

ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッド型
高分子の精密合成とその特性に関する研究
(博士論文)

同志社大学大学院 理工学研究科 応用化学専攻
博士課程 (後期)
2016 年度 1704 番
西村 慎之介

目次

第一章 序論	1
参考文献	14
第二章 マクロモノマー法によるグラフト型ペプチド-ビニルポリマー・ ハイブリッドの合成と細胞足場材料への展開	17
2-1. 緒言	17
2-2. 実験方法	20
2-2-1. 試薬	20
2-2-2. 合成	20
2-2-3. 測定	23
2-3. 結果および考察	24
2-3-1. 細胞接着特性の自在制御を目指したグラフト型ペプチド-ビニルポリマー・ ハイブリッドシステムの設計	24
2-3-2. 光分解性リンカーを介して重合性官能基を末端に有する RGDS ペプチド マクロモノマーの合成とその光分解性	25
2-3-3. ペプチドマクロモノマーとビニルモノマーのラジカル共重合	26
2-3-4. グラフト型 poly(HEMA-g- β A-ANP-K(RhB)- β A-RGDS- <i>Am</i>) フィルムの作製と 細胞接着特性の評価	27
2-3-5. RGDS ペプチドが二次元パターン化されたハイブリッドフィルムの調製と その細胞接着特性の評価	28
2-4. 結言	31
参考文献	32
第三章 クリック反応を用いた重合後修飾法によるグラフト型ペプチド- ビニルポリマー・ハイブリッドの合成と細胞自在操作	33
3-1. 緒言	33
3-2. 実験方法	35
3-2-1. 試薬	35
3-2-2. 合成	35
3-3. 結果および考察	40
3-3-1. RAFT 重合法による poly(HEMA- <i>ran</i> -PgA) の合成	40
3-3-2. 光分解性リンカーを介してアジド基を末端に有する RGDS ペプチドの合成	41

3-3-3. Poly(HEMA- <i>ran</i> -PgA) フィルムへのペプチド修飾と UV 照射による光切断	42
3-3-4. 細胞シートの作製と細胞のパターン化	45
3-3-5. 三次元構造物上への poly(HEMA- <i>ran</i> -PgA) フィルムの調製と 細胞接着性の付与	47
3-4. 結言	49
参考文献	50
第四章 タンパク質の構造・機能をモデルとするブロック型 ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの精密合成とその特性	51
4-1. 緒言	51
4-2. 実験方法	53
4-2-1. 試薬	53
4-2-2. 合成	53
4-2-3. 測定	61
4-3. 結果および考察	63
4-3-1. GFP の高次構造を模倣したブロック型ハイブリッドの設計	63
4-3-2. PVP_n - <i>b</i> - PSt_m - <i>b</i> -FSYGV- <i>b</i> - PSt_m - <i>b</i> - PVP_n の合成とその蛍光発光特性	63
4-3-3. PAA_n - <i>b</i> -PNIPAM _{<i>m</i>} - <i>b</i> -FSYGV- <i>b</i> -PNIPAM _{<i>m</i>} - <i>b</i> - PAA_n の設計	66
4-3-4. ポリマー種が蛍光発光へ及ぼす影響	78
4-4. 結言	81
参考文献	82
第五章 マルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの 精密合成法の確立	83
5-1. 緒言	83
5-2. 実験方法	85
5-2-1. 試薬	85
5-2-2. 合成	85
5-2-3. 測定	94
5-3. 結果および考察	95
5-3-1. TEMPO 由来アルコキシアミンを介して環状構造を有する ペプチド NMP 開始剤の設計	95

5-3-2. TEMPO 由来アルコキシアミン結合を骨格構造に有する 環状ペプチド NMP 開始剤の合成	96
5-3-3. TEMPO 型ペプチド NMP 開始剤による芳香族モノマーの重合	97
5-3-4. 適用可能なビニルモノマー種の拡張を目指した ペプチド NMP 開始剤の新規設計	103
5-3-5. TIPNO 型アルコキシアミン結合を骨格構造に有する 環状(Leu) ₄ NMP 開始剤合成	105
5-3-6. TIPNO 型ペプチド NMP 開始剤によるアクリルアミド系 およびアクリレート系モノマーの重合	106
5-4. 結言	111
参考文献	112
第六章 アミノ酸由来成分からなるマルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー ・ハイブリッドの設計と単鎖フォールディング	113
6-1. 緒言	113
6-2. 実験方法	115
6-2-1. 試薬	115
6-2-2. 合成	115
6-2-3. 測定	118
6-3. 結果および考察	119
6-3-1. アミノ酸由来ビニルポリマーのリビングラジカル重合への適用性の検討と 生体親和性の評価	119
6-3-2. アミノ酸由来ビニルポリマーブラシの作製とその細胞接着特性	119
6-3-3. トリブロック型アミノ酸由来ポリマーの設計	124
6-3-4. 配列制御ペプチド ((Leu) ₄) とアミノ酸由来ビニルポリマーからなる マルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの精密合成	131
6-3-5. マルチブロック型ハイブリッド[(Leu) ₄ - <i>b</i> -PNAGMe ₇₆] ₇ の 水中における単鎖フォールディング	133
6-4. 結言	138
参考文献	139
第七章 総括	141
謝辞	

第一章：序論

代表的な生体高分子であるタンパク質は、生体触媒や物質輸送、運動機能など我々の生命活動を維持するための重要な役割を担っている。モノマーである α -アミノ酸がペプチド結合により連なった巨大な分子であり、三次元的な広がりをもつ明確な立体構造を形成している。このような高分子鎖の三次元構造はビニルポリマーなどに代表される合成ポリマーにおいても見られるが雑然としている。一方で、タンパク質の分子鎖は複雑ながらも理路整然とした構造を形成している。このような精妙に形成された高次構造により、疎水性内部空間の構築や機能性官能基の空間配置、その立体規制（歪み）が実現されており、合成高分子では達成できない高度な機能の発現を可能としている。高次構造は、アミノ酸配列（一次構造）に基づいて形成される α -ヘリックス構造や β -シート構造と呼ばれる二次構造、これら二次構造ユニットが適切に折りたたまれて配置されることで決定する三次構造、さらにそれらがより高次に複数会合することで多サブユニットを形成する四次構造に分類することができる (Figure 1-1)。

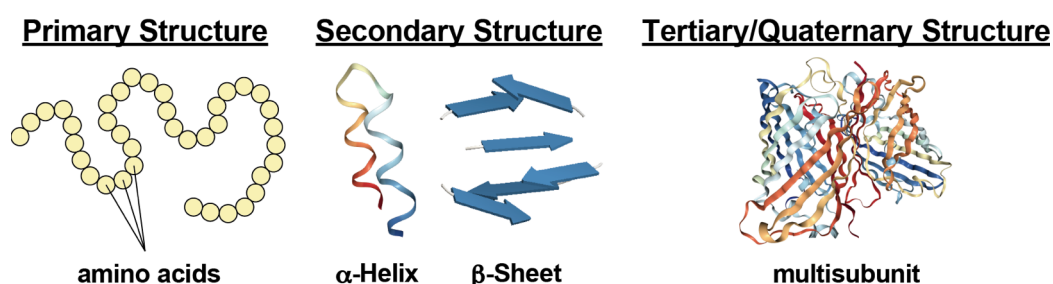


Figure 1-1. Hierarchical structure of proteins.

これら複雑な高次構造は、鋳型にはめ込むトップダウン的ではなく、各ペプチドドメインの階層的な自己組織化に基づいてボトムアップ的に形成される。すなわち、どのような高次構造を最終的に形成するのかは一次構造であるアミノ酸配列に支配される。天然に存在する主なアミノ酸は 20 種類であるが、これらが精密設計された配列に従い、完全かつ単分散で重合されることで特異な立体構造を形成する。高分子化学の視点から高次構造を見ると、水素結合、疎水性相互作用や静電相互作用などの非共有結合性相互作用が分子内や分子間で巧みに利用されていることがわかる。これらの比較的弱い相互作用が数多くかつ正確に働くことでタンパク質はその構造を維持している。そのため、pH や温度などの外部変化に敏感であり、至適 pH および温度を逸脱すると高次構造が崩壊（変性）し、その活性を失ってしまう。タンパク質の優れた立体構造形成能や高度な生体機能は、材料化学の観点から分子素材として大変魅力的であるが、高分子材料として活用する場合、このような外

部環境耐性の低さが問題となる。また、材料としてタンパク質の利用を目指す場合は、人工的に合成する手法を確立する必要もある。現在、大腸菌クローニングによる遺伝子工学的手法¹⁾やネイティブケミカルライゲーション²⁾による化学的手法が主に利用されているが、コスト面と合成スケール面に問題がある。根本的に水以外の溶媒への溶解性に乏しいこともネックとなる。これらがタンパク質の最大の欠点であり、優れた機能を持ちながらも高分子材料としての展開が困難である所以である。

一方で、二官能性モノマーの重縮合や重付加反応などの逐次重合法、ビニルモノマーのイオン重合やラジカル重合などの連鎖重合法によって得られる合成ポリマーは、合成スケール面での有利さ、力学特性、化学的安定性、加工性、様々な溶媒への溶解性が高いことなどから汎用材料として我々の日常生活で広く用いられている (Figure 1-2)。特にビニルポリマーは、合成方法の簡便さや合成スケール面の有位性だけでなく力学特性や化学的安定性、加工性が高く、材料としてのポテンシャルが高い。

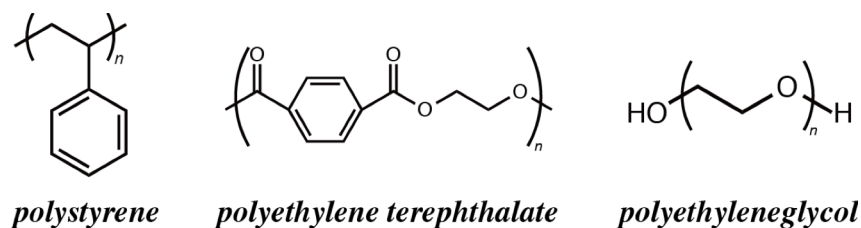


Figure 1-2. Representative synthetic polymers.

すなわち、合成高分子の材料特性のアドバンテージを活かしながら、タンパク質のような特異な高次構造や高度な機能を再現することができれば、従来にない革新的な機能性高分子材料の創成につながるであろう。しかしながら、ビニルポリマーの主鎖骨格を形成する C-C 結合は自由回転できる柔軟な構造であり、かつ一次構造が制御されていないことから、特定の高次構造を形成せず、タンパク質のような特異的機能を設計することが難しい。

本論文では、このような課題をブレイクスルーする新しい高分子ソフトマテリアルの設計戦略として人工ペプチドとビニルポリマーのハイブリッド化法について報告する。先にも述べたように、タンパク質は主鎖骨格がペプチド結合により連結しているため、二面角規制により高次構造形成には有利であるが、環境耐性の面から材料化には不向きである。一方で、鎖長が短く単純な構造の人工ペプチドはタンパク質と比較して環境耐性が高く、安価に配列制御して合成することができる。オリゴペプチドであってもアミノ酸配列に基づいて α -ヘリックス構造や β -シート構造のような二次構造を形成し、さらにそれらが自己組織化することで様々なナノ構造体を形成する³⁻⁷⁾。また、細胞接着性⁸⁾、抗酸化性⁹⁾および抗菌性¹⁰⁾などの生理機能も容易にデザインできるため大変魅力的である。すなわち、ペ

ペプチドとビニルポリマーをハイブリッド化させることで、有無相通ずる分子の設計が可能となろう。Figure 1-3 に本論文におけるペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッド戦略のコンセプトを示した。ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドは、両者の特性が単純に融合した優れた材料となるだけでなく、ハイブリッド化による相乗効果により新たな機能発現も期待できる。ペプチド種とビニルポリマー種の設計・選択だけでなく、両者をどのようにハイブリッドさせるか、すなわち高分子形状 (グラフト型, ジブロック型, トリブロック型, マルチブロック型など) の設計も機能発現の鍵を握る重要な因子であり、ペプチドブロックとビニルポリマーブロックの特性を最大限に引き出した合目的的な分子設計とそれを可能にする高分子合成法の開発が必要である。本論文では、これら配列制御されたペプチドとビニルポリマーからなるハイブリッドポリマーの精密合成法の確立を目指すとともに、機能性バイオマテリアルとしての可能性を示すことにした。

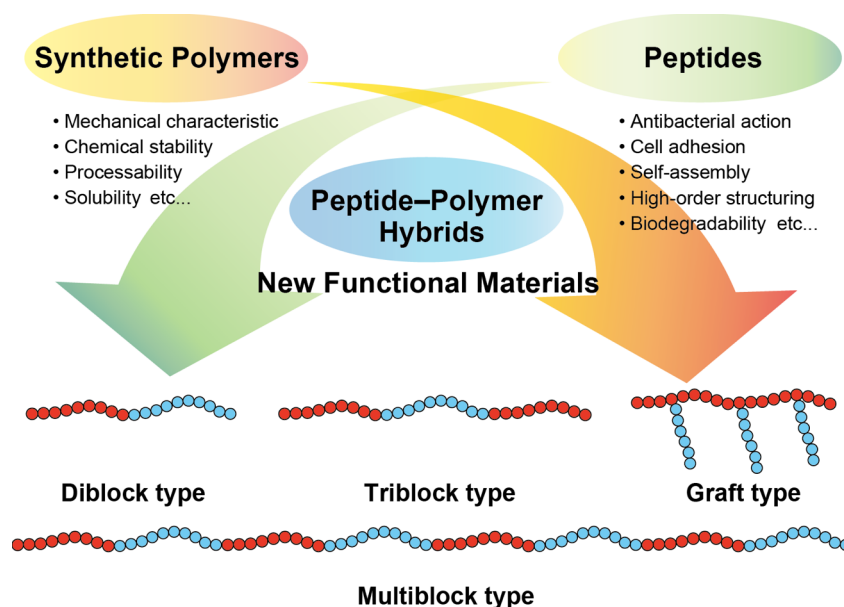


Figure 1-3. Peptide-polymer hybrids for functional soft-materials.

ペプチドとビニルポリマーのハイブリッド化を報告した最初の例は、1976 年に Gallot らによって合成されたジブロック型のポリブタジエン-*b*-ポリ(γ -ベンジル-L-グルタメート) (PBLG) とポリブタジエン-*b*-ポリ(N^{δ} -ヒドロキシルプロピルグルタミン)である。これらのハイブリッドポリマーはポリブタジエンブロックと α -ヘリックス構造のペプチドブロックが相分離することでラメラ構造を形成することが見出された¹¹⁾。このハイブリッドのペプチドブロックは *N*-カルボキシアミノ酸無水物 (NCA) 開環重合により合成されており、ペプチドブロックは単分散でなく分布を持つものの、ミクロ相分離構造の形成は達成されており、ポリペプチドの高い構造形成能を証明している。しかしながら、より精密な自己

組織化ナノ構造体形成や機能発現を狙う場合、ペプチド鎖の鎖長制御や配列制御は重要な課題である。ペプチド固相合成法 (Solid Phase Peptide Synthesis: SPPS) を用いることで配列制御された単分散ペプチドを簡単に設計・合成することができる¹²⁾。一方で、ビニルポリマーブロックの分子量分布の制御はリビング重合法により可能である。

リビング重合の概念が初めて提唱・実施されたのは、1956年のSwzarcによるスチレンのアニオン重合である^{13, 14)}。ナトリウムナフタレニドを開始剤とするテトラヒドロフラン中でのスチレンの重合において、モノマー消費後に新たにスチレンを添加すると高分子鎖末端からさらに重合が進行することが明らかにされた。その後、1983年にはWebsterらによって新たなリビングアニオン重合としてグループトランスファー重合¹⁵⁾、1984年にはHigashimuraおよびSawamotoらによってリビングカチオン重合が発見された¹⁶⁾。これらを契機に、現在までに多くのリビングイオン重合系が見出されてきた¹⁷⁻¹⁹⁾。活性点が失活しないことを利用して、ブロックポリマー²⁰⁻²²⁾、末端官能基化ポリマー^{23, 24)}、グラフトポリマー^{25, 26)}、スターポリマー²⁷⁻²⁹⁾などの形状特異ビニルポリマーの合成が達成されている (Figure 1-4)。

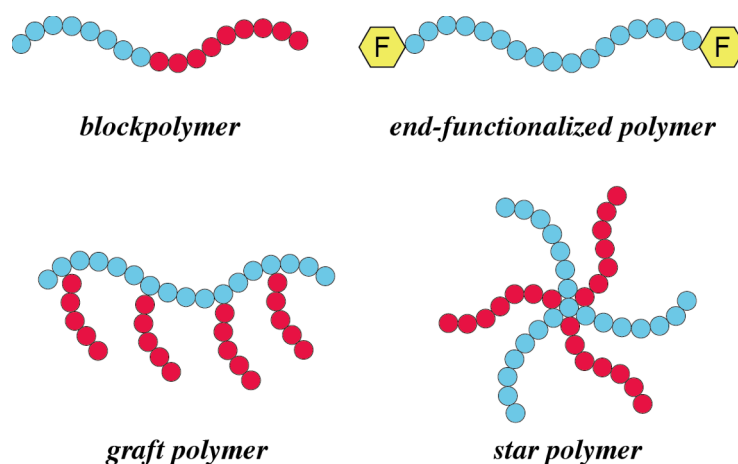
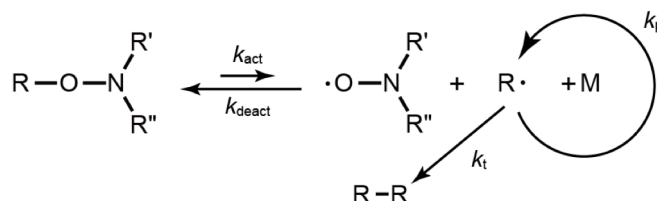


Figure 1-4. Schematic illustration of shape-specific polymers.

しかしながら、これらイオン重合はその機構上、極性官能基を持つモノマーの重合を行うことはできず、官能基許容性の低さがしばしば問題となる。一方で、ラジカル重合は極性モノマーの重合が可能である。イオン種と比較してラジカル種は電氣的に中性であるため、ヒドロキシ基、アミノ基およびカルボキシ基のような高極性官能基が存在したとしても失活せず、重合が進行する。ラジカルは一般的に反応性に富むため制御が困難であったが、近年、系内のラジカル濃度を低く保ち、連鎖移動反応および停止反応を極力防ぐことで擬リビング的に重合を制御できるようになった。現在リビングラジカル重合 (LRP) として利用されているのは主に (1) ニトロキシド介在重合 (NMP)、(2) 原子移動ラジカル重合 (ATRP)、(3) 可逆的付加-開裂連鎖移動 (RAFT) 重合であり、いずれも可逆的にラジカルを

発生するドーマント種を作り出すことでリビング性を実現している．本研究では，SPPS 法とこれら様々な LRP を組み合わせることでペプチドとビニルポリマーのハイブリッド化を実現した．以下，簡潔にこれらの LRP の特徴を述べる．

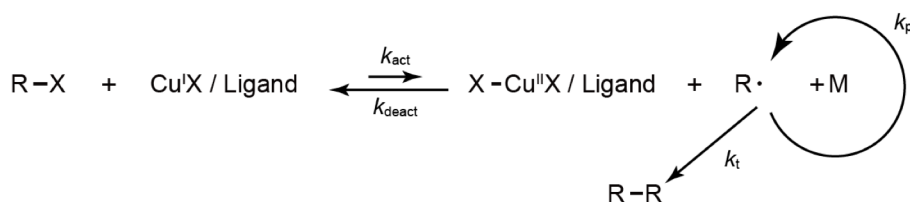
NMP は，1993 年に Georges らによって報告され，過酸化ベンゾイルを開始剤に用いてスチレンを 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシル (TEMPO) 存在下で重合することによりラジカル重合がリビング的に進行することが見出されている³⁰⁾．NMP は安定ラジカルであるニトロキシドラジカルおよびその誘導体のアルコキシアミン類を用いた重合である^{31, 32)} (Scheme 1-1)．



Scheme 1-1. Reaction mechanism of nitroxide-mediated polymerization (NMP).

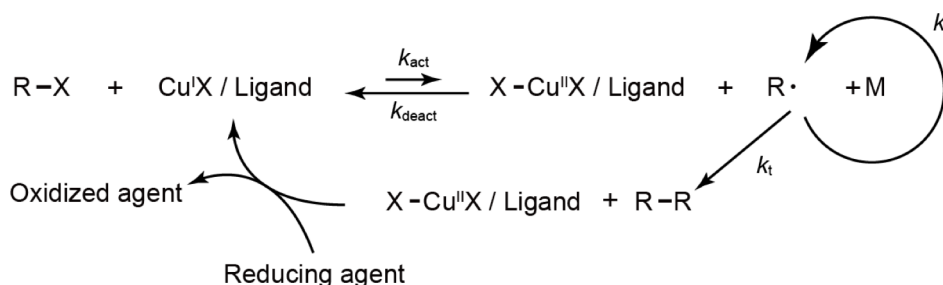
ドーマント種であるアルコキシアミン結合 (C-ON) は熱開裂により可逆的に成長炭素ラジカルを生成可能で，この平衡により系内のラジカル濃度を低く保つことでリビング性を達成している．第一世代のニトロキシドラジカルである TEMPO を用いた NMP では重合可能なモノマーがスチレン誘導体に限られていたが，2,2,5-トリメチル-4-フェニル-3-アザヘキサン-3-ニトロキシド (TIPNO) などの第二世代ニトロキシドラジカル^{33), 34)} の登場により，現在ではアクリレート系モノマーの重合制御も可能となっている．系内に余分な試薬の添加を必要とせず，開始剤とモノマーのみで重合できる一方で，100°C を超える高温環境を必要とし，メタクリレート系モノマーの重合は連鎖移動により制御することができない．

ATRP は 1995 年には Matyjaszewski らと Sawamoto らによってそれぞれ独立に報告された^{35, 36)} (Scheme 1-2)．ATRP は遷移金属錯体を触媒とし，有機ハロゲン化合物を重合開始剤とするラジカル重合であり，炭素-ハロゲン結合を持つドーマント種に対し，金属触媒が一電子酸化還元を伴って可逆的に活性化することで重合が制御される．



Scheme 1-2. Reaction mechanism of atom transfer radical polymerization (ATRP).

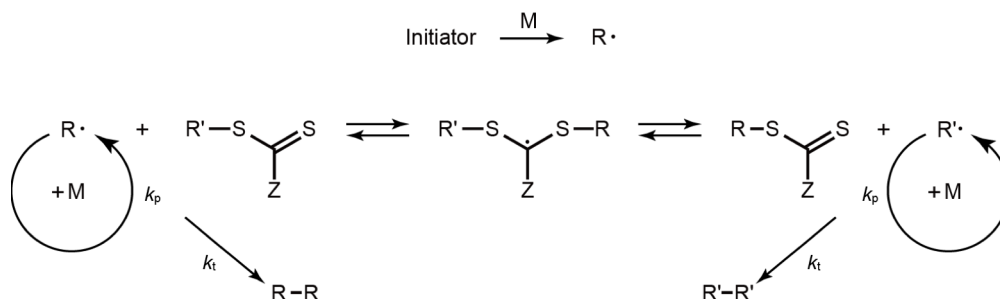
一般的に、安価な銅が触媒として用いられることが多い。しかし、得られたポリマーには金属残渣が含まれる場合があり、生体毒性の懸念がある。近年では、スズ化合物³⁷⁾、アスコルビン酸³⁸⁾、グルコース³⁹⁾などの還元剤を用いることで、触媒量を数 ppm 程度まで軽減できることがわかっている (Scheme 1-3)。



Scheme 1-3. Reaction mechanism of activator regenerated by electron transfer-atom transfer radical polymerization (ARGET-ATRP).

また、錯体を形成させる配位子を適切に設計することで触媒活性や溶媒との親和性を調節することが容易であり、ほとんどの共役モノマーの重合を制御することが可能である。

RAFT 重合は 1998 年には豪州連邦科学産業研究機構にて発見されたラジカル開始剤とジチオカルボニル化合物などの連鎖移動剤 (RAFT 剤) を用いる方法である⁴⁰⁾ (Scheme 1-4)。



Scheme 1-4. Reaction mechanism of reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization.

まず、開始反応により生成したラジカルとモノマーが反応することで成長ラジカル (R^\bullet) が生じ、この成長ラジカルは直ちに連鎖移動とカップリングする。形成した中間体を経由して新たに成長ラジカル (R'^\bullet) が放出され、重合が再び開始する。この交換反応は可逆的かつ速やかに起こり、ラジカル濃度が低く保たれることで制御された重合が進行する。RAFT 剤の構造を適切に設計することで共役モノマー・非共役モノマーともに重合を制御することが可能であるが、得られたポリマーは末端に RAFT 剤構造を有するため着色する、硫黄原子を含有するなどの欠点がある。この問題を克服するため、アミンなどの求核剤で処理

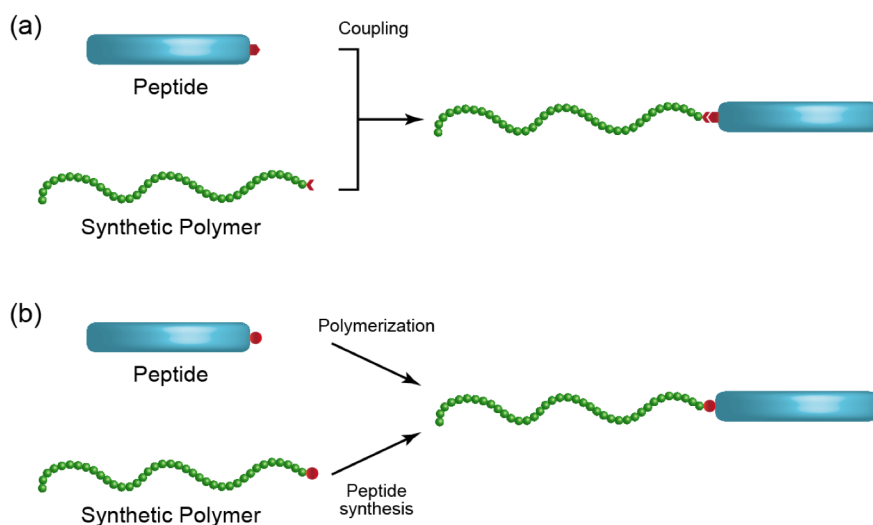
することでチオールに⁴¹⁾、トリス(トリメチルシリル)シランや *N*-エチルピペリジンハイポホスフェート存在下でラジカル処理をおこなうことで水素原子に変換する方法⁴²⁾が考案されている。これらのリビング重合はラジカル種によって進行するため官能基許容性が高く、現在までに様々な極性および非極性モノマーからなる形状特異ポリマーの合成が報告されている⁴³⁻⁴⁹⁾。近年では、これら LRP 重合技術の進歩に伴い、連鎖重合でありながらポリマーの一次構造の制御も可能と成りつつある⁵⁰⁻⁵³⁾。また、LRP により合成されたポリマーは、NMP 開始剤、ATRP 開始剤および RAFT 剤に由来する構造 (-COOH, -NH₂, -Br, -SC(=S)R など) を末端に有するため、さらなる反応や化学修飾ができ、ペプチドとのハイブリッド化も可能となる。

ペプチド-ポリマー・ハイブリッドは骨格構造により、ブロック型、グラフト型、スター型、デンドリマー型などに分類することができる。ハイブリッドポリマーの形状に違いはあれど、その合成方法自体は、

I) 別々に合成したペプチドと合成ポリマーのカップリングによるハイブリッド化 (convergent 法)

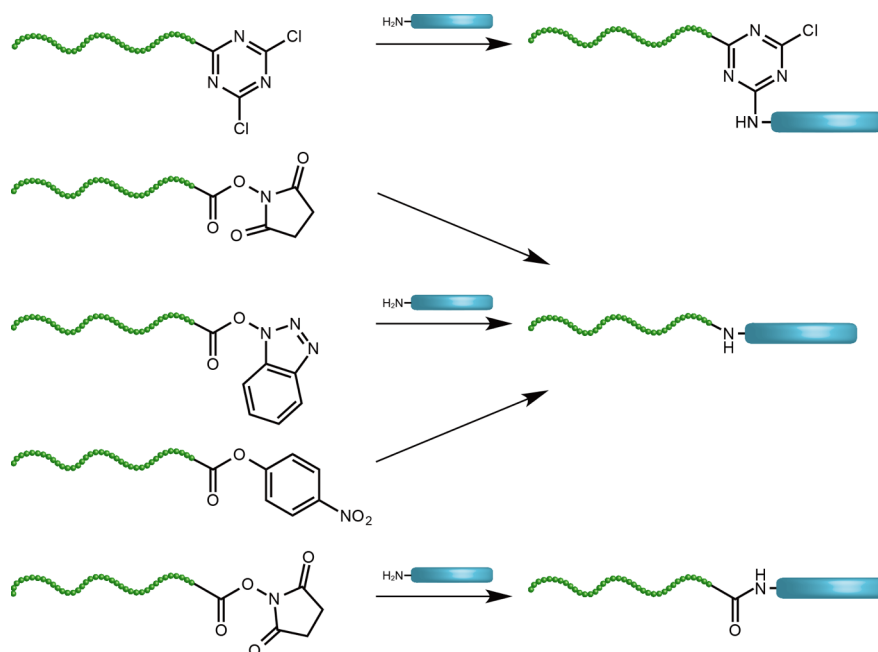
II) ペプチド (合成ポリマー) 末端からの重合によるハイブリッド化 (divergent 法)

の 2 つに大別できる (Scheme 1-5)。



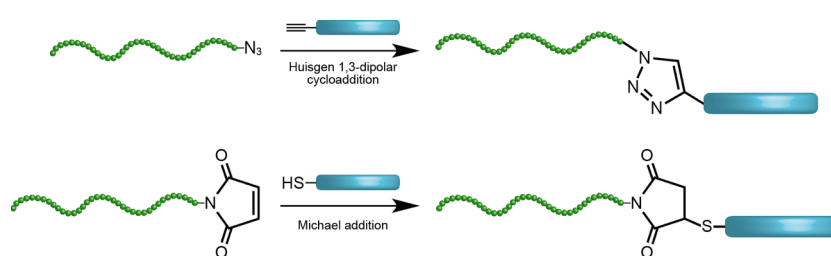
Scheme 1-5. Schematic representation of (a) convergent and (b) divergent synthesis of peptide-polymer hybrids.

ハイブリッドポリマーの古典的な合成は、I 法によるペプチドと高分子鎖末端に反応性の官能基を有するポリエチレングリコール (PEG) のようなポリエーテル、ポリ L-乳酸 (PLLA) のようなポリエステルとの縮合や付加反応によって行われていた^{54, 55)} (Scheme 1-6)。



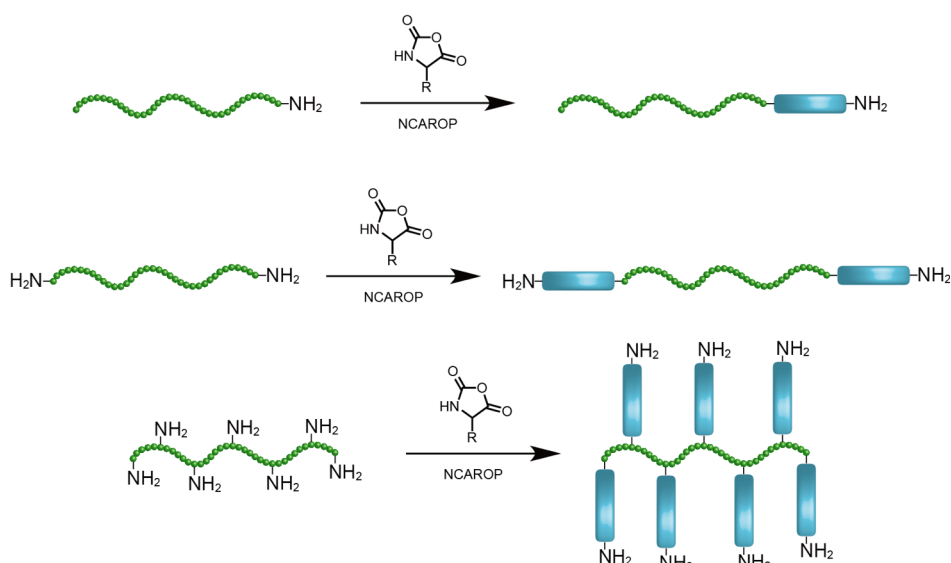
Scheme 1-6. Schematic representation of synthesis of peptide-polymer hybrids by condensation and addition reactions.

一般にビニルポリマーは特定の官能基を末端に持たないため、この方法によるペプチドとのハイブリッド化はほとんど行われてこなかった。この方法は簡便かつ各ブロックの構造を明確に決定できる反面、未反応のプレポリマーが残留し、生成したハイブリッドポリマーの単離が難しい欠点がある。末端基をアジド基やアルキンなどに変換したのち、高反応率のクリックケミストリー⁵⁶⁻⁵⁸⁾による付加反応を用いることにより、未反応のプレポリマーを極力残留させないことで分離プロセスを簡略化することができる (Scheme 1-7)。



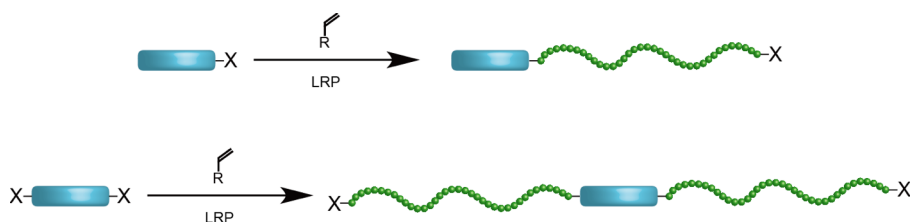
Scheme 1-7. Schematic representation of synthesis of peptide-polymer hybrids by click reaction.

その点、II 法では未反応のモノマーを除去するだけでハイブリッドポリマーを単離できるため、比較的容易に精製を行うことができる。代表的なのが、求核性官能基を持つポリマーを開始剤とした *N*-カルボキシアミノ酸無水物開環重合 (NCA-ROP) である。例えば、アミノ基をもつポリマーを用いて NCA-ROP を行うとジブロック型、トリブロック型およびグラフト型のハイブリッドポリマーを合成することができる⁵⁹⁻⁶¹⁾ (Scheme 1-8)。



Scheme 1-8. Schematic representation of synthesis of peptide-polymer hybrids by NCA-ROP.

このとき得られるハイブリッドのペプチド末端にはアミノ基が残るため、NCA を再度添加することでペプチド鎖の伸長が可能である^{62, 63}。ただし、高分子鎖末端を完全に反応性官能基に変換する必要があるため、ビニルポリマーとの組み合わせには本来適していない。従ってビニルポリマーの場合、NMP および ATRP 開始部位や可逆的連鎖移動部位をペプチド末端に導入し、次いでビニルモノマーを重合する⁶⁴⁻⁶⁶ ほうがハイブリッド化には都合がよいであろう (Scheme 1-9)。



Scheme 1-9. Schematic representation of synthesis of peptide-vinyl polymer hybrids by LRP.

ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドは各構成成分の種類 (一次構造) やその組み合わせ方 (高分子形状) により無限の機能・構造設計が可能な新しいスマートバイオマテリアルと位置づけることができ、それらを精密かつ自在に合成する手法の確立は材料化学の分野において大変意義深いだけでなく、高分子化学の究極の目標の一つである人工タンパク質創成に向けた第一歩となる。そこで本論文では配列制御ペプチドとビニルポリマーのハイブリッド化に際して、高分子形状も分子設計概念に加え、新規に

i) グラフト型ハイブリッド

ii) トリブロック型 (ビニルポリマー-ペプチド-ビニルポリマー) ハイブリッド

iii) マルチブロック型 ((ペプチド-ビニルポリマー)_m) ハイブリッド

の精密合成法を提案し、得られるハイブリッドポリマーの機能・構造特性を明らかにすることにした。

グラフト型ハイブリッドの特徴は、一本のビニルポリマー鎖内に多数のペプチド鎖を導入できることであり、ポリマー主鎖に対してペプチドがぶら下がる様な構造をしている。そのため、ビニルポリマーにペプチド由来の生体機能を付与する場合、グラフト化戦略は都合がよい。第二章および第三章ではこの構造的特徴に着目し、光によりペプチド鎖の脱離が可能なグラフト型ハイブリッドを設計した。グラフト型以外のハイブリッドポリマーでは、ペプチドブロックをポリマー骨格から脱離させるとき、同時にその主鎖骨格構造が破壊されることになる。それに対して、グラフト鎖として導入されたペプチドブロックは、主鎖骨格内に結合点を持たないため、選択的に脱離させることが可能となり、ペプチド由来の機能の ON→OFF が実現できると考えた。ペプチドグラフト鎖の導入方法としては、重合後修飾法やマクロモノマー法が挙げられる。重合後修飾の大きなメリットは、ポリマー主鎖の重合度を変えることなく、任意のグラフト率でペプチドを導入できる点にある。一方、マクロモノマー法のメリットは、シンプルなラジカル重合のケミストリーのみで調製でき、重合の際のモノマーの仕込み比により簡単にグラフト率も調節できる点である。そこで、まず第二章では、マクロモノマー法によるグラフト型ハイブリッドの合成と機能性細胞足場材料への応用性について検討した。ペプチドにはアルギニン-グリシン-アスパラギン酸-セリン配列 (RGDS)、ビニルポリマーには主にポリ(メタクリル酸 2-ヒドロキシエチル) (PHEMA) を採用した。マクロモノマーとしてメタクリロイル基を有する細胞接着性 RGDS ペプチドを新規に設計・合成し (Figure 1-5)、得られたハイブリッドポリマーの細胞接着特性およびその光応答性 (二次元パターニング) について明らかにした。

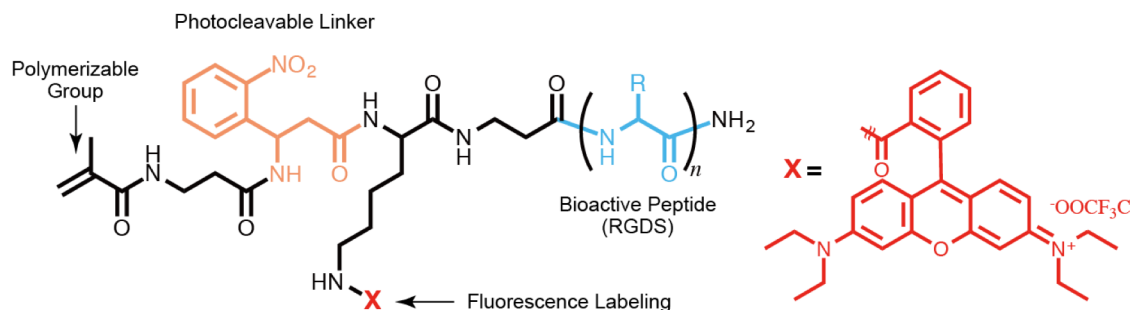


Figure 1-5. Chemical structure of photocleavable and polymerizable RGDS peptide used in chapter 2.

続いて第三章では、クリック反応を用いた重合後修飾によるグラフト型ハイブリッドの合成とその特性について検討した。クリックابل RGDS ペプチドおよびアルキンを含む PHEMA とアクリル酸プロパルギルのランダム共重合体 (poly(HEMA-*ran*-PgA)) を SPPS 法および RAFT 重合法により新規に合成し (Figure 1-6), その細胞接着特性について明らかにした。

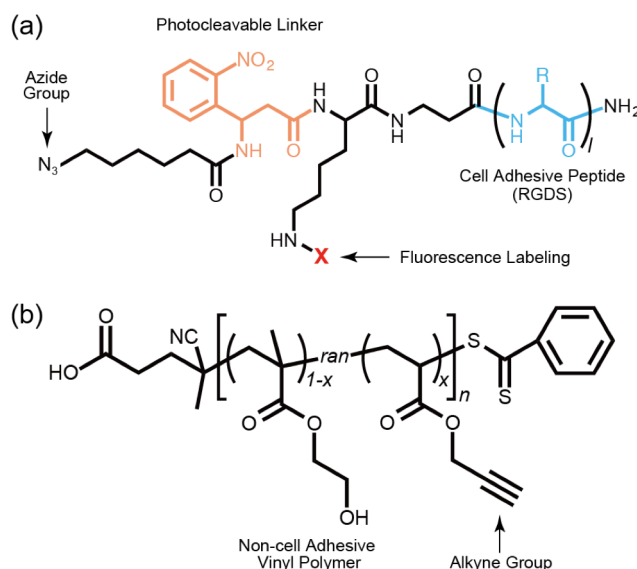


Figure 1-6. Novel photocleavable and clickable peptide (a) and clickable poly(HEMA-*ran*-PgA) (b) used in chapter 3.

一方で、ブロック型ハイブリッドは配列制御されたペプチド鎖が主鎖骨格内の任意の位置に組み込まれた構造をしており、ペプチドブロックの二次構造形成に基づく高次構造化を目指す場合に極めて有効である。このようなブロック型ハイブリッドの特徴を踏まえ、第四章では、トリブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッド (ビニルポリマー-ペプチド-ビニルポリマー) を設計し、ユニマーミセル構造形成に基づくタンパク質様の内部疎水性空間の構築と機能発現の可能性を模索した。構造モデルには緑色蛍光タンパク質 (GFP) を選択し、蛍光種形成に関与する FSYGV ペプチドをコア、疎水性ビニルポリマーをシェル、親水性ビニルポリマーをコロナとしたトリブロック型ハイブリッドを新規に設計した (Figure 1-7)。様々なポリマー種を組み合わせたハイブリッドポリマーを SPPS 法と ATRP 法および RAFT 重合法を組み合わせることで合成し、その蛍光発光特性について明らかにした。GFP 様の緑色蛍光の発現に成功し、ハイブリッド戦略の人工タンパク質モデル構築への有用性を示した。

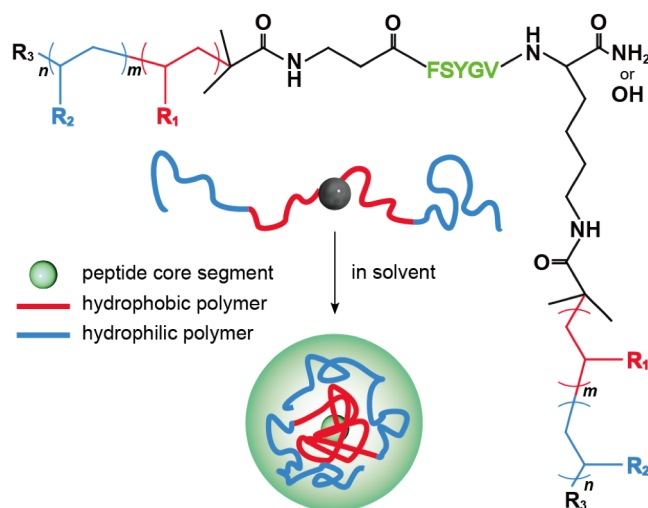


Figure 1-7. Chemical structure of GFP-inspired peptide-polymer hybrid used in chapter 4.

また、ペプチドブロックが一本のビニルポリマー鎖内に繰り返し存在する特異な構造を有するマルチブロック型ハイブリッドは、その反復構造に基づく機能増幅や分子内自己組織化に基づくタンパク質様の単鎖フォールディングも期待でき、近年急速にナノ医療や触媒化学、センサー分野などで注目されている単鎖高分子を基盤とするナノテクノロジー (Single Chain Nanotechnology) を大きく前進させる有望な高分子骨格となり得る。しかしながら、ペプチドとビニルポリマーからなるマルチブロック型ハイブリッドの有効な合成法は確立されていない。そこで、第五章および第六章ではペプチドとビニルポリマーからなるマルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合成法の確立とその構造特性の解明を目指した。まず第五章では NMP の重合機構に着目し、ワンステップでビニルポリマーベースのマルチブロック型ハイブリッドが合成可能な TEMPO 型および TIPNO 型環状ペプチド開始剤を新規に設計・合成した (Figure 1-8)。これらを用いた NMP によりスチレン、*p*-クロロスチレン、4-ビニルピリジン、NIPAM、アクリル酸 *tert*-ブチル、アクリル酸エチルおよびアクリロニトリルなど、様々なビニルモノマーの重合を行い、その重合挙動を明らかにした。

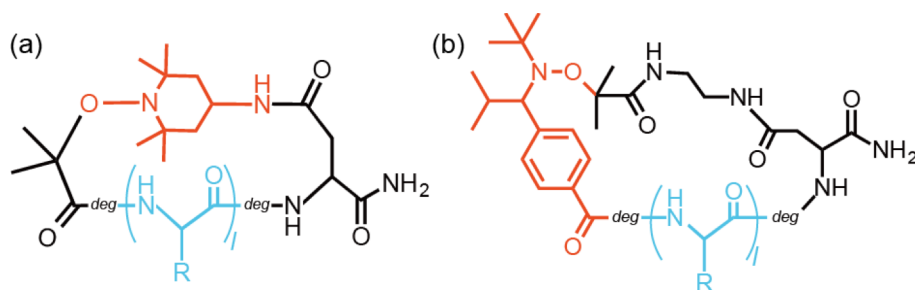


Figure 1-8. Chemical structures of cyclic peptide NMP initiators used in chapter 5 and 6. (a) TEMPO-type and (b) TIPNO-type cyclic peptide initiators.

第六章では、マルチブロック型ハイブリッドのタンパク質様単鎖フォールディングの形成を目指した。第五章で見出したワンステップ合成法を用い、ペプチドとアミノ酸由来ビニルモノマーからなる全ユニットがアミノ酸で構成された温度応答性マルチブロック型ハイブリッドの合成を行い (Figure 1-9), その水中におけるフォールディング挙動について明らかにした。また、アミノ酸由来ビニルポリマーがもつ生体材料としてのポテンシャルを詳細に検討し、細胞シート工学基板としての利用法や生体親和性インジェクタブルゲルとしての利用法も見出した。

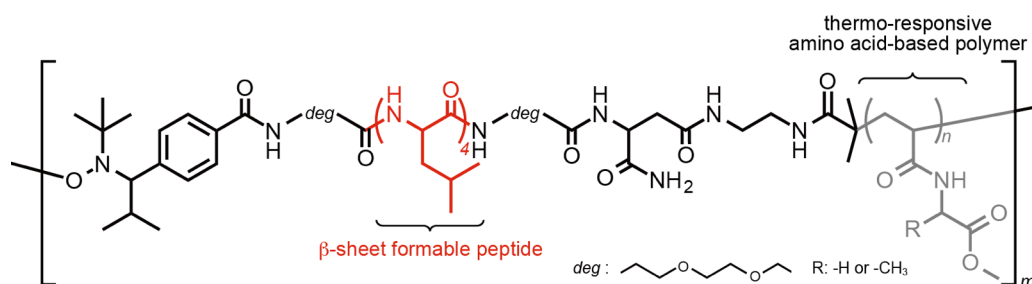


Figure 1-9. Chemical structure of multiblock peptide-polymer hybrid composed of tetraleucine and thermo-responsive amino acid-based vinyl polymer used in chapter 6.

以上の結果を第七章に総括としてまとめ、今後の展望について言及した。

本論文で得た知見は、ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合目的的な設計・合成指針を与えるとともに、スマートバイオマテリアルとしての可能性を広げるものである。また、ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドによる GFP 様の蛍光発現の再現、および全ユニットがアミノ酸で構成されたハイブリッドポリマーによる単鎖フォールディング形成の実現は、人工タンパク質創成に向けた大きな一歩となることを期待する。

参考文献

- 1) W. A. Petka, J. L. Harden, K. P. McGrath, D. Wirtz, D. A. Tirrell, *Science*, **1998**, 281, 389.
- 2) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. C. Lewis, S. B. Kent, *Science*, **1994**, 266, 776.
- 3) J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, *Science*, **2001**, 294, 1684.
- 4) M. G. Ryadnov, D. N. Woolfson, *Nat. Mater.*, **2003**, 2, 329.
- 5) H. Yokoi, T. Kinoshita, S. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2005**, 102, 8414.
- 6) T. Koga, M. Higuchi, T. Kinoshita, N. Higashi, *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 1360.
- 7) S. Nishimura, T. Koga, N. Higashi, *Kobunshi Ronbunshu*, **2016**, 73, 175.
- 8) M. D. Peirschbacher, E. Ruoslahti, *Nature*, **1984**, 309, 30.
- 9) F. G. Hopkins, *Biochem. J.* **1921**, 15, 286.
- 10) E. M. Selsted, S. S. Harwig, T. Ganz, J. W. Schilling, R. I. Lehrer, *J. Clin. Invest.*, **1985**, 76, 1436.
- 11) B. Perly, A. Douy, B. Gallot, *Makromol. Chem.*, **1976**, 177, 2569.
- 12) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149.
- 13) M. Szwarc, *Nature*, **1956**, 178, 1956.
- 14) M. Szwarc, M. Levy, R. Milkovich, *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 2656.
- 15) O. W. Webster, W. R. Hertler, D. Y. Sogah, W. B. Farnham, T. V. Rajanbabu, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 5706.
- 16) T. Higashimura, M. Sawamoto, *Adv. Polymer. Sci.*, **1984**, 62, 49.
- 17) K. Hatada, T. Kitayama, *Polym. Int.*, **2000**, 49, 11.
- 18) M. Sawamoto, *Prog. Polym. Sci.*, **1991**, 16, 111.
- 19) S. Aoshima, S. Kanaoka, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 5245.
- 20) M. Kamigaito, T. Ando, M. Sawamoto, *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 3689.
- 21) K. Matyjaszewski, J. Xia, *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 2921.
- 22) F. J. M. Hoeben, P. Jonkhoejm, E. W. Meijer, A. P. H. J. Schenning, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 1491.
- 23) A. Hirao, M. Hayashi, Y. Tokuda, N. Haraguchi, T. Higashihara, S. W. Ryu, *Polymer J.*, **2002**, 34, 633.
- 24) A. Hirao, M. Hayashi, S. Loykulnant, K. Sugiyama, S. W. Ryu, N. Haraguchi, A. Matsuo, T. Higashihara, *Prog. Polym. Sci.*, **2005**, 30, 111.
- 25) N. Hadjichristidis, M. Pitsikalis, S. Pispas, H. Iatrou, *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 3747.
- 26) S. Paraskeva, N. Hadjichristidis, *J. Polym. Sci., Part A: Polymer Chem.*, **2000**, 38, 931.
- 27) N. Hadjichristidis, *J. Polym. Sci., Part A: Polymer Chem.*, **1999**, 37, 857.
- 28) N. Hadjichristidis, M. Pitsikalis, H. Iatrou, C. Vlahos, *Adv. Polym. Sci.*, **1999**, 142, 72.
- 29) A. Hirao, T. Higashihara, M. Nagura, T. Sakurai, *Macromolecules*, **2006**, 39, 6081.
- 30) M. K. Georges, R. P. N. Veregin, P. M. Kazmaier, G. K. Hamer, *Macromolecules*, **1993**, 26,

2987.

- 31) J. Nicolas, Y. Guillaneuf, C. Lefay, D. Bertin, D. Gigmes, B. Charleux, *Prog. Polym. Sci.*, **2013**, 38, 63.
- 32) A. Goto, T. Fukuda, *Prog. Polym. Sci.*, **2004**, 29, 329.
- 33) D. Benoit, V. Chaplinski, R. Braslau, C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 3904.
- 34) D. Benoit, S. Grimaldi, S. Robin, J. P. Finet, P. Tardo, Y. Gnanou, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 5929.
- 35) J. S. Wang, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 5614.
- 36) M. Kato, M. Kamigaito, M. Sawamoto, T. Higashimura, *Macromolecules*, **1995**, 28, 1721.
- 37) W. Jakubowski, K. Matyjaszewski, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 4482.
- 38) K. Min, H. Gao, K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, **2007**, 40, 1789.
- 39) W. Jakubowski, K. Min, K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, **2006**, 39, 39.
- 40) J. Chiefari, Y. K. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Macromolecules*, **1998**, 31, 5559.
- 41) Y. A. Kabachii, S. Y. Kochev, *Polym. Sci., Ser. A*, **2006**, 48, 717.
- 42) Y. K. Chong, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Macromolecules*, **2007**, 40, 4446.
- 43) C. J. Hawker, J. L. Herdrick, E. E. Malmström, M. Trollsås, D. Mecerreyes, G. Moineau, Ph. Dubois, R. Jérôme, *Macromolecules*, **1998**, 31, 213.
- 44) J. Nicolas, B. Charleux, O. Guerret, S. Magnet, *Macromolecules*, **2005**, 38, 9963.
- 45) Y. Tsujii, K. Ohno, S. Yamamoto, A. Goto, T. Fukuda, *Adv. Polym. Sci.*, **2006**, 197, 1.
- 46) S. E. Kirkland, R. M. Hensarling, S. D. McConaughy, Y. Guo, W. L. Jarrett, C. L. McCormic, *Biomacromolecules*, **2008**, 9, 481.
- 47) C. Li, N. J. Buurma, I. Haq, C. Turner, S. P. Armes, *Langmuir*, **2005**, 21, 11026.
- 48) D. Yu, C. Luo, W. Fu, Z. Li, *Polym. Chem.*, **2014**, 5, 4561.
- 49) H. Mori, T. Endo, *Macromol. Rapid. Commun.*, **2012**, 33, 1090.
- 50) S. Pfeifer, J. -F. Lutz, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 9542.
- 51) N. Badi, J. -F. Lutz, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 3389.
- 52) G. Gody, T. Maschmeyer, P. B. Zetterlund, S. Perrier, *Nat. Commun.*, **2013**, 4, 2505.
- 53) N. G. Engelis, A. Anastasaki, G. Nurumbetov, N. P. Truong, V. Nikolaou, A. Shegiwal, M. R. Whittaker, T. P. Davis, D. M. Haddleton, *Nat. Chem.*, **2017**, 9, 171.
- 54) M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2012**, 64, 116.
- 55) S. Dehn, R. Chapman, K. A. Jolliffe, S. Perrier, *Polym. Rev.*, **2011**, 51, 214.
- 56) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004.
- 57) S. G. Agalave, S. R. Maujan, V. S. Pore, *Chem. Asian J.*, **2011**, 6, 2696.
- 58) C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 1540.

- 59) T. Koga, M. Koike, S. Kamiwatari, N. Higashi, *Chem. Lett.*, **2011**, 40, 1244.
- 60) H. -A. Klok, J. F. Langenwalter, S. Lecommandoux, *Macromolecules*, **2000**, 33, 7819.
- 61) S. Lecommandoux, M. -F. Achard, J. F. Langenwalter, H. -A. Klok, *Macromolecules*, **2001**, 34, 9100.
- 62) B. Perly, A. Douy, B. Gallot, *Makromol. Chem.*, **1976**, 177, 2569.
- 63) H. R. Marsden, A. Kros, *Macromol. Biosci.*, **2009**, 9, 939.
- 64) Y. Mei, K. L. Beers, H. C. M. Byrd, D. L. Vanderhart, N. R. Washburn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 3473.
- 65) T. Koga, S. Kamiwatari, N. Higashi, *Langmuir*, **2013**, 29, 15477.
- 66) T. Koga, E. Aso, N. Higashi, *Langmuir*, **2016**, 32, 12378.

第二章:

マクロモノマー法によるグラフト型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合成と細胞足場材料への展開

2-1. 緒言

序論でも述べたように、ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの構造はグラフト型、ジブロック型、トリブロック型、マルチブロック型、スター型など多岐にわたり、その高分子形状は機能・構造特性に密接に関係する。その中でもグラフト型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドは比較的容易に合成することができ、ポリマー材料にペプチド機能を付与するのに向いている。一般的にグラフトポリマーの代表的な合成方法はマクロモノマー法 (grafting-through), 重合後修飾法 (grafting-to) およびポリマー鎖からのグラフト重合法 (grafting-from) である。ペプチドとのハイブリッド化において、マクロモノマー法では、配列制御ペプチドの末端に重合性の (メタ)アクリロイルなどを導入し、ビニルモノマーと共重合させることでグラフト型ハイブリッドを合成できる。一方、重合後修飾法では、主鎖にペンタフルオロフェニル基のような良好な脱離基やアルキンなどのクリッカブル官能基を有するポリマーを先に合成しておき、後からペプチドをグラフト鎖として導入する。Grafting-from 法では配列制御ペプチドを重合により得ることが困難なため、グラフト型ハイブリッドの合成法として有用性に乏しい。ここではマクロモノマー法を採用した。この方法は、様々なビニルモノマーとペプチドを共重合させることが可能であり、重合時のモノマー仕込み比を変えるだけで容易にグラフト率を変化させることが可能である。本章では、ペプチドセグメントとして細胞認識エピトープを用いてグラフト型ハイブリッドの設計・合成とその細胞足場材料への応用について検討した。

近年、細胞を用いた生体組織の再生あるいは再構築技術の確立を目的とした組織工学が精力的に研究展開されており、それを支える新しい材料の開発や高機能化が求められている。その際、材料と生体分子との間に必ず界面 (バイオインターフェイス) が存在する。生体と材料との相互作用では、この界面が決定的な役割を果たす。従って、バイオ界面をナノ・マイクロスケールで理解し、制御する技術を確立することは、生体接触型マテリアルの高機能化に重要である。特に、周囲の環境条件や外部刺激に応答して自らの表面特性を変化させるスマート界面を設計するためには、大きな内部自由度を特徴とする高分子材料が最適である。本章では、光により細胞との親和性が変化する新しいグラフト型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドを基盤とする高分子材料を設計し、バイオ界面の精密制御に基づいて細胞と人工材料との相互作用や細胞機能の制御を目指した。

生体内で細胞の接着・増殖のための足場の役割を果たしているのは細胞外マトリックス (ECM) である。ECMはタンパク質のグリコサミノグリカンの不溶性集合体であり、細胞の接着・移動・分化・増殖など、細胞活性を細胞の外側から制御する因子群として重要視されて

いる．このうち細胞接着性タンパク質の一つであるフィブロネクチン (FN) は非常に強力な細胞接着活性を持つことが知られている．1984年にPierschbacherとRuoslahtiは，FN中の接着活性に関与している部位のアミノ酸配列のうち，RGDのわずか3残基が細胞接着活性の最小単位であることを報告した¹⁾．1998年にはFNのタイプIII第10モジュールのRGDを含む部分の配列の10残基程度が，ループ構造を形成してタンパク質表面より飛び出ていることが報告された．その折り返し部分に存在するRGD配列は，細胞内の $\alpha_5\beta_1$ と $\alpha_{IIb}\beta_3$ レセプターを含むインテグリンレセプターと結合する主要な接着性シークエンスであるということも明らかにされた²⁻⁶⁾．また，RGDよりもRGDSの方がより高い細胞接着性を示すということも報告されており³⁾，これは鎖長の増加に伴うコンフォメーションの安定化に起因すると考えられる．

天然のECMの代替となる人工の足場材料としては，細胞接着性や増殖性に優れていることの他に，生体親和性，細胞への酸素・栄養を輸送するための多孔質性，適切な機械的特性，取り扱いやすく目的の形状に加工できる成形性などを兼ね備えている方が都合良く，かつ魅力的である．このような観点から，オリゴペプチド・エピトープ (RGDS型) を合成高分子と組み合わせる手法は，化学合成の容易さや高い安定性，様々な材料との融合性や目的に応じた拡張性など，優れた分子戦略であるといえる．

本章では，ビニルポリマーとして高い生体親和性と細胞非接着性を有するポリ(メタクリル酸 2-ヒドロキシエチル) (PHEMA) にグラフト鎖として光分解性の3-アミノ-3-(2-ニトロフェニル)プロパン酸 (ANP) リンカーを介して細胞認識ペプチド (RGDS) エピトープを導入したハイブリッドポリマー (Figure 2-1) を新規に設計した．PHEMAは生体親和性が高く，ハイドゲル形成能や成膜性を有するため人工的な足場材料の素材に適していると考え，光により細胞結合点の二次元・三次元マイクロ空間パターン化が可能な新しい足場材料となることを期待した．光は外部から容易に照射することができ，照射範囲はフォトマスクを用いることで調節可能である．まずRGDSマクロモノマーの合成とその光分解性を評価し，次いでスチレ

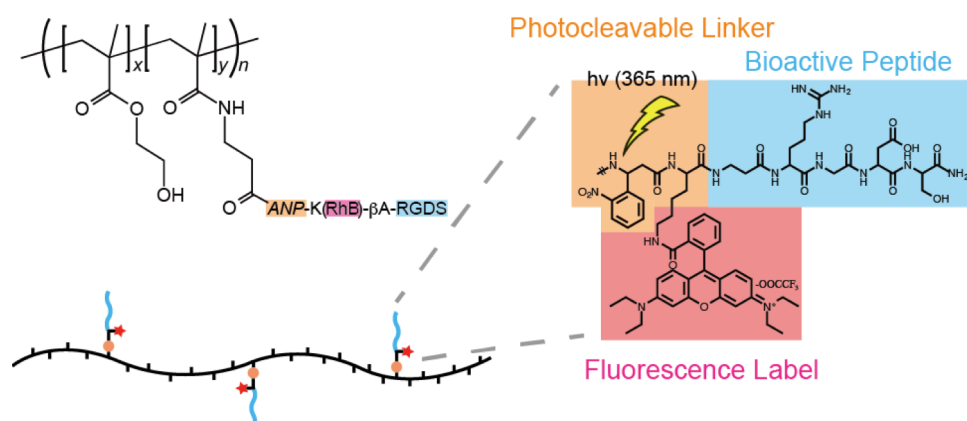


Figure 2-1. Chemical structure of a graft-type peptide–vinyl polymer (PHEMA) hybrid containing cell adhesive and photodegradable peptide-epitope (Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)).

ン，メタクリル酸メチルおよびHEMAなど様々なビニルモノマーとの共重合について検討した．また，得られたPHEMAベースのハイブリッドのフィルム化と細胞接着特性について検討し，光照射によるRGDSペプチドの二次元パターン化も行った．

2-2. 実験方法

2-2-1. 試薬

N,N-ジメチルホルムアミド (DMF), メタノール, 2,2,2-トリフルオロ酢酸 (TFA), ジクロロメタン, ジエチルエーテル, アセトニトリル, 塩酸 (12 M-HCl), トリエチルアミン (TEA), *N*-メチルモルフォリン (NMM), ピペリジン, 2,2,2-トリフルオロエタノール (TFE), 2,2'-アゾイソブチロニトリル (AIBN), スチレン (St) および重ジメチルスルホキシド(DMSO-*d*₆) はナカライテスク株式会社から, 2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA), ローダミン B (RhB), 4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルフォリニウム塩酸塩 (DMT-MM), *N,N'*-ジイソプロピルカルボジイミド (DIPC), *N*-(9-フルオレニルメトキシカルボニルオキシ)スクシンイミド (Fmoc-OSu), 臭化リチウム (LiBr) および *N,N,N',N'',N'''*-ペンタメチルジエレントリアミン (PMDETA) は和光純薬工業株式会社から, Fmoc-L-Arg(Pbf), Fmoc-Gly, Fmoc-L-Asp(OtBu), Fmoc-L-Ser(tBu), Fmoc-β-Ala, Fmoc-Lys(Mtt), Fmoc-NH-SAL MBHA 樹脂 (resin loading 0.67 mmol/g) および 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール無水物 (HOBt) は渡辺化学工業株式会社から, 無水メタクリル酸, 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHBA) およびメタクリル酸メチル (MMA) はシグマアルドリッチジャパン株式会社から, 3-アミノ-3-(2-ニトロフェニル)プロパン酸 (ANP) は Alfa Aesar 社から購入した. 重合には蒸留した DMF およびメタノールを用いた. HEMA, St および MMA は塩基性活性アルミナカラムを用いて重合禁止剤を除去した後に用いた. その他の試薬は特に精製することなく用いた.

