリマーとポリペプチドから成る多相系高分子としては、ブロックとグラフトの二つのタイプが考えられる。本研究では安定な生体膜モデルの構築を目指し、グラフト形を採用することにした。グラフト形では幹部の性質がより強く反映されると言われており、幹成分としてビニルポリマーを用いれば強度を保つのに適していると考えられる。

本研究では共重合ビニルモノマーとしてブチルメタクリレートを用いた。そのポリマーが優れた力学的強度を有することが知られているからである。アゾ開始剤を用いた1とのラジカル共重合によりアミノ基をもつビニルポリマー、すなわち幹ポリマーが得られる。

得られたグラフト共重合体の枝鎖はこのままでは疎水性であり、次のステップとして保護基をはずす必要がある。しかし、これにより生成する両親媒性ポリマーは通常の溶媒には溶解しにくいと考えられる。そこで、脱保護反応は製膜後に行った。

前節で合成した共重合体はクロロホルム溶液からキャストすることにより、無色透明の丈夫な膜となる。透過実験に用いる場合は通常、0.15 g のポリマーを 4 ml のクロロホルムに溶解し、直径 5.7 cm のフラットシャーレ上にキャストし、常圧常温で一晩

IR スペクトル測定に用いる薄膜（フィルム）は 0.07 g のポリマーを 10 ml のクロロホルムに溶解し直径 9.7 cm のシャーレにキャストした。前者の膜厚は約 40 μm 、後者は約 3 μm であった。後で議論するように適当な組成のポリマーであれば、いずれの場合にも容易に膜をシャーレからはがすことができ丈夫な膜を得ることができる。

3.3 グラフト共重合体の組成と膜構造¹³⁾

一方、ポリペプチドを含むグラフト共重合体では、膜の組成が透過性と膜の強度にいちじるしい影響を与えていることが表1からわかる。組成のパラメーターは枝鎖分枝率 α と枝鎖（ポリペプチド）重合度 γ の二つである。ここでは、これから計算されるペプチド含率（ブチル=メタクリレートとアミノ酸の各モノマー単位について考えたときのアミノ酸のモル分率）を指標として議論する。

表中, No. 4, 5, 8, 9 の膜では, 優れた力学的強度を保ったまま膜は塩透過性を示した。No. 4 の膜 (ポリアスパラギン酸枝鎖分枝率, 4.8%; 重合度, 21) について膜断面の超薄切片を (0.1 μm 厚) を作成し透過型電子顕微鏡で観察したところ, 膜面に垂直な方向に縞状の構造が観察された。同様な構造が表面近傍でも

- 13) S. Higuchi, T. Mozawa, M. Maeda, S. Inoue, *Macromolecules*, **19**, 2263(1986).
- 14) M. Maeda, Y. Nitadori, T. Tsuruta, *Makromol. Chem.*, **181**, 2251(1980).
- 15) M. Kimura, T. Egashira, T. Nishimura, M. Maeda, S. Inoue, *ibid.*, **183**, 1393(1982).
- 16) a) M. Maeda, S. Inoue, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **2**, 537(1981).
b) N. Ishiyama, D. Chung, M. Maeda, S. Inoue, *Makromol. Chem.*, **190**, 2417(1989).
- 17) M. Maeda, M. Aoyama, S. Inoue, *Makromol. Chem.*, **187**, 2137(1986).

Table 1 Composition and permeability of graft copolymer membranes

No.	Composition ^{b)}			Peptide content ^{c)} unit mol (%)	Permeability for Na ⁺ after hydrolysis ^{d)}
	<i>n</i>	% bran- ching <i>x</i>	$\overline{DP}$ of branch <i>y</i>		
1 ^{a)}	—	0	0	0	no
2	1	3.5	13	32	no
3	1	10	8	47	yes
4	1	4.8	21	50	yes
5	1	10	21	70	(too brittle)
6	2	1.2	19	18	no
7	2	1.2	28	25	no
8	2	3.5	10	28	yes
9	2	3.8	16	39	yes
10	2	12	7	45	(dispersed in water)
11	2	12	13	60	(dispersed in water)

a) Poly(butyl methacrylate) homopolymer.

b) See the scheme.

c) Calculated from *x* and *y*.

d) For NaCl in water.

