

# スマートバイオマテリアルとしての超分子ヒドロゲル

(京都大学大学院工学研究科) 浜地 格

E-mail: [ihamachi@sbchem.kyoto-u.ac.jp](mailto:ihamachi@sbchem.kyoto-u.ac.jp)

TEL 075-383-2754 FAX 075-383-2759

URL:<http://wwwsbchem.kyoto-u.ac.jp/hamachi-lab/>

## 1 序

改めて述べるまでもなく、酵素やタンパク質は生体内では水分子に囲まれた環境で機能を果たしている。従って、これらを固定化して利用する場合には非生体的な環境にさらすことは避けられない。即ち、固定化した酵素／タンパク質では、その一部あるいは大部分が変性を受け、酵素本来が示す水溶液状態での高活性や高い選択性が失われてしまう危険性が常に伴っている。特に微細な環境変化に敏感な酵素／タンパク質ひいては細胞などをターゲットにした場合にはこれは深刻な問題となることがある。固定化による変性を避けつつ、しかし固定化による便利さをもった酵素／タンパク質システムとして、最近我々のグループでは、ある種の小分子が自発的に自己組織化して形成するヒドロゲル（いわゆる一般の共有結合型の高分子から出来たヒドロゲルと区別するために、超分子ヒドロゲルと呼んでいる）中に非共有結合的に包み込む手法を開発している。本章では、我々の例を中心に糖アミノ酸誘導体の自己集合による超分子ヒドロゲル材料の概略およびそれを用いたセミウエットなタンパク質／酵素アレイ、分子認識チップまた種々の刺激応答材料への応用展開に関して解説する。

## 2 糖アミノ酸誘導体から形成される自己組織的なヒドロゲル

超分子ヒドロゲルとは、分子量数百程度の有機小分子が非共有結合的な相互作用を介して自己組織的に集合した結果、水をゲル化したものであり、いわゆる物理ゲルの一種に分類される。これらはゲル内部に大量の水を含むので、酵素やタンパク質／細胞にとって水と類似の居心地の良い環境を提供できる可能性がある。また、出来上がる巨視的なゲルの物性や特性を分子レベルの設計によってコントロールすることが比較的容易なので、従来用いられて来た高分子ゲルとは異なった観点で新規なバイオ材料として興味が持たれている。超分子ヒドロゲルを形成する有機小分子は、当初から小分子ゲル化剤を意図してデザインされたというよりは、有機溶剤などの油を固めるオイルゲル化剤合成の過程で偶然発見されたものがしばしばである。ゲルは一般に不溶性固体と溶液状態の間のような領域であり、微妙な分子構造の違いによって不溶性固体になってしまったり、溶け過ぎて溶液のままであったりすることが多く、現時点では小分子の自己組織化から形成される超分子ヒドロゲルを完全にゼロから精密な分子設計によって狙って合成することが不可能といわざるを得ない。

我々は、糖とアミノ酸誘導体からなる糖脂質類似の両親媒性分子の化合物ライブラリーを、脂質の固相合成法を開発することによって構築し、このライブラリーのゲル化能をスクリーニングするという戦略によって、糖アミノ酸誘導体型の超分子ヒドロゲルを開発する戦略をとった。具体的には、糖アミノ酸誘導体分子を糖親水部、疎水テール、これらをつなぐスペーサーやコネクターに分けて、ペプチド固相合成類似の方法論によって（糖）脂質類似体のライブラリーを合成した。得られた分子ライブラリーのゲル化能力は、少量を水中に加熱分散後に室温まで冷却して放置し、その後の溶液物性を肉眼で評価することによって一次スクリーニングとした。すなわちこの時点で、最初から不溶のままのもの、沈殿や結晶として相分離したもの、水溶液のままのものを除外し、透明あるいは白濁したゲルを形成する分子をセレクションした。調製した100種類程度の糖アミノ酸誘導体ライブラリーから数種類のヒドロゲル化剤が実際に見いだされた。このコンビナトリアル化学を基盤にした方法論はこれまで創薬開発目的によく用いられていたが、我々はこれを初めて超分子材料の検索に適用し、明瞭な構造-機能相関が明らかになっていない分子性材料を発見し最適化するのにも優れた戦略であることを実証することとなった。