2-2-2. 合成

2-2-2-1. 3-((((9H フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(2-ニトロフェニル)プロパン酸 (Fmoc-ANP) の合成

まず, ANP 2.52g (12.0 mmol) および TEA 3.00 mL (21.5 mmol) を蒸留水 (60 mL) に溶解させた. 次に, Fmoc-OSu 6.09g (18.0 mmol) をアセトニトリル (60 mL) に溶解させ, ANP 水溶液に滴下した. 滴下終了後, 1.5 時間室温下で反応させた. 反応溶液からアセトニトリルを減圧除去し, 得られた水溶液をヘキサン (100 mL) で 3 回洗浄した. 目的の Fmoc-ANP を有機層へ抽出するため, 酢酸エチル (150 mL) と 12 M-HCl_{aq} (15 mL) を水溶液へ加え, 室温で 30 分間激しく攪拌した. 有機層を回収し, 2M-HCl_{aq} (50 mL) および蒸留水 (50 mL) を用いてそれぞれ 3 回ずつ洗浄した. 洗浄後, 有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水し, 溶媒を減圧除去することで粗精製物を固体として得た. 最後に, 粗精製固体を超純水で洗浄し乾燥させることで, 純粋な Fmoc-ANP を肌色固体として得た. 構造決定は ¹H NMR スペクトル測定により行った.

収量: 4.16 g (84.7%)

^1H NMR (DMSO- d_6 , TMS): δ 2.78 ppm (*ANP*, 2H, methylene), 4.21 ppm (Fmoc, 1H, methine), 4.30 ppm (Fmoc, 2H, methylene), 5.45 ppm (*ANP*, 1H, methine), 7.00-8.00 ppm (Fmoc and *ANP*, 12H, aromatic ring), 8.27 ppm (Fmoc, 1H, NHCOO), 12.5 ppm (*ANP*, 1H, carboxyl).

2-2-2-2. 光分解性リンカーを介して重合性官能基を末端に有する RGDS ペプチドマクロモノマーの合成

まず, Fmoc-アミノ酸誘導体 (Fmoc-L-Ser, Fmoc-L-Asp(OtBu), Fmoc-Gly, Fmoc-L-Arg(Pbf), Fmoc- β -Ala, Fmoc-L-Lys(Mtt)), Fmoc-*ANP* および メタクリル酸無水物 (3 当量) を縮合剤に HOBt (3 当量) および DIPC (3 当量) を用いて DMF 中で順次縮合させることにより, 目的の配列を有するペプチドを Fmoc-NH-SAL MBHA 樹脂上に合成した. 続いて, TFA/ジクロロメタン/TIS (v/v/v = 1/98/1) 混合溶媒で 30 分間処理することで Lys 側鎖上の 4-メチルトリチル (Mtt) 基を脱保護した. 露呈した樹脂上の Lys 側鎖のアミノ基と RhB (3 当量), DMT-MM (3 当量) および NMM (3 当量) を DMF/メタノール (v/v=4/1) 混合溶媒中で 24 時間反応させ, 蛍光ラベル化を施した. 修飾後, 樹脂を TFA/ジクロロメタン/TIS (v/v/v=8.5/1/0.5) 混合溶媒で処理した. ジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法により, 目的のペプチドマクロモノマー (MA- β A-*ANP*-K(RhB)- β A-RGDS-*Am*) を紅桔梗色固体として得た. 構造決定は MALDI-TOF MS および ^1H NMR スペクトル測定により行った.

MALDI-TOF MS: obsd. $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$ (calcd. $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$); 1524.095, 1540.167 (1502.59, 1524.58, 1540.68).

^1H NMR (DMSO- d_6 , TMS): δ 0.80-1.82 ppm (RhB, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, 6H; RhB, $=\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, 6H; Lys, γ - CH_2 , 2H; Lys, δ - CH_2 , 2H; Arg, γ - CH_2 , 2H; Lys, β - CH_2 , 2H; Arg, β - CH_2 , 2H; methacryloyl, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, 3H), 2.45 ppm (β -Ala, α - CH_2 , 4H), 2.60-4.90 ppm (*ANP*, $-\text{CH}-\text{CH}_2-$, 2H; Asp, β - CH_2 , 2H; Arg, δ - CH_2 , 2H; Lys, ϵ - CH_2 , 2H; β -Ala, β - CH_2 , 4H; RhB, $=\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, 4H; Gly, α - CH_2 , 2H; Ser, β - CH_2 , 2H; amino acids, α -CH, 5H), 3.30 ppm (RhB, $=\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, 4H; RhB, $=\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, 4H), 5.20, 5.60 ppm (methacryloyl, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, 2H), 6.25-6.45 ppm (RhB, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)=\text{CH}-$, 3H; RhB, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)-\text{CH}=$, 3H), 7.00-8.45 ppm (*ANP*, $-\text{C}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{C}(\text{NO}_2)-$, 4H; RhB, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}-$ 4H; $-\text{OCNH}_2$, 2H; $-\text{CONH}-$, 9H).

2-2-2-3. MA- β A-*ANP*-K(RhB)- β A-RGDS-*Am* と HEMA の共重合

MA- β A-*ANP*-K(RhB)- β A-RGDS-*Am* と HEMA の共重合は開始剤に AIBN を用いてメタノール中 60°C で 12 時間行った. その後, 反応溶液を水へ滴下することで生成したポリマーを沈殿させた. メタノールを良溶媒, 水を非溶媒に用いた再沈殿法により精製し, 凍結乾燥することで目的のグラフトコポリマー (poly(HEMA-*g*- β A-*ANP*-K(RhB)- β A-RGDS-*Am*)) を蹄躑色固体として得た. 構造決定は ^1H NMR スペクトル測定, 数平均分子量 (M_n) およ

び多分散度 (D) の算出は SEC 測定により行った.

SEC (DMF (containing 10 mM LiBr), 40 °C, PMMA standard): $M_n=195000$, $D=1.61$.

^1H NMR (DMSO- d_6 , TMS, x means grafting ratio of peptide chain): δ 0.60-2.00 ppm (RhB, $-(\text{NCH}_2\text{CH}_3)_2$, $6xn\text{H}$; RhB, $=(\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $6xn\text{H}$; Lys, $\gamma\text{-CH}_2$, $2xn\text{H}$; Lys, $\delta\text{-CH}_2$, $2xn\text{H}$; Arg, $\gamma\text{-CH}_2$, $2xn\text{H}$; Lys, $\beta\text{-CH}_2$, $2xn\text{H}$; Arg, $\beta\text{-CH}_2$, $2xn\text{H}$; PHEMA, methylene (main chain), $2(1-x)n\text{H}$; PHEMA, methyl (main chain), $3(1-x)n\text{H}$; poly(MA- β A-ANP-K(RhB)- β A-RGDS-*Am*), methylene (main chain), $2xn\text{H}$; poly(MA- β A-ANP-K(RhB)- β A-RGDS-*Am*), methylene (main chain), $3xn\text{H}$), 2.45-2.90 ppm (β -Ala, $\alpha\text{-CH}_2$, $4xn\text{H}$), 2.90-4.90 ppm (Arg, $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH}_2)=\text{NH}$, $xn\text{H}$; Asp, $\beta\text{-CH}_2$, $2xn\text{H}$; ANP, $-\text{CH}_2$, $2xn\text{H}$; RhB, $-(\text{NCH}_2\text{CH}_3)_2$, $4xn\text{H}$; Arg, $\delta\text{-CH}_2$, $2xn\text{H}$; Lys, $\epsilon\text{-CH}_2$, $2xn\text{H}$; β -Ala, $\beta\text{-CH}_2$, $4xn\text{H}$; RhB, $=(\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $4xn\text{H}$; Gly, $\alpha\text{-CH}_2$, $2xn\text{H}$; Ser, $\beta\text{-CH}_2$, $2xn\text{H}$; amino acids, $\alpha\text{-CH}$, $5xn\text{H}$; PHEMA, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $2(1-x)n\text{H}$; PHEMA, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $2(1-x)n\text{H}$; PHEMA, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $(1-x)n\text{H}$), 6.25-6.45 ppm (RhB, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)=\text{CH}-$, $3xn\text{H}$; RhB, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)=\text{CH}-$, $3xn\text{H}$), 7.00-8.45 ppm (ANP, $-\text{C}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{C}(\text{NO}_2)-$, $4xn\text{H}$; RhB, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}-$, $4xn\text{H}$; $-\text{OCNH}_2$, $2xn\text{H}$; $-\text{CONH}-$, $9xn\text{H}$).

2-2-2-4. ガラス基板上へのポリマー薄膜の調製

Poly(HEMA-*g*- β A-ANP-K(RhB)- β A-RGDS-*Am*), および PHEMA 薄膜の調製はスピコートにより行った. 各ポリマーの TFE 溶液 (20 mg mL^{-1}) を $30 \mu\text{L}$ 超親水化ガラス基板 ($1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$) に乗せ, 100 rpm で 1 分間プレコートした後に 5000 rpm で 30 秒間スピコートした. その後, 室温で一晩乾燥させた. なお, 各ポリマー溶液は使用前にコスモナイスフィルター (ナカライテスク株式会社製, 孔径: $0.45 \mu\text{m}$) を用いて溶液中の不純物を除去してから用いた. 調製したフィルムの厚さは AFM のカンチレバーでスクラッチし, 断面の深さから算出した.

2-2-2-5. フォトマスクの作製

まず, デザインしたパターンを基板に対して 5 倍の大きさにマイクロソフト社製のソフトウェア Power Point を用いて描画し, OHP フィルム (VF-1101N, コクヨ株式会社製) 上に印刷した. この OHP フィルムとエマルジョンマスク (High Precision Photo Plate HRP-SN-2 4×4 30Z, コニカミノルタ株式会社製) を暗室で simple mask fabrication machine (MM605, Nanometric Technology Inc.) にセットした. OHP フィルムを通して光を照射することでエマルジョンマスクを感光させ, OHP フィルム上に描画した 5 分の 1 の大きさのパターンを転写した. 最後にこのエマルジョンマスクを現像液 (High-Resolution Plate Developer CDH-100, コニカミノルタ株式会社製) および定着液 (High-Resolution Plate Fixer CFL-881P, コニカミノルタ株式会社製) で処理し, 目的のフォトマスクを得た.

2-2-2-6. 細胞実験

マウス由来繊維芽細胞 (NIH3T3) を80%コンフルエントになるまで、10%のコウシ血清 (FBS) (04-001-1A, コスモバイオ株式会社製) および抗生物質(A5995-100ML, シグマアルドリッチジャパン株式会社製) を含むDMEM (L7A0439, ナカライテスク株式会社製) 中に播種し、37°C, 5% CO₂のインキュベーターで培養した. このNIH3T3細胞を 2.0×10^4 cells cm⁻²の密度でポリマー薄膜上に播種し、37°C, 5% CO₂のインキュベーターで24時間培養した. 接着細胞数の評価は共焦点顕微鏡の位相差像および蛍光像から検討した. なお, 生細胞はカルセイン-AMで染色した.

2-2-3. 測定

¹H NMRスペクトルの測定は日本電子社製JNM-ECA500を用いて行った. 測定にはφ5×7インチのNMR試験管を用い、温度は25°Cとし積算回数は16回で行った. サンプル濃度は1wt%とした. マトリックス支援レーザー励起イオン化質量分析 (MALDI-TOF MS) スペクトル測定はブルカートルトニックス株式会社製Autoflex Speedを用いて行った. キャスト溶媒には水/TFA (v/v = 7/3), マトリックスにはDHBAを用い、サンプル濃度は0.1 μMとした. サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 測定は日本分光社製LC-net II/ADを用いて行った. カラムには東ソー株式会社製TSKgel α-4000を、溶離液にはDMF (10 mM LiBr) を用いた. ポンプの流速は0.6 mL min⁻¹とし、測定温度は40°Cとした. 解析には付属のプログラムChrom Navi GPCを用い、校正曲線はガスクロ工業社製ポリメタクリル酸メチルスタンダード (M_w =2810, 5000, 10290, 27600, 60150, 138600, 298900) またはガスクロ工業社製ポリスチレンスタンダード (M_w =2200, 4000, 9000, 19000, 50000, 83000, 170000, 300000, 900000, 1800000) により作成した. 紫外可視吸収 (UV-vis) スペクトルは日本分光社製Jasco V-650を用いて光路長1 cmの石英セル中で測定した. サンプル濃度は100 μMとした. フーリエ変換赤外吸収 (FTIR) スペクトルは日本分光社製FT/IR-4600を用いて測定した. 検出器には重水素化L-アラニンドープトリグリシンサルファイド (DLATGS) を用いた. 分解能は4 cm⁻¹とし、積算回数は透過法の場合で8回, 全反射吸収 (ATR) 法の場合で32回とした. 対水接触角測定は協和界面科学株式会社製DropMaster-501を用いて室温で行った. 液滴量は1 μLとした. 原子間力顕微鏡 (AFM) 観察は島津製作所製SPM-9700を用いて行った. 探針種にはOMCL-TR800PSA-1 (曲率半径: <20 nm) を用い、コンタクトモードでスキャン速度1.0 Hzで測定を行った.

2-3. 結果および考察

2-3-1. 細胞接着特性の自在制御を目指したグラフト型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドシステムの設計

緒言でも述べたように、FN中のRGD配列は多種類の細胞の接着や伸展の重要な役割を担うことが明らかにされている。また、RGD密度は細胞の様々な機能に影響を与え、一般に高いRGD表面密度は細胞の焦点接着や増殖を促進すると考えられている。MassiaらはRGDで機能化した表面において、RGD表面密度が 1 fmol cm^{-2} であれば細胞進展に十分であり、 10 fmol cm^{-2} であれば焦点接着形成に十分であることを報告している⁷⁾。一方で、細胞移動に関しては、RGD表面密度が低いと起こらないだけでなく、高密度であっても抑制されることも報告されている⁶⁾。このようにペプチド配列やその導入量は細胞培養において重要である。近年では、固体表面上にRGDエпитープを感光性分子を介して直接修飾することで光による細胞接着性の制御が達成されており⁸⁻¹¹⁾、このような二次元パターン化は組織工学や細胞チップによるスクリーニングにとって重要な技術である。しかしながら、固体基板へRGDエピトーブを直接修飾

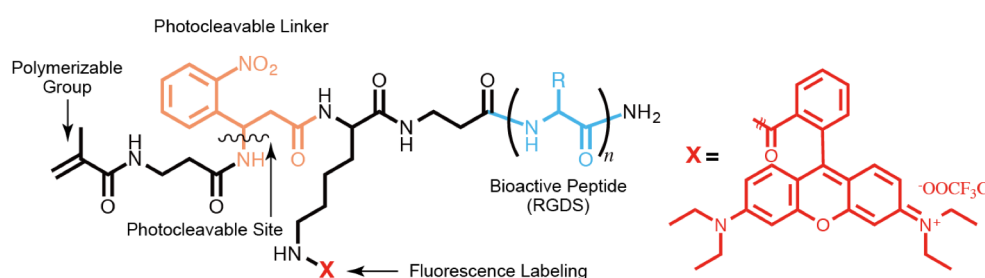


Figure 2-2. Chemical structure of photocleavable and polymerizable RGDS peptide.

するこれらの方法は、使用できる固体基材に制限があり、かつ製造コストが高いことがネックである。本研究では、安価に製造できるビニルポリマーに光切断可能なRGDSペプチドをグラフト鎖として導入したグラフト型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドを採用し、その適用範囲の拡張を狙った。ポリマーは様々な溶媒に可溶で成膜性が高いため様々な基材にコーティングすることが容易であり、複雑な三次元形状の基材などにも細胞接着性を付与することが出来ると考えた。マクロモノマー法により合成でき、重合反応のモノマー仕込み比を変えるだけでグラフト鎖の導入量 (グラフト率, G_r) も簡単に調節できることも魅力的である。Figure 2-2に示した光分解性の3-アミノ-3-(2-ニトロフェニル)プロパン酸 (ANP) を介して重合性官能基を末端に有するRGDSマクロモノマーを新規に設計し、本ハイブリッドシステムの確立を目指した。

2-3-2. 光分解性リンカーを介して重合性官能基を末端に有するRGDSペプチドマクロモノマーの合成とその光分解性

Figure 2-2に示したように、本研究で用いるペプチドは、1) *N*末端に重合性のメタクリロイル、2) 光分解性のANPリンカー、3) 蛍光ラベル化を施すためのLys残基、そして4) 細胞接着性を発現するRGDS配列を有する。このペプチドは別途合成したFmoc-ANPと通常のFmoc-アミノ酸を用いたSPPS法により純度よく合成することができた。なお、ローダミンB (RhB) による蛍光ラベル化は、Lys残基上のMtt基を選択的に脱保護した後、樹脂上で行った。構造確認はMALDI-TOF MS (Figure 2-3b, 上段) および¹H NMRスペクトル測定により行った。それぞれ理論値に一致する分子量および化学シフト値が観測されたことから、純度よくペプチドマクロモノマーが得られたことがわかった。

次に、ペプチドマクロモノマー中のANPリンカーの光分解性を検討した。ANPは比較的エネルギーの低い365 nmの紫外線を照射するだけで Norrish II型機構を経て速やかに分解することが知られている^{12, 13}。ペプチドマクロモノマーを100 μMの濃度になるように水へ溶解させ、8 Wのハンディーランプを用いて365 nmの光を室温で照射した。この光分解反応の挙動をUV-visおよびMALDI-TOF MSスペクトルを用いて追跡した。なお、RhBの強い吸収によりANPに由来する吸収を区別することができないため、UVスペクトル測定にはRhBを修飾していないペプチドマクロモノマーを用いた。Figure 2-3aにその際のUVスペクトルの変化を示す。

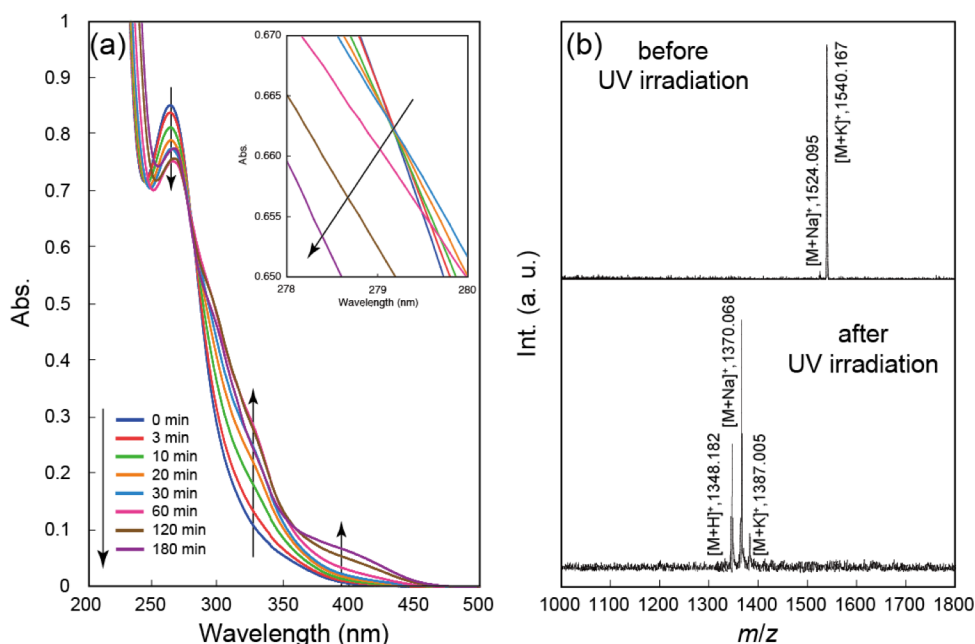


Figure 2-3. (a) UV-vis spectral change of peptide-macromonomer (without RhB) by UV irradiation (365 nm) in water at RT. Inset shows magnified spectral change at around 279 nm. [peptide]=100 μM. (b) MALDI-TOF MS spectra of peptide-macromonomer (with RhB) obtained before and after UV irradiation for 30 min in water.

UV照射前に観察されたANP部位に基づく264 nmの吸収はUV照射により減少し、同時に325 nmおよび 400 nmに新たな吸収が出現すると共にその増大が観察された。スペクトルの変化は 279 nmの等吸収点を通して進行したが、UV照射時間が30分を超えると等吸収点からのずれが生じることがわかった。この結果から、UV照射によるANP部位の光分解反応は30分以内に完了し、それ以上の照射は副反応をもたらすことが示唆された。同様の条件で光を30分間照射したRhBが修飾されたペプチドマクロモノマーのMALDI-TOF MSスペクトル測定を行ったところ、光照射前に見られた1524.1 ($[M+Na]^+$) および1540.2 ($[M+K]^+$) が完全に消失し、新たに1348.2 ($[M+H]^+$), 1370.1 ($[M+Na]^+$) および1387.0 ($[M+K]^+$) が出現した (Figure 2-3b)。これは、ANPのC-N結合の開裂により生じたペプチドフラグメントの分子量とよく一致する。以上のことから、ANP部位の光分解は30分間のUV照射で十分に進行すると判断し、以降の実験における光照射時間は全て30分とした。

2-3-3. ペプチドマクロモノマーとビニルモノマーのラジカル共重合

このマクロモノマーと種々のビニルモノマー (HEMA, StおよびMMA) のラジカル共重合を開始剤にAIBNを用いて60°Cで行い (仕込み比は[マクロモノマー]:[HEMA, StまたはMMA]:[AIBN]=3:97:0.5), 得られたハイブリッドポリマーの構造をSECおよび 1H NMR解析により評価した。一例として, HEMA ベースのグラフト型ハイブリッド (poly(HEMA-g- β A-ANP-K(RhB)- β A-RGDS-*Am*)) の測定結果をFigure 2-4, 青線に示す。SECチャートより単一のピークが得られ高分子量 ($M_n=195000$ g mol $^{-1}$, $D=1.61$) のポリマーが生成していることがわかる。また, 1H NMRスペクトルからペプチドグラフト鎖の存在を確認し, グラフト率 (G_r)を算出したところ, 3%の仕込みに対して2.5%のハイブリッドポリマーが得られていることがわかった。さらに, 重合時のモノマーの仕込み比を変えることで $G_r=0.3\%$, 0.8% , 4.2% , 8.1% のpoly(HEMA-g- β A-ANP-K(RhB)- β A-RGDS-*Am*)を得ることに成功した (Table 2-1)。同様にStやMMAとの共重合でも重合が進行し, グラフト型ハイブリッドを得ることができた。

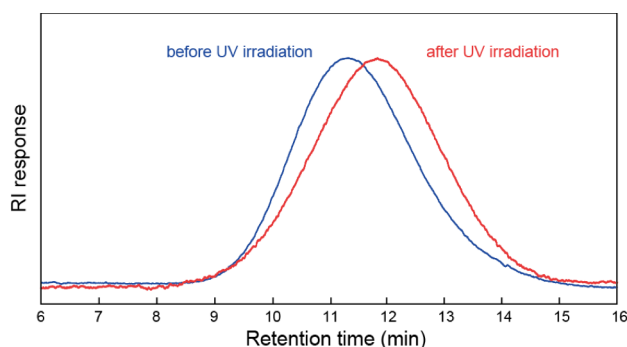


Figure 2-4. SEC charts (DMF eluent (containing 10 mM LiBr), 40°C, refractive index (RI) detector) of poly(HEMA-g- β A-ANP-K(RhB)- β A-RGDS-*Am*) ($G_r=2.5\%$) obtained before and after UV irradiation (365 nm, 30 min).

これらの結果より、マクロモノマー法によりRGDSペプチドを種々のビニルポリマーにグラフト鎖として導入することができ、かつ仕込み比によりグラフト率を容易に調節可能であることがわかった。最も重要なことは、ANPの光分解反応は共重合体においても進行し、実際にペプチドグラフト鎖がポリマー主鎖から切断可能であるかということである。そこで、 $G_r=2.5\%$ のpoly(HEMA-g- β A-ANP-K(RhB)- β A-RGDS-*Am*)をDMFに溶解させ、30分間 365 nmのUV光を照射したのちにSEC測定を行った (Figure 2-4, 赤線)。UV照射後のハイブリッドポリマーのSECチャートは低分子量側にシフトし、 M_n はUV照射前と比較しておおよそ38000 g mol⁻¹程度減少していた。この分子量の減少量はポリマー主鎖に含まれるペプチドグラフト鎖の分子量の合計 (42500 g mol⁻¹) とよく一致した。このことから、光照射によりRGDSペプチド鎖をポリマー主鎖から自由に切断可能であることがわかった。

Table 2-1. Summary of feed composition of copolymerization and characterization of obtained polymers in this study.

Feed composition		MeOH (mL)	Obtained Grafting Ratio, G_r^a (%)	M_w^b ($\times 10^5$ g mol ⁻¹)	M_n^b ($\times 10^5$ g mol ⁻¹)	\bar{D} (M_w/M_n)	Thicknesses of Polymer Films ^{c, d} (nm)	Water Contact Angles ^c (°)
[HEMA] ($\times 10^{-5}$ mol)	MA- β A-ANP- K(RhB)- β A-RGDS- <i>Am</i> ($\times 10^{-5}$ mol)							
99.5	0.5	0.373	0.3	3.84	2.25	1.71	110	43 \pm 1
99.0	1.0	0.366	0.8	3.45	2.16	1.60	100	51 \pm 1
97.0	3.0	0.340	2.5	3.14	1.95	1.61	100	58 \pm 1
95.0	5.0	0.314	4.2	2.39	1.68	1.42	95	60 \pm 1
90.0	10.0	0.249	8.1	1.86	1.31	1.42	90	62 \pm 1

a) The chemical compositions of copolymers were evaluated by ¹H NMR analysis.

b) Weight-average and number-average molecular weights were calculated by SEC analysis (PMMA standard) in DMF (containing 10 mM Li Br) at 40°C.

c) Polymer thin films were prepared by spin-coating (5000 rpm) from 2,2,2-trifluoroethanol solutions of copolymers (20 mg mL⁻¹).

d) Thicknesses of polymer thin films were evaluated by using AFM cross-sectional analyses.

2-3-4. グラフト型poly(HEMA-g- β A-ANP-K(RhB)- β A-RGDS-*Am*)フィルムの作製と細胞接着特性の評価

以降の実験は、poly(HEMA-g- β A-ANP-K(RhB)- β A-RGDS-*Am*)を用いて行った。PHEMAは高い生体親和性と力学特性を有するポリマーであり、ハイドロゲルやフィルムを形成しやすく、細胞非接着性を示すため、バイオマテリアルとして利用されている¹⁴⁾。ガラス基板上に $G_r=0.3$, 0.8, 2.5, 4.2および8.1%のpoly(HEMA-g- β A-ANP-K(RhB)- β A-RGDS-*Am*)ハイブリッドフィルムおよびPHEMAホモポリマーフィルムをスピコート法により作製し、その特性評価を行った (Table 2-1)。得られたフィルムをAFMのカンチレバーを用いて削り、断面の高さから膜厚を算出したところ、全てのフィルムの膜厚はおおよそ100 nmであることがわかった (Figure 2-5a)。次に、ATR-FTIRスペクトル測定によりハイブリッドフィルム上のペプチドグラフト鎖の二次構造特性を検討した。1724 cm⁻¹にHEMAユニットに由来するエステルのC=O伸縮振動が、1668 cm⁻¹および1540-1535 cm⁻¹にアミド Iおよびアミド IIの吸収が観測され、ペプチドグラフト鎖はランダムコイル構造を形成していることがわかった¹⁵⁾ (Figure 2-5b)。さらに、ハイブリッド

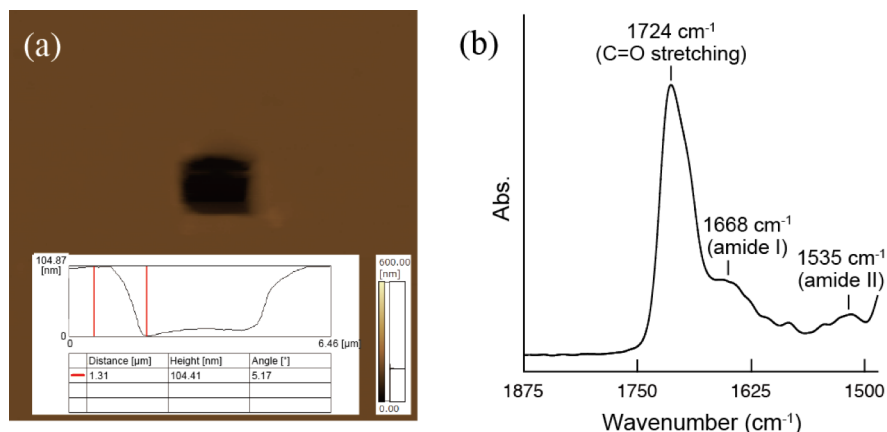


Figure 2-5. (a) AFM image of poly(HEMA-g-βA-ANP-K(RhB)-βA-RGDS-*Am*) ($G_r=2.5\%$). Inset shows its height profile. (b) ATR-FTIR spectrum of the hybrid film.

フィルム表面の対水接触角測定を行ったところ、 $43\text{--}62^\circ$ でありグラフト率が大きいほど大きい値を示した (Table 2-1). PHEMAフィルムの接触角は 40° であることから、HEMAユニットより疎水的なペプチド鎖がフィルム表面に存在していることを示唆している。

次に、各グラフト率のハイブリッドフィルムの細胞接着特性の評価を行った。マウス胎児由来繊維芽細胞 (NIH3T3細胞) を $2 \times 10^4 \text{ cells cm}^{-2}$ の細胞密度で播種し、無血清培地中 37°C で24時間培養した (Figure 2-6b~6e)。比較としてPHEMAフィルム上でも同様の実験を行った (Figure 2-6a)。RGDSペプチドをグラフト鎖に持たないPHEMAフィルム上では接着細胞が全く見られないが、poly(HEMA-g-βA-ANP-K(RhB)-βA-RGDS-*Am*)フィルム上で接着細胞が確認された。このことから、RGDSペプチドを導入することでPHEMAフィルムに細胞接着性を付与できることがわかる。また、接着細胞数はグラフト率が高くなると増加していき、 $G_r=2.5\%$ を超えると逆に減少した (Figure 2-6f)。これは、フィルム表面のRGDS密度が大きすぎる場合、細胞接着性が低下するためと考えられる¹⁶⁾。このことから、細胞接着性を付与するにあたり $G_r=2.5\%$ が最適であるといえる。なお、 $G_r=8.1\%$ のハイブリッドフィルムは培養中に破れてしまうため、細胞接着性を評価することができなかった。これは、RGDSペプチドの含有量が増えることでPHEMA間の水素結合が弱まり、フィルムの水中での安定性が低下したためであると考えられる。これらの結果は、細胞足場材料へ応用する場合、グラフト型ハイブリッドの構造を精密に設計する重要性を明確に示している。

2-3-5. RGDSペプチドが二次元パターン化されたハイブリッドフィルムの調製とその細胞接着特性の評価

本研究で用いたpoly(HEMA-g-βA-ANP-K(RhB)-βA-RGDS-*Am*)フィルムはUV光を照射することで、RGDSペプチドを切断することが可能である (Figure 2-7a)。そこで、最も良好な細胞接着性を示した $G_r=2.5\%$ のフィルムにフォトマスクを被せ、365 nmのUV光を30分間照射した。

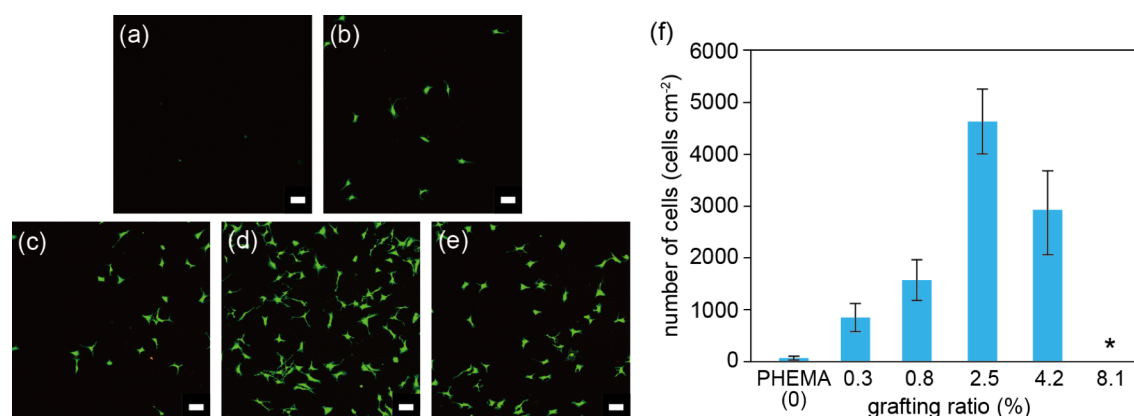


Figure 2-6. Confocal microscope images of NIH3T3 cells cultured for 24 h on PHEMA (a) and poly(HEMA-g- β A-ANP-K(RhB)- β A-RGDS-*Am* ($G_r=0.3\%$ (b), 0.8% (c), 2.5% (d), 4.2% (e)). Living cells were stained by Calcein-AM. Scale bar: 100 μ m. (f) Cell adhesion of NIH3T3 onto PHEMA homopolymer and poly(HEMA-g- β A-ANP-K(RhB)- β A-RGDS-*Am* with various grafting ratio at 24 h.

光切断されたペプチドを除去するために水 (pH 3) で洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてフィルム内でのペプチドグラフト鎖の二次元マイクロパターン化について検討した。(Figure 2-7b). RhBでラベル化されたRGDSペプチドが切断された暗い領域がはっきりと出現しており、減少量を輝度値から算出したところ約45%であった。FTIRスペクトルのアミド I の強度の減少量から算出したペプチド量も、同様に約半分に減少したことがわかった。以上のことから、光照射によるRGDSペプチドのマイクロパターン化が可能であることが示唆された。なお、RGDSペプチドの減少率が100%に達していないのは光切断反応が完全に進行していない可能性もあるが、おそらくは光切断されたフィルム内部のRGDSペプチドがPHEMAネットワークに絡まっており完全に除去できていないためであると考えられる。

光切断前および切断後のフィルム上にそれぞれNIH3T3細胞を 2×10^4 cells cm⁻²の細胞密度で播種し、無血清培地中37°Cで24時間培養したところ、切断後のフィルムの細胞接着数は切断前のフィルム上のものと比べて明らかに少なかった。次に、マイクロスケールの星、円、渦巻およびストライプパターンを持つフォトマスクを介してフィルムにUV光を照射した。Figure 2-7cは照射後のフィルムの共焦点顕微鏡画像であり、それぞれのマイクロパターンが明瞭に現れていることがわかる。RGDSパターン化フィルムの細胞接着性を検討するため、ストライプ模様パターン化したフィルム上にNIH3T3細胞を 2×10^4 cells cm⁻²の細胞密度で播種し、無血清培地中37°Cで24時間培養した (Figure 2-7d). RGDSペプチドが多く存在する明るい領域に多くの細胞が接着しており、暗い領域と比較して2倍以上多くの細胞が接着した (Figure 2-7e). 以上のことから、光切断性グラフト型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドを用いることで、RGDSペプチドおよび細胞のパターン化が実現できることを明らかにした。

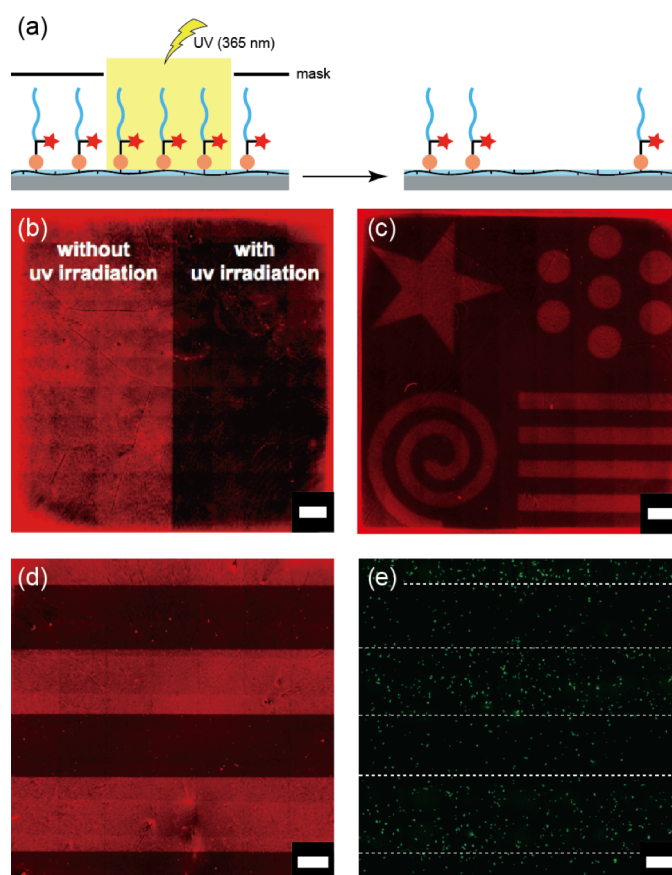


Figure 2-7. (a) Conceptual scheme for the patterning of RGDS peptide by UV irradiation. (b and c) Confocal microscope images of RGDS peptide-patterned PHEMA films prepared by photolithographic technique. (d and e) Spatial control of NIH3T3 cell adhesion by using stripe-patterned poly(HEMA-g-βA-ANP-K(RhB)-βA-RGDS-*Am* ($G_r=2.5\%$) thin film. Living cells in image (e) were stained by Calcein-AM. Scale bar: 500 μm .

2-4. 結言

本章では、光分解性のANPをリンカーとして有するRGDSペプチドマクロモノマーを新規に設計・合成した。ラジカル共重合によってRGDSペプチドをグラフト鎖としてビニルポリマー骨格へ導入でき、グラフト率は仕込み比を変えることで容易に調節することができた。またグラフト鎖は365 nmのUV光を30分間照射することで切断することが可能であった。NIH3T3細胞を用いてpoly(HEMA-g- β A-ANP-K(RhB))- β A-RGDS-Am ($G_r=0.3\%$, 0.8% , 2.5% , 4.2% および 8.1%) フィルムの細胞接着性を検討したところ、RGDSペプチドを持たないPHEMAと比較して多くの細胞が接着し、 $G_r=2.5\%$ のハイブリッドフィルムが最も良好な細胞接着性を示した。また、フォトマスクを用いて $G_r=2.5\%$ のハイブリッドフィルムにUV光を照射することで、約45%のRGDSペプチドを表面から除去することができ、様々な模様パターン化することに成功した。ストライプ模様パターン化したフィルム上でNIH3T3細胞を培養することで、細胞のパターン化にも成功した。本研究の手法を用いることで、二次元のみでなく三次元的なマテリアルに応用することも可能であると考えられ、バイオメディカル分野を始めとする様々な分野での利用が期待される。

参考文献

- 1) M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature*, **1991**, 30, 309.
- 2) M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, 81, 5985.
- 3) E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science*, **1987**, 238, 491.
- 4) M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *J. Biol. Chem.*, **1987**, 262, 17294.
- 5) P. Schaffner, M. M. Dard, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2003**, 60, 119.
- 6) U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials*, **2003**, 24, 4385.
- 7) S. P. Massia, J. A. Hubbell, *J. Cell Biol.*, **1991**, 114, 1089.
- 8) Y. Ohmuro-Matsuyama, Y. Tatsu, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2008**, 47, 7527.
- 9) S. Petersen, J. M. Alonso, A. Specht, P. Duodu, M. Goeldner, A. del Campo, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2008**, 47, 3192.
- 10) M. Wirkner, J. M. Alonso, V. Maus, M. Salierno, T. T. Lee, A. J. García, A. del Campo, *Adv. Mater.*, **2011**, 23, 3907.
- 11) S. V. Wegner, O. I. Sentürk, J. P. Spatz, *Sci. Rep.*, **2015**, 5, 18309.
- 12) B. B. Brown, D. S. Wagner, H. M. Geysen, *Mol. Diversity*, **1995**, 1, 4.
- 13) C. G. Bochet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2002**, 125.
- 14) K. Y. Lee, D. J. Mooney, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 1869.
- 15) T. Miyazawa, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, 83, 721.
- 16) G. L. Saux, A. Magenau, T. Böcking, K. Gaus, J. J. Gooding, *PLoS ONE*, **2011**, 6, (13 pages).

第三章:

クリック反応を用いた重合後修飾法によるグラフト型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合成と細胞自在操作

3-1. 緒言

第二章では、マクロモノマー法による共重合により種々のビニルモノマーに光切断可能な RGDS ペプチド鎖を導入したグラフト型ハイブリッドポリマーの合成に成功し、このポリマーフィルムを用いることで、固体基板表面に細胞接着性を付与できるとともに、光による細胞のパターン化が可能になることを明らかにした。本章では、グラフト型ハイブリッドの別の合成戦略としてクリック反応を利用した重合後修飾法について検討することにした。PHEMA フィルム表面への RGDS ペプチドグラフト鎖の導入を試み、光による精密な細胞接着性のコントロールの実現を目指した。クリックケミストリーは 2001 年に Sharpless によって提唱された付加反応であり、迅速に副反応を伴わずに進行するものを指す¹⁾。代表的なクリック反応はヒュスゲン 1,3-双極子付加環化反応である²⁾。この反応は銅を触媒としたアジド基とアルキンの付加反応であり、水が存在する場合でも進行する³⁻⁵⁾。実際に、クリック反応は新規分子の合成や固体表面の修飾に広く用いられている⁶⁻⁹⁾。

本章では、第二章で用いたペプチドの分子設計を踏襲した N 末端にアジド基を有する RGDS ペプチドおよびアルキンを有する PHEMA とアクリル酸プロパルギルのランダム共重合体 (poly(HEMA-*ran*-PgA)) を新規に設計した (Figure 3-1)。

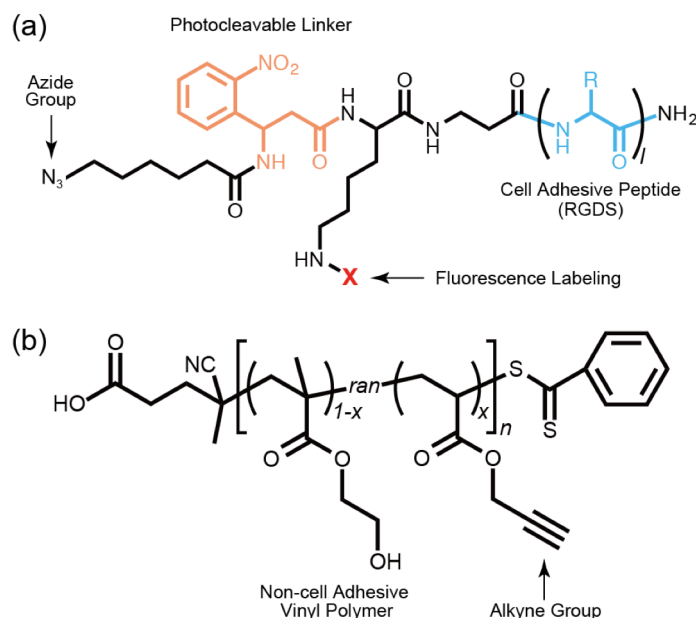


Figure 3-1. Novel photocleavable and clickable peptide (a) and clickable poly(HEMA-*ran*-PgA) (b) as a biofunctional coating reagent.

poly(HEMA-*ran*-PgA) の合成にはリビングラジカル重合の一種である可逆的付加-開裂連鎖移動 (RAFT) 重合法を採用した。ガラス基板上にpoly(HEMA-*ran*-PgA)フィルムを作製し、クリック反応によって表面をRGDSペプチドにより修飾した。得られたRGDS修飾フィルムの照射前後における細胞接着特性を詳細に検討した。また、細胞培養後に照射することによって細胞をシート状に回収することも試みた。ペプチド鎖の重合後修飾によるハイブリッド化はマクロモノマー法とは異なり、基材の最表面のみに導入できるため光パターン化に有利であり、また複雑な構造体の表面を簡便に改質できることも利点である。そこで、ディップコート法を用いて生分解性のポリ(L-乳酸) (PLLA) からなる三次元構造体への細胞接着性の付与も試みた。PLLAは3Dプリンターを利用して様々な三次元構造を容易に作製できる。本システムはこうした三次元高分子構造体の表面に生体機能を導入する新しい手法となる。

3-2. 実験方法

3-2-1. 試薬

ヘキサン, 酢酸エチル, 無水硫酸ナトリウム, アジ化ナトリウムおよびアンモニア水 (25 vol% NH₃) はナカライテスク株式会社から, 臭化銅(II) (CuBr₂), 臭化リチウム (LiBr), *N,N,N',N'',N'''*-ペンタメチルジエチレントリアミン (PMDETA) および塩化チオニルは和光純薬工業株式会社から, 4-シアノ-(4-チオベンゾイルチオ)ペンタン酸 (CTPA), アクリル酸プロパルギル (PgA) および 6-ブロモヘキサン酸はシグマアルドリッチジャパン株式会社から, アスコルビン酸は東京化成工業株式会社から, ポリ(L-乳酸) (PLLA) は Maker Bot 社から購入した. 重合には蒸留した DMF を用いた. PgA は塩基性活性アルミナカラムを用いて重合禁止剤を除去した後に用いた.

3-2-2. 合成

3-2-2-1. 6-アジドヘキサン酸 (N₃-HA) の合成

6-ブロモヘキサン酸 1.95g (10.0 mmol) およびアジ化ナトリウム 2.0 g (30.8 mmol) を DMF (50 mL) 中 80°C で 24 時間反応させた. 反応後, DMF を減圧除去し, 生じた固体にヘキサン/酢酸エチル (v/v = 3/7) 混合溶媒 (100 mL) を加え攪拌した. この溶液を 1 M-HCl_{aq} (100 mL) および飽和食塩水 (100 mL) でそれぞれ 3 回洗浄した. 有機層を回収し, 無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した. 最後に, 溶媒を減圧除去することで純粋な 6-アジドヘキサン酸 (N₃-HA) を無色透明な液体として得た. 構造決定は ¹H NMR および FTIR スペクトル測定により行った.

収量: 1.43 g (91.3%).

¹H NMR (CDCl₃, TMS): δ 1.42 ppm (N₃-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COOH, 2H), 1.65 ppm (N₃-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COOH, 4H), 2.41 ppm (N₃-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COOH, 2H), 3.3 ppm (N₃-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COOH, 2H).

Transmission-FTIR (on CaF₂ plate): 2944 cm⁻¹ (ν_s: C-H (methylene)), 2870 cm⁻¹ (ν_s: C-H (methylene)), 2678 cm⁻¹ (ν_s: COO-H), 2097 cm⁻¹ (ν_s: N=N=N), 1709 cm⁻¹ (ν_s: C(=O)O).

3-2-2-2. 光分解性リンカーを介してアジド基を末端に有するクリッカブル RGDS ペプチドの合成

まず, Fmoc-アミノ酸誘導体 (Fmoc-L-Ser, Fmoc-L-Asp(OtBu), Fmoc-Gly, Fmoc-L-Arg(Pbf), Fmoc-β-Ala, Fmoc-L-Lys(Mtt)), Fmoc-ANP および N₃-HA (3 当量) を縮合剤に HOBt (3 当量) および DIPIC (3 当量) を用いて DMF 中で順次縮合させることにより, 目的の配列を有するペプチドを Fmoc-NH-SAL MBHA 樹脂上に合成した. 続いて, TFA/ジクロロメタン/TIS (v/v/v = 1/98/1) 混合溶媒で 30 分間処理することで Lys 側鎖上の Mtt 基を脱保護した. 露呈した樹

脂上の Lys 側鎖のアミノ基と RhB (3 当量), DMT-MM (3 当量) および NMM (3 当量) を DMF/メタノール (v/v=4/1) 混合溶媒中で 24 時間反応させ, 蛍光ラベル化を施した. 修飾後, 樹脂を TFA/ジクロロメタン/TIS (v/v/v=8.5/1/0.5) 混合溶媒で処理した. ジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法により, 目的のクリッカブルペプチド (N_3 -HA-ANP-K(RhB)- β A-RGDS-Am) を紅桔梗色固体として得た. 構造決定は MALDI-TOF MS, ^1H NMR および FTIR スペクトル測定により行った.

MALDI-TOF MS: obsd. $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$ (calcd. $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$); 1523.94, 1540.00 (1502.60, 1524.58, 1540.69).

^1H NMR (DMSO- d_6 , TMS): δ 0.75-2.45 ppm (RhB, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, 6H; RhB, $=\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, 6H; methylene of N_3 -HA, 8H; Lys, γ - CH_2 , 2H; Lys, δ - CH_2 , 2H; Arg, γ - CH_2 , 2H; Lys, β - CH_2 , 2H; Arg, β - CH_2 , 2H; β -Ala, α - CH_2 , 4H), 2.60-4.70 ppm (methylene of N_3 -HA, 2H; ANP, $-\text{CH}-\text{CH}_2-$, 2H; Asp, β - CH_2 , 2H; Arg, δ - CH_2 , 2H; Lys, ϵ - CH_2 , 2H; β -Ala, β - CH_2 , 4H; Gly, CH_2 , 2H; Ser, β - CH_2 , 2H; amino acids, α -CH, 5H), 3.30 ppm (RhB, $=\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, 4H; RhB, $=\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, 4H), 6.25-6.45 ppm (RhB, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)=\text{CH}-$, 3H; RhB, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)-\text{CH}=\text{CH}-$, 3H), 7.00-8.45 ppm (ANP, $-\text{C}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{C}(\text{NO}_2)-$, 4H; RhB, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}-$ 4H; $-\text{OCNH}_2$, 2H; $-\text{CONH}-$, 9H).

Transmission-FTIR (KBr pellet): 3330 cm^{-1} (ν_s : O-H), 3196 cm^{-1} (ν_s : CON-H), 3076 cm^{-1} (ν_s : CON-H), 2945 cm^{-1} (ν_s : C-H (methylene)), 2873 cm^{-1} (ν_s : C-H (methylene)), 2104 cm^{-1} (ν_s : N=N=N), 1662 cm^{-1} (ν_s : NHC=O), 1533 cm^{-1} (δ : CON-H).

3-2-2-3. 6-ブロモヘキサンアミドの合成

6-ブロモヘキサン酸 2.93 g (15 mmol) を塩化チオニル 5.42 mL (75 mmol) に溶解させ, 3 時間加熱還流を行った. 反応溶液から過剰の塩化チオニルを減圧除去することで淡黄色液体を得た. この液体を 25%- NH_3aq (100 mL) に氷浴下でゆっくりと滴下し, 1 時間攪拌した. 生じた沈殿をろ過により回収し, 残渣を超純水 (100 mL) で洗浄した. この残渣を凍結乾燥することで純粋な 6-ブロモヘキサンアミドを白色固体として得た. 構造決定は ^1H NMR および FTIR スペクトル測定により行った.

収量: 1.54 g (52.6%).

^1H NMR (CDCl_3 , TMS): δ 1.51 ppm ($\text{Br}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, 2H), 1.70 ppm ($\text{Br}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, 2H), 1.91 ppm ($\text{Br}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, 2H), 2.22 ppm ($\text{Br}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, 2H), 3.41 ppm ($\text{Br}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, 2H), 5.5-6.0 ppm ($\text{Br}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, 2H).

Transmission-FTIR (KBr pellet): 3366 cm^{-1} (ν_s : N-H (aggregated CONH_2)), 3193 cm^{-1} (ν_s : N-H (aggregated CONH_2)), 2946-2081 cm^{-1} (ν_s : C-H (methylene)), 1659 cm^{-1} (ν_s : NHC=O), 1631 cm^{-1} (δ : CON-H).

3-2-2-4. 6-アジドヘキサンアミドの合成

6-ブロモヘキサンアミド 1.54 g (7.94 mmol) およびアジ化ナトリウム 2.58 g (39.7 mmol) を DMF (10 mL) 中 80°C で 24 時間反応させた。反応溶液をろ過し、ろ液を減圧濃縮することで粗精製物を得た。この粗精製物をアセトン/メタノール (v/v=5/1) 混合溶液を展開溶媒に用いたシリカゲルカラムにより精製し、溶媒を減圧除去することで純粋な 6-アジドヘキサンアミドを白色固体として得た。構造決定は ^1H NMR および FTIR スペクトル測定により行った。

収量: 0.859 g (69.3%).

$R_f = 0.57$ (アセトン/メタノール (v/v = 5/1)).

^1H NMR (D_2O , DSS): δ 1.42 ppm ($\text{N}_3\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, 2H), 1.65 ppm ($\text{N}_3\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, 4H), 2.22 ppm ($\text{N}_3\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, 2H), 3.3 ppm ($\text{N}_3\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, 2H).

Transmission-FTIR (KBr pellet): 3361 cm^{-1} (ν_s : N-H (aggregated CONH_2)), 3193 cm^{-1} (ν_s : N-H (aggregated CONH_2)), 2945-2802 cm^{-1} (ν_s : C-H (methylene)), 2104 cm^{-1} (ν_s : $\text{N}=\text{N}=\text{N}$), 1659 cm^{-1} (ν_s : $\text{NHC}=\text{O}$), 1632 cm^{-1} (δ : CON-H).

3-2-2-5. 可逆的付加-開裂連鎖移動 (RAFT) 重合法を用いた HEMA と PgA の共重合

HEMA 2.06 mL (17 mmol), PgA 0.335 mL (3 mmol), CTPA 5.6 mg (0.02 mmol) および AIBN 1.6 mg (0.01 mmol) を全量 5 mL となるように DMF に溶解させ、モノマー濃度を 4 M とした。この溶液を試験管に移し、液体窒素を用いて凍結脱気した後に封管し、60°C の油浴に静置した。3-24 時間重合させた後、液体窒素で急冷することで反応を停止させた。その後、反応溶液をジエチルエーテルへ滴下することで生成したポリマーを沈殿させた。DMF を良溶媒、ジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法により精製し、目的のランダムコポリマー (poly(HEMA-*ran*-PgA)) を桜色固体として得た。構造決定は ^1H NMR および FTIR スペクトル測定、 M_n および D の算出は SEC 測定 (THF, 40°C) により行った。

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, TMS, Polymn. Time: 13 h, $x = F_{\text{PgA}}$): δ 0.50-2.45 ppm (HEMA, methylene (main chain), $2(1-x)n\text{H}$; PHEMA, methyl (main chain), $3(1-x)n\text{H}$; PPgA, methylene (main chain), $2xn\text{H}$; PPgA, methine (main chain), $xn\text{H}$; CTPA, methyl, 3H; CTPA, methylene, 4H), 3.37-3.75 ppm (PPgA, $-\text{COOCH}_2\text{CCH}$, $xn\text{H}$; PHEMA, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $2(1-x)n\text{H}$), 3.80-4.20 ppm (PHEMA, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $2(1-x)n\text{H}$), 4.45-4.75 ppm (PPgA, $-\text{COOCH}_2\text{CCH}$, $2xn\text{H}$), 4.75-4.95 ppm (PHEMA, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $(1-x)n\text{H}$), 7.45-8.10 ppm (CTPA, phenyl, 4H).

ATR-FTIR (Polymn. Time: 13 h): 3423 cm^{-1} (ν_s : O-H), 3262 cm^{-1} (ν_s : O-H), 2987 cm^{-1} (ν_s : C-H (methyl)), 2951 cm^{-1} (ν_s : C-H (methylene)), 2888 cm^{-1} (ν_s : C-H (methylene)), 2127 cm^{-1} (ν_s : $\text{N}=\text{N}=\text{N}$), 1725 cm^{-1} (ν_s : $\text{C}(\text{=O})\text{O}$).

Polymn. Time: 1 h: $F_{\text{PgA}} = 6.89$, $M_n = 9000$ (NMR), $n = 70$ (NMR), $D = 1.21$. 3 h: $F_{\text{PgA}} = 7.61$, M_n ,

=38300 (NMR), $n = 298$ (NMR), $D=1.25$. 6 h: $F_{PgA}=8.46$, $M_n=65600$ (NMR), $n = 510$ (NMR), $D=1.28$. 13 h: $F_{PgA}=9.87$, $M_n=101500$ (NMR), $n = 792$ (NMR), $D=1.31$. 24 h: $F_{PgA}=10.42$, $M_n=111000$ (NMR), $n = 859$ (NMR), $D=1.37$.

3-2-2-6. ガラス基板上へのポリマー薄膜の調製

Poly(HEMA-*ran*-PgA) 薄膜の調製はスピンコートにより行った. ポリマーの TFE 溶液 (20 mg mL^{-1}) を $30 \text{ }\mu\text{L}$ 超親水化ガラス基板 ($1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$) に乗せ, 3000 rpm で 30 秒間スピンコートした. その後, 室温で一晩乾燥させた. なお, ポリマー溶液は使用前にコスモナイスフィルター (ナカライテスク株式会社製, 孔径: $0.45 \text{ }\mu\text{m}$) を用いて溶液中の不純物を除去してから用いた. 調製したフィルムの厚さは AFM のカンチレバーでスクラッチし, 断面の深さから算出した.

3-2-2-7. PLLA からなる三次元構造物上への poly(HEMA-*ran*-PgA) 薄膜の調製

PLLA からなる三次元構造物は熱溶解積層方式の 3D-プリンター (Replicator Desktop 3D Printer, Maker Bod 社製) を用いて作製した. この PLLA 構造物を poly(HEMA-*ran*-PgA) ($M_n=101500$, $D=1.31$) メタノール溶液 (20 mg mL^{-1}) に 3 分間浸漬させ, 1.0 mm s^{-1} の速度で引き上げた. その後, 室温で一晩乾燥させた. なお, ポリマー溶液は使用前にコスモナイスフィルター (ナカライテスク株式会社製, 孔径: $0.45 \text{ }\mu\text{m}$) を用いて溶液中の不純物を除去してから用いた.

3-2-2-8. クリック反応による poly(HEMA-*ran*-PgA) 薄膜の RGDS ペプチド修飾

まず, $\text{N}_3\text{-HA-ANP-K(RhB)-}\beta\text{A-RGDS-Am}$ $134 \text{ }\mu\text{g}$ (96 nmol), CuBr_2 $39 \text{ }\mu\text{g}$ (175 nmol), PMDETA $73 \text{ }\mu\text{g}$ (349 nmol) および AsAc 15 mg ($85 \text{ }\mu\text{mol}$) を 15 mL のメタノール/水 ($v/v=5/7$) 混合溶液に溶解させ, 液体窒素を用いた凍結脱気により溶存酸素を除去した. 続いて, この溶液と 15 枚の poly(HEMA-*ran*-PgA) コート基板をセパラブルフラスコに入れ, 室温で窒素ガスを 30 分間バブリングした. セパラブルフラスコのコックを閉じ, 40°C で 24 時間反応させた. 反応後, 基板をメタノール/水 ($v/v=5/7$) 混合溶液, $1\text{M-HCl}_{\text{aq}}$, $1\text{M-EDTA}_{\text{aq}}$ ($\text{pH } 8.0$) および蒸留水の順に 10 分ずつ浸漬させることで洗浄し, 室温で乾燥させた. 基板の評価は ATR-FTIR スペクトル測定から行った.

ATR-FTIR: 3423 cm^{-1} (ν_s : O-H, ν_s : CON-H), 3262 cm^{-1} (ν_s : O-H), 2987 cm^{-1} (ν_s : C-H (methyl)), 2951 cm^{-1} (ν_s : C-H (methylene)), 2888 cm^{-1} (ν_s : C-H (methylene)), 1725 cm^{-1} (ν_s : C(=O)O), 1662 cm^{-1} (ν_s : NHC=O), 1533 cm^{-1} (δ : CON-H).

3-2-2-9. クリック反応による poly(HEMA-*ran*-PgA) 薄膜の 6-アジドヘキサンアミド修飾

まず, 6-アジドヘキサンアミド $15 \text{ }\mu\text{g}$ (96 nmol), CuBr_2 $39 \text{ }\mu\text{g}$ (175 nmol), PMDETA $73 \text{ }\mu\text{g}$

(349 nmol) および AsAc 15 mg (85 μ mol) を 15 mL のメタノール/水 (v/v=5/7) 混合溶液に溶解させ、液体窒素を用いた凍結脱気により溶存酸素を除去した。続いて、この溶液と 15 枚の poly(HEMA-*ran*-PgA) コート基板をセパラブルフラスコに入れ、室温で窒素ガスを 30 分間バブリングした。セパラブルフラスコのコックを閉じ、40°C で 24 時間反応させた。反応後、基板をメタノール/水 (v/v=5/7) 混合溶液、1M-HCl_{aq}、1M-EDTA_{aq} (pH 8.0) および蒸留水の順に 10 分ずつ浸漬させることで洗浄し、室温で乾燥させた。基板の評価は ATR-FTIR スペクトル測定から行った。

ATR-FTIR: 3423 cm^{-1} (ν_s : O-H, ν_s : CON-H), 3262 cm^{-1} (ν_s : O-H), 2987 cm^{-1} (ν_s : C-H (methyl)), 2951 cm^{-1} (ν_s : C-H (methylene)), 2888 cm^{-1} (ν_s : C-H (methylene)), 1725 cm^{-1} (ν_s : C(=O)O), 1678 cm^{-1} (ν_s : CON-H), 1658 cm^{-1} (δ : CON-H).

3-2-2-10. 細胞実験

マウス由来繊維芽細胞 (NIH3T3) およびマウス由来骨芽細胞 (MC3T3-E1) を 80% コンフルエントになるまで、10% のコウシ血清 (FBS) (04-001-1A, コスモバイオ株式会社製) および抗生物質 (A5995-100ML, シグマアルドリッチジャパン株式会社製) を含む DMEM (L7A0439, ナカライテスク株式会社製) および α -MEM (12571-963, ライフテクノロジーズジャパン株式会社製) 中にそれぞれ播種し、37°C, 5% CO₂ のインキュベーターで培養した。これらの細胞を実験に応じて 6.0×10^3 または $3.0 \times 10^4 \text{ cells cm}^{-2}$ の密度でポリマー薄膜上に播種し、無血清または血清培地中で、37°C, 5% CO₂ のインキュベーターで 24 または 48 時間培養した。生細胞はカルセイン-AM で染色した。

3-3. 結果および考察

3-3-1. RAFT 重合法による poly(HEMA-*ran*-PgA) の合成

NMP¹⁰⁾, ATRP^{11, 12)} およびRAFT重合¹³⁾ などに代表されるLRP技術の発展により, フリーラジカル重合では不可能であった高機能性ポリマーの合成が可能となった. また, これらの重合法はジブロック型¹⁴⁻¹⁸⁾, トリブロック型¹⁹⁻²²⁾, マルチブロック型²³⁾ および星型²⁴⁻²⁶⁾ の様な特殊構造ポリマーだけでなく, アルキンのようなラジカルとの反応性が高い官能基を含むランダムコポリマーをリビング的に重合することもできる²⁷⁾.

クリック反応による重合後修飾を行うためには, ポリマーにクリック可能なアルキンなどの官能基を導入する必要がある. 先にも述べたように, 通常のラジカル重合ではラジカル活性なアルキンを含むモノマーを重合することは困難であり, LRP法を用いて重合する必要がある. そこで, 本研究ではRAFT重合法を採用し, 連鎖移動剤に4-シアノ-4-(チオベンゾイルチオ)ペンタン酸 (CTPA) を用いてまずHEMAとPgAのランダム共重合を試みた. HEMAとPgAからなるランダム共重合体はポリマー鎖内にアルキンを有するため, 重合後修飾が可能となる. 仕込み比は[HEMA]:[PgA]:[CTPA]:[AIBN]=850:150:1:0.5, [monomer]=4 Mとし, DMF中60°Cで1から24時間重合を行った. 得られたポリマー (重合時間: 1, 3, 6, 13および24時間) の M_n は¹H NMRスペクトル, D はSEC測定により算出した. 各重合時間で得られたポリマーのSEC測定を行ったところ, 全てのピークは単峰であり, かつ重合時間の増加に伴い高分子量側にシフトしていることがわかる (Figure 3-2a). 全てのポリマーの M_n は, 7.45-8.05 ppm のCTPAのベンゼン環に由来するピーク (5H) で規格化したHEMAおよびPgAユニットに由来するピークの積分値から算出した. また, ポリマーの組成 (PgA含有量 (F_{PgA})) は3.80-4.20 ppm (HEMA, 2H) および4.45-4.75 ppm (PgA, 2H) の積分値の比から算出した. Figure 3-2bに一例として13時間重合した際に得られたランダムコポリマーの¹H NMRスペクトルを示した. モノマー転化率に対して M_n をプロットしたところ分子量は線形的に増加し, 比較的分散度が小さい ($D < 1.4$) ことから, 重合はリビング的に進行したといえる (Figure 3-2c). 一方で, F_{PgA} はモノマー転化率に対してほぼ一定の値であった. 以上のことから, ポリマー鎖長が比較的制御され, 仕込み比通りの組成をもつpoly(HEMA-*ran*-PgA)の合成に成功したといえる.

