

アミロース工学による分子認識性ナノゲル微粒子の設計と応用

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

秋吉 一成

Synopsis: Stimuli-responsive molecular assembly systems have attracted considerable attention in the fields of biotechnology and drug delivery systems. Typically, the external stimulus is heat, pH, light or the addition of molecules, such as glucose or cyclodextrin. Enzymes are also used to trigger the response of a system. We report here new enzyme-responsive micellar systems in which an enzymatic reaction controls the amphiphilicity of the surfactants. The surfactants in our study consist of a short alkyl chain and a maltooligomer as a primer which can be synthesized enzymatically. In the presence of phosphorylase and α -D-glucose-1-phosphate (G1P), the elongation reaction of the saccharide chain proceeds from the non-reducing 4-OH terminus of the (α 1 \rightarrow 4)-glucan chain. Thus, we first prepared amylose-primer surfactants (C8MP, C12MP, C16MP) where an alkyl group (C8, C12, C16) is linked to the reduced terminus of maltopentaose (MP, number of glucose units (GU) = 5). The surfactants form micelles in water, which are dissociated upon the enzymatic elongation reaction of the sugar moiety. The association of amylose primer surfactants was controlled by changing the amphiphilicity with a chain-elongation reaction triggered by the addition of phosphorylase. We demonstrate here that by using this property the micelle-to-vesicle transition of mixed lipid/ primer systems can be controlled, and this presents a new method for the reconstitution of transmembrane protein to liposome.

1. 緒言

生分解性を有するアミロースは水溶液中において螺旋構造を形成し、その中に疎水性の低分子を包接しうる興味ある高分子ホストである。アミロースはまた、グルコース残基5つからなるマルトペンタオースをプライマーとして、ホスホリラーゼを用いた酵素触媒重合により合成できる^[1, 2]。この反応は非還元末端から進行することから還元末端の修飾により、様々なアミロース誘導体の合成が可能である^[3-6]。

我々はこれまでにポリエチレンオキシド (PEO) 修飾プライマーを合成し、酵素重合法により両親媒性の PEO-アミロースブロックコポリマーを合成した。この PEO-アミロースがククロホルム中にてアミロース部位を内核とした会合体を形成し、特異な包接挙動を示すことを明らかにした^[6]。食品やドラッグデリバリー分野ではすでに利用され安全性も高いアミロースの自己組織化制御による機能発現、ナノバイオマテリアル創製はより広範な利用の途が開かれるものと期待される。

本研究ではマルトペンタオースにアルキル鎖 (アルキル鎖長 = 8, 12, 16) を化学置換した両親媒性アルキル置換プライマー (C8-MP, C12-MP, C16-MP) を合成し、その水中での会合挙動、ホスホリラーゼを用いた酵素重合に

よる会合構造の制御、およびそのバイオテクノロジー応用について検討した。

2. 実験

2.1 アルキル置換アミロースプライマーの合成とキャラクター化

マルトペンタオースの還元末端を既存の方法によりラクトン化し、マルトペンタオースラクトンを得た (図1)。

その後、マルトペンタオースラクトン / エチレングリコール溶液にアルキルアミン / エチレングリコール溶液を滴下し、窒素雰囲気化にて70℃で6時間攪拌することで、アルキル鎖長が8, 12, 16のC8-MP, C12-MP, C16-MPを得た。

構造解析は¹H-NMR, FT-IR, MSより行った。次に表面張力測定により各アルキル置換プライマーの臨界ミセル濃度 (CMC) を決定した。またC12-MP, C16-MPの水溶液中における会合挙動を多角度光散乱測定 (MALS) 測定により評価した。

2.2 アルキル置換プライマーを用いた筋肉ホスホリラーゼによる酵素重合

合成した各プライマーを用いて筋肉ホスホリラーゼによる酵素重合を行った (図2)。

各プライマーまたはマルトペンタオース (1.0mM)、G-1-P (100mM)、AMP (10mM)、筋肉ホスホリラーゼ (0.26 μ M) となるように pH6.2 の 100mM Bis-Tris buffer に溶解し、40℃にて重合を開始した。所定の時間における反応液を用いて遊離リン酸の定量を行い、重合度を求めた。



