

平成4年度新エネルギー・産業技術総合開発機構委託

「先進バイオ材料の創製加工技術の研究開発」 成果報告書

平成5年3月

財団法人 大阪科学技術センター

NEDO 図書・資料室

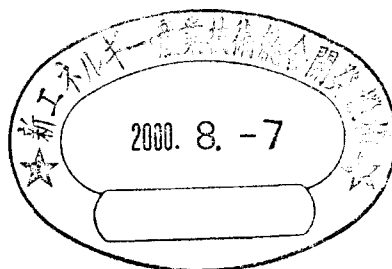


010015482-2

79
68
0

目 次

	ページ
1. はじめに	1
2. 機能性分子の創製技術の研究開発成果	
2.1 ペプチドの構造機能設計の研究開発	3
2.2 配座制御技術の研究開発	22
2.3 光・電子機能を持つペプチドの研究開発	33
2.4 酵素法によるペプチド合成の研究開発	42
2.5 非天然アミノ酸のペプチドへの導入方法の研究開発	62
3. 機能性分子の材料化技術の研究開発成果	
3.1 基板形成技術の研究開発	81
3.2 基板修飾技術に関する研究開発	117
3.3 ペプチドの結合試薬の開発	129
3.4 分子識別能をもつバイオ材料の創製とその安定化技術の研究開発	148
4. 総合調査研究	
4.1 総合調整委員会の組織と活動	157
4.2 先進バイオ材料に関する文献調査	158
5. まとめ	163



1. はじめに

大阪工業技術試験所
吉 川 暹

生体のもつ高度な機能を利用したバイオ材料の開発は、21世紀における産業基盤技術として、その重要性が指摘されている。一方、化学工業、エネルギー産業等の産業分野あるいは医療福祉等の分野に用いられる機能材料に対する要求は年々高度化しており、その要求を満たすものとして、分子レベルでの精密な機能設計が可能なバイオ材料に対する大きな期待が寄せられており、とりわけ天然の枠にとらわれないバイオ材料の開発が課題となっている。

そこで、本研究開発においては非天然アミノ酸を含むペプチドを創製し、これを各種材料と複合化する事によって生体の持つ高度な機能を発現し得る先進バイオ材料の創製加工技術を開発することが基本的な目標となっている。

このようなテーマが近畿地域の重要地域技術研究開発テーマとして取り上げられた背景には、従来から近畿地域の化学産業を始めとする繊維、医薬品等の産業において、新医薬、機能性蛋白、生体材料等のバイオ分野での産業活動が活発であり、蛋白工学研究所をはじめとする多数の関連研究機関の集積があることがあげられる。これらバイオ分野においては、これまでの天然の生理的機能に加え、本来この分野が可能性としてもつ環境調和型技術や高度な機能材料としての展開への強い要求があることから、近年、天然の枠にとらわれないバイオ材料の創出への期待が高まっており、新たな機能性分子の創製及びその材料化、並びにその評価が重要な研究開発課題となっている。

そこで、この分野の新たな基盤技術を育成し産業技術として確立していくために、ペプチドを利用したバイオ材料の開発を今後6年間にわたり先端的な地域大プロとしての取り組んでいくことの重要性について合意形成が図られた。

本テーマは、近畿のバイオインダストリーの振興を目指して新しいバイオテクノロジーの基盤を確立するために世界に先駆けて取り組みを始めたものであり、近畿が基礎分野において発信源となり得る領域の形成ということも大きな目標となっている。従って、要素となる各技術課題は未分化のものが多く、大阪工業技術試験所が中心となって地域の民間企業、公設試験研究機関等と連携しつつ、各要素技術を分担していくことにより相互補完的に新たな技術基盤の形成を図っていくことがとりわけ重要であることから、本NEDO委託研究においては、機能性分子の創製技術及び機能性分子の材料化技術の2項目にわたる、以下の9課題について研究開発を開始した。

各項目は、1) ペプチドの構造機能設計、2) 配座制御技術、3) 光・電子機能をもつペプチド、4) 酵素法によるペプチド合成、5) 非天然アミノ酸のペプチドへの導入方法、6) 基板形成技術、7) 基板修飾技術、8) ペプチドの結合試薬、9) 分子識別能をもつバイオ材料の創製とその安定化技術の9つであるが、いずれもペプチドを工学的に利用していくためには重要なものばかりである。

今年度は期間が3ヶ月強であるということもあり、それぞれ機能性分子の設計や材料化手法の選定などが主たる研究内容となっており、いわば平成5年度に開始される本格的な研究に向けたフィージビリティスタディーの期間である。その研究成果は今後の進展の礎となるものであり大変重要である。

2. 機能性分子の創製技術の研究開発成果

2. 1. ペプチドの構造機能設計の研究開発

田辺製薬株式会社
土佐 哲也、沼波 憲一
山田 昌樹、清水 良

1. はじめに

タンパク質の構成成分であるペプチドは、生体内において種々の生理的機能の発現に深く関わっている。とりわけそれらの中には、細胞膜上のレセプターを介して細胞間の情報伝達能を有する物が多く見出されている。即ち、多細胞が示す生命現象において、動物細胞同志がお互いの構成タンパク質を認識することにより、細胞外の情報が核に伝わり、細胞の増殖、分化、移動をはじめとする多くの基本的な生命現象が発生すると考えられている。そして、細胞接着に代表されるこのような現象は、細胞の構成タンパク質に存在するある特定のペプチド配列が、細胞上のレセプター等の構成タンパク質と相互作用することによって起こると報告され、生体における分子認識の機構が解明されつつある(図1)。この様な生体のもつ高度な機能を工学的に利用するためには、生体を構成する物質と類似の機能を持つ分子を設計、合成する必要がある。求める機能を持つ分子の創製は材料化技術の開発を同時に行うことにより、高度な機能を発現しうる先進バイオ材料の開発につながると考えられる。そこで、機能発現機構は未だ不明であるが、細胞同志のレセプターリガンド相互作用の1つと考えられるマクロファージの遊走促進あるいは阻害活性を分子認識評価系として選び、分子識別機能をもつ低分子をモデルにそのいずれかの相互作用に関与する未知のペプチド化合物を構造設計する分子設計手法の選択、確立を目的として本研究を開始した。

2. 研究内容及び成果

2-i. モデル分子の合成

本研究のモデル分子であり、これまでに唯一マクロファージ遊走促進活性を有する有機化合物として知られているイミダゾリン化合物(4a- ℓ)の活性を再確認する目的で合成を行った(図2)。即ち、ベンジル(1)をメタノール中ヒドロキシルアミンと加熱反

応させジオキシム (2) とした。(2) を触媒量の10%パラジウム炭素の存在下、接触的水素分解し cis-ジアミン (3) に導いた。さらに置換シアニドから容易に導かれるエチルイミデート塩酸塩と塩基存在下閉環させ、対応する目的のイミダゾリン誘導体 (4a- ℓ) を合成した。合成した全ての化合物の物理恒数は、報告されたものと一致した。

2-i i . 評価系の検討

本研究の分子認識評価系として選択したマクロファージ遊走能試験法については以下のように確立し、用いた (図3)。即ち、雌の日本白色種ウサギ (体重約3kg) を用い、ペントバルビタールを静脈内投与麻酔後、開胸し肺と気管を取り出した。生理食塩水を気管から注入し、洗液を採取後遠心し、得られたマクロファージの Cell pellet を 40 ~ 50% 細胞濃度になる様に RPMI を培地にけん濁した。内径 1mm のキャピラリーチューブにけん濁液を入れ、一方の口を封じた。検体を培地に溶解し、キャピラリーチューブを静置後24時間37℃で放置した。遊走面積を拡大透視し、プランニメーターで測定した。判定法は以下の様に行った。即ち、5mM-L-フコースを添加した時の遊走面積をポジティブコントロールとし、無添加時の値との差を100とした。

$$\text{遊走 index} = \frac{\text{検体添加時の値} - \text{検体無添加時の値}}{\text{5mM-L-フコース添加時の値} - \text{検体無添加時の値}} \times 100$$

2-i i i . モデル分子の評価

モデル分子として合成したイミダゾリン化合物 (4a- ℓ) のマクロファージ遊走能を上記評価系で調べた。その結果を表1に示した。いずれの化合物もマクロファージの遊走を促進したが、イミダゾリンの2,4,5位の置換基で活性は大きく異なり、2-Chlorophenyl-4,5-diphenyl誘導体 (4a) が最も強い活性を示した。

2-i v . モデル分子の構造解析

X線結晶構造解析の結果 (図4) を初期座標として、半経験的分子軌道法の一つである PM3 法によって最もマクロファージ遊走促進作用の強かった 4a の分子モデリングを行った。まず、単位結晶格子に含まれる2個の構造の一方を取り出して、その構造を PM3 法で構造最適化した。ついで、その構造に含まれる3個の回転可能な結合を30度刻みで360度回転させ、計1728個 ($=12^3$) の配座のエネルギーを計算した。最安定配座は図5に示したように結晶構造に近いものであった。

同様に結晶構造を初期座標として、QUANTA の Molecular Editor を用いて 4a の trans 異性体 (4 ℓ) の構造を構築し、PM3 法で最適化した。両者を重ね合わせたところ、図6に示したようにフェニル基の位置が大きく異なることがわかった。4 ℓ の活性が低いことから、これらフェニル環の空間的な配置が活性発現に極めて重要であることがわかった。

以上の分子モデリングは IBM RS/6000 上で Molecular Simulations Inc. のペプチド

分子設計支援システム CHARMM/QUANTA を用いた。分子軌道法計算は MOPAC Ver. 6 を用いた。

2-v. ペプチド化合物の分子設計

非ペプチド性モデル分子 4a の立体構造から考慮した活性発現に必要な条件を満たすペプチド化合物の分子モデリングを行った。

先に述べたように、4a 誘導体においては (1) 3 個のフェニル環が適切な空間配置を占めること、(2) 分子内にイミダゾリン環のような塩基性構造を有すること、の二つがマクロファージ遊走促進活性の発現に重要な役割を果たしていることがわかった。

そこで、これらの条件を満足させることによって、同様のマクロファージ遊走促進活性を有するペプチド化合物を創製出来ると考え、次に述べるような分子設計を試みた。

まず、図 7 のように 4a のイミダゾリン環を 4 位炭素と 5 位炭素の間で開裂した場合を考えた。開裂の結果、3 個のフェニル環が炭素および窒素原子 3 個ずつ隔たった構造が得られる。したがって、3 個のフェニル環が適切な空間配置を有し、その間を適当なペプチド構造を結んだような化合物にはマクロファージ遊走促進活性が期待できるものと考えた。

次に、図 8 のようにイミダゾリン環を 2 位炭素と 3 位炭素の間および 3 位窒素と 4 位炭素の間で開裂した場合を考えた。この場合は二つのフェニル環が近接し、そこから一定の距離をペプチド構造で隔てた部位にもう一つのフェニル環が存在する化合物にマクロファージ遊走促進活性が期待できるものと考えた。

芳香環を側鎖中に有する天然型アミノ酸としては、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジンがある。したがって、これらの側鎖をうまく配向させることによって、側鎖中の芳香環を 4a と同様の位置に置くことが必要となる。ペプチド化合物の場合には、アミノ酸残基だけでなくアミノ基、カルボキシル基、チオール基をはじめとする官能基の保護基の中にも芳香環を有しているものが多いことから、これらを構造のユニットとして組み込むことによって、選択の幅が大きく広がる (表 2、3、4)。したがって、これらの組み合わせで 3 個の芳香環を適切な空間配置に固定し、かつ分子内に塩基性構造を有する化合物のデザインを試みることにした。

2-vi. ペプチド化合物のコンピュータシミュレーション

上記の条件に適合するペプチド化合物として、まず、合成上容易である N 末端を benzyloxycarbonyl 基 (Z)、C 末端をアミド基で保護した 3 種のトリペプチド (Z-Phe-Phe-X-NH₂, Z-Phe-X-Phe-NH₂, Z-X-Phe-Phe-NH₂, X=His, Arg, Orn, Lys) をデザインした。これらはいずれも分子内に 3 個のフェニル環をもち、かつ塩基性の側鎖を有するアミノ酸残基をもっている。これら 3 個のフェニル環が 4a と同じ空間的配向をしているか否かを検証することを目的として、コンピュータシミュレーションを行った。

以下の分子モデリングは IBM RS/6000 上で Molecular Simulations Inc. のペプチド分子設計支援システム CHARMM/QUANTA を用いた。まず側鎖構造の最適化が容易と考えられる X=His をモデルとして、QUANTA の Sequence Builder によって直鎖上のペプチド

