

氏 名 (本籍) 江^え 川^{がわ} 祐^{ゆう} 哉^や

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 第 5 0 3 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 8 年 1 月 1 8 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

学 位 論 文 題 目

インプリントポリマーおよび基板表面に固定化されたシクロデキストリンの機能に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 安 齋 順 一
教 授 根 東 義 則
助 教 授 鈴 木 巖

論文内容要旨

シクロデキストリン (CD) は環状オリゴ糖であり, 1 分子に含まれるグルコースが 6 個, 7 個, 8 個のものは幅広く利用され, それぞれ α -, β -, γ -CD と呼ばれる。CD の最大の特徴は, 空孔内の疎水的性質に起因する包接体形成能を示す点である。また, 包接体形成の際, 疎水性が高く CD 空孔に適合する大きさのゲストほど強く包接されることから, CD は分子認識能を持つといわれている。これまでの CD 機能に関する多くの研究は, CD が溶解した均一系での研究を中心に発展してきたが, 近年では CD 機能を固液界面へ導入する試みが行われ, 分子機能開発に貢献する材料として新たな価値が見出されている。このような観点から著者は, 以下に記す固液界面に固定化された CD による特異的な結合力, 分子認識力, および高分子同士の集積化に関する検討を行った。

(1) インプリントシクロデキストリンマイクロスフィアの調製

CD 機能を固液界面上で発現させる一つの方法として, CD 自身を化学的に架橋した不溶性の CD ポリマーが挙げられる。近年では CD ポリマーに分子インプリント法を適用し, 特定の標的分子に対し特異的な結合力を有するインプリントシクロデキストリン (Im-CD) が報告されている。分子インプリント法は, 標的分子を鑄型分子として反応液中に共存させ, 機能性モノマーと鑄型分子による複合体を形成させた後にポリマー化することで, 鑄型分子に選択性のある結合部位をポリマー中に構築する方法である。CD を機能性モノマーとして使用した Im-CD は新たな人工レセプターとして注目を集めているが, これまで Im-CD 自身の形状を制御する方法はなく, Im-CD の利用法は限定されていた。著者は Im-CD の応用範囲を拡大すべく, Im-CD を球状で大きさが均一なマイクロスフィアとして調製すること, すなわちインプリントシクロデキストリンマイクロスフィア (Im-CD-MS) の調製を試みた。

従来の Im-CD の調製はジメチルスルホキシド (DMSO) を溶媒としており, Im-CD-MS を調製するには DMSO 溶液を適当な溶媒に分散させるのが有効と考えられた。DMSO は両親媒性であり, 使用可能な溶媒は少ないと思われたが, 種々検討した結果, ポリジメチルシロキサン (PDMS) により DMSO を小液滴に分散できることを見出した。この知見を基に β -CD および鑄型分子としてコレステロールを含む DMSO 溶液を PDMS 中に分散させ, ここに架橋剤としてトルエン-2,4-ジイソシアネートを加えることで Im-CD-MS の調製を試みた。調製条件を検討した中で, 温度が Im-CD-MS の粒子形態に大きな影響を与える要因であることが明らかになった。すなわち 55°C では Im-CD-MS 同士の激しい凝集が見られたが, 95°C と比較的高い温度に設定することで粒子の凝集を抑制することができた。次に調製温度を 95°C に固定し, PDMS の粘度を変化させたところ, Im-CD-MS の粒度分布に変化が生じた。50 および 1000 mm²/s の PDMS を用いて調製した Im-CD-MS の平均粒子径はそれぞれ 146, 43 μm であり, PDMS の粘

度が増加すると Im-CD-MS の粒子径は縮小する傾向にあった。このことは PDMS の粘度を選択することで目的に応じた粒子径の Im-CD-MS を得ることが可能になることを示している。

調製した Im-CD-MS の結合力は各種ステロイド誘導体を用いた吸着実験にて評価した。その結果、Im-CD-MS は鑄型（コレステロール）を用いずに調製した CD ポリマーに比べ、各種ステロイドに対する結合力が向上していたが、その中でも鑄型分子として使用したコレステロールに対する結合力の増加が最も顕著であった。Im-CD-MS の鑄型分子に対する結合力は、従来法で調製した Im-CD の結合力に比べ遜色なく、本手法により、球状でかつ均一な大きさを有する Im-CD-MS の調製が可能となった。

(2) シクロデキストリン単分子膜修飾電極による分子認識

CD 機能を固体基板表面に固定化する手法として自己集積化単分子膜法 (SAM) が多用されている。SAM は金をアルカンチオール等の溶液に浸すことで、金原子-イオウ原子間の共有結合を介し、自発的に金表面に形成される単分子膜である。CD 誘導体による SAM (CD-SAM) を金電極上に修飾したものは、CD の分子認識能を活かした電気化学センサーなどへの発展が期待されている。著者は CD-SAM の分子認識能を精査する目的で、二つの観点からの検討を行った。

一つ目の検討として電気化学的に活性を持つカテコールアミン誘導体に関する調査を行った。長鎖アルキル基を持つ β -CD 誘導体による CD-SAM を金電極上に作製し、各種カテコールアミン誘導体の電極反応をサイクリックボルタンメトリー (CV) により評価した。その結果、ドーパミン、ノルエピネフリン、およびエピネフリンでは酸化還元によるピーク電流が得られたのに対し、L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (L-DOPA) の電極反応は完全に阻害された。この電極応答の差が生じる要因を調査した結果、 β -CD 空孔とカテコールアミン誘導体との親和性の差に加え、CD-SAM が L-DOPA のみに存在する負に帯電したカルボキシラート基の有無を認識している可能性が示された。