偶然の発見の産物をヒントに合理的な設計指針を確立するためには、可能な限り構造と機能（この場合、ゲル化能）の相関を明らかにしていくことが望まれる。我々は得られたゲル化剤の中から代表的な糖アミノ酸誘導体型超分子ゲルの構造をTEM, SEM, AFM および CLSM などの各種顕微鏡や X 線回折によって解析することによって明らかにし、小分子からなるゲルの形成機構を大まかに理解できるスキームを提案した（図1）。それによると、糖アミノ酸誘導体は、水中に加熱分散してその後室温に放置すると自己組織化して繊維状の会合体を形成する。その繊維の基本単位は5から10ナノメートル以下であり、2分子層に相当する程度の細さであることが TEM や AFM 観察から示された。粉末 X 線回折 (XRD) のピークから得られる長周期は、約4ナノメートルであり顕微鏡観察結果と良好な一致をしめた。また SEM からはより太い繊維状会合体が無数に絡まっている状態が見られ、極細の繊維がバンドル化して太いファイバーへと成長していることを窺わせる。これらが絡まって形成されたマイクロメートルサイズの空間に大量の水分子が閉じ込められてヒドロゲルとなると推測される。実際に、ドライなゲルではなくウェットなままの状態を観測できる共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いると、ゲル状態でも明瞭な繊維状会合体の存在が確認できた（微分干渉画像データとして）。また、興味深いことに、疎水的な環境で蛍光の量子収率が大きくなり強い蛍光を発するようなプローブ分子をこのヒドロゲルに少量混合すると、大きな蛍光強度の増大が見られた。また、この蛍光を指標にして CLSM 観察を行うと（蛍光画像データとして）連続してつながる蛍光像が得られ、明らかにヒドロゲル繊維自身が環境応答性の蛍光プローブで染色されている。このことは、糖アミノ酸誘導体からなる超分子ヒドロゲル中に自己組織化によって形成された繊維の中に疎水的なマイクロ環境が連続的に広がっている

