

細胞膜類似の応答機能を有する合成高分子膜の創出

Design of polymeric membranes having responsive functions like cellular membranes

代表研究者 東京工業大学生命理工学部生体分子工学科・助手 丸山 厚
Res. Assoc., Dept. of Biomol. Enging., Tokyo Inst. of Tech.
Atsushi MARUYAMA

Two kinds of hydrogel membranes which changed their membrane properties in response to metal ion were prepared. One of them was crown ether containing gels. Swelling degree of the gels was increased by an addition of metal salt such as NaCl and KCl, whereas that of the control gels was decreased. Permeability of the crown ether containing gels was able to be controlled by the external ion concentration. Mechanism in the permeation control was based on diffusibility changes caused by the swelling change. The other membrane was consist of polysaccharide. Adsorption of cationic dye, crystal violet (CV), to polysaccharide gels was markedly suppressed by an addition of metal salt. This suppressive effect of the salt depended on the configuration of hydroxyl groups on polysaccharide and kind of metal ions. Thus, the effect was considered to be due to specific interaction between metal ion and hydroxyl groups on polysaccharides. The permeation of CV was also able to be regulated by coexisted metal ion. In this case, permeation control mechanism was based on partition control. The polysaccharide gels were examined as glucose sensitive gels, because addition of polyols as sugars was expected to affect the interaction between metal ions and polysaccharide gels. CV adsorption increased in response to glucose concentration in the presence of metal ions, while it was not changed in the absence of metal ions. The result indicated that polysaccharide gels had potential as a new type of glucose sensor.

研究目的

細胞膜とりわけ形質膜は、原形質と外界と物理的な境界として細胞の構造を保持しているのみならず、種々の膜タンパク質と共にイオンやアミノ酸などの低分子物質の透過制御、シグナルの伝達などの生命維持に不可欠な機能を果たしている。その中でも、レセプタータンパクは細胞の外界におけるシグナルとなる糖やペプチド、ホルモンなどの基質を高感度、高分解能で認識し、原形質側にその情報を送達し、酵素活性の制御や膜透過性の調整などの2次的な機能に結び付けている。このように特定の物質を認識すると共に、その濃度変化に応じ反応性や物質輸送能を制御するシステムは、人工臓器や自己制御型薬物放出システムをはじめとして、生体機能を積極的に制御しうるデバイスの実現には不可欠であると考えられる。

これまでに酵素やレクチンなどの生体由来の高分子を認識デバイスとして巧みに利用し膜の透過性などを制御した例はいくつかあるが、免疫応答からの回避、生体内安定性、応答性の精密制御あるいは種々の物質に対するデバイスの設計を可能にするためには、タンパク質等の生体由来の物質に頼らない新しい概念に基づく材料設計が重要となる。

本研究では、シグナル分子として生体内でも重要な役割をしている金属イオンに着目し、金属イオンの濃度に対応して透過性の変化する高分子膜の設計を行った。さらに、金属イオンと糖との相互作用を利用し、糖に応答する膜システムについても検討を加えた。