Amylose engineering: Design of nanogel particles with molecular recognition

Kazunari Akiyoshi

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

2.3 アルキル置換プライマーの酵素重合による動的構造変化

酵素重合による C12-MP ミセルの崩壊挙動を重合条件下における表面張力変化および重合度より評価した。

2.4 アルキル置換プライマーの酵素重合によるリポソームの再構成

DPPC (1mM) および C12-MP (1mM) を G-1-P (100mM)、AMP (10mM)、筋肉ホスホリラーゼ (1.3 μ M) を含む pH6.2 の 100mM Bis-Tris buffer (1mL) に溶解し、40 $^{\circ}$ C にて重合を開始した。各時間における溶液を採取し、0.80

μ m のフィルターを通した後、動的光散乱 (DLS) 測定を行い粒径を評価した。TEM 観察は 0.5% の酢酸ウランにより染色後、100kV で行った。

3. 結果および考察

3.1 プライマーの合成とキャラクタリゼーション

1 H-NMR、MS スペクトルより、アルキルプライマーの合成をそれぞれ確認した。

合成の結果、それぞれ収率 50%、39%、20% で C8-MP、C12-MP、C16-MP を得た (表 1)。

両親媒性プライマーは表面張力測定からミセルを形

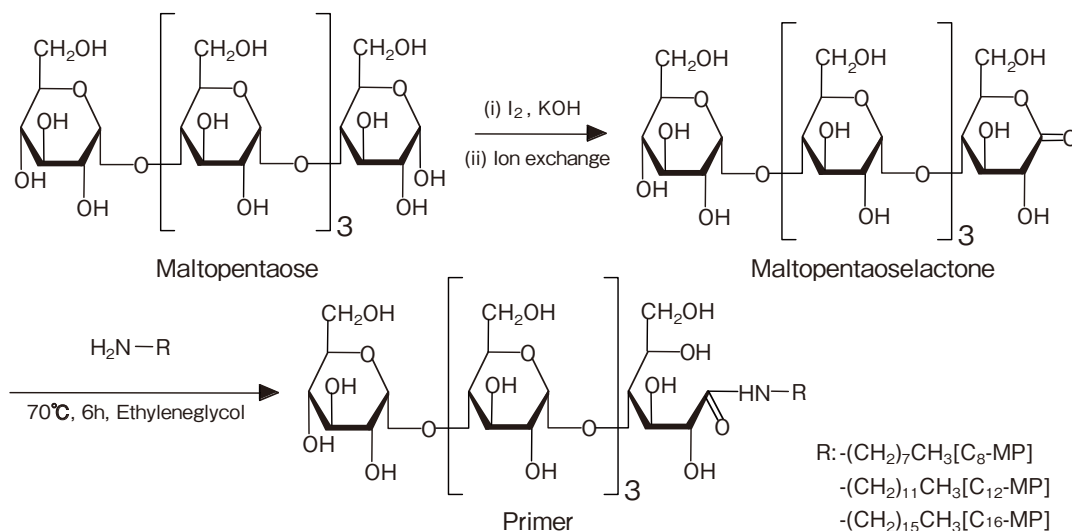


図1 アルキル化アミロースプライマーの合成

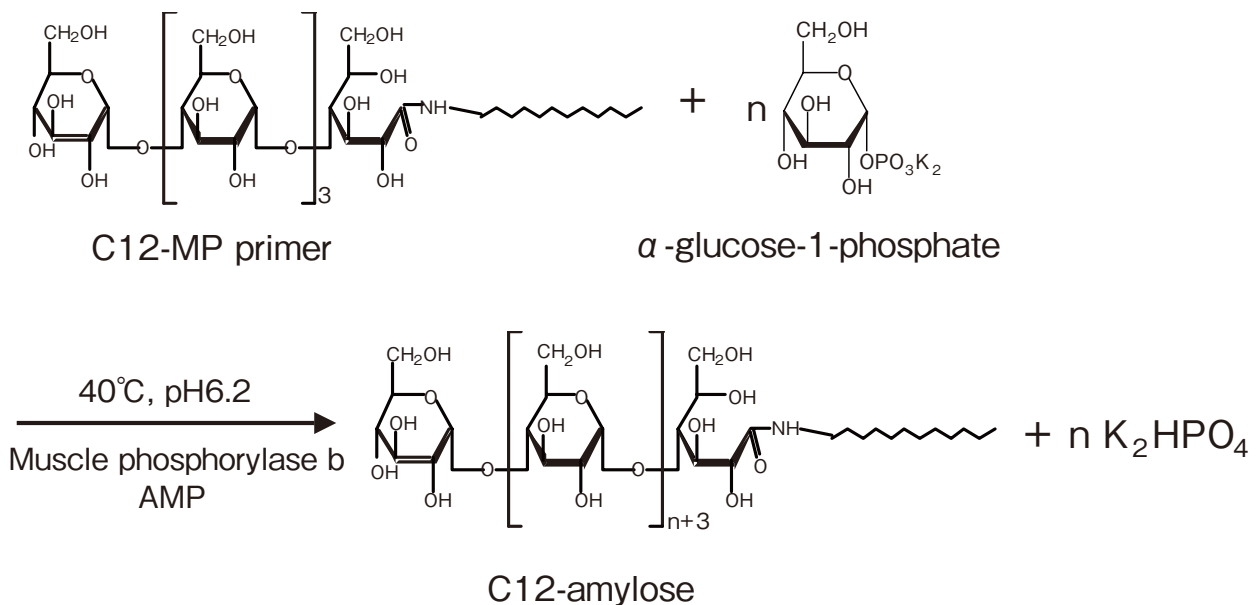


図2 C12-MP プライマーの酵素重合

成していることが示唆され、CMCは、それぞれC8-MP=10mM、C12-MP=0.5mM、C16-MP=0.05mMであることが明らかとなった。静的光散乱測定による求められた会合体の分子量から、C12-MPでは会合数が約68分子のミセルをC16-MPでは138分子からなるミセルをそれぞれ形成していることが示された。