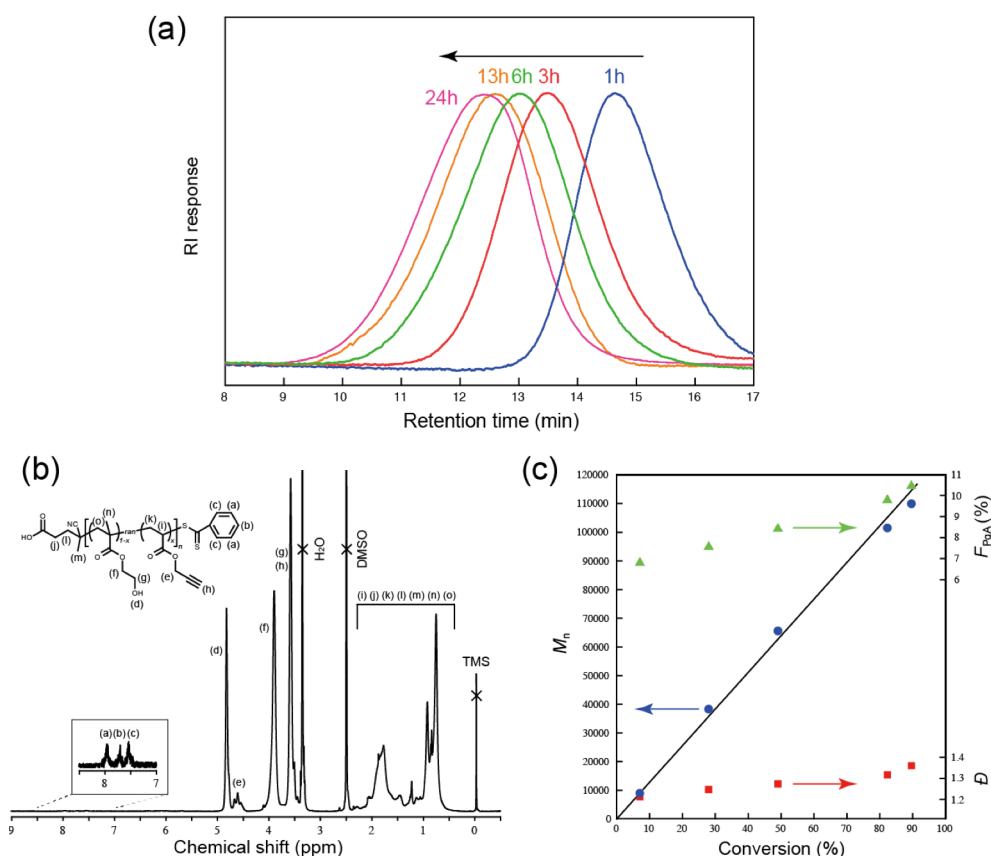
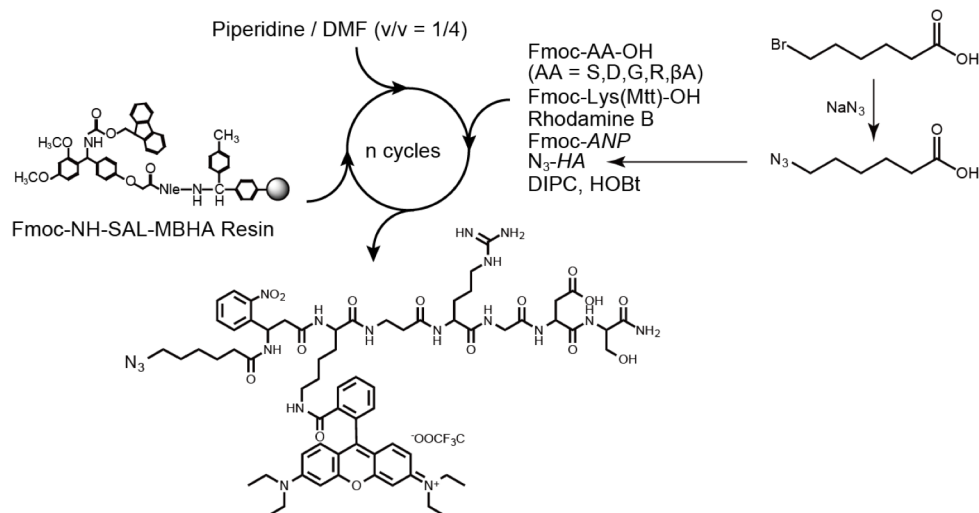


Figure 3-2. (a) SEC traces (DMF containing LiBr, 40°C) of poly(HEMA-*ran*-PgA) obtained at different polymerization time. (b) ¹H NMR spectrum of poly(HEMA-*ran*-PgA) obtained at 13 h of polymerization time. (c) Plots of M_n (blue circles), D (red squares) and F_{PgA} (green triangles) as a function of conversion. The solid line represents the theoretical M_n calculated from conversion.

3-3-2. 光分解性リンカーを介してアジド基を末端に有する RGDS ペプチドの合成

目的の新規クリッカブルペプチドはScheme 3-1に従って、SPPS法により合成した。まず、目的の配列を有するペプチドをFmoc-アミノ酸誘導体を用いてFmoc-NH-SAL MBHA樹脂上に合成した。続いて、Lys残基上のMtt基を選択的に脱保護し、露呈したアミノ基をRhBにより蛍光ラベル化した。その後、N末端と6-アジドヘキサノ酸と反応させることでアジド基を導入した。最後に、ペプチドを樹脂から切り出し、構造確認をMALDI-TOF MS, FTIRおよび¹H NMRスペクトル測定により行った。それぞれ理論値に見合う分子量、伸縮・変角振動ピークおよび化学シフト値が観測されたことから、純度よく目的のクリッカブルペプチドを得られたことがわかった。次に、このペプチドのANP部位の光分解性を検討した。ペプチドを100 μMの濃度になるように水へ溶解させ、8 Wのハンディーランプを用いて365 nmの光を室温で照射した。第二章において、類似した構造を持つペプチドマクロモノマーが30分間の光照射により速やかに分解することが明らかとなっている。そこで、本実験の光照射時間も30分間とし、照射前後における分子量の変化をMALDI-TOF MSスペクトル測定により確認した。光照射前



Scheme 3-1. Synthetic route of clickable and photocleavable RGDS peptide.

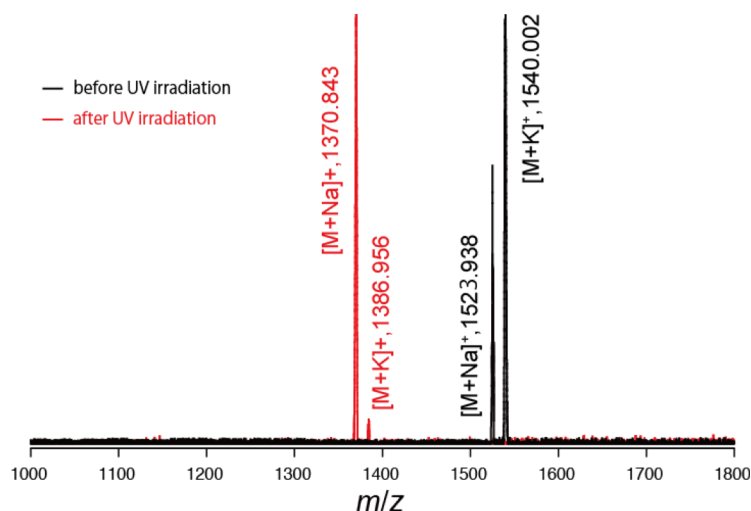


Figure 3-3. MALDI-TOF MS spectra of photocleavable and clickable peptide obtained before (black) and after (red) UV irradiation for 30 min in water. Matrix: DHBA.

に見られた1523.9 ($[M+Na]^+$) および1540.0 ($[M+K]^+$) が完全に消失し、新たに1370.8 ($[M+Na]^+$) および1386.9 ($[M+K]^+$) が出現した (Figure 3-3). このことから、クリックブルペプチドにおいてもANP部位の光分解は30分間のUV照射で速やかに進行することがわかった.

3-3-3. Poly(HEMA-*ran*-PgA) フィルムへのペプチド修飾とUV照射による光切断

クリック反応によるRGDSペプチドのpoly(HEMA-*ran*-PgA) フィルム上への修飾と光切断について検討した. ここでは, $M_n=101500$, $D=1.31$, $F_{PgA}=9.87$ のpoly(HEMA-*ran*-PgA) を用いた. まず, スピンコート法によりこのポリマーの薄膜をガラス基板上に作製した. 得られた

フィルムをAFMのカンチレバーを用いて削り、断面の高さから膜厚を算出したところ、およそ150 nmであることがわかった。次に、クリック反応によるこのフィルムへのRGDSペプチド修飾とフォトリソグラフィによるペプチドエピトープの除去を試みた (Figure 3-4a)。初めに, poly(HEMA-*ran*-PgA) フィルムとクリックブルRGDSペプチドを銅触媒存在下40°Cで24時間反応させた。続いて, 365 nmのUV光をフィルムの半面にフォトマスクを介して30分間照射し, 水 (pH 3.0) でよく洗浄した。Figure 3-4bはUV照射後におけるRGDS修飾 poly(HEMA-*ran*-PgA) フィルムの共焦点顕微鏡画像である。UVが照射された領域は暗くなり, RGDSペプチドをフィルム表面から切断できたことがわかる。輝度値からRGDSペプチドの切断率を見積もったところ, ほぼ100%切断できていることがわかった。前章のマクロモノマー法により調製したグラフト型ハイブリッドフィルムでは光照射後においても約50%のペプチド鎖が残留し, PHEMAフィルム内部にトラップされた。重合後修飾により表面にのみグラフト化できる本手法はペプチドエピトープをより効率的に光パターン化できることを示してい

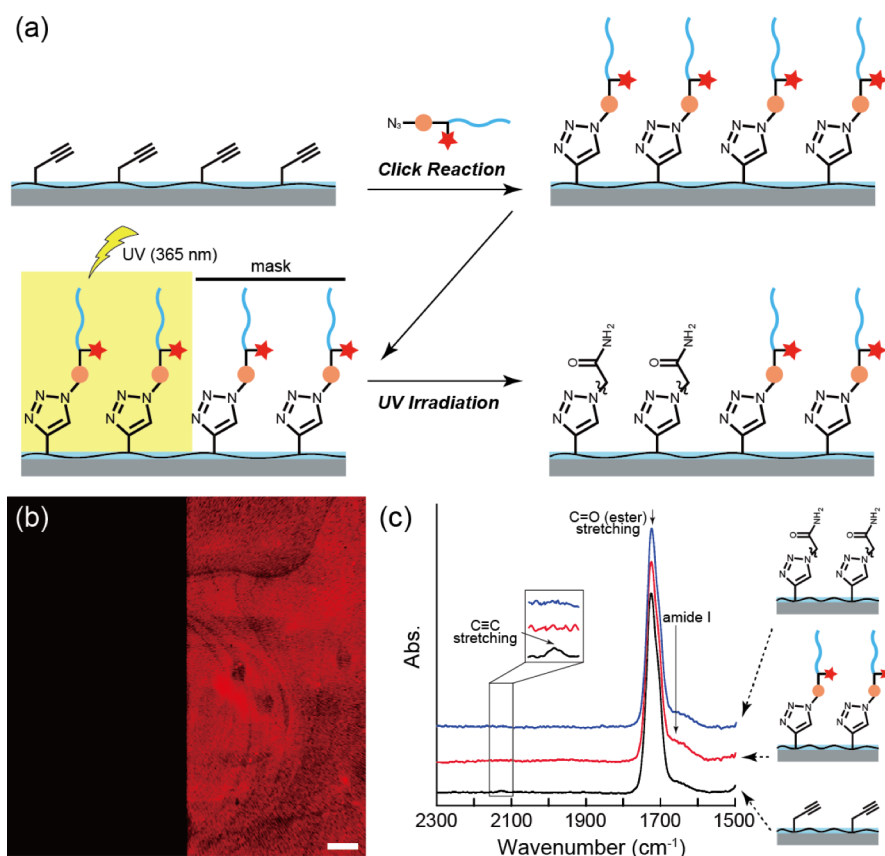


Figure 3-4. (a) Conceptual scheme for the modification of RGDS peptide on poly(HEMA-*ran*-PgA) film *via* click reaction and 2D-patterning *via* UV irradiation. (b) Confocal microscope image of RGDS-modified film with (left) and without (right) UV irradiation. Scale bar is 500 μm . (c) ATR-FTIR spectra of bare poly(HEMA-*ran*-PgA) film (black line), RGDS-modified film (red line), and UV-irradiated RGDS-modified film (blue line).

る。各ステップにおけるフィルム表面の構造はATR-FTIRスペクトル測定により評価した (Figure 3-4c)。RGDSペプチド修飾前では、 2127 cm^{-1} にアルキンの $\text{C}\equiv\text{C}$ 伸縮振動に、 1725 cm^{-1} にエステル $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動に由来するピークが見られた (Figure 3-4, 黒線)。一方、RGDS修飾後には $\text{C}\equiv\text{C}$ 伸縮振動のピークが減少し、 1656 cm^{-1} 付近にアミド I に由来するピークが出現した (Figure 3-4c, 赤線)。このことからクリック反応によりRGDSペプチドが表面に導入にされたこと、またペプチドはランダムコイル構造を形成していることがわかった。UV照射を行った領域では、アミド I に由来するピークが減少した (Figure 3-4c, 青線)。ペプチドエポトープの減少量を算出するため、poly(HEMA-*ran*-PgA) フィルムと6-アジドヘキササンアミドを銅触媒存在下 40°C で24時間反応させ、ペプチドの光切断後に生成する表面と同じ構造を有するモデル表面を作製した。このモデル表面およびUV照射後のRGDS修飾表面のFTIRスペクトル測定を行い、得られたスペクトルのピーク強度比からペプチド切断率を算出したところほぼ100%であり、輝度値から算出した結果とよく一致した。以上のことから、RGDSペプチド修飾表面の調製および光によるペプチドグラフト鎖の切断に成功したといえる。

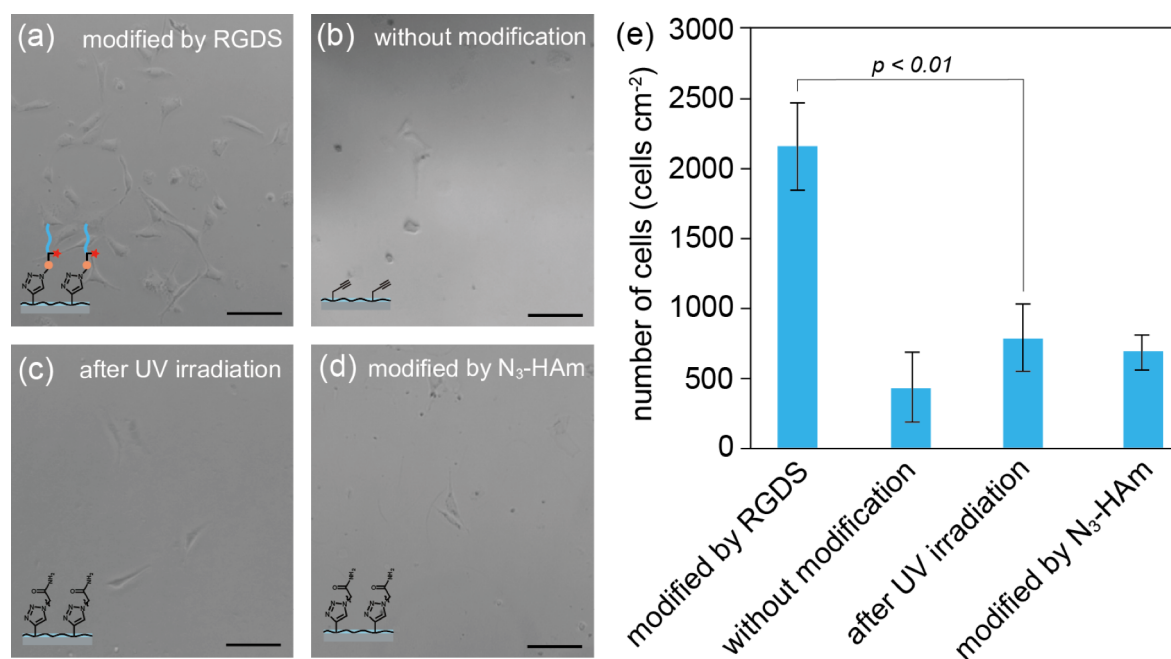


Figure 3-5. Phase contrast images of MC3T3-E1 cells on various polymer films cultured in serum free medium for 24 h. Scale bar is $100\text{ }\mu\text{m}$. (a) Poly(HEMA-*ran*-PgA) thin film modified by RGDS peptide without UV irradiation. (b) Poly(HEMA-*ran*-PgA) film without modification. (c) Poly(HEMA-*ran*-PgA) thin film modified by RGDS peptide after UV irradiation. (d) Poly(HEMA-*ran*-PgA) thin film modified by N₃-HAM which has same surface structure as RGDS-modified film after UV irradiation. Insets show the chematic models of the surface structures. (e) Summary of cell adhesion experiments.

次に、RGDS修飾poly(HEMA-*ran*-PgA)フィルムの細胞接着特性の検討を行った。マウス由来骨芽細胞 (MC3T3-E1細胞) を 6.0×10^3 cells cm^{-2} の細胞密度で播種し、無血清培地中37°Cで24時間培養した (Figure 3-5a)。比較としてRGDS未修飾poly(HEMA-*ran*-PgA)フィルム上でも同様の実験を行った (Figure 3-5b)。RGDS未修飾フィルムの表面には少数の接着細胞しか見られなかった。これはPHEMAによる親水的な表面に起因していると考えられる。一方で、RGDS修飾フィルムの表面には多数の接着細胞が観察され、接着細胞数は未修飾フィルムに比べて約4倍であった (Figure 3-5e)。このことから、クリック反応により導入したRGDSエピトープが細胞接着部位としてpoly(HEMA-*ran*-PgA)フィルム上で機能していることは明らかである。なお、RGDSペプチドを修飾していない場合でもわずかなではあるが接着細胞が観察された。これは、PHEMAホモポリマーフィルムの対水接触角は40°であったのに対し、poly(HEMA-*ran*-PgA)フィルムの接触角は54°であったことから、PgAユニットにより疎水性が上昇し、RGDSペプチド未修飾の場合でもフィルム上に細胞が接着したと考えられる。RGDS修飾poly(HEMA-*ran*-PgA)フィルムは、UV光を照射することでRGDSエピトープを容易に切断でき、細胞接着性を調節できると考えられる。そこで、UV光を照射したRGDS修飾poly(HEMA-*ran*-PgA)フィルム表面上における細胞接着特性の検討をおこなった。MC3T3-E1細胞を先ほどと同様の細胞密度で播種し、無血清培地中37°Cで24時間培養したのちに観察した (Figure 3-5c)。UV未照射のRGDS修飾poly(HEMA-*ran*-PgA)フィルムと比較して、明らかに接着細胞数が減少していることがわかる。UV照射された表面の細胞接着特性をより詳細に検討するため、UV照射後の表面と同じ構造を有するモデル表面上でも同様の実験を行った (Figure 3-5d)。これらの表面に接着した細胞の数は概ね等しかった (Figure 3-5e)。この結果は、UV照射によりRGDS修飾poly(HEMA-*ran*-PgA)フィルム表面からRGDSエピトープが除去されており、フィルム表面上の細胞接着特性が制御されていることを示している。また、UV照射前後のRGDS修飾poly(HEMA-*ran*-PgA)フィルム表面における接着細胞数は3倍程度の差があり、t検定より $p < 0.01$ であった。以上、クリック反応による重合後修飾法により合成したグラフト型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドを用いることで、光照射により細胞接着性を任意に制御できる表面の構築に成功した。

3-3-4. 細胞シートの作製と細胞のパターン化

前項より、光照射によりフィルム表面からRGDSエピトープを切断でき、細胞接着性をコントロールできることが明らかとなった。接着部位が遊離するということは、細胞をRGDS修飾poly(HEMA-*ran*-PgA)フィルム上で培養したのちに光を照射することで、接着した細胞を剥離させることも可能となろう。そこで、まず細胞シートの作製を試みた (Figure 3-6a)。NIH3T3細胞を 3.0×10^4 cells cm^{-2} の細胞密度で播種し、血清培地中37°Cで48時間培養した。80%コンフルエントになったことを確認し、PBS(-)バッファー中で全面に365 nmのUV光を30分間照射した。UV照射による細胞の挙動を共焦点顕微鏡で観察したところ、UV照射前では基板

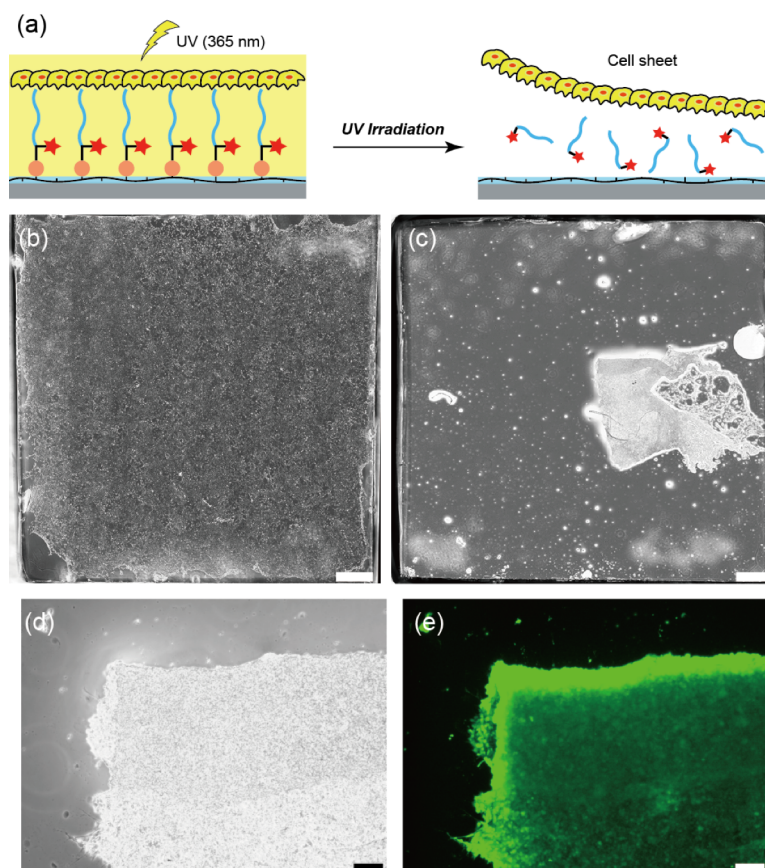


Figure 3-6. (a) Conceptual scheme for cell-sheet engineering using photodegradable graft-type peptide-PHEMA hybrid film. Phase contrast images of confocal microscope of NIH3T3 cells on RGDS-modified film cultured in serum medium for 48 h before (b) and after (c) UV irradiation. Phase contrast (d) and fluorescence (e) images of confocal microscope of NIH3T3 cell-sheet. Living cells were stained by Calcein-AM. Scale bar is 1000 (b, c) and 100 μm (d, e).

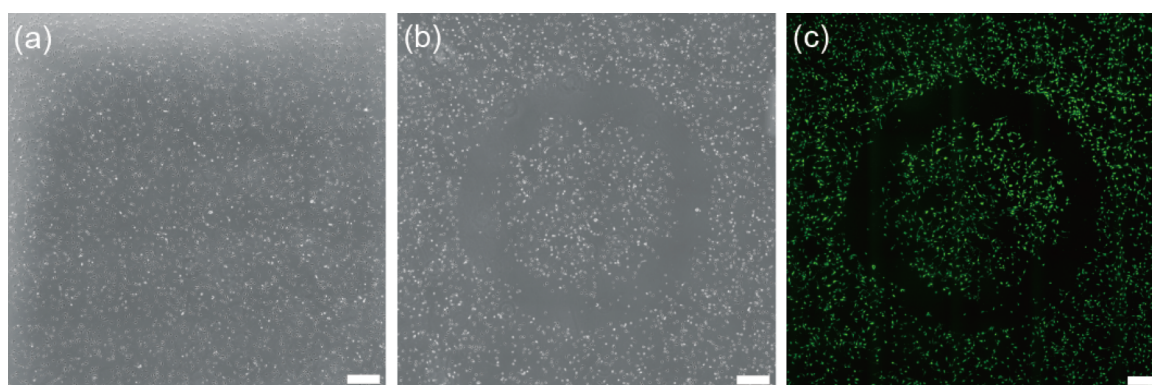


Figure 3-7. Phase contrast images of confocal microscope of NIH3T3 cells on RGDS-modified film cultured in serum free medium for 24 h before (a) and after (b) UV irradiation *via* circular ring-patterned photomask. (c) Fluorescence image of b. Living cells were stained by Calcein-AM. Scale bar is 500 μm .

全面に細胞が接着している様子が見られたが、照射後には細胞が収縮しシート状に剥離していることがわかった (Figure 3-6b, c). 得られた細胞シートをカルセイン-AMで染色したところ緑色蛍光を示したことから、365 nmのUV光を30分間照射した場合でも細胞は生存していることがわかった (Figure 3-6d, e). 次に、細胞のパターン化を試みた. NIH3T3細胞 を 3.0×10^4 cells cm^{-2} の細胞密度で播種し、無血清培地中37°Cで24時間培養した. その後、PBS(-)バッファー中で一例として内径3 mm, 外径4 mm, 幅 500 μm のリング状に加工したフォトマスクを使用してUV光を30分間照射した. Figure 3-7a, bはUV照射前後における共焦点顕微鏡の位相差像である. UV光を照射した領域のみリング状に細胞が剥離されており、またカルセイン-AMで染色したところ剥離せずフィルム表面に接着している他の細胞は緑色蛍光を示したことから周囲の細胞は生存していることがわかった (Figure 3-7c).

以上の、本ポリマーフィルム上で培養した細胞は光によりシート状に回収することができ、また細胞のマイクロパターンを任意に作製することもできる. そのため、細胞シート工学基板やセルチップなどへの応用が可能である.

3-3-5. 三次元構造物上へのpoly(HEMA-*ran*-PgA)フィルムの調製と細胞接着性の付与

緒言でも述べたように、本グラフト型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドシステムの最大の魅力は生体親和性と成膜性の高い細胞非接着性PHEMAからなる高分子薄膜を用いるため、複雑な三次元構造体の表面もディップコートなどの手法により簡便に改質できる点にある. 特にPHEMAは水素結合性が高く、種々の固体表面に安定にコーティングできる. そこで、生分解性ポリマーとして様々な医用高分子材料として活用されているPLLAからなる三次元構造体への細胞接着性の付与を試みた. まず、PLLAからなる三次元構造物を熱溶解積層方式の3Dプリンターを用いて作製した (Figure 3-8a). このPLLA構造体にpoly(HEMA-*ran*-PgA)をディップコート法により被膜した. 次いで、クリック反応によりRGDSペプチド修飾を行い、共焦点顕微鏡で観察した. Figure 3-8b, cより、PLLA構造物全体がペプチドにラベル化したRhBに基づいて赤色蛍光を発しており、poly(HEMA-*ran*-PgA)の被膜およびRGDSペプチドの導入に成功したことがわかる. 続いて、このRGDS修飾PLLA構造物の細胞接着特性を検討した. MC3T3-E1細胞を 3.0×10^4 cells cm^{-2} の細胞密度で播種し、無血清培地中37°Cで24時間培養した. その後DAPIで細胞核を染色し、共焦点顕微鏡で観察を行ったところ、多数の接着細胞が確認された (Figure 3-8d). なお、このPLLA構造物は、ポリマー未修飾では細胞接着性がほとんど見られない. このことからPLLAからなる三次元構造体への細胞接着性の付与に成功した. 既存の方法のほとんどが光切断性のRGDSペプチドを固体基板に表面に直接化学修飾したものであり、修飾可能な基材や形状が限られるという問題点があった. 本ハイブリッドポリマーシステムはこの汎用性の問題をブレイクスルーでき、様々な分野で表面改質技法としての応用が期待される.

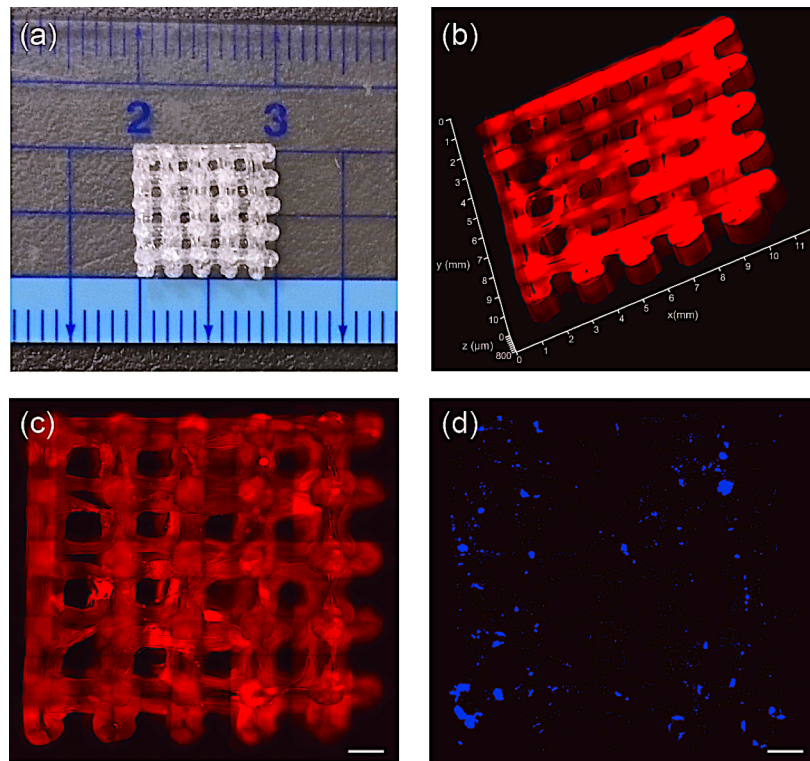


Figure 3-8. (a) Photograph of 3D-construction (1 cm×1 cm×0.2 cm) made from PLLA. (b and c) Confocal microscope images of polymer-coated PLLA after modification of RGDS peptide. (b) 3D view. (c) Top view. (d) Fluorescence image of MC3T3-E1 cells on RGDS-modified PLLA 3D-construction cultured in serum free medium for 24 h. Observed cells were stained by DAPI. Scale bar is 500 μm .

3-4. 結言

本章では、クリックブルな光分解性のANPをリンカーとして有するRGDSペプチドとpoly(HEMA-*ran*-PgA)を新規に設計・合成し、重合後修飾によるグラフト型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合成方法および細胞足場材料への有用性を明らかにした。RAFT重合法を用いることで、ラジカルとの反応性が高いアルキンをPHEMA鎖に組み込むことができた。また、モノマー転化率を変えることで、ポリマーの分子量を自在に制御できることも見出した。Poly(HEMA-*ran*-PgA) ($F_{PgA}=9.81$) フィルムはスピコート法を用いることで容易かつ安定的にガラス基板上に作製することができた。このフィルム表面にはクリック反応により光分解性リンカーを介してRGDSペプチドを容易に導入することができ、UV光の照射によりフィルム表面から完全に除去できることも示した。MC3T3-E1細胞を用いて細胞接着特性を検討したところ、RGDS修飾poly(HEMA-*ran*-PgA)フィルムは細胞接着性を示し、未修飾poly(HEMA-*ran*-PgA)フィルムと比較して4倍以上の細胞接着数であった。このような光照射によりRGDSエピトープが遊離する性質を利用し、NIH3T3細胞からなる細胞シートおよび細胞パターンを得ることに成功した。また、ポリマーを用いる本システムの特徴である三次元構造物の表面改質も行った。3Dプリンターで作製したPLLA三次元構造物にディップコート法によりpoly(HEMA-*ran*-PgA)被膜を行い、クリック反応によりRGDSペプチドを導入した。MC3T3-E1細胞を用いて細胞接着特性を検討し、PLLA三次元構造物に細胞接着性を持たせることに成功した。本研究の手法は完全なRGDSエピトープの切断を行えるだけでなく、三次元構造物のような複雑な形状の表面の改質も可能である。このことから、材料化学分野だけでなく再生医療分野での利用も大いに期待できる。

参考文献

- 1) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004.
- 2) R. Huisgen, *Proc. Chem. Soc.*, **1961**, 357.
- 3) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2596.
- 4) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 3057.
- 5) B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science*, **2013**, 340, 457.
- 6) M. Whiting, J. C. Tripp, Y. -C. Lin, W. Lindstrom, A. J. Olson, J. J. Elder, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 7697.
- 7) O. Š. Miljanić, W. R. Dichtel, S. I. Khan, S. Mortezaei, J. R. Heath, J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 8236.
- 8) Y. H. Lau, P. J. Rutledge, M. Watkinson, M. H. Todd, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 2848.
- 9) G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 1398.
- 10) M. K. Georges, R. P. N. Veregin, P. M. Kazmaier, G. K. Hamer, *Macromolecules.*, **1993**, 26, 2987.
- 11) K. Matyjaszewski, J. Xia, *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 2921.
- 12) M. Kamigaito, T. Ando, M. Sawamoto, *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 3689.
- 13) G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Aust. J. Chem.*, **2005**, 58, 379.
- 14) A. Kajiwarra, K. Matyjaszewski, *Macromolecules.* **1998**, 31, 3489.
- 15) D. Benoit, V. Chaplinski, R. Braslau, C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 3904.
- 16) T. Koga, K. Kitamura, N. Higashi, *Chem. Commun.*, **2006**, 4897.
- 17) T. Koga, M. Koike, S. Kamiwatari, N. Higashi, *Chem. Lett.*, **2011**, 40, 1244.
- 18) T. Koga, E. Aso, N. Higashi, *Langmuir*, **2016**, 32, 12378.
- 19) S. Coca, K. Matyjaszewski, *J. Polym. Sci. A*, **1997**, 35, 3595.
- 20) S. Robin, O. Guerret, J. -L. Couturier, R. Pirri, Y. Gnanou, *Macromolecules*, **2002**, 35, 3844.
- 21) R. T. A. Mayadunne, E. Rizzardo, J. Chiefari, J. Krstina, G. Moad, A. Postma, S. H. Thang, *Macromolecules*, **2000**, 33, 243.
- 22) T. Koga, S. Kamiwatari, N. Higashi, *Langmuir*, **2013**, 29, 15477.
- 23) Y. Wu, Q. Wang, *J. Polym. Sci. A*, **2010**, 48, 2425.
- 24) Xia, J. X. Zhang, K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, **1991**, 24, 4482.
- 25) M. S. Rosenbaum, T. P. Davis, V. Chen, A. G. Fane, *J. Polym. Sci. A*, **2001**, 39, 2777.
- 26) R. T. A. Mayadunne, J. Jeffery, G. Moad, E. Rizzardo, *Macromolecules*, **2003**, 36, 1505.
- 27) O. Wiarachai, T. Vilaivan, Y. Iwasaki, V. P. Hoven, *Langmuir*, **2016**, 32, 1184.

第四章:

タンパク質の構造・機能をモデルとするブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの精密合成とその特性

4-1. 緒言

第二章および第三章ではマクロモノマー法およびクリック反応を用いた重合後修飾法によるグラフト型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合成法を確立し、ペプチドセグメントに光切断可能な RGDS エピトープを、ビニルポリマー骨格に PHEMA を採用することで光照射により細胞接着特性が制御可能な細胞足場材料として機能することを明らかにした。グラフト型ハイブリッドは、一本のビニルポリマー主鎖に複数のペプチドがぶら下がった構造をしている。ポリマー表面にペプチド鎖が露呈しており、そのグラフト率を容易に調節できることから、細胞接着性や抗菌性などのペプチド由来の生体機能を付与する場合に適している。一方で、ブロック型ハイブリッドはポリマー鎖内のペプチドおよびビニルポリマーの各ブロックが明確に分離した構造をしている。そのため、機能活性部位となるペプチドブロックの厳密な空間配置や自己組織化によるナノ構造体形成を合目的的に設計できる。また、分子設計次第では分子内自己組織化によるタンパク質様の単鎖フォールディング形成も可能となろう。

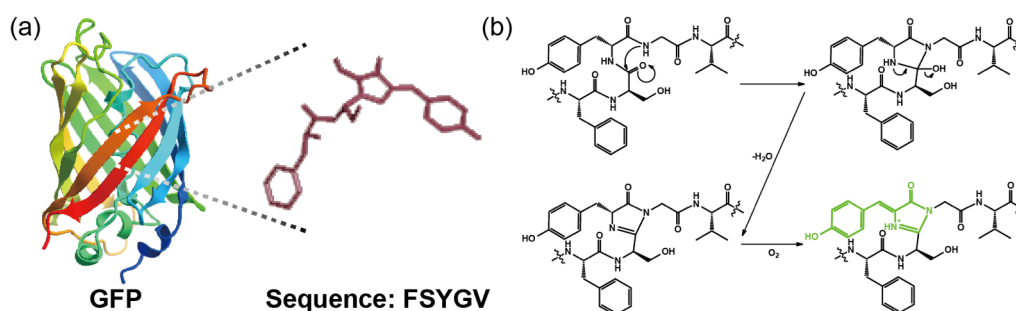


Figure 4-1. (a) High-order structure of GFP and sequence of core segment (ref. protein-data bank). (b) Formation mechanism of *p*-hydroxybenzylideneimidazolinone.

第四章では、ブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドとしてビニルポリマー-配列制御ペプチド-ビニルポリマーのトリブロック構造を基本とするハイブリッドの精密合成法の確立に取り組んだ。

高次構造に由来する機能発現モデルとして緑色蛍光タンパク質 (GFP) に着目した。GFP はオワンクラゲから抽出・単離された蛍光タンパク質であり、これまでに様々な蛍光色を発するものが報告されている¹⁻⁶⁾。これら蛍光性タンパク質は補酵素などの二次的分子を必要とせずにペプチド鎖のみで蛍光発光を示すことから、最も利用されている蛍光分子の 1 つとなっている。GFP は 238 残基のアミノ酸からなるタンパク質であるが、実際に蛍光発光に関与

しているのはタンパクの中心にある配列 (F)SYG(V) のみである。これは GFP が三次構造である β -バレル構造を形成しており^{7),8)}、その疎水性内部に閉じ込められたコア配列が立体規制により通常ではエネルギー的に起こりえない分子内環化反応が進行し、蛍光団である *p*-ヒドロキシベンジリデンイミダゾリノン形成するためである⁹⁾ (Figure 4-1)。このような GFP 様の高分子フォールディングと蛍光発現を実現するためには、FSYGV ペプチドの両末端から疎水・親水性ビニルポリマーを順次ハイブリッド化したブロック型が最適であると考えた (Figure 4-2)。そこで、Table 4-1 に示す組み合わせのブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドを新規に設計・合成し、タンパク質の内部環境再現に基づく機能発現を目指した。

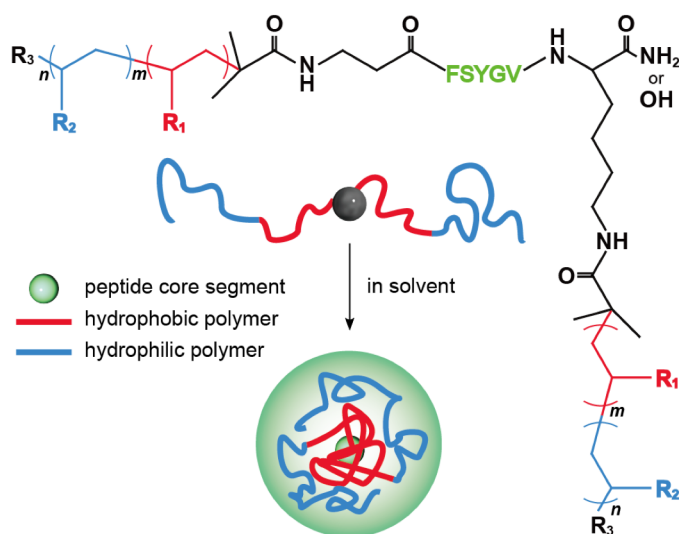


Figure 4-2. Chemical structure of GFP-inspired block-type peptide-vinyl polymer hybrid and its structural model in solvent.

Table 4-1. Vinyl polymer species and the chemical structures employed in this study as hydrophobic and hydrophilic blocks

Sample names	1	2 _n	3	4	5
Hydrophobic polymers (R ₁)	PSt	PNIPAM	PNIPAM	PMMA	PMMA
Chemical structures		 (LCST type)	 (LCST type)		
Hydrophilic polymers (R ₂)	PVP	PAA	PDMAEMA	PAA	PDMAEMA
Chemical structures	 (nonionic)	 (anionic)	 (cationic)	 (anionic)	 (cationic)

4-2. 実験方法

4-2-1. 試薬

Fmoc-Lys(Alloc), Fmoc-Phe, Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Tyr(tBu)およびFmoc-Val, は渡辺化学工業株式会社, 2-クロロトリチルクロライド樹脂 (resin loading 1.6 mmol g^{-1}) はペプチド研究所社, 2-ブロモ-2-メチルプロパン酸 (BMPA), ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA), アクリル酸 *tert*-ブチル (*t*BuA), メタクリル酸 *N,N*-ジメチルアミノエチル (DMAEMA), 臭化銅(I) (Cu(I)Br)およびテトラメチルシラン (TMS) は和光純薬工業株式会社, *N*-ビニル-2-ピロリドン (NVP), *N*-イソプロピルアクリルアミド (NIPAM), 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP), エタノール (EtOH), 水酸化ナトリウム (NaOH), アセトン, シクロヘキサン, トルエン, テトラヒドロフラン (THF), ブタン-2-オン, ジメチルスルホキシド (DMSO), 硫酸ナトリウム, 塩化ナトリウム, フルオレセイン, 重メタノール (CD_3OD), 重クロロホルム (CDCl_3)および重アセトン ($\text{acetone-}d_6$) はナカライテスク株式会社から, 4-シアノ-4-(チオベンゾイルチオ)ペンタン酸 (CTPA) はシグマアルドリッチジャパン株式会社から, フェニルシラン (PhSiH_3), テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0) ($\text{Pd}(0)(\text{PPh}_3)_4$), トリイソプロピルシラン (TIS)およびキサントゲン酸 *O*-エチルカリウム (POEX) は東京化成株式会社からそれぞれ購入した. 重合には蒸留したアセトンを用いた. NVP, NIPAMおよび*t*BuAは塩基性活性アルミナカラムにより重合禁止剤を除去した後に用いた

4-2-2. 合成

4-2-2-1. 両末端に ATRP 開始点を有するペプチドコア (PC) 担持樹脂 (PCI Resin) の合成

まず, Fmoc-アミノ酸誘導体 (Fmoc-Lys(Alloc), Fmoc-L-Val, Fmoc-Gly, Fmoc-L-Tyr(tBu), Fmoc-L-Ser(tBu), Fmoc-L-Phe, Fmoc- β -Ala) (3 当量) を縮合剤に HOBt (3 当量) および DIPC (3 当量) を用いて DMF 中で順次縮合させることにより, 目的の配列を有するペプチドを Fmoc-NH-SAL MBHA 樹脂上に合成した. 続いて, 窒素雰囲気下ジクロロメタン中で PhSiH_3 および $\text{Pd}(0)(\text{PPh}_3)_4$ で 2 時間処理することで Lys 側鎖上の Alloc 基を脱保護した. 続いて, *N*末端の Fmoc 基を脱保護したのち, BMPA (3 当量), HOBt (3 当量) および DIPC (3 当量) を DMF 中で一晩反応させ, ATRP 開始部位を導入することで目的の BMPA- β Ala-FSYGV-Lys(BMPA) 担持樹脂 (PCI Resin) を得た. 構造決定は樹脂から切り出したペプチドを用いて MALDI-TOF MS および ^1H NMR スペクトル測定により行った.

MALDI-TOF MS: obsd. $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}-\text{Br}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}-2\text{Br}+\text{Na}]^+$ (calcd. $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}-\text{Br}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}-2\text{Br}+\text{Na}]^+$); 1067.9, 1091.2, 1011.2, 931.2 (1067.7, 1090.9, 1011.9, 932.5).

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, TMS): δ 0.96 ppm (6H: Val β - CH_3), 1.2-1.7 ppm (6H: Lys β - CH_2 , Lys γ - CH_2 , Lys δ - CH_2), 1.8 ppm (12H: $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{Br}$), 1.9-2.4 ppm (3H: β Ala α - CH_2 , Val β -CH), 2.6-3.3 ppm (8H: Lys ε - CH_2 , Phe β - CH_2 , Tyr β - CH_2 , β Ala β - CH_2), 3.4-3.8 ppm (4H: Ser β - CH_2 , Gly α - CH_2),

4.0-5.0 ppm (6H: Phe α -CH, Ser α -CH, Tyr α -CH, Val α -CH, Lys α -CH, Ser β -OH), 6.6-7.3 ppm (11H: aromatic ring of Phe and Tyr, -CONH₂), 7.8-8.3 ppm (8H: -CONH-).

4-2-2-2. Br-PSt_m-b-FSYGV-b-PSt_m-Br 担持樹脂 ((Br-PSt_m)₂ PCI Resin) の合成

PCI Resin 0.0621 g (0.025 mmol) をトルエン 1.05 mL により一晩膨潤させた。次に、モノマーとして St 2.284 mL (20 mmol), 触媒として Cu(I)Br 16 mg (0.1 mmol), 配位子として PMDETA 44 μ L (0.2 mmol) を加えた。寒剤に N₂(l) を用いて凍結脱気を行った後に封管し、油浴下 (110°C) で 2, 3, 4, 5, 12 および 24 時間重合させた。重合後、系内からモノマー、触媒および配位子を除去する為、DMF 10 mL で繰り返し洗浄した。最後に DCM 10 mL で繰り返し洗浄し、DMF から DCM に置換した後、デシケーター内で減圧乾燥させることで目的の Br-PSt_m-b-FSYGV-b-PSt_m-Br 担持樹脂 ((Br-PSt_m)₂ PCI Resin) を得た。得られたポリマーハイブリッドの構造と分子量は ¹H NMR スペクトルにより、分子量と多分散度は SEC 測定により確認した。なお測定に用いたポリマーハイブリッドは、樹脂の一部を TFA/DCM/TIS (v/v = 8.5/1/0.5) 5 mL で処理し、MeOH を非溶媒に用いた再沈殿法により得た。重合時間 2 時間 (収量: 0.244 g, 重合率: 7.96 %).

SEC (THF, PSt standard): 分子量 $M_{n,SEC}$ =15600, 重合度 m_{SEC} =70, 多分散度 D =1.18.

¹H NMR (CDCl₃, TMS): 分子量 $M_{n,NMR}$ =14000, 重合度 m_{NMR} =62.

δ 0.9-1.0 ppm (18H: Val β -CH₃, -C(CH₃)₂), 1.2-2.4 ppm (393H: main chain of PSt, Lys β -CH₂, Lys γ -CH₂, Lys δ -CH₂, β Ala α -CH₂, Val β -CH), 2.6-3.3 ppm (8H: Lys ϵ -CH₂, Phe β -CH₂, Tyr β -CH₂, β Ala β -CH₂), 3.4-3.8 ppm (4H: Ser β -CH₂, Gly α -CH₂), 4.0-5.0 ppm (5H: Phe α -CH, Ser α -CH, Tyr α -CH, Val α -CH, Lys α -CH), 6.3-7.3 ppm (629H: aromatic ring of PSt, Phe and Tyr).

4-2-2-3. X-PSt₆₂-b-PC-b-PSt₆₂-X 担持樹脂 ((X-PSt₆₂)₂ PCI Resin) の合成

スチレンの重合を 2 時間行って得た (Br-PSt₆₂)₂ PCI Resin 0.244 g (0.025 mmol) をブタン-2-オン 10 mL により一晩膨潤させた。膨潤液を除去し、溶媒としてブタン-2-オン 5 mL に溶解させた POEX 0.07 g (0.38 mmol) を加え、4 日間反応させた。反応後、残留試薬を除去する為にブタン-2-オン 10 mL で繰り返し洗浄した。最後に DCM 10 mL で繰り返し洗浄し、ブタン-2-オンから DCM に置換した後、デシケーター内で減圧乾燥させることで目的の X-PSt₆₂-b-FSYGV-b-PSt₆₂-X 担持樹脂 ((X-PSt₆₂)₂ PCI Resin) を得た (収量 : 0.245 g).

4-2-2-4. PVP_n-b-PSt₆₂-b-FSYGV-b-PSt₆₂-b-PVP_n(1) の合成

(Br-PSt₆₂)₂ PCI Resin 0.245 g (0.025 mmol) を NVP 5.33 mL (50 mmol) により一晩膨潤させた。そのまま寒剤に N₂(l) を用いて凍結脱気を行った後に封管し、35°C にインキュベートしながら低圧水銀灯を用いて 10 cm の距離から UV 光 (254 nm) を照射して 16 時間重合させた。重合後、系内からモノマー除去する為、DMF 10 mL で繰り返し洗浄した。最後に DCM

10 mL で繰り返し洗浄し、DMF から DCM に置換した後、デシケーター内で減圧乾燥させることで目的のポリマーハイブリッド担持樹脂を得た。樹脂上からの切り出しは TFA/DCM/TMS (v/v/v = 8/1.5/0.5) 50 mL を加え、一晚攪拌することで行った。この試料溶液を濃縮し、最後にジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法により精製を行うことで目的の **1** を得た。得られたポリマーハイブリッドの構造と分子量は ^1H NMR スペクトルにより、分子量と多分散度は SEC 測定により確認した。

PVP_n-b-PSt₆₂-b-FSYGV-b-PSt₆₂-b-PVP_n (**1**): 収量: 4.845 g, 重合率: 90.9 %

SEC (DMF, PSt standard): 分子量 $M_{n,SEC}=149500$, 重合度 $n_{SEC}=598$, 多分散度 $D=2.25$.

^1H NMR (CDCl₃, TMS): 分子量 $M_{n,NMR}=126700$, 重合度 $n_{NMR}=507$.

δ 0.9-2.4 ppm (5481H: Val β -CH₃, -C(CH₃)₂, main chain of PSt and PVP, pyrrolidone ring of PVP, Lys β -CH₂, Lys γ -CH₂, Lys δ -CH₂, β Ala α -CH₂, Val β -CH), 2.6-3.9 ppm (2040H: pyrrolidone ring of PVP Lys ϵ -CH₂, Phe β -CH₂, Tyr β -CH₂, β Ala β -CH₂, Ser β -CH₂, Gly α -CH₂), 4.0-5.0 ppm (5H: Phe α -CH, Ser α -CH, Tyr α -CH, Val α -CH, Lys α -CH), 6.3-7.3 ppm (629H: aromatic ring of PSt, Phe and Tyr).

4-2-2-5. 両末端に連鎖移動部位を有するペプチドコア (PCCTA) の合成

まず、2-クロロトリチルクロライド樹脂を Fmoc-L-Lys(Alloc) (3 当量), DIPEA (9 当量) で処理した。その後、未反応の反応点をクエンチするため、DCM/MeOH/DIPEA (v/v = 17/2/1) 混合溶液で 3 分間処理した。続いて、Fmoc-アミノ酸誘導体 (Fmoc-L-Val, Fmoc-Gly, Fmoc-L-Tyr(tBu), Fmoc-L-Ser(tBu), Fmoc-L-Phe, Fmoc- β -Ala) (3 当量) を縮合剤に HOBt (3 当量) および DIPC (3 当量) を用いて DMF 中で順次縮合させることにより、目的の配列を有するペプチドを樹脂上に合成した。続いて、窒素雰囲気下ジクロロメタン中で PhSiH₃ および Pd(0)(PPH₃)₄ で 2 時間処理することで Lys 側鎖上の Alloc 基を脱保護した。続いて、N 末端の Fmoc 基を脱保護したのち、CTPA (3 当量), HOBt (3 当量) および DIPC (3 当量) を DMF 中で 3 日間反応させ、連鎖移動部位を導入することで目的の CTPA- β Ala-FSYGV-Lys(CTPA) を樹脂上に合成した。樹脂を HFIP/DCM (v/v=3/7) 混合溶液で処理した。ジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法により、目的のペプチド連鎖移動剤 (PCCTA) を紅桔梗色固体として得た。構造決定は ^1H NMR スペクトル測定により行った。

^1H NMR (DMSO-*d*₆, TMS): δ 0.96 ppm (6H: Val β -CH₃), 1.0-1.15 ppm (18H: *tert*-butyl group of Ser and Tyr), 1.2-1.7 ppm (6H: Lys β -CH₂, Lys γ -CH₂, Lys δ -CH₂), 1.78 ppm (3H: -C(CN)(CH₃)S-), 1.9-2.4 ppm (7H: β Ala α -CH₂, Val β -CH, -COCH₂CH₂-), 2.6-3.3 ppm (12H: Lys ϵ -CH₂, Phe β -CH₂, Tyr β -CH₂, β Ala β -CH₂, -COCH₂CH₂-), 3.4-3.7 ppm (4H: Ser β -CH₂, Gly α -CH₂), 4.0-5.0 ppm (6H: Phe α -CH, Ser α -CH, Tyr α -CH, Val α -CH, Lys α -CH, Ser β -OH), 6.8-7.3 ppm (9H: aromatic ring of Phe and Tyr), 7.5-7.7 ppm (10H: aromatic ring of CTPA), 7.8-8.3 ppm (8H: -CONH-), 12.5 ppm (1H: -COOH).

4-2-2-6. PNIPAM_m-b-FSYGV-b-PNIPAM_m の合成

連鎖移動剤として PCCTA 0.28 g (0.2 mmol), モノマーとして NIPAM 4.5 g (40 mmol), 開始剤として AIBN 0.015 g (0.1 mmol) を混合し, 溶媒にメタノールを用いて 10 mL にメスアップした. 寒剤に N₂(l) を用いて凍結脱気を行った後に封管し, 油浴下 (60°C) で 9 時間重合させた. 重合後, ジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法により精製し, 目的の PNIPAM_m-b-FSYGV-b-PNIPAM_m を得た. 得られたポリマーハイブリッドの構造と分子量は ¹H NMR スペクトルにより, 分子量と多分散度は SEC 測定により確認した.

SEC (THF, PMMA standard): 分子量 $M_{n,SEC}=9000$, 重合度 $m_{SEC}=29$, 多分散度 $D=1.20$ (PMMA standard).

¹H NMR (CD₃OD, TMS): 分子量 $M_{n,NMR}=8200$, 重合度 $m_{NMR}=30$.

δ 0.9-2.4 ppm (590H: Val β-CH₃, *tert*-butyl group of Ser and Tyr, Lys β-CH₂, Lys γ-CH₂, Lys δ-CH₂, -C(CN)(CH₃)-, βAla α-CH₂, Val β-CH, -COCH₂CH₂-, Lys β-CH₂, Lys γ-CH₂, Lys δ-CH₂, βAla α-CH₂, Val β-CH, main chain of PNIPAM, -CH(CH₃)₂), 2.6-3.3 ppm (12H: Lys ε-CH₂, Phe β-CH₂, Tyr β-CH₂, βAla β-CH₂, -COCH₂CH₂-) 3.4-3.7 ppm (4H: Ser β-CH₂, Gly α-CH₂), 3.8 ppm (60H: -CH(CH₃)₂), 4.0-5.0 ppm (6H: Phe α-CH, Ser α-CH, Tyr α-CH, Val α-CH, Lys α-CH, Ser β-OH), 6.8-7.3 ppm (9H: aromatic ring of Phe and Tyr), 7.5-8.3 ppm (78H: aromatic ring of CTPA, -CONH-).

4-2-2-7. PtBuA_n-b-PNIPAM₃₀-b-FSYGV-b-PNIPAM₃₀-b-PtBuA_n (**2'**_n) の合成

マクロ連鎖移動剤として PNIPAM₃₀-b-FSYGV-b-PNIPAM₃₀ 0.0163 g (0.0025 mmol), モノマーとして *t*BuA 0.579 mL (4 mmol), 開始剤として AIBN 0.051 mg (0.00125 mmol) を混合し, 溶媒にアセトンを用いて 1 mL にメスアップした. 寒剤に N₂(l) を用いて凍結脱気を行った後に封管し, 油浴下 (60°C) で 2, 6 および 24 時間重合させた. 重合後, MeOH/水 (v/v = 7/3) を非溶媒に用いた再沈殿法により精製し, 凍結乾燥することで目的の **2'**_n を得た. 得られたポリマーハイブリッドの構造と分子量は ¹H NMR スペクトルにより, 分子量と多分散度は SEC 測定により確認した.

重合時間 2 時間 (収量: 0.079 g, 重合率: 12.2 %)

SEC (THF, PMMA standard): 分子量 $M_{n,SEC}=39300$, 重合度 $n_{SEC}=117$, 多分散度 $D=1.24$.

¹H NMR (CDCl₃, TMS): 分子量 $M_{n,NMR}=33200$, 重合度 $n_{NMR}=98$.

δ 0.9-2.4 ppm (2840H: Val β-CH₃, *tert*-butyl group of Ser and Tyr, Lys β-CH₂, Lys γ-CH₂, Lys δ-CH₂, -C(CN)(CH₃)-, βAla α-CH₂, Val β-CH, -COCH₂CH₂-, Lys β-CH₂, Lys γ-CH₂, Lys δ-CH₂, βAla α-CH₂, Val β-CH, main chain of PNIPAM and PtBuA, -CH(CH₃)₂, *tert*-butyl group of PtBuA), 2.6-3.3 ppm (12H: Lys ε-CH₂, Phe β-CH₂, Tyr β-CH₂, βAla β-CH₂, -COCH₂CH₂-) 3.4-3.7 ppm (4H: Ser β-CH₂, Gly α-CH₂), 3.8 ppm (60H: -CH(CH₃)₂), 4.0-5.0 ppm (6H: Phe α-CH, Ser α-CH, Tyr α-CH, Val α-CH, Lys α-CH, Ser β-OH), 6.8-7.3 ppm (9H: aromatic ring of Phe and Tyr), 7.5-8.3

ppm (78H: aromatic ring of CTPA, -CONH-).

4-2-2-8. PAA_n-b-PNIPAM₃₀-b-FSYGV-b-PNIPAM₃₀-b-PAA_n (**2_n**) の合成

得られた **2'** 全量を TFA/ジエチルエーテル/TIS (v/v = 10/9/1) 50 mL に溶解させ、一晚撹拌することで Ser, Tyr および PtBA の *tert*-ブチル基の脱保護を行った。透明のゲル状の沈殿が確認されたため、デカンテーションにより反応液を除去し、これを回収した。MeOH に再溶解させ、減圧濃縮することで TFA を共沸により除去した。再び MeOH に溶解させ、ジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法により精製し、目的のを **2_n** を得た。得られたポリマーハイブリッドの構造と *tert*-ブチル基の脱保護率は ¹H NMR スペクトルにより確認した。なお、重合度は **2'_n** の測定で得られた値に準じた。

PAA₇₉₄-b-PNIPAM₃₀-b-FSYGV-b-PNIPAM₃₀-b-PAA₇₉₄ (**2₇₉₄**)

¹H NMR (CD₃OD, TMS): 分子量 $M_{n,NMR}=144500$.

δ 0.9-2.4 ppm (7641H: Val β-CH₃, Lys β-CH₂, Lys γ-CH₂, Lys δ-CH₂, -C(CN)(CH₃)-, βAla α-CH₂, Val β-CH, -COCH₂CH₂-, Lys β-CH₂, Lys γ-CH₂, Lys δ-CH₂, βAla α-CH₂, Val β-CH, main chain of PNIPAM and PAA, -CH(CH₃)₂), 2.6-3.3 ppm (12H: Lys ε-CH₂, Phe β-CH₂, Tyr β-CH₂, βAla β-CH₂, -COCH₂CH₂-) 3.4-3.7 ppm (4H: Ser β-CH₂, Gly α-CH₂), 3.8 ppm (60H: -CH(CH₃)₂), 4.0-5.0 ppm (7H: Phe α-CH, Ser α-CH, Tyr α-CH, Val α-CH, Lys α-CH, OH of Ser and Tyr), 6.8-7.3 ppm (9H: aromatic ring of Phe and Tyr), 7.5-8.3 ppm (78H: aromatic ring of CTPA, -CONH-).

4-2-2-9. 光切断性 ANP リンカーを有するペプチドコア連鎖移動剤 (PCCTA_{ANP}) の合成

まず、2-クロロトリチルクロライド樹脂を Fmoc-L-Lys(Alloc) (3 当量), DIPEA (9 当量) で処理した。その後、未反応の反応点をクエンチするため、DCM/MeOH/DIPEA (v/v = 17/2/1) 混合溶液で 3 分間処理した。続いて、Fmoc-アミノ酸誘導体 (Fmoc-L-Val, Fmoc-Gly, Fmoc-L-Tyr(tBu), Fmoc-L-Ser(tBu), Fmoc-L-Phe, Fmoc-β-Ala) (3 当量) を縮合剤に HOBt (3 当量) および DIPIC (3 当量) を用いて DMF 中で順次縮合させることにより、目的の配列を有するペプチドを樹脂上に合成した。続いて、窒素雰囲気下ジクロロメタン中で PhSiH₃ および Pd(0)(PPH₃)₄ で 2 時間処理することで Lys 側鎖上の Alloc 基を脱保護した。続いて、N 末端の Fmoc 基を脱保護したのち、Fmoc-ANP, HOBt (3 当量) および DIPIC (3 当量) を DMF 中で一晚反応させることで光分解性リンカーを導入した。次いで、CTPA (3 当量), HOBt (3 当量) および DIPIC (3 当量) を DMF 中で 3 日間反応させ、連鎖移動部位を導入することで目的の CTPA-ANP-βAla-FSYGV-Lys(-ANP-CTPA) を樹脂上に合成した。樹脂を HFIP/DCM (v/v=3/7) 混合溶液で処理した。ジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法により、目的のペプチド連鎖移動剤 (PCCTA_{ANP}) を紅桔梗色固体として得た。構造決定は ¹H NMR スペクトル測定により行った。

¹H NMR (DMSO-*d*₆, TMS) : δ 0.96 ppm (6H: Val β-CH₃), 1.0-1.15 ppm (18H: *tert*-butyl group of

Ser and Tyr), 1.2-1.7 ppm (6H: Lys β -CH₂, Lys γ -CH₂, Lys δ -CH₂), 1.78 ppm (3H: -C(CN)(CH₃)S-), 1.9-2.4 ppm (7H: β Ala α -CH₂, Val β -CH, -COCH₂CH₂-), 2.6-3.3 ppm (12H: Lys ϵ -CH₂, Phe β -CH₂, Tyr β -CH₂, β Ala β -CH₂, -COCH₂CH₂-) 3.4-3.7 ppm (4H: Ser β -CH₂, Gly α -CH₂), 4.0-5.3 ppm (7H: Phe α -CH, Ser α -CH, Tyr α -CH, Val α -CH, Lys α -CH, Ser β -OH, -CH(C₆H₄NO₂)NH-), 6.8-7.3 ppm (9H: aromatic ring of Phe and Tyr), 7.5-8.3 ppm (13H: aromatic ring of CTPA and ANP, -CONH-), 12.5 ppm (1H: -COOH).

