

光極性変化するナノ界面の創製とタンパク質分離膜の光制御の基礎研究

Preparation of cytocompatible polymeric separation membrane film

with photo-reversible phospholipid polymer

東北大学大学院薬学研究科 金野 智浩

【研究の目的】

本研究では、光刺激による分子構造の異性化に伴い親水-疎水性が可逆的に変化するポリマー界面の創製、およびこれを用いた生体分子の非侵襲分離のための基礎研究を実施する。界面におけるポリマー鎖の分子構造の光極性変化により、疎水性相互作用や静電的相互作用の動的変化など界面の物理化学特性を明らかにすることを目的とする。光異性化分子として知られるスピロピラン骨格を導入したメタクリル酸エステルモノマーを合成し、これを一成分とした光異性化ポリマーからなるスマートナノ界面を創製する。この界面を修飾した基材表面を構築し、タンパク質の変性や細胞の活性化を抑止して天然状態のまま吸着・脱着を実現する光分離技法を確立する。

【研究の内容, 成果】

1. 光異性化モノマー (MEOSP) の合成

光異性化ユニットとして、スピロピラン骨格を有するメタクリル酸エステル(MEOSP)を合成した。MEOSPは、ポリエチレングリコールモノメタクリレートにスピロピラン骨格を有するアルコール(SPOH)を縮合反応により導入することで合成した。合成したMEOSPの構造は¹H-NMR解析により帰属した。

2. 光異性化ポリマーの合成

MEOSPを一成分に含むポリマーを合成した。MEOSPおよびタンパク質分子との相互作用が極めて低く、細胞親和性を有する2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)、基板表面への物理吸着時における成膜性が良好な *n*-ブチルメタクリレート

(BMA)からなる三元共重合体を合成した。代表的なポリマーの化学構造式を Fig. 1 に示す。

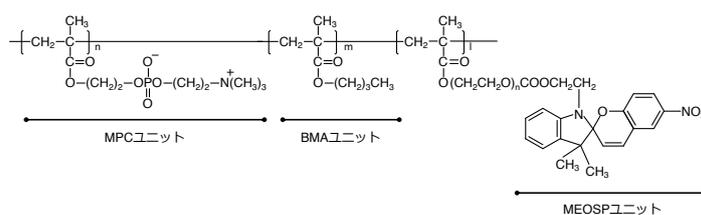


Fig. 1 Chemical structure of phospholipid polymer bearing photoisomerizable unit

各ユニットの配列がランダムなランダムコポリマー、および各ユニットの配列を規定したブロックコポリマーをフリーラジカル重合または可逆的付加開裂連鎖移動ラジカル重合により行った。ランダムコポリマーおよびブロックコポリマーともに重合に成功し、一定の組成をもつ光異性化ポリマーを得ることができた。

得られたポリマーをエタノールに溶解し、その溶液の光異性化反応を検討した。MEOSP ユニットは紫外線照射時にメロシアニン構造に異性化し、可視光線照射時にスピロピラン構造に逆反応することを特徴とする。あらかじめ可視光線を 5 分間照射することでスピロピラン構造にした後に、続けて照射波長を切り替えて紫外線を照射することでメロシアニン構造への異性化を評価した。Fig. 2 に紫外線可視吸収スペクトルを示す。545 nm の吸収はメロシアニン構造に由来する吸収である。この結果、紫外線照射 10 分間で十分に光異性化反応が生起することがわかった。また、メロシアニン構造のポリマーに対して可視光線を照射することで逆反応が生起し、スピロピラン構造に戻ることも確認できた (Fig. 3)。

3. 光異性化ポリマー表面の調製と機能評価

ランダムコポリマー型の PMB-*r*-MEOSP、およびブロックコポリマー型の PM-*b*-(BMA-co-MEOSP) を修飾した基板表面を調製した。調製条件はいずれも 0.2 wt% エタノール溶液を用いたディップコーティング法で行った。得られたポリマー表面の接触角測定を行った。いずれのポリマー表面もスピロピラン構造/メロシアニン構造に依らずほぼ一定の接触角であることがわかった。したがって、親水性ユニットとして 20 mol% の MPC ユニットを含むポリマーの場合、その最表面には極めて親水性に優れる MPC ユニットが支配的になっていることが示唆された。この場合においても光照射によって基板表面の色調変化は認められたことから、光異性化反応は液相側ではなく固相側で生起していると考えられる。

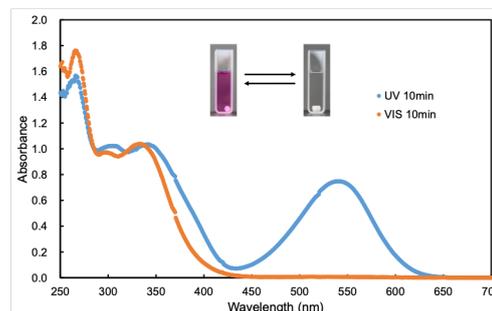


Fig. 2 UV spectra of photoisomerizable PMB-SPMAs in 1 mg/mL ethanol solution (dashed line: spiropyran form, solid line: merocyanine form)

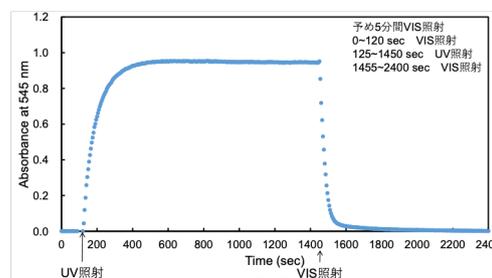


Fig. 3 UV absorption at 545 nm attributed to merocyanine form of PMB-SPMA toward to photo-irradiation time.