化合物の立体構造を構築し、それを CHARMM 力場を用いて Steepest Descent 法および Adaptive-Basis Newton-Lapson 法によって構造最適化したところ、図 9 (Z-Phe-Phe-His-NH₂)、図 10 (Z-Phe-His-Phe-NH₂)、図 11 (Z-His-Phe-Phe-NH₂) のような安定構造が得られた。いずれも破線で示した分子内水素結合によって安定化することによって、ターン構造をとっていることがわかった。しかし、いずれの構造においても 3 個のフェニル環は大きく隔たっており、4a の場合とは異なる空間配置であった。今後、分子動力学計算を用いた配座探索によってペプチド化合物のコンピュータシミュレーションを行い、化合物のデザインに基づいて、有望と判定された化合物の合成とマクロファージ遊走促進活性の測定を行う予定である。

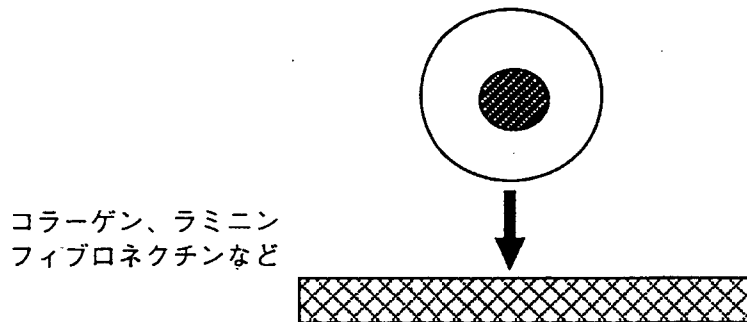
3. まとめ

細胞同志のレセプターリガンド相互作用の 1 つと考えられるマクロファージ遊走活性を分子認識評価系として選び、その相互作用を促進するペプチドの構造設計を目的とし、まず促進作用を有する非ペプチド性低分子化合物を構造解析した。ついで同じ作用を有するペプチドを設計する分子設計手法の選定に着手した。

図 1 細胞接着

関与する主な接着分子

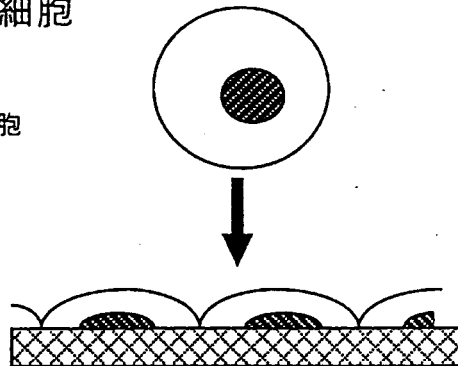
1. 細胞 - 細胞外基質



$\beta 1$ インテグリンファミリー

2. 浮遊細胞 - 接着細胞

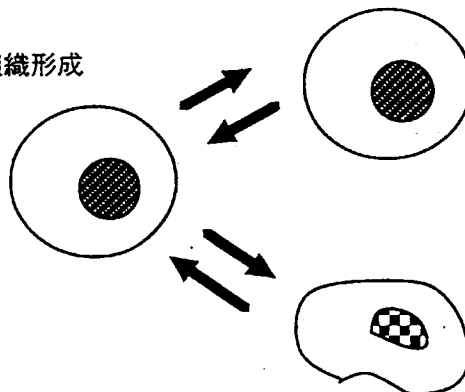
例) 白血球-血管内皮細胞



$\beta 2$ インテグリンファミリー
Ig スーパーファミリー
セレクトリンファミリー

3. 細胞 - 細胞

例) 発生過程における組織形成



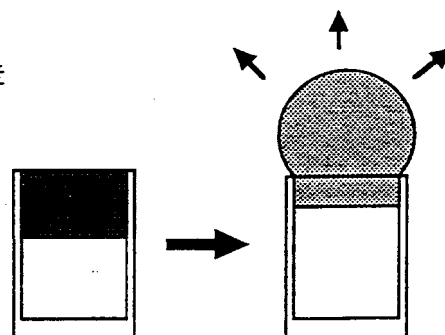
カドヘリンファミリー
(ホモタイプ)

例) 抗原提示細胞による
リンパ球の活性化

インテグリンファミリー
Ig スーパーファミリー
(ヘテロタイプ)

4. 細胞遊走

例) マクロファージの遊走



不 明

図2 モデル化合物（4a-1）の合成

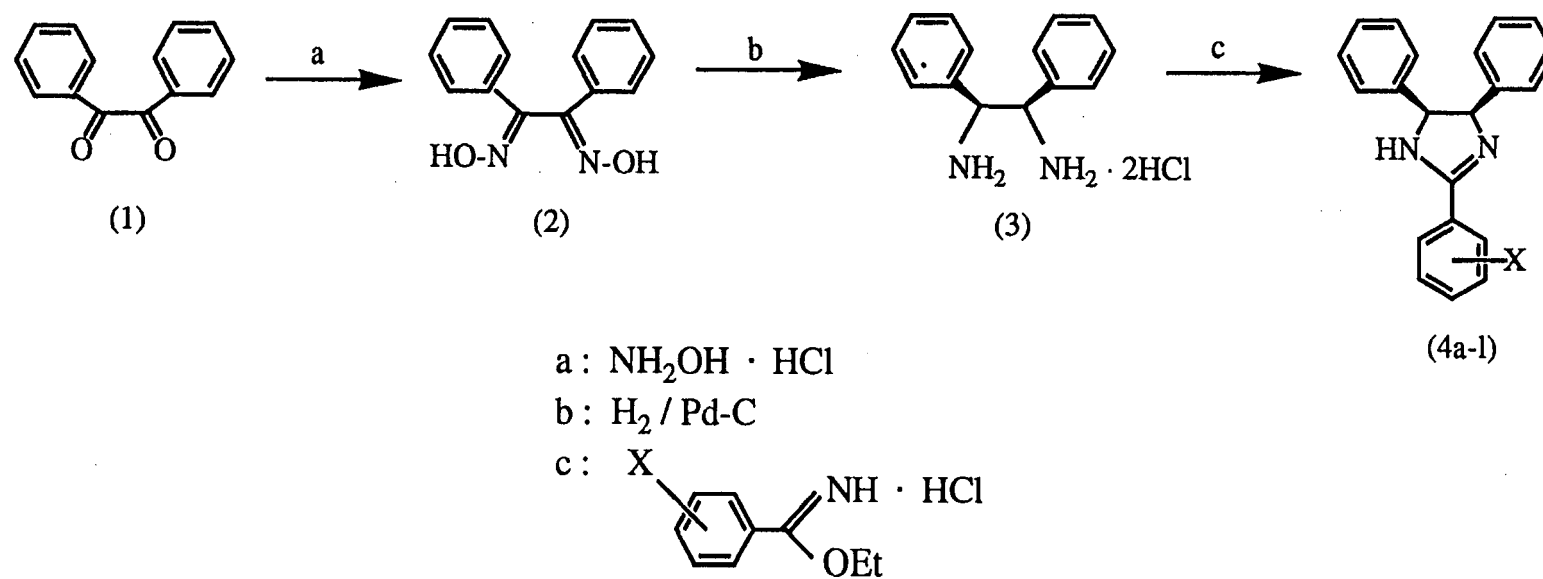


図3 マクロファージ遊走能試験評価系

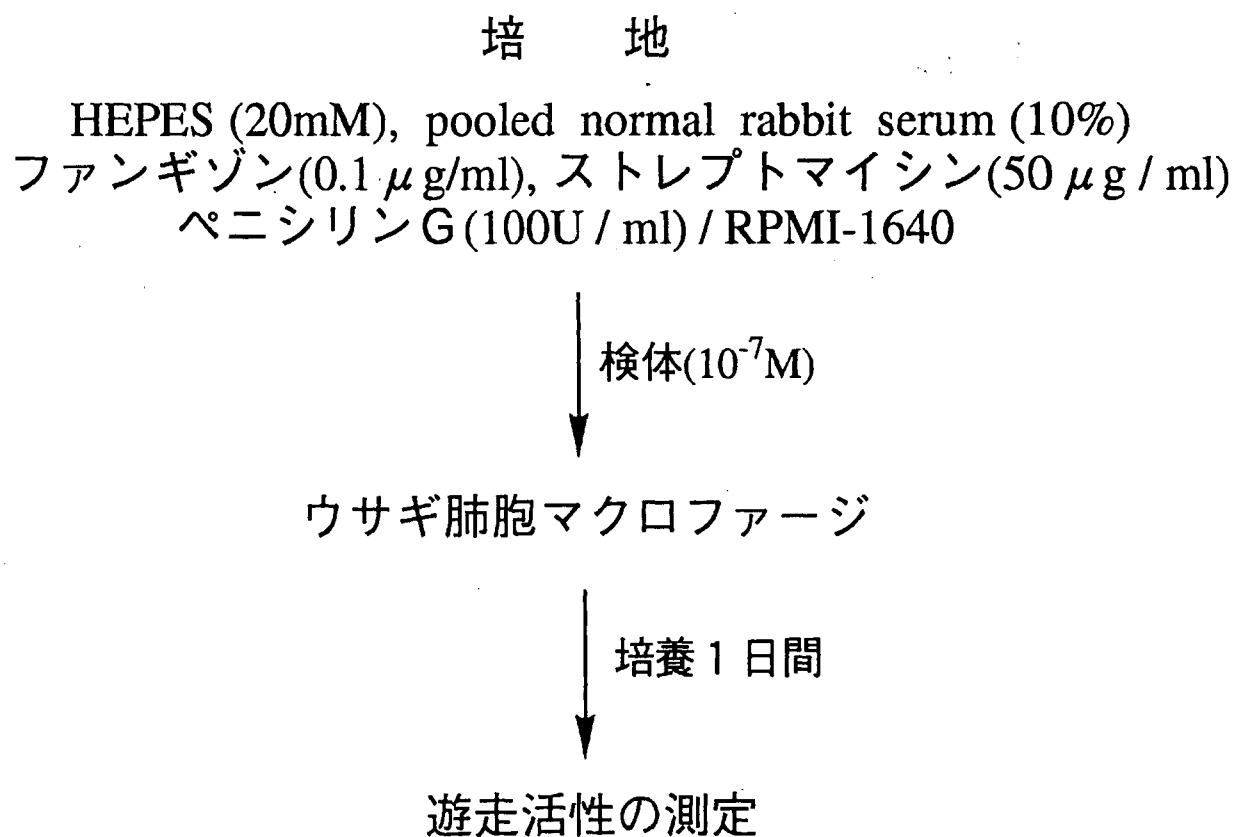
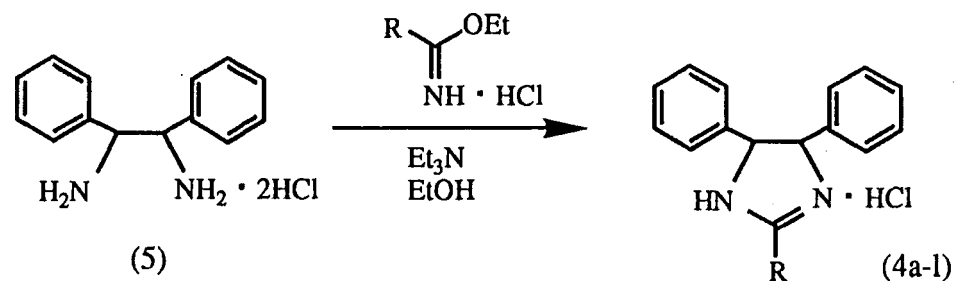


表1 モデル化合物のマクロファージ遊走促進作用



compd. No.	R	config.	yield (%)	mp (°C)	¹ H-NMR (δ) methine	IR (cm ⁻¹) ν C=N	formula	MEF activity index
4a	4-ClPh	<i>meso</i>	70	>280	5.92 ⁿ	1620	C ₂₁ H ₁₇ ClN ₂ · HCl	139.6
4b	4-FPh	<i>meso</i>	87	>280	5.94	1620	C ₂₁ H ₁₇ FN ₂ · HCl	11.0
4c	4-BrPh	<i>meso</i>	83	>280	5.36 ⁿ	1615	C ₂₁ H ₁₇ BrN ₂ · HCl	24.8
4d	Ph	<i>meso</i>	79	>250	5.98	1615	C ₂₁ H ₁₈ N ₂ O · HCl	34.2
4e	4-MeOPh	<i>meso</i>	55	260-261	5.94	1615	C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O · HCl	18.2
4f	4-BzlOPh	<i>meso</i>	58	256-258	5.91	1610	C ₂₈ H ₂₄ H ₂ O · HCl	-16.0
4g	4-HOPh	<i>meso</i>	94	264-266	5.88	1610	C ₂₁ H ₁₈ N ₂ O · HCl	18.0
4h	4-MePh	<i>meso</i>	63	>280	5.95	1615	C ₂₂ H ₂₀ N ₂ · HCl	46.4
4i	3-ClPh	<i>meso</i>	54	251-253	5.98	1620	C ₂₁ H ₁₇ ClN ₂ · HCl	67.5
4j	3-CF ₃ Ph	<i>meso</i>	45	>280	6.00	1610	C ₂₂ H ₁₇ F ₃ N ₂ · HCl	8.0
4k	2-thienyl	<i>meso</i>	31	259-261	5.94	1600	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ S · HCl	11.7
4l	4-ClPh	<i>dl</i>	80	281-284	5.22	1612	C ₂₁ H ₁₇ ClN ₂ · HCl	1.8

