

平成 年 月 日

氏名 宮本 大輔



21世紀 COE プログラム

拠点：大学院工学系研究科

応用化学専攻、化学システム工学専攻、

化学生命工学専攻、マテリアル工学専攻

“化学を基盤とするヒューマンマテリアル創成”

平成15年度リサーチ・アシスタント報告書

ふりがな 氏名	みやもと だいすけ 宮本 大輔	生年 月 日
所属機関名	東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻	
所在地	〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1 電話 03:(5841) 7124	
申請時点での 学年	博士課程 3 年	
研究題目	リビングラジカル固相重合法によるバイオハイブリッド用ポリマーの創製	
指導教官の所属・氏名	大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 石原一彦 教授	

## I 研究の成果 (1000字程度)

(図表も含めて分かりやすく記入のこと)

## 1.はじめに

近年のバイオテクノロジーの進歩に伴い、高い生理活性を有するタンパク質などのバイオ分子が大量かつ高純度で入手できるようになり、これらを効果的に広範囲で応用することに大きな期待がかかっている。応用例の一つとして、バイオ分子に合成ポリマーを修飾しハイブリッド体を形成することにより、バイオ分子の高機能性を維持したまま安定性および耐久性を高めることがある (Figure 1)。

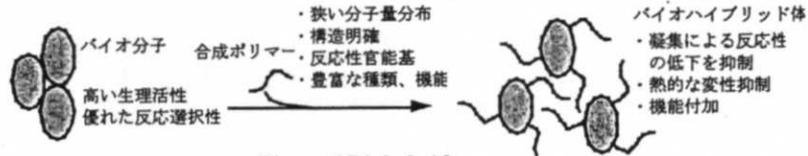


Figure 1 Biohybrid

このハイブリッドタンパク質のポリマーには末端基を含めて構造が明確であること、分子量分布が小さいこと、ハイブリッド体とした際にバイオ分子に対して悪影響を与えないことが要求される。一般にポリエチレングリコール (PEG) など水溶性ポリマーが利用されてきた。一方で、高度に機能化されたハイブリッド体を創製するためには利用するポリマーのバリエーションを増やすことも重要である。(PEG は分子構造が単純であるためにバリエーションを増やすことが困難であり、ビニルポリマーでは容易である。) そこで、本研究では様々な化学構造を有するビニルモノマ

ーに対して応用するために、ポリマー鎖の末端反応性基とポリマーを構成するモノマーユニットのシーケンスを同時に制御して合成する方法を新たに開拓し、バイオハイブリッド用ポリマーのバリエーションを増やすことを目的とする。すなわち、光リビングラジカル重合法と固相重合法を組み合わせ精密に構造が制御されたポリマーを作製する。バイオ分子を合成ポリマーにより化学修飾し安定性や耐久性などバイオ分子に欠落している性質を付与することができれば、高い生理活性を有しているバイオ分子の応用性が飛躍的に高まり、薬学、医学、工学、農学、バイオ分野全体に大きな福音をもたらすものと思われる。

本研究では、バイオハイブリッド用骨格ポリマーとして、生体適合性に優れた 2-メタクリロイルオキシエチレンホスホリルコリン(MPC)ポリマーを光リビングラジカル重合法により合成した。そして、モデルタンパク質として加水分解酵素であるパパインを選択し、MPC ポリマーを修飾したパパインの長期安定性を調べ、MPC ポリマー修飾の効果を検討した。

## I 研究の成果 (1000字程度)

(図表も含めて分かりやすく記入のこと)

## 2. 報告事項

## 2.1 イニファータの作製

p-クロロメチル安息香酸と N,N ジエチルジチオカルバミド酸ナトリウムの縮合反応により 4-N,N ジエチルジチオカルバミルメチル安息香酸 (BDC) を作製した。

## 2.2 リビングラジカル固相重合

固相担体にキトサン骨格を有するキトパール AL-01 を使用した。縮合剤にジシクロヘキシルカルボジイミドを用いて固相担体に BDC を導入した。次に、MPC 溶液中で光を照射することに固相担体に MPC ポリマーを導入した。さらに、水酸化ナトリウムを用いて、エステル加水分解により固相担体から MPC ポリマーを回収した。それぞれの段階における、固相担体表面解析の結果を Figures 2,3 に示す。