膜内部においても常に見られることから、膜内全域にわたって規則的なシリンダー状もしくはラメラ状のマイクロドメイン構造が形成されているものと考えられる。一方、これらの膜においては側鎖ベンジルエステルの加水分解反応もほぼ定量的に進行することが明らかとなっている¹⁷⁾。グラフト共重合体フィルム（約 3 μ m 厚）の IR スペクトルを測定すると、一置換フェニル基に帰属される 695 cm^{-1} の吸収が加水分解処理後にはほぼ完全に消失していた。また膜から遊離してくるベンジルアルコールを回収、定量すると、脱ベンジル化率 80~90% という値が得られた。

このように、適当なペプチド含有率をもつ膜ではビニルポリマー膜中に膜の裏表で通じたポリペプチド連続相が形成され、脱ベンジル化処理が円滑に進行するとともに、生成する親水性ポリペプチドドメインはその後、膜の透過経路（チャンネル）として作用していると考えられる。この膜は次章以下で述べる一連の実験に対し、数か月にわたって再現性よく可逆的な応答を示した。透析型セルで行うかぎり、特別な支持体は必要ではなく、非常に安定な膜である。

一方、ペプチド含有率が不適当であると透過膜としてうまく作用しなかった。ペプチド含有率が低い場合（No. 2, 6, 7）は加水分解処理後もまったく透過性を示さない。同組成のフィルムの IR を測定するとアルカリ処理後も 695 cm^{-1} の吸収が 1/3 程度の強度で残っていた¹⁸⁾。この場合はポリペプチド相がビニルポリマー膜中で球状のドメインを形成しこれらが不連続となるため、加水分解が内部まで進行しなかったと考えられる。このため膜の表裏で貫通した溶質透過経路は形成されず、膜は透過性を示さなかったのであろう。逆にペプチド含有率が高い膜（No. 5, 10, 11）では加水分解処理により膜が分散崩壊してしまった。この場合は膜中でポリペプチドが主成分となり、逆にビニルポリマードメインが球状・不連続となるため、ビニルポリマーが支持相としての役割を十分果たしていないと考えられる。このため、脱ベンジル化によってポリペプチド鎖が水溶性となるのにもない膜が水中に分散したのだと考えられる。

以上のように、適切な分子設計を行えば水溶性ポリペプチドから成る溶質透過ドメインを安定なビニルポリマー膜中に形成させることが可能である。

4 ポリペプチドドメインの機能

4.1 可逆的立体構造変化

表 1 の No. 4 のポリマーについて IR 用のフィルムをつくり脱保護を行った。各 pH の緩衝液で処理した後、IR スペクトルの測定を行った（図 1）¹³⁾。pH 5 以上で 1600 cm^{-1} のカルボキシル

Fig. 1 Infrared spectra of the film from No. 4 after hydrolysis, pretreated in buffer solutions with various pH.

pH; 1, pH 1.0; 2, pH 1.8; 3, pH 2.6; 4, pH 3.6; 5, pH 4.2; 6, pH 5.0; 7, pH 5.7; 8, pH 6.5; 9, pH 7.3

ートの吸収が現れるとともに、アミドVバンドに帰属される吸収が 630 cm^{-1} から 670 cm^{-1} にシフトしている。この変化はポリ(L-アスパラギン酸)の α -ヘリックス構造からランダムコイル構造への転移にともなう IR 吸収位置の変化¹⁹⁾と一致している。したがって膜中においてポリペプチド鎖の構造が α -ヘリックスからランダムコイルへと変化していると考えられる。

pH 変化にともなう膜中のポリペプチドの高次構造変化は、円偏光二色性 (CD) スペクトルによっても確かめることができる¹²⁰⁾。IR 用と同様の操作で薄いフィルムをつくり、これを石英板 (5 mm 厚) 上に貼りつけた。これを所定の加水分解処理ならびに酸ないしはアルカリで前処理した後、純水で満たした光路長 1 cm の石英セル中に浸漬して CD スペクトルを測定した。No. 9 の共重合体を用いた場合の結果を図 2 に示す。加水分解処理を行う前は、グラフト共重合体膜は 226 nm に負のピークを示している。これはポリ(L-グルタミン酸 γ -ベンジル) がフィルム状態で右巻き α -ヘリックス構造をとっているとき²¹⁾と同様のスペクトルである。加水分解処理後、pH 2 の緩衝液で前処理を行うと、膜の CD スペクトルのピーク位置は 223 nm にシフトする。この位置は PGA が酸性水溶液中で α -ヘリックス構造をとっているときと同じである²²⁾。ただし、ピーク位置での精円率は加水分解前にくらべ約 30% に減少した。これを pH 7 の緩衝液で前処理