図 4 4aの X 線結晶構造解析

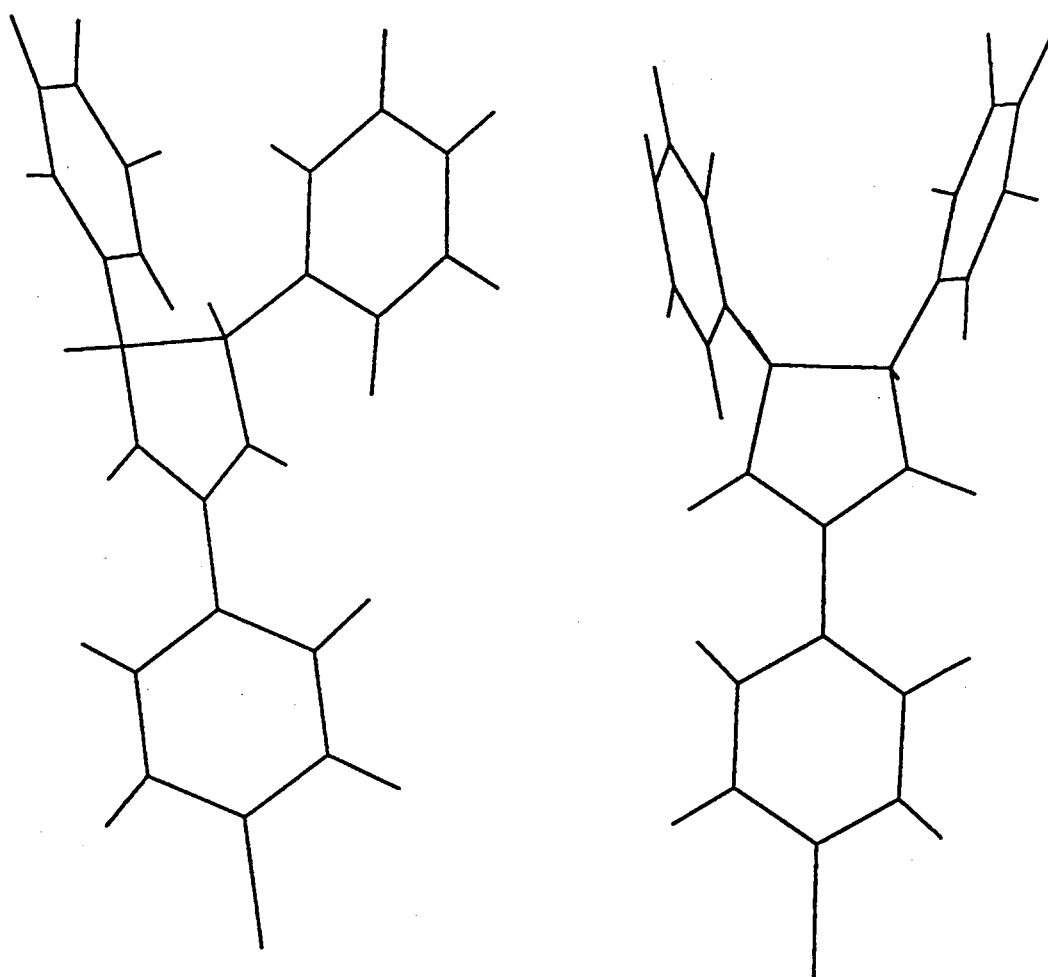


図 5 実線 PM3法で最適化した構造
破線 X線結晶解析

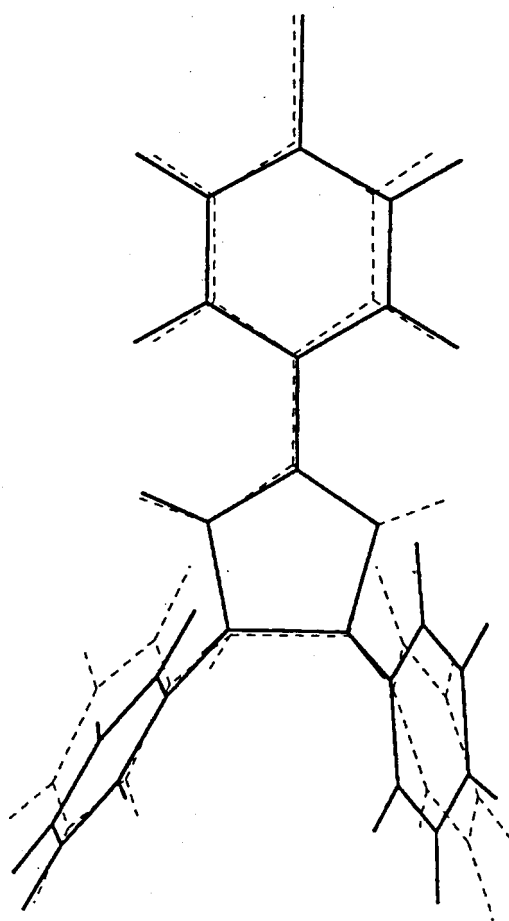


図 6 実線 4a (PM3法安定構造)
 破線 4l (PM3法安定構造)

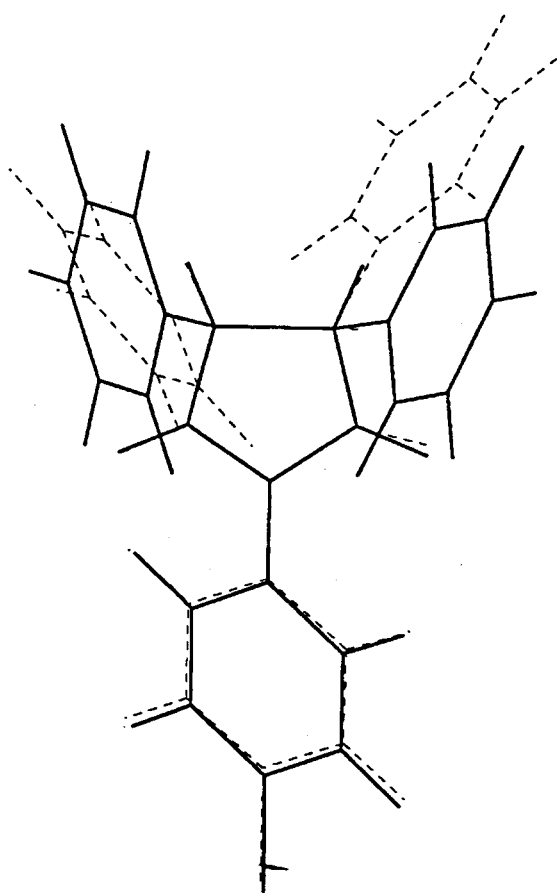


図7 ヘプチド化合物の分子設計(1)

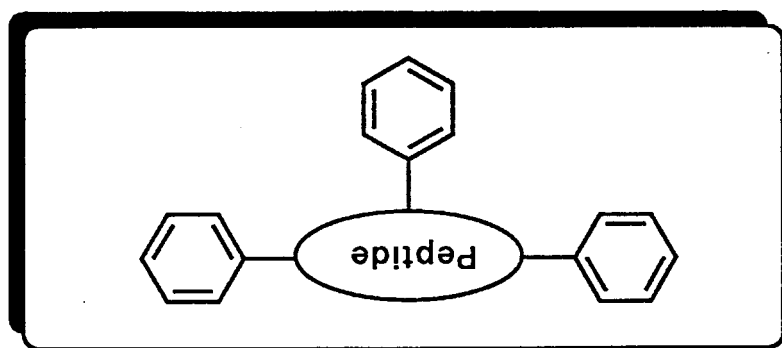
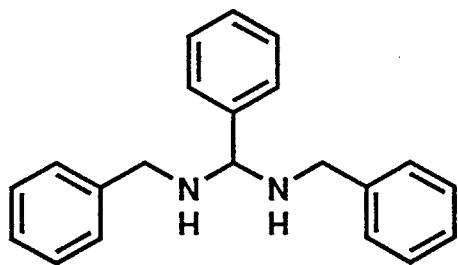
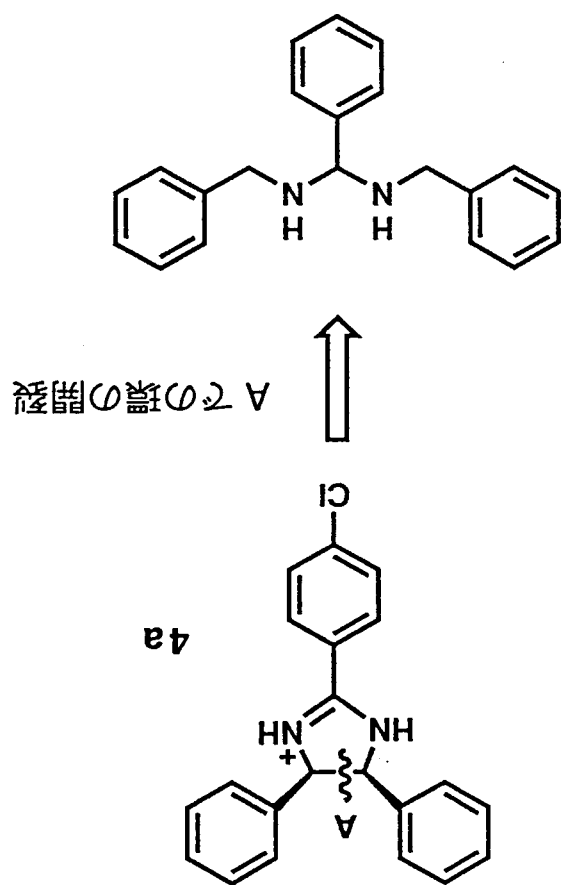


図 8 ペプチド化合物の分子設計(2)

