

# 双極子-双極子相互作用を会合因子とした 自己組織化ポリマーのタンパク質安定化

森本 展行\*

## Design of self-assembled polymers based on dipole-dipole interaction for protein stabilization

Nobuyuki Morimoto\*

Self-assembled nano-microspheres are useful materials those can be applied in nano-biotechnology. In this study, we designed sulfobetaine block copolymer, poly(ethylene glycol)-b-poly(4-vinyl pyridinium propane sulfonate), (PEG-b-PVPPS) to use dipole-dipole interaction as a driving force for self-assembly even in physiological salt conditions. The PEG-b-PVPPS formed monodisperse nanospheres self-assembly in phosphate buffered saline. With increasing the molecular weight of PEG, the nanoparticles were stably dispersed at least 4 days. Moreover, the nanospheres were confirmed encapsulation of proteins. The PEG-b-PVPPS nanospheres can be expected to apply as a protein carrier.

### 1. はじめに

生体分子は水中で水素結合や静電相互作用、疎水性相互作用などの分子間相互作用が巧みに組み合わせり自己組織化することで、高次構造を形成し多様な機能を発現し得る。一方で分子の自己組織化の利用は、ナノテクのキーポイントであるが、すべての相互作用を自在かつ複合的に使いこなせるわけではない。しかし、機能性分子を合成しビルディングブロックとして用いることにより、従来の分子集合体にはない構造・機能が期待できる。疎水性相互作用は、これまでにミセルをはじめベシクル、ゲルなど多くのナノ-マイクロサイズ集合体の駆動力として利用されてきた。ただ、タンパク質との相互作用を考えた場合、タンパク質分子内部での疎水性相互作用と非特異的に混同し、変性をも引き起こすため、その駆動力の制御は難しい。他の相互作用に基づいてタンパク質を変性させないナノ-マイクロサイズ集合体が調製し得れば、タンパク質工学の分野に画期的な進歩が期待される。

正負の荷電性基が分子内に存在するベタイン分子を側鎖に有したポリマーは、特殊な水和層を形成し得ることから高い生体適合性、タンパク質安定化能を有することが知られる[1]。加えてポリ(3-ジメチル(メタクリロイルオキシエチル)アンモニウムプロパンスルホネート)、(PDMAAPS)は、スルホベタイン分子間で引き起こされる双極子-双極子相互作用より凝集し、加熱により溶解する上限臨界共溶温度(UCST)を示す。我々はこの作用を多点で利用し、凝集を抑制することで分子集合体を調製し得ると考え、PDMAAPSと非荷電の親水性ポリマーであるポリエチレングリコール(PEG)とのブロック共重合体(PEG-b-PDMAAPS)から水中で多層膜型のミクロスフィアを調製した[2]。このミクロスフィアは、純水中では可逆に会合-解離の転移温度制御が可能であるものの、塩の添加により容易に溶解してしまう。これらのことから、生理条件下でスルホベタインポリマーベシクルの転移温度制御を実現することで、タンパク質キャリアとしての展開が可能となると考えられる。本研究では、生理条件下で利用しうるポリスルホベタイン-PEGブロックコポリマーおよびそのミクロスフィアの調製を試み、その上でタンパク質を内包しキャリアとして機能させる展望を得ることを目的とした。

### 2. 実験

DMAPSは市販のものを、4-ビニルピリジニウムプロパンスルホネート(VPPS)は、既報から合成した[3]。これらのモノマー、開始剤として[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]2HCl塩を、重合度が22, 44, 110のPEGを修飾した連鎖移動剤存在下、50°C、水中にて可逆的付加開裂連鎖移動重合により合成を行った。得られたPEG-b-PDMAAPSは10 mg/mLの濃度で純水、あるいは塩化ナトリウム水溶液中に溶解させて試料とした。ポリマーのUCSTは、溶液の温度に対する濁度変化から透過率が50%となる値を用いた。位相差および蛍光顕微鏡により観察するとともに、動的光散乱(DLS)測定から粒径を見積もった。

2014年3月13日 受理

\* 豊田理研スカラー (東北大学大学院工学研究科材料システム工学専攻)