3.2 プライマーの酵素重合

図3より1mMの各プライマー存在下にて筋肉ホスホリラーゼを用いた酵素重合ではC12-MPにおいて酵素重合がマルトペンタオースに比べ、約4倍早く進行した。リン定量により求められた重合度の値は¹H-NMRより計算された重合度とほぼ一致することが確かめられた。また、糖鎖の伸長はマススペクトル(MS)より確認され、分子量分布も狭いことが分かった。

いずれの系でもCMCより低い濃度、すなわちモノマーとして存在する濃度では、重合速度は、アルキル鎖を導入していない未修飾のマルトペンタオース(MP)とほぼ等しかった。一方、C8-MPとC12-MPをCMCよりも高い濃度で重合させた場合には、未修飾MPよりも反応が加

速された。これは、ミセル表面で基質の濃縮効果によるものと思われる。一方、C16-MPではCMCよりも高い濃度では重合反応はむしろ抑制された。本酵素反応の律速は、ミセルから基質プライマーが引き抜かれ、酵素活性点へ取り込まれる段階であると考えられる。疎水性が高く最も安定なミセルを形成するC16-MP系では、ミセルへの引き抜きが抑制され結果的に反応が抑制されたものと考えられた。プライマーの会合状態により、酵素反応が制御しえることが明らかになった。

また、ホスホリラーゼbはAMPが存在することで活性型となり重合を開始することから、AMP分子応答性のミセルともいえる。

3.3 酵素重合によるミセル構造の動的変化

C12-MPミセル(1mM)系での酵素重合反応の時間変化を詳細に観測したところ、重合および表面張力は時間とともに、初期の早い反応過程とその後ある時間経過後の遅い反応の二段階で進行することが明らかになった(図4)。

これは糖鎖の伸長により親水性が増大し、ミセル臨界濃度が増加し、最終的にはC12-MPミセルが崩壊したものと

表1 アルキル置換アミロースプライマーの合成およびキャラクタリゼーション

Abb.	アルキルアミン ¹⁾ (mmol)	エチレングリコール (mL)	収率 (%)	CMC ²⁾ (mM)
C8-MP	6.0	18	50	10
C12-MP	6.0	18	39	0.5
C16-MP	6.0	21	20	0.05