ることを意味している。

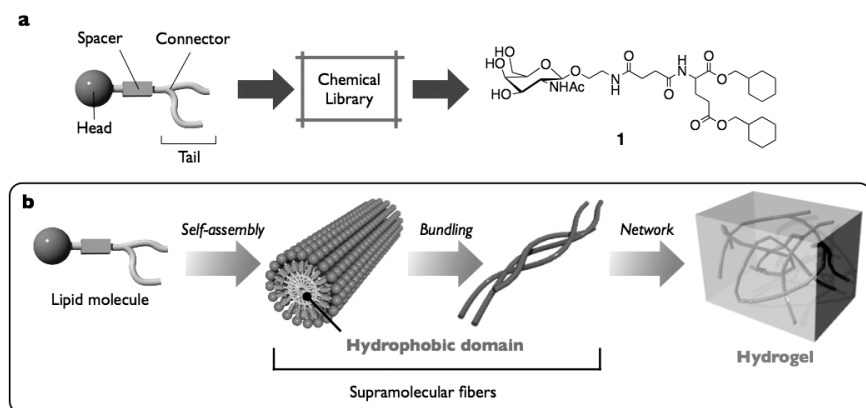


図1 階層的な超分子ヒドロゲル形成スキーム

このヒドロゲルを過飽和状態で調製するとゲルから結晶への転移が起こり、その中から構造解析が可能な単結晶が得られた。これを X 線構造解析すると、上記の推論に一致するような分子配列構造が現れた。即ち、2 分子の糖アミノ酸誘導体が疎水的なテール部分を向け合っ入れ子構造で組み合わせられて、van der Waals 相互作用の距離で綺麗にパッキングしていた。一方、糖親水部は複数の水分子との水素結合を介して整然と配向し、安定な界面形成に寄与している。さらにスペーサーとコネクタ部位のアミド結合が分子間でよく発達した水素結合帯を形成していた。この水素結合はゲル状態の赤外分光 (IR) から示唆されたものであり、またテール部分の入れ子構造は CLSM 観察で見いだされた発達した疎水性マイクロ環境の実体として理解される。以上のような構造解析から総合的に考察すると、超分子ヒドロゲルの形成機構は階層的な自己組織化過程によって起こると考えるのが最も妥当であろう。

### 3 糖アミノ酸誘導体型ヒドロゲルによる酵素/タンパク質のラッピング

糖アミノ酸誘導体型の超分子ヒドロゲルでは 0.1 から 0.2wt% 程度の低濃度でゲル形成が可能である。これはゲル化剤 1 分子に 20000 個以上の水が固められている計算になり、水が豊富な準固体的な環境と捉えることが出来る。また、形成されたヒドロゲルは透明性が高く、それ自身の色調の変化を肉眼や紫外可視分光スペクトルや蛍光スペクトルで定量的にモニターすることが出来る。このような特徴は、ゲル中に閉じ込められた分子の機能・特性評価に適した材料を提供することになる。特に、ゲル化剤の分子構造が糖鎖やアミノ酸誘導体から成るため天然由来の酵素類の変性を抑制すると期待できること、また電荷的に中性の分子なので、様々な pH (pH 5 から 8 程度の範囲) や塩強度 (0 から 250mM) 条件でもほぼ同様のゲルとなるなど、酵素やタンパク質の閉じ込め (固定化) に魅力的な分子材料となると思われた。

そこでまず、酵素に関して超分子ゲル中での活性評価実験を行った。例えば、アルカリフォスファターゼを包摂したヒドロゲルに蛍光性基質を添加して活性を評価すると、リン酸エステル部

分の加水分解の進行が蛍光変化として観測される。見かけの反応速度は、mL サイズのバルクゲルでは基質の拡散が律速となって、1時間以上かかってしまうが、 $\mu\text{L}$  サイズまで小型化されたゲル中では酵素反応は5分程度で終了し、水溶液中とほとんど変わらなかった。即ち、水溶液中での酵素反応をそのままマイクロなゲル中での定量的な解析に適用することが可能となった。また、超分子ヒドロゲル繊維が持っている疎水的なマイクロ環境を利用すると、酵素本来の天然基質に近い基質を用いてコントラストよくゲル中での酵素活性を評価することも可能となり、種々の読み出しモードを酵素に合わせて適用できる柔軟なバイオ材料であることも示されつつある。

#### 4 セミウェットな酵素／タンパク質チップへの応用

ゲノミクスをはじめとするオーム科学（プロテオミクス、メタボロミクス等）において、多種類の検体を微量ずつ基板上に並べて網羅的に解析するマイクロアレイ技術が有用なツールとなると期待されている。その成功例の代表格は、生物ゲノムにおける転写効率や変異／異常を簡便に検出するための強力なツールとして数万個の短い DNA 鎖を一枚のガラス基板の表面に並べて固定化した DNA チップであろう。しかしながら、化学的に安定でタフな DNA とは異なり、酵素やタンパク質の場合、生体内環境とは異なるドライな基板上に生理活性を有する状態のまま固定化するのが困難である場合が多い。例えば、乾燥や界面吸着によるタンパク質の3次構造の不可逆的な変性がプロテインマイクロアレイの構築においてしばしば問題となる。また、基板への2次元的な固定には、一般的に共有結合が用いられるが、反応性が一定しなかったり操作が煩雑だったりするだけでなく、2次元的に限られた表面ではシグナルが弱いという問題点が避けられない。一方、我々の開発した超分子ヒドロゲルは生体内と同様に豊富に水を含んでいるため、タンパク質を包埋しても活性を保持したままであり、また、ゲル構造が3次元的であるため読み出すべきシグナル強度も十分強いことがわかった。