Fig. 2 Circular dichroism spectra of the film from No. 9

1: Before hydrolysis, 2: After hydrolysis, at pH 2, 3: After hydrolysis, at pH 7, 4: After hydrolysis, at pH 2, 5: After hydrolysis, at pH 7
Numbers represent the order of measurement

- 19) V. Sandek, S. Stokrova, P. Schmidt, *Biopolymers*, 21, 1011(1982).
- 20) D. Chung, S. Higuchi, M. Maeda, S. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 5823(1986).
- 21) W. L. Sederel, A. Bantjes, J. Feijen, *Biopolymers*, 19, 1603(1980).

すると、ピークはいちじるしく小さくなった。この結果は膜中の PGA 鎖の α -ヘリックスからランダムコイルへの構造変化を示している。以上の変化は図 2 に示すとおり、ほぼ完全に可逆的であった。

以上のように、固体膜中におけるポリペプチドの二次構造を外

4.2 膜透過性の制御

3.3 で述べたように、親水性ポリペプチドの連続相が膜中で溶質透過経路 (チャンネル) として働いていると考えられることから、前節で証明されたポリペプチド鎖の二次構造変化は直接、膜透過性に反映されると期待される。そこで各 pH の緩衝液中で透過性を調べてみた¹⁹⁾。

実験に先立ち、2 日間所定 pH の緩衝液でセルの両側を満たすという操作を行い、膜の状態を平衡に達するようにした。透過基質としては、高分子電解質であるポリペプチドの荷電の影響 (イオン間の相互作用) を直接受けないよう、非イオン性の水溶性物質であるスチレングリコール (1-フェニル-1,2-エタンジオール) を用いた。この物質は非イオン性ながら水溶性であり、また UV スペクトルにより容易に定量することができる。この膜の透過ドメインが L-体のアミノ酸から成る不斉の場合であり、光学異性体の透過挙動に興味があることも、この化合物を選んだ一因である。

No. 4 の共重合体から調製した膜についてスチレングリコールの透過速度と pH の関係を示したのが図 3 である。透過速度は pH に対しグモイド状に変化し、pH 4.4~5 付近においていちじるしい変化を示した。その変化は pH 2 と pH 7 の間で 20 倍以上に達した。このように膜中でのポリペプチドの二次構造変化に対応して膜の溶質透過性がいちじるしく変化することが明らかとなった。

高分子電解質を用いた刺激応答性の膜としては、ポリ(アスパラギン酸)や PGA と同様ポリカルボン酸であるアクリル酸誘導体を用いた例がある。長田らは、多孔膜上にポリ(メタクリル酸)を高密度にグラフトし、その立体構造変化を利用して膜の透水性を制御した²³⁾。岡畑らは同じくポリ(アクリル酸)誘導体を、今度

Fig. 3 Rate of permeation of styrene glycol across membrane No. 4 after hydrolysis, in buffer solutions with various pH at 30°C

- 22) G. Holtzwarth, P. Doty, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 218(1965).

はナイロンカプセル上にグラフトし、カプセル内容物の放出制御に応用している²⁴⁾。関連する研究を今西らがまとめている²⁵⁾。

5 様々な生体膜類似機能

5.1 二価イオン応答性¹⁷⁾

生体内で二次的メッセンジャーとして働いていることが知られるカルシウムイオンに対し、このグラフト共重合体膜は透過性変化という形で応答する。結果を図4に示す。あらかじめ水酸化ナトリウム水溶液で前処理した膜では、PGA鎖はその側鎖がカルボキシレート形となっており、ランダムコイル状構造をとっている。透過実験を始めて1時間後に塩化カルシウム水溶液を添加したところ、これに対応して透過速度の減少が見られた。これは解離しているカルボキシレートをカルシウムイオンがイオンの橋かけするためであると考えられる。この際、膜内において α -ヘリックス構造が誘起されていることがCDスペクトルにより確かめられている²⁶⁾。

膜に結合したカルシウムイオンはEDTAにより取り除くことができ、透過速度は再び増加した。塩化カルシウムの代わりに塩化カリウムを加えても透過性はまったく変化しないことから、これは二価陽イオンに特有な現象と考えられる。

5.2 分子認識機能

この膜は分子の構造を認識して、応答の度合を変えるという機能を有している。構造の異なる一連の長鎖アルキルアンモニウム塩が膜の透過性におよぼす影響を調べたところ、それが明らかになった²⁷⁾²⁸⁾。

3種のアンモニウム塩、ドデシルアンモニウムクロリド ($C_{12}N^+$)、ドデシルジメチルアンモニウムクロリド ($C_{12}N^+ 2C_1$)、ド

Fig. 4 Reversible premeability regulation of styrene glycol across the membrane ($n=2$; degree of branching, 4%; $\overline{DP}$ of branch, 15) using 2 cm^3 of 0.05 M CaCl_2 aq. and 2 cm^3 of 0.1 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) aq.