研究経過

膜を介した物質の透過速度(P)は、膜中での物

質の拡散定数 (D) と外液/膜間の物質の分配係数 (K) により次式のように表せる。

$$P = DK(C_0 - C_1)/l$$

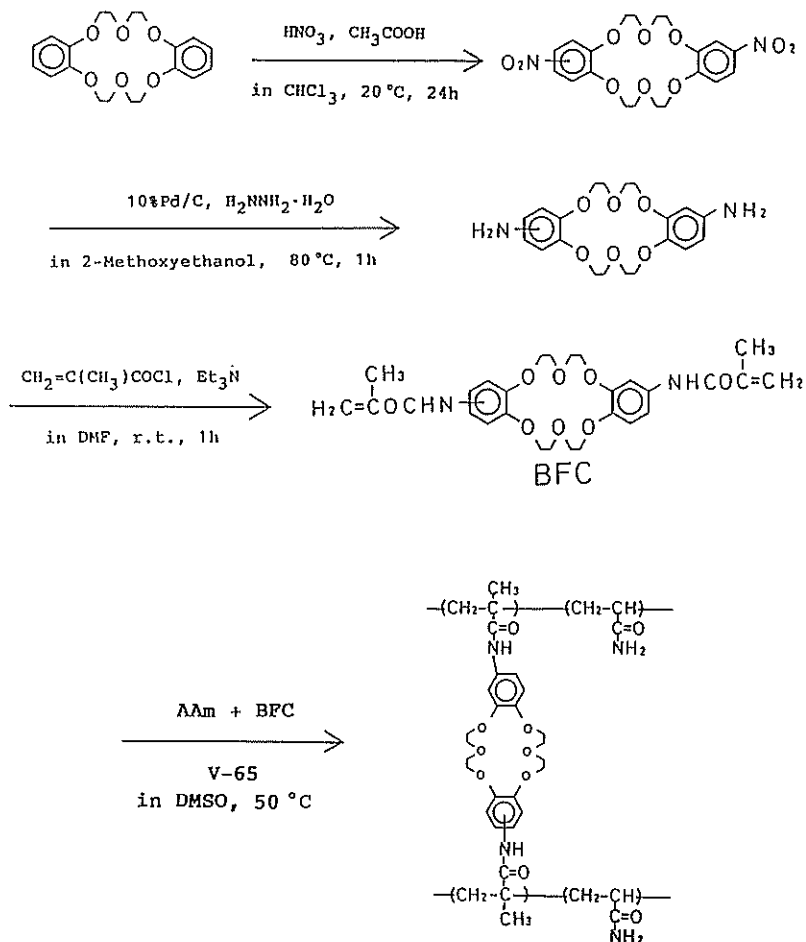
C_0, C_1 : 供給側及び透過側の外液濃度, l : 膜厚

したがって、膜の透過性を変化させるには、拡散係数あるいは分配係数を制御することが必要となる。つまり、外部からの刺激に応じてこれらの因子を変化させることが必要となる。本研究では、金属イオンにより膜の拡散係数が変化する膜及び分配係数が変化する膜の双方について検討を加えた。

1. クラウンエーテルを含む高分子水ドロゲル膜の調整とそのイオン応答性

水ドロゲルの膨潤は、ゲル内への浸透圧によ

りもたらされるが、浸透圧はゲルを構成する高分子鎖と溶媒との熱力学的な相互作用、高分子鎖と溶媒のエントロピー変化、高分子鎖の弾性さらに荷電基を有する場合は電荷間の相互作用により定まる。クラウンエーテルは、金属イオンに選択的に配位することが知られている。したがって、クラウンエーテルをゲル内に固定することにより、金属イオンとの相互作用でゲルの浸透圧が変化し、ゲルの膨潤度が金属イオン選択的に変わることが予測される。水ドロゲル内の物質の拡散定数は、ゲルの膨潤度の増加に伴い指数関数的に大きくなるので、これにより透過性を変化させられる。クラウンエーテルを含有する水ドロゲルをスキーム 1 に従い調製した。つまり、ジベンゾ-



スキーム 1. クラウンエーテル含有高分子ゲルの合成

表1. クラウンエーテル含有高分子ゲルの合成

Code	AAM			BMA		BFC	Conc. of soln.*
	mol%			mol%		mol%	wt%
10C2.5	97.6					2.4	10
10C5	95.2					4.8	10
15C2.5	97.6					2.4	15
15C5	95.2					4.8	15
20C2.5	97.6					2.4	20
20C2.5B10	91.8			6.1		2.1	20
20C2.5B30	80.8			17.3		1.9	20

Code	AAM			BMA		EGM	Conc. of soln.
	mol%			mol%		mol%	wt%
10E2.5	97.6					2.4	10
10E5	95.3					4.7	10
15E2.5	97.4					2.6	15
15E5	94.8					5.2	15
20E2.5	97.6					2.4	20
20E2.5B10	91.2			5.5		3.3	20
20E2.5B30	80.2			16.7		3.1	20