### 3. 結果および考察

PDMAPS ホモポリマーは、分子量の増加により UCST が上昇するが、逆に塩添加濃度に依存してその UCST が減少する。このため、モノマー仕込み量を連鎖移動剤、開始剤に対し増加させることで高分子量、かつ高 PDMAPS 組成の PDMAPS-*b*-PEG の調製を試みた。ところが、図 1 に示すように 5°C においても 100 mM が限界であった。この重合条件では、溶解度の問題からこれ以上の重合度のポリマーを得るのは難しく、また水溶液中での分散制御も難しいと考えられた。そのため、側鎖の運動性の減少、および側鎖間のスタッキングによる構造安定化を期待して、アンモニウム型のスルホベタインからピリジニウム型のスルホベタインの利用を考えた。ピリジニウム型スルホベタインモノマーは高収率(73.3%)で得られ、RAFT 重合も順調に進行した。得られた PEG-*b*-PVPPS の <sup>1</sup>H-NMR 測定の結果を図 2 に示す。得られた PEG-*b*-PVPPS のそれぞれのブロックの重合度から例えば 22-67 と表記する。得られた PEG-*b*-PVPPS はいずれも純水中には溶解しなかったため、10 倍濃度のリン酸緩衝液 (PBS) 中にて溶解し、生理塩濃度まで希釈を行うことで白濁の溶液が得られた。これらの調製直後の溶液を DLS 測定した結果を図 3 に示す。これより、いずれのポリマーにおいても比較的サイズの揃った粒子が得られることが確認され、PEG の重合度が高くなるにつれてその粒径は減少した。PEG 重合度が 110 のポリマーの場合では、PVPPS の重合度によらずいずれも 100 nm 程度の流体力学径となった。これらの粒子は、生理条件下で溶解しないものの、PEG 重合度が低い 22-67 のポリマーは不安定で、調製直後では 620 nm であったのに対し、3 時間後には、約 3 μm にサイズが上昇した。44-102 では 152 nm から 96 時間後に 387 nm と徐々に粒径が増大した。一方で PEG 重合度が 110 の場合では 4 日後もほとんど粒径に変化が認められなかった。高い PEG 重合度が PVPPS 側鎖の相互作用によるミクロスフィアの高い組織化と分散安定化に寄与したと考えられた。一方でリン酸緩衝液中の塩濃度を増加させていくと、室温においてはいずれも 400–500 mM の塩化ナトリウム濃度まで溶解せずに粒子状態を保持しえた。以上のことから、このミクロスフィアはスルホベタインの双極子—双極子相互作用を基に構造を形成し、ピリジン環によるスタッキングの効果で塩の侵入を抑制することで構造を安定化しえたと考えられた。

次に高塩濃度の PEG-*b*-PVPPS ポリマー溶液からの希釈時において、モデルタンパク質としてフルオレセイン修飾した牛血清アルブミン (FITC-BSA) を共存させることで、タンパク質を内包し得ることに成功した。(図 4)

### 4. まとめ

モノマーユニットにおけるスルホベタインのカチオンをピリジニウム基に変更し、ノニオン性の PEG ユニットの重合度を高くすることで生理条件下の塩濃度においても十分安定に分散し得る自己組織型の新規ナノミクロスフィアの調製に成功した。さらにこのミクロスフィアへのタンパク質の担持に成功したことから、タンパク質キャリアとしての検討を進めていきたい。

### REFERENCES

- (1) H. Kitano, M. Imai, K. Sudo, M. Ide. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 11391–11396.
- (2) N. Morimoto, K. Muramatsu, Y. Inoue, T. Wazawa, M. Suzuki. *Macromol. Rapid Commun.* **2014**, 35, 103–108.
- (3) V. M. Monroy Soto, J. C. Galin. *Polymer* **1984**, 25, 121–128.

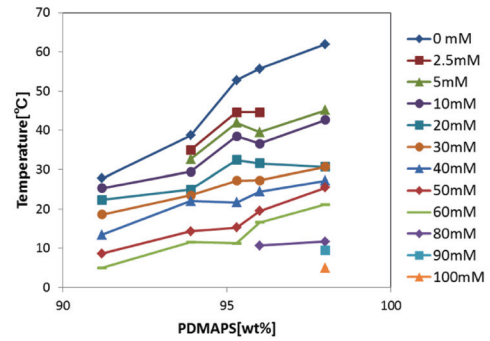


図 1. PEG-*b*-PDMAPS 中における PDMAPS 含量と NaCl 濃度が UCST に与える影響

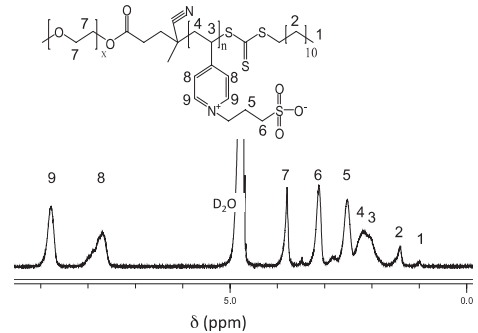


図 2. PEG-*b*-PVPPS (22-67) の 1 M NaCl を含む重水中における <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

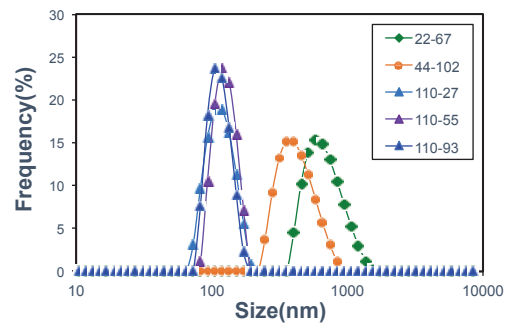


図 3. PEG-*b*-PVPPS ミクロスフィアの粒径分布

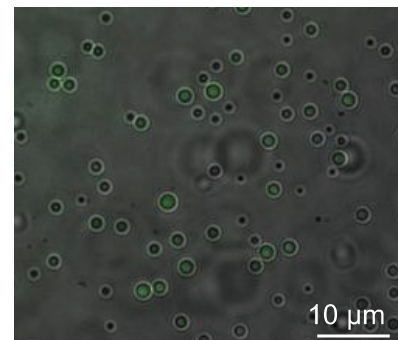


図 4. FITC-BSA を内包した PEG-*b*-PVPPS (22-67) ミクロスフィアの Merge 像