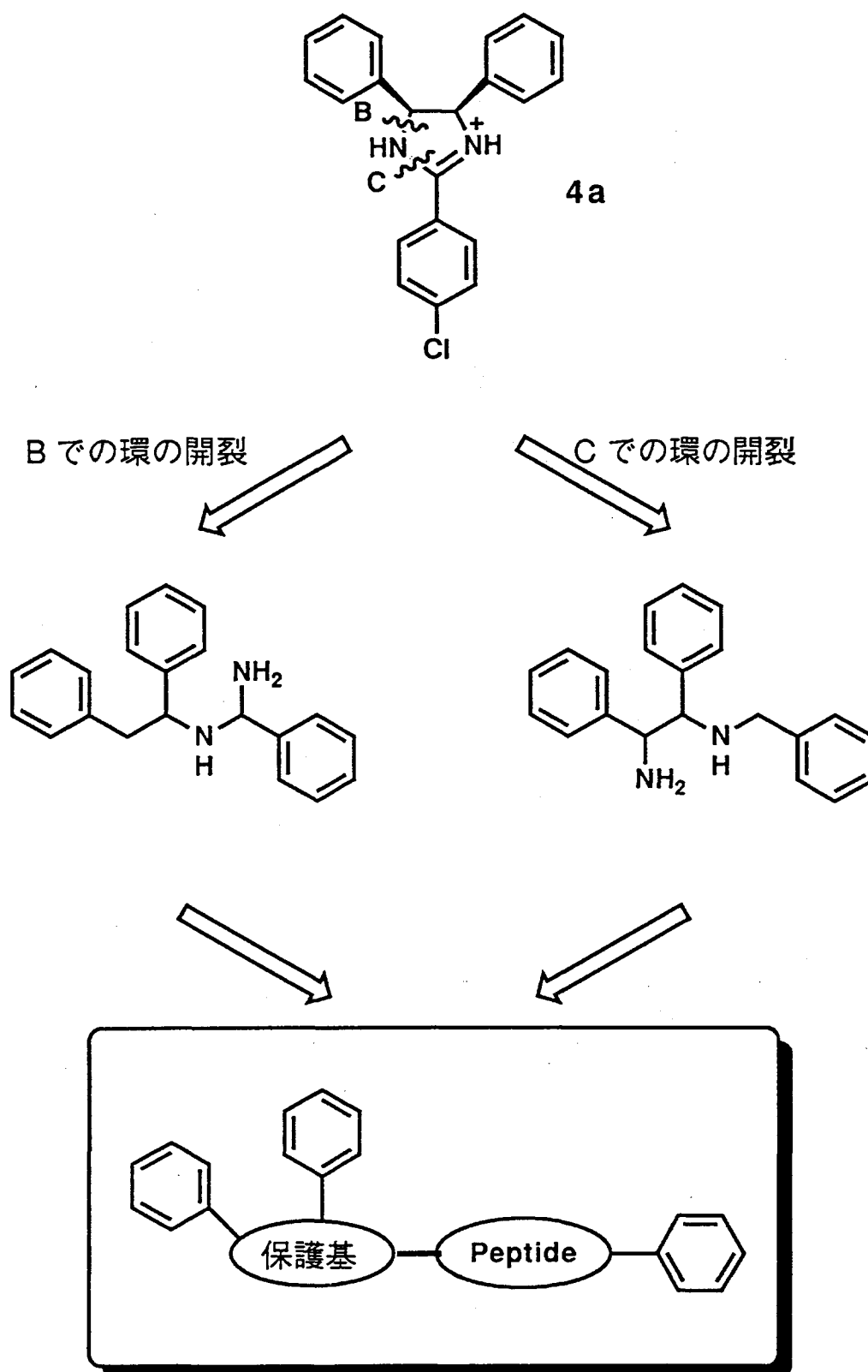


表2 芳香環を有する α -アミノ基の保護基

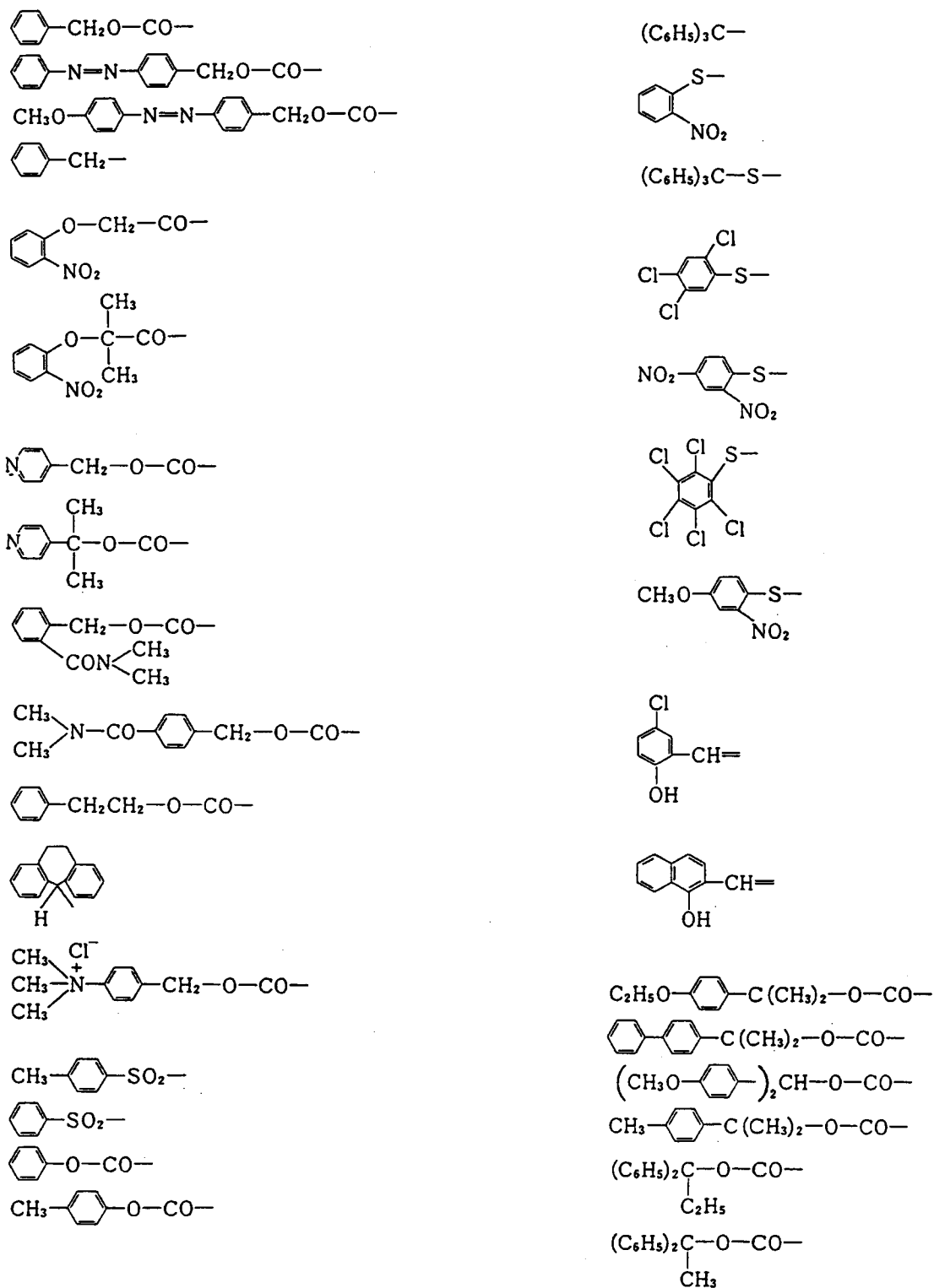


表3 芳香環を有する α -カルボキシシル基の保護基

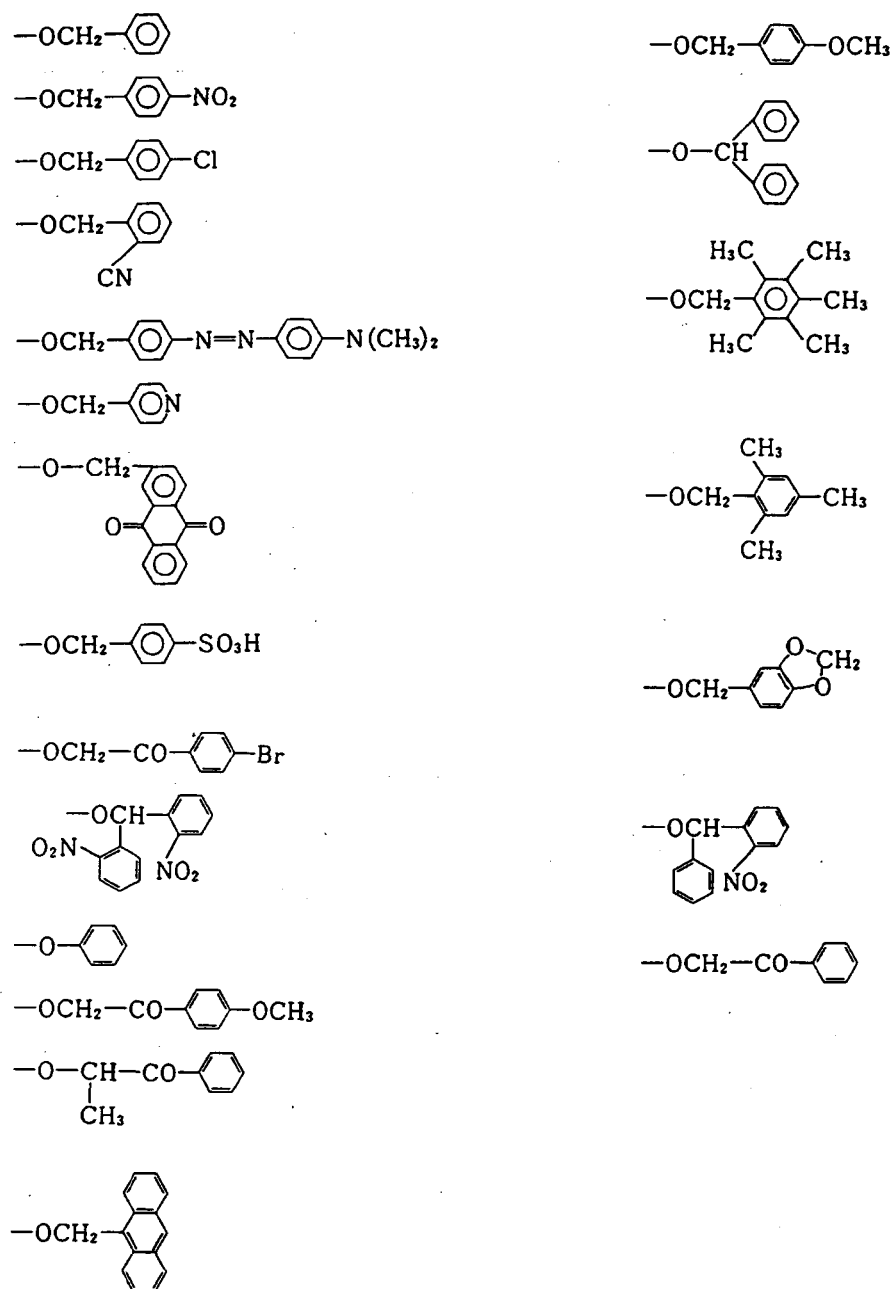


表 4 芳香環を有する側鎖官能基の保護基

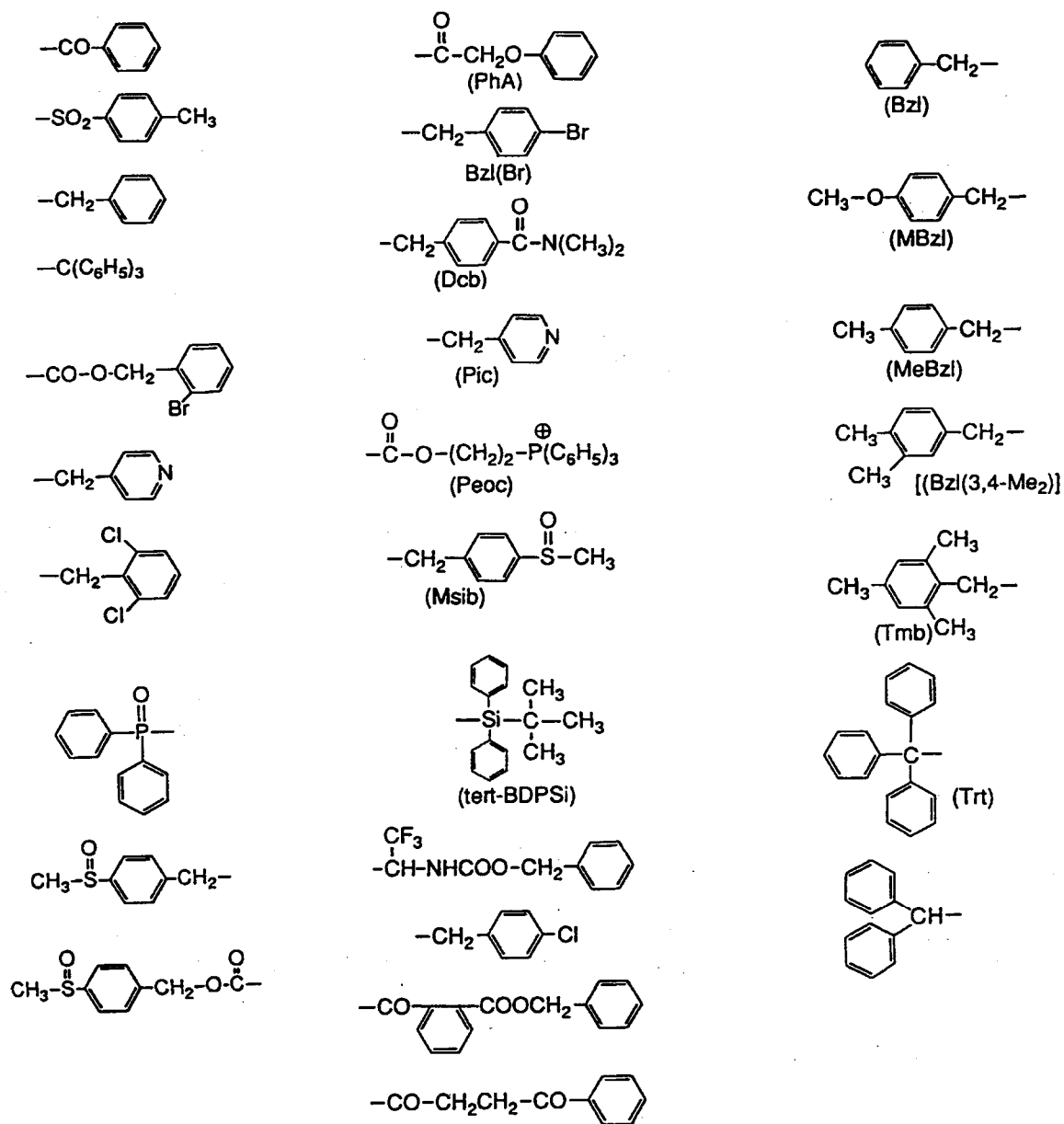


図 9 Z-Phe-Phe-His-NH₂の立体構造

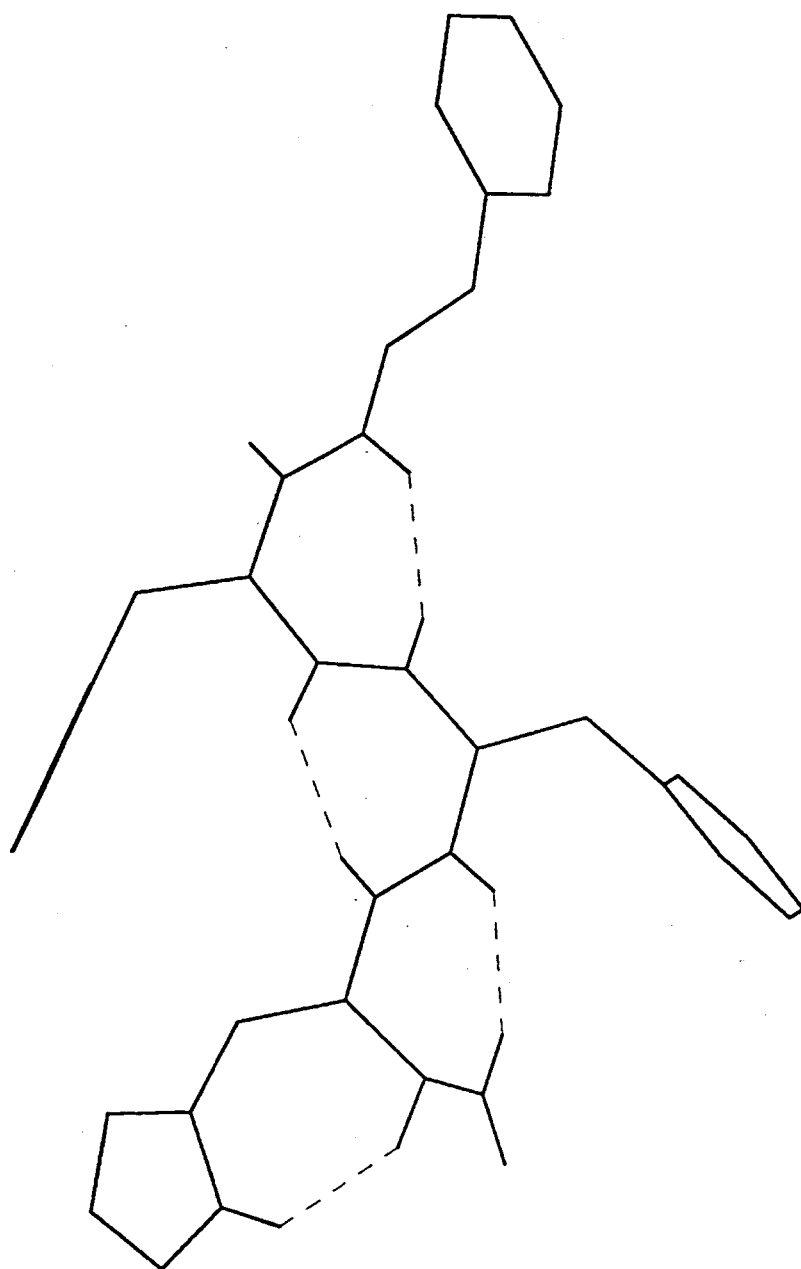


図 1 0 Z-Phe-His-Phe-NH₂の立体構造

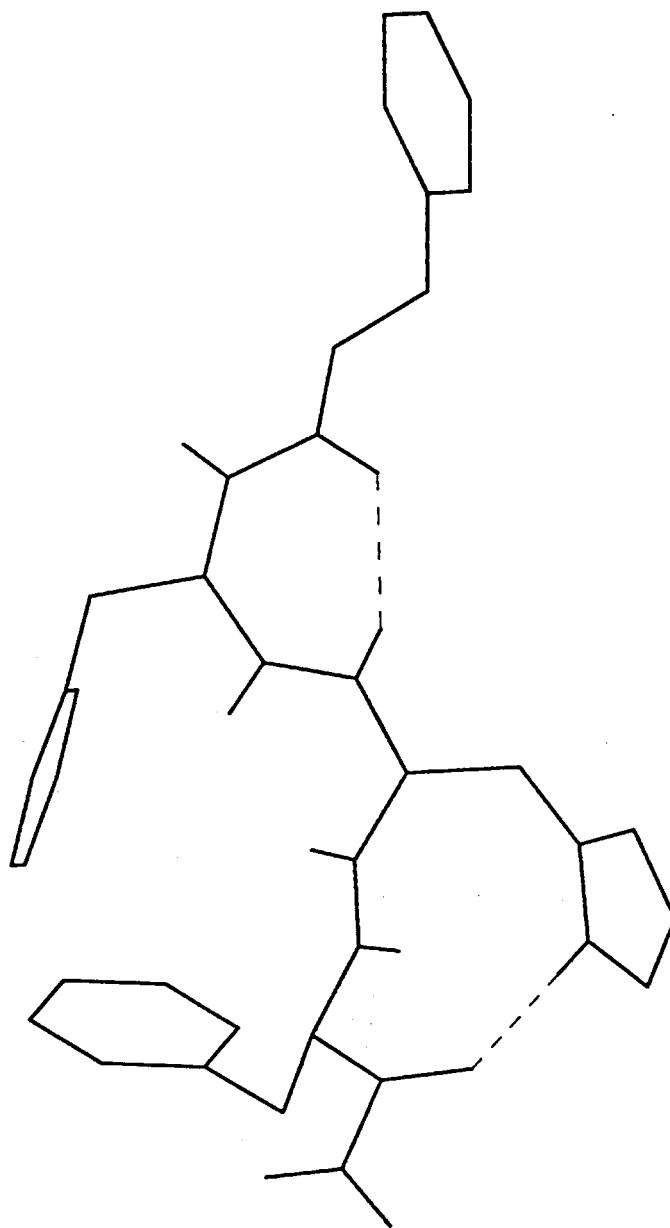
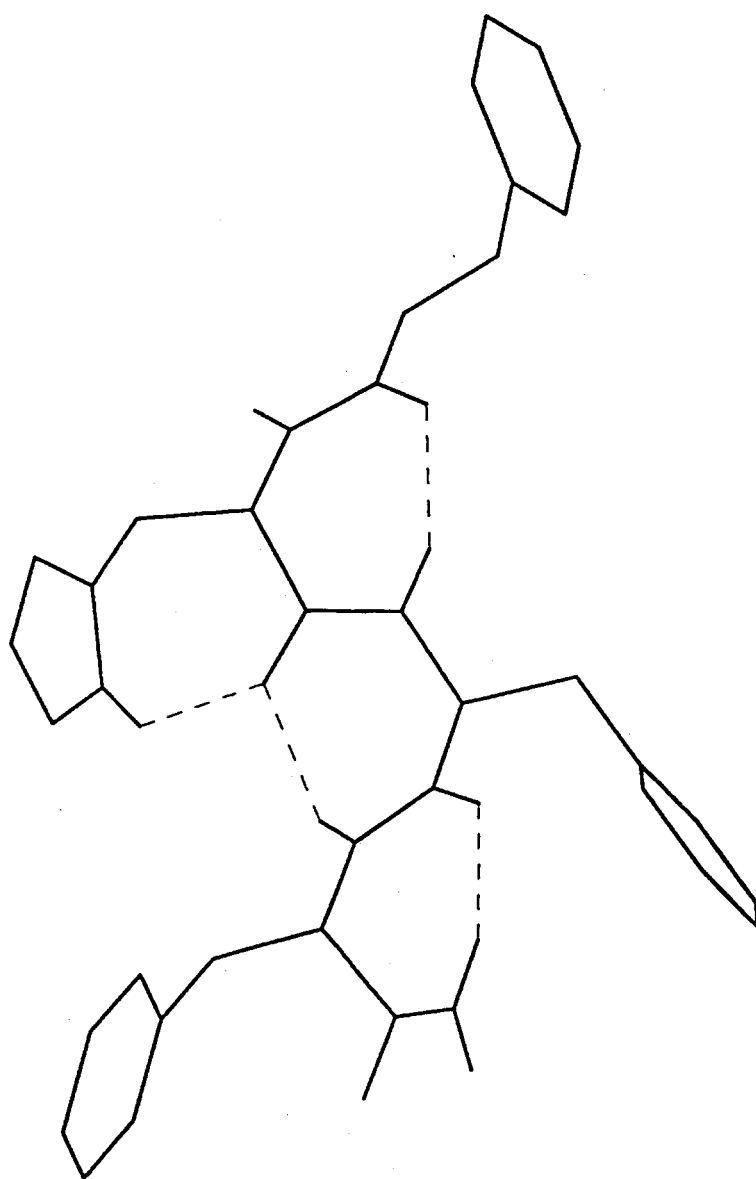


図 1 1 Z-His-Phe-Phe-NH₂の立体構造



平成4年度研究成果報告書

2. 2 配座制御技術の研究開発

平成4年度研究課題

配座制御アミノ酸類の分子設計

サントリー株式会社基礎研究所
(財) サントリー生物有機科学研究所
大 船 泰 史

1. はじめに

アミノ酸や小分子量のペプチド類は情報伝達物質として生体内のさまざまな機能の発現に重要にかかわっている。これらの情報分子は通常、蛋白受容体と結合することにより、受容体に連結した生体反応の連鎖を触媒する。この過程はまさに蛋白受容体によるリガンドの分子識別であり、またこの過程の分子レベルの理解は基礎科学及び応用科学の重要な研究課題として広範な分野からの研究が取り組まれている。本研究分担では蛋白がもつ、あるいはアミノ酸や小分子量のペプチド類が役割を果たす、「分子識別機能」に焦点をあわせ、リガンドからの分子認識の機構研究と分子識別分子の創製を目標とする。