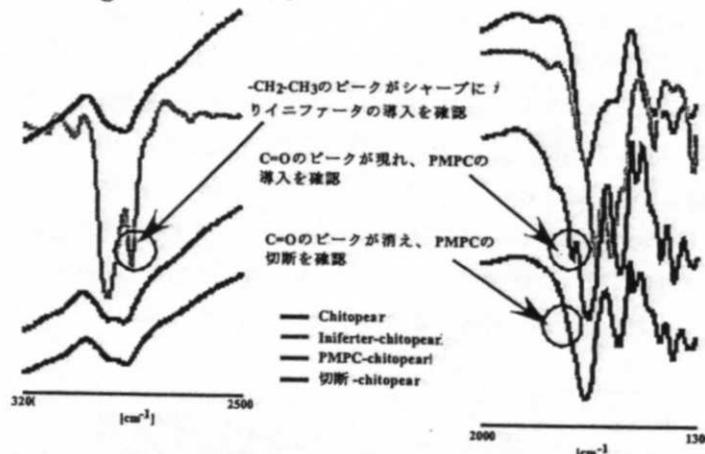


Figure 2 FT-IR spectra of solid phase

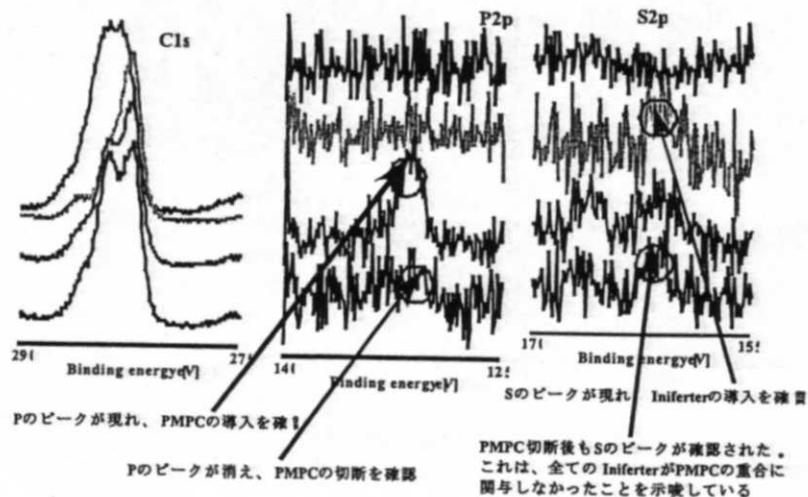


Figure 3 ESCA spectra of solid phase

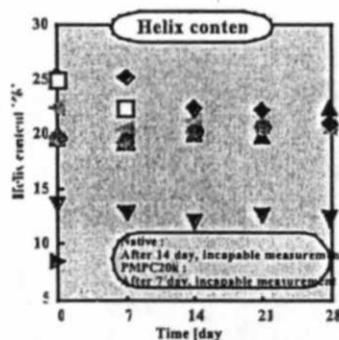
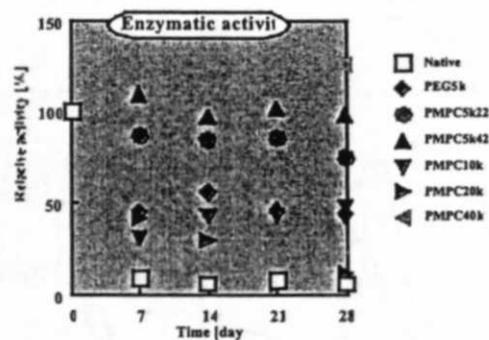
## I 研究の成果 (1000字程度)

(図表も含めて分かりやすく記入のこと)

FT-IR 測定より、固相担体に MPC ポリマーを導入することによりメタクリル酸エステルピークが出現し、固相担体から MPC ポリマーを切断することによりメタクリル酸エステルピークが消失した。また、ESCA 測定より、固相担体に BDC を導入することにより S のピークが出現し、固相担体に MPC ポリマーを導入することにより P のピークが出現し、固相担体から MPC ポリマーを切断することにより、P のピークが消失した。これらのことより、本反応が進行したことが確認された。以上より、キットパール AL-01 を用いた、光リビングラジカル重合法が有効であることが分かった。

## 2.3 MPC ポリマーを用いたバイオコンジュゲーション

BDC を用い、光リビングラジカル重合法により末端にカルボキシル基を有する、 $M_w=5000-40000$  の MPC ポリマー(-COOH PMPC)を得た。さらに末端のカルボキシル基をジシクロヘキシルカルボジイミドとヒドロキシスクシンイミドを用いて活性化し、パパインのアミノ基と反応させ、アミド結合を介してパパインに MPC ポリマーを修飾した。そして、 $40^\circ\text{C}$  pH 6.10 の条件下で、MPC 修飾パパインの活性を評価した(Figure 4)。MPC ポリマーを修飾したパパインは  $40^\circ\text{C}$  という高温においても、75%の活性を4週間以上維持しつづけた。MPC ポリマーをパパインに修飾することにより自己消化を抑制し、二次構造の変化を起こさないこと(CD 測定)も確認された。また、修飾ポリマーの分子量の増加により修飾酵素の安定性は減少したが、修飾率を減少させると修飾酵素の安定性の減少は抑制された。

Figure 4 Stability profile stored at  $40^\circ\text{C}$ Figure 5 Activity profile of papain stored at  $40^\circ\text{C}$

## II (1) 学術雑誌等に発表した論文 (掲載を決定されたものを含む。)

共著の場合、申請者の役割を記載すること。

(著者、題名、掲載誌名、年月、巻号、頁を記入)

- Daisuke Miyamoto, Junji Watanabe and Kazuhiko Ishihara, Highly-stabilized papain conjugated with water-soluble phospholipid polymer chain having a reacting terminal group, Journal of applied polymer science, in press
- Daisuke Miyamoto, Junji Watanabe and Kazuhiko Ishihara, Effect of water-soluble phospholipid polymers conjugated with papain on the enzymatic activity, Biomaterials, in press
- Daisuke Miyamoto, Junji Watanabe and Kazuhiko Ishihara, Synthesis of novel phospholipid polymer for bioconjugation by living radical solid phase polymerization, in preparation
- Daisuke Miyamoto, Junji Watanabe and Kazuhiko Ishihara, Stabilization of Enzymatic Activity by Bioconjugation with Novel Phospholipid homo, random and block Polymers, in preparation

氏名

宮本 大輔

II (2) 学会において申請者が口頭発表もしくはポスター発表した論文  
(共同研究者(全員の氏名), 題名, 発表した学会名, 場所, 年月を記載)

・宮本大輔・渡邊順司・石原一彦、「リビングラジカル固相重合法によるバイオコンジュゲーション用ポリマーの作製」、高分子年次会、名古屋、2003年5月。