4-2-2-10. 光切断 ANP リンカーを有する PNIPAM_m-b-ANP-FSYGV-ANP-b-PNIPAM_m の合成

連鎖移動剤として PCCTA_{ANP} 0.361 g (0.2 mmol), モノマーとして NIPAM 4.5 g (40 mmol), 開始剤として AIBN 0.015 g (0.1 mmol) を混合し, 溶媒に DMF/MeOH (v/v=1/4) を用いて 10 mL にメスアップした. 寒剤に N₂(l) を用いて凍結脱気を行った後に封管し, 油浴下 (60°C) で 9 時間重合させた. 重合後, ジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法により精製し, 目的の PNIPAM_m-b-ANP-FSYGV-ANP-b-PNIPAM_m を得た. 得られたポリマーハイブリッドの構造と分子量は ¹H NMR スペクトルにより, 分子量と多分散度は SEC 測定により確認した. SEC (THF, PMMA standard): 分子量 $M_{n,SEC}$ =14000, 重合度 m_{SEC} =54, 多分散度 D =1.23.

¹H NMR (CD₃OD, TMS): 分子量 $M_{n,NMR}$ =19200, 重合度 m_{NMR} =77.

δ 0.9-2.4 ppm (1436H: Val β -CH₃, *tert*-butyl group of Ser and Tyr, Lys β -CH₂, Lys γ -CH₂, Lys δ -CH₂, -C(CN)(CH₃)-, β Ala α -CH₂, Val β -CH, -COCH₂CH₂-, Lys β -CH₂, Lys γ -CH₂, Lys δ -CH₂, β Ala α -CH₂, Val β -CH, main chain of PNIPAM, -CH(CH₃)₂), 2.6-3.3 ppm (12H: Lys ϵ -CH₂, Phe β -CH₂, Tyr β -CH₂, β Ala β -CH₂, -COCH₂CH₂-) 3.4-3.7 ppm (4H: Ser β -CH₂, Gly α -CH₂), 3.8 ppm (60H: -CH(CH₃)₂), 4.0-5.3 ppm (7H: Phe α -CH, Ser α -CH, Tyr α -CH, Val α -CH, Lys α -CH, Ser β -OH, -CH(C₆H₄NO₂)NH-), 6.8-7.3 ppm (9H: aromatic ring of Phe and Tyr), 7.5-8.3 ppm (172H: aromatic ring of CTPA and ANP, -CONH-).

4-2-2-11. 光切断 ANP リンカーを有する PtBuA_n-b-PNIPAM₇₇-b-ANP-FYSGV-ANP-b-PNIPAM₇₇-b-PtBuA_n(**2'**_{n,ANP}) の合成

マクロ連鎖移動剤として PNIPAM₇₇-b-ANP-FSYGV-ANP-b-PNIPAM₇₇ 0.048 g (0.0025 mmol), モノマーとして *t*BuA 0.579 mL (4 mmol), 開始剤として AIBN 0.051 mg (0.00125 mmol) を混合し, 溶媒にアセトンを用いて 1 mL にメスアップした. 寒剤に N₂(l) を用いて凍結脱気を行った後に封管し, 油浴下 (60°C) で 2, 6 および 24 時間重合させた. 重合後, MeOH/水 (v/v=7/3) を非溶媒に用いた再沈殿法により精製し, 凍結乾燥することで目的の **2'**_{n,ANP} を得た. 得られたポリマーハイブリッドの構造と分子量は ¹H NMR スペクトルにより, 分子量と多分散度は SEC 測定により確認した.

重合時間 2 時間 (収量: 0.109 g, 重合率: 11.9%)

SEC (THF, PMMA standard): 分子量 $M_{n,SEC}$ =44000, 重合度 n_{SEC} =117, 多分散度 D =1.24.

^1H NMR (CDCl_3 , TMS): 分子量 $M_{n,\text{NMR}}=53000$, 重合度 $n_{\text{NMR}}=132$.

δ 0.9-2.4 ppm (4604H: Val $\beta\text{-CH}_3$, *tert*-butyl group of Ser and Tyr, Lys $\beta\text{-CH}_2$, Lys $\gamma\text{-CH}_2$, Lys $\delta\text{-CH}_2$, $-\text{C}(\text{CN})(\text{CH}_3)-$, $\beta\text{Ala } \alpha\text{-CH}_2$, Val $\beta\text{-CH}$, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$, Lys $\beta\text{-CH}_2$, Lys $\gamma\text{-CH}_2$, Lys $\delta\text{-CH}_2$, $\beta\text{Ala } \alpha\text{-CH}_2$, Val $\beta\text{-CH}$, main chain of PNIPAM and PtBuA, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, *tert*-butyl group of PtBuA), 2.6-3.3 ppm (12H: Lys $\varepsilon\text{-CH}_2$, Phe $\beta\text{-CH}_2$, Tyr $\beta\text{-CH}_2$, $\beta\text{Ala } \beta\text{-CH}_2$, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$) 3.4-3.7 ppm (4H: Ser $\beta\text{-CH}_2$, Gly $\alpha\text{-CH}_2$), 3.8 ppm (60H : $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.0-5.0 ppm (6H: Phe $\alpha\text{-CH}$, Ser $\alpha\text{-CH}$, Tyr $\alpha\text{-CH}$, Val $\alpha\text{-CH}$, Lys $\alpha\text{-CH}$, Ser $\beta\text{-OH}$), 6.8-7.3 ppm (9H: aromatic ring of Phe and Tyr), 7.5-8.3 ppm (172H : aromatic ring of CTPA, $-\text{CONH}-$).

4-2-2-12. PDMAEMA $_n$ -*b*-PNIPAM $_m$ -*b*-FSYGV-*b*-PNIPAM $_m$ -*b*-PDMAEMA $_n$ (**3**) の合成

マクロ連鎖移動剤として PNIPAM $_m$ -*b*-FSYGV-*b*-PNIPAM $_m$ 0.0163 g (0.0025 mmol), モノマーとして DMAEMA 0.679 mL (4 mmol), 開始剤として AIBN 0.051 mg (0.00125 mmol) を混合し, 溶媒にアセトンを用いて 1 mL にメスアップした. 寒剤に $\text{N}_2(l)$ を用いて凍結脱気を行った後に封管し, 油浴下 (60°C) で 24 時間重合させた. 重合後, ヘキサンを非溶媒に用いた再沈殿法により精製し, 目的の **3** を得た. 得られたポリマーハイブリッドの構造と分子量は ^1H NMR スペクトルにより確認した.

^1H NMR (CDCl_3 , TMS): 分子量 $M_{n,\text{NMR}}=474000$, 重合度 $n_{\text{NMR}}=1482$.

δ 0.9-2.4 ppm (11906H: Val $\beta\text{-CH}_3$, *tert*-butyl group of Ser and Tyr, Lys $\beta\text{-CH}_2$, Lys $\gamma\text{-CH}_2$, Lys $\delta\text{-CH}_2$, $-\text{C}(\text{CN})(\text{CH}_3)-$, $\beta\text{Ala } \alpha\text{-CH}_2$, Val $\beta\text{-CH}$, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$, Lys $\beta\text{-CH}_2$, Lys $\gamma\text{-CH}_2$, Lys $\delta\text{-CH}_2$, $\beta\text{Ala } \alpha\text{-CH}_2$, Val $\beta\text{-CH}$, main chain of PNIPAM and PDMAEMA, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.6-3.3 ppm (2976H: Lys $\varepsilon\text{-CH}_2$, Phe $\beta\text{-CH}_2$, Tyr $\beta\text{-CH}_2$, $\beta\text{Ala } \beta\text{-CH}_2$, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$, methylene of PDMAEMA) 3.4-3.7 ppm (4H: Ser $\beta\text{-CH}_2$, Gly $\alpha\text{-CH}_2$), 3.8 ppm (60H: $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.0-5.0 ppm (2970H: Phe $\alpha\text{-CH}$, Ser $\alpha\text{-CH}$, Tyr $\alpha\text{-CH}$, Val $\alpha\text{-CH}$, Lys $\alpha\text{-CH}$, Ser $\beta\text{-OH}$, methylene of PDMAEMA), 6.8-7.3 ppm (9H: aromatic ring of Phe and Tyr), 7.5-8.3 ppm (78H: aromatic ring of CTPA, $-\text{CONH}-$).

4-2-2-13. PMMA $_m$ -*b*-FSYGV-*b*-PMMA $_m$ の合成

連鎖移動剤として PCCTA 0.14 g (0.1 mmol), モノマーとして MMA 2.31 mL (20 mmol), 開始剤として AIBN 7.5 mg (0.05 mmol) を混合し, 溶媒にアセトンを用いて 5 mL にメスアップした. 寒剤に $\text{N}_2(l)$ を用いて凍結脱気を行った後に封管し, 油浴下 (60°C) で 6 時間重合させた. 重合後, メタノールを非溶媒に用いた再沈殿法により精製し, 目的の PMMA $_m$ -*b*-FSYGV-*b*-PMMA $_m$ を得た. 得られたポリマーハイブリッドの構造と分子量は ^1H NMR スペクトルにより, 分子量と多分散度は SEC 測定により確認した.

SEC (THF, PMMA standard): 分子量 $M_{n,\text{SEC}}=13200$, 重合度 $m_{\text{SEC}}=59$, 多分散度 $D=1.16$.

^1H NMR (CD_3OD , TMS): 分子量 $M_{n,\text{NMR}}=11800$, 重合度 $m_{\text{NMR}}=52$.

δ 0.9-2.4 ppm (1006H: Val $\beta\text{-CH}_3$, *tert*-butyl group of Ser and Tyr, Lys $\beta\text{-CH}_2$, Lys $\gamma\text{-CH}_2$, Lys

δ -CH₂, -C(CN)(CH₃)-, β Ala α -CH₂, Val β -CH, -COCH₂CH₂-, Lys β -CH₂, Lys γ -CH₂, Lys δ -CH₂, β Ala α -CH₂, Val β -CH, main chain of PMMA, -CH(CH₃)₂, 2.6-3.3 ppm (12H: Lys ϵ -CH₂, Phe β -CH₂, Tyr β -CH₂, β Ala β -CH₂, -COCH₂CH₂-) 3.4-3.7 ppm (916H: Ser β -CH₂, Gly α -CH₂, -OCH₃ of PMMA), 4.0-5.0 ppm (6H: Phe α -CH, Ser α -CH, Tyr α -CH, Val α -CH, Lys α -CH, Ser β -OH), 6.8-7.3 ppm (9H: aromatic ring of Phe and Tyr), 7.5-8.3 ppm (9H: aromatic ring of CTPA).

4-2-2-14. PtBuA_n-*b*-PMMA₅₂-*b*-FSYGV-*b*-PMMA₅₂-*b*-PtBuA_n (**4'**) の合成

マクロ連鎖移動剤として PMMA₅₂-*b*-FSYGV-*b*-PMMA₅₂ 0.0325 g (0.0025 mmol), モノマーとして *t*BuA 0.579 mL (4 mmol), 開始剤として AIBN 0.051 mg (0.00125 mmol) を混合し, 溶媒にアセトンを用いて 1 mL にメスアップした. 寒剤に N₂(l) を用いて凍結脱気を行った後に封管し, 油浴下 (60°C) で 24 時間重合させた. 重合後, MeOH/水 (v/v = 7/3) を非溶媒に用いた再沈殿法により精製し, 凍結乾燥することで目的の **2'**_n を得た. 得られたポリマーハイブリッドの構造と分子量は ¹H NMR スペクトルにより, 分子量と多分散度は SEC 測定により確認した.

SEC (THF, PMMA standard): 分子量 $M_{n,SEC}=266000$, 重合度 $n_{SEC}=1015$, 多分散度 $D=1.30$.

¹H NMR (CDCl₃, TMS): 分子量 $M_{n,NMR}=186000$, 重合度 $n_{NMR}=696$.

δ 0.9-2.4 ppm (17710H: Val β -CH₃, *tert*-butyl group of Ser and Tyr, Lys β -CH₂, Lys γ -CH₂, Lys δ -CH₂, -C(CN)(CH₃)-, β Ala α -CH₂, Val β -CH, -COCH₂CH₂-, Lys β -CH₂, Lys γ -CH₂, Lys δ -CH₂, β Ala α -CH₂, Val β -CH, main chain of PMMA and PtBuA, -CH(CH₃)₂, *tert*-butyl group of PtBuA), 2.6-3.3 ppm (12H: Lys ϵ -CH₂, Phe β -CH₂, Tyr β -CH₂, β Ala β -CH₂, -COCH₂CH₂-) 3.4-3.7 ppm (916H: Ser β -CH₂, Gly α -CH₂, -OCH₃ of PMMA), 4.0-5.0 ppm (6H: Phe α -CH, Ser α -CH, Tyr α -CH, Val α -CH, Lys α -CH, Ser β -OH), 6.8-7.3 ppm (9H: aromatic ring of Phe and Tyr), 7.5-8.3 ppm (9H: aromatic ring of CTPA, -CONH-).

4-2-2-15. PAA₆₉₆-*b*-PMMA₅₂-*b*-FSYGV-*b*-PMMA₅₂-*b*-PAA₆₉₆ (**4**) の合成

得られた **4'** 全量を TFA/ジエチルエーテル/TIS (v/v/v = 10/9/1) 50 mL に溶解させ, 一晚攪拌することで Ser, Tyr および PtBuA の *tert*-ブチル基の脱保護を行った. 透明のゲル状の沈殿が確認されたため, デカンテーションにより反応液を除去し, これを回収した. MeOH に再溶解させ, 減圧濃縮することで TFA を共沸により除去した. 再び MeOH に溶解させ, ジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法により精製し, 目的のを **4** を得た. 得られたポリマーハイブリッドの構造と *tert*-ブチル基の脱保護率は ¹H NMR スペクトルにより確認した. なお, 重合度は **4'** の測定で得られた値に準じた.

¹H NMR (CD₃OD, TMS): 分子量 $M_{n,NMR}=115300$.

δ 0.9-2.4 ppm (5232H : Val β -CH₃, Lys β -CH₂, Lys γ -CH₂, Lys δ -CH₂, -C(CN)(CH₃)-, β Ala α -CH₂, Val β -CH, -COCH₂CH₂-, Lys β -CH₂, Lys γ -CH₂, Lys δ -CH₂, β Ala α -CH₂, Val β -CH, main chain of

PNIPAM and PAA, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.6-3.7 ppm (916H: Lys ϵ - CH_2 , Phe β - CH_2 , Tyr β - CH_2 , β Ala β - CH_2 , $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{OCH}_3$ of PMMA) 3.4-3.8 ppm (4H: Ser β - CH_2 , Gly α - CH_2), 3.8 ppm (60H: $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.0-5.0 ppm (6H: Phe α -CH, Ser α -CH, Tyr α -CH, Val α -CH, Lys α -CH, OH of Ser and Tyr), 6.8-7.3 ppm (9H: aromatic ring of Phe and Tyr), 7.5-8.3 ppm (9H: aromatic ring of CTPA, $-\text{CONH}-$).

4-2-2-16. PDMAEMA_n-b-PMMA₅₂-b-FSYGV-b-PMMA₅₂-b-PDMAEMA_n (5) の合成

マクロ連鎖移動剤として PMMA_m-b-FSYGV-b-PMMA_m 0.0325 g (0.0025 mmol), モノマーとして DMAEMA 0.679 mL (4 mmol), 開始剤として AIBN 0.051 mg (0.00125 mmol) を混合し, 溶媒にアセトンを用いて 1 mL にメスアップした. 寒剤に $\text{N}_2(l)$ を用いて凍結脱気を行った後に封管し, 油浴下 (60°C) で 24 時間重合させた. 重合後, ヘキサンを非溶媒に用いた再沈殿法により精製し, 目的の **5** を得た. 得られたポリマーハイブリッドの構造と分子量は ^1H NMR スペクトルにより確認した.

^1H NMR (CDCl_3 , TMS): 分子量 $M_{n,\text{NMR}}=452300$, 重合度 $n_{\text{NMR}}=1482$.

δ 0.9-2.4 ppm (12862H: Val β - CH_3 , *tert*-butyl group of Ser and Tyr, Lys β - CH_2 , Lys γ - CH_2 , Lys δ - CH_2 , $-\text{C}(\text{CN})(\text{CH}_3)-$, β Ala α - CH_2 , Val β -CH, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$, Lys β - CH_2 , Lys γ - CH_2 , Lys δ - CH_2 , β Ala α - CH_2 , Val β -CH, main chain of PMMA and PDMAEMA, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.6-3.3 ppm (5938H: Lys ϵ - CH_2 , Phe β - CH_2 , Tyr β - CH_2 , β Ala β - CH_2 , $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$, methylene of PDMAEMA) 3.4-3.7 ppm (912H: Ser β - CH_2 , Gly α - CH_2 , $-\text{OCH}_3$ of PMMA), 4.0-5.0 ppm (2970H: Phe α -CH, Ser α -CH, Tyr α -CH, Val α -CH, Lys α -CH, Ser β -OH, methylene of PDMAEMA), 6.8-7.3 ppm (9H: aromatic ring of Phe and Tyr), 7.5-8.3 ppm (9H: aromatic ring of CTPA, $-\text{CONH}-$).

4-2-3. 測定

濁度測定は日本分光社製 Jasco V-650 を用いて行った. 温度制御には日本分光社製 ETCS-761 ペルチェ式恒温装置を用いた. 測定は光路長 1 cm の石英セル中, 温度勾配 1°C min^{-1} (4-60°C), 波長 600 nm で行った. 蛍光スペクトルは日本分光社製 FP-8300 及び FP-6100 を用いて 1 cm 角の石英セル中で測定した. 温度制御には日本分光社製 ETC-815 ペルチェ式恒温装置を用いた. 相対量子収率測定では日本分光社製副標準ハロゲン光源を用いてスペクトル補正を行った. 基準試薬にはフルオレセイン (エタノール溶液) を用いた. 測定は 25°C, 励起バンド幅 5 nm, 蛍光バンド幅 10 nm, 励起波長 365 または 472 nm の条件で行った. 位相差顕微鏡観察はオリンパス株式会社製倒立型培養顕微鏡 CKX41 を用いて行った. 照明系にはオリンパス株式会社製ハロゲンランプ U-LS30-3, プリセンタースライダーには IX2-SLP, 接眼レンズには WHB10×, 対物レンズには LCAchN4×PhP を用い, 倍率 40 倍で観察した. CCD カメラには Q-imaging 社製 QIClick-R-F-CLR-12, 接続アダプターにはオリンパス株式会社製 U-CMAD3 および U-TV1X-2 を用いた. サンプルは蛍光スペクトル測

定と同様のものを約 0.1 μL 滴下したものをを用いた。蛍光顕微鏡観察はオリンパス株式会社製倒立型培養顕微鏡 CKX41 を用いて行った。照明系にはオリンパス株式会社製 U-RFLT50, 接眼レンズには WHB10 \times , 対物レンズには LCAch N 4 \times PhP を用い, 倍率 40 倍で観察した。CCD カメラには Q-imaging 社製 QIClick-R-F-CLR-12, 接続アダプターにはオリンパス株式会社製 U-CMAD3 および U-TV1X-2 を用いた。サンプルは蛍光スペクトル測定と同様のものを約 0.1 μL 滴下したものをを用いた。原子間力顕微鏡 (AFM) 観察は島津製作所製 SPM-9700 を用いて行った。探針種は MPP-11100 (曲率半径: <12 nm) を用い, タッピングモードでスキャン速度 1.0 Hz で測定を行った。サンプルは蛍光スペクトル測定で用いたものをマイカ基板上に滴下し, 4 $^{\circ}\text{C}$ で乾燥させて調製した。透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察は日本電子製 JEM-2100F を用い, 加速電圧 200 kV で行った。サンプルは蛍光スペクトル測定で用いたものをエラスチックカーボン支持膜 (TEM グリッド) 上に滴下し, 4 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間静置した後, ろ紙を用いて過剰な溶液を除去することで調製した。なお, サンプルは 1wt% リンタングステン酸水溶液により染色した。走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察は日本電子製 JSM-7500FD を用い, 加速電圧 0.5 kV で行った。サンプルは AFM 観察を行ったものに厚さ 10 nm の白金スパッタ処理を施すことで調製した。動的光散乱 (DLS) 測定は大塚電子製 DLS 7000 を用いて行った。光源には He-Ne レーザー (632.8 nm) を用い, 測定角は 90 $^{\circ}$ とした。サンプルは蛍光スペクトル測定で用いたものを使用した。相関関数の解析は付属のプログラムを用いて非負拘束最小自乗法 (NNLS) から行った。ブロックポリマー中の ANP 部位の光切断は, THF 中 (1 mg mL $^{-1}$) で 4 W のハンディランプを用いて UV 光 (365 nm) を 10 cm の距離から 1 時間照射することで行った。

4-3. 結果および考察

4-3-1. GFP の高次構造を模倣したブロック型ハイブリッドの設計

GFP はリアルタイムかつ in situ で検出でき、他のタンパク質との融合タンパク質としても機能することから、細胞内のシグナル伝達などに関与する細胞内局在を明らかにするレポーター分子として細胞生物学、発生生物学、神経細胞生物学などで広く利用されている。GFP はコア配列 FSYGV を β -バレル構造内に閉じ込めることにより緑色蛍光を発する。これは、緒言でも述べたように FSYGV ブロックが疎水性環境下に置かれることで分子内環化反応が進行するためである (Figure 4-1b)。ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドを用いて GFP 様の単分子フォールディングと蛍光発現を実現するために、本研究では蛍光種形成に直接的に関与する FSYGV ペプチドの両末端を両親媒性ビニルポリマーで修飾したブロック型ハイブリッドを新規に設計した (Figure 4-2)。種々のラジカル重合法をモノマーの重合性を考慮しながら適切に採用することで、親水性および疎水性ブロックには様々なビニルポリマーを選択することが可能となる。本章では水中での蛍光発光発現ならびにその分子構造の最適化を目指して、親水-疎水ブロックの組み合わせを様々に変化させたブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合成戦略を確立した (Table 4-1)。

4-3-2. PVP_n - b - PSt_m - b -FSYGV- b - PSt_m - b - PVP_n の合成とその蛍光発光特性

GFP は β -バレル構造により、タンパク質内部の高い疎水性環境を維持している。また、タンパク質表面には親水性アミノ酸残基が位置し、中性付近で高い蛍光強度と水溶性を示す。そこで、蛍光種を形成し得る FSYGV ペプチドをコアブロックとし、疎水性ブロックに疎水性度の高い PSt、親水性ブロックにノニオン性の人工高分子である PVP を用いたブロックポリマー PVP_n - b - PSt_m - b -FSYGV- b - PSt_m - b - PVP_n (**1**) を新規に設計した (Figure 4-3)。水中で PSt ブロックが FSYGV ペプチド周辺に疎水的環境を提供し、PVP が表面の親水性を付与することで GFP 様の蛍光発現を期待した。

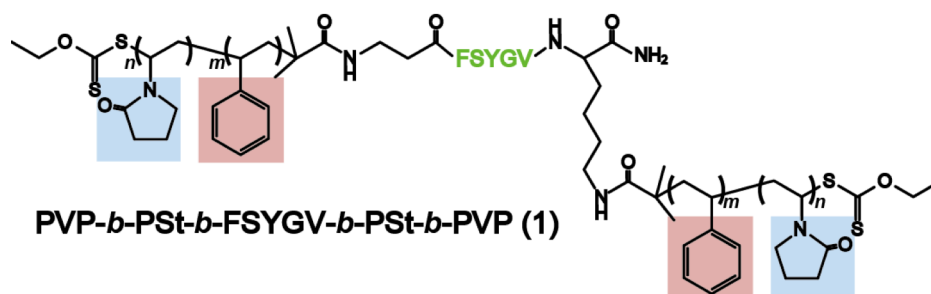


Figure 4-3. Chemical structure of **1**.

ペプチドとビニルポリマーのハイブリッド化は、SPPS 法と LRP 法を組み合わせること
で可能となる。特に RAFT 重合はハイブリッド化と相性が良く、比較的良好に用いられる。
例えば, Cate らは末端に連鎖移動部位を有する DFGDG 配列のペプチドを SPPS により合成
し、マクロ連鎖移動剤 (CTA) とすることで、RAFT 重合によりハイブリッド化に成功して
いる¹⁰⁾。一方で ATRP は、汎用の触媒である銅がペプチドと配位しやすいため、ペプチド
の配列次第で重合が進行しない場合がある。しかし、Mei らは末端に ATRP 開始点を有する
GRGDS 配列のペプチドを SPPS により合成し、固相樹脂上からメタクリル酸 2-ヒドロキシ
エチルを重合させることで、制御されたポリマー鎖を持つハイブリッドが得られることを
報告している¹¹⁾。しかしながら、ATRP では非共役モノマーの制御された重合が困難であり、
RAFT 重合においても連鎖移動反応を用いることから、反応性の大きく異なる共役モノマー
と非共役モノマーのブロック共重合を行うことが困難である。この問題を解決するために、
ATRP と RAFT 重合を組み合わせる方法が提案されている。ATRP を用いた場合、生成した
ポリマー末端には良好な脱離基であるハロゲン原子を有するため、求核置換することが容
易である。Hussain らは、ATRP を用いて St を重合した後にキサントゲン酸 O-エチルカリ
ウム (POEX) を用いて末端ハロゲン原子をザンテート基に置換することでマクロ CTA と
し、RAFT 重合により NVP とのブロック化に成功している¹²⁾。しかしながら、連鎖移動定
数の小さいザンテート基を用いた固相樹脂上からの RAFT 重合は進行しづらいことが予想
される。ザンテート基は光重合開始剤として用いることもでき、さらに重合はリビング的
に進行することが報告されている。以上のことから、ATRP とザンテート基を用いた光重合
を組み合わせることで、PSt と PVP からなるブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブ
リッドの合成が固相樹脂上で行うことが可能であると考えた。

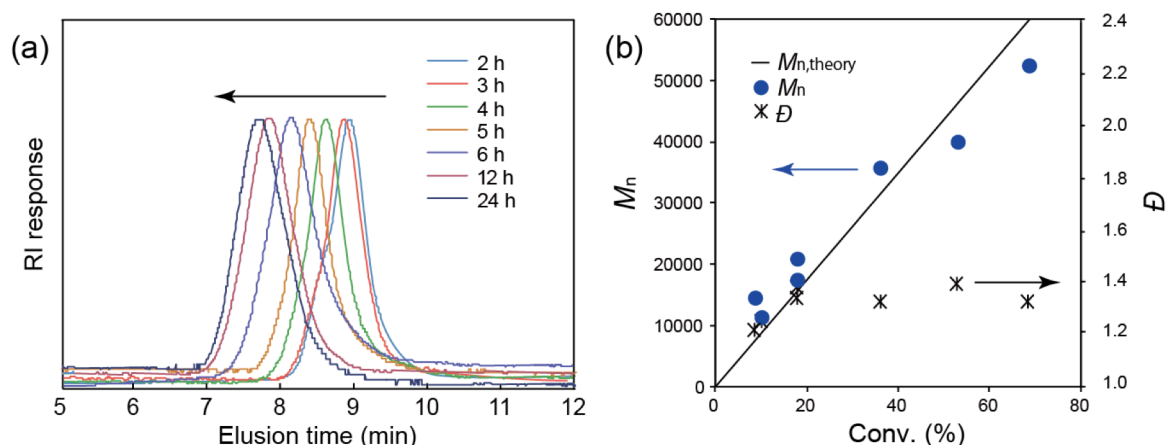


Figure 4-4. (a) SEC charts (THF, 40°C) of PSt_m-b-FSYGV-b-PSt_m at various polymerization times. (b) Plots of M_n and D as a function of conversion. Polymerization of St was carried out by **PCI Resin** in toluene at 110°C. The M_n and D were estimated from ¹H NMR and SEC measurements, respectively. The theoretical line was calculated from conversion.

両末端にATRP開始点を有するFSYGVペプチド担持樹脂 (**PCI Resin**) は、SPPSにより目的の配列を樹脂上に合成することで得た。構造確認は一部を樹脂上から切り出したものを用いてMALDI-TOF MS, FTIRおよび ^1H NMRスペクトル測定により行った。それぞれ理論値に見合う分子量および化学シフト値が観測されたことから、純度よくペプチドを樹脂上に合成できたといえる。次に、**PCI Resin**をATRP開始剤としたStの重合をCu(I)Br/PMDETA錯体を触媒に用いてトルエン中で行い、**(Br-PSt_m)₂ PCI Resin**を合成した (重合時間: 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24時間, 重合温度: 110°C)。得られたポリマーの M_n は ^1H NMRスペクトル, D はSEC測定により算出した。各重合時間で得られたポリマーのSEC測定を行ったところ、全てのピークは単峰であり、かつ重合時間の増加に伴い高分子量側にシフトしていることがわかる (Figure 4-4a)。モノマー転化率に対して M_n をプロットしたところ分子量は線形的に増加し、比較的分散度が小さい ($D < 1.3$) ことから、重合はリビング的に進行したといえる (Figure 4-4b)。以降の実験は重合時間2時間の **(Br-PSt₆₂)₂ PCI Resin**を用いた。次に、**(Br-PSt₆₂)₂ PCI Resin**をブタン-2-オン中でPOEXと4日間反応させることで末端のBr原子をザンテート基に置換した **(X-PSt₆₂)₂ PCI Resin**を得た。樹脂上での連鎖移動反応は不利であるため、**(X-PSt₆₂)₂ PCI Resin**を光重合開始剤としてNVPの光重合を低圧水銀灯を用いてUV光 (254 nm) を35°Cで16時間照射することで行った。重合後、樹脂をTFA/ジクロロメタン/TIS (v/v=8/1.5/0.5) で処理することで目的の**1**を得た (Figure 4-5a)。SEC測定よりNVPの重合後にピークが高分子量側シフトしたことからブロック化の進行を確認した (Figure 4-5b)。PVPの数平均重合度 (n) は ^1H NMRスペクトル測定より507であることがわかった。

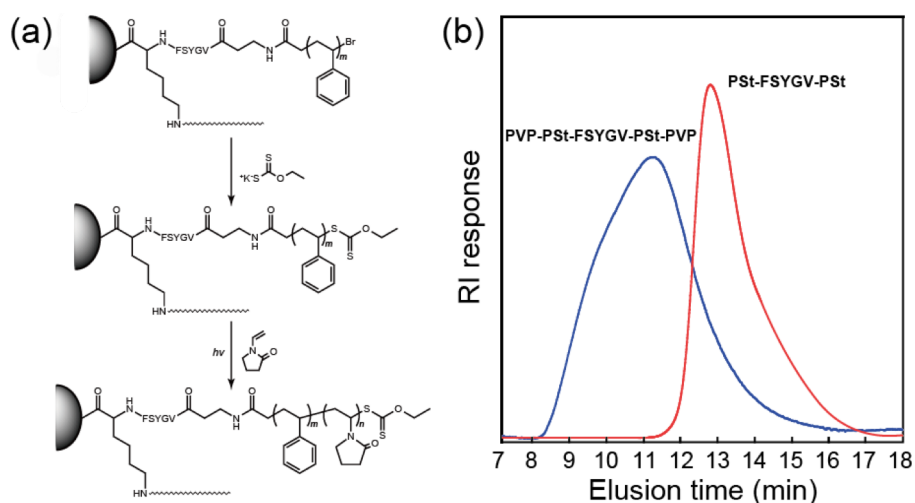


Figure 4-5. (a) Photopolymerization of NVP from resin surface. (b) SEC charts of PSt₆₂-b-FSYGV-b-PSt₆₂ obtained before and after polymerization of NVP. Eluent: DMF with LiBr.

1 は水に対して不溶であったが、 $\text{PSt}_m\text{-}b\text{-FSYGV-}b\text{-PSt}_m$ が溶解しない高極性溶媒である DMSO には溶解した。そこで、**1** の DMSO 中における蛍光発光特性を蛍光スペクトル測定により検討した。Figure 4-6a はその結果である。比較としてビニルポリマーブロックをもたない **PCI** の DMSO 中における蛍光スペクトルも併せて示した。ポリマー鎖を持たない **PCI** は全く蛍光発光を示さないのに対し、**1** は 365 nm で励起することで 450 nm の青緑色蛍光を示すことがわかった。ハンディランプを用いて波長 365 nm の UV 光を照射したところ、**1** は肉眼でも蛍光発光が確認できた (Figure 4-6b)。緑色蛍光を示さなかったのは、DMSO 中であるため疎水性ブロックの凝集とフォールディングが効果的に働かず FSYGV ペプチドが形成した蛍光種の共役長が短かったため、もしくは有機溶媒中であるために蛍光がブルーシフトしたためであると考えられる。しかしながら、**PCI** と比べて明らかに蛍光発光の発現が確認されたことから、ブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッド戦略が GFP 様の高分子フォールディングと蛍光機能発現に有効であることが示唆された。

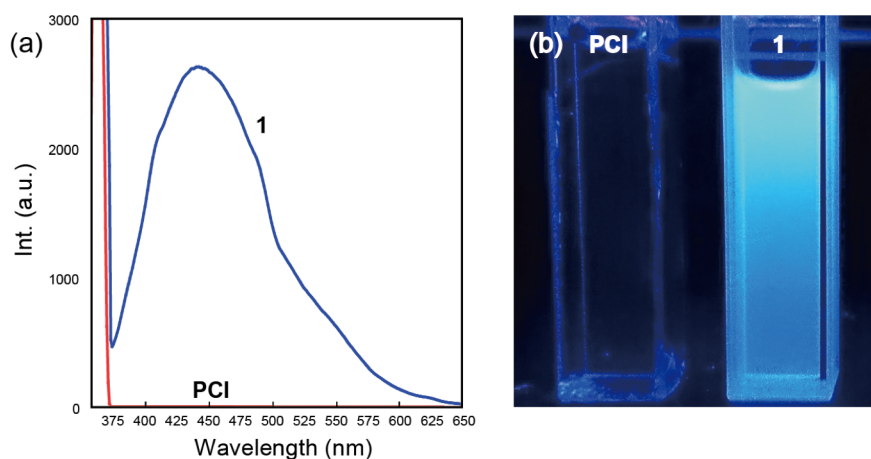


Figure 4-6. Fluorescence property of **1** and **PCI** in DMSO at 25°C. (a) Fluorescence spectra. (b) Photograph under UV (365 nm) irradiation. [peptide] = 100 μM , λ_{ex} = 365 nm.

4-3-3. $\text{PAA}_n\text{-}b\text{-PNIPAM}_m\text{-}b\text{-FSYGV-}b\text{-PNIPAM}_m\text{-}b\text{-PAA}_n$ の設計

4-3-3-1. $\text{PAA}_n\text{-}b\text{-PNIPAM}_m\text{-}b\text{-FSYGV-}b\text{-PNIPAM}_m\text{-}b\text{-PAA}_n$ の設計と合成

前項の分子設計では、目的のブロックポリマーの水への溶解性が低いことが課題であった。そこで、水への溶解性の向上を目指し、疎水性・親水性ブロックともに水溶性を高めた分子 $\text{PAA}_n\text{-}b\text{-PNIPAM}_m\text{-}b\text{-FSYGV-}b\text{-PNIPAM}_m\text{-}b\text{-PAA}_n$ (**2_n**) を新規に設計した (Figure 4-7)。疎水性ブロックに採用した PNIPAM は下限臨界溶液温度 (LCST) を 32°C に有する。つまり、PNIPAM ブロックは 32°C 以下では親水的であり、それ以上の温度で疎水性ブロックとして機能することになる。言い換えると、親水性の向上に加え、温度に応答した蛍光発光の発現が可能となろう。一方、親水性ブロックに採用したポリアクリル酸 (PAA) はアニオン性

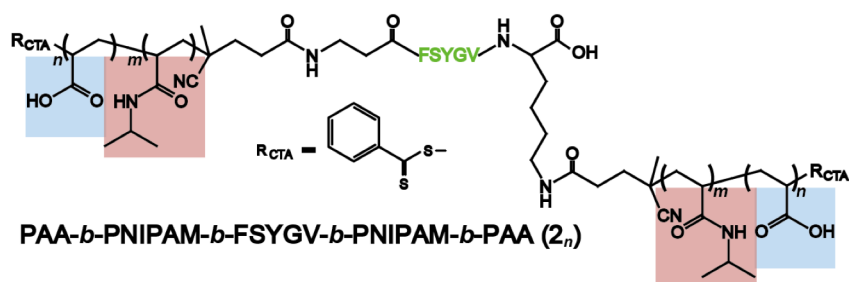


Figure 4-7. Chemical structure of 2_n .

の高分子であることから、一般にノニオン性の高分子である PVP と比較して水溶性が高い。また、PVP は非共役モノマーである NVP の重合が必要であるが、PAA は共役モノマーであるアクリル酸から得られる。すなわち、前分子で問題となった共役-非共役モノマーのブロック共重合ではなく、共役-共役モノマーのブロック共重合となるため、単一の重合方法のみで合成が可能なメリットもある。

共役モノマー同士のブロック共重合は、前述のように単一のリビングラジカル重合法を用いて合成が可能である。しかしながら、ATRP は一般にハロゲン化銅とアミン系の配位子による錯体を触媒として重合の制御を行っている¹³⁾。そのため、ペプチドをマクロ開始剤とした ATRP は、ペプチドのアミド結合によるビウレット反応が銅触媒を失活させる可能性があるため、液相では制御された重合を行うことが困難になる場合がある。ゆえに、触媒を失活させないようにペプチドの自由度を低下させるために固相樹脂上から重合を行う必要があった。また、反応を均一に進行させるために樹脂の膨潤が必要不可欠であるが、固相樹脂は一般に疎水性ポリマーの架橋樹脂であるため、樹脂を収縮させるような極性溶媒を重合溶媒として選択することは難しい。そこで、様々な溶媒を使用でき、かつ液相中でペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合成が可能である RAFT 重合法に着目し、両末端に連鎖移動部位を有する FSYGV コアブロック (PCCTA) を新規に設計した。また、重合が両末端から定量的に進行しているかどうかを確認するためのモデル分子として、365 nm の UV 光で速やかに光分解を起こす ANP をリンカーとして導入した FSYGV ペプチド (PCCTA_{ANP}) も併せて設計した。

両末端に連鎖移動部位を有する PCCTA および PCCTA_{ANP} は SPPS 法により合成した。構造確認は ¹H NMR スペクトル測定から行い、理論値に見合うピークが観測されたことから純度よく合成できたと判断した。次に、PCCTA を連鎖移動剤に用いた RAFT 重合法による NIPAM の重合がリビング的に進行するかどうかを確認するため、NIPAM の重合を CD₃OD 中に行い、¹H NMR スペクトルを用いて反応を追跡した。(重合時間: 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 時間, 重合温度: 60°C)。得られたポリマーの M_n は ¹H NMR スペクトル、 D は SEC 測定により算出した。各重合時間で得られたポリマーの SEC 測定を行ったところ、全てのピー

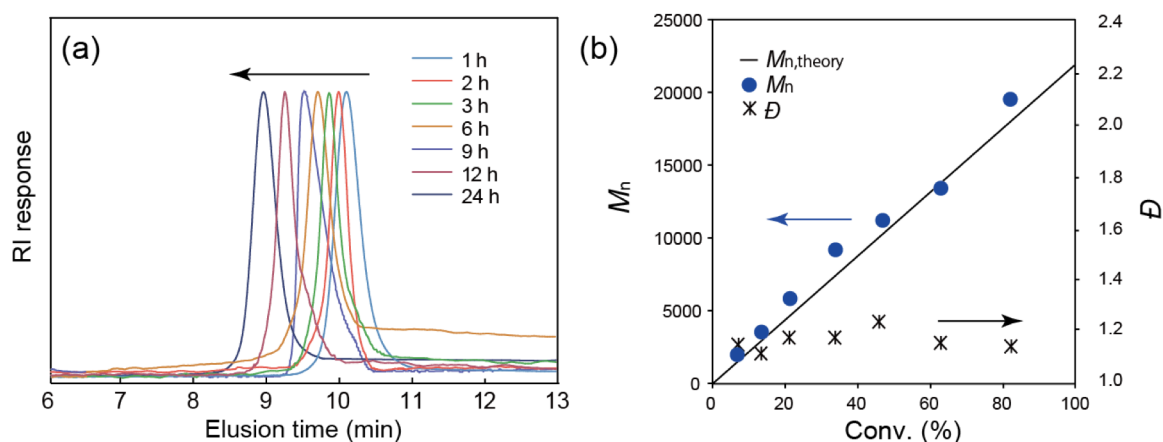


Figure 4-8. (a) SEC charts (THF, 40°C) of $\text{PNIPAM}_m\text{-}b\text{-FSYGV-}b\text{-PNIPAM}_m$ at various polymerization times. (b) Plots of M_n and \bar{D} as a function of conversion. Polymerization of NIPAM was carried out by PCCTA in MeOH at 60°C. The M_n and \bar{D} were estimated from ^1H NMR and SEC measurements, respectively. The theoretical line was calculated from conversion.

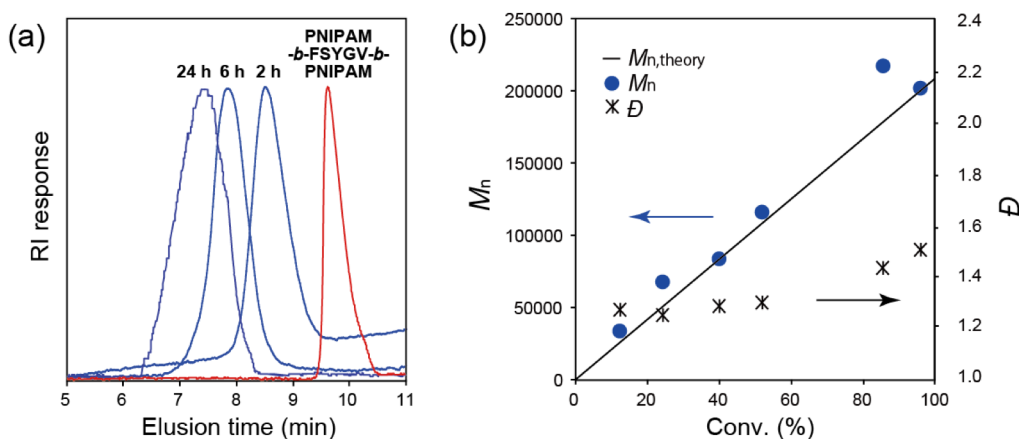


Figure 4-9. (a) SEC charts (THF, 40°C) of $\text{PtBuAn}_n\text{-}b\text{-PNIPAM}_m\text{-}b\text{-FSYGV-}b\text{-PNIPAM}_m\text{-}b\text{-PtBuAn}_n$ at various polymerization times. (b) Plots of M_n and \bar{D} as a function of conversion. Polymerization of *t*BuA was carried out by $\text{PNIPAM}_m\text{-}b\text{-FSYGV-}b\text{-PNIPAM}_m$ in acetone at 60°C. The M_n and \bar{D} were estimated from ^1H NMR and SEC measurements, respectively. The theoretical line was calculated from conversion.

クは単峰であり、かつ重合時間の増加に伴い高分子量側にシフトしていることがわかる (Figure 4-8a). モノマー転化率に対して M_n をプロットしたところ分子量は線形的に増加し、比較的分散度が小さい ($\bar{D} < 1.2$) ことから、重合はリビング的に進行したといえる (Figure 4-8b). 以降のブロック化は $m=30$ の $\text{PNIPAM}_{30}\text{-}b\text{-FSYGV-}b\text{-PNIPAM}_{30}$ を用いた.

次に、 $\text{PNIPAM}_{30}\text{-}b\text{-FSYGV-}b\text{-PNIPAM}_{30}$ をマクロ連鎖移動剤に用いてアセトン中で *t*BuA の重合を行い (重合時間: 2, 6, 24 時間, 重合温度: 60°C), 目的の $2'_n$ を得た. *PtBuA* ブロックの重合度は ^1H NMR スペクトルより $n=98, 401, 794$, であった. モノマー転化率に対

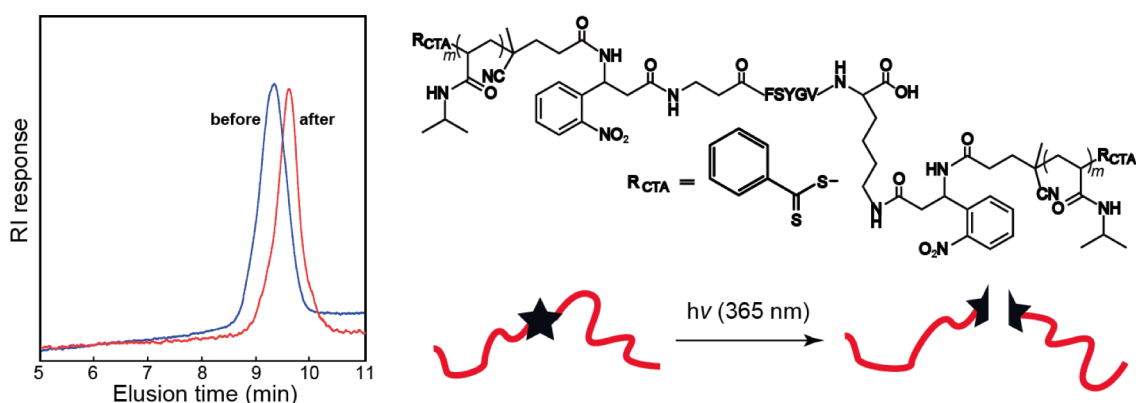


Figure 4-10. SEC charts of PNIPAM_m-*b*-ANP-FSYGV-ANP-*b*-PNIPAM_m obtained before and after UV (365 nm) irradiation for 1 h and schematic illustration for photo-cleavage of ANP moieties.

して M_n をプロットしたところ分子量は線形的に増加しことから、重合はリビング的に進行したといえる (Figure 4-9a). また、SEC 測定より *t*BuA の重合後にピークが高分子量側シフトしたことからブロック化の進行を確認した (Figure 4-9b).

次に、これらの重合反応が両末端から定量的に進行しているかどうかを検討するため、PCCTA_{ANP} を連鎖移動剤に用いて同様の重合を行った。ただし、PCCTA_{ANP} は MeOH 単体に不溶であったため、重合は MeOH/DMF (v/v=7/3) 中 60°C で 15 時間行った。得られたポリマーに UV 光 (365 nm) を THF 中で 1 時間照射した。Figure 4-10 に UV 照射前後における SEC の測定結果を示す。UV 光照射前は $M_{n,SEC}=14000$, $D=1.23$ であり、照射後には $M_{n,SEC}=8200$, $D=1.16$ と分子量が約半分になり多分散度も低いままであるから、両末端から定量的にリビング重合が進行していることを確認した。続いて、これをマクロ連鎖移動剤として、アセトン中で *t*BuA の重合を行い (重合時間: 2, 6, 24 時間, 重合温度: 60°C), 目的の **2'**_{*n*, ANP} を得た。重合度は ¹H NMR スペクトル測定より $n=132, 503$ および 775 であることがわかった。このポリマー同様に UV 光 (365 nm) により分解した。Figure 4-11 に UV 照射前後における SEC の測定結果を示す。UV 光照射前は **2'**_{132, ANP}: $M_{n,SEC}=44000$, $D=1.24$, **2'**_{503, ANP}: $M_{n,SEC}=130000$, $D=1.26$, **2'**_{775, ANP}: $M_{n,SEC}=227000$, $D=1.39$ あり、照射後には **2'**_{132, ANP}: $M_{n,SEC}=26000$, $D=1.19$, **2'**_{503, ANP}: $M_{n,SEC}=78000$, $D=1.21$, **2'**_{775, ANP}: $M_{n,SEC}=97000$, $D=1.29$ といずれのポリマーも分子量が約半分になり多分散度も低いままであるから、どの重合時間においても両末端から定量的にリビング重合が進行していることがわかった。

次に、先に得られた **2'**_{*n*} を TFA/ジエチルエーテル/TIS (v/v=10/9/1) を用いて一晚処理し、*t*Bu 基の脱保護を行うことで目的の **2**_{*n*} を得た。¹H NMR スペクトルより、*t*Bu 基に由来する 1.5 ppm のピークが完全に消失していることから脱保護の完了を確認した。

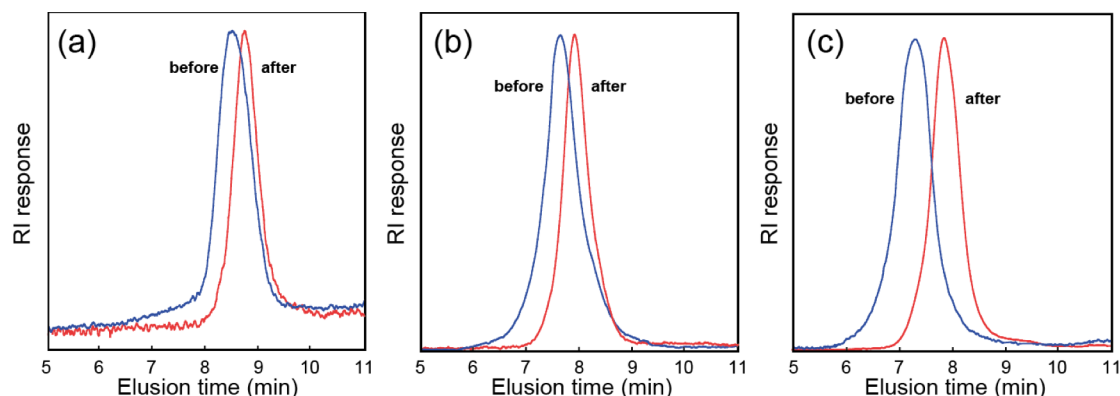


Figure 4-11. SEC charts of $2'_{n,ANP}$ obtained before and after UV irradiation. Polymerization time; (a) 2 h, (b) 6 h and (c) 24 h.

4-3-3-2. $PAA_n-b-PNIPAM_m-b-FSYGV-b-PNIPAM_m-b-PAA_n$ の蛍光発光特性

PAA ブロックの鎖長が最も大きい 2_{794} を用いて蛍光発光特性の検討を行った。なお、サンプルは水 (pH 12) に溶解させ、 $[peptide]=100 \mu M$ とした。Figure 4-12 に $4^\circ C$ または $60^\circ C$ で一晩インキュベートした後、それぞれ $4^\circ C$ で測定した蛍光スペクトルを示す。

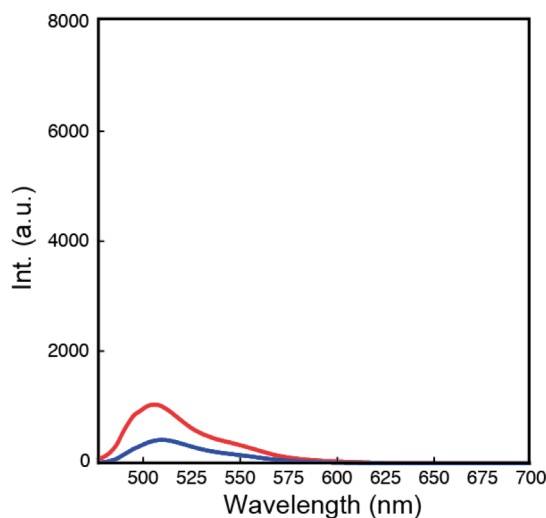


Figure 4-12. Fluorescence spectra of 2_{794} in water (pH 12) at $4^\circ C$. Blue: incubated at $4^\circ C$ and Red: incubated at $60^\circ C$ for overnight before FL measurements, respectively. $[peptide] = 100 \mu M$. $\lambda_{ex} = 472 \text{ nm}$.

両温度ともに 472 nm で励起させることで 515 nm に天然の GFP に近い緑色蛍光の発光が見られた。さらに興味深いことに、 $4^\circ C$ でインキュベートしたときと比較して、 $60^\circ C$ でインキュベートしたことで、蛍光強度の増加が見られた。これは PNIPAM ブロックが LCST 温度 ($32^\circ C$) 以上になることで脱水和が進行し、凝集することで FSYGV コアブロックに摂動

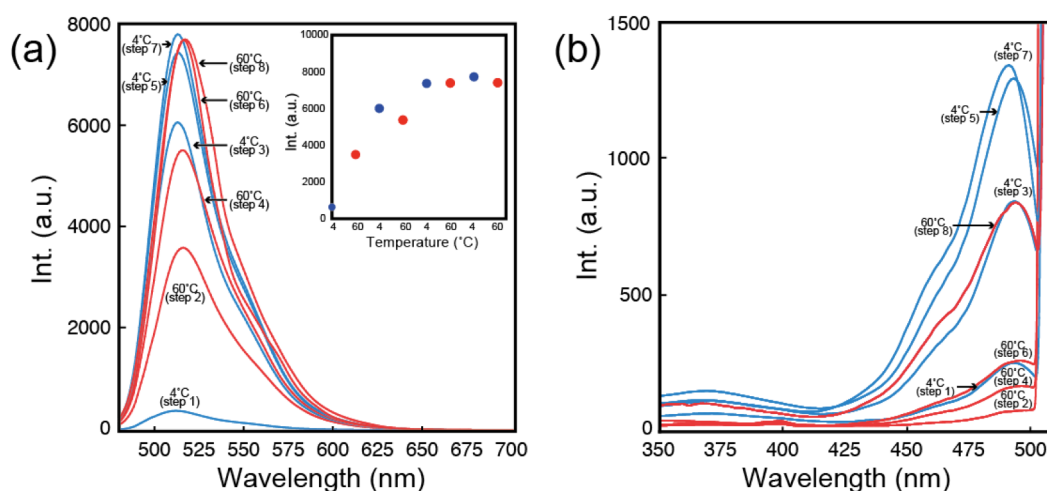


Figure 4-13. (a) Fluorescence and (b) excitation spectral changes of **2794** in water (pH 12) by thermal cycle (4-60°C). Inset shows intensity changes at 515 nm by thermal cycle. Blue: 4°C. Red: 60°C. [peptide] = 100 μM. λ_{ex} = 472 nm. λ_{em} = 515 nm.

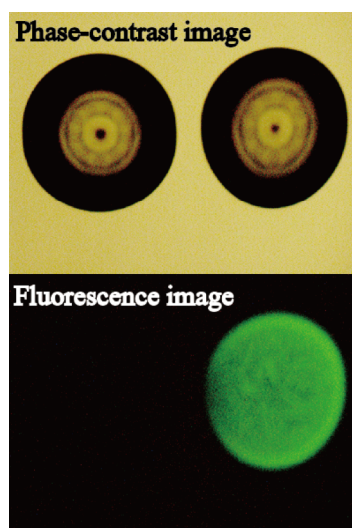


Figure 4-14. Phase-contrast (top) and fluorescence (bottom) microscope observation of **2794** aqueous droplet at RT. Left: before thermal cycle. Right: after thermal cycle. [peptide] = 100 μM. λ_{ex} = 488 nm. Droplet = ca. 0.1 μL.

歪みを与え、立体規制により分子内環化反応による蛍光種形成が進行したためであると考えられる。ポリマーの親水-疎水スイッチングによる疎水性場の提供とフォールディングにより、凝集-緩和を繰り返すことで更に蛍光種の形成を促進できるのではないかと考え、4°Cに冷却後60°Cに加熱しその後4°Cに冷却するという冷却-加熱サイクルを行った。各温度に到達してから1時間インキュベートした後に測定した蛍光スペクトルおよび励起スペクトルをFigure 4-13に示す。驚くべきことに、サイクルを経る毎に蛍光種の発生を示す472 nm

の吸収の増大および蛍光強度の増大が観察され、最終的に飽和する挙動が見られた。また、Figure 4-14 に冷却-加熱サイクル前後でのポリマー水溶液の液滴の位相差顕微鏡写真とその蛍光顕微鏡写真を示した。冷却-加熱サイクル前は蛍光発光が見られず、サイクル後にははっきり緑色蛍光の発光が見られた。このことは、PNIPAM ブロックの加熱による凝集が分子内環化反応に必要なフォールディング形態と疎水性場を提供し、かつそれが確率的に起こることを示唆している。冷却-加熱サイクル後を経ることで蛍光発光を示すことが明らかとなった。そこで、冷却-加熱サイクル後の 4°C における蛍光量子収率の測定を行った。量子収率には蛍光発光による光子を直接的に測定して求める絶対量子収率と量子収率が既知の分子と比較して求める相対量子収率がある。本研究では、測定の簡便さから相対法を用いた。標準試料にはフルオレセインエタノール溶液を用いた。Figure 4-15 に 4°C におけるこれらの吸収スペクトルと蛍光スペクトルを示す。

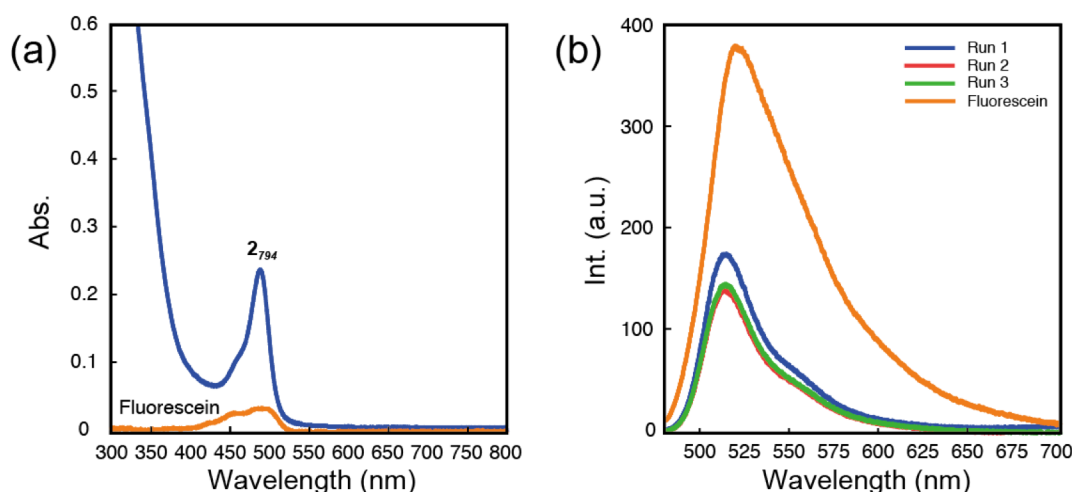


Figure 4-15. (a) Absorption and (b) fluorescence spectra of 2_{794} in water (pH12) and fluorescein in EtOH at 4°C. [peptide] = 100 μ M. [fluorescein] = 20 μ M. λ_{ex} = 472 nm.

未知試料の量子収率 Φ_{obs} は以下の式で表される。

$$\Phi_{\text{obs}} = \Phi_{\text{st}} \cdot \left(\frac{A_{\text{st}}}{A_{\text{obs}}} \right) \cdot \left(\frac{F_{\text{obs}}}{F_{\text{st}}} \right) \cdot \left(\frac{n_{\text{obs}}^2}{n_{\text{st}}^2} \right) \cdot \left(\frac{D_{\text{obs}}}{D_{\text{st}}} \right)$$

Φ : Quantum Yield, A : Absorbance of Excitation Wavelength, F : Area of Fluorescence Spectrum, n : Reflective Index of Solvent, D : Dilution Rate.

また、蛍光スペクトル面積 F は

$$F = \int_{\lambda_0}^{\lambda_n} E_q(\lambda) d\lambda$$

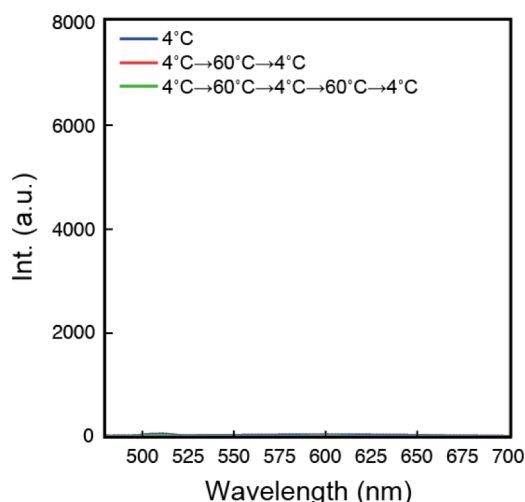


Figure 4-16. Fluorescence spectral changes of PNIPAM₃₀-*b*-FSYGV-*b*-PNIPAM₃₀ in water (pH 12) by thermal cycle (4-60°C). [peptide] = 100 μM. λ_{ex} = 472 nm.

で表される.

ここで, $E_q(\lambda)$ は,

$$E_q(\lambda) = \lambda E(\lambda)$$

で表され, 測定で得られた蛍光スペクトルは $E(\lambda)$ で表現されている.

そのため, 相対量子収率の算出に用いた関数は測定より得られたものを λ 倍したのを用い, スペクトル面積はそれを台形法により積分した値を用いた. 系を変えて 3 回測定を行った結果, 得られた相対量子収率の平均は $\Phi=7.0\%$ となった. これは野生型 GFP の蛍光量子収率の約 10 分の 1 に相当する. 次に, この挙動が PAA ブロックをもたないブロックポリマーでも示すのではないかと考え, PNIPAM₃₀-*b*-FSYGV-*b*-PNIPAM₃₀ の冷却-加熱サイクル (4-60°C) を同条件で行った. PAA ブロックフリーのブロックポリマーでは, LCST 以上において凝集により白濁したため, 4°C でのみで蛍光スペクトルの測定を行った (Figure 4-16). 興味深いことに, PAA ブロックフリーのブロックポリマーではどの段階においても全く蛍光発光を示さなかった. この現象をより詳細に検討するため, **2₇₉₄** と PNIPAM₃₀-*b*-FSYGV-*b*-PNIPAM₃₀ 両サンプルを用いて pH 12 の水中における 600 nm の濁度変化を測定した. 測定結果を Figure 4-17 に示す. 先述のように PAA ブロックフリーの PNIPAM₃₀-*b*-FSYGV-*b*-PNIPAM₃₀ では 30°C 付近で急激な濁度の増加が見られ PNIPAM ブロックに由来する LCST 挙動を示したのに対し, **2₇₉₄** ではそのような濁度変化を全く示さなかった. これは PAA ブロック間の静電反発により, 分子間での凝集が抑制されたためと考えられる. これらのことを考慮すると, 蛍光種を形成するための条件は分子が溶液中に均一系に存在しながら, FSYGV ペプチドの分子内環化反応に必要な立体規制と疎水性場の提供を疎水性ブロックが果たす必要があると考えられる.

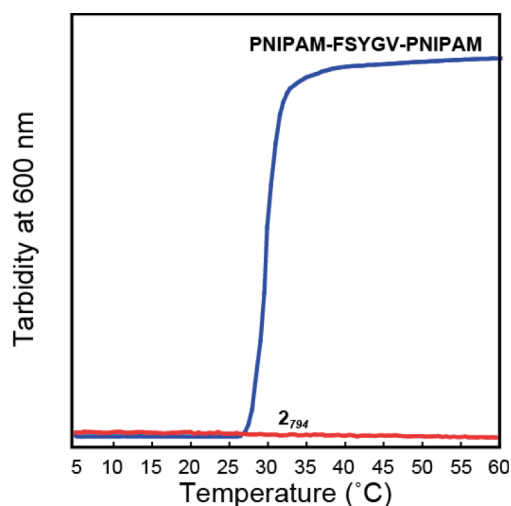


Figure 4-17. Turbidity measurements of PNIPAM₃₀-*b*-FSYGV-*b*-PNIPAM₃₀ and **2794** in water (pH 12). [peptide] = 100 μ M.