一般に、情報伝達にかかわる小分子量のペプチド類をその化学構造の面から考察すると、これらは伸縮性に富んだ分子でありいろいろな立体配座（コンフォメーション）をとることができる。従って、常温、水溶液中（あるいは有機溶媒中）でいろいろな配座異性体（コンフォーマー）の混合物として存在する。受容体との結合ではこれら多くのコンフォーマーのうちある特別な配座が関与するものと考えられている。このような活性配座はS-S結合を別として（1）分子内あるいは分子間水素結合、（2）イオン結合、（3）疎水性相互作用、（4）親水性相互作用、（5）立体的相互作用、（6）立体電子的相互作用など、弱い相互作用によりそれが保持されている。受容体蛋白との結合様式にもよるが、これらの要素は主にペプチドを構成するアミノ酸類の側鎖官能基やアミドカルボニル基（ペプチド結合部位）などのペプチド類の構造に由来するさまざまな要因によるものと考えることができる。⁽¹⁾

我々はコンフォメーションを制御したペプチド類を創製することにより、分子認識にかかわるペプチド類の立体配座要請(conformational requirements)を明らか

できるものと考えた。上に述べたように、ペプチド類の配座形成にはおおくの要素がかかわっている。そこで、ペプチド類の配座制御には、ペプチド類を構成するアミノ酸類の一部を配座制御アミノ酸に組み替えることにより達成できると考えた。今回、配座制御因子を抽出し、配座制御アミノ酸の設計と、その導入によるペプチドの立体配座制御法を探ることを本年度の主たる目標として、以下に述べる成果を得たので報告する。

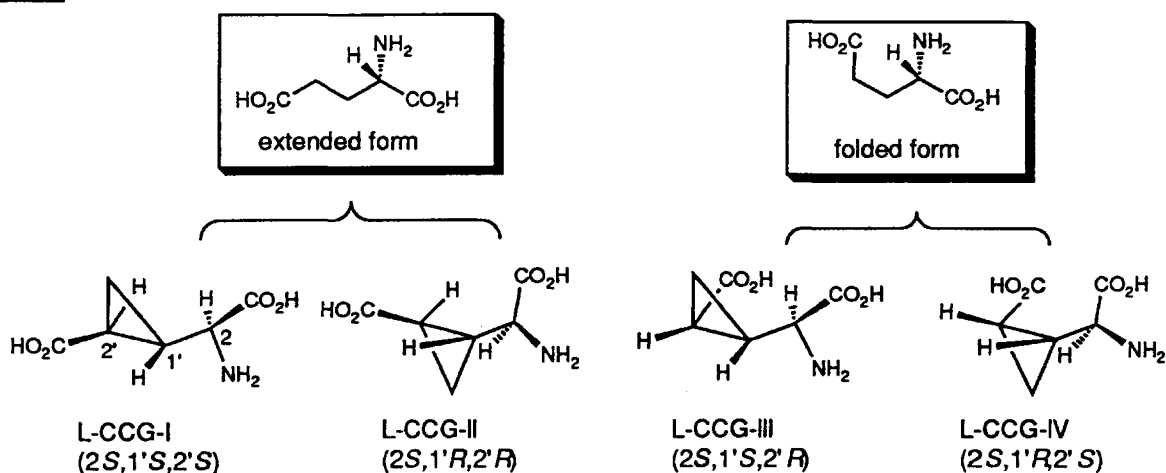
2. 研究の内容

従来、我々は(1)精密有機合成化学と天然物化学を基盤として生理活性アミノ酸、ペプチド類の合成方法論研究に、⁽²⁾また(2)神経化学面から配座制御法による興奮性神経アミノ酸受容体の立体配座要請研究に携わっている。⁽³⁾今回、配座制御アミノ酸類の合成設計に際して、上記(1)－(6)の要素を考慮した分子設計が必要である。生体機能性ペプチドにはその構成アミノ酸としてグルタミン酸、アスパラギン酸、リジンなどのアミノ酸類が多く含まれている。これらアミノ酸類はその側鎖官能基を介して、受容体との結合やペプチドの配座固定にかかわっていることは容易に想像できよう。今回、これらのアミノ酸類を配座制御分子の候補として考えた。アミノ酸類の配座制御法として次の方法を立案した。