そこで我々は、超分子ヒドロゲルをプロテインマイクロアレイの担体として応用することにした。アレイの調製方法は極めて簡便である（図2）。ゲル化剤を加熱分散させた溶液をガラス基板上に、適量滴下し室温で静置することにより自発的にゲル化させる。得られた各ゲルスポット中にタンパク質を注入するとプロテインアレイの完成である。

実際に我々は、グリコシダーゼ類やプロテアーゼ類など複数の酵素をアレイ化して蛍光基質を用いて網羅的な酵素アッセイを試みた。その結果、透明度の高い超分子ヒドロゲル上ではバックグラウンドノイズが小さく定量性のあるアウトプットを得ることができた。さらにゲルアレイは巨視的には固体であるため、ガラス基板を丸ごと水に浸してもゲルスポットの形状は崩れず、隣り合うスポットが混ざることもない。従って、アレイを検査対象の水溶液に浸すという極めて簡便な操作によって複数の検体を同時にハイスループットに分析することも可能であった。また、こ

のヒドロゲルアレイは、酵素の活性ベースでの情報を与えることから、酵素阻害剤のスクリーニングにも適用可能である。ヒドロゲルスポットに対象とする酵素と種々の阻害剤候補化合物とともに固定化したプロテインアレイを同様な手法で調製し、それに蛍光性の基質を添加して各スポットの基質分解に伴う蛍光変化を評価する。蛍光変化が見られないスポットでは、添加した候補化合物が阻害剤として作用していることが分かる。モデル実験として加水分解酵素トリプシンを固定化した酵素アレイでの、低分子型阻害剤およびタンパク質型阻害剤の阻害活性を濃度依存プロットとして評価すると、前者はマイクロ mol レベルの阻害能、後者はナノ mol の阻害活性が得られ、水中での値と良好な一致を示した。もちろんアレイを使って阻害剤の酵素選択性を簡便に評価することも可能であった。このように、超分子ヒドロゲルの分子レベルの自己組織化によって構築された巨視的な物性が、活性ベースで評価可能な酵素/プロテインマイクロアレイ用の担体に適していることが実証された。