* 重合時のモノマー濃度

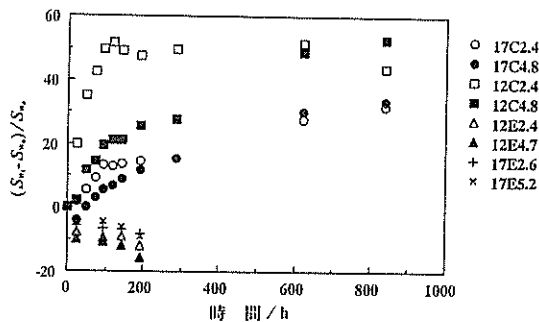


図1. カリウム塩による膨潤度変化

S_{w0} : 純水中の膨潤度

S_w : 0.1 mM の KCl 溶液中 t 時間後の膨潤度

18-クラウン-6 のジアミノ体を合成後、これに重合性の官能基であるメタクリロイル基を導入し架橋性モノマー (BFC) とした。これとアクリルアミド (AAM) を共重合することに高分子架橋膜とした。表1に、合成したゲルの組成を示す。一方、クラウンエーテルを含まない対照ゲルとしてエチレングリコールジメタクリレート を架橋剤としたゲルも作製した。

純水中で平衡膨潤に達したこれらのゲルに、カ

リウムイオン (K^+) を添加した際の膨潤度変化を 図1 に示す。クラウンエーテルを含まない対照ゲルではいずれもカルシウムイオンの添加に伴い膨潤度は減少するのに対し、クラウンエーテルを含むゲルはイオン添加直後から膨潤度が増加し始めた。対照ゲルでは塩の添加にともない外液の浸透圧が高くなりゲルが収縮する。一方、クラウンエーテルを有するゲルでは、クラウンエーテルと K^+ とのコンプレックス形成によりゲル内の塩濃度が増加する結果、膨潤度が増加したものと考えられる。さらに、クラウンエーテル部分の新水性が K^+ との結合により高められることも膨潤度が増大する一因と考えられる。表2に種々のゲルの膨潤度変化をまとめる。KCl 濃度が 0.1 mM の時には、対照ゲルでは大きく収縮するのに対して、クラウンエーテルを含むゲルではいずれのゲルも膨潤度が増加している。一方、KCl 濃度が高くなると、クラウンエーテルを含むゲルでも収縮することが分かる。つまり、ゲル中の塩濃度の増加よりも外液中の塩濃度の増加が大きくなることによりゲルが収縮したと考えられる。したがって、最

表2. 種々のゲルの膨潤特性

Code	S_w^*	$S_w'^{**}$	$[K^+]$	$(S_w' - S_w)/S_w$
			mol dm ⁻³	%
10C2.5	182	263	10 ⁻⁴	44.2
15C2.5	41.9	55.5	10 ⁻⁴	32.5
20C2.5	22.3	27.7	10 ⁻⁴	24.0
20E2.5	160	31.9	10 ⁻⁴	-80.2
10C5	65.9	102	10 ⁻⁴	54.7
15C5	17.9	24.2	10 ⁻⁴	35.6
		23.1	10 ⁻³	29.4
		16.0	10 ⁻²	-10.5
		14.6	10 ⁻¹	-18.3