- (1) 炭素鎖の環の導入による制御。
- (2) アミノ基を介した環の導入による制御。
- (3) α -位に置換基を導入することによるアミノ酸基の回転異性体の制御。

2. 1. アミノ酸の炭素鎖の固定による配座制御

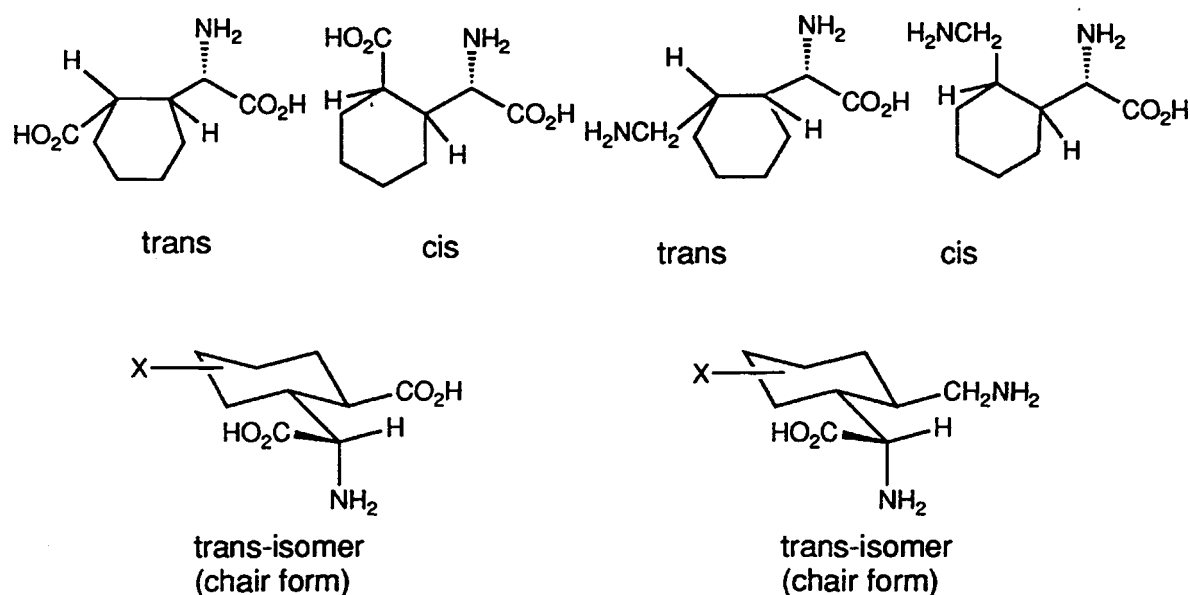
図 1



代表的な例として、興奮性神経伝達物質グルタミン酸の配座制御があげられる。我々はグルタミン酸のC3位とC4に三員環を導入した4種の2-(カルボキシシクロプロピル)グリシン類はグルタミン酸の立体配座をextended型あるいはfolded型に制御したアミノ酸であり、これらの物質群を神経薬理学に導入することにより、哺乳動物の中枢神経細胞のグルタミン酸受容体のうち代謝調節型受容体はextended型のグルタミン酸と選択的に結合し、folded型はイオンチャネル型を活性化することを明らかにしてきた(図1)。(4)

上記の結果を踏まえ、2-(カルボキシシクロプロピル)グリシン類の3員環のかわりに6員環を導入することも有力である。すなわち、6員環化合物にジェカトリアルな置換基を設定すると、そのコンフォメーションを椅子型に固定できる。従って、グルタミン酸のC3位とC4を6員環で固定した化合物は、神経受容体のみならず、ペプチドに組み込むことによりペプチドの配座制御をはかるうえで有力な物質となるものと考えられる(図2)。

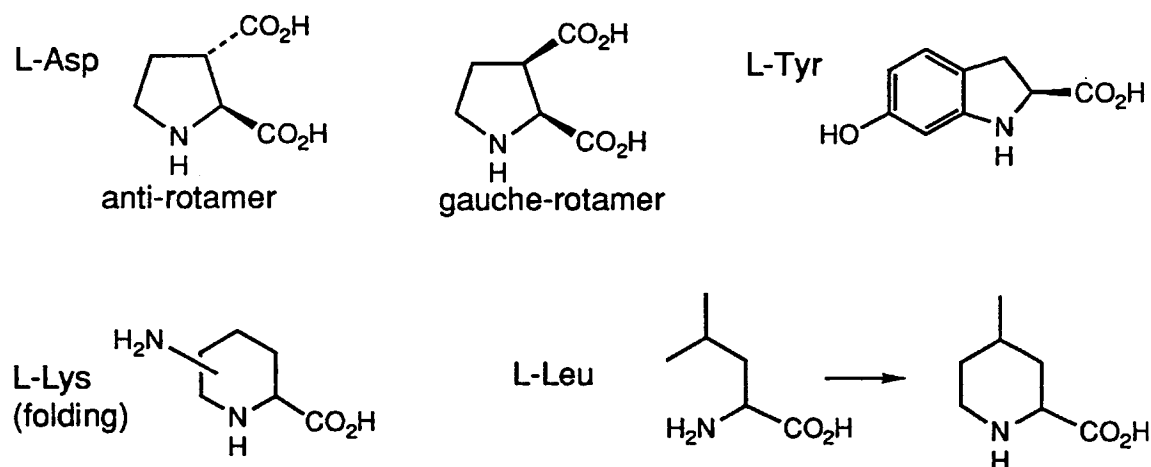
図2



2. 2. アミノ基を介した炭素鎖の固定による配座制御

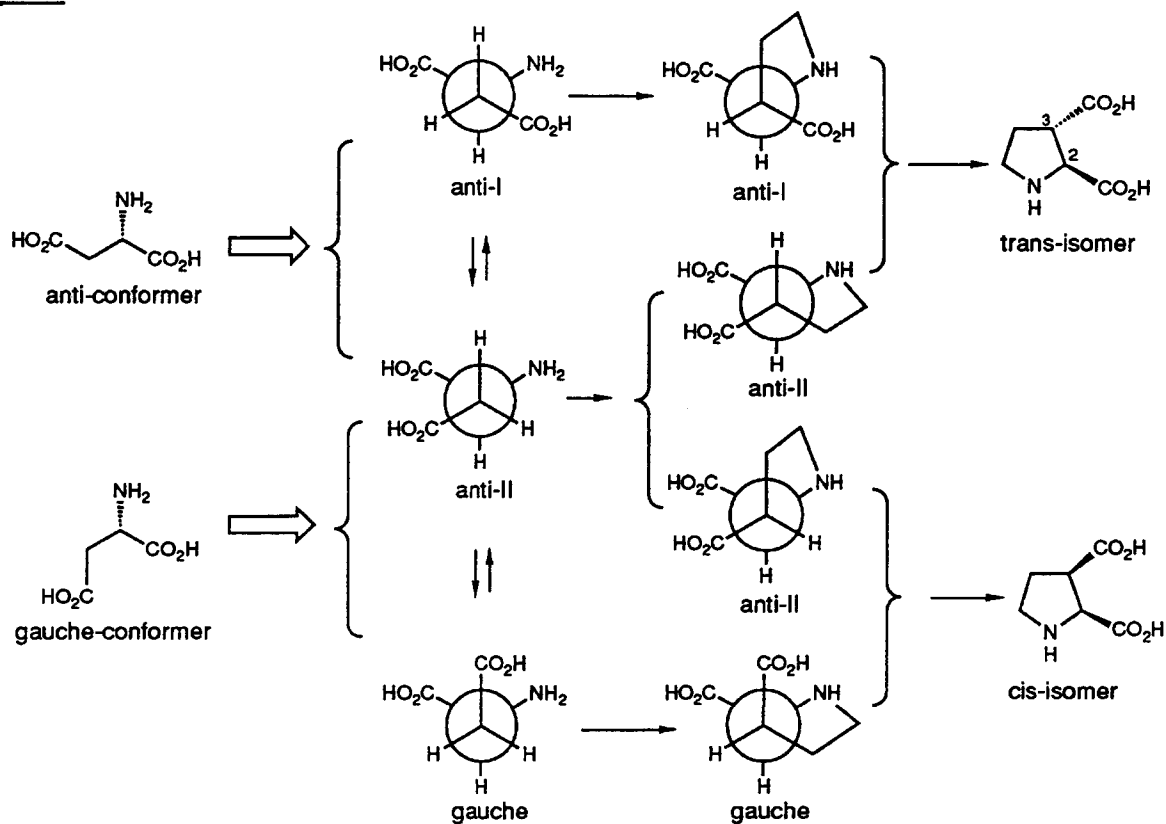
グルタミン酸、アスパラギン酸、リジン、トリプトファン、ロイシン、バリンなどのアミノ酸類の α -アミノ基と側鎖を炭素鎖でつなぎ環形成をすることにより、いろいろな配座制御アミノ酸を合成できる(図3)。

図 3



鎖状のアミノ酸類は常温、水溶液中で炭素－炭素結合が自由に回転できることから、おおくのコンフォーマーの混合物として存在する。アスパラギン酸の場合を例にとると、5員環を導入することによりアスパラギン酸の代表的なコンフォーマーであるそれぞれ2種類のアンチ型とゴーシュ型を図のように固定できる（図4）。

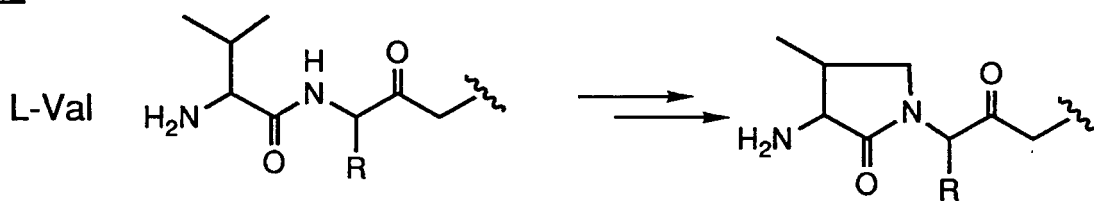
図 4



トランス体はアンチ-I型とアンチ-II型を固定し、シス型はアンチ-IIとゴーシュ型を固定したアミノ酸である。ペプチドのアスパラギン酸成分をこのような5員環類縁体（シスあるいはトランス-ピロリジン-2、3-ジカルボン酸）に置き換えることにより、側鎖についたカルボキシル基が蛋白と結合する際の空間的な配置についての情報が得られ、またプロリンの類縁体ともみなすことができることから、ペプチドのコンフォメーションに与える効果も興味深い。従って、ピロリジン-2、3-ジカルボン酸はアスパラギン酸とプロリンをハイブリットしたアミノ酸とみなすことができる。

ペプチド結合のアミノ基とバリンのメチル基をつなぐと図5のような配座制御ができる。これにより、伸縮性に富んだバリン残基をかなり固定できるし、ペプチドの立体配座に与える効果も興味深い。⁽⁵⁾