4-3-3-3. 蛍光発光に及ぼす PAA ブロックの鎖長および pH の影響

前項より，親水性の PAA ブロックの必要性，すなわち両親媒性ブロック構造の重要性が明らかとなった．そこで，PAA ブロックの鎖長が蛍光発光に及ぼす影響を検討するため，PPA 鎖長が半分の **2401** および 8 分の 1 の **298** を用いて同様の実験を行った．Figure 4-18 は冷却-加熱サイクルにおけるこれらの蛍光スペクトルと励起スペクトルの変化を示したものである．なお，600 nm の濁度変化測定より **2401** および **298** ともに 60°C においても濁度の増加は確認されず，均一系で存在することを確認した．温度サイクルを経る毎に励起光および蛍光強度の増加がみられた．また，4°C におけるサイクル後の蛍光強度は PAA ブロックの鎖長が長いほど若干高いことがわかった．また，Figure 4-19 にこれらの冷却-加熱サイクル前後でのポリマー液滴の位相差顕微鏡写真および蛍光顕微鏡写真であり，どちらのサンプルにおいてもサイクル前では蛍光発光が見られず，サイクル後には緑色蛍光の発光が見られた．そこで，**2794** の場合と同様にこれらの冷却-加熱サイクル後の 4°C における蛍光量子収率の測定を行った．Figure 4-20a にこれらの吸収スペクトル，b に **2401** の，c に **298** の蛍光スペクトルをフルオレセインのスペクトルと共にそれぞれ示した．先と同様に系を変えて 3 回測定を行った結果，得られた相対量子収率の平均は **2401**: $\Phi=5.6\%$ ，**298**: $\Phi=4.2\%$ となった．このことから，PAA ブロックが長いほど，わずかであるが量子収率が高くなることがわかった．これは，PAA ブロックが長いほど静電反発が大きく，PNIPAM ブロックに由来する分子間での疎水性相互作用を抑制しているため，蛍光種間距離が一定に保たれ消光が抑制されたためと考えられる．

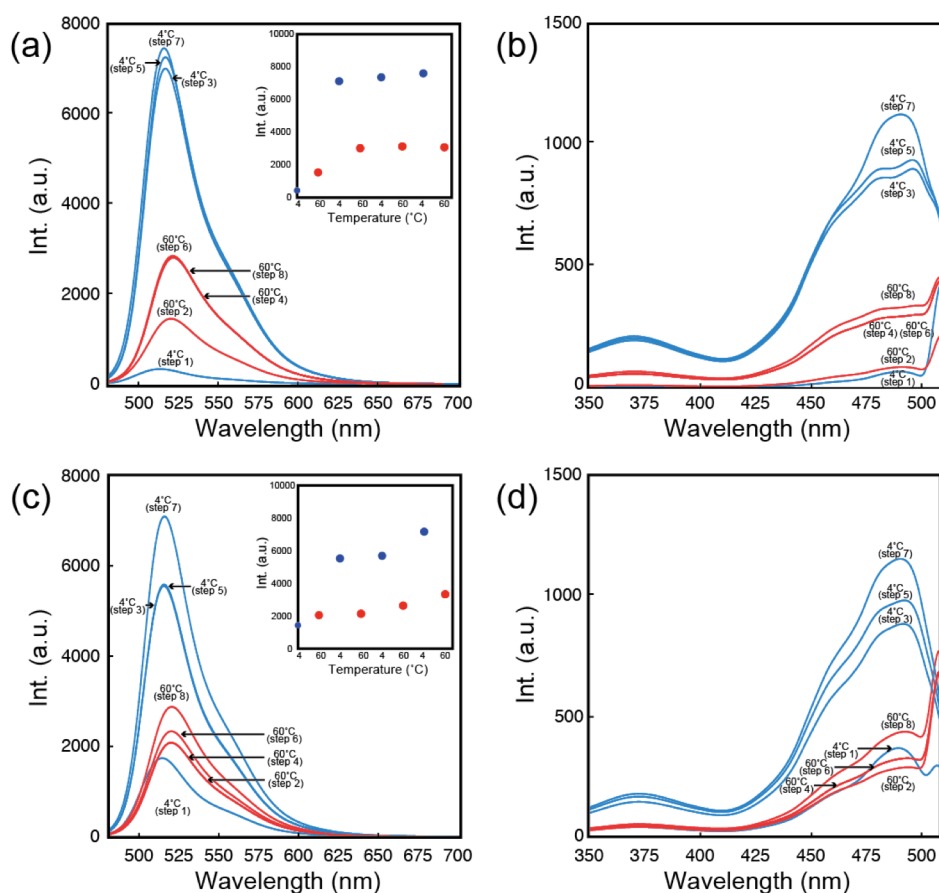


Figure 4-18. Fluorescence and excitation spectral changes of **2₄₀₁** and **2₉₈** in water (pH 12) by thermal cycle (4-60°C). (a) Fluorescence and (b) excitation spectra of **2₄₀₁**. (c) Fluorescence and (d) excitation spectra of **2₉₈**. Inset shows intensity changes at 515 nm by thermal cycle. Blue: 4°C. Red: 60°C. [peptide] = 100 μ M. λ_{ex} = 472 nm. λ_{em} = 515 nm.

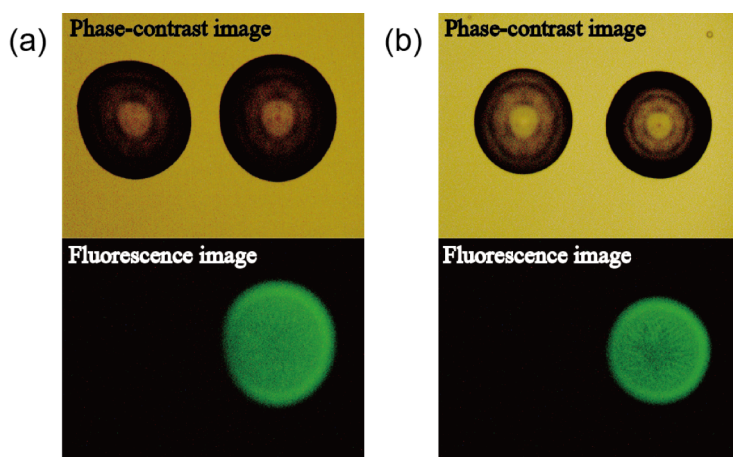


Figure 4-19. Phase-contrast and fluorescence microscope observation of (a) **2₄₀₁** and (b) **2₉₈** aqueous droplets at RT. Left: before thermal cycle and Right: after thermal cycle. [peptide] = 100 μ M. λ_{ex} = 488 nm. Droplet = ca. 0.1 μ L.

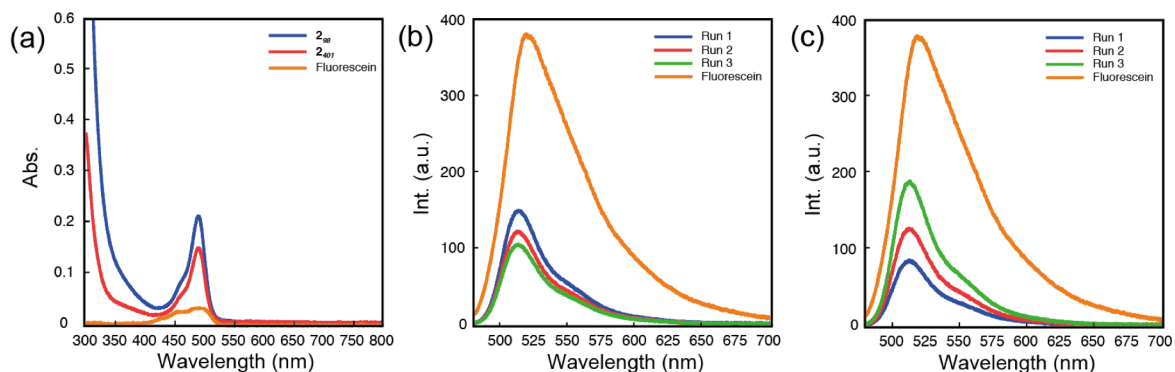


Figure 4-20. (a) Absorption spectra of **2₄₀₁**, **2₉₈** in water (pH 12) at 4°C and fluorescein in EtOH at 4°C. Fluorescence spectra of (b) **2₄₀₁** and (c) **2₉₈** in water (pH 12) at 4°C. Data of fluorescein in EtOH is also shown in these figures. [peptide] = 100 μM. [fluorescein] = 20 μM. λ_{ex} = 472 nm.

PAA はアニオン性高分子であり、pH が蛍光発光特性に影響を及ぼす可能性がある。そこで **2₇₉₄**, **2₄₀₁** および **2₉₈** の様々な pH における 4°C での蛍光発光特性を次に検討した。サンプルは全てにおいて冷却-加熱サイクル (4-60°C) を 4 回行ったもの (pH 12) を始点とし、12 M-HCl_{aq} を極微量ずつ添加していくことで pH を調製した。また、最終 pH は各サンプルにおいて沈殿が生じたところまでとし、HCl_{aq} の添加に伴う濃度の変化はほぼ無視できる条件である。なお、PAA の鎖長が長いほど沈殿が生じはじめる pH は高くなった。これらの各 pH における蛍光スペクトルを Figure 4-21 に示す。全てのサンプルにおいて、pH の低下にともない、515 nm の蛍光強度のわずかな減少が見られた。なお、この蛍光強度の現象は PAA の鎖長が長いほど緩やかとなった。これは鎖長が長いほど PAA のプロトン化による凝集が進行しても、カルボキシ基の絶対数が多いために静電反発により分子間での凝集が抑制されているためと考えられる。また、**2₇₉₄** では pH 6.5 以下においてスペクトルパターンが大きく変化し、550 nm の蛍光強度が大幅に増加した。この理由は現状では定かではないが、pH の低下によって蛍光種の構造自体が変化した可能性、または共役長の異なる二種類の蛍

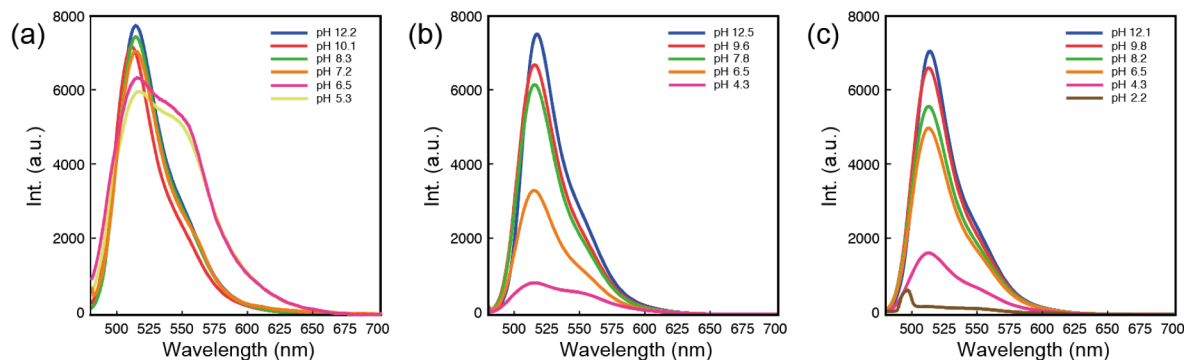


Figure 4-21. pH-dependence on fluorescence spectra of (a) **2₇₉₄**, (b) **2₄₀₁** and (c) **2₉₈** by in water at 4°C.

光種が生成しており、この蛍光種間で凝集に伴う蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の可能性が考えられる。また、**2₇₉₄** のみで見られたのは PAA 鎖長が長く、沈殿を引き起こす分子間の巨大な凝集が生じなかったためと考えられる。

4-3-3-4 PAA_n-b-PNIPAM_m-b-FSYGV-b-PNIPAM_m-b-PAA_n の分子状態の検討

次に、温度サイクルにより蛍光発光を示す分子種に変換後の **2_n** の水中における分子状態を検討した。以降の実験は全て蛍光量子収率を測定したものと同様のサンプルを用いた。まず、**2₇₉₄**、**2₄₀₁** および **2₉₈** のモルフォロジー観察を AFM から行った。Figure 4-22 は、4°C でマイカ基板に吸着させたときの AFM 観察の結果である。**2₇₉₄** では 230-530 nm、**2₄₀₁** では 270-450 nm、**2₉₈** では 130-330 nm の粒状体が観察された。また、同条件で作成したサンプルの TEM 観察を行ったところ **2₇₉₄** では 180-450 nm、**2₄₀₁** では 30-100nm、**2₉₈** では 10-50 nm 前後の粒状体が観察され、一部は複数個の粒状体が凝集している様子が見られた (Figure 4-23)。理論的な最大分子長 がそれぞれ **2₇₉₄**: ca. 200 nm、**2₄₀₁**: ca. 100 nm、**2₉₈**: ca.50 nmであることを考慮すると、以上の結果より、分子は単粒子または複数個が凝集した状態で存在していると考えられる。より詳細な会合状態を検討するため、水中における分子の粒径測定を DLS を用いて行った。

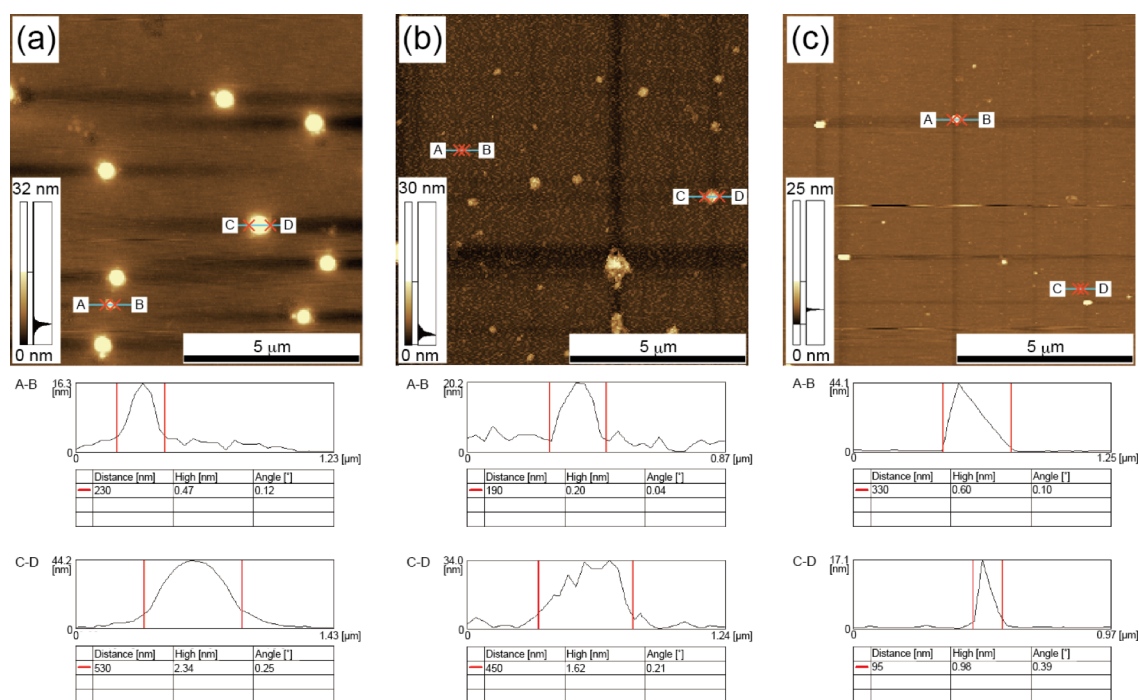


Figure 4-22. AFM images and their cross-sectional analyses of (a) **2₇₉₄**, (b) **2₄₀₁** and (c) **2₉₈**.

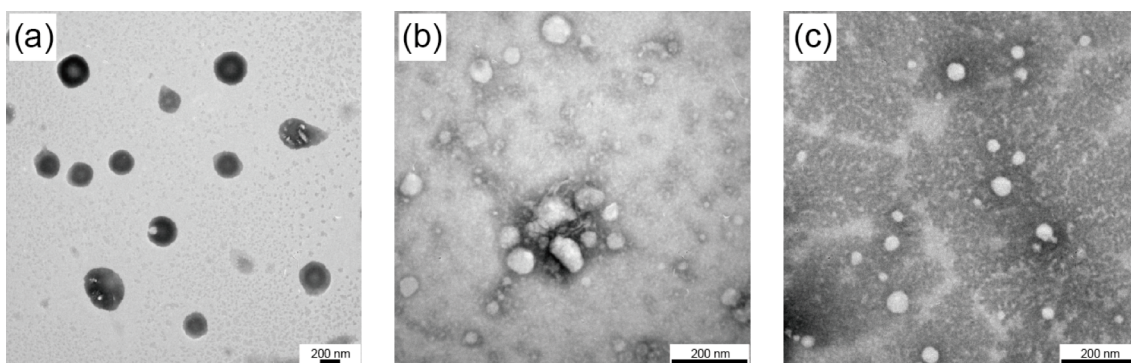


Figure 4-23. TEM images of (a) 2_{794} , (b) 2_{401} and (c) 2_{98} .

Figure 4-24 に、 4°C 及び 60°C における測定結果を示す。 4°C では全サンプルにおいて顕微鏡観察とおおよそ一致する粒径が得られた (2_{794} : 250-600 nm, 2_{401} : 170-550 nm, 2_{98} : 100-500 nm). このことから、本分子はユニマーミセルを形成し、それらが単粒子または数個~数十個会合して蛍光発光をしているものと考えられ、会合による消光が起こらないのは、ビニルポリマー鎖が蛍光種を覆うことで十分な距離を保っているためと考えられる. しかし、 60°C においては 2_{98} のみ 4°C のときと比べて大きな粒径を示した. これは、PAA ブロックの鎖長が短いために、PNIPAM ブロックの凝集が、一部分子間でも働いているためと考えられる.

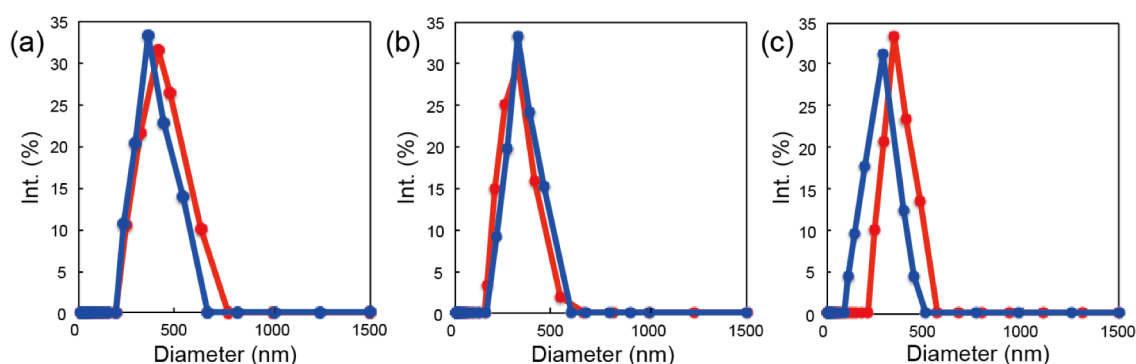


Figure 4-24. DLS measurements of (a) 2_{794} , (b) 2_{401} and (c) 2_{98} in water (pH 12). Blue: 4°C . Red: 60°C . [peptide] = 100 μM .

4-3-4. ポリマー種が蛍光発光へ及ぼす影響

これまでの結果より、**1** が DMSO 中で *ca.* 450 nm の青緑色蛍光を、また、 2_n が水中で *ca.* 515 nm 緑色蛍光を発することが明らかとなった. これらの蛍光波長の違いは溶媒による影響も十分に考えられるが、ポリマー種による影響も否定できない. そこで、 2_n の親水性ブロックをカチオン性のポリ(メタクリル酸 *N,N*-ジメチルアミノエチル) (PDMAEMA) とした PDMAEMA-*b*-PNIPAM-*b*-FSYGV-*b*-PNIPAM-*b*-PDMAEMA (**3**), 2_n の疎水性ブロックをポリ(メタクリル酸メチル) (PMMA) とした PAA-*b*-PMMA-*b*-FSYGV-*b*-PMMA-*b*-PAA (**4**),

疎水性ブロックを PMMA，親水性ブロックを PDMAEMA とした PDMAEMA_n-b-PMMA_m-b-FSYGV-b-PMMA_m-b-PDMAEMA_n (5) を新規に設計した (Figure 4-25). これらのモノマーはいずれも共役モノマーであるため，全てにおいてビニルポリマーブロックは PCCTA を連鎖移動剤に用いた RAFT 重合により合成した．また PMMA および PDMAEMA ブロックの重合がリビング的に進行しているかは ¹H NMR スペクトルから検討し，モノマー転化率に対して分子量をプロットしたところ，全て線形関係が得られた

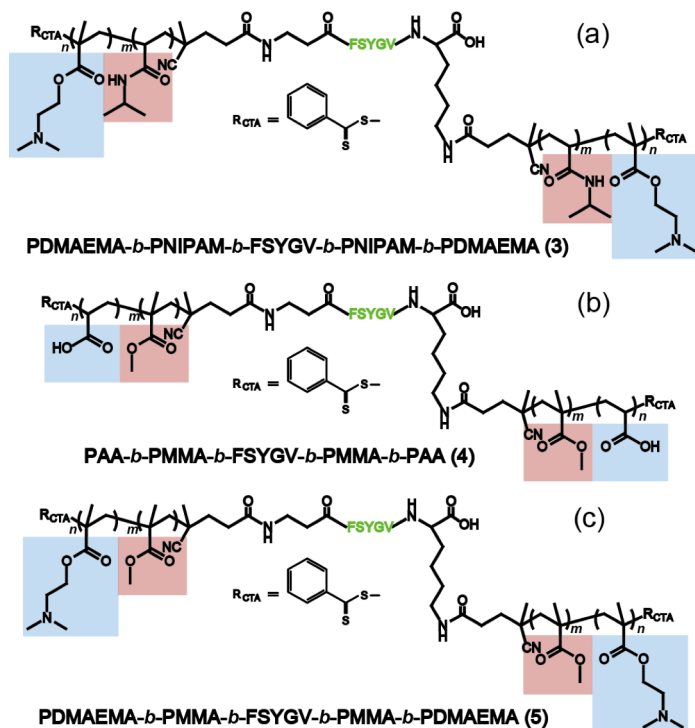


Figure 4-25. Chemical structures of 3 (a), 4 (b) and 5 (c).

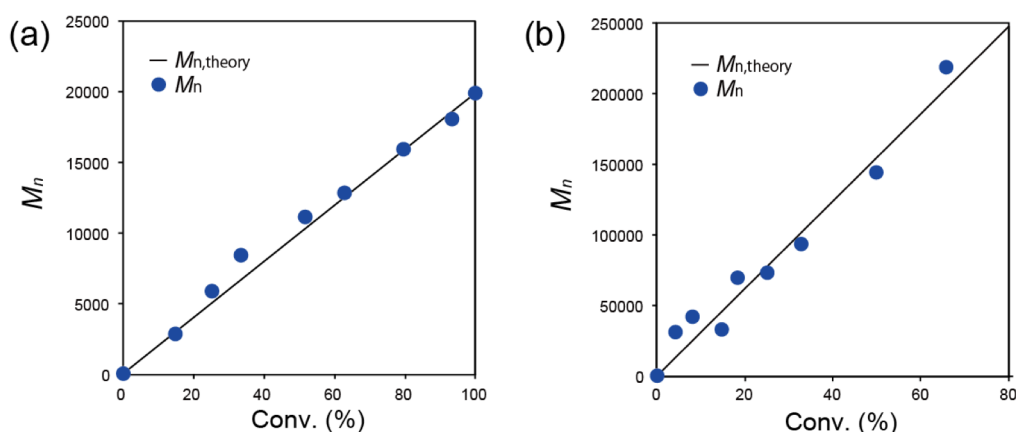


Figure 4-26. Plots of M_n as a function of conversion. Polymerization of MMA by PCCTA (a) and (b) DMAEMA by PNIPAM₃₀-*b*-FSYGV-*b*-PNIPAM₃₀ (b). The M_n values were estimated from ¹H NMR measurements. The theoretical line was calculated from conversion.

(Figure 4-26). なお、以降の実験に用いたサンプルの重合度は全て ^1H NMR スペクトル測定から決定した (**3**: $m=30$, $n=1482$, **4**: $m=52$, $n=696$, **5**: $m=52$, $n=1482$). 次に、これらの蛍光発光特性を蛍光スペクトルから検討した. サンプルは全て $[\text{peptide}]=100\ \mu\text{M}$ とし、**3** と **5** は溶媒に NaOH 水溶液 (pH 12), **4** は溶媒に塩酸 (pH 2.2)を用いた. まず, Figure 4-27 に **3** の冷却-加熱サイクルにおける蛍光スペクトルの変化を示す. **2_n** と同様に, サイクルを経る毎に蛍光強度の増加が見られたが, 強度自体は著しく小さかった. これは親水性ブロックの PDMAEMA が第 3 級アミンであるために消光したためであると考えられる¹⁴⁾. 次に, **4** と **5** の 4°C および 60°C における蛍光スペクトルの測定結果を示す (Figure 4-28). 興味深いことに, どちらも全く蛍光発光を示さなかった. このことは疎水性ブロックの疎水性度またはフォールディング状態が蛍光種形成に重要であることを示唆するものであり, 適切なビニルポリマーとのハイブリッド化が機能発現の鍵となるといえよう.

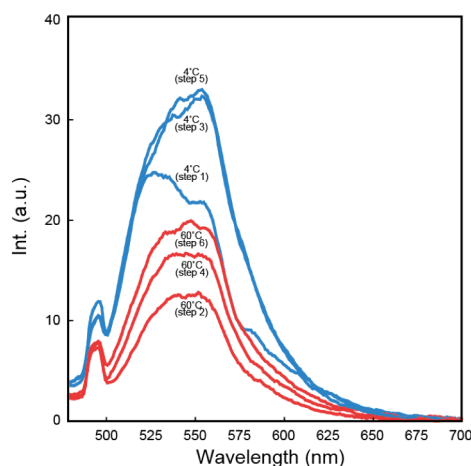


Figure 4-27. Fluorescence spectral changes of **3** in water (pH 2) by thermal cycle (4-60°C). Blue: 4°C. Red: 60°C. $[\text{peptide}] = 100\ \mu\text{M}$. $\lambda_{\text{ex}} = 472\ \text{nm}$.

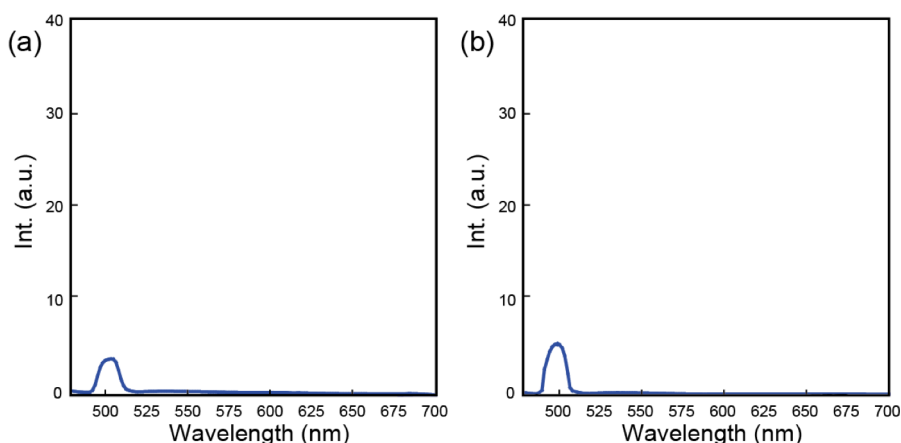


Figure 4-28. Fluorescence spectra of **4** in water (pH 12) and **5** in water (pH 2) at 25°C. $[\text{peptide}] = 100\ \mu\text{M}$. $\lambda_{\text{ex}} = 472\ \text{nm}$.

4-4. 結言

本章では、人工タンパク質モデルの構築を目指して、様々な LRP と SPPS を組み合わせたブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合成法の確立を進めた。タンパク質の機能モデルとして GFP に着目し、FSYGV ペプチドをコアセグメントに有する両親媒性ペプチド-ビニルポリマーハイブリッド **1** (PSt-PVP type) 及び **2_n** (PNIPAM-PAA type) を新規に設計・合成した。また、それらの蛍光発光特性を検討し、**2_n**を用いて分子の会合状態を詳細に検討した。さらに、**3** (PNIPAM-PDMAEMA type), **4** (PMMA-PAA type) および **5** (PMMA-PDMAEMA type) を設計・合成し、ポリマー種が及ぼす蛍光発光への影響を検討した。両末端に ATRP 開始点を有する FSYGV ペプチド (**PCI**) および両末端に連鎖移動部位を有する FSYGV ペプチド (**PCCTA**) の合成は SPPS 法により達成した。共役-非共役ビニルポリマーブロックは ATRP 及び光重合法を組み合わせることで、共役-共役ビニルポリマーブロックは RAFT 重合法を用いることで合成でき、配列制御ペプチドと種々の制御されたビニルポリマーの多様な組み合わせのハイブリッド化に成功した。**1** は極性溶媒である DMSO に溶解し、さらに DMSO 中で青緑色蛍光を示した。**2_n** は水中 (pH 12) で緑色蛍光を示した。また、4-60°C の冷却-加熱サイクルを経ることで蛍光強度が増加することを明らかにした。**3** は冷却-加熱サイクルを経ることで蛍光強度が増加したが、第 3 級アミンである PDMAEMA の影響により **2_n** と比較すると蛍光強度は著しく低かった。疎水性セグメントを PMMA とした **4** と **5** は一切の蛍光発光を示さなかった。このことは疎水性セグメントの疎水性度またはフォールディング状態が蛍光種形成に重要であることを示唆している。

以上のことから、ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドを用いて GFP 様の蛍光種形成メカニズムを有する人工 GFP の創成を達成した。これらは有機溶媒中または高温下の水中でも蛍光発光を示すことが明らかとなった。また、温度応答性高分子である PNIPAM を疎水性セグメントに用いることで、温度に応答した蛍光発光の OFF→ON スイッチを可能とした。本研究において考案した手法はこれまでにない非常にユニークかつ有用なものであり、人工タンパク質創成の分子設計に新たな指針を提供する。

参考文献

- 1) O. Shimomura, F. H. Johnso, Y. Shiga, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **1962**, 59, 223.
- 2) M. V. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zarausky, M. L. Markelov, S. A. Lukyanov, *Nature Biotechnol.*, **1999**, 17, 969.
- 3) S. Karasawa, T. Araki, M. Yamamoto-Hino, A. Miyawaki, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 34167.
- 4) S. Karasawa, T. Araki, T. Nagai, H. Mizuno, A. Miyawaki, *Biochem. J.*, **2004**, 381, 307.
- 5) R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno, A. Miyawaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 12651.
- 6) R. Ando, H. Mizuno, A. Miyawaki, *Science*, **2004**, 306, 1370.
- 7) M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science*, **1996**, 273, 1392.
- 8) F. Yang, L. G. Moss, G. N. Phillips. Jr, *Nat. Biotechnol.*, **1996**, 14, 1246.
- 9) R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.*, **1998**, 67, 509.
- 10) M. G. J. ten Cate, H. Rettig, K. Bernhardt, H. G. Börner, *Macromolecules*, **2005**, 38, 10643.
- 11) Y. Mei, K. L. Beers, H. C. M. Byrd, D. L. Vanderhart, N. R. Washburn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 3473.
- 12) H. Husain, B. H. Tan, C. S. Gudipati, Y. Liu, C. B. He, T. P. Davis, *J. Pol. Sci.*, **2008**, 46, 5604.
- 13) K. Matyjaszewski, *Curr. Op. Sol.*, **1996**, 1, 769.
- 14) G. Pistolis, A. Malliaris, C. M. Paleos, D. Tsiourvas, *Langmuir*, **1997**, 13, 5870.

第五章:

マルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの精密合成法の確立

5-1. 緒言

第四章ではビニルポリマー-配列制御ペプチド (FSYGV)-ビニルポリマーからなる各種ブロック型ハイブリッドの精密合成に成功し、それらが GFP 様の自発的な分子内環化反応を経て蛍光発光を発現することを述べた。このように、ペプチドとビニルポリマーからなるブロック型ハイブリッドはその特異な構造に基づいてこれまでにない魅力的な機能を発現しうる。これまでも、 α -ヘリックス¹⁻⁴⁾、 β -シート⁵⁻⁸⁾およびコイルドコイル構造⁹⁻¹¹⁾を形成するペプチドとビニルポリマーからなるブロック型ハイブリッドが生体機能性ナノマテリアルとして利用できることが報告されている。しかしながら、これらのブロックポリマーのほとんどが AB 型ジブロック構造、ABA または ABC 型トリブロック構造と単純なものに限られており、マルチブロック型のような複雑な構造のハイブリッドの報告例は少ない。マルチブロック型ハイブリッドは、配列制御されたペプチドが一本のビニルポリマー鎖内に繰り返し存在する特異な構造をしており、その反復構造に基づく機能増幅や分子内自己組織化に基づくタンパク質様の単鎖フォールディング形成も期待できる。

一般的なマルチブロック型ハイブリッドの合成方法はペプチドとプレポリマーとの重縮合または重付加である¹²⁻¹⁴⁾。すなわち、両末端に官能基を有するポリマーにしか適用できないため、末端に官能基を持たないビニルポリマーを用いることは難しく、ほとんどの例で α , ω -テレケリックポリエーテルがポリマーブロックに採用されている^{12, 13)}。ペプチドとビニルポリマーのマルチブロック化については少数例ではあるが Grieshaber および Luo らが報告しており、クリック反応とリビングラジカル重合である ATRP または RAFT 重合法を組み合わせた方法により合成が達成されている¹⁵⁻¹⁷⁾。しかしながら、これらの方法はポリマー鎖の両末端を正確にクリッカブルな官能基に置換する必要がある。また、ビニルポリマーの分子量には分布があるため、マルチブロック化において重要な等モル性の確保が難しい。そのため、純度の高いマルチブロック型ハイブリッドを得るためには、サイズ排除クロマトグラフィーなどの精製プロセスが必須となる。このように、莫大な時間と困難を要する精製操作の必要性がマルチブロック型ハイブリッドについての研究において最大の障壁となっている。

本章では、煩雑な精製プロセスを必要としないマルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの新規合成法の開発を目指した。ビニルモノマーの重合とペプチドとのマルチブロック化が同時に進行すれば、ワンステップかつ必要最低限の精製操作により目的のマルチブロック型ハイブリッドを得ることができる。そこで、ニトロキシド介在重合 (NMP) の重合機構に着目し、アルコキシアミン結合を介して環状構造を有するペプチドを新規に設計・合成した (Figure 5-1)。様々なアミノ酸配列のペプチド開始剤を用いた NMP により種々

のビニルモノマーの重合を行い、ワンステップマルチブロック化について検討を行うことにした (Figure 5-2).

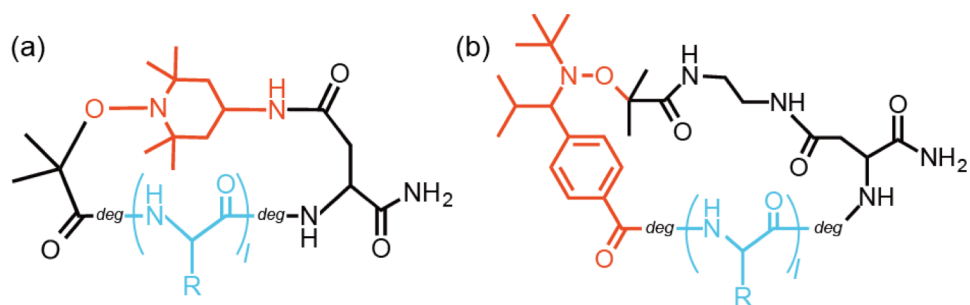


Figure 5-1. Chemical structures of cyclic peptide NMP initiators. (a) TEMPO-type and (b) TIPNO-type.

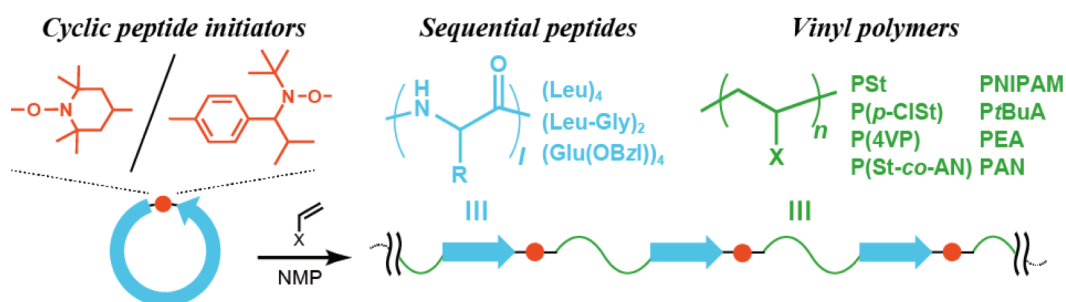


Figure 5-2. Conceptual scheme for the one-step synthesis of multiblock peptide-polymer hybrids *via* NMP using cyclic peptide initiators.

5-2. 実験方法

5-2-1. 試薬

N-メチル-2-ピロリドン, 塩化アクリロイル, 臭化2-ブromo-2-メチルプロパノイル, 酢酸銅(II) ($\text{Cu}(\text{OAc})_2$), ヒドロキノンおよび重トルエン (toluene- d_8) はナカライテスク株式会社から, 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシル (TEMPO), 4-アミノ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシル (4-amino-TEMPO), 2-ブromo-2-メチルプロパン酸*tert*-ブチル, トリフルオロメタンスルホン酸銅(II) ($\text{Cu}(\text{OTf})_2$), *N*-Boc-エチレンジアミン (*N*-Boc-EDA), 2-メチル-2-ニトロプロパン, イソブチルアルデヒド, 塩化アンモニウム (NH_4Cl), 4-ヨード安息香酸, カリウム*tert*-ブトキシド, *p*-クロロスチレン (*p*-ClSt), 4-ビニルピリジン (4VP) およびアクリロニトリル (AN) は東京化成工業株式会社から, 銅粉 ($\text{Cu}(0)$) (99.9%, $\phi=75\text{ }\mu\text{m}$), 亜鉛粉 ($\text{Zn}(0)$) (99.9%, $\phi=75\text{--}150\text{ }\mu\text{m}$), エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 (EDTA), 超脱水THF (THF_{SD}), 1 M-*i*PrMgBr THF溶液およびアクリル酸エチル (EA) は和光純薬工業株式会社から, Fmoc-L-Leu, Fmoc-L-Glu- γ -ベンジルエステル (Fmoc-L-Glu(OBzl))およびFmoc-L-Asp- β -アリルエステル, (Fmoc-L-Asp(OAll)) は渡辺化学工業株式会社から, 1,4,8,11-テトラメチル-1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカン (Me_4Cyclam) および2,2,5-トリメチル-4-フェニル-3-アザヘキサン-3-ニトロキシド (TIPNO) はシグマアルドリッチジャパン株式会社から, Fmoc-8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸 (Fmoc-*deg*-COOH) はCombi-Blocks社から購入した. EAは塩基性活性アルミナカラムにより重合禁止剤を除去した後に用いた. 4VP, *p*-ClStおよびANはヒドロキノン存在下で蒸留することにより重合禁止剤を除去した後に用いた.

5-2-2. 合成

5-2-2-1. 4-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-(2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル), フリーラジカル (Fmoc-NH-TEMPO) の合成.

4-アミノ-TEMPO 1.62g (9.45 mmol), Fmoc-OSu 3.04g (9.00 mmol) and TEA 1.25 mL (9.00 mmol) をジクロロメタン (20 mL) に溶解させ, 室温で 20 時間攪拌した. 反応後, ヘキサン/酢酸エチル ($v/v=3/7$) (100 mL) を加え, HCl_{aq} (100 mL, pH 2.0) で 3 回洗浄した. 有機層を回収し, 無水硫酸ナトリウムで脱水した. 溶媒を減圧除去することで粗精製物を赤橙色油状液体として得た. この粗精製物をヘキサン/アセトン ($v/v=7/3$) 混合溶液を展開溶媒に用いたシリカゲルカラムにより精製し, 溶媒を減圧除去することで目的の Fmoc-NH-TEMPO を赤橙色固体として得た. この分子はニトロキシドラジカルによる電子スピンの影響により ^1H NMR スペクトル測定を用いた構造決定が出来ない. そのため, 分子量を DART MS スペクトル測定により確認した.

収量: 3.05 g (86.0%).

$R_f=0.52$ (ヘキサン/アセトン ($v/v=7/3$)).

DART-MS: found $[M+H]^+$, $[M-O+H]^+$ (calcd. $[M+H]^+$, $[M-O+H]^+$); m/z 394.1, 378.2 (394.2, 378.2).

5-2-2-2. 2-((4-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-イル)オキシ)-2-メチルプロパン酸 *tert*-ブチル

(Fmoc-NH-TEMPO-COO t Bu) の合成

Fmoc-NH-TEMPO 0.98 g (2.48 mmol), 2-ブロモ-2-メチルプロパン酸 *tert*-ブチル 0.92 mL (4.96 mmol), 銅粉 0.158 g (2.48 mmol), Cu(OTf)₂ 18 mg (5.96×10^{-2} mmol), PMDETA 41.6 μ L (0.20 mmol) およびメタノール (20 mL) を混合し, この不均一溶液を試験管へ移した. 液体窒素を用いた凍結脱気により溶存酸素を除去したのち封管し, 60°C で 24 時間反応させた. 反応溶液にヘキサン/酢酸エチル (v/v=1/1) 混合溶媒 (100 mL) を加え, 0.1 M-EDTA_{aq} (100 mL, pH 8.0) および蒸留水 (100 mL) を用いてそれぞれ 3 回ずつ洗浄した. 有機層を回収し, 無水硫酸ナトリウムにより脱水した. 溶媒を減圧除去することで粗精製物を薄橙色油状液体として得た. この粗精製物をヘキサン/ジエチルエーテル (v/v=7/3) 混合溶液を展開溶媒に用いたシリカゲルカラムにより精製し, 溶媒を減圧除去することで目的の Fmoc-NH-TEMPO-COO t Bu を白色固体として得た.

収量: 0.84 g (62.9 %).

R_f =0.32 (ヘキサン/ジエチルエーテル (v/v=2/1)).

¹H NMR (DMSO- d_6 , TMS): δ 0.88 ppm, 1.02 ppm, 1.15 ppm (TEMPO, 12H, methyl), 1.28-1.37 ppm (TEMPO, 2H, methylene and (CH₃)₃COOCC(CH₃)₂O-, 6H), 1.41 ppm ((CH₃)₃COOCC(CH₃)₂O-, 9H), 1.61-1.70 ppm (TEMPO, 2H, methylene), 3.55-3.71 ppm (TEMPO, 1H, methine), 4.21 ppm (Fmoc, 1H, methine), 4.30 ppm (Fmoc, 2H, methylene), 7.18 ppm (Fmoc, 1H, NHCOO), 7.27-7.93 ppm (Fmoc, 8H, aromatic ring).

5-2-2-3. 2-((4-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-イル)オキシ)-2-メチルプロパン酸 (Fmoc-NH-TEMPO-COOH) の合成

Fmoc-NH-TEMPO-COO t Bu 0.81 g (1.51 mmol) を TFA/ジクロロメタン/TIS (v/v/v=8.5/1/0.5) 混合溶媒 (30 mL) に溶解させ, 室温で 12 時間攪拌した. 反応後, 溶媒を減圧除去することで粗精製物を無色透明な油状液体として得た. ヘキサン/アセトン (v/v=2/1) (30 mL) に溶解させ, -20°C で再結晶することで純粋な Fmoc-NH-TEMPO-COOH を白色固体として得た.

Yield: 0.36 g (49.8%).

¹H NMR (DMSO- d_6 , TMS): δ 0.88 ppm, 1.02 ppm, 1.15 ppm (TEMPO, 12H, methyl), 1.28-1.37 ppm (TEMPO, 2H, methylene; HOCC(CH₃)₂O-, 6H), 1.61-1.70 ppm (TEMPO, 2H, methylene), 3.55-3.71 ppm (TEMPO, 1H, methine), 4.21 ppm (Fmoc, 1H, methine), 4.30 ppm (Fmoc, 2H, methylene), 7.18 ppm (Fmoc, 1H, NHCOO), 7.27-7.93 ppm (Fmoc, 8H, aromatic ring), 12.4-12.6 ppm (1H, HOCC(CH₃)₂O-).

5-2-2-4. TEMPO 型環状ペプチド NMP 開始剤の合成.

TEMPO 型環状ペプチド開始剤 (**cPI-1**, **cPI-2** および **cPI-3**) は Fmoc 固相合成法により合成した. まず, まず, Fmoc-アミノ酸誘導体(Fmoc-L-Leu, Fmoc-Gly, Fmoc-L-Glu(OBzl) および Fmoc-L-Asp(OAll)), Fmoc-deg-COOH および Fmoc-NH-TEMPO-COOH (3 当量) を縮合剤に HOBt (3 当量) および DIPC (3 当量) を用いて順次縮合させることにより, 目的の配列を有する直鎖ペプチドを Fmoc-NH-SAL MBHA 樹脂上に合成した. 窒素雰囲気下ジクロロメタン中で直鎖ペプチド担持樹脂を Pd(0)(PPH₃)₄ (0.1 当量) およびフェニルシラン (10 当量) を用いて室温で 3 時間処理することで Asp 側鎖上のアリル基を脱保護した. 続いて, N 末端の Fmoc 基を脱保護したのち, HOBt (3 当量) および DIPC (3 当量) で処理することで分子内環化反応を樹脂上で行った. 環化後, 樹脂を TFA/ジクロロメタン/TIS (v/v/v=8.5/1/0.5) 混合溶媒で処理した. ジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法により, **cPI-1**, **cPI-2** および **cPI-3** をそれぞれ白色固体として得た. 構造決定は MALDI-TOF MS および ¹H NMR スペクトル測定により行った.

MALDI-TOF MS: found [M+H]⁺, [M+Na]⁺, [M+K]⁺ (calcd. [M+H]⁺, [M+Na]⁺, [M+K]⁺); **cPI-1**: 1098.2, 1120.3, 1136.3 (1098.4, 1120.4, 1136.5). **cPI-2**: 985.8, 1007.8, 1023. 7 (986.2, 1008.2, 1024.3). **cPI-3**: 1522.1, 1544.1, N.D. (1522.7, 1544.7, 1560.8).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, TMS): **cPI-1**: δ 0.88-1.15 ppm (TEMPO, methyl, 12H; Leu, δ-CH₃, 24H), 1.28-1.72 ppm (TEMPO, methylene, 4H; -C(CH₃)₂O-, 6H; Leu, γ-CH, 4H; Leu, β-CH₂, 8H), 3.11-3.75 ppm (Asp, β-CH₂, 2H; TEMPO, methine, 1H; -HN(CH₂)O-, 8H; -O(CH₂)O-, 8H), 3.80-3.90 ppm (-O(CH₂)CONH-, 4H), 4.25-4.65 ppm (amino acids, α-CH, 5H), 7.15-8.32 ppm (-OCNH₂, 2H; -CONH-, 8H). **cPI-2**: δ 0.88-1.15 ppm (TEMPO, methyl, 12H; Leu, δ-CH₃, 12H), 1.28-1.72 ppm (TEMPO, methylene, 4H; -C(CH₃)₂O-, 6H; Leu, γ-CH, 2H; Leu, β-CH₂, 4H), 3.11-3.75 ppm (Asp, β-CH₂, 2H; TEMPO, methine, 1H; -HN(CH₂)O-, 8H; -O(CH₂)O-, 8H), 3.80-3.90 ppm (-O(CH₂)CONH-, 4H), 4.25-4.65 ppm (Leu, α-CH, 2H; Gly, α-CH₂, 4H, Asp, α-CH, 1H), 7.15-8.32 ppm (-OCNH₂, 2H; -CONH-, 8H). **cPI-3**: δ 0.88-2.51 ppm (TEMPO, methyl, 12H; TEMPO, methylene, 4H; -C(CH₃)₂O- 6H; Glu(OBzl) β-CH₂, 8H; Glu(OBzl) γ-CH₂, 8H), 3.11-3.75 ppm (Asp, β-CH₂, 2H; TEMPO, methine, 1H; -HN(CH₂)O-, 8H; -O(CH₂)O-, 8H), 3.80-3.90 ppm (-O(CH₂)CONH-, 4H), 4.25-4.65 ppm (amino acids, α-CH, 5H), 5.13 ppm (-OCOCH₂Ph, 8H), 7.15-8.32 ppm (-OCNH₂, 2H; Glu(OBz), 20H, phenyl; -CONH-, 8H).

5-2-2-5. TEMPO 型環状ペプチド開始剤を用いたマルチブロックコポリマー (**P1-P9**) の合成

モノマー (1.0 mmol) および **cPI-1**, **2**, **3** (0.010 mmol) をモノマー濃度が 6 M となるよう DMF に溶解させた. 溶液を試験管に移し, 液体窒素を用いた凍結脱気により溶存酸素を除去したのちに封管し, 110°C (120°C)で重合を開始させた. 重合後, 液体窒素を用いて急冷

することで重合を停止させた。その後、反応溶液をメタノール (**P8** の場合はジエチルエーテル) へ滴下することで生成したポリマーを沈殿させた。DMF を良溶媒、メタノール (ジエチルエーテル) を非溶媒に用いた再沈殿法により精製し、乾燥させることで目的のマルチブロックコポリマー (**P1-P9**) を白色固体として得た。構造決定は ^1H NMR および FTIR スペクトル測定、 M_n および D の算出は SEC 測定により行った (Table 5-1)。

Transmission-FTIR (cast film from CHCl_3 onto CaF_2): **P2**: 3286, 3081 cm^{-1} (N-H stretching of Leu_4), 3025 cm^{-1} (C-H stretching of PSt (phenyl group)), 2925, 2854 cm^{-1} (C-H stretching of PSt (main chain)), 1943, 1873, 1805, 1750 cm^{-1} (C-H stretching of PSt (phenyl group)), 1639 cm^{-1} (amide I), 1600 cm^{-1} (C=C stretching of PSt (phenyl group)), 1532 cm^{-1} (amide II), 1494, 1453 cm^{-1} (C=C stretching of PSt (phenyl group))。

^1H NMR (CDCl_3 , TMS): **P2**: δ 0.79-1.10 ppm (TEMPO, methyl, 12H; Leu, $\delta\text{-CH}_3$, 24H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$, 6H), 1.28-2.33 ppm (TEMPO, methylene, 4H; Leu, $\gamma\text{-CH}$, 4H; Leu, $\beta\text{-CH}_2$, 8H; PSt, methylene, $2n\text{H}$; PSt, methine, $n\text{H}$), 3.11-3.81 ppm (Asp, $\beta\text{-CH}_2$, 2H; TEMPO, methine, 1H; $-\text{HN}(\text{CH}_2)\text{O}-$, 8H; $-\text{O}(\text{CH}_2)\text{O}-$, 8H; $(-\text{O}(\text{CH}_2)\text{CONH}-$, 4H), 3.88-4.21 ppm (amino acids, $\alpha\text{-CH}$, 5H), 6.32-8.32 ppm (PSt, phenyl, $5n\text{H}$; $-\text{OCNH}_2$, 2H; $-\text{CONH}-$, 8H)。

5-2-2-6. TEMPO 型環状ペプチド開始剤を用いて合成したマルチブロックコポリマー (**P1-P9**) の断片化

P1-P9 (10.0 mg) および TEMPO (40.0 mg, 256 μmol) を *N*-メチル-2-ピロリドン (100 μL) に溶解させた。溶液を試験管に移し、液体窒素を用いた凍結脱気により溶存酸素を除去したのちに封管し、110 $^\circ\text{C}$ (120 $^\circ\text{C}$) で6時間反応させた。メタノール (**P8** の場合はジエチルエーテル) を非溶媒に用いた再沈殿法により精製し、目的のフラグメントポリマーを薄山吹色固体として得た。構造決定は ^1H NMR および FTIR スペクトル測定、 M_n および D の算出は SEC 測定により行った (Table 5-1)。

Transmission-FTIR (cast film from CHCl_3 onto CaF_2): **P2**(fragment): 3286, 3081 cm^{-1} (N-H stretching of Leu_4), 3025 cm^{-1} (C-H stretching of PSt (phenyl group)), 2925, 2854 cm^{-1} (C-H stretching of PSt (main chain)), 1943, 1873, 1805, 1750 cm^{-1} (C-H stretching of PSt (phenyl group)), 1639 cm^{-1} (amide I), 1600 cm^{-1} (C=C stretching of PSt (phenyl group)), 1532 cm^{-1} (amide II), 1494, 1453 cm^{-1} (C=C stretching of PSt (phenyl group)) (Fig. 2c, red line)。

^1H NMR (CDCl_3 , TMS): **P2**(fragment): δ 0.79-1.10 ppm (TEMPO, methyl, 12H; Leu, $\delta\text{-CH}_3$, 24H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$, 6H), 1.28-2.33 ppm (TEMPO, methylene, 4H; Leu, $\gamma\text{-CH}$, 4H; Leu, $\beta\text{-CH}_2$, 8H; PSt, methylene, $2n\text{H}$; PSt, methine, $n\text{H}$), 3.11-3.81 ppm (Asp, $\beta\text{-CH}_2$, 2H; TEMPO, methine, 1H; $-\text{HN}(\text{CH}_2)\text{O}-$, 8H; $-\text{O}(\text{CH}_2)\text{O}-$, 8H; $(-\text{O}(\text{CH}_2)\text{CONH}-$, 4H), 3.88-4.21 ppm (amino acids, $\alpha\text{-CH}$, 5H), 6.32-8.32 ppm (PSt, phenyl, $5n\text{H}$; $-\text{OCNH}_2$, 2H; $-\text{CONH}-$, 8H)。

5-2-2-7. (9H-フルオレン-9-イル)メチル *tert*-ブチルエタン-1,2-ジイルジカルバメート (*N*-Fmoc-*N'*-Boc-EDA)

N-Boc-EDA 10.0 g (62.4 mmol), Fmoc-OSu 23.16 g (68.4 mmol) および TEA 9.56 mL (68.4 mmol) を 500 mL のクロロホルムに溶解させ、24 時間室温で撹拌した。反応溶液を 0.1 M HCl_{aq} (100 mL), 0.1 M NaOH_{aq} (100 mL) および蒸留水 (100 mL) を用いてそれぞれ 3 回ずつ洗浄した。有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧除去することで粗精製物を白色固体として得た。この粗精製物をシクロヘキサン/メタノール (v/v=4/1) 混合溶液 (100 mL) を用いて洗浄したのちに乾燥させることで、純粋な *N*-Fmoc-*N'*-Boc-EDA を白色固体として得た。

収量: 18.95 g (79.4 %)

¹H NMR (acetone-*d*₆, TMS): δ 1.46 ppm (-OC(CH₃)₃, 9H), 3.25 ppm (-NH(CH₂)₂NH-, 4H), 4.25 ppm (-OCH₂CH<, 1H), 4.38 ppm (-OCH₂CH<, 2H), 7.35-7.90 ppm (Fmoc, 8H, aromatic ring; -NH(CH₂)₂NH-, 2H).

5-2-2-8. 2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)エタン-1-アミニウム塩酸塩 (*N*-Fmoc-EDA•HCl) の合成

N-Fmoc-*N'*-Boc-EDA 18.95 g (49.5 mmol) を 12 M-HCl_{aq}/メタノール (v/v=1/2) 混合溶液 (300 mL) に溶解させ、室温で一晩撹拌した。この溶液を減圧濃縮し、生じた白色固体をろ過により回収した。残渣をアセトンにより洗浄することで純粋な *N*-Fmoc-EDA•HCl を白色固体として得た。

収量: 13.63 g (86.3 %)

¹H NMR (DMSO-*d*₆, TMS): δ 2.83 ppm (-CH₂NH₃⁺, 2H), 3.26 ppm (-NHCH₂CH₂NH₃⁺, 2H), 4.29 ppm (-OCH₂CH<, 1H), 4.38 ppm (-OCH₂CH<, 2H), 7.37-8.06 ppm (Fmoc, 8H, aromatic ring; -NH(CH₂)₂NH₃⁺, 1H; -NH(CH₂)₂NH₃⁺, 3H).

5-2-2-9. (9H-フルオレン-9-イル)メチル (2-(2-ブロモ-2-メチルプロパンアミド)エチル)カルバメート (Fmoc-EDA-Br)

N-Fmoc-EDA•HCl 13.63 g (42.7 mmol) および TEA 13.15 mL (94.0 mmol) を 300 mL のクロロホルムに氷浴下で溶解させた。そこに臭化 2-ブロモ-2-メチルプロパノイル 6.33 mL (51.2 mmol) を加え、氷浴下で 6 時間撹拌した。反応溶液を減圧濃縮し、酢酸エチル (200 mL) を加えた。続いて、1M-HCl_{aq} (100 mL), 1 M-NaOH_{aq} (100 mL) および蒸留水 (100 mL) を用いてそれぞれ 3 回ずつ洗浄した。有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた。溶媒を減圧除去することで、純粋な Fmoc-EDA-Br を白色固体として得た。

収量: 14.83 g (80.5%)

¹H NMR (CDCl₃, TMS): δ 1.93 ppm (-C(=O)C(CH₃)₂Br, 6H), 3.40 ppm (-NH(CH₂)₂NH-, 4H), 4.22

ppm (-OCH₂CH<, 1H), 4.41 ppm (-OCH₂CH<, 2H), 7.08-7.80 ppm (Fmoc, 8H, aromatic ring; -NH(CH₂)₂NH-, 2H).

5-2-2-10. *N*-*tert*-ブチル- α -イソプロピルニトロンの合成

2-メチル-2-ニトロプロパン 10 g (97.0 mmol), イソブチルアルデヒド 8.81 mL (97.0 mmol) および塩化アンモニウム 5.71 g (106.8 mmol) を 200 mL の水および 100 mL のジエチルエーテルに氷浴下で溶解させた. 続いて, 亜鉛粉 25.37 g (388 mmol) を溶液に 1 時間かけて少量ずつ加え攪拌し, 室温で 12 時間反応させた. 反応溶液をガラスろ紙を用いてろ過し, 残渣をメタノール (100 mL) で洗浄した. ろ液を減圧濃縮したのち, ジクロロメタン (50 mL) で目的物を 3 回抽出した. 無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥したのち, 溶媒を減圧除去することで純粋な *N*-*tert*-ブチル- α -イソプロピルニトロンを無色透明な液体として得た.

収量: 10.05 g (72.3%)

¹H NMR (CDCl₃, TMS): δ 1.11 ppm (-CH(CH₃)₂, 6H), 1.48 ppm (-C(CH₃)₃, 9H), 3.16 ppm (-CH(CH₃)₂, 1H), 6.61 ppm (-N⁺(-O⁻)=CH-, 1H).

5-2-2-11. *Tert*-ブチル 4-ヨード安息香酸の合成

4-ヨード安息香酸 25.0 g (100.8 mmol) および塩化チオニル 21.4 mL (302.4 mmol) を酢酸エチル/トルエン (v/v=1/1) 混合溶液 (40 mL) に溶解させ, 4 時間加熱還流した. 過剰の塩化チオニルと溶媒を減圧除去することで 4-ヨードベンゾイルクロリドを承和色固体として得た. この固体を 50 mL の THF に溶解させた. カリウム *tert*-ブトキシド 12.5 g (111.6 mmol) を 350 mL の THF に溶解させ, 氷浴下で 4-ヨードベンゾイルクロリド THF 溶液にゆっくりと滴下し, 1 時間攪拌した. 過剰のカリウム *tert*-ブトキシドをクエンチするため, 冷やした超純水 (65 mL) をゆっくりと加えた. 溶液を減圧濃縮し, そこに超純水 (200 mL) を加え, ジエチルエーテル (200 mL) で抽出した. 無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥したのち, 溶媒を減圧除去することで粗精製物を山吹色油状液体として得た. この粗精製物をヘキサン/ジエチルエーテル (v/v=20/1) 混合溶媒としたシリカゲルカラムにより精製し, 溶媒を減圧除去することで純粋な 4-ヨード安息香酸 *tert*-ブチルを薄黄蘗色油状液体として得た.

収量: 19.7 g (64.1%)

R_f = 0.61 (ヘキサン/ジエチルエーテル (v/v=20/1))

¹H NMR (CDCl₃, TMS): δ 1.58 ppm (*tert*-butyl, 9H), 7.70 and 7.84 ppm (phenyl, 4H).

5-2-2-12. 2,2,5-トリメチル-4-*p*-*tert*-ブチルベンゾエート-3-アザヘキサン-3-ニトロキシド, フリーラジカル (TIPNO-COO*t*Bu) の合成

全てのガラス器具は使用前に 70°C の乾燥機で一晩乾燥させた. 超脱水 THF (200 mL) を二口フラスコに入れ, -30°C に冷却した. 次に, 1 M-*i*PrMgBr THF 溶液 76 mL (76.0 mmol

*i*PrMgBr) を加え撹拌した。続いて、4-ヨード安息香酸 *tert*-ブチル 15.41 g (50.7 mmol) を超脱水 THF (50 mL) に溶解させ、グリニャール試薬溶液に 10 分間かけてゆっくりと滴下した。 -30°C で 1 時間撹拌したのち、超脱水 THF (30 mL) に溶かした *N-tert*-ブチル- α -イソプロピルニトロン (10.16 g (71.0 mmol)) を 10 分間かけてゆっくりと滴下し、 -30°C で 12 時間反応させた。過剰のグリニャール試薬をクエンチするため、飽和 $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{aq}}$ (22.5 mL) および超純水 (150 mL) をゆっくりと加えた。このとき、反応溶液は 2 層に分離した。目的物を含む有機層 (上層) を回収した。続いて、水層側に含まれる目的物を回収するため、ジエチルエーテル (50 mL) を用いて 3 回抽出した。各ステップで回収した有機層をひと纏めにし、無水硫酸マグネシウムを用いて乾燥した。溶媒を減圧除去し、新たにメタノール (150 mL) および 25%- NH_3_{aq} (22.5 mL) を加えた。この混合溶液に $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ 135 mg (0.74 mmol) を加え、空気でバブリングしながら 2 時間撹拌した。溶媒を減圧除去し、ヘキサン/酢酸エチル ($v/v=1/2$) 混合溶液 (100 mL) を加え、0.1 M- EDTA_{aq} (100 mL, pH 8.0) および超純水を用いてそれぞれ 3 回洗浄した。有機層を回収し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。溶媒を減圧除去することで粗精製物を赤橙色油状液体として得た。この粗精製物をヘキサン/酢酸エチル/ジクロロメタン ($v/v/v=10/1/1$) 混合溶液を展開溶媒に用いたシリカゲルカラムにより精製し、溶媒を減圧除去することで純粋な TIPNO-COO*t*Bu を低融点の赤橙色固体として得た。

収量: 10.29 g (63.3%)

$R_f=0.47$ (ヘキサン/酢酸エチル/ジクロロメタン ($v/v/v=10/1/1$))

DART-MS: found $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z 321.2 (321.5).

ESR (CHCl_3 , -196°C , Freq.: 9.148 GHz): g value=2.011.

5-2-2-13. *Tert*-ブチル 4-(11-(*tert*-ブチル)-1-(9*H*-フルオレン-9-イル)-9,9,13-トリメチル-3,8-ジオキソ-2,10-ジオキサ-4,7,11-トリアザテトラデカン-12-イル)ベンゾエート (Fmoc-NH-TIPNO-COO*t*Bu) の合成

Fmoc-EDA-Br 2.00 g (4.64 mmol), TIPNO-COO*t*Bu 1.49 g (4.64 mmol), 銅粉 0.296 g (4.64 mmol), $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ 33.7 mg (0.112 mmol), Me_4Cyclam 72.3 mg (0.376 mmol) およびメタノール (50 mL) を混合し、この不均一溶液を試験管へ移した。液体窒素を用いた凍結脱気により溶存酸素を除去したのち封管し、 60°C で 24 時間反応させた。反応溶液に酢酸エチル (200 mL) を加え、0.1 M- EDTA_{aq} (100 mL, pH 8.0) および蒸留水 (100 mL) を用いてそれぞれ 3 回ずつ洗浄した。有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムにより脱水した。溶媒を減圧除去することで粗精製物を薄橙色油状液体として得た。この粗精製物をヘキサン/ジエチルエーテル/ジクロロメタン ($v/vv=2/1/1$) 混合溶液を展開溶媒に用いたシリカゲルカラムにより精製し、溶媒を減圧除去することで目的の Fmoc-NH-TEMPO-COO*t*Bu を白色固体として得た。

収量: 1.97 g (63.2 %).