デシルトリメチルアンモニウムクロリド ($C_{12}N^+ 3C_1$) はいずれも、アルカリ前処理した膜の溶質透過性を減少させるが、その影響の程度は $C_{12}N^+ 3C_1 < C_{12}N^+ 2C_1 < C_{12}N^+$ の順に大きくなった。ほぼ同じ炭素数をもつテトラブチルアンモニウム塩では透過性にまったく影響はない。CDスペクトル測定によると、これら3種のアンモニウム塩はいずれも膜中のPGA鎖のヘリックス構造を誘起し、その度合は上述の透過性に与える影響の順位と同じであった²⁷⁾。

一方、同じアルキルトリメチルアンモニウム構造についてアルキル鎖長の影響を調べたところ、以下のような現象が見られた²⁸⁾。アルカリ前処理した膜 (PGA鎖はランダムコイル状態) ではデシル (C_{10})、ドデシル (C_{12})、テトラデシル (C_{14}) ではヘリックス構造が誘起されるのに対し、ヘキサデシル (C_{16})、オクタデシル (C_{18}) ではCDスペクトルに有意な変化は現われなかった。一方、酸前処理した膜 (PGA鎖は α -ヘリックス構造) では C_{16} 、 C_{18} がランダムコイルへの転移を促すのに対し、 C_{10} 、 C_{12} 、 C_{14} では二次構造に変化はなかった。

膜透過性については、多くの場合、透過性を減少させる方向にこれらアンモニウム塩は作用したが、酸前処理した膜に C_{16} 、 C_{18} を作用させた場合には透過性が逆に増大するという現象がみられた。これら長鎖アンモニウム塩の透過性に与える影響には、二次構造変化とチャネル内の疎水性の増大の両方の寄与があると考えられる。

こうした外部刺激物質の構造に応じた応答の違いは、化学構造を認識する人工レセプターセンサーへの可能性を示唆するものであり、興味深い²⁹⁾。

5.3 透過選択性とその制御

生体膜のもつ厳格な透過選択機能も、生体類似機能膜に求められる条件のひとつである。本研究では大きさの異なるいくつかの糖質についてその透過性を調べた。単糖であるグルコース、三糖であるラフィノース、およびスチレングリコールを比較のために用い、これら3基質の等モル混合水溶液に対し透過実験を行った。ただし、膜はあらかじめ各pHの緩衝液で前処理し、透過実験は純水中で行った。これら三つの基質それぞれについて、透過速度とpHの間に図3と同様のシグモイド状曲線が得られた。次に糖の相対的透過性をスチレングリコールを基準として求め、pHに対してプロットした。結果を図5(a)に示す。スチレングリコールにくらべ、糖質であるグルコースやラフィノースの透過性が低pH領域で大幅に低下していることがわかる。低pH領域においてはペプチド側鎖が非解離の状態となり、透過チャネル内が比較的疎水性の場となる。このため親水性の糖質はスチレングリコールにくらべ、より透過しにくくなったと考えられる。

一方、このデータをグルコースを基準に整理し糖質間で比較すると、図5(b)に示すように分子径の大きいラフィノースの相対的透過性が低pH領域で減少している。糖質間では親水性は同程度であると考えられるので、この変化は透過チャネル内の疎水性の増加というよりむしろ、高次構造の変化に基づくものであると考えられる。

5.4 透過チャネルの変性³⁰⁾

尿素はタンパク質の変性剤として知られ、その作用はしばしばタンパク質の高次構造変化ならびに機能変化をもたらす。合成ポ

- 23) 太田 克, 長田義仁, 高分子学会予稿集, 32, 1431(1983).
- 24) Y. Okahata, K. Ozaki, T. Seki, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1984, 519.
- 25) 今西幸男, 伊藤嘉浩, 化学, 43, 764(1988).
- 26) 青山真人, 井上祥平, 未発表データ.
- 27) D. Chung, K. Kurosawa, M. Maeda, S. Inoue, *Makromol. Chem.*, 189, 2731(1988).
- 28) D. Chung, K. Tanaka, M. Maeda, S. Inoue, *Polymer J.*, 20, 933(1988).