1) マルトペンタオースの仕込量：1.2mmol

2) 表面張力測定による

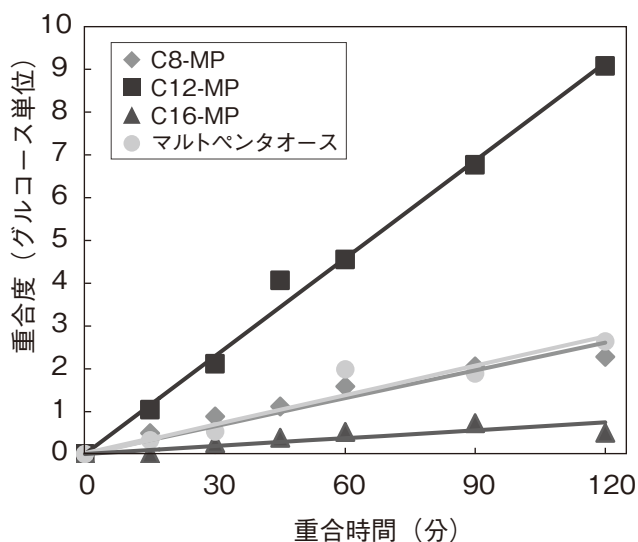


図3 各プライマーの酵素重合

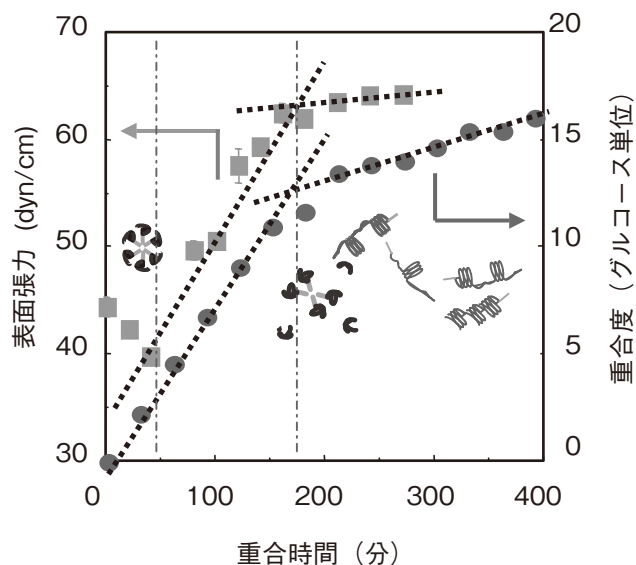


図4 C12-MPの酵素重合による表面張力変化

いえる。今回行った表面張力測定では40分後から160分後に急激な変化が見られたことから、その中間点である100分後の重合度(DP = 9)あたりからミセルの崩壊が始まり、180分後の重合度(DP = 17)でミセルは完全に崩壊していると考えられた。

3.4 ミセルベシクル転移の酵素反応制御：新規リポソーム合成法

リン脂質-界面活性剤系における酵素応答性ミセルベシクル転移についても検討した。リン脂質とC12-MPを混合すると動的光散乱測定より粒径21.1nmの混合ミセルが形成することがわかった。この溶液に酵素処理を行うと、時間とともに会合体の粒径が増加し、重合時間が2時間を経過すると(重合度14)比較的サイズの揃った約100nmのリポソームが形成した。C12-MPの糖鎖の伸長に伴って、その親水性が増加して界面活性剤としての性質が失われ、会合体から除去され結果的にリン脂質のみからなるリポソームへと転移したものと考えられる。

この重合条件における混合ミセルの重合速度はMPの1.5倍であった。電子顕微鏡観察からもサイズの揃ったリポソーム形成が確認された。これは、リポソーム形成法として従来にない新しい手法である。

C12-MPミセルは、バクテリオロドプシン(BR)を可溶化した。このBRを含むミセル溶液にC12-MP-リン脂質(DPPC)混合ミセルを加えた。この溶液に対して、グルコース-1-リン酸および筋肉ホスホリラーゼ存在下酵素重合を2時間行ったところ、約150nmのロドプシン再構成リポソームが調製しえた。この再構成されたロドプシンは、プロトンポンプ活性を有しており、本システムが、新規な膜タンパク質再構成リポソーム調製法として有効であることが明らかになった。