$R_f=0.32$ (ヘキサン/ジエチルエーテル/ジクロロメタン (v/vv/=2/1/1))

^1H NMR (acetone- d_6 , TMS): δ 0.45 ppm ($>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 3H, enantiomer), 0.98 ppm ($>\text{NC}(\text{CH}_3)_3$, 9H), 1.23 ppm ($>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 3H, enantiomer), 1.58 ppm ($-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, 9H), 1.65 ppm ($>\text{C}(\text{CH}_3)_2$, 6H), 2.14 ppm ($>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 1H), 3.22 ppm ($-\text{OC}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, 2H), 3.34 ppm ($-\text{OC}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, 2H), 3.68 ppm ($>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 1H), 4.20 ppm ($-\text{OCH}_2\text{CH}<$, 1H), 4.32 ppm ($-\text{OCH}_2\text{CH}<$, 2H), 6.42 ppm ($-\text{OC}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})-$, 1H), 7.17-7.95 ppm (Fmoc, 8H, aromatic ring; TIPNO, 4H, aromatic ring; $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}-$, 1H).

5-2-2-14. 4-(11-(*tert*-ブチル)-1-(9*H*-フルオレン-9-イル)-9,9,13-トリメチル-3,8-ジオキソ-2,10-ジオキサ-4,7,11-トリアザテトラデカン-12-イル)安息香酸 (Fmoc-NH-TIPNO-COOH) の合成

Fmoc-NH-TEMPO-COOtBu 1.20 g (1.79 mmol) を TFA/ジクロロメタン/TIS (v/v/v=8.5/1/0.5) 混合溶液に (30 mL) に溶解させ、室温で 12 時間撹拌させた。溶媒を減圧除去のち、アセトンを良溶媒、ヘキサンを非溶媒に用いた際沈殿法により精製し、純粋な Fmoc-NH-TIPNO-COOH を白色固体として得た。

Yield: 1.05 g (95.2 %).

^1H NMR (DMSO- d_6 , TMS): δ 0.36 ppm ($>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 3H, enantiomer), 0.88 ppm ($>\text{NC}(\text{CH}_3)_3$, 9H), 1.14 ppm ($>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 3H, enantiomer), 1.44 and 1.51 ppm ($>\text{C}(\text{CH}_3)_2$, 6H), 1.98 ppm ($>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 1H), 3.00 ppm ($-\text{OC}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, 2H), 3.17 ppm ($-\text{OC}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, 2H), 3.60 ppm ($>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 1H), 4.19 ppm ($-\text{OCH}_2\text{CH}<$, 1H), 4.28 ppm ($-\text{OCH}_2\text{CH}<$, 2H), 7.16-7.94 ppm (Fmoc, 8H, aromatic ring; TIPNO, 4H, aromatic ring; $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}-$, 2H), 12.75 ppm ($-\text{COOH}$, 1H).

5-2-2-15. TIPNO 型環状ペプチド NMP 開始剤の合成

まず、Fmoc-アミノ酸誘導体(Fmoc-L-Leu および Fmoc-L-Asp(OAll)), Fmoc-deg-COOH および Fmoc-NH-TIPNO-COOH (3 当量) を縮合剤に HOBt (3 当量) および DIPC (3 当量) を用いて順次縮合させることにより、目的の配列を有する直鎖ペプチドを Fmoc-NH-SAL MBHA 樹脂上に合成した。窒素雰囲気下ジクロロメタン中で直鎖ペプチド担持樹脂を $\text{Pd}(0)(\text{PPH}_3)_4$ (0.1 当量) およびフェニルシラン (10 当量) を用いて室温で 3 時間処理することで Asp 側鎖上のアリル基を脱保護した。続いて、*N* 末端の Fmoc 基を脱保護したのち、HOBt (3 当量) および DIPC (3 当量) で処理することで分子内環化反応を樹脂上で行った。環化後、樹脂を TFA/ジクロロメタン/TIS (v/v/v=8.5/1/0.5) 混合溶媒で処理した。ジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法により、目的の環状ペプチド NMP 開始剤 (**cPI-4**) を白色固体として得た。構造決定は MALDI-TOF MS および ^1H NMR スペクトル測定により行った。

MALDI-TOF MS: found $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$); 1233.68 (1233.57, 1255.56,

1271.67).

^1H NMR (DMSO- d_6 , TMS): δ 0.32 ppm ($>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 3H, enantiomer), 0.75-0.92 ppm ($>\text{NC}(\text{CH}_3)_3$, 9H; Leu, $\delta\text{-CH}_3$, 24H), 1.11 ppm ($>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 3H, enantiomer), 1.34-1.61 ppm ($>\text{C}(\text{CH}_3)_2$, 6H; Leu, $\gamma\text{-CH}$, 4H; Leu, $\beta\text{-CH}_2$, 8H), 1.95 ppm ($>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 1H), 2.46 ppm (Asp, $\beta\text{-CH}_2$, overlapped with DMSO), 3.05 ppm ($-\text{OC}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, 2H), 3.11-3.28 ppm ($-\text{OC}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, 2H; $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, 4H), 3.34-3.64 ppm ($-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}-$, 8H; $>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 1H), 3.88 ppm ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, 4H), 4.20-4.54 ppm ($-\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})-$, 4H; Asp, $\alpha\text{-CH}$, 1H; Leu, $\alpha\text{-CH}$, 4H), 7.00-8.48 ppm (TIPNO, 4H, aromatic ring; $-\text{CONH}_2$, 2H; amide bonds of cyclic peptide, 9H).

5-2-2-16. TIPNO 型環状ペプチド開始剤を用いたマルチブロックコポリマー (**P10-P18**) の合成

モノマー (1.0 mmol) および **cPI-4** 12.3 mg (0.010 mmol)を試験管内で DMF と混合させた。液体窒素を用いた凍結脱気により溶存酸素を除去したのちに封管し、120°C (110°C)で重合を開始させた。重合後、液体窒素を用いて急冷することで重合を停止させた。その後、反応溶液をジエチルエーテル (**P18** の場合はメタノール) へ滴下することで生成したポリマーを沈殿させた。DMF を良溶媒、ジエチルエーテル (メタノール) を非溶媒に用いた再沈殿法により精製し、乾燥させることで目的のマルチブロックコポリマー (**P10-P18**) を白色固体として得た。構造評価は ^1H NMR, CD および FTIR スペクトル測定, 分子量 (M_n) および多分散度 (D) の算出は SEC 測定により行った (Table 5-2)。

Transmission-FTIR (cast film from CHCl_3 onto CaF_2): **P11**: 3429 cm^{-1} (ν_s : CON-H), 3300 cm^{-1} (ν_s : CON-H), 3071 cm^{-1} (ν_s : C-H (methylene)), 2970 cm^{-1} (ν_s : C-H (methyl)), 2935 cm^{-1} (ν_s : C-H (methine)), 2876 cm^{-1} (ν_s : C-H (methyl)), 1645 cm^{-1} (ν_s : C(=O)NH), 1538 cm^{-1} (δ : CON-H), 1476 cm^{-1} (δ : C-H (methylene)), 1368 cm^{-1} (δ : C-H (methyl), δ : *i*Pr group)。

^1H NMR (CDCl_3 , TMS): **P11**: δ 0.50 ppm ($>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 3H, enantiomer), 0.90 ppm (Leu, $\delta\text{-CH}_3$, 24H; $>\text{NC}(\text{CH}_3)_3$, 9H), 1.05-2.40 ppm (PNIPAM, $2n\text{H}$, methylene of main chain; PNIPAM, $n\text{H}$, methine of main chain; PNIPAM, $6n\text{H}$, methyl of side chain; $>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 3H, enantiomer; $>\text{C}(\text{CH}_3)_2$, 6H; Leu, $\gamma\text{-CH}$, 4H; Leu, $\beta\text{-CH}_2$, 8H; $>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 1H; Asp, $\beta\text{-CH}_2$, 2H), 3.80 ppm ($-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}-$, 8H), 4.00 ppm (Leu, $\alpha\text{-CH}$, 4H; PNIPAM, $n\text{H}$, methine of side chain), 3.20-4.50 ppm ($-\text{OC}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, 2H; $-\text{OC}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, 2H; $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, 4H; $>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 1H; $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, 4H; $-\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})-$, 4H; Asp, $\alpha\text{-CH}$, 1H), 6.00-7.80 ppm (PNIPAM, $n\text{H}$, amide; TIPNO, 4H, aromatic ring; $-\text{CONH}_2$, 2H; amide bonds of peptide, 9H)。

5-2-2-17. P15 の P_tBuA セグメントの脱保護

P15 20 mg (0.76 μ mol) を TFA/ジクロロメタン/TIS (v/v/v=8.5/1/0.5) 混合溶液 (30 mL) に溶解させ、室温で 12 時間攪拌した。反応溶液を濃縮したのち、メタノールを良溶媒、ジエチルエーテルを非溶媒とした再沈殿法により精製し、目的の Leu₄ およびポリ(アクリル酸) (PAA) からなる脱保護体 (P15') を薄山吹色固体として得た。

Transmission-FTIR (cast film from methanol onto CaF₂): 3429 cm⁻¹ (ν_s : COO-H, ν_s : CON-H), 3131 cm⁻¹ (ν_s : CON-H), 2949 cm⁻¹ (ν_s : C-H (methylene)), 2879 cm⁻¹ (ν_s : C-H (methine)), 2623 cm⁻¹ (ν_s : COO-H), 1708 cm⁻¹ (ν_s : C(=O)OH), 1632 cm⁻¹ (ν_s : C(=O)NH), 1564 cm⁻¹ (δ : CON-H), 1455 cm⁻¹ (δ : C-H (methylene)).

¹H NMR (CD₃OD, TMS): δ 0.50 ppm (>CHCH(CH₃)₂, 3H, enantiomer), 0.90 ppm (Leu, δ -CH₃, 24H; >NC(CH₃)₃, 9H), 1.05-2.60 ppm (PAA, 2*n*H, methylene of main chain; PAA, *n*H, methine of main chain; >CHCH(CH₃)₂, 3H, enantiomer; >C(CH₃)₂, 6H; Leu, γ -CH, 4H; Leu, β -CH₂, 8H; >CHCH(CH₃)₂, 1H; Asp, β -CH₂, 2H), 3.40-4.70 ppm (-OC(=O)NHCH₂CH₂NH-, 2H; -OC(=O)NHCH₂CH₂NH-, 2H -NHCH₂CH₂O-, 4H; -O(CH₂)₂O-, 8H; >CHCH(CH₃)₂, 1H; -NHCH₂CH₂O-, 4H; -OCH₂C(=O)-, 4H; Asp, α -CH, 1H; Leu, α -CH, 4H), 6.80-7.80 ppm (TIPNO, 4H, aromatic ring; -CONH₂, 2H; amide bonds of peptide, 9H).

5-2-3. 測定

¹H NMR スペクトル測定は日本電子社製 JNM-ECA500 を用いて行った。測定には $\phi 5 \times 7$ インチの NMR 試験管を用いた。測定温度は 20-80°C, 積算回数は 16 回, サンプル濃度は 1wt%または 0.01wt%とした。電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルは日本電子社製 JET-TE200 を用いて-196°C で測定した。直接質量分析 (DART MS) スペクトル測定は IonSense 社製 DART-SVP を用いて 300°C で行った。円偏光二色性 (CD) スペクトルは日本分光社製 J-820 を用いて光路長 1 mm の石英セル中で測定した。測定温度は 25°C, サンプル濃度は 0.01wt% とした。

5-3. 結果および考察

5-3-1. TEMPO由来アルコキシアミンを介して環状構造を有するペプチドNMP開始剤の設計

マルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドに関する研究は、その合成法の煩雑さが障壁となっており、簡便かつ精密な新規合成法の確立は興味深く大変意義深い。緒言でも述べたように、ビニルモノマーの重合とペプチドとのマルチブロック化が同時に進行すれば、ワンステップかつモノマーを除去するという容易な精製操作により目的のマルチブロック型ハイブリッドを得ることができる。そこで、NMPによるマルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドのワンステップ合成を目指した (Figure 5-3)。

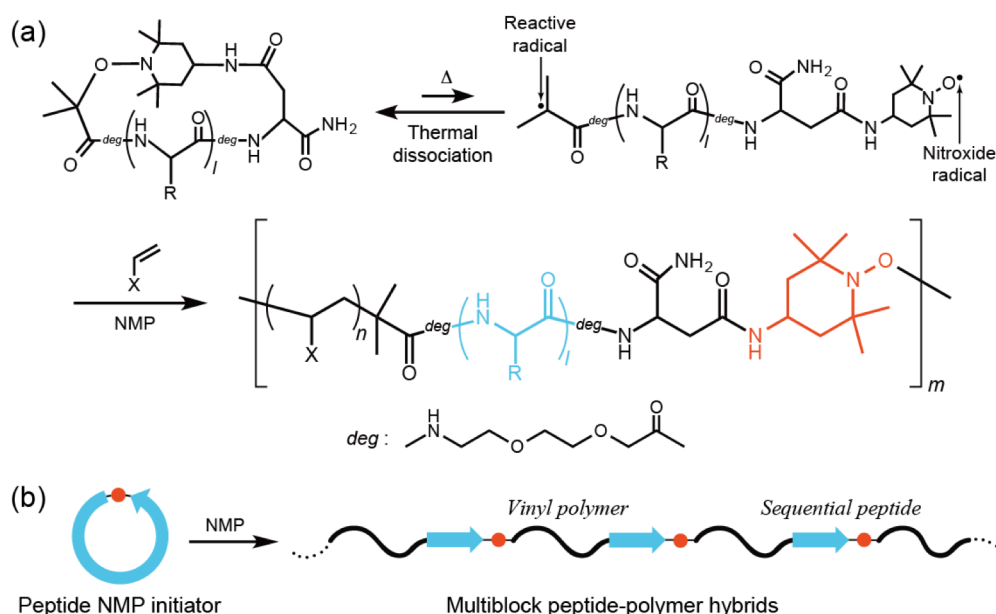


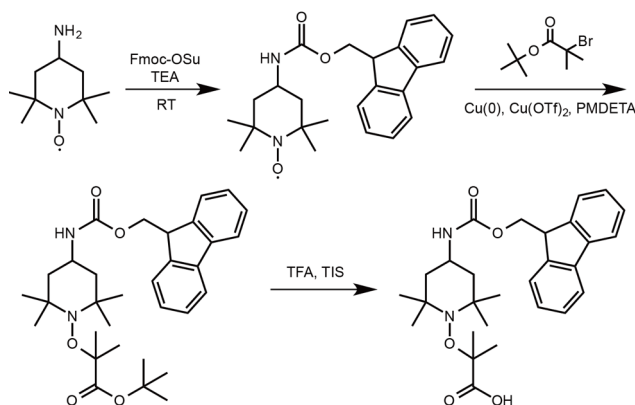
Figure 5-3. Conceptual scheme for the synthesis of multiblock peptide-polymer hybrids *via* NMP. (a) Radical polymerizations of aromatic vinyl monomers initiated by cyclic peptide containing a thermally labile alkoxyamine bond yield multiblock architectures composed of alternately aligned sequential peptides and vinyl polymers. (b) Schematic illustration of multiblock peptide-vinyl polymer hybrid formation.

Georgesらによって最初に報告されたNMPはスチレン (St) の重合であり、開始剤に過酸化ベンゾイル (BPO)、重合を制御するニトロキシドラジカルとして2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシル (TEMPO) が用いられていた¹⁸⁾。この反応系では、BPOより生成したオキシラジカルがStに付加し、生じたスチルラジカルとTEMPOのニトロキシドラジカルがカップリングする。このとき形成されるアルコキシアミン結合は熱可逆的であるためドーマント種として機能し、制御されたラジカル重合が進行する。この重合機構の特徴は、一つのアルコキシアミン結合が解離することで反応性炭素ラジカルと安定なニトロキシドラジカルという異

なる二種のラジカルが生じ、さらに再カップリングする点である。この点に着目し、本研究ではTEMPO由来アルコキシアミン結合を主鎖骨格に有する環状ペプチドNMP開始剤を設計した。このペプチドは加熱によって開環し、炭素ラジカルとニトロキシドラジカルがNおよびC末端にそれぞれ同時に生じる (Figure 5-3a)。ペプチド末端の炭素ラジカルにより成長反応が進行し、もう一方の末端に存在するニトロキシドラジカルによって成長ラジカルが捕捉される。そのため、得られるポリマーはアルコキシアミン結合を介してマルチブロック構造を形成すると考えられる (Figure 5-3b)。

5-3-2. TEMPO由来アルコキシアミン結合を骨格構造に有する環状ペプチドNMP開始剤の合成

様々なアミノ酸配列の環状ペプチドNMP開始剤はSPPS (Fmoc法) により合成した。まず, Scheme 5-1に従い, アミノ基とカルボキシ基を有する二官能性ヘテロTEMPO由来アルコキシアミン (Fmoc-NH-TEMPO-COOH) の合成を行った。市販の4-アミノ-TEMPOをFmoc-OSuと反応させ, アミノ基をFmoc基で保護した。ニトロキシドラジカルの電子スピン効果により¹H NMRスペクトル測定が行えないため, 分子量をDART MSスペクトル測定により確認した。Fmoc-NH-TEMPOと2-ブロモ-2-メチルプロパン酸*tert*-ブチルを原子移動ラジカル付加反応¹⁹⁾によりカップリングさせ, *tert*-ブチル基を脱保護することで目的のFmoc-NH-TEMPO-COOHを得た。構造決定は¹H NMRスペクトル測定により行い, 理論値に見合うピークが得られたことから純度良く合成できたことがわかった。



Scheme 5-1. Synthetic route to the hetero-bifunctional TEMPO-derived alkoxyamine.

次に, 目的のアミノ酸配列のペプチド [(Leu)₄ (**cPI-1**), (Leu-Gly)₂ (**cPI-2**) and (Glu(OBzl))₄ (**cPI-3**)]を樹脂上に合成し, Fmoc-NH-TEMPO-COOHを導入した後, N末端のアミノ基とAsp側鎖のカルボキシ基を樹脂上で分子内縮合させることで環化させた。一例として, Figure 5-4に **cPI-1**のMALDI-TOF MSおよび¹H NMRスペクトルを示す。MSスペクトルより, 環化反応

前後で分子量が18減少していること、また ^1H NMRスペクトルのプロトン数が目的物に見合うことから、環化反応は完全に進行したといえる。他のアミノ酸配列のペプチドについても同様に環化反応を行い、MALDI-TOF MSおよび ^1H NMRスペクトル測定により構造を確認した。以上、種々のアミノ酸配列を持つTEMPO型環状ペプチドNMP開始剤の合成に成功した。

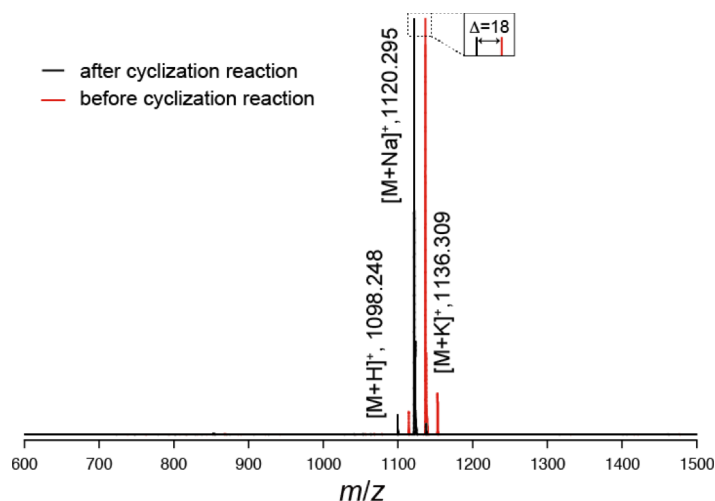


Figure 5-4. (a) MALDI-TOF MS spectra of **cPI-1** obtained before (red) and after (black) cyclization reaction. Matrix: DHBA.

5-3-3. TEMPO型ペプチドNMP開始剤による芳香族モノマーの重合

5-3-3-1. TEMPO型ペプチドNMP開始剤によるスチレンの重合と得られたポリマーの構造解析

まず、**cPI-1**を用いてStの重合を行い、得られたポリマーの構造解析を行った。重合はDMF中110°Cで18 (**P1**), 36 (**P2**), 70 (**P3**) および140時間 (**P4**) 行い、得られたポリマーの M_n および

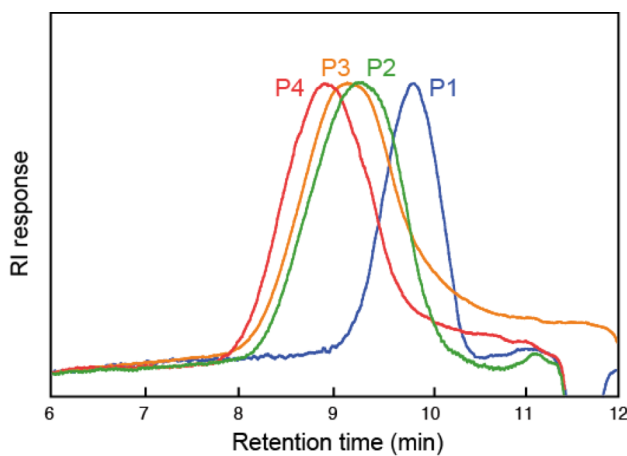


Figure 5-5. SEC traces (THF, 40°C) of the multiblock copolymers (**P1-P4**).

\bar{M}_n はSEC測定により算出した。それらの結果をTable 5-1にまとめた。すべてのポリマーのSECチャートは対称な単峰であり、モノマー転化率の増加にともない高分子量側にシフトした (Figure 5-5)。しかしながら、SECから算出した分子量とモノマー転化率とジブロック構造を仮定して算出した理論分子量 ($M_{n, \text{Theor}} = \text{cPI-1の分子量} + \text{モノマー転化率} \times \text{スチレンの分子量} \times 100$) は大きく異なり (**P1**; $M_n = 4340 \text{ g mol}^{-1}$, $M_{n, \text{Theor}} = 1560 \text{ g mol}^{-1}$, **P2**; $M_n = 9600 \text{ g mol}^{-1}$, $M_{n, \text{Theor}} = 2640 \text{ g mol}^{-1}$, **P3**; $M_n = 10800 \text{ g mol}^{-1}$, $M_{n, \text{Theor}} = 4660 \text{ g mol}^{-1}$, **P4**; $M_n = 21300 \text{ g mol}^{-1}$, $M_{n, \text{Theor}} = 8650 \text{ g mol}^{-1}$), 分布も比較的にブロードであった ($\bar{M}_w/\bar{M}_n \approx 2.0$)。FTIRスペクトル測定を行ったところ, 1639 cm^{-1} および 1532 cm^{-1} に(Leu)₄ブロックに由来するアミド I および II の伸縮振動が, 1600 cm^{-1} にPStブロックに由来するC=C伸縮振動のピークの存在が確認された (Figure 5-6c, 青線)。また, ¹H NMRスペクトル測定において0.9 ppm 付近に(Leu)₄およびTEMPOのメチル基, 4 ppm付近に(Leu)₄のメチン基およびdegのメチレン基, 6.2-7.5 ppm付近にPStのフェニル基に由来するピークがそれぞれ観測された (Figure 5-7, 青線)。以上の結果は, 得られたハイブリッドポリマーはFigure 5-3に示したようなマルチブロック構造を形成していることを示唆している。

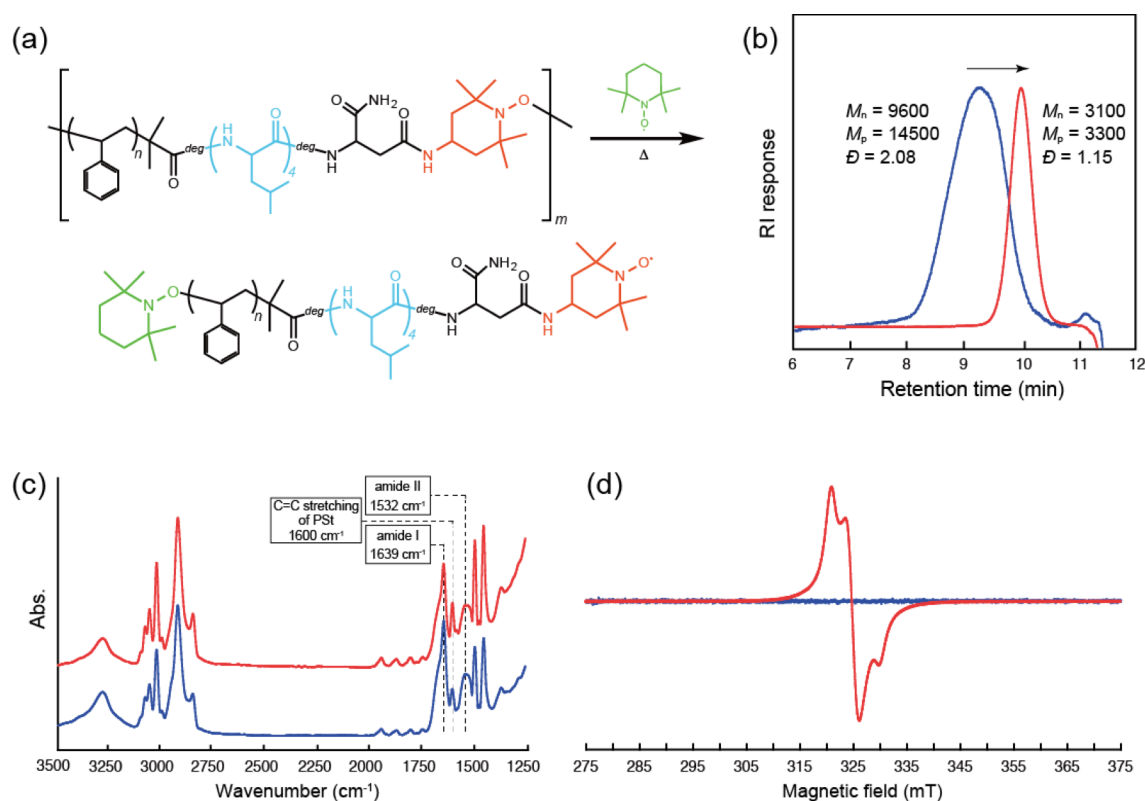


Figure 5-6. (a) Thermal treatment (110°C , 6 h) of **P2** in the presence of excess TEMPO causes fragmentation from multiblock to diblock architectures *via* a radical crossover reaction. (b) SEC traces of multiblock **P2** obtained before (blue) and after (red) fragmentation in THF at 40°C , showing a clear shift towards a lower molecular weight. (c) Transmission-FTIR spectra of **P2** (blue) and fragmented **P2** (red) casted from the CHCl_3 solution onto a CaF_2 plate. (d) ESR spectra of **P2** (blue) and fragmented **P2** (red) in CDCl_3 at -196°C .

そこで、得られたポリマーのマルチブロック構造について検討するため、ラジカル交換反応²⁰⁾によるポリマーのフラグメント化を行った。本手法によって合成されたハイブリッドポリマーがマルチブロック構造を有していると仮定すると、マルチブロック数と同数のアルコキシアミン結合が主鎖内に存在する。そのため、大過剰の安定ラジカル存在下で熱処理することで、ラジカル交換反応によりポリマー鎖が断片化され、ジブロック構造になると考えられる (Figure 5-6a)。P1-P4のフラグメント化は大過剰のTEMPO存在下 (>100当量) *N*-メチル-2-ピロリドン中110°Cで6時間加熱することで行い、生成したフラグメントポリマーを再沈殿により精製・単離した。これらのSEC測定を行ったところ、いずれのポリマーもフラグメント処理前と比較して分子量が大幅に低下しており、分子量分布も狭くなっていることがわかった (Figure 5-6b, 5-8)。例えば、P2の場合ではフラグメント処理後には M_n が9600 g mol⁻¹ ($D=2.08$) から3100 g mol⁻¹ ($D=1.15$)へと変化している (Table 5-1)。一方で、FTIRおよび¹H NMRスペクトルにおいて、フラグメント処理前後でピークの変化はほとんど見られず (Figure 5-6c, 7)、分子量が低下しながらも (Leu)₄ ブロックとPStブロックの組成比は変化しない。すなわち、フラグメント処理前のポリマーは、(Leu)₄-*b*-PStのジブロック構造を基本単位としたマルチブロック構造を有していると考えられる。なお、AIBNを開始剤とした古典的なフリーラジカル重合により合成したPStホモポリマー ($M_n=22700$ g mol⁻¹) を用いて同様の実験を行ったところ、フラグメント処理前後で分子量および多分散度の変化は見られなかった。さらに、フラグメントポリマーのESRスペクトル測定を行ったところ、末端に生成したニトロキシドラジカル由来する有機ラジカルのシグナルが得られた (Figure 5-6d)。フラグメント処理を行っていないポリマーではシグナルが検出されなかった。これは環状構造の可能性も否定できない

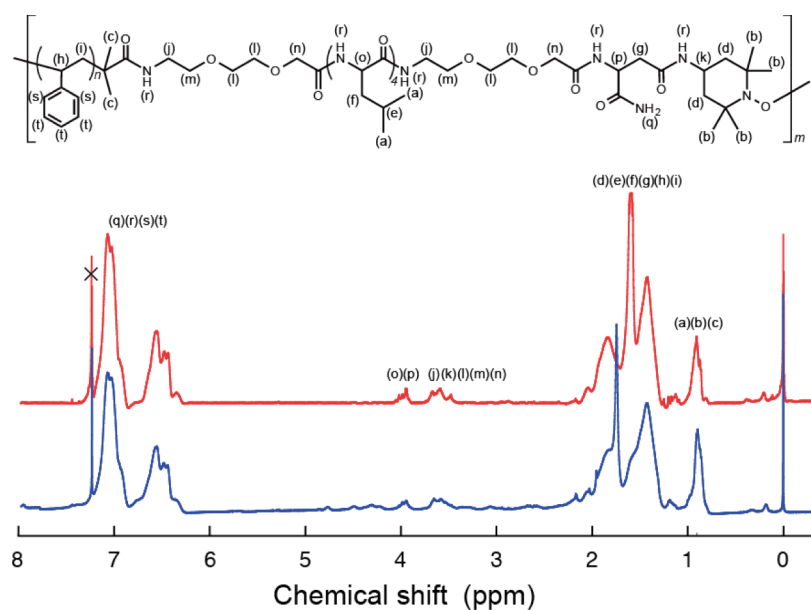


Figure 5-7. ¹H NMR spectra of the multiblock P2 obtained before (blue) and after (red) fragmentation in CDCl₃ at 25°C.

が、マルチブロック構造の場合、末端に存在するニトロキシドラジカルの濃度が低いとと
考えられる。いずれにしても、本手法によりマルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハ
イブリッドのワンステップ合成が達成されたといえる。

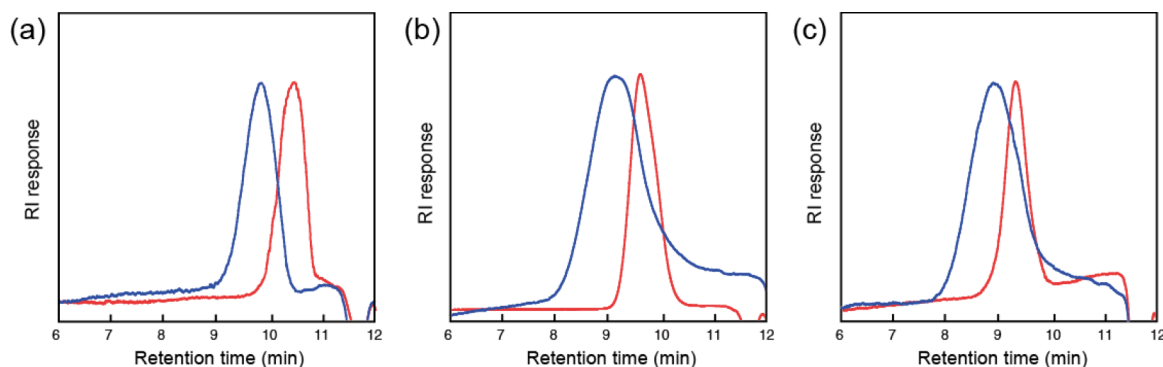


Figure 5-8. SEC traces of (a) **P1**, (b) **P3** and (c) **P4** before (blue) and after (red) fragmentation in THF at 40°C.

フラグメントポリマーの分子量および多分散度を評価することで、Stの重合挙動および得られたPStブロックの構造を明らかにできる。Figure 5-9aに**P1-P4**の各フラグメントポリマーのSEC測定の結果を示した。全てのピークは単峰かつシャープであり、重合時間の増加と共に高分子量側にシフトした。モノマー転化率に対して分子量をプロットしたところ、線形的に増加し、多分散度も $D < 1.3$ であったことから環状ペプチド開始剤を用いたNMPはリビング的に進行していることがわかった (Figure 5-9b)。また、これらの分子量は理論分子量とも良く一致し (Table 5-1)、フラグメント化前後の M_n を比較することで、得られたマルチブロック型ハイブリッドは(Leu)₄-*b*-PStユニットが3~4回繰り返した構造をしていることがわかった。さらに、モノマー転化率を変化させることでPStブロックの長さを容易に調節することができた (Figure 5-9c)。言い換えると、一本のビニルポリマー鎖中でのペプチドブロックの配置を任意に設計できることになる。

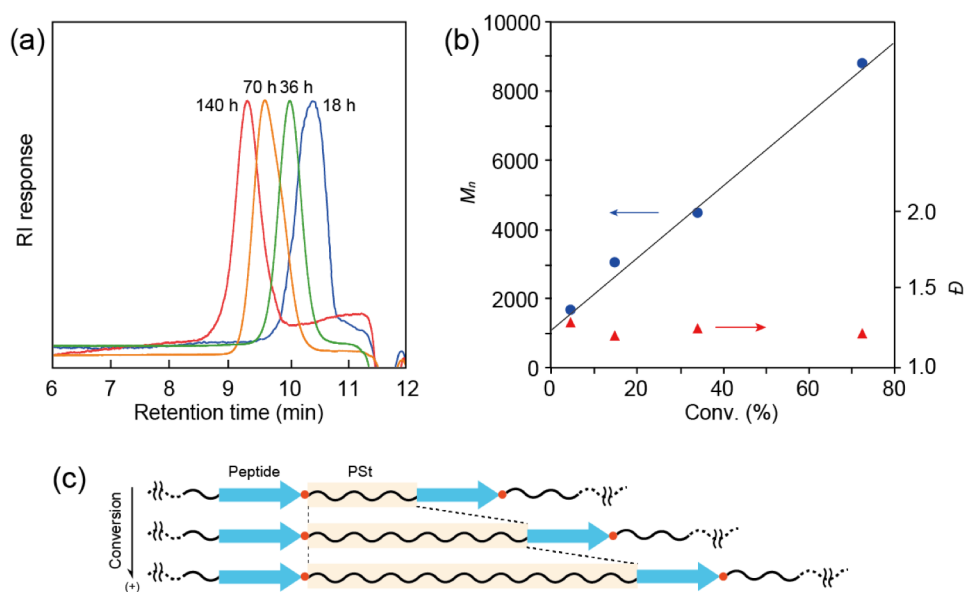


Figure 5-9. (a) SEC traces (THF, 40 °C) of the fragmented block copolymers obtained from **P1–P4**, demonstrating excellent controlled polymerization. (b) Plots of M_n (blue circles) and \bar{D} (red triangles) as a function of conversion. Solid line represents the theoretical M_n . (See footnote (a) in Table 5-1). (c) Schematic model of the multiblock architectures ($[(\text{Leu})_4\text{-}b\text{-PSt}]_m$).

Table 5-1. Summary of the syntheses of the multiblock peptide-polymer hybrids prepared by **cPI-1~cPI-3**.

Polymer	Initiator	Monomer	Sequence of peptide	Polymn. time (hrs)	Polymn. temp. (°C)	Conv. (%)	$M_{n,\text{Theo.}}^a)$ (g mol ⁻¹)	Before fragmentation			After fragmentation		
								M_n (g mol ⁻¹)	$M_p^b)$ (g mol ⁻¹)	\bar{D} (M_w/M_n)	M_n (g mol ⁻¹)	$M_p^b)$ (g mol ⁻¹)	\bar{D} (M_w/M_n)
P1	cPI-1	St	Leu ₄	18	110	4.4	1560	4340 ^{c)}	4430	1.41	1690 ^{c)}	1440	1.27
P2	cPI-1	St	Leu ₄	36	110	14.8	2640	9600 ^{c)}	14500	2.08	3100 ^{c)}	3300	1.15
P3	cPI-1	St	Leu ₄	70	110	34.2	4660	10800 ^{c)}	18900	2.31	4500 ^{c)}	6700	1.22
P4	cPI-1	St	Leu ₄	140	110	72.5	8650	21300 ^{c)}	27500	1.90	8800 ^{c)}	9500	1.18
P5	cPI-2	St	(Leu-Gly) ₂	48	110	58.6	7060	15800 ^{c)}	21600	2.46	9900 ^{c)}	13100	1.42
P6	cPI-3	St	(Glu(OBzl)) ₄	48	110	65.9	8360	22700 ^{c)}	26000	1.99	11500 ^{c)}	16400	1.33
P7	cPI-1	<i>p</i> -ClSt	Leu ₄	18	110	18.3	3630	9800 ^{c)}	13500	1.86	3300 ^{c)}	3700	1.23
P8	cPI-1	4VP	Leu ₄	48	120	42.6	5580	13300 ^{d)}	17800	2.58	4500 ^{d)}	6800	1.16
P9	cPI-1	St/AN (4/1)	Leu ₄	18	120	-	-	23700 ^{d)}	35400	2.05	9400 ^{d)}	12000	1.13

a) Theoretical number-average molecular weight of fragmented polymer calculated by following equation:

$$M_{n,\text{Theo.}} = [\text{monomer}] / [\text{initiator}] \times \text{conversion} \times \text{molecular weight of monomer} + \text{molecular weight of initiator}.$$

b) Molecular weight at peak top in SEC curve.

c) Number-average molecular weight calculated by SEC analysis (PSt standard) in THF at 40 °C.

d) Number-average molecular weight calculated by SEC analysis (PSt standard) in DMF (containing 10 mM LiBr) at 40 °C.

5-3-3-3. アミノ酸配列の異なるTEMPO型ペプチドNMP開始剤によるスチレンの重合

前項より、環状 (Leu)₄NMP開始剤を用いてスチレンを重合すると、ワンステップでマルチブロック型ハイブリッドを得られることが明らかとなった。続いて、本手法がペプチドの配列によらず適用可能かを検討するため、**cPI-2**および**cPI-3**を用いてStの重合を試みた。得られたポリマー (**P5**および**P6**) の構造評価はSEC測定、FTIRおよび¹H NMRスペクトル測定を用いてこれまでと同様に行った (Table 5-1, Figure 5-10)。どちらの開始剤を用いた場合でも、ペプチドとPStからなるマルチブロック型ハイブリッドを得ることができた (**P5**; $M_n=16000 \text{ g mol}^{-1}$, **P6**; $M_n=23000 \text{ g mol}^{-1}$)。これらのポリマーを大過剰のTEMPO存在下でフラグメント化したところ、分子量は大きく低下し、多分散度も比較的小さくなった ($D=1.3\text{-}1.4$)。このように、本手法を用いることで任意の配列のペプチドが組み込まれたマルチブロック型ハイブリッドを容易に合成することができる。それだけでなく、例えば**P6**のGlu残基のベンジルエステル基を脱保護すれば一本のビニルポリマー鎖内に等間隔にカルボキシ基を導入できる。このように、ビニルポリマーの位置選択的な官能基導入も可能であり、精密ビニルポリマーの新しい合成戦略を提供する。

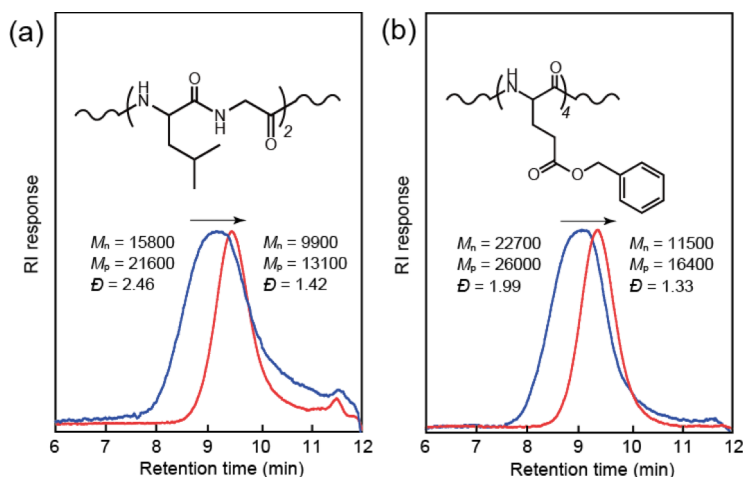


Figure 5-10. SEC traces (THF, 40 °C) of the multiblock **P5** (a) and **P6** (b) obtained before (blue) and after (red) fragmentation.

5-3-3-4. TEMPO型ペプチドNMP開始剤を用いた各種芳香族ビニルモノマーの重合

続いて、St以外の芳香族モノマー (*p*-ClStと4VP) の単独重合およびSt/ANの共重合を開始剤に**cPI-1**を用いて試みた。得られたポリマー (**P7**, **P8**および**P9**) の構造評価はこれまでと同様の測定により行った (Table 5-1, Figure 5-11)。全てのハイブリッドポリマーはマルチブロック構造を有しており、それらのビニルポリマーブロックは良く制御されていた ($D=1.13\text{-}1.23$)。特筆すべきは、環状ペプチド開始剤を用いてSt/ANの共重合が可能な点である。St/ANコポリ

マーはSAN樹脂といわれ、機械的強度と化学的耐性に優れているため、汎用プラスチックとして広く用いられている。一般的に、TEMPOを用いたNMPは芳香族モノマーしかリビング的に重合することはできず、アクリロニトリルなどのアクリレート系モノマーには適用できない。しかしながら、スチレンを主成分とした共重合であればリビング的に重合できることが報告されている²¹⁾。実際に**cPI-1**を用いて得られたSt/ANコポリマーからなるマルチブロック型ハイブリッドのFTIRおよび¹H NMRスペクトルでは、2240 cm⁻¹にC≡N伸縮振動に由来するピークおよび3.3 ppm付近に-CH(C≡N)-に由来する¹Hシグナルがそれぞれ観測された。また、フラグメントポリマーの分子量は $M_n=9600 \text{ g mol}^{-1}$ 、多分散度は $D=1.13$ であったことから、制御された共重合が進行したといえる。

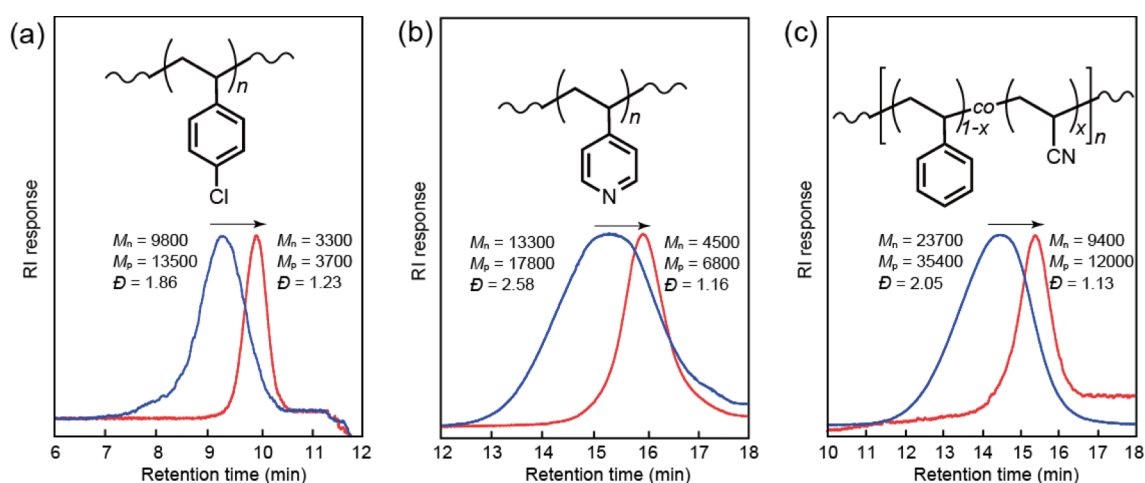


Figure 5-11. SEC traces of the multiblock **P7** (a, (THF, 40 °C)), **P8** and **P9** (b, c (DMF, 40 °C)) obtained before (blue) and after (red) fragmentation.

5-3-4. 適用可能なビニルモノマー種の拡張を目指したペプチドNMP開始剤の新規設計

これまでに、TEMPO由来アルコキシアミン結合を主鎖骨格に有する環状ペプチドNMP開始剤を用いることで、ワンステップでマルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドが得られることを明らかとした。しかしながら、TEMPO由来アルコキシアミンのC-ON結合の解離定数 (k_d) が小さいため²²⁾、適用可能なモノマーはStに代表される芳香族性のものに限られていた。そこで、本手法における適用モノマー種の拡張を目指し、新たな環状ペプチド開始剤を設計した。ここでは、2,2,5-トリメチル-4-フェニル-3-アザヘキサン-3-ニトロキシド (TIPNO) に着目した。TIPNOは窒素原子に隣接する α -炭素原子にプロトンが1つ結合した特徴的な構造を有しており、このプロトンがアルコキシアミン結合の k_d を上昇させることで様々なモノマーのリビング重合を可能とする²⁴。このことを踏まえ、環状ペプチドNMP開始剤のモノマー適用性を向上させるため、新たにTIPNO由来アルコキシアミン結合を主鎖骨格

に有する環状ペプチドNMP開始剤を新規に合成することにした (Figure 5-12). なお、ペプチドの配列には構造解析が行いやすく自己集合性をもつ (Leu)₄を採用した. この新規環状ペプチド開始剤を用いて様々なビニルポリマーとペプチドからなるマルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドのワンステップ合成を目指した.

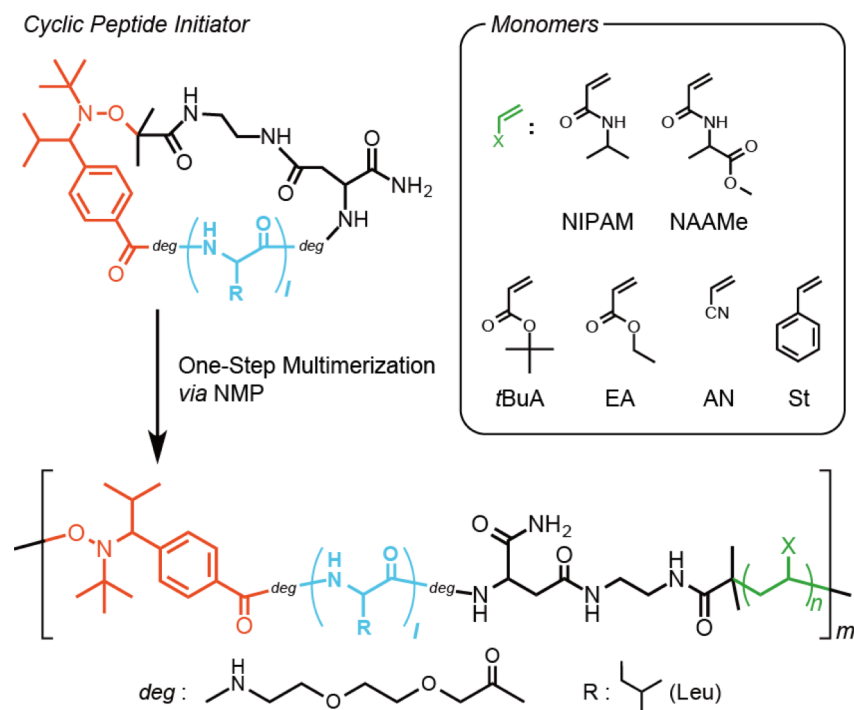


Figure 5-12. Schematic illustration of the one-step synthesis of versatile multiblock peptide-polymer hybrids *via* NMP utilizing the TIPNO-based cyclic peptide initiator.

5-3-5. TIPNO由来アルコキシアミン結合を骨格構造に有する環状(Leu)₄NMP開始剤の合成

まず, Scheme 5-2 に従って, ヘテロ二官能性 TIPNO 由来アルコキシアミン (Fmoc-NH-TIPNO-COOH) の合成を行った. *N*-Boc-EDAをFmoc-OSuを用いてFmoc基で保護したのち, 塩酸で処理することで*N*-Fmoc-EDA・HClを得た. 次いで, 臭化2-ブロモ-2-メチルプロパノイルを反応させることでFmoc-EDA-Brとした. *N*-*tert*-ブチル- α -イソプロピルニトロンは2-ニトロプロパンとイソブチルアルデヒドの還元的付加反応により合成した²³. 4-ヨード安息香酸*tert*-ブチルは4-ヨード安息香酸を塩化チオニルで処理したのち, カリウム*tert*-ブトキシドと反応させることで得た. これらの構造は¹H NMRスペクトル測定により確認した. 一般的に, エステルやニトリルなどの官能基を有する化合物からグリニャール試薬を調製することはできない. しかしながら, 低温下でヨウ化アリールと*i*PrMgBrの金属-ハロゲン交換反応により調製できることが見出されている²⁴. この方法に従い, *i*PrMgBrと4-ヨード安息香酸*tert*-ブチルの金属-ハロゲン交換反応をTHF中-30°Cで1時間行った. 調製したグリニャール試薬と

NCNC(Boc)C(F)(F)F
 $\xrightarrow[\text{ii) HCl}]{\text{i) Fmoc-OSu, TEA}}$
NC(F)(F)FNC(F)(F)FNC(F)(F)F
 $\xrightarrow[\text{TEA}]{\text{BrC(=O)C(Br)C(C)(C)C}}$
NC(F)(F)FNC(F)(F)FNC(=O)C(C)(C)C

CC(C)=O + CC(C)(C)[N+](=O)[O-]
 $\xrightarrow[\text{RT}]{\text{Zn/NH}_4\text{Cl}}$
CC(C)C(C)(C)[N+](=O)[O-]

CC(C)C(C)(C)[N+](=O)[O-] + CC(C)C(C)(C)OC(=O)c1ccc(I)cc1
 $\xrightarrow[-30^\circ\text{C}]{\text{MgI}}$
CC(C)C(C)(C)[N+](=O)[O-] + CC(C)C(C)(C)OC(=O)c1ccc(OC(=O)C(C)(C)C)cc1

CC(C)C(C)(C)[N+](=O)[O-] + CC(C)C(C)(C)OC(=O)c1ccc(OC(=O)C(C)(C)C)cc1
 $\xrightarrow[\text{Air}]{\text{Cu(OAc)}_2}$
CC(C)C(C)(C)[N+](=O)[O-] + CC(C)C(C)(C)OC(=O)c1ccc(OC(=O)C(C)(C)C)cc1

CC(C)C(C)(C)[N+](=O)[O-] + CC(C)C(C)(C)OC(=O)c1ccc(OC(=O)C(C)(C)C)cc1
 $\xrightarrow[\text{Me}_4\text{Cyclam, Cu(OTf)}_2]{\text{Fmoc-EDA-Br, Cu(0)}}$
CC(C)C(C)(C)[N+](=O)[O-] + CC(C)C(C)(C)OC(=O)c1ccc(OC(=O)C(C)(C)C)cc1

CC(C)C(C)(C)[N+](=O)[O-] + CC(C)C(C)(C)OC(=O)c1ccc(OC(=O)C(C)(C)C)cc1
 $\xrightarrow[\text{TIS}]{\text{TFA}}$
CC(C)C(C)(C)[N+](=O)[O-] + CC(C)C(C)(C)OC(=O)c1ccc(OC(=O)C(C)(C)C)cc1

(a)

(b)

Chemical structure of compound 1 is shown with 20 labeled atoms (a-t). The ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) shows peaks corresponding to these labels: (a) at ~2.1 ppm, (b) and (c) at ~1.2 ppm, (d), (e), and (f) at ~1.5 ppm, (g) at ~2.5 ppm, (h) at ~3.5 ppm, (i) and (j) at ~4.5 ppm, (k), (l), (m), and (n) at ~5.5 ppm, (o), (p), (q), (r), (s), (t), (u), (v), (w), and (x) at ~7.5 ppm. Solvent peaks for H_2O and DMSO are marked with 'x'.

105

Fmoc-EDA-BrとTIPNO-COOtBuを原子移動ラジカル付加反応によりカップリングさせ、*tert*-ブチル基を脱保護することで目的のFmoc-NH-TIPNO-COOHを得た。構造決定は¹H NMRスペクトル測定により行い、理論値に見合うピークが得られたことから純度良く合成できたことがわかった。次に、目的の配列のペプチドを樹脂上に合成し、Fmoc-NH-TIPNO-COOHを導入した後に樹脂上で環化させることで目的の環状ペプチドNMP開始剤 (**cPI-4**) を得た。MALDI-TOF MSスペクトル測定を行ったところ理論値と一致する分子量が、¹H NMRスペクトル測定より目的物の構造に見合うピークが得られたことから、合成に成功したといえる (Figure 5-13).

5-3-6. TIPNO型ペプチドNMP開始剤によるアクリルアミド系およびアクリレート系モノマーの重合

5-3-6-1. TIPNO型(Leu)₄NMP開始剤による*N*-イソプロピルアクリルアミドの重合と構造解析

この**cPI-4**を用いてアクリルアミド系、アクリレート系、アクリロニトリルおよびスチレンモノマーの重合を行った。まず、NIPAMの重合をDMF中120°Cで1 (**P10**), 3 (**P11**), 6 (**P12**), 12 (**P13**) および24時間 (**P14**) 行い、得られたポリマーの M_n と D を算出した (Table 5-2)。すべてのポリマーのSECチャートは単峰であり、モノマー転化率の増加にともない高分子量側にシフトした (Figure 5-14)。しかしながら、SECから算出した分子量とモノマー転化率から算出した理論分子量 (ジブロック構造仮定) は大きく異なり (**P10**; $M_n=7000 \text{ g mol}^{-1}$, $M_{n, \text{Theor}}=2820 \text{ g mol}^{-1}$, **P11**; $M_n=11200 \text{ g mol}^{-1}$, $M_{n, \text{Theor}}=4850 \text{ g mol}^{-1}$, **P12**; $M_n=19700 \text{ g mol}^{-1}$, $M_{n, \text{Theor}}=6400 \text{ g mol}^{-1}$, **P13**; $M_n=24500 \text{ g mol}^{-1}$, $M_{n, \text{Theor}}=9100 \text{ g mol}^{-1}$, **P14**; $M_n=38600 \text{ g mol}^{-1}$, $M_{n, \text{Theor}}=11400 \text{ g mol}^{-1}$)、多分散度も比較的にブロードであった ($D \approx 1.8$)。これらのポリマーは水に溶解し、PNIPAMブロック

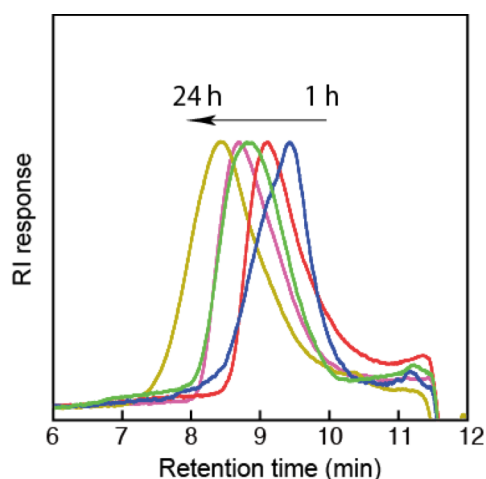


Figure 5-14. SEC traces (THF, 40°C) of the multiblock copolymers (**P10-P14**) obtained after polymerization for 1 (blue), 3 (red), 6 (green), 12 (pink) and 24 h (yellow).

Table 5-2. Summary of the syntheses of the multiblock peptide-polymer hybrids prepared by **cPI-4**.

Polymer	Monomer	Polymn. time (hrs)	Polymn. temp. (°C)	Conv. (%)	$M_{n, Theor}^a)$ (g mol ⁻¹)	Before fragmentation			After fragmentation		
						M_n	$M_p^b)$	\bar{D} (M_w/M_n)	M_n	$M_p^b)$	\bar{D} (M_w/M_n)
P10	NIPAM	1	120	14.0	2820	7000 ^{d)}	10300	1.77	2400 ^{d)}	3400	1.20
P11	NIPAM	3	120	32.1	4850	11200 ^{d)}	17800	1.67	3800 ^{d)}	4800	1.25
P12	NIPAM	6	120	45.6	6400	19700 ^{d)}	30600	1.87	7500 ^{d)}	9600	1.19
P13	NIPAM	12	120	69.8	9100	24500 ^{d)}	36100	1.67	8300 ^{d)}	12900	1.21
P14	NIPAM	24	120	89.9	11400	38600 ^{d)}	64300	2.12	12400 ^{d)}	21800	1.28
P15	<i>t</i> BuA	17	120	79.4	11400	26300 ^{d)}	42800	1.89	9500 ^{d)}	13100	1.18
P16	EA	25	120	42.6	5500	9500 ^{d)}	18400	1.63	3700 ^{d)}	6200	1.22
P17	AN	16	120	97.7	6400	34200 ^{e)}	43500	1.54	13400 ^{e)}	15200	1.38
P18	St	72	110	76.5	9200	38800 ^{e)}	55000	1.77	8400 ^{e)}	9100	1.10

a) Theoretical number-average molecular weight of fragmented polymer calculated by following equation:

$$M_{n, Theor.} = [\text{monomer}] / [\text{initiator}] \times \text{conversion} \times \text{molecular weight of monomer} + \text{molecular weight of initiator.}$$

b) Molecular weight at the top of the peak in the SEC curve.

c) Number-average molecular weight calculated by SEC analysis (PSt standard) in THF at 40 °C.

d) Number-average molecular weight calculated by SEC analysis (PMMA standard) in THF at 40 °C.

e) Number-average molecular weight calculated by SEC analysis (PMMA standard) in DMF (containing 10 mM LiBr) at 40 °C.

に由来するLCST挙動を示した。一方で、CDスペクトル測定を行ったところ、208 nmに負の極大吸収および218 nmにショルダーからペプチドブロックの存在が確認され、 β -シート構造とランダムコイル構造が混在した二次構造を形成していることがわかった (例 **P11**: Figure 5-15b, 青線)。さらに、¹H NMRスペクトル測定からもペプチドおよびPNIPAMブロックの存在が確認された (Figure 5-15c, 青線)。これらの結果から、TIPNO型環状ペプチド開始剤の開環とそれに伴うNMPによりNIPAMの重合が進行し、マルチブロック構造を形成していると考えられる。なお、マルチブロック型ハイブリッドのLCSTは最もPNIPAM鎖の鎖長が長いもの (**P14**) でさえ、PNIPAMホモポリマーと比較して低温側にシフトした (Figure 5-16)。これは、(Leu)₄ブロックがマルチに導入されたことにより、ポリマー全体の疎水性度が上昇したためと考えられる。次に、**P10-P14**のラジカル交換反応によるフラグメント化を行った。大過剰のTIPNO存在下 (>70当量) *N*-メチル-2-ピロリドン中120°Cで12時間加熱することで行い、生成したフラグメントポリマーを再沈殿により精製・単離した。これらのSEC測定を行ったところ、フラグメント処理前と比較して分子量が大幅に低下しており、分布も狭くなっていることがわかった。例えば、**P11**の場合ではフラグメント処理後には M_n が11200 g mol⁻¹ (\bar{D} =1.67) から3800 g mol⁻¹ (\bar{D} =1.25) へと変化している (Figure 5-15a, 赤線)。¹H NMRおよびFTIRスペクトルにおいてはフラグメント処理前後でピークの変化はほとんど見られず (Figure 5-15c), 分子量が低下しながらも (Leu)₄ ブロックとPNIPAMブロックの組成比は変化していない。一方で、CDスペクトルはフラグメント後において200 nmに負の極大吸収が出現しており、ペプチドのコンフォメーションはランダムコイル構造へ転移していることがわかった (Figure 5-15b, 赤線)。このことはペプチドとPNIPAMブロックが交互に配列されたユニークなマルチブロック構造によるペプチドの局所濃度の増加に基づくものと考えられる。実際にマルチブロック構造中のペプチドブロックの二次構造は、PNIPAM鎖長が長くなると局所濃度の低下に伴いランダムコイル構造となった (Figure 5-17)。以上のことから、PNIPAMと(Leu)₄からなるマルチブ

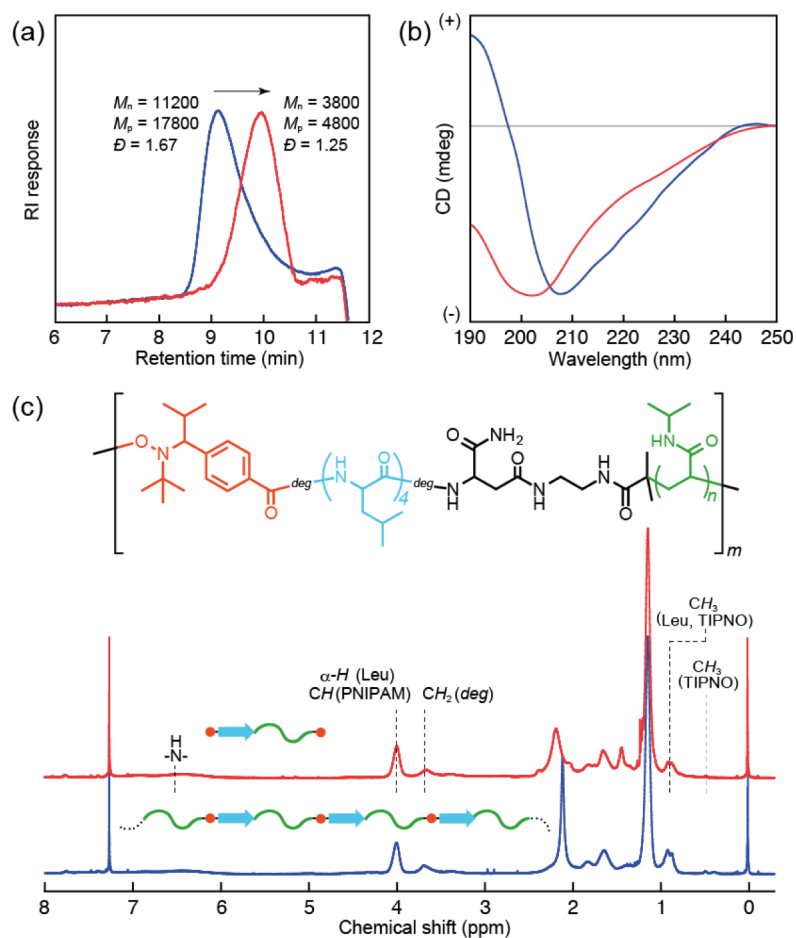


Figure 5-15. (a) SEC traces (THF, 40°C) of the multiblock **P11** obtained before (blue) and after (red) fragmentation. (b) CD spectra of **P11** (blue) and fragmented **P11** (red) in water at 25°C. [polymer]=0.01 wt%. (c) ^1H NMR spectra of **P11** (blue) and fragmented **P11** (red) in CDCl_3 at 25°C.