- 29) 前田瑞夫, 高木 誠, 化学, 44, 620(1989).

Fig. 5 Relative permeability of glucose (G), raffinose (R), and styrene glycol (S) in the mixed system of S, G, and R across the membrane No.9; change in pH from high to low (○, □) and from low to high (●, ■)

(a): S as the reference, (b): G as the reference

リペプチドから成るドメインを透過チャネルとしてもつ、著者らの生体膜モデルには尿素はどのような作用を示すだろうか。以下に示すように、この生体膜モデルでも、膜タンパク質モデルである透過チャネルの構造変化ならびにそれにともなう機能の喪失が見られたのである。

CD スペクトル測定の結果を図6に示す。酸前処理で α -ヘリ

Fig. 6 Circular dichroism spectra of the film from No. 9 after hydrolysis; treated with (1) 0.1 M HCl, (2) 8 M urea, (3) 0.1 M HCl, (4) 0.1 M NaOH

Numbers represent the order of measurement

ックス構造をとっていた膜中の PGA 鎖が、アルカリ前処理と同様、尿素によってもランダムコイル状態に構造変化を起こしていることがわかる。一方、膜透過性であるが、結果を図7に示す。塩酸前処理した膜（膜中の PGA 鎖は α -ヘリックス構造）を尿素水溶液で処理すると、透過速度が増大することがわかる。この時、PGA 側鎖のカルボキシル基の解離状態はほとんど変化しないことが、IR スペクトルから確かめられている。

次に前節で述べた透過選択性について尿素の影響を調べた。結果を図8に示す。単糖グルコース、二糖ラクトース、三糖ラフィ

Fig. 7 Time-transport curves of styrene glycol across the membrane No.9 after hydrolysis

After treatment with 0.1 M HCl, ((1)(○), (3)(●), (5)(△), (7)(□)), 1 M urea ((2)(▽), 4 M urea ((4)(▲)), 8 M urea ((6)(■))
Numbers represent the order of the permeation experiment

Fig. 8 Relative permeability of lactose (L) and raffinose (R) to glucose (G) as the reference, in the mixed system of styrene glycol, G, L, and R across the membrane No. 9 after hydrolysis; treated with 0.1 M HCl and 8 M urea.

ノースについて相対的な膜透過性を調べ、グルコースを基準にまとめられている。塩酸前処理した膜は、グルコースをラフィノースの約5倍速く透過させるという選択性を示している。ところが膜を8 M 尿素水溶液で処理すると、選択性は大幅に減少した。これは、タンパク質が変性によりその機能を失う現象とよく似ている。その原因が機能をもたらす特定の立体構造が崩壊することにあるのも同様である。

6 透過性制御の機構^{2a)}

以上、ポリペプチドドメインをチャンネルとしてもつ高分子膜について、その生体類似機能をいくつか示してきた。膜透過性が外部刺激により変化する際には必ずポリペプチド鎖の立体構造変化が起きていることがわかる。しかし両者の因果関係は必ずしも単純ではない。

pH 応答性については、ポリペプチド側鎖カルボキシル基の解離にともない透過チャンネル内の親水性が増大するので、透過性におよぼすその影響は無視できない。しかし例えば、5.3 で述べた大きさの異なる糖質の選択性変化については、チャンネル内ポリペプチド鎖の高次構造ならびにその集合体構造の変化が主に支配していると思われる。また5.2 で述べたように、長鎖アルキルアンモニウム塩がチャンネルの疎水性を増加させていると考えられるにもかかわらず溶質透過性が増加する場面が見られた。その時同時にペプチド鎖が α -ヘリックスからランダム構造へと変化していることから、これも構造変化の寄与が明確に示された例と言えるだろう。尿素応答性の場合、5.3 で述べたとおりカルボキシル基の解離状態に変化がみられないことから、主に立体構造の変化が膜透過性に反映していると考えられる。透過性に寄与する因子は複雑でありまた互いに独立ではない。このため単純な理解は難しいが、チャンネルを形成するポリペプチドの立体構造がその因子のひとつであることは確かである。