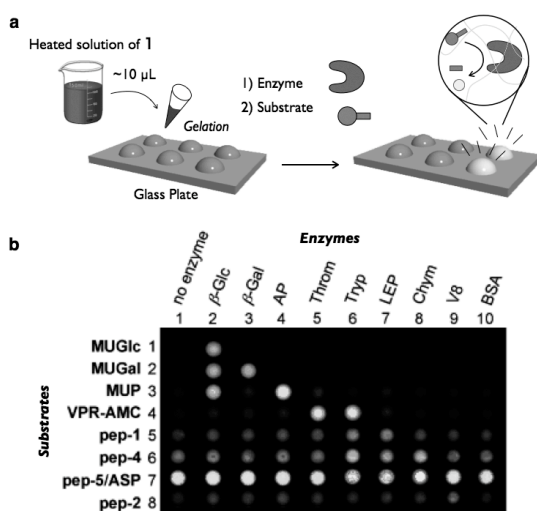


図2 超分子ヒドロゲルを用いたセミクエットタンパク質アレイの作製

同様なアレイ化は、酵素だけでなく特定の生理活性物質に結合活性を有するタンパク質にも適用できる。我々はレセプタータイプのタンパク質のアレイにも成功し、バイオセンシングに応用している。酵素アレイと同様に、シグナルの読み出しにはチップ上での蛍光変化を利用している。レクチンは糖を高選択的に識別することが出来る糖結合タンパク質であり、現在、腫瘍マーカーなどの検出に用いられている。これに蛍光色素（例えば **Fluorescein**）修飾を施し、超分子ヒドロゲルを用いてアレイ化した。次にレクチンに特異的に結合する糖鎖の末端に消光剤（**Dabsyl**）を修飾したものをそれぞれのゲルスポットに注入すると、修飾糖鎖がレクチンと結合し、レクチンに修飾した **Fluorescein** から糖鎖上の **Dabsyl** 消光剤へと蛍光エネルギー移動が起こり各スポットの蛍光が消える。このように消光した各ゲルスポットに、分析対象となる種々の糖を添加したところ、レクチンに結合する糖のスポットでのみレクチンの糖結合ポケットから消光剤付き糖鎖

が追い出されて、選択的に蛍光が回復した。レクチンと結合しない糖を添加したスポットでは蛍光回復は見られなかった。糖認識能の異なる6種類の蛍光修飾レクチンとそれに対応する消光剤をアレイしたレクチンチップを調製し、網羅的な糖種の分析を行うと、単純な糖だけでなく糖タンパク質や糖脂質といった配糖体の簡便な検出とパターンニングが可能となった。また、細胞破砕液を分析サンプルとしてレクチンチップの評価を行うと、各スポットの蛍光回復パターンを指標に、大腸菌や動物細胞の糖鎖の存在量/比率を基本とした細胞種のプロファイリングやクラスタリングもできることが分かって来た。このように、酵素やタンパク質の本来の機能をほぼ完全に保持した状態でのヒドロゲルタイプのタンパク質アレイはさらに多様な応用展開の潜在性を秘めていると期待できる。

#### 5 セミウエットな分子認識/センサーアレイ

セミウエットなヒドロゲルチップは、酵素タンパク質だけでなく、化学センサーや pH プローブなどの固定化にも適用できる。実際に、我々のグループが全く別のプロジェクトで開発していた世界初のリン酸化タンパク質に対する人工蛍光センサー分子は水中とほぼ同程度の検出限界値を示し、ゲルチップ中で良好に機能した。同様な手法で、亜鉛イオンやカルシウムイオン、pH に対するセンサーをそれぞれ異なるゲルスポットにアレイ化すると、複数の分析対象を蛍光色変化として一挙に分析することのできるセンサーアレイとすることができる。

超分子ヒドロゲルはこの他にも種々の刺激応答機能の組み込みが可能でプログラムできる機能性材料としての広がりも見せてきている。今後の展開が注目される。

#### 参考文献

- 1) As a review: Estroff, L. A., Hamilton, A. D. (2004) *Chem. Rev.* **104**, 1201–1217. 松本真治、浜地格、同仁ニュース、2006,118,1-16
- 2) Kiyonaka, S., Shinkai, S., Hamachi, I. (2003) *Chem. Eur. J.* **9**, 976–984.
- 3) Kiyonaka, S., Sada, K., Yoshimura, I., Shinkai, S., Kato, N., Hamachi, I. (2004) *Nature Mat.*, **3**, 58–64.
- 4) Tamaru, S.-i., Kiyonaka, S., Hamachi, I. (2005) *Chem. Eur. J.* **11**, 7294–7304.
- 5) Tamaru, S.-i., Yamaguchi, S., Hamachi, I. (2005) *Chem. Lett.*, 294–295.
- 6) Yoshimura, I., Miyahara, Y., Kasagi, N., Yamane, H., Ojida, A., Hamachi, I. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 12204–12205.
- 7) Yamaguchi, S., Yoshimura, I., Kohira, T., Tamaru, S.-i., Hamachi, I. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 11835–11841.
- 8) Koshi, Y., Nakata, E., Yamane, H., Hamachi, I. (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 10413–10422
- 9) Matsumoto, S., Yamaguchi, S., Wada, A., Matsui, T., Ikeda, M., Hamachi, I. (2008) *Chem. Commun.*, 1545–1547. *J.* **11**, 7294–7304.