* S_w : 純水中の膨潤度

** S_w' : KCl 水溶液中の平衡膨潤度

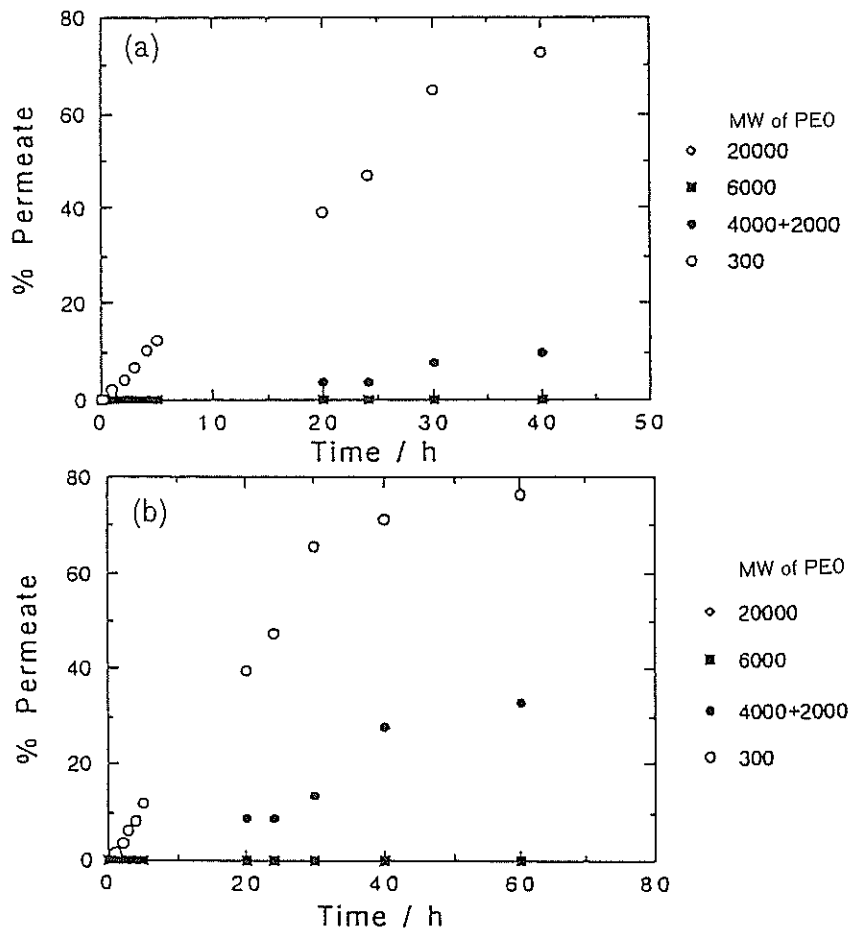
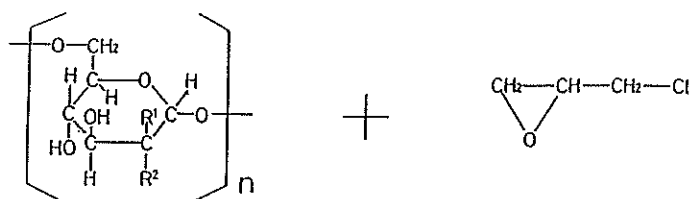


図2. 15C5B30膜を介したPEOの透過挙動
(a) 塩不在下, (b) 0.1 mM KCl 存在下

大の膨潤度を示す塩濃度はゲル内のクラウンエーテル濃度やイオン種（クラウンエーテルとの結合定数）により異なることを示し、このようなゲルにより金属イオンの種類や濃度を検知できることを示す。

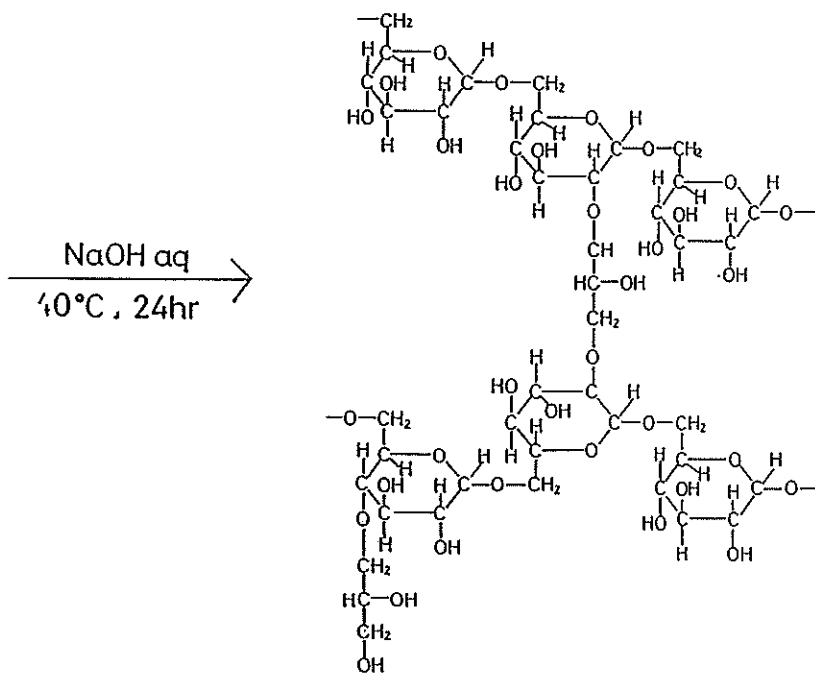
金属イオンに応答し膨潤度が制御できることが分かったので、これらのゲル膜による透過制御を試みた。透過実験は、2室型のセルの中にゲル膜を挟み、濃度勾配による物質の透過性を評価した。透過物質としては、分子量の異なるポリエチ