次に、これらの表面に対する低分子化合物の吸着特性を評価した。低分子化合物はモデル薬物としてメチレンブルーを用いた。Fig. 4 にスピロピラン構造（疎水的）またはメロシアニン構造（親水的）に対するメチレンブルーの吸着量を示す。この結果、いずれの表面においても一定の吸着量を認め、特にスピロピラン構造に対して有意に吸着が起きていることがわかった。メロシアニン構造になることで疎水性相互作用のみならず静電的相互作用が惹起し、吸着量が増大することはなく、溶質の吸着挙動は主に疎水性相互作用によるものであることがわかった。最表面を形成している MPC ユニットのタンパク質の吸着を抑制する一方、低分子化合物に対しては透過性を有しており、BMA ユニットまたは MEOSP ユニットに吸着することがわかった。しかしながら、スピロピラン構造において有意に吸着が起きていることから、可視光線照射時の親水型構造（メロシアニン）への異性化が起こったとしても脱着しにくい状態（不可逆的吸着）であった。

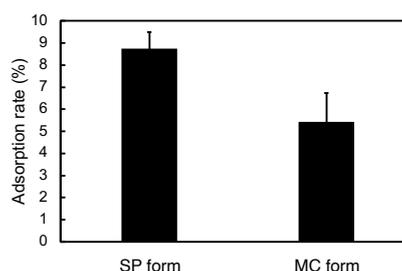


Fig. 4 Adsorption of methylene blue on the photoisomerizable polymer surface

4. 光異性化ポリマー表面への細胞接着

ポリマー表面への細胞接着性を評価した。スピロピラン構造とメロシアニン構造の表面をそれぞれ用意し、上皮様細胞（HeLa 細胞）の接着性を評価した。Fig. 5 に播種 24 時間後の位相差顕微鏡写真を示す。ネガティブコントロールとして、MEOSP ユニットを導入していないポリマー（PMB30, MPC/BMA=0.3/0.7 mole fraction）において細胞接着を完全に抑制した。これは培養環境において BMA ユニットが安定に固相側に多点で物理吸着しており、一方、MPC ユニットが水相側で支配的になることでタンパク質吸着のみならず細胞接着も抑制することを示している。一方、MEOSP ユニットを導入したポリマー表面ではその光異性化によって接着性に差異があることがわかった。特に疎水性のスピロピラン構造において細胞接着を認め

(a) Spiropryan form



(b) Merocyanine form



Fig. 5 Cell adhesion on (a) PMB-MEOSP with spiropyran form and (b) with merocyanine form surface

た。その傾向はランダムポリマーとブロックポリマーにおいても差異が認められ、特にブロックポリマーを修飾した基板表面のスピロピラン型において有意に接着を認めた。今後、ブ

ブロックポリマーを修飾した表面の相分離構造などを解析する必要があるが、ブロックコポリマーにすることで表面にマイクロドメイン構造が形成されたことを示唆するものである。光照射による可逆的な細胞接着は認められていないが、ポリマー分子内のマイクロな構造変化を鋭敏に反映した細胞接着性の相違を認めることができた。

【今後の研究の方向，課題】

本研究の遂行により、細胞親和性を特徴とする MPC ポリマーの動的物性制御を目的として、光照射により親水-疎水性が切り替わる光刺激応答性ポリマーによるタンパク質および細胞分離膜の基礎的研究を実施した。本研究では、疎水性ユニットとして *n*-ブチル基を側鎖に有する BMA を中心に進めてきた。BMA は MPC との共重合反応性が良好であり、仕込み組成に応じて導入量を制御することができる。また、その単独ホモポリマーのガラス転移点は約 20°C であり、成膜性や造膜性に秀でており、基材表面に安定な修飾膜を形成することができる。さらに生体内環境においても長期にわたり安定な修飾膜として機能する。その結果、水系では MPC ユニットが水相側に配向し、タンパク質吸着抑制や細胞接着抑制効果を発現する。この表面に対して第三成分目に MEOSP のような機能性ユニットを導入することで表面の光機能化を検討した。しかしながら MEOSP ユニット自身が疎水的のモノマーであり、光異性化した後のメロシアニン構造においてもスピロピラン構造と比べた場合に相対的に親水的という程度である。したがって、極めて親水性に秀でた MPC ユニットが最表面相を支配する結果、光異性化反応が修飾膜の内部で生起することから、明瞭な色調変化は認められるものの、接触角などの表面物性にまで摂動効果をもたらせることは困難であった。低分子化合物は最表面の MPC ユニットの透過して固相側に吸着することが可能であった。したがって、系の pH 変化などを含めて脱着機構をさらに検討することで光照射による低分子化合物の溶出性を付与できると考えられる。一方、タンパク質や細胞などのスケールの分子群の吸着や脱着は最表面相の物性を反映する。そこで、疎水性ユニットとして、側鎖のアルキル鎖をヘキシル基にした *n*-ヘキシルメタクリレート (HMA) を成分とする光異性化ポリマーを合成してきている。このポリマーを基材表面に修飾し、細胞接着性について評価したところ、BMA を疎水性ユニットとするポリマーと比較して、明らかに細胞接着性が亢進することがわかった。現時点においては、スピロピラン構造とメロシアニン構造とで細胞接着性に明確な差異は認めていないが、光機能性表面を設計する際にポリマーに導入する疎水性ユニットについても十分に留意する必要があると考えられる。さらにブロックコポリマー化することで表面に明確な相分離構造を形成させるなど、より精密な表面設計が必要であると考えられる。

【成果の発表，論文等】

岩附芽衣，能崎優太，金野智浩，可逆的光応答性を特徴とする生体親和性リン脂質ポリマーの創製と機能評価，第 70 回高分子討論会，2021 年 9 月 6 日-8 日（オンライン開催）