

内 22-23

早稲田大学大学院理工学研究科

# 博 士 論 文 概 要

## 論 文 題 目

Syntheses of Bio-related Supramolecules with  
Hydrogen-Bonding  
and their Application to Molecular Recognition

水素結合による生体関連超分子の構築と  
その分子認識能

申 請 者

大 川

春 樹

Haruki

Ohkawa

応用化学専攻

高分子化学研究

2002 年 11 月



超分子化学は、生体機能の模倣、さらに有機分子に分子認識をはじめ高次機能を付与できることから発展を続けている。例えば、ヘモグロビンの酸素運搬機能は、ポルフィリン鉄が非共有結合でグロビタンパク質の特定部位に結合していることに起因している。また血液凝固あるいは癌転移に関わる粘着性タンパク質（インテグリン）は二価イオンを介したキレート効果と水素結合によって特定部位を認識している。生体内で普遍的にみられるこれら一連の分子認識機能を合成系の超分子で実現することは一つの大きな課題である。また、柔軟性を有する超分子は共有結合で構築した分子にはないリサイカビリティ（可逆性）・分子の形態変化・分子スイッチなど独特な高次機能が期待できる。

このような背景をもとに本論文ではまず、非共有結合として多点での水素結合に着目し、ポルフィリン鉄とカリックス[4]アレーンから成る二分子構造体の生成とヘモグロビンモデルとしての機能発現に挑戦した。次いで水素結合によって配向性を制御した新しいポリエチレングリコール脂質の合成とリポソームへの分子認識能の付与について成果をまとめた。特に前者については、所属研究室の修飾ポルフィリンでの先駆的成果をもとに、ポルフィリンの構造および疎水性と構造体生成の相関を、その可逆(リサイカブル)性も含め明らかにしており、ポルフィリンによる酸素運搬の切り口から二次結合力の役割と新しい可能性を示している。具体的には、1章では序論、2～4章ではポルフィリン・カリックスアレーン二分子構造体の生成と酸素結合能、5章ではポリエチレングリコール脂質の合成とリポソームの表面修飾、6章ではアルブミン粒子の調製と分子認識能の付与、7章を終章として結論と将来展望を述べた。各章の概要は以下の通りである。

第1章では、非共有結合として特に水素結合に焦点を合わせてその性質を述べ、生体内でみられる水素結合を駆動力とした分子認識の機構、分子認識を利用した分子カプセル、超分子ポリマーの応用例を整理した。また従来の共有結合によって合成されたポルフィリンの修飾構造、酸素結合能を列挙し、その特徴から本論文で扱う分子認識によって生成されるヘモグロビンモデルの最適分子を理論的に考察し、その有用性と意義を簡潔に述べた。

第2章では、ポルフィリンとカリックス[4]アレーンが多点水素結合二分子構造体を生成することを見い出したので、その分子設計、合成、生成要件（最適なビルディングブロックの組み合わせ、必要な官能基の数）などをまとめた。環状分子の寸法と適度な剛直性から、カリックス[4]アレーンをポルフィリン上に構築するキャビティ分子として選定し、アップーリムに水素結合に関与しうる官能基を持つ誘導体を、ポルフィリン骨格としては、テトラフェニルポルフィリンと類縁体、および対応する金属錯体(鉄、コバルト、亜鉛)を対象とした。Duff 反応、Gross 反応によって誘導したアルデヒド基を有するカリックス[4]アレーンを経由して、酸化反応、Baeyer-Villiger 反応、還元反応によってカルボキシル、ヒドロ

キシル、ヒドロキシメチル基を構築した。また、これら官能基で二～四置換したカリックス[4]アレーン誘導体も合成した。ポルフィリンは対応するベンズアルデヒドとピロールを原料に Adler 法で縮合環化させることによって得た。ポルフィリンとカリックス[4]アレーン各々の自己会合体の生成も想定されたので、まず ESI-MS(エレクトロスプレーイオン化質量分析)を活用して、二分子構造体を生成する条件を官能基の数(水素結合の数)と相関させて探索した。*o*-ピリジルポルフィリンと四ヒドロキシ置換カリックス[4]アレーンが最も安定に二分子構造体を生成すると示唆された。二、三置換体の実験とあわせて安定な二分子構造体生成には少なくとも三点での相互作用が必要であると結論づけた。逆に *m*-ピリジルポルフィリンとは構造体形成が認められず、相互作用の方向性と特異性が示唆された。構造体の O-H 伸縮振動の赤色シフト( $3200\text{cm}^{-1}$ )は、水素結合の寄与を支持した。ポルフィリンのキャビティ構造は、カリックス[4]アレーンの  $^1\text{H-NMR}$  シグナルのポルフィリン環電流効果による高磁場から示された。構造体生成定数は( $\text{M}^{-1}$ ) $10^3$  桁と算定され、ほかのカリックス[4]アレーンから成る分子カプセル系とほぼ同等であった。Foster-Fyfe プロットより 80%以上(確率論的に予想される値は 68%)が構造体を生成と算出され、ピリジン環の自発的回転をともなつて構造体を生成していると考えられた。三ヒドロキシ置換カリックス[4]アレーンの構造体生成定数は四置換体より一桁小さく、かつカリックス[4]アレーン  $^1\text{H-NMR}$  高磁場シフトの非対称性から、カリックスアレーンがポルフィリンに対して曲がって位置していることが示唆された。