レンオキサイド (PEO) を用い、透過選択性の変化を評価した。図2は5 mol% の BFC 及び強度を高めるために 30 mol% のブチルメタクリレート (BMA) を含むゲル膜を作成し、これを介した透過挙動を示す。塩が存在しない場合、分子量 300 の PEO のみが速やかに透過するのに対し、0.1 mM NaCl 存在下では分子量 6000 の PEO の透過も観察される。つまり塩の存在により膜の膨潤度が高まり、より高分子量の PEO が透過可能となったことを示す。この結果は、適宜塩濃度を変



Dextran : $R_1 = H, R_2 = OH$

Mannan : $R_1 = OH, R_2 = H$



スキーム 2. 多糖ゲルの調製

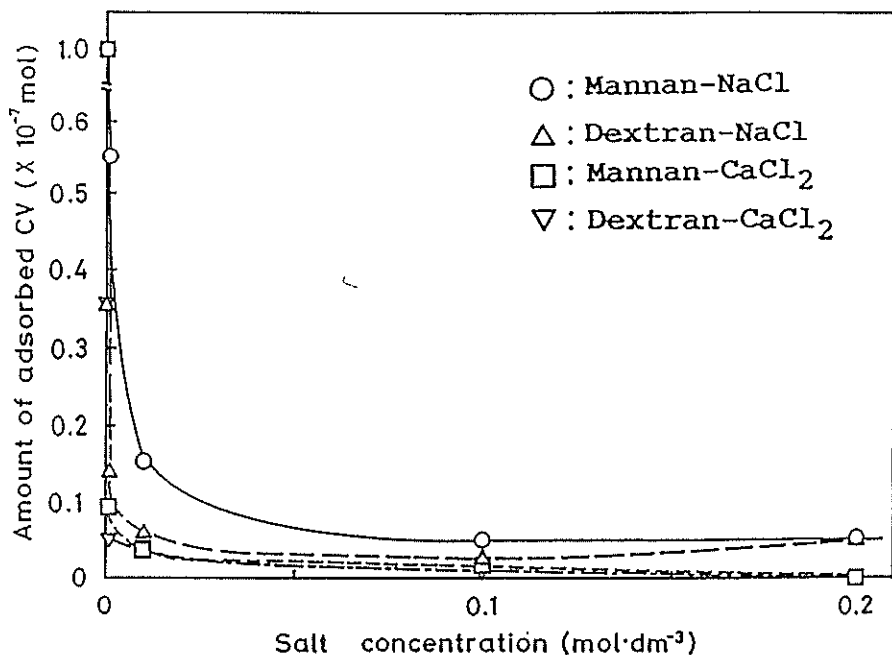


図3. CVの多糖ゲルへの吸着性及び共存イオンの効果

化させることにより、分子量の異なる物質を順次フラクションとして連続的に分離できることを示し、新しい膜分離システムが構築できることを示唆する。

2. 分配係数制御によるイオン応答性膜

糖などの多価のアルコールは、金属イオンと配位結合することが知られている。この結合性は水酸基の立体配座と金属イオン種によって異なる。したがってポリオールからなる膜は、金属イオンに反応しその物性変ることが期待される。そこで、立体配座の規定されている多糖を利用し、ハイドロゲル膜を作成しそのイオン応答性を評価した。繰り返し単位構造中のC-1位の水酸基の配座が異なるデキストラン及びマンナンをエピクロロヒドリンで架橋することによりハイドロゲルを調製した(スキーム2)。