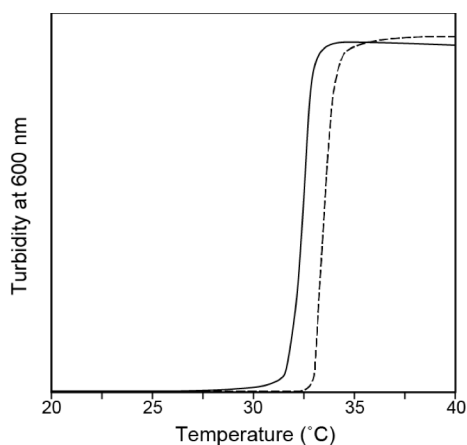


Figure 5-16. Turbidity measurements of **P14** (solid line) and PNIPAM homopolymer ($M_n=74000 \text{ g mol}^{-1}$) (dashed line) in water at 600 nm. [Polymer]=1 wt%.

ロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合成に成功し、また、PNIPAM鎖長が短い場合、(Leu)₄ブロックは水中で β -シート構造を形成し自己組織化していることを明らかにした。

先にも述べたように、フラグメントポリマーの分子量および多分散度を評価することで、NIPAMの重合挙動および得られたPNIPAMブロックの構造を明らかにできる。Figure 5-18aにP10-P14の各フラグメントポリマーのSEC測定の結果を示した。全てのピークは単峰かつシャープであり、重合時間の増加と共に高分子量側にシフトした。モノマー転化率と M_n の変化に

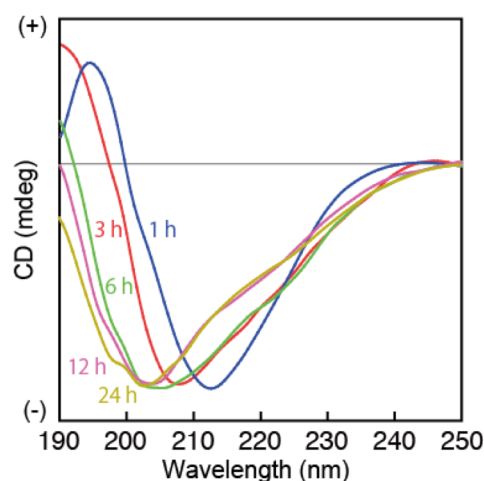


Figure 5-17. (a) CD spectra of P10-14 obtained at different polymerization time in water at 25°C. [polymer]=0.01 wt%.

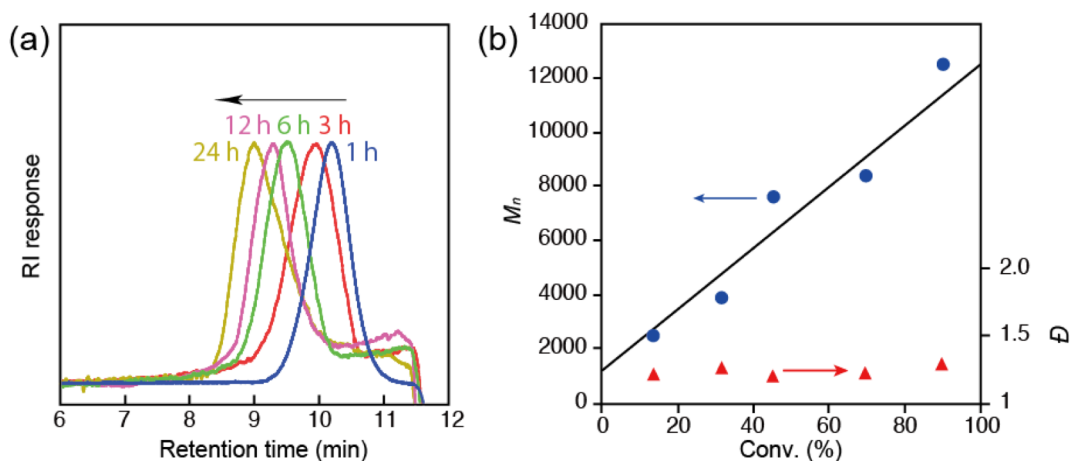


Figure 5-18. (a) SEC traces (THF, 40°C) of the fragmented block copolymers obtained from P10-P14, demonstrating excellent controlled polymerization. (b) Plots of M_n (blue circles) and D (red triangles) as a function of the conversion rate. The solid line represents the theoretical M_n (see the footnote (a) in Table 5-2).

は良好な直線関係が認められ、多分散度も $D < 1.3$ であった (Figure 5-18b). また、これらの分子量は理論分子量とも良く一致し (Table 5-2)、重合はリビング的に進行していることがわかる. このことから、得られたマルチブロック型ハイブリッドは、(Leu)₄-*b*-PNIPAMユニットが3~4回繰り返した構造を有しており、モノマー転化率を変化させることでPNIPAMブロックの長さを容易に調節できることがわかった. TEMPO型ペプチド開始剤ではアクリルアミド系モノマーの重合を制御できないことから、TIPNO型ペプチド開始剤の有用性を示す結果である.

5-3-6-2. TIPNO由来アルコキシアミン結合を骨格構造に有する環状(Leu)₄NMP開始剤によるアクリレート系モノマーの重合

続いて、アクリレート系モノマー (*t*BuAおよびEA) の重合をcPI-4を用いて行った. 得られたポリマー (P15およびP16) の構造評価はこれまでと同様の測定により行った (Table 5-2). 全てのハイブリッドポリマーはマルチブロック構造を有しており (P15: $M_n = 26300 \text{ g mol}^{-1}$, P16: $M_n = 9500 \text{ g mol}^{-1}$), それらのポリマーブロックは良く制御されていた ($D < 1.25$). P15の*t*BuAブロックは*tert*-ブチル基を脱保護することで容易に親水的なポリアクリル酸 (PAA) に変換することができる. この変換後のポリマーは超純水に溶解した. また、pHを下げることでPAAブロックのカルボキシ基のプロトン化により沈殿するpH応答性を示した. 次に、ANの単独重合を試みた. 先に述べたように、TEMPO型環状(Leu)₄NMP開始剤の場合、ANの単独重合を行うことはできず、Stと共重合させる (St主成分) 必要があった. しかしながら、TIPNO型(Leu)₄NMP開始剤を用いることでPANと(Leu)₄からなるマルチブロック型ハイブリッド (P17: $M_n = 34200 \text{ g mol}^{-1}$) を得ることが可能となる. 事実、P17のFTIRおよび¹H NMRスペクトル測定を行ったところ、PANブロックに由来するC≡N伸縮振動 (2242 cm^{-1}) および¹Hシグナル (3.2 ppm) に由来するピークが確認された. SEC測定より算出したフラグメントポリマーの多分散度は $D = 1.38$ であり、若干制御性にかけるもののマルチブロック数は3回程度であり、ANの単独重合に成功したといえる. 勿論、TIPNO型(Leu)₄NMP開始剤はスチレンの重合に適用可能であり、制御されたPStブロックを有するマルチブロック型ハイブリッドを得ることができる (P18, Table 5-2). また、同条件で重合を行ったのにも関わらず、TIPNO型(Leu)₄NMP開始剤を用いた場合は72時間の重合でモノマー転化率が77%に達するのに対し、TEMPO型の場合は70時間の重合で転化率は34%であった. このことは、TIPNOおよびTEMPO由来アルコキシアミンの k_d の違いを実に反映しているといえる.

5-4. 結言

本研究では、マルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドのワンステップ合成を目指し、TEMPO 由来アルコキシアミンを主鎖骨格内に有する種々の配列 ((Leu)₄, (Leu-Gly)₂ および (Glu(OBzl))₄) の環状ペプチド NMP 開始剤を新規に設計・合成した。これら環状ペプチド開始剤は SPPS 法を用いることで容易に合成することができた。(Leu)₄ 開始剤を用いて St の重合を行ったところ、PSt と (Leu)₄ からなるマルチブロック型ハイブリッドが得られた。重合はリビング的に進行し、PSt の鎖長はモノマー転化率を変えることで任意に調節することが可能であった。また、異なるペプチド配列の開始剤を用いた場合でもマルチブロック型ハイブリッドを得ることができる。すなわち、本手法は様々なアミノ酸配列のペプチドに適用可能であり、多様な構造・機能設計を実現できる。さらに、*p*-ClSt および 4VP の単独重合、St/AN の共重合も可能であった。

適用可能モノマー種を拡張するため、TIPNO由来アルコキシアミンを主鎖骨格内に有する環状(Leu)₄NMP開始剤の新規設計・合成にも成功した。この開始剤を用いてアクリルアミド系モノマーの一種であるNIPAMの重合を行ったところ、マルチブロック型ハイブリッドがワンステップで得られ、PNIPAMブロックの鎖長はモノマー転化率を変えることで任意に調節することが可能であった。また、アクリレート系モノマーである*t*BuAおよびEAの重合にも成功した。さらに、TEMPO型では達成できなかったANの単独重合も可能であった。以上、マルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドのワンステップ合成に成功した。本手法はこれまでマルチブロックポリマーの研究の障壁となっていた合成方法の煩雑さを解決するものであり、配列制御ペプチドと多様なビニルポリマーから構成される新規機能性ポリマーの創成を可能とする。ナノテクノロジー、生物医学および工業材料など、様々な分野への応用が期待される。

参考文献

- 1) B. Perly, A. Douy, B. Gallot, *Makromol. Chem.*, **1976**, 177, 2569.
- 2) S. Lecommandoux, M-F. Achard, J. F. Langenwalter, H. -A. Klok, *Macromolecules*, **2001**, 34, 9100.
- 3) S. Ludwigs, G. Krausch, G. Reiter, M. Losik, M. Antonietti, H. Schlaad, *Macromolecules*, **2005**, 38, 7532.
- 4) T. Koga, M. Koike, S. Kamiwatari, N. Higashi, *Chem. Lett.*, **2011**, 40, 1244.
- 5) D. Eckhardt, M. Groenewolt, E. Krause, H. G. Börner, *Chem. Commun.*, **2005**, 2814.
- 6) H. -A. Klok, J. F. Langenwalter, S. Lecommandoux, *Macromolecules*, **2000**, 33, 7819.
- 7) J. M. Smeenk, M. B. J. Otten, J. Thies, D. A. Tirrell, H. G. Stunnenberg, J. C. van Hest, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 1968.
- 8) O. Rathore, D. Y. Sogah, *Macromolecules*, **2001**, 34, 1477.
- 9) G. W. M. Vandermeulen, C. Tziatzios, H. -A. Klok, *Macromolecules*, **2003**, 36, 4107.
- 10) H. R. Marsden, A. V. Korobko, E. N. M. van Leeuwen, E. M. Pouget, S. J. Veen, N. A. J. M. Sommerdijk, A. Kros, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 9386.
- 11) P. Jing, J. S. Rudra, A. B. Herr, J. H. Collier, *Biomacromolecules*, **2008**, 9, 2438.
- 12) O. Rathore, D. Y. Sogah, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 5231.
- 13) M. Bikram, C-H. Ahn, S. Y. Chae, M. Lee, J. W. Yockman, S. W. Kim, *Macromolecules*, **2004**, 37, 1903
- 14) C. Zhou, B. Leng, J. Yao, J. Qian, X. Chen, P. Zhou, D. P. Knight, Z. Shao, *Biomacromolecules*, **2006**, 7, 2415.
- 15) S. E. Grieshaber, A. J. E. Farran, S. L-Gibson, K. L. Kiick, X. Jia, *Macromolecules*, **2009**, 42, 2532.
- 16) K. Luo, J. Yang, P. Kopečková, J. Kopeček, *Macromolecules*, **2011**, 44, 2481.
- 17) S. E. Grieshaber, B. A. Paik, S. Bai, K. L. Kiick, X. Jia, *Soft Matter*, **2013**, 9, 1589.
- 18) M. Georges, R. P. N. Veregin, P. M. Kazmaier, G. K. Hamer, *Macromolecules*, **1993**, 26, 2987.
- 19) K. Matyjaszewski, B. E. Woodworth, X. Zhang, S. G. Gaynor, Z. Metzner, *Macromolecules*, **1998**, 31, 5955.
- 20) H. Otsuka, K. Aotani, Y. Higaki, A. Tkahara, *Chem. Commun.*, **2002**, 2838.
- 21) T. Fukuda, T. Terauchi, A. Goto, Y. Tsujii, T. Miyamoto, *Macromolecules*, **1996**, 29, 3050.
- 22) S. Marque, C. L. Mercier, P. Tord, H. Fischer, *Macromolecules*, **2000**, 33, 4403.
- 23) D. Benoit, V. Chaplinski, R. Braslau, C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 3904.
- 24) A. E. Jensen, W. Dohle, I. Sapountzis, D. M. Lindsay, V. A. Vu, P. Knochel, *Synthesis*, **2002**, 565.

第六章:

アミノ酸由来成分からなるマルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの設計と単鎖フォールディング

6-1. 緒言

第一章で述べたように、タンパク質は精密に制御された一次構造 (アミノ酸配列) に基づいて特異な立体構造を形成し、様々な優れた機能を発現している。このような分子構造や立体構造制御を合成高分子で達成することは、高分子化学における究極の目標の 1 つといえる。天然のタンパク質は高次構造形成に基づいて、疎水性内部領域の構築、機能活性部位の空間配置やその立体規制 (歪み) を見事に実現しており、機能発現へと結びつけている。近年では合成高分子による人工タンパク質創成を目標に、配列制御重合¹⁻⁵⁾や単鎖フォールディング⁶⁻⁹⁾に関する研究がスタートしている。LRP 法を用いて合成された分子量および多分散度が制御され、官能性側鎖が位置特異的に導入されたビニルポリマーは、分子内における共有¹⁰⁻¹³⁾、動的共有¹⁴⁻¹⁶⁾または非共有結合性相互作用¹⁷⁻²²⁾により、溶液中でタンパク質のような単鎖フォールディングを形成することが報告されている。単鎖フォールディングナノ粒子は、ドラッグデリバリーシステム、センサー、触媒、および生体高分子モデルとして応用可能性を秘めた新しい高分子ナノマテリアルである。本論文でも第四章において、FSYGV ペプチドをコアとするブロック型ハイブリッドがユニマーミセル構造を形成することで、ペプチドブロックの分子内環化反応を促進し、GFP 様の蛍光発光を発現することを明らかにした。また第五章では、合成高分子鎖間に多数の自己組織性ペプチドブロックを等間隔に組み込むことが可能な新規マルチブロック型ハイブリッドの合成法の開発に成功した。この手法によって得られたマルチブロック型の高分子骨格は、ビニルポリマー鎖に自己組織性ブロックが複数かつ均等に含まれる構造であるため、より明確なタンパク質様の単鎖フォールディングの形成に適しているといえる。

そこで本章では、人工タンパク質創成への展開を念頭に、ビニルポリマーブロックにアミノ酸由来のビニルポリマーを採用することにした。また、ペプチドブロックには β -シート形成能を有する (Leu)₄ を採用し、TIPNO 型 NMP ペプチド開始剤を用いてマルチブロック型ハイブリッドを新規に合成した (Figure 6-1)。全てのユニットがアミノ酸由来成分で構成されたハイブリッドポリマーは正に人工タンパク質創成の第一歩であるといえよう。

アミノ酸由来ビニルポリマーは、(メタ)アクリロイル基をアミノ酸に導入した後に重合する^{23, 24)}、またはペンタフルオロフェニル基などの良好な脱離基を有するプレポリマーをいったん合成した後にアミノリシスによりアミノ酸をビニルポリマー側鎖に導入することで得られる²⁵⁾。主な天然アミノ酸に限定しても 20 種類存在するため、様々な組み合わせや分子設計が可能である。アミノ酸の種類によって得られるビニルポリマーの特性は異なるが、水溶性のものは多くの場合で LCST または上限臨界溶液温度 (UCST) 型の温度応答挙動を

示すことがこれまでにわかっている^{23, 24)}。代表的な温度応答性高分子である PNIPAM と比較して、アミノ酸の構造に由来した生体親和性や光学活性、pH 応答性なども期待でき、機能設計の面で大きなアドバンテージがある。特筆すべきは、アミノ酸種によって LCST が異なるため、共重合させることで任意に LCST をチューニングできる点である。事実、 α -カルボキシ基をメチルエステル化したアラニン由来のポリマーは 18°C 付近、グリシン由来のポリマーは 73°C 付近に LCST を示し、これらを共重合させて得られるポリマーをそのコポリマー組成比に応じて 18-73°C の間で LCST を任意に制御できる²⁴⁾。このように、アミノ酸由来ビニルポリマーは分解生成物が生体成分であるアミノ酸であるだけでなく、高い水溶性と温度応答性も合わせ持つ優れたビニルポリマーである。そのため、ペプチドとアミノ酸由来ビニルポリマーからなるマルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドはタンパク質モデルとしての重要性にとどまらず、DDS キャリアやバイオセンサーなどへの応用展開が可能なこれまでにない新しい刺激応答性ナノバイオマテリアルとなりうる。本章では、まずアミノ酸由来ビニルポリマーの生体材料としてのポテンシャルを検討した後に、ペプチドとのマルチブロック化を行い、その単鎖フォールディング現象について検討した。

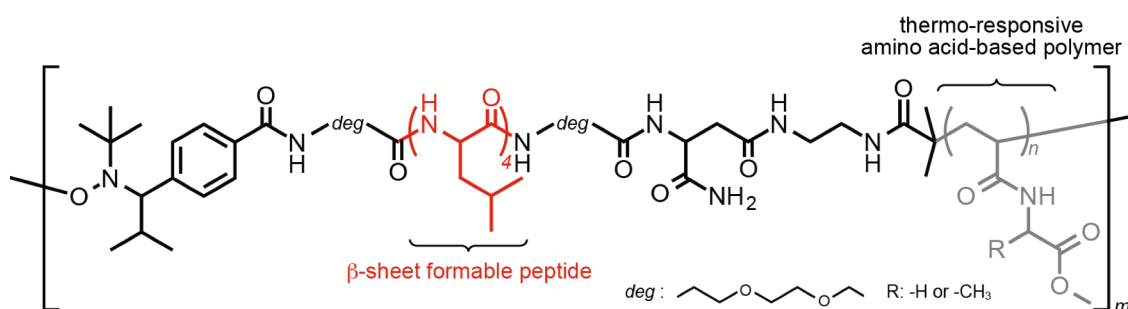


Figure 6-1. Chemical structure of a multiblock peptide-polymer hybrid composed of alternating aligned tetra-leucine and thermo-responsive amino acid-based vinyl polymer.

6-2. 実験方法

6-2-1. 試薬

ピレン, 3-アミノプロピルトリエトキシシラン (3-APTES), 重水 (D_2O) および 3-(トリメチルシリル)-1-プロパンスルホン酸ナトリウム (DSS) はナカライテスク株式会社から, アスコルビン酸 (AsAc), 2-ブロモ-2-メチルプロパン酸エチル, 塩化ナトリウムおよび臭化リチウム (LiBr) は和光純薬工業株式会社から, グリシン-*O*-メチルエステル塩酸塩およびアラニン-*O*-メチルエステル塩酸塩は渡辺化学工業株式会社から, エチレンビス(2-ブロモイソブチレート) (EbBiB) はシグマアルドリッチジャパン株式会社から購入した.

6-2-2. 合成

6-2-2-1. *N*-アクリロイルグリシン-*O*-メチルエステル (NAGMe) の合成.

グリシン-*O*-メチルエステル塩酸塩 5.00 g (39.8 mmol) およびトリエチルアミン 12.2 mL (87.6 mmol) をクロロホルム (200 mL) に溶解させた. 塩化アクリロイル 3.87 mL (47.8 mmol) をクロロホルム (15 mL) に溶解させ, アミノ酸溶液に氷浴下でゆっくりと滴下した. 滴下終了後, 氷浴を取り除き室温で一晩反応させた. 反応溶液を 1.5 M $MgSO_{4aq}$ (100 mL) を用いて 5 回洗浄したのち有機層を回収し, 無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた. 溶液を減圧濃縮し, ヘキサン/酢酸エチル ($v/v=1/2$) を展開溶媒に用いたシリカゲルカラムにより精製した. 溶媒を減圧除去することで若干量の不純物を含む NAGMe を薄黄色固体として得た. この粗精製物にジエチルエーテル (20 mL) を加え, 40°C に加熱することで溶解させた. 室温で 1 時間静置し再結晶させ, 乾燥させることで純粋な NAGMe を白色固体として得た.

1H NMR ($DMSO-d_6$, TMS): δ 3.63 ppm ($-C(O)OCH_3$, 3H), 3.92 ppm ($-NHCH_2C(O)O-$, 2H), 5.63 and 6.12 ppm ($-CH=CH_aH_a$, 2H), 6.40 ppm ($-CH=CH_aH_a$, 1H), 8.54 ppm ($-CONH-$, 1H).

6-2-2-2. *N*-アクリロイルアラニン-*O*-メチルエステル (NAAMe) の合成.

アラニン-*O*-メチルエステル塩酸塩 5.00 g (35.8 mmol) およびトリエチルアミン 11.0 mL (78.9 mmol) をクロロホルム (200 mL) に溶解させた. 塩化アクリロイル 3.48 mL (43.0 mmol) をクロロホルム (15 mL) に溶解させ, アミノ酸溶液に氷浴下でゆっくりと滴下した. 滴下終了後, 氷浴を取り除き室温で一晩反応させた. 反応溶液を 1.5 M $MgSO_{4aq}$ (100 mL) を用いて 5 回洗浄したのち有機層を回収し, 無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた. 溶液を減圧濃縮し, ジエチルエーテルを展開溶媒に用いたシリカゲルカラムにより精製した. 溶媒を減圧除去することで若干量の不純物を含む NAAMe を薄黄色油状液体として得た. この粗精製物を展開溶媒にジエチルエーテルを用いた塩基性アルミナカラムにより精製し, 溶媒を減圧除去することで純粋な NAAMe を白色固体として得た.

収量: 3.32 g (58.9 %).

$R_f=0.48$ (ジエチルエーテル)

^1H NMR (DMSO- d_6 , TMS): δ 1.30 ppm (-NHCH(CH₃)C(O)O-, 3H), 3.62 ppm (-C(O)OCH₃, 3H), 4.33 ppm (-NHCH(CH₃)C(O)O-, 1H), 5.62 and 6.10 ppm (-CH=CH_aH_{a'}, 2H), 6.27 ppm (-CH=CH_aH_{a'}, 1H), 8.51 ppm (-CONH-, 1H).

6-2-2-3. ATRP 開始点を有するガラス基板の作製

1.0 cm×1.0 cm のガラス基板を SC-1 洗浄液²⁶⁾に 70°C で 30 分間浸漬させた。次に、3-APTES 水溶液 (0.2 wt%) に 60°C で 1 時間浸漬させ、次いで 90°C で 30 分間アニールすることで有機アミノ基をガラス基板表面に導入した。この基板をトリエチルアミン存在下 DMF 中で BiBB と 3 時間反応させることで、基板表面に ATRP 開始点を導入した。

6-2-2-4. 表面開始 ATRP によるポリマーブラシの作製

開始剤導入基板 1 枚につき、NAAMe/NAGMe を合計で 4.2 mmol となるように [NAAMe]:[NAGMe]=1:0, 4:1, 5:1, 0:1 のいずれかの比で秤量し、アスコルビン酸 0.3 mg, CuBr₂ 0.078 mg, PMDETA 0.072 μL , 2-ブromo-2-メチルプロパン酸エチルおよび水/メタノール (v/v=1/1) 混合溶媒を全量で 1.2 mL となるように混和させた。この溶液に開始剤導入基板を浸漬させ、凍結脱気後に封管し、窒素雰囲気下 60°C で 24 時間反応させた。重合後によく洗浄し、乾燥させることでポリマー修飾基板を得た。なお、フリーの開始剤により重合したポリマーはジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法に精製し、白色固体として得た。

6-2-2-5. 二官能性 PNAGMe マクロ開始剤の合成

NAGMe 1.50 g (10.5 mmol), EbBiB 12.6 mg (35 μmol), CuBr 5.0 mg (35 μmol) および Me₆TREN 14.23 μL (52.5 μmol) をモノマー濃度が 3.5 M となるように DMSO/2-プロパノール (v/v=1/1) 混合溶媒に溶解させた。凍結脱気後に封管し、室温で 3 時間反応させた。反応後、クロロホルムを展開溶媒に用いた塩基性アルミナカラムにより銅を除去し、ジエチルエーテル/メタノール (v/v=40/1) 混合溶液を非溶媒とした際沈殿法により精製し、目的の PNAGMe マクロ開始剤を白色固体として得た。

6-2-2-6. PNAAMe-*b*-PNAGMe-*b*-PNAAMe の合成

PNAGMe マクロ開始剤 0.173 g (5.0 μmol), NAAMe 1.100g (7.0 mmol), CuBr 1.4 mg (10 μmol) および Me₆TREN 4.07 μL (15 μmol) をモノマー濃度が 3.5 M となるように DMSO/2-プロパノール (v/v=1/1) 混合溶媒に溶解させた。凍結脱気後に封管し、室温で 30 分間反応させた。反応後、クロロホルムを展開溶媒に用いた塩基性アルミナカラムにより銅を除去

し、ジエチルエーテル/メタノール (v/v=40/1)混合溶液を非溶媒とした際沈殿法により精製し、目的の PNAAMe-*b*-PNAGMe-*b*-PNAAMe を白色固体として得た。

6-2-2-7. (Leu)₄ と PNAGMe から成るマルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッド([(Leu)₄-*b*-PNAGMe]_{*n*}) の合成と断片化

NAGMe 0.286 g (2.0 mmol), **cPI-4** 24.6 mg (0.020 mmol) および DMF (82.4 μL) を試験管内で混合させ、モノマー濃度を約 5 M とした。ただし、この混合物は NAGMe の融点以下では不均一である。液体窒素を用いた凍結脱気により溶存酸素を除去したのちに封管し、120°C で重合を開始させた。重合後 (18 時間)、液体窒素を用いて急冷することで重合を停止させた。その後、反応溶液をジエチルエーテルへ滴下することで生成したポリマーを沈殿させた。DMF を良溶媒、ジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法により精製し、乾燥させることで目的の [(Leu)₄-*b*-PNAGMe]_{*n*} を白色固体として得た。得られた [(Leu)₄-*b*-PNAGMe]_{*n*} (0.10 g, 1.25 μmol) および TIPNO (0.22 g, 1.0 mmol) を *N*-メチル-2-ピロリドン (100 μL) に溶解させた。溶液を試験管に移し、液体窒素を用いた凍結脱気により溶存酸素を除去したのちに封管し、120°C で 12 時間反応させた。ジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法により精製し、目的のフラグメントポリマーを薄山吹色固体として得た。フラグメント前後におけるポリマーの構造決定は ¹H NMR および FTIR スペクトル測定、分子量 (*M_n*) および多分散度 (*D*) の算出は SEC 測定により行った。

SEC (DMF (containing 10 mM LiBr), 40°C, PMMA standard): *M_n*=80400, *M_p*=111900, *D*=2.89 (the original polymer), *M_n*=12100, *M_p*=14300, *D*=1.25 (the fragmented polymer).

¹H NMR (D₂O, DSS) (the original & fragmented polymers): δ 0.39 ppm (>CHCH(CH₃)₂, 3H, enantiomer), 0.90 ppm (Leu, δ-CH₃, 24H; >NC(CH₃)₃, 9H), 1.05-2.70 ppm (PNAGMe, 2*n*H, methylene of main chain; PNAGMe, *n*H, methine of main chain; >CHCH(CH₃)₂, 3H, enantiomer; >C(CH₃)₂, 6H; Leu, γ-CH, 4H; Leu, β-CH₂, 8H; >CHCH(CH₃)₂, 1H; Asp, β-CH₂, 2H), 3.78 ppm (PNAGMe, 3*n*H, methyl ester), 3.87-4.29 ppm (PNAGMe, 2*n*H, α-CH₂), 4.30 ppm (-OC(=O)NHCH₂CH₂NH-, 2H; -OC(=O)NHCH₂CH₂NH-, 2H; -NHCH₂CH₂O-, 4H; -O(CH₂)₂O-, 8H; >CHCH(CH₃)₂, 1H; -NHCH₂CH₂O-, 4H; -OCH₂C(=O)-, 4H; Asp, α-CH, 1H), 4.37 ppm (Leu, α-CH, 4H).

6-2-2-8. (Leu)₄ と PNAAMe から成るマルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッド([(Leu)₄-*b*-PNAAMe]_{*n*}) の合成と断片化

NAAMe 0.157 g (1.0 mmol), **cPI-4** 12.3 mg (0.010 mmol) および DMF (41.2 μL) を試験管内で混合させ、モノマー濃度を約 5 M とした。ただし、この混合物は NAAMe の融点以下では不均一である。液体窒素を用いた凍結脱気により溶存酸素を除去したのちに封管し、120°C で重合を開始させた。重合後 (18 時間)、液体窒素を用いて急冷することで重合を停

止させた．その後，反応溶液をジエチルエーテルへ滴下することで生成したポリマーを沈殿させた．DMF を良溶媒，ジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法により精製し，乾燥させることで目的の $[(\text{Leu})_4\text{-}b\text{-PNAAM}_m]_n$ を白色固体として得た．得られた $[(\text{Leu})_4\text{-}b\text{-PNAAM}_m]_n$ (10.0 mg, 0.31 μmol) および TIPNO (22.0 mg, 100 μmol) を *N*-メチル-2-ピロリドン (100 μL) に溶解させた．溶液を試験管に移し，液体窒素を用いた凍結脱気により溶存酸素を除去したのちに封管し，120°C で 12 時間反応させた．ジエチルエーテルを非溶媒に用いた再沈殿法により精製し，目的のフラグメントポリマーを薄山吹色固体として得た．フラグメント前後におけるポリマーの構造決定は ^1H NMR および FTIR スペクトル測定，分子量 (M_n) および多分散度 (D) の算出は SEC 測定により行った．

SEC (THF, 40°C, PMMA standard): $M_n=32300$, $M_p=53000$, $D=1.46$ (the original polymer), $M_n=12700$, $M_p=19800$, $D=1.23$ (the fragmented polymer).

^1H NMR (CDCl_3 , TMS) (the original & fragmented polymers): δ 0.50 ppm ($>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 3H, enantiomer), 0.90 ppm (Leu, $\delta\text{-CH}_3$, 24H; $>\text{NC}(\text{CH}_3)_3$, 9H), 1.05-2.70 ppm (PNAAMe, 3*n*H, methyl of side chain; PNAAMe, 2*n*H, methylene of main chain; PNAAMe, *n*H, methine of main chain; $>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 3H, enantiomer; $>\text{C}(\text{CH}_3)_2$, 6H; Leu, $\gamma\text{-CH}$, 4H; Leu, $\beta\text{-CH}_2$, 8H; $>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 1H; Asp, $\beta\text{-CH}_2$, 2H), 3.65 ppm (PNAAMe, 3*n*H, methyl ester), 3.25-3.95 ppm ($-\text{OC}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, 2H; $-\text{OC}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, 2H; $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, 4H; $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}-$, 8H; $>\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, 1H; $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, 4H; $-\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})-$, 4H; Asp, $\alpha\text{-CH}$, 1H), 4.00-4.70 ppm (Leu, $\alpha\text{-CH}$, 4H; PNAAMe, *n*H, α -methine), 6.80-8.40 ppm (PNAAMe, *n*H, amide; TIPNO, 4H, aromatic ring; $-\text{CONH}_2$, 2H; amide bonds of peptide, 9H).

6-2-2-9. 細胞実験

マウス由来繊維芽細胞 (NIH3T3) を 80%コンフルエントになるまで，10%のコウシ血清 (FBS) (04-001-1A, コスモバイオ株式会社製) および抗生物質(A5995-100ML, シグマアルドリッチジャパン株式会社製) を含むDMEM (L7A0439, ナカライテスク株式会社製) 中に播種し，37°C，5% CO_2 のインキュベーターで培養した．このNIH3T3細胞を 2.0×10^4 cells cm^{-2} の密度で播種し，37°C，5% CO_2 のインキュベーターで24時間培養した．接着細胞数の評価は共焦点顕微鏡の位相差像および蛍光像から検討した．なお，生細胞はカルセイン-AMで染色した．

6-2-3. 測定

接触角測定は協和界面科学製 Drop Master 501 を用いた．液中気泡法による測定は三態系キットを用いた．マークス型高周波グロー放電発光表面 (GD-OES) 分析は HORIBA 社製 GDProfiler2 を用いて行った．動的光散乱 (DLS) 測定は大塚電子製 DLS 7000 を用いて行った．光源には He-Ne レーザー (632.8 nm) を用い，測定角は 90°とした．相関関数の解析は付属のプログラムを用いて非負拘束最小自乗法 (NNLS) から行った．

6-3. 結果および考察

6-3-1. アミノ酸由来ビニルポリマーのリビングラジカル重合への適用性の検討と生体親和性の評価

β -シート形成能を有するオリゴペプチド ((Leu)₄) とアミノ酸由来ビニルポリマーからなるマルチブロック型ハイブリッドの合成に先立ち、まず、アミノ酸由来ビニルポリマーのリビングラジカル重合への適用性と得られるポリマーの生体親和性および温度応答性を検討することにした。アミノ酸由来ビニルポリマーはアミノ酸構造に基づいて多様な温度応答性を示すことがわかっており、こうした特性をうまく材料設計に生かすことができれば様々な生体機能材料への展開が可能であろう。まず、細胞とのアフィニティーを調べるために、アラニンおよびグリシンメチルエステルからなるビニルモノマー (NAAMe, NAGMe) を調製し、評価を簡便に行うことができる固体表面上に表面開始ATRP (SI-ATRP) により修飾することにした (Figure 6-2)。また、LRPによりブロック化に関する知見を得るため、これらNAAMeおよびNAGMeからなるトリブロック型アミノ酸由来ビニルポリマーの合成を試み、得られたポリマーの生体親和性材料としてのポテンシャルを評価した。

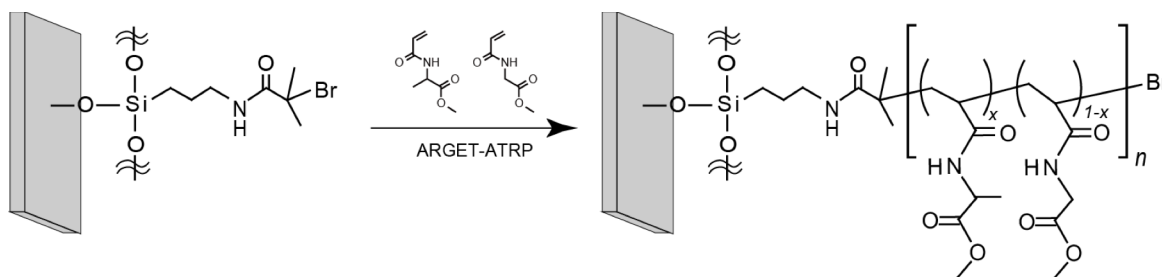


Figure 6-2. Synthetic route of the amino acid-based polymer brush on glass surface.

6-3-2. アミノ酸由来ビニルポリマーブラシの作製とその細胞接着特性

6-3-2-1. アミノ酸由来ビニルポリマーブラシの作製とその温度応答挙動

ポリマーグラフト表面を作製するため、まずガラス基板の表面に3-APTESを縮合させ有機アミノ基を持たせたのち、臭化2-メチル-2-ブロモプロパノイル (BiBB) と反応させることでATRP開始点を導入した。ATR-FTIRスペクトル測定を行ったところ、3-APTES導入後にはメチレンおよびアミノ基に由来する吸収が2950および1600 cm⁻¹に見られ、さらにBiBB導入後には1600cm⁻¹のピークが消失し、新たに1660 cm⁻¹にアミド I、1540 cm⁻¹にアミド II のピークが出現した (Figure 6-3a)。またGD-OES測定からBiBB導入後にはC, N, HおよびBr元素の存在が確認された (Figure 6-3b)。以上のことから、ATRP開始点の導入に成功したといえる。

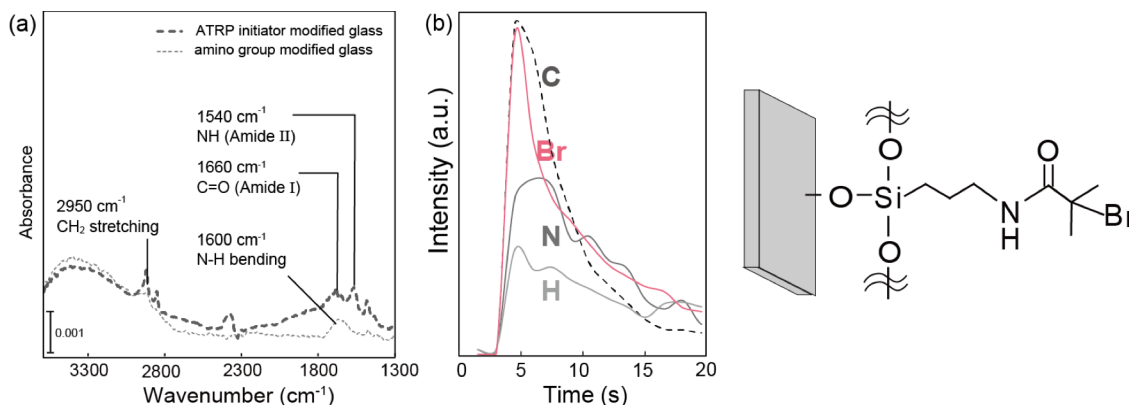


Figure 6-3. ATR-FTIR spectra (a) and GD-OES profile (b) of ATRP initiating point-introduced glass surface.

続いて、アミノ酸由来ビニルモノマーとしてNAAMeを採用し、この基板を開始剤としたARGET ATRP²⁷⁻²⁹⁾によるNAAMeの表面グラフト重合を水/メタノール (v/v=1/1) 混合溶媒中60°Cで24時間行った。重合後、同様の解析を行ったところ、アミド I および II の非常に強い吸収がそれぞれ1656および1540 cm^{-1} に、また新たにエステル結合に由来する吸収が1730 cm^{-1} に出現した (Figure 6-4a)。またGD-OES測定では、重合後においても基板表面にBr元素が存在することがわかった (Figure 6-4b)。これらの結果から、NAAMeの重合はガラス基板表面から進行しているといえる。

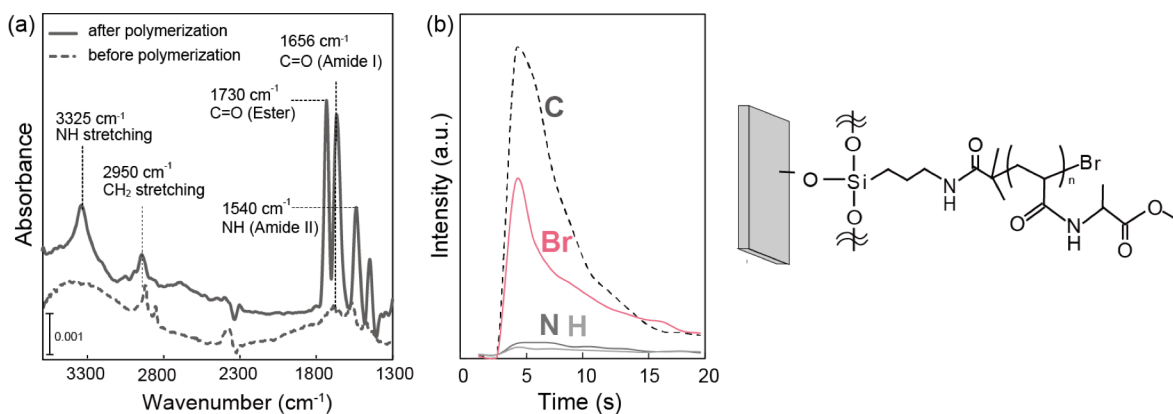


Figure 6-4. ATR-FTIR spectra (a) and GD-OES profile (b) of PNAAMe-grafted glass surface.

ガラス表面に修飾したポリマーの分子量や多分散度を直接解析することは困難である。そこで、表面開始重合を行う際に類似の構造を持つフリーの開始剤を共存させることで、基板に固定されていないポリマーを回収し、解析した。また、先述と同様の手法で新たにP(NAAMe-co-NAGMe) およびPNAGMeブラシの調製を行った。得られたフリーのポリマーを

用いて¹H NMRスペクトル測定よりポリマー組成を，SEC測定より分子量および多分散度を，また透過率測定よりLCSTを決定した．これらの結果はTable 6-1にまとめた．すべてのポリマーにおいて分布が狭い ($\mathcal{D}<1.3$) ことから，表面開始重合はリビング的に進行し，ポリマー鎖は比較的制御されていることがわかった．すなわち，これらのアミノ酸由来ビニルモノマーはLRPに適用できることを示している．また，ポリマー組成は仕込み比によって変化し，NAGMe含有量が増加するに伴いLCSTは上昇した．これは，NAGMeユニットがNAAMeユニ

Table 6-1. Summary of the amino acid-based vinyl polymer brushes synthesized by ARGET ATRP.

Feed ratio in mol (NAAMe:NAGMe)	copolymer composition F_A^*	M_n	\mathcal{D}	LCST(°C)
1:0	1.0	11000	1.28	17
5:1	0.70	6600	1.16	22
4:1	0.66	8200	1.27	25
0:1	0	4900	1.17	72

* $F_A \equiv$ molar fraction of NAAMe in copolymer

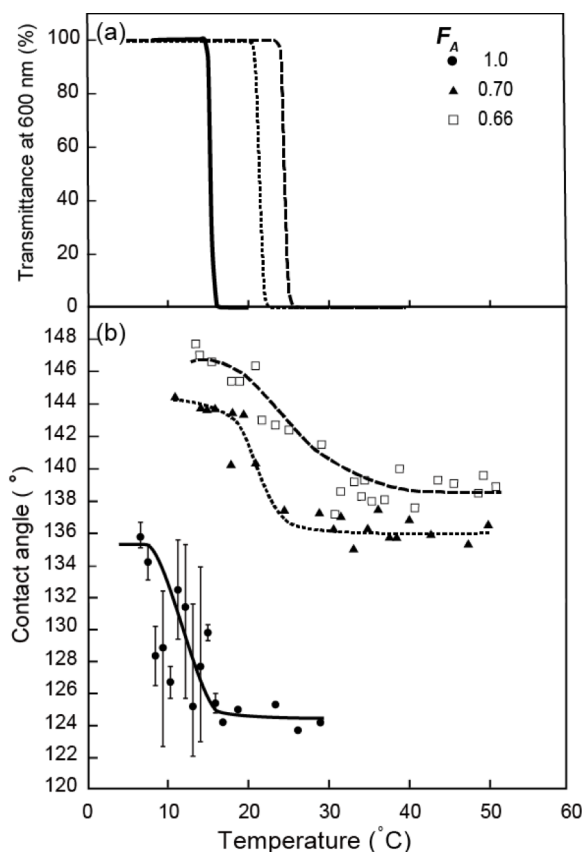


Figure 6-5. Temperature-dependences of amino acid-based polymers in water (a) and on glass surface (b). Transmittances of polymer solution (1 wt%) were measured during heating process of 1°C min⁻¹. Contact angles were measured using captive bubble method.

ットと比較してより親水的なためである．続いて，ポリマーグラフト表面の温度応答性を検討するため，液中気泡法による接触角測定を行った．この方法は水中で行うため，表面の親水性だけでなく温度応答性も評価することができる．Figure 6-5aに遊離ポリマーの透過率測定，Figure 6-5bに温度に対する接触角の変化をプロットした結果を示した．温度上昇に伴い接触角が減少し，表面が疎水的になるLCST型の温度応答挙動を示した．興味深いことに，ポリマーブラシにおいても遊離ポリマーと同様に組成に応じてLCSTが変化し，さらに転移温度域も一致している．以上のことから，ガラス基板表面上でポリマーブラシの作製に成功し，その表面の親水-疎水性は温度によって変化させることができ，またLCSTはポリマー組成によって調節できることがわかった．

6-3-2-2. アミノ酸由来ビニルポリマーブラシ上における細胞接着特性

先に調製したアミノ酸由来ビニルポリマーグラフト基板 (PNAAMe ($F_A=1.0$), P(NAAMe-co-PNAGMe) ($F_A=0.66$)) およびPNAGMe ($F_A=0$)) を用いて，これらアミノ酸由来ビニルポリマーと細胞とのアフィニティを検討した．なお，接触角測定より $F_A=1.0$ および 0.66 のポリマーブラシの転移温度はそれぞれ $10-15^{\circ}\text{C}$ および $22-30^{\circ}\text{C}$ であり， $F_A=0$ は細胞培養温度である 37°C において親水的表面であることがわかっている．NIH3T3細胞を $2.0 \times 10^4 \text{ cells cm}^{-2}$ で播種し，無血清培地中 37°C で24時間培養した．Figure 6-6に各基板上における細胞の接着数と伸展率をまとめた．一般に親水性表面には細胞が接着しにくいことが知られており³⁰⁾，親水性表面である $F_A=0$ の基板上においては接着細胞がほとんど見られなかった．一方， $F_A=1.0$ および 0.66 では細胞の接着・伸展が見られた．ただし，LCST以下においても比較的親水的であった $F_A=0.66$ の基板上における接着数および伸展率は $F_A=1.0$ のものと比較して半分程度であった．また，これらの接着細胞の生存率は90%以上であり，アミノ酸由来ビニルポリマーブラシに細胞毒性が無いことがわかった．

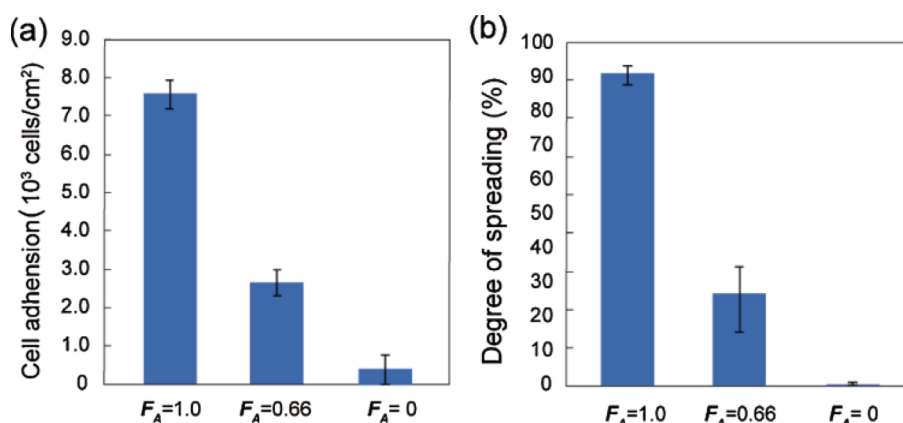


Figure 6-6. Cell adhesion (a) and degree of cell spreading (b) of NIH3T3 cells onto PNAAMe ($F_A=1.0$), PNAGMe ($F_A=0$), and copolymer ($F_A=0.66$) brushes at 24 h after seeding. Error bars represent the standard deviation ($n=3$).

次に、細胞シートの作製を試みた。細胞シート工学とは、Okanoらによって提唱された温度応答性高分子を利用した細胞工学技術である³¹⁾。最も利用されている温度応答性高分子はPNIPAMであり32°C付近にLCSTを示す³²⁾。このPNIPAMを基板表面に固定したとき、PNIPAMのLCSTが32°Cであることから、細胞培養温度37°CではPNIPAM鎖は凝集し、適度な疎水性表面として細胞接着の足場となる。しかし外部温度をLCST以下に冷却すると、表面が親水化することで細胞の自発的な剥離を促す^{33, 34)}。これにより、トリプシンなどのタンパク質分解酵素を必要とせず、温度変化のみで細胞の接着および脱着を制御できる。そのため、細胞間の相互作用を破壊せず、損傷を与えることなく細胞を回収することが可能であり、細胞はシート状で得られる。細胞が接着因子や細胞外マトリックスとともに剥離することから、細胞シート同士の接着が可能となり、組織としての移植や積層化による細胞の再構築に成功した例も報告されており^{35, 36)}、再生医療に重要な技術となりつつある。しかしながら、これまでの研究のほとんどがPNIPAMを用いたものである³⁷⁻⁴²⁾。緒言でも述べたように、アミノ酸由来ビニルポリマーは共重合により転移温度を任意に変えることができる。そのため、広域の温度の中から目的に合わせて任意の温度で細胞剥離を引き起こす基板の作製が可能であり、細胞種に応じた最適な表面の濡れ性をもつ基板が得られるだろう。そこで、アミノ酸由来ビニルポリマーブラシ上での細胞接着および剥離特性についても検討した。NIH3T3細胞を 2.0×10^4 cells cm^{-2} で $F_A=1.0$, 0.66およびポリマーを持たず比較的疎水的なATRP開始剤修飾基板上に播

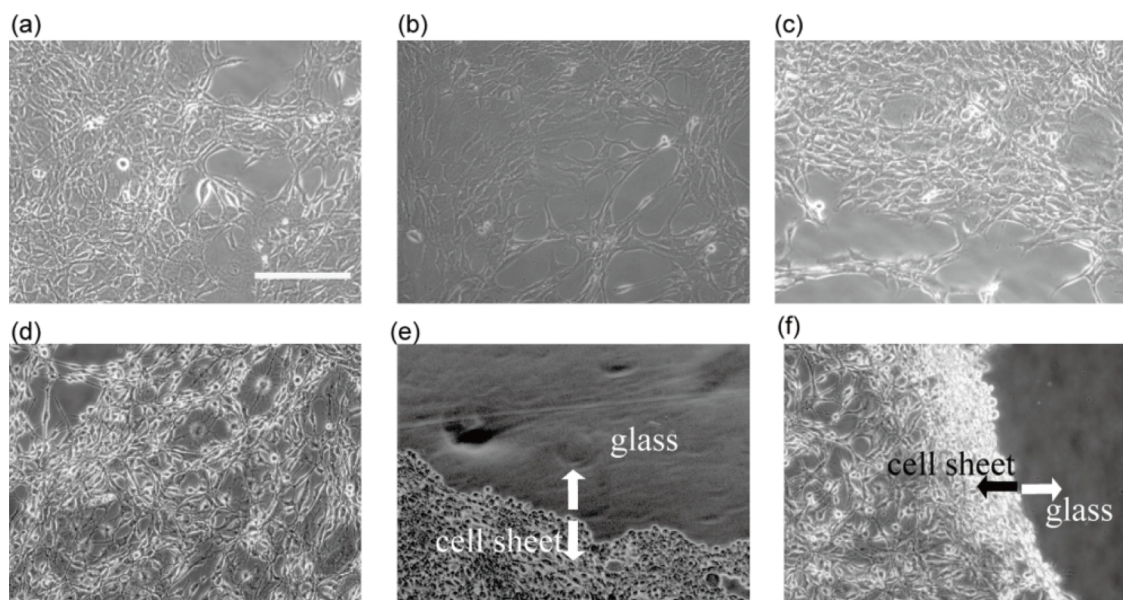


Figure 6-7. Phase contact microscope images of NIH3T3 cells on the polymer brush-free initiator immobilized surface (a, b), the copolymer ($F_A=0.66$) brush-grafted surface (b, e), and PNAAME homopolymer ($F_A=1.0$) brush-grafted surface (c, f). The images (a)-(c) indicate after 4 days-incubation at 37°C, and that of (e) after 20 min-incubation at 20°C, that of (f) just after cooling to 4°C, and that of (d) after 20 min incubation at 4°C.

種し、血清培地中37°Cで培養した。80%コンフルエントになるまで培養した後、それぞれLCST以下に冷却したPBS(-) 緩衝液で基板を洗浄し、 $F_A=1.0$ および開始剤修飾基板は4°Cに、 $F_A=0.66$ の基板は20°Cに冷却したPBS(-) 緩衝液に浸漬させ、細胞の様子を観察した (Figure 6-7)。 $F_A=1.0$ の基板では直ちに細胞が収縮し始め、2分後にはシート状に剥離した。一方、 $F_A=0.66$ の基板においてもシート状に細胞を回収することができたが、20分の時間を要した。なお、開始剤修飾基板の場合は60分以上冷却しても剥離は全く見られなかった。このことから、細胞の剥離はポリマー鎖の相転移に誘発されるものであり、また転移前後の極性変化が大きいほど速やかに剥離が起きることがわかった。得られたシートの生死染色を行ったところ、カルセイン-AMに由来する緑色蛍光を発したことから、細胞は生存していることがわかった。

以上の結果から、アミノ酸由来ビニルモノマーはリビングラジカル重合に適用可能であり、得られるビニルポリマーは生体親和性を有することが明らかとなった。

6-3-3. トリブロック型アミノ酸由来ポリマーの設計

前項より、アミノ酸由来ビニルモノマーはATRPにより重合可能であることが明らかになった。次に、アミノ酸由来ビニルポリマーのブロック化についての知見を得るために、Figure 6-8に示すABA型トリブロック構造のアミノ酸由来ビニルポリマーを新規に合成することにした。異なる温度応答性を有する高分子からなるABA型トリブロックポリマーは、親水性、親水-疎水-親水または疎水-親水-疎水の両親媒性、疎水性など、温度により高分子の特性を変化させる。特に、B-ブロックにLCSTが高いポリマーを用いることで、ユニークな会合挙動を示すだけでなく、A-ブロックのLCST以上かつB-ブロックのLCST以下では疎水性相互作用によるハイドロゲル形成なども期待できる。そこで、A-ブロックにはアラニン由来のPNAAMe (LCST: 18°C)、Bブロックにはグリシン由来のPNAGMe (LCST: 73°C) を採用した。

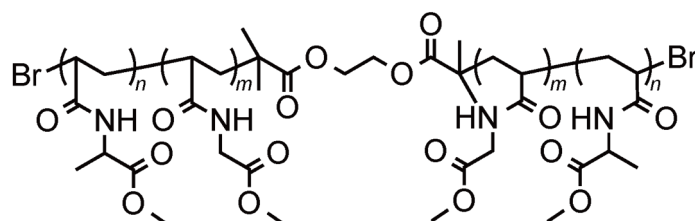


Figure 6-8. Chemical structure of PNAAMe-*b*-PNAGMe-*b*-PNAAMe synthesized by ATRP using bifunctional initiator.

6-3-3-1. トリブロック型アミノ酸由来ポリマーの合成と温度応答特性

二官能性開始剤であるEbEiBを用いたATRPによりNAGMeの重合をDMSO/2-プロパノール (v/v=1/1) 混合溶媒中室温で3時間行った。SEC測定を行ったところ、 $M_n=34500 \text{ g mol}^{-1}$, $D=1.19$

であり，分布の狭い制御されたポリマーであることがわかった (Figure 6-9, 青線). 次に，得られたPNAGMeをマクロ開始剤に用いたATPRによりNAAMeの重合をDMSO/2-プロパノール (v/v=1/1) 混合溶媒中室温で30分間行った．得られたPNAAMe_n-b-PNAGMe_m-b-PNAAMe_nのSEC測定を行ったところ単一のピークが得られ ($D=1.35$)，かつ高分子量側へシフトしていることからブロック化が進行していることがわかった (Figure 6-9, 赤線). また，¹H NMRスペクトル測定により重合度を算出したところ， $m=240$ ， $n=53$ であった．

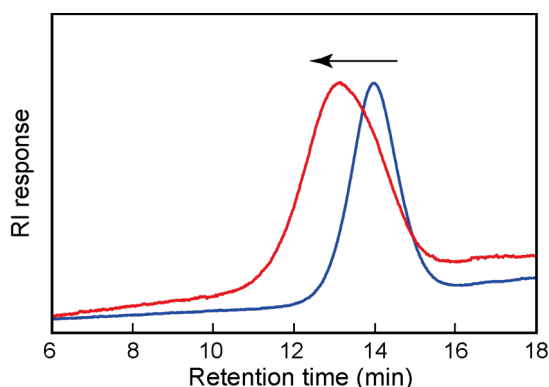


Figure 6-9. SEC traces (THF, 40°C) of PNAGMe-macroinitiator before (blue) and after (red) polymerization of NAAMe.

次に，PNAAMe₅₃-b-PNAGMe₂₄₀-b-PNAAMe₅₃の水中での温度応答挙動について検討した．Figure 6-10は600 nmにおける濁度の温度依存性を示したものであり，比較としてPNAGMeマクロ開始剤およびPNAAMeホモポリマーの測定結果も併せて示した．すべてのポリマーがLCST挙動を示し，PNAAMeホモポリマーは18°C，PNAGMeマクロ開始剤は77°Cであった．興味深いことに，PNAAMe₅₃-b-PNAGMe₂₄₀-b-PNAAMe₅₃はそれぞれのブロックに対応する18°Cおよび60°Cに二段階のLCSTを示した．PNAGMeブロックに由来するLCSTがホモポリマーと比較して低温側にシフトしたのは，PNAAMeブロックの影響により疎水性が増加したためと考えられる．この結果よりPNAAMe₅₃-b-PNAGMe₂₄₀-b-PNAAMe₅₃は水中で温度上昇により両親媒性構造となり，会合状態が変化していることが示唆された．会合状態について詳細に検討するため，臨界会合濃度 (CAC) およびDLS測定，AFMおよびTEM観察を行った．CACの算出はピレンをプローブとした色素法により行い，測定は5°C，35°Cおよび70°Cで行った．一例として35°Cにおけるピレンの励起スペクトル ([polymer]= 1.0×10^{-4} wt%, 0.1 wt%) をFigure 6-11aに示す．濃度増加に伴い，励起スペクトルのレッドシフトが観測された．各濃度における極大吸収波長335.6 nmおよび333.8 nmの蛍光強度比 ($I_{335.6}/I_{333.8}$) をポリマー濃度に対してプロットしたところ，CAC= 7.0×10^{-4} wt%であることがわかった (Figure 6-11b)．なお，70°CにおけるCACは 2.1×10^{-4} wt%であり，5°Cにおいては観測されず分子分散していることがわかった．

続いて、CAC以上である0.25 wt%に調製したポリマー水溶液のAFM、TEMおよびDLS測定を行った。35°Cにおいて、AFMおよびTEMから85-145 nmの球状会合体が観察された (Figure 6-12a, b)。Figure 6-12cは35°CにおけるDLS測定の結果であり、粒径は 156 ± 29 nmであると算出され、AFMおよびTEMから求めた粒径と良く一致した。また、これらの結果と重合度から見積もった理論最大分子長106 nm (A-ブロック: 16 nm, B-ブロック: 74 nm) を考慮すると、PNAAMe₅₃-*b*-PNAGMe₂₄₀-*b*-PNAAMe₅₃はFigure 6-12eに示したようなPNAAMeブロックをコアとしたフラワーミセル構造を形成していると考えられる。

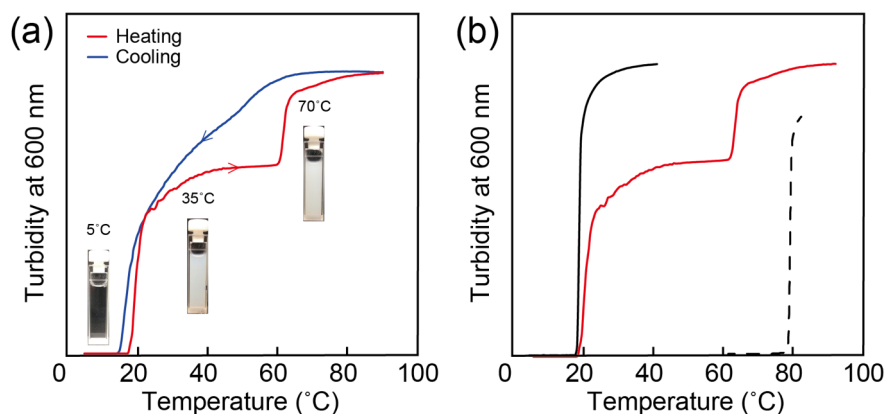


Figure 6-10. (a) Temperature-dependence of the turbidity at 600 nm for PNAAMe₅₃-*b*-PNAGMe₂₄₀-*b*-PNAAMe₅₃ aqueous solution (0.25 wt%). Heating and cooling rates are constant at 1°C min⁻¹. The inset shows photographs of the solution that were acquired at the indicated temperatures in the heating process. (b) Comparison of the turbidity curves in the heating process between the triblock copolymer PNAAMe₅₃-*b*-PNAGMe₂₄₀-*b*-PNAAMe₅₃ (red line) and the corresponding homopolymers of PNAAMe (black solid line) and PNAGMe-macroinitiator (black dashed line).

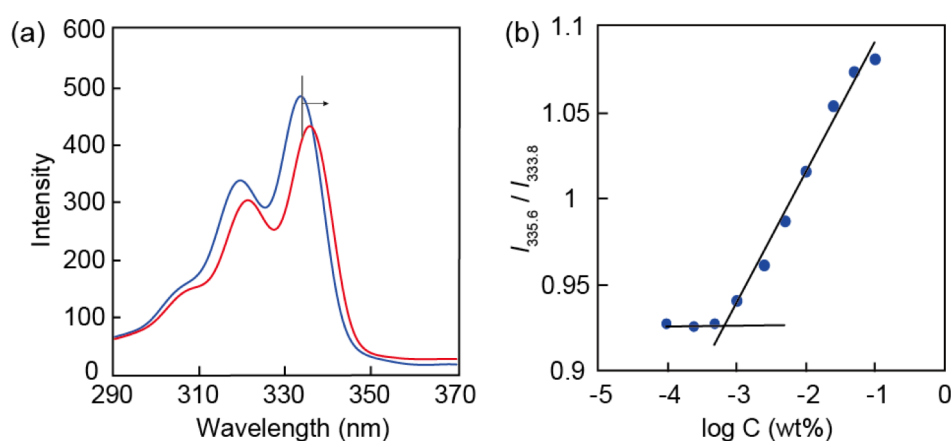


Figure 6-11. (a) Excitation spectra of pyrene in PNAAMe₅₃-*b*-PNAGMe₂₄₀-*b*-PNAAMe₅₃ aqueous solutions (1.0×10^{-4} wt% and 1.0 wt%) at 35°C. (b) Intensity ratio ($I_{335.8}/I_{333.6}$) obtained from the excitation spectra of pyrene as a function of PNAAMe₅₃-*b*-PNAGMe₂₄₀-*b*-PNAAMe₅₃ concentration at 35°C.

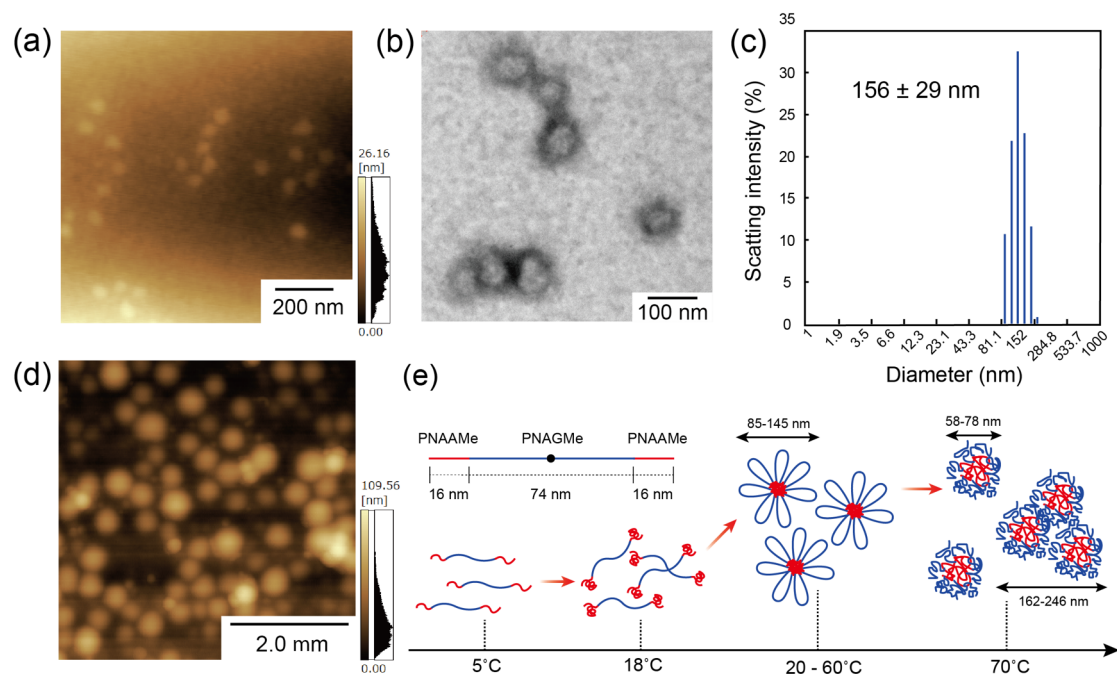


Figure 6-12. AFM (a, d) and TEM (b) images of PNAAMe₅₃-*b*-PNAGMe₂₄₀-*b*-PNAAMe₅₃ aqueous solution. Sample preparations were performed by incubation at 35°C (a, b) and 70°C (d) and subsequent staining with phosphotungstic acid (1.0 wt%) for TEM observation. Size distribution of the polymer (0.25 wt%) at 35°C was estimated by means of DLS measurement (c). (e) Plausible model for the thermos-responsive transition of the polymer *via* aggregation states containing flower-like micelle formation.