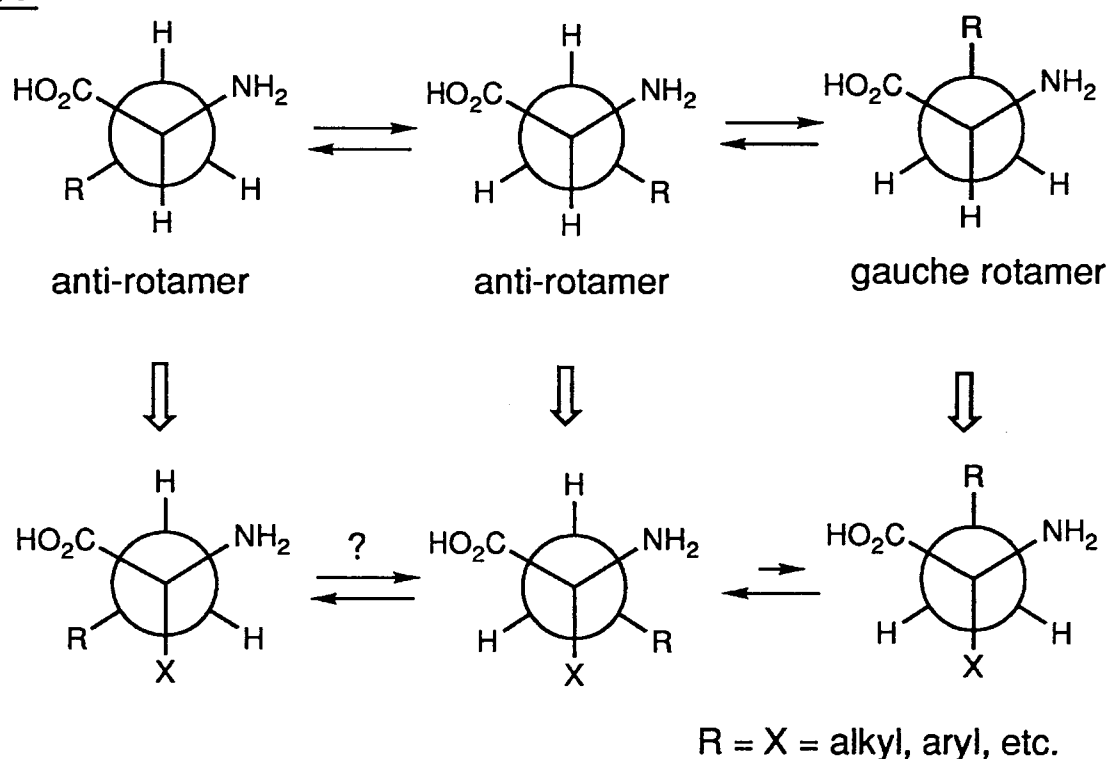
図5



2. 3. α -位に置換基を導入することによるアミノ酸基の回転異性体の制御

グルタミン酸、アスパラギン酸、リジン等の環形成による配座制御のみならず、単に置換基を導入することによる配座の制御を考えた。前節で述べたように、アミノ酸類がさまざまなコンフォマーをとりうるのは炭素-炭素自由回転に要するエネルギー障壁が低いことに起因している。そこで、 α -アミノ酸基の付け根の炭素に立体的に嵩高い置換基を導入し、炭素-炭素結合の自由回転に要するエネルギー障壁を高めるてやればよいと考えられる（図6）。その結果、 α -置換- α -アミノ酸類は立体反発の大きいゴーシュ型より、安定なアンチ型のコンフォマーに固定されるものと考えられることができる。

図 6



2. 4. 機能性官能基をもったアミノ酸類の設計

分子識別機能のみならず光電変換機能など、機能性材料に有用なアミノ酸類の設計も行った。スクアリン酸は特異な4員環構造をもつ芳香族化合物である。また、強酸であり、さまざまな金属と錯体を形成し色素、医薬品、機能性高分子等の素材として用いられている。このようなスクアリン酸の化学的な性質を利用して、スクアリン酸を部分構造としてもつアミノ酸類の設計を行った。

3. ターゲットの選定と合成経路の立案

以上の調査研究、ターゲットの立案、分子設計から3. 1～4. に示す配座制御アミノ酸、ペプチド類の合成ルートの検討を行った。これらのアミノ酸、ペプチド類の合成には(1)不斉中心の立体制御、(2)保護基の選択、(3)ラセミ化などの解決すべき諸問題があり、温和な反応条件を設定し立体選択的な合成方法の開発など方法論の検討がまず取り組むべき課題であることはいうまでもない。

3. 1. 合成方法に関する基本戦略

配座制御アミノ酸類の合成では、(1)光学活性アミノ酸から出発した立体選択的な手法による配座制御因子の導入、(2)糖を用いた官能基変換、ついで配座制御因子の導入、(3)ラセミ化合物から出発した光学分割あるいは不斉合成

など、がありそれぞれ表に示した特徴がある。

(1) 光学活性アミノ酸法

配座固定因子として必須であるアミノ酸の多不斉中心の導入には光学活性アミノ酸類から出発し、その不斉因子を活用し側鎖の不斉中心導入の制御をはかる。出発物質が市販品として得られ合成経路が比較的短いこと、またラセミ化がおこりにくいことなどがそのメリットである。われわれの従来の研究から独自の立体制御法を幾つか集積している。通常、設計した分子に対し従来の手法が必ずしも適切かどうか常に検討の余地があるが、これを解決することにより一般性の高いルートを確立することができる。

(2) 糖類法

糖は各種生理活性物質の出発物質として頻用されている。糖類の不斉因子を活用し配座固定因子や、アミノ基の導入も可能であり、これにより目的化合物へ導くことができるが合成経路がかなり長くなり単一の配座制御分子には有効であるが一般性に欠けるきらいがある。出発物質が市販品として得られ、配座制御因子の導入が比較的容易であり、ラセミ化がおこりにくいメリットがある。

(3) 不斉合成法

不斉合成手法を駆使するか、あるいはラセミ化合物で合成を行ない光学分割により目的物を得る。出発物質が市販品として得られ、合成経路が短く一般性が高く、ラセミ化を考慮にいれた合成設計ができる。不斉合成法の確立は重要かつチャレンジングな課題であり、合成化学にたいする寄与も大きい。これらの手法の特徴を表1に示す。

表1

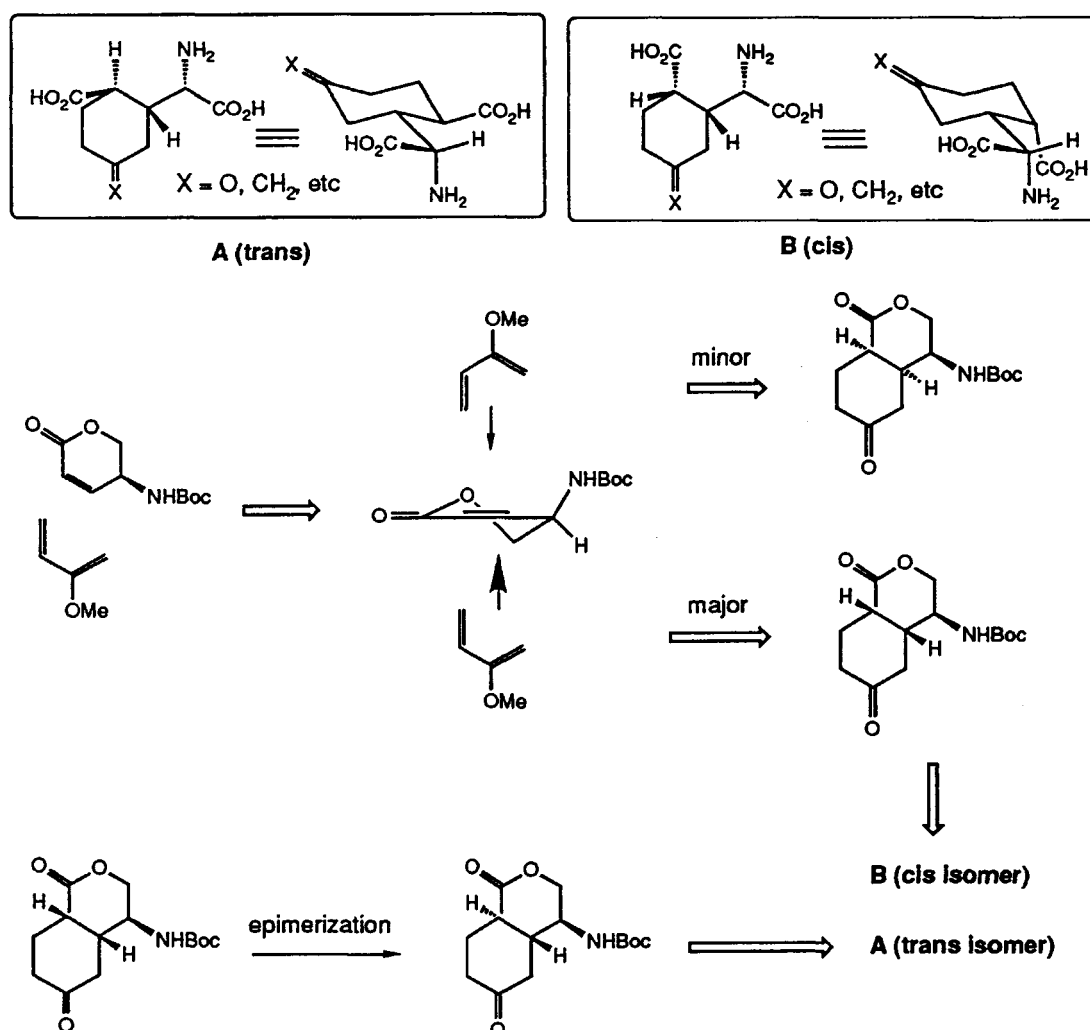
出発物質	アミノ酸	糖類	ラセミ化合物
価格	安価	安価	物質の選定次第
ラセミ化の有無	無	無	時々有り
合成経路の難易	比較的容易	容易	難
合成ステップの長短	比較的短	長	短
立体制御の難易	比較的容易	難	容易
光学分割の要、不要	不要	不要	要
一般性の有無	有	無	有

ここでは我々の研究背景および本研究目的から(1)と(3)の場合を考慮にいれ、ターゲットの合成を行う。

3. 2. 炭素鎖を固定したアミノ酸類

すでに、2-(カルボキシシクロプロピル)グリシン類など3員環で固定したグルタミン酸類縁体や⁽³⁾ 2-(カルボキシ-4-メチレンシクロペンチル)グリシン類など5員環で固定した類縁体の合成を報告している。⁽⁶⁾ グルタミン酸の6員環類縁体は前章で述べたようにペプチドの配座固定能が高いことが期待できる。そこで、その合成経路を図7のように立案した。

図 7



L-グルタミン酸から誘導できる不飽和ラクトン体と2-メトキシブタジエンの環化付加反応はアミノ置換基の立体障害から、 α -面からのジエンの攻撃が優先し、(R)型のシス環化付加物を主生成物として与えるものと期待できる。このシス体のラクトンの加水分解、生成した一級水酸基の酸化、保護基の除去によりB(cis-isomer)へ導くことができる。また、シス体を塩基処理により平衡化を行うと、熱力学的に安定なトランス体へ異性化するものと期待できる。これより、シ

ス体と同様な経路でA (trans-isomer)へ変換する。

A, Bの両者とも椅子型の立体配座が安定であり、グルタミン酸の側鎖の立体配座の固定に用いることができる。また、本合成ルートでは6員環上にカルボニル基が配置してあり、いろいろな官能基変換にとり手掛かりとなる。

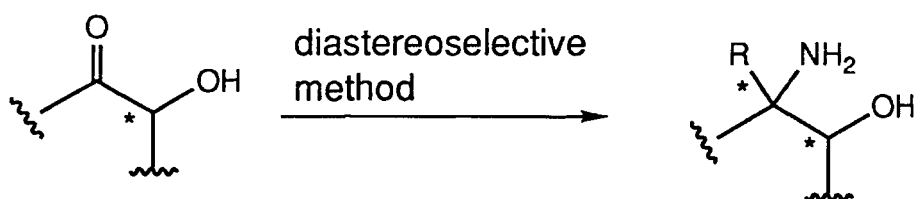
3. 3. アミノ基を介した炭素鎖固定アミノ酸類

シスあるいはトランス-ピロリジン-2、3-ジカルボン酸の合成は先に報告したが、⁽⁷⁾ ペプチドへの導入に必要な量を確保できる効率的な手法の開発が必要であり新手法を検討する。

3. 4. α -位置換- α -アミノ酸類の合成方法論

α -位置換- α -アミノ酸類の合成方法には幾つかの方法が報告されている。⁽⁸⁾ しかしながら、その一般性は必ずしも今回のターゲット分子に適切とは言えない。そこで、ラセミ体である β -ヒドロキシカルボニル化合物のヒドロキシル基にアミノ酸基を持つ光学活性の銑型をエステルとして導入し、カルボニル基のアミノ酸化を試みる。また、その有用性を一般化できる経路に導く (図8)。