続いて、CD-SAM の胆汁酸誘導体に対する分子認識能を評価した。胆汁酸はカテコールアミンとは異なり、電気化学的に不活性な物質であるため、評価には電気化学的に活性なマーカーを併用した。従来の検討とは異なり、マーカーは CD 空孔と相互作用せず、かつ電子移動速度が適度に遅いフェリシアン酸イオン ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) を用い CV による調査を行った。胆汁酸誘導体の存在により $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ の電極応答は阻害され、酸化還元ピーク電位差 (ΔE_p) の変化が容易に観測できた。この ΔE_p を指標とした解析を行い、界面における CD と胆汁酸誘導体の結合定数を算出した。 β -CD-SAM 修飾電極では $5.2 \times 10^5 \sim 1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、 γ -CD-SAM 修飾電極では $2.8 \times 10^5 \sim 1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 程度の値が得られたが、後者の値は均一水溶液中で求めた γ -CD と胆汁酸誘導体との会合定数より 5.0 ~ 50 倍大きく、CD の胆汁酸誘導体の認識は均一溶液中よりも膜表面の方が有利であることが示された。また、界面での結合定数は胆汁酸誘

導体ごとに異なり、構造の似通ったウルソデオキシコール酸とケノデオキシコール酸であっても識別できる可能性が示唆された。胆汁酸誘導体による電極応答の阻害機構を調査した結果、CD-SAMに固定されたゲスト分子によるCD-SAMの導電性の変化と、CD-SAMに固定されたゲスト分子とマーカ間の反発が電極応答阻害要因になっていると考えられた。

(3) シクロデキストリン二量体による交互累積膜の作製

SAMは幅広い分子に応用され、多様性に優れるが、単分子膜であるため機能の増幅、機能の高次化の面で難がある。この点を打破する優れた分子固定化法として交互累積膜法が挙げられる。交互累積膜法は高分子間に働く静電的相互作用、もしくはアビジン-ビオチンなどに代表される生体高分子の特異的結合力を利用して、高分子を何層にも積み上げる手法である。著者は新たにCDの包接力を駆動力とした交互累積膜の調製を試みた。

積層させる高分子には、 β -CDに強く包接されるフェロセン (Fc) 残基をポリアリルアミン (PAA) に修飾したFcPAAを使用し、接着分子には β -CD二量体 (CD-dimer) を用いた。積層の様子を水晶振動子マイクロバランス法により評価したところ、CD-dimerの処理を挟むことにより、電荷間の反発があってもFcPAAを繰り返し積層できることが確認された。対照実験により、Fc残基およびCD-dimerが積層に必須であること、また、 β -CDのゲストの共存により積層が抑制されることが明らかになった。この結果は、積層の駆動力がCD包接力であることを裏付けるものである。本手法は同電荷を持つ高分子の積層を可能にし、またCD複合体の分子量が比較的小さいことから、密度の高い交互累積膜が調製できるものと期待される。

以上の結果は、界面に固定化されたCDの機能に新たな視点を与えるものであり、分子機能開発に寄与する重要な知見といえる。固液界面において、特異的な結合力、分子認識力、高分子同士の集積化を可能にするCDは、ナノテクノロジーにおけるボトムアップ方式の有望な材料と考えられ、将来求められる機能性材料の開発に貢献するものと期待される。

審査結果の要旨

審査本研究では、包接複合体形成能を示す環状オリゴ糖であるシクロデキストリン (CD) を固液界面に固定化して CD の新たな機能に関する研究が行われ、以下の知見が得られた。

分子インプリント法を適用した不溶性 CD ポリマーはインプリント CD (Im-CD) と呼ばれ、鑄型分子に対して特異的な結合力を固液界面で発揮する。論文提出者は Im-CD の利用範囲拡大を目指し、Im-CD をマイクロスフィア (MS) として調製することを試みた。その結果、Im-CD-MS はポリジメチルシロキサンを分散媒としたエマルジョン系で調製可能であり、また、ポリジメチルシロキサン粘度を選択することで目的の粒子径の Im-CD-MS を得る方法を確立した。調製された Im-CD-MS は鑄型分子に対し特異的に高い結合力を持つことを明らかにした。

次に CD の分子認識能を界面に導入する試みとして CD 単分子膜修飾電極に関して検討した。CD-SAM 修飾電極におけるカテコールアミン誘導体の電極応答を評価したところ、負に帯電しているカルボキシラート基を持つ分子に対し特異的な電極反応阻害効果を見出した。続いて、胆汁酸誘導体に対する CD 単分子膜修飾電極の分子認識能を評価した。胆汁酸誘導体は電気化学的に不活性であるため、フェリシアン酸イオンをマーカーとして用いた。界面での胆汁酸誘導体と CD の結合定数は均一溶液中での結合定数と比べて大きく、また、界面での結合定数は胆汁酸誘導体ごとに異なり、構造の似通ったものでも識別できる可能性が示された。

さらに CD の包接力を駆動力とした交互累積膜の調製を試みた。ゲスト修飾高分子を調製し、これを集積するバインダーとして CD-dimer を用いた。水晶振動子マイクロバランス法で評価したところ、CD-dimer 処理を行うことによりフェロセン修飾高分子を繰り返し積層できることが確認された。対照実験により、フェロセン残基および CD-dimer が積層に必須であること、また、CD のゲストの共存により積層が抑制されることから積層の駆動力が CD 包接力であることが裏付けられた。これらの研究は、各種医薬品の物理化学的評価や分析を実施する上で新たな知見を与えるものである。

よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。