これらのゲルに対する色素クリスタルバイオレット(CV)の吸着性を、金属イオンの存在非において検討した結果、図3に示すように1 mM-10 mM以上の塩存在下においてCVのゲル膜への吸着が大きく抑制されることが見いだされた。CVは、有機カチオンでありその多糖ゲルへの吸着に、水酸基との相互作用が含ま

表3. 多糖ゲルへのCVの分配係数とその塩添加による変化

Gels	Blank	NaCl	CaCl ₂
Dextran	65.3	7.70	4.91
Manna	579	24.9	5.59

CV初濃度: 1.37×10^{-3} M
塩濃度: 0.01 M

れることが予想される。したがって、金属イオンの存在により、この相互作用が競合的に阻害されCVの吸着性が抑制されたものと考えられる。さらに表3に示すようにこの抑制効果は、マンナンとデキストランで微妙に異なることが分かる。すなわちデキストランではNaCl, CaCl₂共に同程度の阻害効果を発現するのに対して、マンナンではNaClに比べCaCl₂で顕著であった。したがって、多糖ゲルと各イオンの相互作用は以下の順であることが分かる。

Dextran: $CV \ll Na^+ \leq Ca^{2+}$

Mannan: $CV \ll Na^+ < Ca^{2+}$

以上のように、CVの吸着(分配)性が、金属塩の存在により大きく変化することが認められた。

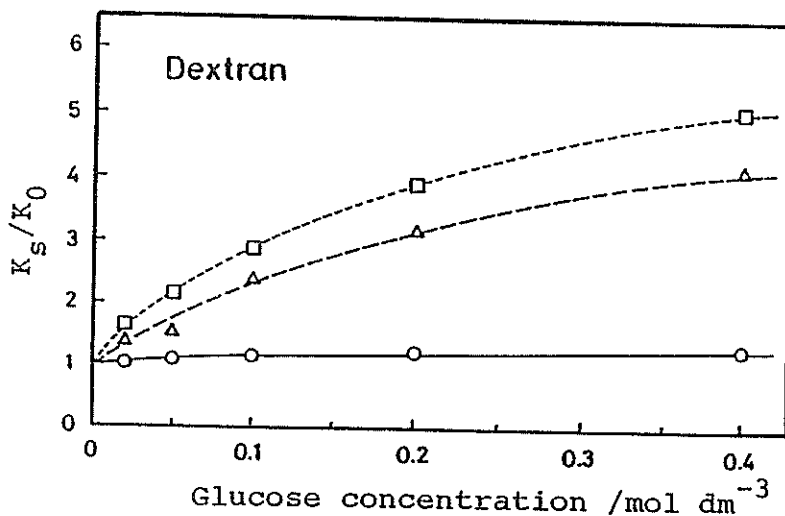
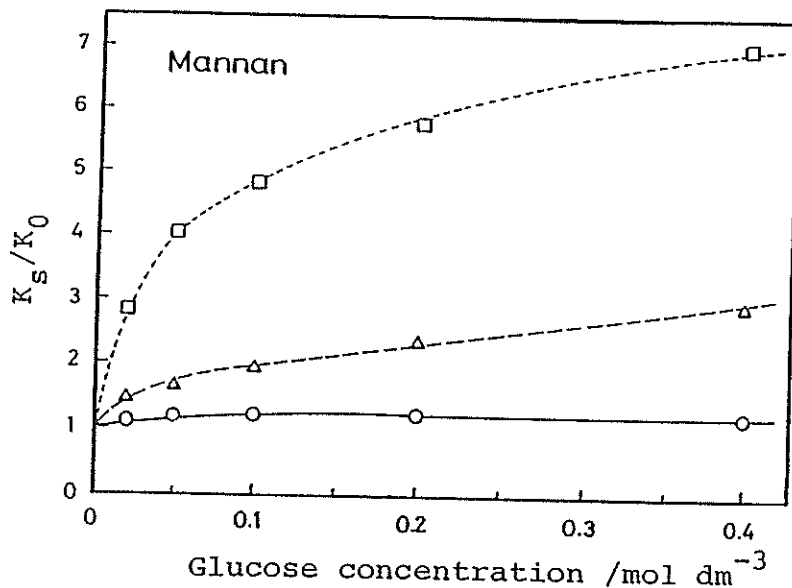