第 3 章では、最新の ESI-MS および MS/MS 分析法を駆使して二分子構造体の安定性を熱力学的パラメータと比較しながらカリックス[4]アレーンの分子構造(特に分子の剛直性、官能基数)と相関させて議論した。鑄型合成によりクラウンエーテルで架橋した剛直なカリックス[4]アレーンを、エトキシエトキシ基を Williamson 反応により導入した柔軟性のあるカリックス[4]アレーンを合成して、それぞれ二～四個のヒドロキシメチル基を導入した。ポルフィリンと二分子構造体を生成後、過塩素酸ナトリウムを固液抽出してイオンラベルすることにより ESI-MS シグナル強度の定量性と再現性を実現させた。カリックス[4]アレーンの自己会合体は二分子構造体より安定性が低く、カリックス[4]アレーンがポルフィリンを認識して、二分子構造体が優先的に生成することが実証された。構造体分子イオンのみをイオントラップによって取り出し CAD(Collision Activated Dissociation)分析を実施した。この結果、構造体における水素結合の数(構造体生成エンタルピー変化)と安定性に弱い相関があることが明らかとなった。一方、剛直性の異なるカリックスアレーンを用いた構造体の相対的安定性はカリックスアレーンの剛直性(構造体生成エントロピー変化)との強い相関が認められた。気相中で分子運動を活性化させたことによりエントロピー損失が増幅されることに起因すると考察された。以上より気相中での定量分析により構造体生成に伴うエ

ントロピー、エンタルピー変化に関する考察が可能となった。

第4章では2、3章で得た知見をもとに、一連の二分子構造体への気体分子の結合能を評価した。ポルフィリン鉄(II)構造体は第5配位座にイミダゾールを結合後、鉄を還元させて得た。ESI-MSによって5配位の構造体の生成が明らかとなり、酸素雰囲気下においてもデオキシ状態で安定であった。一方、一酸化炭素雰囲気では一酸化炭素がポルフィリンに配位して安定な6配位錯体を得た。従来報告例がない選択的な一酸化炭素結合能は、カリックスアレーンによって提供されるキャビティの空間状態に起因していると考察された。

第5章では、水素結合によって構造を制御した両親媒性のペプチド由来多アシル型ポリエチレングリコール(PEG)脂質の合成と分子認識素子の結合について記述した。両親媒性分子は親水部としてPEGを、また疎水部として4本のパルミトイル鎖を有しており、4本鎖はアミノ酸の一つリジン骨格のモノデンドロン構造によるものである。モノデンドロン構造と分子内水素結合により規則的にアシル鎖数を増大させたシリンダ状の両親媒性化合物が得られた。上記のPEG脂質をリン脂質二分子膜に導入させた結果、デンドロン世代数の増大にともなった分子内水素結合の増大、アシル鎖数に応じたPEGによるリン脂質二分子膜表面への安定担持と分散安定度増大が明らかとなった。また、直交型保護基(ターシャールブチルオキシカルボニル基、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基)を用いて末端を活性化させたPEG脂質を合成して、チトクロムcをインテグリンファミリーのモデル分子として用いて、PEG鎖を介したリポソームへ収率30%弱で固定化させた。調製直後と調製2ヶ月後で粒子径(約300nm)に差異はなく、蛋白質結合PEGで修飾されたリン脂質二分子膜小胞の分散安定度が証明された。以上の結果は、表面修飾したリン脂質二分子膜小胞の分子認識(ターゲティング)の分野で非常に重要な知見である。

第6章では、分子内ジスルフィド結合を分子間ジスルフィド結合に切り替えることによってアルブミンを重合させ、アルブミンの粒子を調製した。粒子の大きさは数百ナノ～数ミクロンの間で制御可能であった。また調製したアルブミン粒子にヘテロ二官能性の架橋剤によって分子認識素子である粘着タンパク質を結合させ、その結合量、反応速度を解析するとともに、粒子の分子認識能を明らかにした。

第7章は以上の研究の総括と将来展望である。特に、分子認識によって新しく合成した、ポルフィリン構造体は従来のヘモグロビンモデルにはない柔軟性を有しているので、例えば、ポルフィリン機能ユニットの分離・回収性あるいはポルフィリン部への酸素分子の結合・脱着により惹起される構造体の動的変化など全く新しい機能発現が有望である。これらの実現へ向けた具体的な方法論を構造体の次元拡張を含めて将来展望として記述した。