そこで，¹H NMR スペクトル測定により，温度上昇に伴う PNAAMe₅₃-*b*-PNAGMe₂₄₀-*b*-PNAAMe₅₃の構造変化を追跡した (Figure 6-13a). 10°Cでは4.3-4.7 ppm付近に見られるAla由来のメチン基のピーク (i) が見られるが，PNAAMeのLCST以上である20°Cではピークが著しくブロードになった．一方，4.2 ppm付近に見られるGlyに由来するメチレン基のピーク (ii) は変化しなかった．Figure 6-13bはDSSで規格化した積分値を温度に対してプロットしたものである．このことから，粒径測定を行った35°CではPNAAMeブロックは疎水的，PNAGMeは親水的に振る舞っていることがわかる．なお，Figure 6-12dに示したように，PNAGMeブロックのLCST以上である70°Cでは巨大な不定凝集体が観察された．以上のことから，PNAAMe₅₃-*b*-PNAGMe₂₄₀-*b*-PNAAMe₅₃はPNAAMeブロックのLCST以上かつPNAGMeのLCST以下である20-60°Cの範囲でフラワーミセル構造を形成していることが明らかとなった．

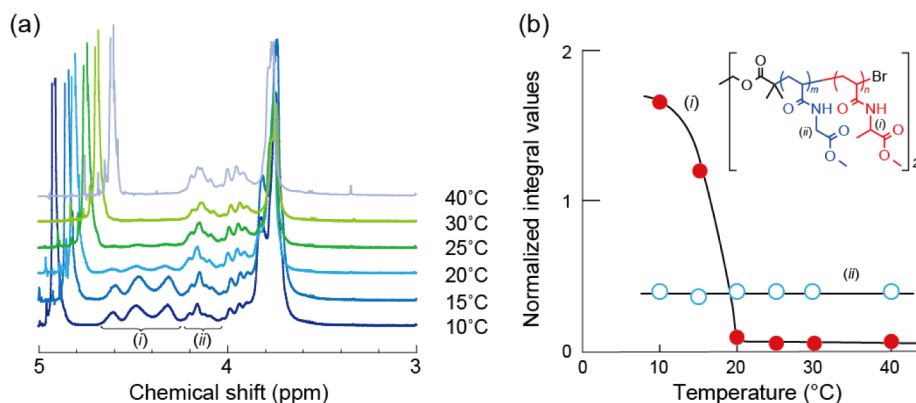


Figure 6-13. (a) Variable-temperature ^1H NMR spectra recorded for a 1 wt% D_2O solution of PNAAMe₅₃-*b*-PNAGMe₂₄₀-*b*-PNAAMe₅₃. (b) Normalized integral values for variable-temperature ^1H NMR spectra of PNAAMe₅₃-*b*-PNAGMe₂₄₀-*b*-PNAAMe₅₃ in D_2O .

6-3-3-2. トリブロック型アミノ酸由来ビニルポリマーからなるハイドロゲルの特性と生体親和性

PNAAMe₅₃-*b*-PNAGMe₂₄₀-*b*-PNAAMe₅₃は希薄濃度条件下 (0.25 wt%) でフラワーミセル構造を形成することがわかった. 次に, 高濃度条件下 (30 wt%) で各温度 (5, 22, 35, 70°C)における挙動を検討した. Figure 6-14aに各温度におけるポリマー水溶液の状態を示した. 5°Cでは透明なゾル状態であったが, 温度上昇に伴い白濁し, 22および35°Cではハイドロゲルを形

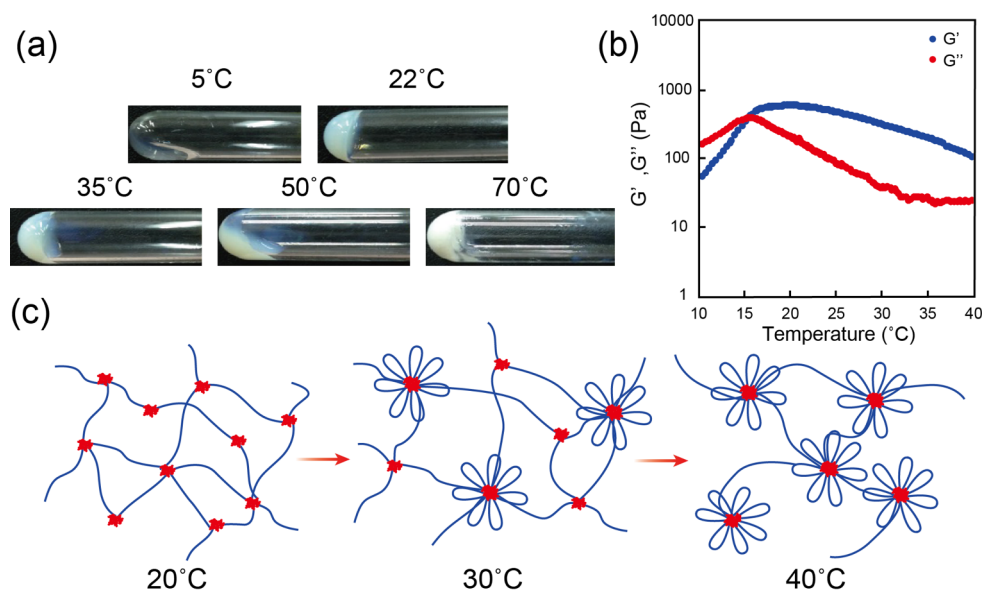


Figure 6-14. (a) Photographs of PNAAMe₅₃-*b*-PNAGMe₂₄₀-*b*-PNAAMe₅₃ aqueous solutions at various temperatures. [polymer]=30 wt%. (b) Temperature-dependence of the storage (G') and loss (G'') modulus for the polymer in the heating process from 10°C to 40°C. (c) Schematic illustration of the polymer in water between 20°C and 40°C.

成した。その後、50°Cで流動性が増加し、70°Cで再びハイドロゲルを形成した。これは温度上昇に伴ってPNAAMeブロックの疎水性相互作用がネットワーク構造の架橋点として作用しているものと考えられる。この溶液の10-40°Cにおける動的粘弾性測定を行ったところ、PNAAMeブロックのLCST以上で貯蔵弾性率 (G') が損失弾性率 (G'') を上回る典型的なゲル型挙動を示した (Figure 6-14b)。ゲルの形成後、22°C以降で徐々に G' が減少していくのはFigure 6-14cに示したように、架橋点が非共有結合により形成されているため安定ではなく、温度上昇により組換えが生じることで熱力学的に安定なフラワーミセルが形成され、ネットワークの架橋密度が低下するためと考えられる。このハイドロゲルの歪み依存性について検討したところ、10%の歪みを境に急激に G' が低下するずり減粘挙動を示し、100%の歪みで完全にゾル化した (Figure 6-15a)。その後、再び歪みを1%に戻したところ G' が急速に上昇し、約80%まで回復した (Figure 6-15b)。この素早い自己修復特性はポリマー鎖の架橋構造形成速度が速いためと考えられる。

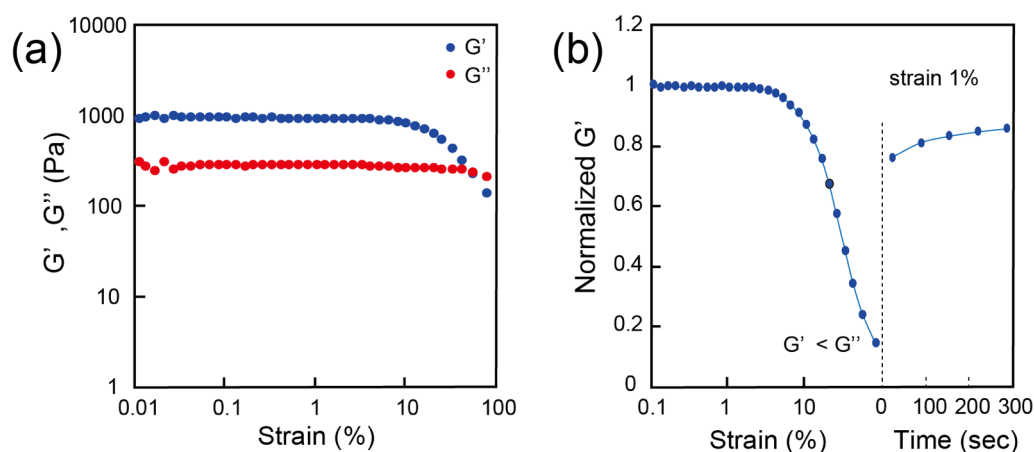


Figure 6-15. (a) Storage (G') and loss (G'') modulus on strain sweep. (b) Recovery of stiffness after failure induced by shear strain.

PNAAMe₅₃-*b*-PNAGMe₂₄₀-*b*-PNAAMe₅₃はPNAAMeブロックのLCSTである18°Cを境に急速にハイドロゲルを形成する。すなわち、生体温度である37°Cではハイドロゲルを形成する。そこで、このハイドロゲルのインジェクタブル性を検討するため、5°Cに冷却してゾル化させたPNAAMe₅₃-*b*-PNAGMe₂₄₀-*b*-PNAAMe₅₃水溶液 (30 wt%) をシリンジに詰め、37°Cの水を入れたシャーレへと射出した。すると直ちにゲル化し、一本の紐状となった (Figure 6-16)。また、このゲルの入ったシャーレを5°Cに冷却するとゲルは水へ溶解した。なお、このハイドロゲルは37°Cでは水中においても一週間以上安定に存在することができた。以上の結果より、PNAAMe₅₃-*b*-PNAGMe₂₄₀-*b*-PNAAMe₅₃は優れたインジェクタブル特性も有しているといえる。

これまでに、 $\text{PNAAMe}_{53}\text{-}b\text{-PNAGMe}_{240}\text{-}b\text{-PNAAMe}_{53}$ が水中で二段階温度応答性を示し、 PNAAMe ブロックのLCST以上かつ PNAGMe のLCST以下である $20\text{-}60^\circ\text{C}$ の範囲でフラワーミセル構造を形成することが明らかとなった。また、高濃度条件でハイドロゲルを形成し、優れた自己修復性とインジェクタブル性を有していることもわかった。生体材料として利用可能か検討するため、MTTアッセイによる細胞毒性試験を行った。0.1, 1.0 wt%のポリマーを添加した無血清培地中でNIH3T3細胞を24時間培養し、細胞生存率を算出した (Figure 6-17)。いずれの濃度の場合でも細胞生存率は90%以上であり、細胞毒性がないことがわかる。以上のことから、アミノ酸由来ビニルモノマーはLRPの一つであるATRPにより容易にブロック重合ができ、またブロック型の場合においても細胞毒性が十分に低いため、ビニルポリマーが生体材料として高いポテンシャルを有していることがわかった。

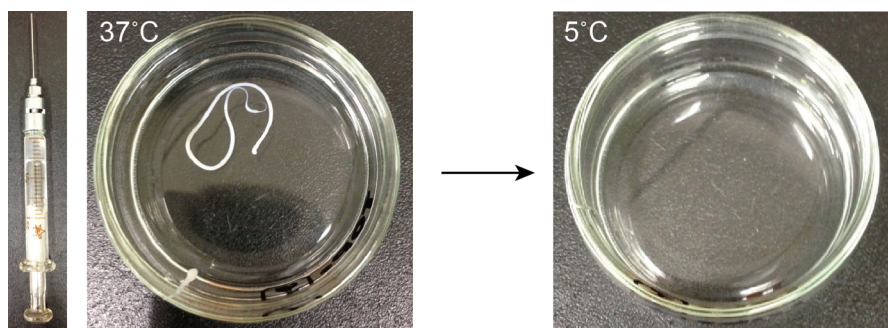


Figure 6-16. Pictures taken when the $\text{PNAAMe}_{53}\text{-}b\text{-PNAGMe}_{240}\text{-}b\text{-PNAAMe}_{53}$ hydrogel (30 wt%) was injected by using a syringe (left) into water at 37°C (middle) and when cooled to 5°C after one week-incubation at 37°C (right).

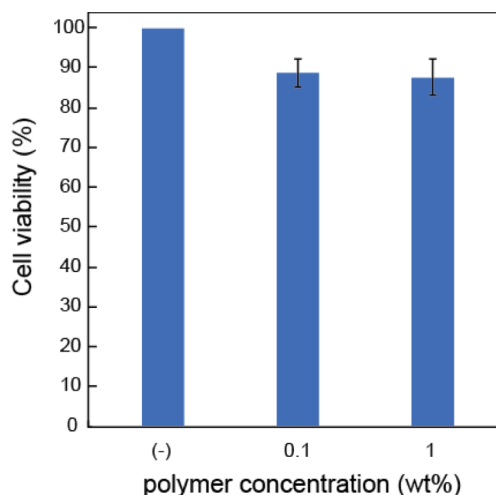


Figure 6-17. Viability of NIH3T3 cells cultured for 24 h in $\text{PNAAMe}_{53}\text{-}b\text{-PNAGMe}_{240}\text{-}b\text{-PNAAMe}_{53}$ serum free medium. Error bars represent the standard deviation ($n=3$). [polymer]=0.1 and 1.0 wt%.

6-3-4. 配列制御ペプチド ((Leu)₄) とアミノ酸由来ビニルポリマーからなるマルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの精密合成

これまでに、アミノ酸由来ビニルポリマーのリビング重合性、ブロック化および生体親和性の評価を行い、生体材料としての高いポテンシャルを明らかにした。そこで次に、アミノ酸成分のみで構築されるマルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドを合成し、タンパク質様の単鎖フォールディングによる立体構造形成を目指した。アミノ酸由来ビニルモノマーはNIPAMと同じくアクリルアミド系モノマーであり、第六章で述べたTIPNO型環状ペプチドNMP開始剤を用いたマルチブロック型ハイブリッドのワンステップ合成法が適用できると考えられる。

5-3-5. で合成した**cPI-4**を用いてNAGMeおよびNAAMeの重合をDMF中120°Cで18時間行った。得られたマルチブロックポリマー[(Leu)₄-*b*-PNAGMe_{*m*}]_{*n*}および[(Leu)₄-*b*-PNAAMe_{*m*}]_{*n*}のSEC測定を行ったところ単峰なピークが得られ、それぞれ $M_n=80400 \text{ g mol}^{-1}$, $M_p=111900 \text{ g mol}^{-1}$, $D=2.89$ および $M_n=32300 \text{ g mol}^{-1}$, $M_p=53000 \text{ g mol}^{-1}$, $D=1.46$ であった (Figure 6-18, 青線)。次に、マルチブロック化が進行しているかどうかを確認するため、これまでと同様に[(Leu)₄-*b*-PNAGMe_{*m*}]_{*n*}および[(Leu)₄-*b*-PNAAMe_{*m*}]_{*n*}のラジカル交換反応によるフラグメント化を行った。大過剰のTIPNO存在下*N*-メチル-2-ピロリドン中120°Cで12時間加熱することで行い、生成したフラグメントポリマーを再沈殿により精製・単離した。これらのSEC測定を行ったところ、フラグメント処理前と比較して分子量が大幅に低下しており、分布も狭くなっていることがわかった ((Leu)₄-*b*-PNAGMe_{*n*}: $M_n=12100 \text{ g mol}^{-1}$, $M_p=14300 \text{ g mol}^{-1}$, $D=1.25$, (Leu)₄-*b*-PNAAMe_{*n*}: $M_n=12700 \text{ g mol}^{-1}$, $M_p=19800 \text{ g mol}^{-1}$, $D=1.23$) (Figure 6-18, 赤線)。これらのハイブリッドポリマーは、全ユニットがアミド基を有するため、FTIRによるペプチドの二次構造解析が不可能である。また、Ala由来のPNAAMeは光学活性であるため、

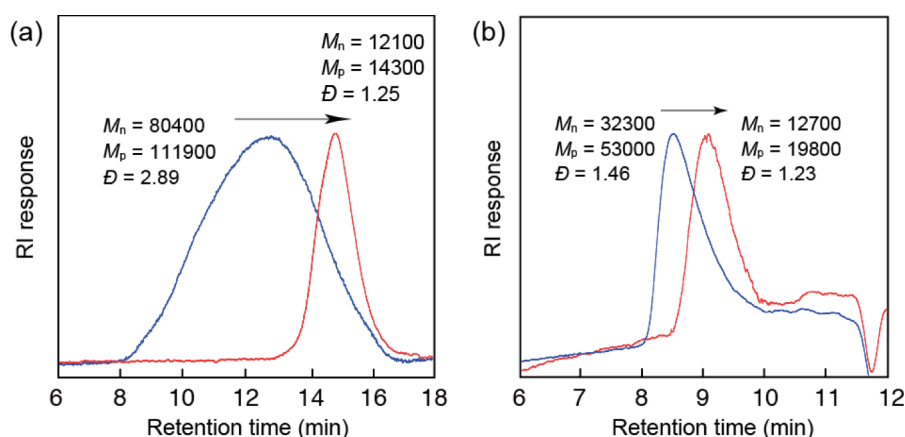


Figure 6-18. SEC traces of (a) [(Leu)₄-*b*-PNAGMe_{*m*}]_{*n*} in DMF (containing 10 mM LiBr) and (b) [(Leu)₄-*b*-PNAAMe_{*m*}]_{*n*} in THF at 40°C before (blue) and after (red) fragmentation.

$[(\text{Leu})_4\text{-}b\text{-PNAAMe}_{81}]_3$ のペプチドブロックの二次構造特性をCDスペクトルにより検討することが難しい．そこで， $[(\text{Leu})_4\text{-}b\text{-PNAGMe}_{76}]_7$ のフラグメント処理前後におけるCDスペクトルを水中で測定した (0.05 wt%) (Figure 6-19)．どちらのポリマーでも $(\text{Leu})_4$ ブロックは β -シート構造とランダムコイル構造が混在した二次構造を形成していることがわかった．マルチブロック構造の場合でもランダムコイル構造が多く含まれているのは，PNAGMeブロックの鎖長が長く，ペプチドブロックの自己組織化が抑制されているためと思われる．

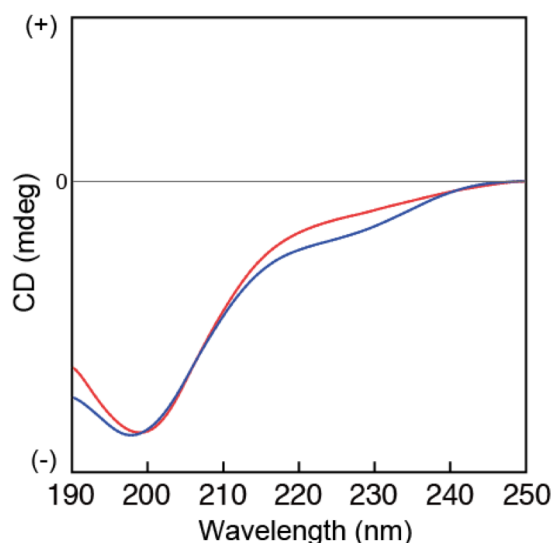


Figure 6-19. CD spectra of (a) $[(\text{Leu})_4\text{-}b\text{-PNAGMe}_m]_n$ in water at 25°C before (blue) and after (red) fragmentation. [polymer]=0.05 wt%.

モノマー転化率から算出した理論分子量は $(\text{Leu})_4\text{-}b\text{-PNAGMe}_n$ の場合は $M_{n,\text{Theor}}=13400 \text{ g mol}^{-1}$ (Conv.: 86.4%)， $(\text{Leu})_4\text{-}b\text{-PNAAMe}_n$ の場合は $M_{n,\text{Theor}}=15000 \text{ g mol}^{-1}$ (Conv.: 87.6%) であり，SECより算出した M_n と良く一致した．また， ^1H NMRスペクトル測定を行ったところ，フラグメント処理前後で大きな変化が見られなかった (Figure 6-20)．以上のことから，マルチブロック化が進行し，かつビニルポリマーブロックの重合はリビング的に進行していることがわかった．また，重合度およびマルチブロック数はそれぞれ $[(\text{Leu})_4\text{-}b\text{-PNAGMe}_m]_n$ ($m=76$, $n=7$)， $[(\text{Leu})_4\text{-}b\text{-PNAAMe}_m]_n$ ($m=81$, $n=3$) であった．マルチブロック数は現状では制御できておらず，両者に差が生じる理由は定かではないが，各モノマーのラジカルとの反応性の違いが影響している可能性がある．いずれにせよ，全てのユニットがアミノ酸由来成分で構成されたマルチブロック型ハイブリッドの合成に成功した

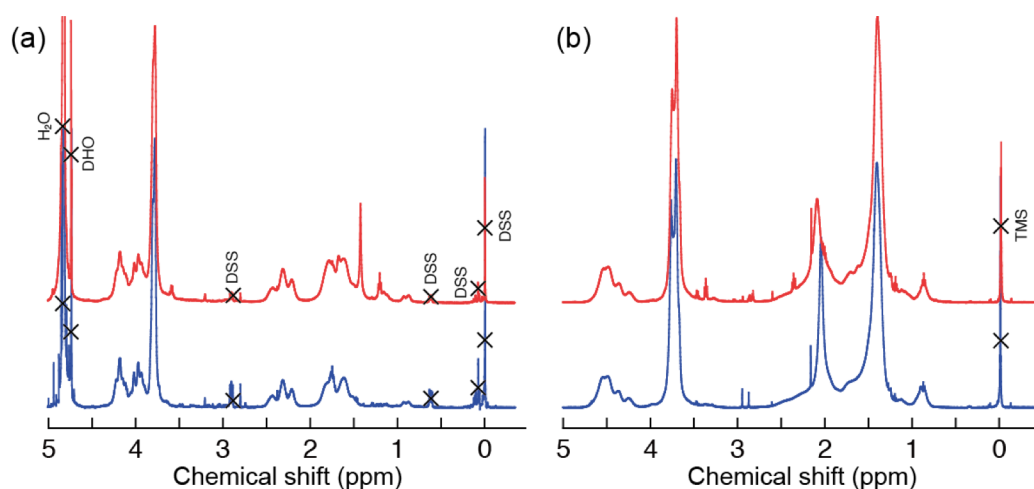


Figure 6-20. ^1H NMR spectra of (a) $[(\text{Leu})_4\text{-b-PNAGMe}_m]_n$ in D_2O and (b) $[(\text{Leu})_4\text{-b-PNAAMe}_m]_n$ in CDCl_3 at 25°C before (blue) and after (red) fragmentation.

6-3-5. マルチブロック型ハイブリッド $[(\text{Leu})_4\text{-b-PNAGMe}_{76}]_7$ の水中における単鎖フォールディング

全ユニットがアミノ酸で構成されたマルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合成に成功した．次に，得られたマルチブロック数が大きい $[(\text{Leu})_4\text{-b-PNAGMe}_{76}]_7$ (Figure 6-21) の温度応答特性と単鎖フォールディング形成の検討を行った．まず，温度応答特性について600 nmにおける濁度測定により検討した．Figure 6-22aは $[(\text{Leu})_4\text{-b-PNAGMe}_{76}]_7$ 水溶液 (1 wt%) の温度による濁度の変化を示したものである ($20\text{-}80^\circ\text{C}$, 30サイクル)．また，比較としてAIBNを用いたフリーラジカル重合により合成したPNAGMeホモポリマー ($M_n=39000\text{ g mol}^{-1}$) の同条件における濁度変化の結果をFigure 6-22bに示した．マルチブロック型の $[(\text{Leu})_4\text{-b-PNAGMe}_{76}]_7$ はLCST挙動を示したが，温度応答挙動はPNAGMeホモポリマーと大きく異なる．PNAGMeのLCSTは 73°C であるのに対し， $[(\text{Leu})_4\text{-b-PNAGMe}_{76}]_7$ のLCSTは 62°C であった．これは，疎水的である $(\text{Leu})_4$ ブロックが組み込まれることにより，ポリマー全体の疎水性度が上昇したためと考えられる．興味深いことに，昇温-降温サイクルを繰り返すことで $[(\text{Leu})_4\text{-b-PNAGMe}_{76}]_7$ のLCSTは徐々に高温側にシフトしていき，30回目にはPNAGMeホモポリマーのLCSTとほぼ一致した．一方，PNAGMeホモポリマーは昇温-降温サイクルを繰り返してもLCSTに変化はなかった．なお， 80°C ではマルチブロック型ハイブリッドの断片化は起こらない．また，昇温-降温サイクルを繰り返した後においても，LCST以上で白濁している溶液はLCST以下にすると完全な透明な溶液に戻る (Figure 6-22, 挿入図)．このことから，ハイブリッドポリマーのサーマルサイクルによる顕著なヒステリシスは，ポリマー鎖の分子間で巨大な凝集体が形成されるではなく，分子内フォールディングに基づくものと考えられる．昇温過程において，PNAGMeブロックは転移温度以下では水和により伸びた状態であり，転移温度以上では脱水された折りたたまれた状態に変化する．この相転移の繰り返しは，

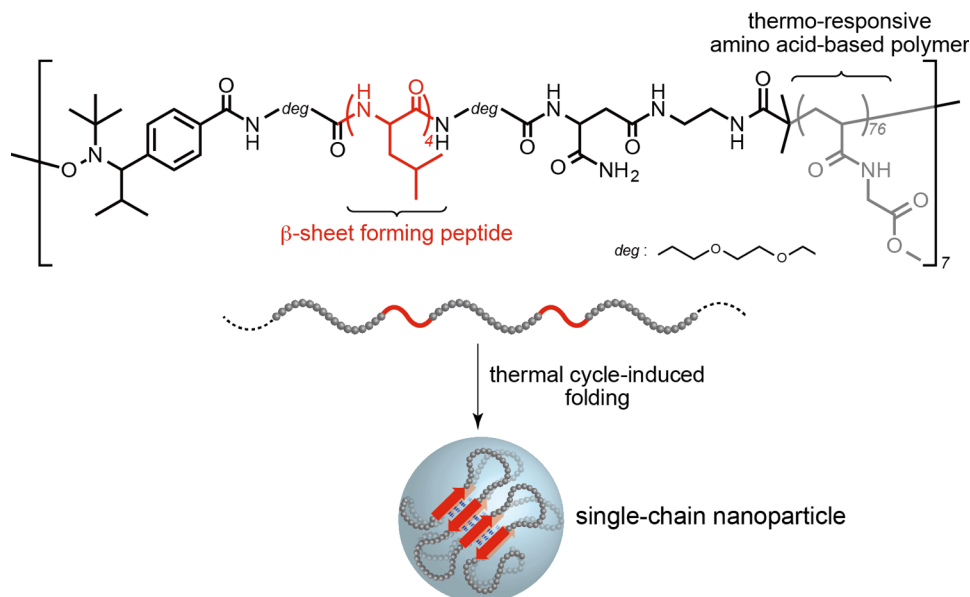


Figure 6-21. Chemical structure of a multiblock hybrid polymer composed of alternating aligned tetra-leucine β -sheet and thermo-responsive glycine-derived vinyl polymer (top), and schematic illustration of the folding process to form single-chain nanoparticles *via* intramolecular cross-links among the peptide multiblocks (bottom).

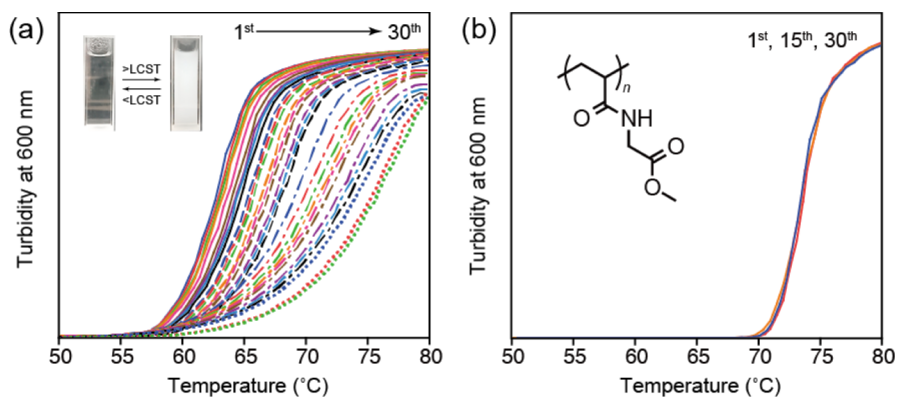


Figure 6-22. Temperature dependence of turbidity at 600 nm for the multiblock hybrid (a) and PNAGMe homopolymer (b) aqueous solutions during heating portion of the heating-cooling cycles (20 to 80°C). [polymer]=1.0 wt%. The inset in (a) shows photographs of the hybrid solutions at 20°C (left) and 80°C (right), acquired over 30 cycles.

ポリマー鎖内のペプチドブロックの非共有結合性相互作用による分子内架橋点の形成を促進し、疎水的なペプチドブロックが水との接触を最小限にするようにPNAGMeブロックがその表面を覆うことで、内部に隔離された単鎖フォールディングを誘発したと考えられる。その結果、疎水的なペプチドコアは親水的なPNAGMeブロックによって包み込まれることで遮蔽され、マルチブロック型ハイブリッドの温度応答挙動は表面に露呈したPNAGMe鎖に支配されるため、PNAGMeホモポリマーに近づいたものと考えられる。

そこで、昇温-降温サイクルを30回行った後の[(Leu)₄-*b*-PNAGMe₇₆]₇のCDスペクトル測定を行った (0.05 wt%) (Figure 6-23a, 緑線). サイクル前と比較してピーク形状が大きく変化しており、差スペクトルをとると、220 nmに負のコットン効果, 198 nmに正のコットン効果が観察され, β -シート構造に典型的なCDパターンを示した. すなわち, この二次構造の変化は昇温-降温サイクルにより(Leu)₄ブロックの自己組織化がアシストされたためと考えられ, 非共有結合型の架橋点を形成していることを示している. β -シート構造のように強固な水素結合により自己組織化したペプチドは, 多くの場合DMF中においてもその構造が保持される傾向にある. そこで, サイクル後の[(Leu)₄-*b*-PNAGMe₇₆]₇のSEC測定をDMF中で行った (Figure 6-23b). 驚くべきことに, M_n が80400 g mol⁻¹から70800 g mol⁻¹に見かけ上減少しており (約12%), ピークトップに着目すると明らかに低分子量側へシフトしている. これはポリマーの溶液中での流体力学直径が減少したことを意味しており, CDスペクトル測定の結果を考慮すると, Figure 6-21に示したように昇温-降温サイクルにより(Leu)₄ブロックが β -シート構造の形成を

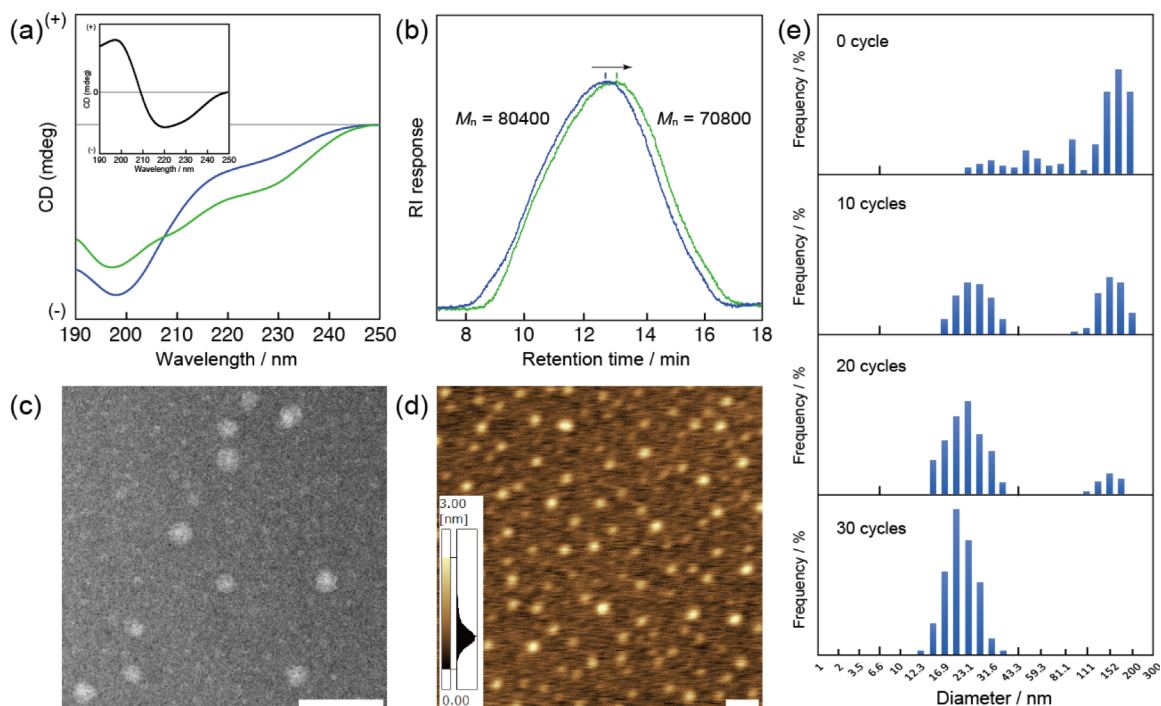


Figure 6-23. Folding behavior of the multiblock hybrid polymer in pure water, driven by thermal cycling (20 to 80°C, 30 cycles). (a) CD spectral change before (blue) and after (green) the thermal cycles. The inset shows the differential spectrum. (b) SEC traces (DMF, 40°C) of the multiblock hybrid polymer in the expanded (blue) and folded (green) states. (c) TEM image of the folded multiblock hybrid polymer stained negatively with 1% phosphotungstic acid at RT. Scale bar=200 nm. (d) Tapping-mode AFM image of the folded hybrid polymer on mica at RT. Scale bar=200 nm. [polymer]=0.05 wt%. (e) Hydrodynamic diameters of the multiblock hybrid polymer in water (1 wt%) during the thermal cycles, as measured by DLS at 20°C.

駆動力とした単鎖フォールディング形成が起きたと考えられる．そこで次に，サイクル後のマルチブロック型ハイブリッドのモルフォロジー観察を行った．Figure 6-23c, dはTEMおよびAFM画像である．TEM画像から直径40-50 nmの均一なナノ粒子が観察された．AFM画像からも同様にサイズのそろった粒子が確認され，断面解析から高さ1.5-2.5 nm，直径50-70 nmであることがわかった．通常，このような球状会合体は，キャストの際に重力により拉げるため実際の粒径よりも大きく観察される．会合体が均一な球状の場合，キャスト後の形状は楕円球であると仮定できるため，AFMにより得られた平均半径 (30 nm) と平均高さ (2 nm) を用いて体積を見積もり，そこから溶液中での形態である真円球の粒径を算出した⁹⁾．

AFM基板上に吸着した半楕円球の体積 ($V_{e,1/2}$) は

$$V_{e,1/2} = \frac{1}{2} \times \frac{4}{3} \pi r_e^2 h_e$$

r_e = radius of ellipsoid, h_e = height of ellipsoid

真円球の体積 (V_{ts}) は

$$V_{ts} = \frac{4}{3} \pi r_{ts}^3$$

r_{ts} = radius of true sphere

であり， $V_{e,1/2} = V_{ts}$ であるから

真円球の半径 (r_{ts}) は

$$r_{ts} = \sqrt[3]{r_e^2 h_e / 2}$$

となる．

このとき， r_e および h_e はAFMより得られた半径 (nm) と高さ (nm) である．

先ほどAFMより得られた半径は30 nm，高さは2 nmであるから

$$r_{ts} = \sqrt[3]{30^2 \times 2 / 2} = 9.65$$

より，[(Leu)₄-b-PNAGMe₇₆]₇の水中での粒径は19.3 nmと換算される．

また，DLS測定を行ったところ，昇温-降温サイクル前の[(Leu)₄-b-PNAGMe₇₆]₇の水中における粒径は160 nm程度であり，比較的分布の広いものであったが，サイクルを経ることで分布の狭い20 nm前後の粒径へと変化することがわかった (Figure 6-23e)．これらの値は，[(Leu)₄-b-PNAGMe₇₆]₇の理論分子長である約22 nmとよく一致した．このことから，[(Leu)₄-b-PNAGMe₇₆]₇は水中でβ-シート構造形成に基づく非共有結合性相互作用により，Figure 6-21に示したような単鎖フォールディングを形成していることが示唆された．そこで，疎水性環境下で蛍光波長がブルーシフトすることが知られているナイルレッドの蛍光スペクトル測定を，昇温-降温サイクル前後の[(Leu)₄-b-PNAGMe₇₆]₇水溶液中および超純水中で行っ

た (Figure 6-24). 超純水中では $\lambda_{em}=650$ nm, サイクル前の[(Leu)₄-*b*-PNAGMe₇₆]₇水溶液中では $\lambda_{em}=645$ nmであったが, サイクル後の[(Leu)₄-*b*-PNAGMe₇₆]₇水溶液中では $\lambda_{em}=616$ nmであり, 明らかなブルーシフトが観察された. この結果は, サイクル後の[(Leu)₄-*b*-PNAGMe₇₆]₇が疎水性ポケットを形成していることを示しており, 単鎖フォールディングの形成を指示するモノである. このマルチブロック型ハイブリッドの特徴は多分散度が高い ($\bar{D}>2.89$) にもかかわらず, 均一な形状およびサイズのナノ粒子を形成することである. これはハイブリッドポリマーの特徴的な分子構造とペプチドブロックをコアに幾重にもビニルポリマー鎖 (PNAGMe ループ) がフラワーミセルのように覆うタンパク質様のフォールディング形態に起因している. 粒子径および均一性はマルチブロック数にほとんど依存せず, ペプチド鎖とポリマー鎖の重合度および多分散度によって決定する. 事実, このマルチブロック型ハイブリッドの各構成成分の多分散度は十分に小さかった ((Leu)₄ブロック: $\bar{D}=1.0$, PNAGMeブロック: $\bar{D}=1.25$). そのため, ペプチドコアを覆うPNAGMeループからなるコロナ層の厚さは一定であり, 均一なナノ粒子を形成したと考えられる. 以上のことから, [(Leu)₄-*b*-PNAGMe₇₆]₇は水中で昇温-降温サイクルにより β -シート構造形成が促進され, それを駆動力とした単鎖フォールディングを形成することが明らかとなった.

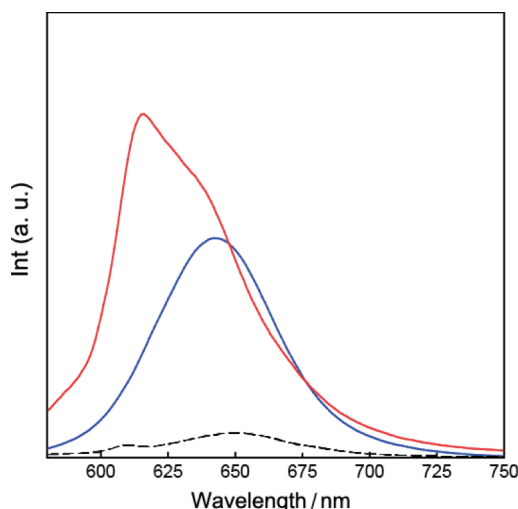


Figure 6-24. Emission spectra of Nile red in pure water (dashed black line) and in aqueous solutions of the multiblock hybrid obtained before (blue line) and after (red line) the thermal cycles (20 to 80°C, 30 cycles). $\lambda_{ex}=553$ nm.

6-4. 結言

本章では、配列制御ペプチドとアミノ酸由来ビニルポリマーからなる全ユニットがアミノ酸で構成されているマルチブロック型ハイブリッドを新規に設計・合成し、単鎖フォールディングの形成を目指した。また、アミノ酸由来ビニルポリマーの生体親和性および生体材料としてのポテンシャルを検討した。表面開始 ATRP によりガラス表面にアミノ酸由来ポリマーブラシを修飾することができた。この基板は細胞培養温度において疎水的であるため細胞接着性を示し、LCST 以下に冷却することで細胞をシート状に回収することができた。さらに、二官能性 ATRP 開始剤を用いて NAGMe および NAAMe を順次重合することで、ABA 型のトリブロックポリマーを合成し、その温度応答特性およびゲル化特性について検討した。PNAAMe-*b*-PNAGMe-*b*-PNAAMe はそれぞれのポリマーブロックの LCST に起因する二段階温度応答挙動を示し、希薄条件下においてフラワーミセルを形成した。高濃度条件では PNAAMe ブロックの LCST である 18°C 以上でハイドロゲルを形成し、このハイドロゲルは自己修復性とインジェクタブル性を示した。また、MTT アッセイにより生体親和性に優れていることがわかった。続いて、TIPNO 型環状(Leu)₄NMP 開始剤を用いて NAGMe および NAAMe を重合し、すべてがアミノ酸成分からなるマルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合成に成功した。[(Leu)₄-*b*-PNAGMe₇₆]₇ は、水中で LCST 型の温度応答性を示し、昇温-降温サイクルを繰り返すことで LCST が高温側へシフトしたこのサーマルサイクルによりβ-シート構造形成が促進され、ナノ粒子構造への単鎖フォールディングが起こることを見出した。TEM および AFM よりそのモルフォロジーを明らかにし、溶液中における粒径は 19.3 nm と見積もられた。これは理論分子長とよく一致した。以上のことから、[(Leu)₄-*b*-PNAGMe₇₆]₇ はサーマルサイクルを繰り返すことでタンパク質様の単鎖フォールディングが生じることを明らかにした。全ユニットがアミノ酸で構成されているポリマーによる単鎖フォールディングの報告例はなく、本知見は人工タンパク質創成に向けた大きな一歩となろう。

参考文献

- 1) N. Badi, J. -F. Lutz, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 3389.
- 2) A. H. Soeriyadi, C. Boyer, F. Nystrom, P. B. Zetterlund, M. R. Whittaker, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 11128.
- 3) F. S. Bates, M. A. Hilmyer, T. P. Lodge, C. M. Bates, K. T. Delaney, C. H. Fredrickson, *Science*, **2012**, 336, 434.
- 4) G. Gody, T. Mashmeyer, P. B. Zetterlund, S. Perrier, *Nat. Commun.*, **2013**, 4, 2505.
- 5) N. G. Engelis, A. Anastasaki, G. Nurumbetov, N. P. Truong, V. Nikolaou, A. Shegiwal, M. R. Whittaker, T. P. Davis, D. M. Haddleton, *Nat. Chem.*, **2017**, 9, 171.
- 6) T. Terashima, T. Mes, T. F. A. De Greef, A. J. Gillissen, P. Besenius, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 4742.
- 7) M. Ouchi, N. Badi, J. -F. Lutz, M. Sawamoto, *Nat. Chem.*, **2011**, 3, 917.
- 8) B. Schmidt, N. Fechler, J. Falkenhagen, J. -F. Lutz, *Nat. Chem.*, **2011**, 3, 234.
- 9) E. J. Foster, E. B. Berda, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 6964.
- 10) E. Harth, B. V. Horn, V. Y. Lee, D. S. Germack, C. P. Gonzales, R. D. Miller, C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 8563.
- 11) J. J. Jiang, S. Thayumanavan, *Macromolecules*, **2005**, 38, 5886.
- 12) O. Altintas, J. Willenbacher, K. N. R. Wuest, K. K. Oehlenschlaeger, P. Krolla-Sidenstein, H. Glieman, C. Barner-Kowollik, *Macromolecules*, **2013**, 46, 8092.
- 13) J. P. Cole, J. J. Lessard, C. K. Lyon, B. T. Tuten, E. B. Berda, *Poly. Chem.*, **2015**, 6, 5555.
- 14) B. S. Murray, D. A. Fulton, *Macromolecules*, **2011**, 44, 7242.
- 15) B. T. Tuten, D. Chao, C. K. Lyon, E. B. Berda, *Poly. Chem.*, **2012**, 3, 3068.
- 16) D. E. Whitaker, C. S. Mahon, D. A. Fulton, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 956.
- 17) M. Seo, B. J. Beck, J. M. J. Paulusse, C. J. Hawker, S. Y. Kim, *Macromolecules*, **2008**, 41, 6413.
- 18) E. J. Foster, E. B. Berda, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 6964.
- 19) T. Terashima, T. Mes, T. F. A. De Greef, M. A. J. Gillissen, P. Besenius, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 4742.
- 20) E. A. Appel, J. Dyson, J. del Barrio, Z. Walsh, O. A. Scherman, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 4185.
- 21) T. Terashima, T. Sugita, K. Fukae, M. Sawamoto, *Macromolecules*, **2014**, 47, 589.
- 22) F. Wang, H. Pu, Y. Ding, H. Pan, Z. Chang, M. Jin, *Polymer*, **2018**, 141, 86.
- 23) H. Mori, H. Iwayama, T. Endo, *Chem. Commun.*, **2005**, 4872.
- 24) N. Higashi, R. Sonoda, T. Koga, *RSC Adv.*, **2015**, 9, 67652.
- 25) Y. Zhu, A. B. Lowe, P. J. Roth, *Polymer*, **2014**, 55, 4425.
- 26) W. Kern, D. A. Puotinen, *RCA Rev.*, **1970**, 31, 187.

- 27) W. Jakubowski, K. Matyjaszewski, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 4482.
- 28) K. Matyjaszewski, W. Jakubowski, K. Min, W. Tang, J. Huang, W. A. Braunecker, N. V. Tsarevsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2006**, 103, 15309.
- 29) A. Marmur, *Colloids Surf. A.*, **1998**, 136, 209.
- 30) L. Ponsonnet, K. Reybier, N. Jaffrezic, V. Comte, C. Lagneau, M. Lissac, C. Martelet, *Mater. Sci. Eng. C*, **2003**, 23, 551.
- 31) N. Yamada, T. Okano, H. Sakai, F. Karikusa, Y. Sawasaki, Y. Sakurai, *Makromol. Chem. Rapid. Commun.*, **1990**, 11, 571.
- 32) M. Heskins, J. E. Guillet, *J. Macromol. Sci. A.*, **1968**, 2, 1441.
- 33) Y. Akiyama, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, *Langmuir*, **2004**, 20, 5506.
- 34) K. Uchida, K. Sakai, E. Ito, O. H. Kwon, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, *Biomaterials*, **2000**, 21, 923.
- 35) A. Kushida, M. Yamato, C. Konno, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano, *J. Biomed. Mater. Res. A.*, **1999**, 45, 355.
- 36) T. Okano, N. Yamada, H. Sakai, Y. Sakurai, *J. Biomed. Mater. Res. A.*, **1993**, 27, 1243.
- 37) E. Ebara, M. Yamamoto, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai, T. Okano, *Biomacromolecules*, **2004**, 5, 505.
- 38) O. H. Kwon, A. Kikuchi, M. Yamamoto, T. Okano, *Biomaterials*, **2003**, 24, 1223.
- 39) M. Nakayama, N. Yamada, Y. Kumashiro, H. Kanazawa, M. Yamato, T. Okano, *Macromol. Biosci.*, **2012**, 12, 751.
- 40) A. Mizutani, A. Kikuchi, M. Yamato, H. Kanazawa, T. Okano, *Biomaterials*, **2008**, 29, 2073.
- 41) K. Nagase, A. Kimura, T. Shimizu, K. Matsuura, M. Yamato, N. Takeda, T. Okano, *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 19514.
- 42) G. Pan, Q. Guo, Y. Ma, H. Yang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 6907.

第七章：総括

本論文では、配列制御ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合目的的な機能設計とその精密合成法の確立を目指した。グラフト型、トリブロック型、マルチブロック型など多様な高分子形状のハイブリッドポリマーの開発に成功し、それらのナノバイオマテリアルとしての高いポテンシャルを示した。特に、新規構造-発現機能の相関性の探究は新しい高分子ソフトマテリアルを設計する上で大変重要である。以下に各章で得られた知見についてまとめるとともに、今後の展望について言及し、本論文の総括とする。

第二章では、マクロモノマー法によるグラフト型ハイブリッドの合成と機能性細胞足場材料への応用性について検討した。グラフト型ハイブリッドの特徴であるグラフト鎖の脱離に伴う機能のON→OFF制御に着目し、光分解性リンカーを介してRGDSペプチドグラフト鎖を有するビニルポリマーを設計した。末端に重合性のメタクリロイル基を有するRGDSペプチドマクロモノマー合成はSPPS法により行い、光分解性について検討した。ANP部位の光分解はUV照射により速やかに進行した。RGDSマクロモノマーとSt, MMAおよびHEMAの共重合をフリーラジカル重合法により行い、RGDSペプチドと種々のビニルポリマーからなるグラフト型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合成に成功した。poly(HEMA-g-βA-ANP-K(RhB))-βA-RGDS-Amを用いてANP部位の光分解性を検討したところ、光切分解反応は共重合体においても進行し、ペプチドグラフト鎖がポリマー主鎖から切断可能であることを明らかにした。NIH3T3細胞を用いて細胞接着性を検討したところ、RGDSペプチドをグラフト鎖に持たないPHEMAフィルム上では接着細胞が全く見られないが、poly(HEMA-g-βA-ANP-K(RhB))-βA-RGDS-Amフィルム上で接着細胞が確認された。また、接着細胞数はグラフト率が高くなると増加していき、 $G_r=2.5\%$ を超えると逆に減少した。これらの結果は、細胞足場材料へ応用する場合、グラフト型ハイブリッドの構造を精密に設計する重要性を明確に示しているといえよう。フォトマスクを介してpoly(HEMA-g-βA-ANP-K(RhB))-βA-RGDS-AmフィルムにUV光を照射することで、RGDSエpitepならびに接着細胞のパターン化が実現できることも見出した。

第三章では、クリック反応を用いた重合後修飾によるグラフト型ハイブリッドの合成と機能性細胞足場材料への応用性について検討した。第二章で得られた知見をもとに、クリック反応を用いたRGDSペプチドおよびアルキンを有するPHEMAとアクリル酸プロパルギルのランダム共重合体 (poly(HEMA-ran-PgA)) を新規に設計した。Poly(HEMA-ran-PgA) の合成はRAFT重合法によるHEMAとPgAの共重合によって行い、モノマー転化率に対して分子量は線形的に増加すること、多分散度が比較的小さい ($D<1.4$) ことから、重合はリビング的に進行することを明らかにした。また、 F_{PgA} はモノマー転化率に対してほぼ一定の値であり、ポリマー鎖長

が比較的制御され、仕込み通りの組成を有するpoly(HEMA-*ran*-PgA) の精密合成に成功した。クリックブルペプチドはSPPS法により合成し、ANP部位の光分解はこの場合も速やかに進行することを示した。スピンコート法により作製したpoly(HEMA-*ran*-PgA)フィルム上で、クリック反応によりRGDSペプチドの重合後修飾が可能なことを示した。フォトリソグラフィーによりこのペプチドエピトープは切断可能であり、マクロモノマー法により得られたグラフト型ハイブリッドフィルムと比較して高い除去率 (約100%) を達成した。MC3T3-E1細胞のRGDS修飾poly(HEMA-*ran*-PgA)フィルムへの接着性を検討したところ、RGDS修飾フィルムの表面の接着細胞数は未修飾と比較して約4倍であった。さらに、UV照射前後のRGDS修飾poly(HEMA-*ran*-PgA)フィルム表面の細胞接着特性を検討したところ、接着細胞数は3倍程度の差があり、光照射により細胞接着性を任意に制御できることが明らかとなった。光照射によりフィルム表面からRGDSエピトープを切断できるため、培養後の光照射による細胞の剥離も可能であった。NIH3T3細胞をRGDS修飾poly(HEMA-*ran*-PgA)フィルム上で80%コンフルエントになるまで培養した後、UV光を照射することで細胞をシート状に回収することができた。また、フォトマスクを介して光照射を行うことで、マイクロパターン化にも成功した。これらの特性から、細胞シート工学基板やセルチップなどへの利用が期待できるだろう。それだけでなく、高分子薄膜を用いる本手法は複雑な三次元構造体の表面もディップコート法という簡便な方法で改質可能であった。3Dプリンターで作製したPLLA構造物にpoly(HEMA-*ran*-PgA)をディップコート法により被膜し、クリック反応によりRGDSペプチド修飾を行い、MC3T3-E1細胞を播種した。ポリマー未修飾のPLLAでは細胞接着性がほとんど見られないのに対し、RGDS修飾を行うことで細胞接着性を付与することに成功した。既存の方法のほとんどが光切断性のRGDSペプチドを固体基板に表面に直接化学修飾したものであり、修飾可能な基材や形状が限られるという問題点があった。本ポリマーシステムはこの汎用性の問題をブレイクスルーでき、材料化学分野だけでなく再生医療分野での応用も十分に期待できる。

第四章以降は、ブロック型のハイブリッドに焦点をあて、特にタンパク質様の構造と機能発現を目指した。まず第四章では、トリブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッド (ビニルポリマー-配列制御ペプチド-ビニルポリマー型) を設計し、ユニマーミセル構造形成に基づくタンパク質様の内部疎水性空間を構築と機能発現の可能性を模索した。様々なビニルポリマー種を組み合わせたハイブリッドポリマーを設計し、その蛍光発光特性について詳細に検討した。SPPS法によりFSYGVペプチド ATRP 開始剤およびRAFT 剤は固相合成法により合成した。このペプチドを用いた ATRP およびRAFT 重合法により、PVP-PS_t, PAA-PNIPAM, PAA-PMMA, PDAEMA-PNIPAM, PDAEMA-PMMA ビニルポリマーブロックを有するトリブロック型ハイブリッドの合成に成功した。特に、PAA-PNIPAM ブロックを有するハイブリッドは、GFP 様の緑色蛍光の発光を示した。さらに、加熱-冷却サ

イクルを経ることで、PNIPAM セグメントの緩和と凝集の繰り返しにより蛍光強度が増加することもわかった。PNIPAM セグメントの緩和-凝集が、FSYGV ペプチドに適切な歪みを与え、分子内環化反応を促進していることを示唆した。また、冷却-加熱サイクル後における蛍光強度は PAA 鎖長が長いほど、わずかではあるが高く、量子収率も同様の傾向にあることが明らかとなった。モルフォロジー観察および DLS 測定から蛍光発光時には単粒子または数個~数十個の分子が会合していることがわかった。本章では、温度応答性高分子である PNIPAM を用いることで、温度に応答した蛍光発光の OFF→ON スイッチを可能とした。GFP 様の緑色蛍光の発現に成功し、ハイブリッド戦略の人工タンパク質モデル構築への有用性を示すとともに、分子設計に新たな指針を提供するものである。

第五章では、ペプチドとビニルポリマーからなるマルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの新しい合成法を確立した。NMPの重合機構に着目し、ワンステップでビニルポリマーベースのマルチブロック型ハイブリッドが合成可能なTEMPO型環状ペプチド開始剤を新規に設計・合成した。TEMPO型 (Leu)₄NMP開始剤を用いてStの重合を行ったところ、ワンステップで (Leu)₄-b-PStユニットが3~4回繰り返した構造を有するマルチブロック型ハイブリッドを得ることに成功し、モノマー転化率を変化させることでPStブロックの長さを容易に調節できることを明らかにした。また、重合はアミノ酸配列が異なるペプチド ((Leu-Gly)₂ および (Glu(OBzl))₄) NMP開始剤を用いた場合でも良好に進行した。このように、本手法を用いることで任意の配列のペプチドが組み込まれたマルチブロック型ハイブリッドを容易に合成することができる。それだけでなく、側鎖に官能基を持つアミノ酸種を選択することで、一本のビニルポリマー鎖内に等間隔に官能基導入でき、位置特異的な化学修飾も可能となるだろう。TEMPO型 (Leu)₄ NMP開始剤を用いてSt以外の芳香族モノマー(*p*-ClStと4VP) の単独重合およびSt/ANの共重合を試みた。全てのハイブリッドポリマーはマルチブロック構造を有しており、それらのポリマーブロックは良く制御されていることを明らかにした。TEMPO由来アルコキシアミンを用いた場合、重合可能なモノマーは芳香族モノマーに限られたため、TIPNO型(Leu)₄NMP開始剤を設計・合成し、適用可能モノマー種の拡張を試みた。この開始剤を用いることで、スチレンに加えてアクリルアミド系、アクリレート系およびアクリルニトリルが重合ができ。また、この際もモノマー転化率によりビニルポリマー鎖の鎖長制御が可能であった。以上、マルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの新しい合成手法の開発に成功した。本手法はこれまでマルチブロックポリマーの研究の障壁となっていた合成方法の煩雑さを解決するものであり、新規機能性ポリマーの創成を可能とすることから、ナノテクノロジー、生物医学および工業分野への応用が期待される。

第六章では、マルチブロック型ハイブリッドのタンパク質様単鎖フォールディングの形成を目指し、全ユニットがアミノ酸で構成された温度応答性マルチブロック型ハイブリッ

ドを設計・合成した。まず、アミノ酸由来ビニルポリマーとしてアラニンおよびグリシン由来ビニルポリマーおよびその共重合体の生体親和性および生体材料としてのポテンシャルを検討した。SI-ATRPによりガラス表面にアミノ酸由来ポリマーブラシを修飾することができた。アミノ酸由来ポリマーブラシ修飾基板表面は温度に応答して親水-疎水性が変化し、また NAGMe と NAAMe を共重合させることで転移温度を調節することができた。この基板は細胞培養温度において疎水的であるため細胞接着性を示し、LCST 以下に冷却することで細胞をシート状に回収することができた。このことから、基板表面に固定されたアミノ酸由来ビニルポリマーは細胞毒性がなく生体親和性が高いことが明らかとなった。また、二官能性 ATRP 開始剤を用いて NAGMe および NAAMe を順次重合することで、ABA 型のトリブロックポリマーを合成した。アミノ酸由来ビニルモノマーは LRP が適用可能であり、容易にブロック化することができる。PNAAMe-*b*-PNAGMe-*b*-PNAAMe はそれぞれのポリマーブロックの LCST に起因する二段階温度応答挙動を示し、希薄条件下においてフラワーミセルを形成することがわかった。さらに、高濃度条件では PNAAMe ブロックの LCST である 18°C 以上でハイドロゲルを形成し、自己修復性とインジェクタブル性を示した。MTT アッセイから評価した細胞生存率も 90%以上であったことから、溶液状態においてもアミノ酸由来ビニルポリマーは高い生体親和性を有することが明らかとなった。第五章で見出した TIPNO 型環状ペプチド NMP 開始剤を用いたワンステップ合成法により、ペプチドとアミノ酸由来ビニルモノマーからなる全ユニットがアミノ酸で構成された温度応答性マルチブロック型ハイブリッドの合成に成功した。(Leu)₄ と PNAGMe からなるマルチブロック型ハイブリッドは水中で LCST 型の温度応答性を示し、興味深いことに昇温-降温サイクルを繰り返すことでβ-シート構造形成が促進され、それに基づくナノ粒子形状への単鎖フォールディングが起こることが明らかとなった。全ユニットがアミノ酸で構成されているポリマーによる単鎖フォールディングの報告例はなく、このような明確な構造のナノ粒子は、ドラッグデリバリーシステム、センサー、触媒、および生体高分子モデルとして応用可能性を秘めた新しい高分子ナノマテリアルである。また、人工タンパク質創成に向けた大きな一歩となろう。

以上、本論文では、配列制御ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合目的的な機能設計とその精密合成法の確立を目指し、グラフト型、トリブロック型、マルチブロック型など多様な高分子形状のハイブリッドポリマーの設計およびその合成法について明らかにした。ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドは各構成成分の種類 (一次構造) やその組み合わせ方 (高分子形状) により無限の機能・構造設計が可能な新しいスマートバイオマテリアルであり、そのハイブリッド化の組み合わせ方は機能発現の鍵を握る重要な因子である。本論文が示したペプチドブロックとポリマーブロックの特性を最大限に引き出した合目的的な分子設計とそれを可能にする精密かつ自在に合成する手法の確立は、材料化学の分野

においてスマートバイオマテリアルとしての可能性を広げる．ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドによる GFP 様の蛍光発現の再現，および全ユニットがアミノ酸で構成されたハイブリッドポリマーによる単鎖フォールディング形成の実現は，高分子化学の究極の目標の一つである人工タンパク質開発において大変意義深いものであり，新しい設計・合成指針となるだろう．

謝辞

研究者としての志や本研究の礎となる着想とその遂行の機会を与えて戴くとともに、終始懇切な御指導を賜りました 東 信行 教授に心より感謝致します。本研究を進めるにあたり、日常の議論を通じて的確な知識や示唆を御教授して戴くとともに、本論文の細部にわたり有益なる御指導を賜りました 古賀 智之 教授に心より感謝致します。

学位論文審査において、ご多忙の中、副査としての的確な御指導をして頂きました、同志社大学 理工学部 水谷 義 教授ならびに小寺 政人 教授に深く感謝致します。

学位論文審査において、副審査員として有益な助言をして頂きました、同志社大学 理工学部 松本 道明 教授ならびに加藤 将樹 教授に心より感謝致します。

学生生活の9年間を通じて、様々な場面でお世話になりました、同志社大学 理工学部 機能分子・生命化学科ならびに化学システム創成工学科の先生方に心より感謝いたします。

実験に関して、様々な御協力を賜りました 松本 孝広 実験講師に深く感謝致します。量子収率測定を行うにあたり、御協力を賜りました 同志社大学 理工学部 木村 佳文 教授に感謝致します。不慣れな細胞実験遂行にあたり、ディスカッションを通じて正鵠得た指摘および適切な助言を賜りました 同志社大学 生命医科学部 森田 有亮 教授ならびに山本 浩司 准教授に感謝致します。

学部時代、研究室に配属された時分に研究実験のイロハを指導して頂いた高分子化学研究室卒業生 宮沢 豪 先輩、菌田 遼 先輩、吉川 諒 先輩、松岡 智雄 先輩に感謝致します。学部から博士前期課程を通じて共に切磋琢磨し、笑い合った同輩であり高分子化学研究室卒業生 元野 雄太 君、関根 大輝 君、麻生 英理 さん、福島 郁子 さん、大野 雅未 さん、山形 優美 さん、吉田 恵利 さんに感謝致します。共に研究に邁進した良き後輩であり、良き共同研究者であり、また良き好敵手でもあった、高分子化学研究室卒業生 平田 絢葉 さん、松原 翔 君に感謝致します。共同研究を通じて、共に難題を乗り越えてきたバイオマテリアル研究室卒業生 瀧 由貴子 さんに感謝致します。また、いつも無理なお願いに応え、真剣に実験に取り組んでくれたバイオマテリアル研究室 外園 尚輝 君に感謝致します。共同研究において、丁寧かつ迅速な補佐をしてくれた高分子化学研究室 百井 菜々さん、元田 秀樹 君に感謝致します。知的好奇心を刺激し合えたエネルギッシュな高分子化学研究室内の皆様に御礼申し上げます。

中等教育課程において、研究に携わるにあたり礎となる理科の楽しさを教えて下さった、大阪市立阪南中学校 故 中野 裕子 教諭に心より感謝致します。高等教育課程において、化学の基礎と面白さを教えて下さった上宮高等学校 稲井 啓子 教諭、物理学の基礎を丁寧に教えて下さった 福井 篤 教諭、数学の基礎をユニークな発想と共に教えて下さった中野 優士 教諭に御礼申し上げます。

最後に、常に第一の理解者であり、献身な支援によりここまで育て上げてくれた家族に深甚なる謝意を表します。