図4. CVの分配係数に及ぼすグルコースの効果

K_D : グルコース添加前の分配係数

K_S : グルコース添加後の分配係数

○: no salt, △: 0.1 M NaCl, □: 0.1 M CaCl₂

そこで多糖ゲル膜を介したイオン応答性の透過制御について検討を加えた。金属塩の存在下及び不在下でCVの透過速度を測定した結果、金属塩存在下に比べ金属塩不在下ではCVの透過速度が約2.5倍増加することが分かった。このことは、分配係数の変化と一致しており、金属塩不在下においてCVの膜への分配係数が増大し透過速度が速

まると解釈される。金属イオンとポリオールとの相互作用は有機溶媒中では比較的強いが水中では非常に弱い。しかしながら本研究より、ハイドロゲルとし有機カチオンとのであるCVの吸着を指標とすることにより非常に明確にその相互作用が見ることができ興味深い。

3. 糖を認識する高分子膜

2. で述べたように、多糖ゲル膜が金属イオンと相互作用することにより、CVの分配挙動が変化することが明らかとなった。このようなシステムにさらに外液に糖などの多価アルコールを加えることにより、ゲル/金属イオン間の相互作用に影響を与えCVの分配化が変化すると予測される。そこで多糖ゲルへのCVの分配に及ぼすグルコースの添加効果を検討した。図4は、デキストラン及びマンナン膜へのCV吸着に及ぼすグルコース添加効果を金属イオンの存在下、不在下で検討した結果を示す。金属イオンの不在下では、いずれの膜へのCV吸着性もグルコースの影響を受けない。一方、金属塩を加えた系では、グルコースの添加量に依存してCVの分配性が增大していることが分かる。つまり、外液に加えたグルコースが金属イオンと相互作用する結果、ゲルと金属イオンとの相互作用に影響を与え、CVの吸着性が増大したものと考えられる。このように、グルコースに反応するシステムは、新しいグルコースセンサーやグルコース濃度に反応しインシュリンを放出する自己制御型インシュリン放出デバイスなどへの利用が期待される。

今後の課題と発展

本研究では、特に金属イオンとの相互作用を利用し、ハイドロゲルの膨潤度あるいは分配係数を制御することにより、金属イオンに反応する透過制御が可能であることを明らかにした。また、多糖ゲル膜では、元来非常に弱い金属イオンと糖との相互作用が、ハイドロゲルとすることにより非常に敏感に検知できる点で興味深い。さらに、金属イオンと糖との相互作用を利用し、グルコースに反応するハイドロゲルが実現された。これらは、新しい膜分離システムやセンサー、薬物放出システムへの応用が期待される。とりわけ多糖からなるゲルは、生体内への埋め込や投与などの点でも有利であり、グルコースセンサーやインシュリン放出システムへの展開が考えられる。しかしながら、これらのシステムを実現するためには、イオン種あるいは糖種に対する選択性及び反応性をより高める必要がある。また、ゲル膜の力学的強度の改善も必要である。今後、ゲルの架橋構造の最適化、糖鎖構造などの最適化を計り、より高選択的、高反応性を併え持つハイドロゲルシステムを構築したい。