一方、*N*-(ω -ヒドロキシアルキル)-L-グルタミンから成る親水性ポリペプチドを用いた場合にも、高次構造変化に対応して膜透過性が変化した^{16b)}。この場合、媒質である水中にメタノールを添加することにより高次構造を変化させる。ポリ(*N*-(2-ヒドロキシエチル)-L-グルタミン)を枝鎖としてもつグラフト共重合体膜において、水中でランダムコイル構造をとっていたポリペプチドが水/メタノール 1:1 混合溶媒中では α -ヘリックスの集合体構造へと変換することがCD スペクトル測定により確かめられた。これにともないスチレングリコールに対する膜透過性の減少が見られた。混合溶媒中では溶媒、溶質間の相互作用も同時に変化すると考えられる。しかし、 α -ヘリックス構造をとりえない鎖長の短いポリペプチドを用いた際には、メタノール添加にともない透過性は逆に増加した。したがって、 α -ヘリックスの集合体形成という膜構造の変化が透過性減少の直接の原因であると結論される。このように、イオンへの解離をともなわないポリペプチドを含む膜においても、立体構造変化と対応した透過挙動が見られることから、チャンネルの立体構造の重要性が直接に示されたと考えている。

なお、しばしば「膜透過性の変化は膨潤度で説明できる。立体構造変化は無関係ではないか。」との指摘を受けることがある。このコメントの前半はある意味で正しいが、膨潤度を決定する因子についての議論が含まれていない。後半は誤解であろう。膨潤度と言うのはバルクでの膜物性のひとつであり、これには必ず膜を構成する高分子の高次構造変化が関与している。本研究では、設計原理に由来する膜中のポリペプチド鎖の比較的自由な高次構造変化が、ポリペプチドドメイン（透過チャンネル）の膨潤度の変化に大きく寄与していると著者らは考えている。

7 おわりに

合成高分子膜に生体類似機能を付与しようとする試みが内外で熱心に続けられてきた。しかし、これまでの研究の多くは汎用高分子の膜に何らかの官能基を導入しただけのもので、生体膜の多様な機能のごく一部を現象としてまねできているにすぎなかった。問題点のひとつを指摘するとすれば、有機化学や錯体化学で明らかにされた華麗な分子認識現象や包接現象に頼りすぎ、膜そのものに対する工夫が十分でなかったように思われる。

著者らは生体膜の構造的な特徴に着目した。構造維持・バリアー機能と特異的透過機能をモザイク状に分業したシステム、加えて透過を司る生体高分子の機能発現の源である高次構造とその変化、これらの二つのエッセンスを多相系高分子のつくるマイクロドメイン構造という場を用いて人工膜に取り入れることができた。いずれも、高分子化合物を用いてはじめて可能になったという点を強調しておきたい^{2c)}。

本研究の概念はその後、光応答性ポリペプチドの膜への固定化（視細胞膜モデル）へと発展した^{2b)31)}。また、化学物質を認識し電気化学的に応答するセンサーへの応用も始められている^{2d)32)}。

31) M. Aoyama, J. Watanabe, S. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.*, in press.

32) M. Maeda, Y. Tsuzaki, K. Nakano, M. Takagi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, in press.

**Special Articles on
Synthesis and Supramolecular Structure
of Functionality Amphiphiles**

**Polymer Membrane Having Polypeptide Domains as Channel
——Stable Biomembrane Model——**

Mizuo MAEDA** and Shohei INOUE*

*Department of Organic Chemistry, Faculty of Engineering, University of
Tokyo; Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113 Japan*

*** Present address; Department of Organic Synthesis, Faculty of Engineering,
Kyushu University; Hakozaki, Fukuoka-shi 812 Japan*

A novel polymer membrane having a transmembrane permeation pathway ("channel") was prepared from a polyvinyl-polypeptide graft copolymer. The transmembrane continuous phases of the hydrophilic polypeptide were found to be formed in the stable matrix from vinyl polymer and to function as a permeation pathway for polar substances; the polypeptide domain is regarded as membrane protein model. The infrared and circular dichroism spectra of the membrane showed the pH-dependent conformational change of the polypeptide segment. Regulation of the permeability and permselectivity was performed by pH based on the conformational change of the channel-composing polypeptide. In addition, the membrane has been found to respond to divalent cations, cationic surfactants, and urea in terms of membrane permeability as well as conformational status of polypeptide. The membrane thus proved to be a good model of biological membrane but with a remarkable stability.