4. 総括

以上のように、糖鎖界面活性剤は、水中、中性pHという穏和な条件下でホスホリラーゼ酵素による糖鎖伸長反応により分子の親水性-疎水性を変化させ、その集合特性、界面特性を制御しえることが明らかになった。これら界面活性の制御は、材料表面へのコーティング、物質可溶化、エマルジョン作成はもとより近年のマイクロ計測における流れやぬれの制御などにおいて重要であろう。この新規酵素応答性界面活性剤を持ちうることで、コロイド化学のみならず、タンパク質再生や膜タンパク質再構成などのバイオテクノロジー分野での幅広い応用が期待できる。

(参考文献)

- 1) Whelan WJ, Bailey JM, : The action pattern of potato phosphorylase, *Biochem. J.* 58, 560-9, 1954.
- 2) Ziegast G, Pfannemueller B.; Linear and star-shaped hybrid polymers.4. Phosphorolyric synthesis with di-functional, oligo-functional and multifunctional primers, *Carbohydr. Res.*, 160, 185-204, 1987.
- 3) Kobayashi K, Kamiya S.; Amylose-carrying styrene Macromonomer and its homo- and copolymers: Synthesis via enzyme-catalyzed polymerization and complex formation with iodine, *Macromolecules* 29, 8670-8676, 1996.
- 4) Loos K, Stadler R.; Synthesis of Amylose-block-polystyrene rod-coil block copolymers, *Macromolecules* 30, 7641-7643, 1997.
- 5) Enomoto N, Furukawa S, Ogasawara Y, Akano H, Kawamura Y, Yashima E, Okamoto Y.; Preparation of silica gel-bonded amylose through enzyme-catalyzed

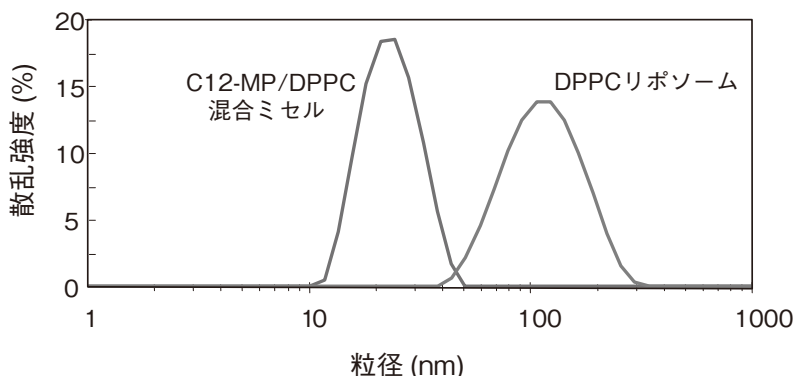


図5 C12-MP/DPPC 混合ミセルの酵素重合によるベシクル転移

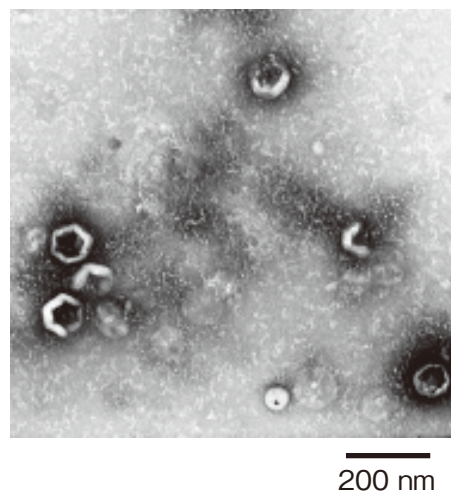


図6 C12-MP/DPPC 混合ミセルの酵素重合により得られたDPPCリポソームの電子顕微鏡像

polymerization and chiral recognition ability of its phenylcarbamate derivative in HPLC, *Anal. Chem.*, 68, 2798-2804, 1996.

6) Akiyoshi K, Maruichi N, Kohara M, Kitamura S.: Amphiphilic block copolymer with a molecular

recognition site: Induction of a novel binding characteristic of amylose by self-assembly of poly(ethylene oxide)-block-amylose in chloroform, *Biomacromolecules*, 3, 280-3, 2002.