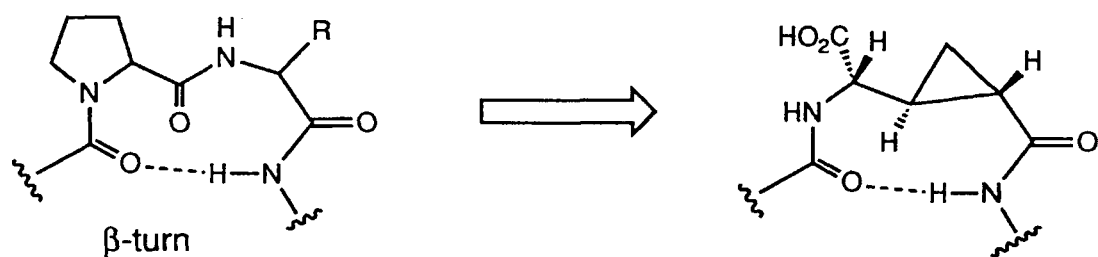
図8



3. 5. 配座制御ペプチドのターゲット

一般に、 β -ターン構造はプロリンのC端及びN端がペプチド結合で結ばれた、3個のアミノ酸残基を持つペプチドで形成される。配座制御アミノ酸を導入することによりアミノ酸2残基で β -ターン構造の制御が可能になる。このようなアミノ酸として、(2S,3S,4S)あるいは(2S,3R,4R)-2-(カルボキシシクロプロピル)グリシンや6員環類縁体 (ピペリジン-2、3-ジカルボン酸) が有力である (図9)。

図 9



4. まとめ

以上のように、平成4年度は我々の研究基盤をもとに機能性ペプチドを視野に
 いた分子識別分子の候補物質の調査研究、ターゲットの立案、分子設計を行っ
 た。勿論、試験的に合成研究も開始している。

5. 参考文献

1. (a) Chothia, C. *Ann. Rev. Biochem.* **1984**, *53*, 537
(b) DeGrado, W. F.; Wasserman, Z. R.; Lear, J. D.; *Science* **1989**, *243*, 622.
(c) Gierasch, L. M. *Biochemistry* **1989**, *28*, 923.
(d) Goldberg, D. P. *Ann. Rev. Biophys. & Biosphys. Chem.* **1988**, *17*, 481.
(e) Kim, P. S.; Baldwin, R. L. *Ann. Rev. Biochem.* **1982**, *51*, 459.
(f) Wright, P. E.; Dyson, H. J.; Lerner, R. A. *Biochemistry* **1988**, *27*, 7167.
(g) Moser, R.; Klauser, S.; Leist, T.; Langen, H.; Epprecht, T.; Gutte, B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 719.
(h) Mutter, M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 639.
(i) Gellman, S.; Dado, G. P.; Liang, G-B.; Adams, B. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1164.
2. Ohfuné, Y. *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 360.
3. 島本啓子、S.ラグワン、大船泰史 第34回天然有機化合物討論会（東京）1992年、講演要旨集 p47.
4. Shimamoto, K.; Ishida, M.; Shinozaki, H.; Ohfuné, Y. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4167.
5. (a) Koskinen, A. M. P.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1859.
(b) Wolf, J-P.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3164.
6. S.ラグワン、大船泰史：L-2-(2-カルボキシ-4-メチリデンシクロペンチル)グリシン類の合成；日本化学会第63春季年会、平成4年3月（大阪）、講演要旨集 II-1903 (3E714).
7. 山本治、堀川学、橋本貴美子、白濱晴久、大船泰史：日本化学会第59春季年会、平成2年4月（横浜）、講演要旨集 II-1149 (4C516).
8. (a) Seebach, D.; Aebi, J. D.; Gander-Coquoz, M.; Naef, R. *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1195.
(b) Roos, E. C.; Hiemstra, H.; Speckamp, N.; Kaptein, B.; Kamphuis, J.; Schoemaker, H. E. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1992**, *111*, 360.

2. 3 光・電子機能を持つペプチドの研究開発

協和発酵工業株式会社

田村圭史郎

倉橋孝夫

伊藤幸良

清水幾夫

1. はじめに

現在使われている機能性色素という言葉は、可視域の光を吸収する色素を指しており、主となる用途としては、光ディスク、電子写真の感光体などがあげられる。前者の場合、色素は、吸収した光エネルギーを熱エネルギーに変換するものとして使われているが、感光体の場合は、光エネルギーを電荷に変える、いわゆる光電変換機能を果たすものとして利用されている。これらの分野では、加工性の高さなどから、かなりの材料が無機系から有機系へ変換された。

一方、光電変換機能を利用した最も一般的な用途の一つに太陽電池があるが、材料として使われているのは、シリコン系を中心とした無機材料である。太陽電池の場合、有機材料は変換効率、あるいは耐候性などに問題があり、研究段階にとどまっている。しかし、自由な分子設計、加工性の容易さ、吸光係数の高さなど、有機材料の優れた面を考えると、有機材料の可能性を追求する価値は存在すると思われる。

電子写真の感光体では、光吸収過程に続いて発生した電荷が外部電場により反対方向へ引っ張られるが、太陽電池では外部電場が無い場合、発生した電荷をいかに再結合させることなく取り出せるかが変換効率を上げる重要なポイントとなる。有機系でこれを成し遂げるためには、個々の分子設計の最適化はもちろんだが、それ以外に、規則立った分子配向の場が必要と思われる。しかし、多くの有機系電池の研究は、単分子の真空蒸着、あるいはスピンコートといった手法でデバイス化しているため、材料内はアモルファス状態になっていると考えられる。

光電変換材料の分子配向の一つの手段として、高分子主鎖に、光を吸収する色素部位と、電荷が流れる部位を並べてぶら下げる方法が考えられる。実際にそういった研究例も見られるが、より細かなデザインを考えると、ビニルポリマーなどの高分子では適さないと思われる。そこで、今回のプロジェクトでは、高分子としてペプチドを取り上げ、ペプチドのヘリックス構造を分子配向の場として利用することにした。ヘリックス構造は、主鎖がらせん状をしており、そこに色素部位をぶら下げることにより、各色素部位を規則性をもって配列させることが可能になるとと思われる。穴戸らは、色素以外の芳香環を用いてこの手法を使い、各芳香環間の電子移動の研究を行っている¹。

また、天然アミノ酸のポリマーであるペプチドは、生理活性に対する関心から、合成手法が広く研究されており、それらの手法を利用できる点でもこの方法はメリットがあると思われる。

具体的手法としては、色素を側鎖として持つ非天然アミノ酸を合成し、同種あるいは異種の非天然アミノ酸、あるいは天然アミノ酸と非天然アミノ酸をつなげて光電変換機能を

有するペプチドを合成する。

この手法が確立されれば、光電変換機能以外の光・電子機能分野での、非天然アミノ酸ペプチドの応用も期待される。

以下に、平成4年度の研究結果を記すが、平成4年度は光・電子機能を有するペプチドの、機能部分を担う色素置換の非天然アミノ酸の合成方法の確立を目標とした。また、用いる色素としては、吸光係数が大きく、吸収波長の選択、誘導体の合成が容易な、スクアリン酸誘導体色素＝スクアリリウム色素を選ぶことにした。スクアリリウム色素は、スクアリン酸骨格を二つの芳香環ではさんだ構造をしており、芳香環の選択により、吸収波長をはじめ、諸物性を変えることができる。今年度は、スクアリリウム色素置換非天然アミノ酸合成法の確立と、アミノ酸側鎖となる基本スクアリリウム色素の選定を行うことにした。

2. 研究内容及び結果

1. 基本色素の選定

非天然アミノ酸色素の側鎖となるスクアリリウム色素を選ぶために、光起電力性について、大阪府立大学の上原先生に測定を依頼した。

① 光起電力

数種類のスクアリリウム色素を使い、真空蒸着法により下記のような積層型のデバイスを作成し、タングステンハロゲンランプを光源とし、電流－電圧特性を測定した。

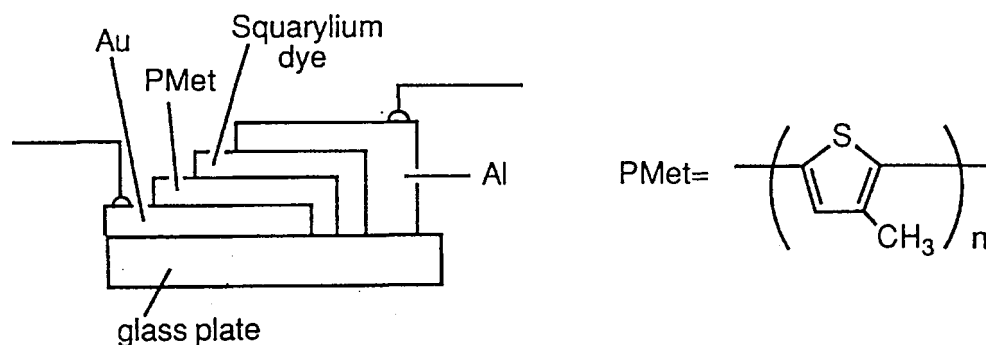


Fig. 1

測定の結果、光電変換機能では、次の構造の、アニリン誘導体を芳香環側鎖として持つスクアリリウム色素（以下アニリン型スクアリリウム色素と略す。）が、測定サンプル中では一番良い成績を出し、光電変換効率で0.017%、整流比（±2.0V）が12000という値を示した。

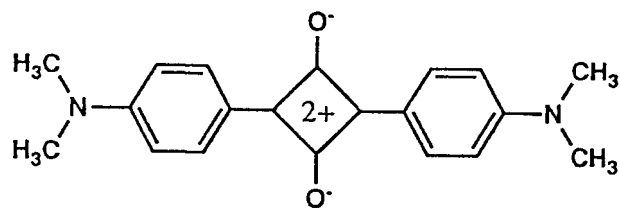


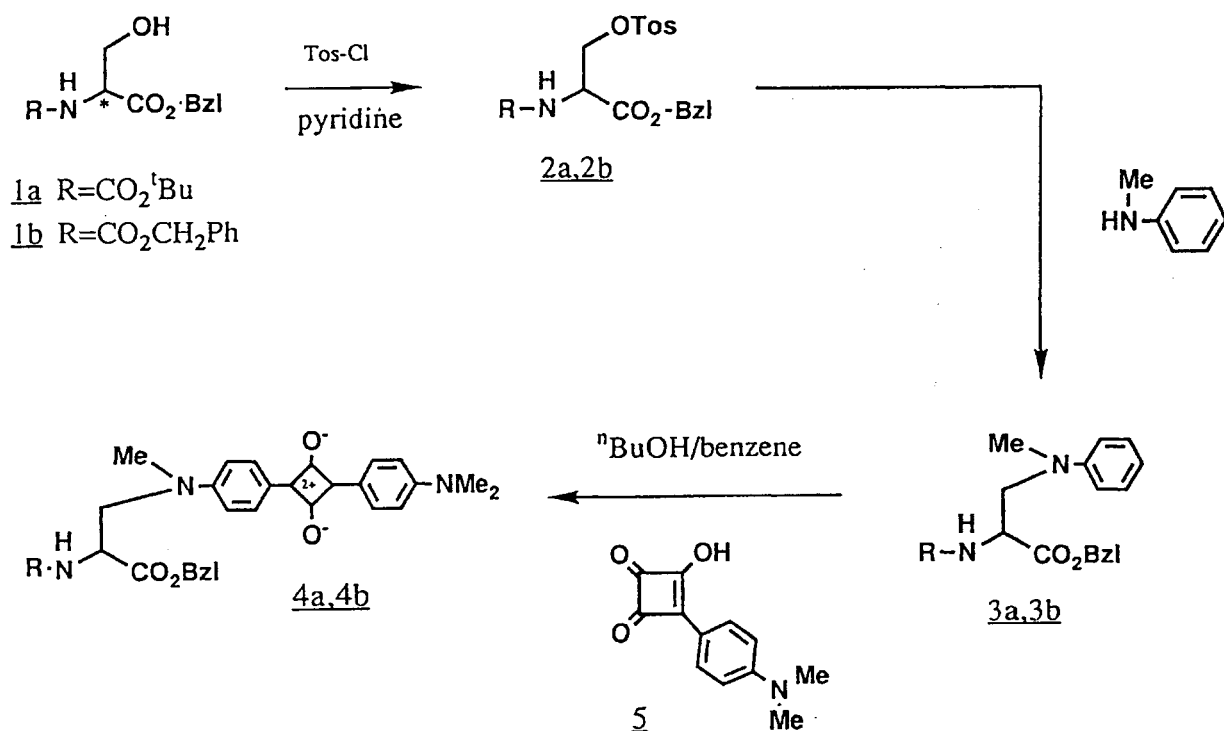
Fig. 2

この測定以外にも、IBM、エクソンの研究者らが、スクアリリウム色素を用い光電変換機能の測定を行っている²。

2. 非天然アミノ酸の合成研究

アニリン型スクアリリウム色素を側鎖とする非天然アミノ酸合成のために、下記の合成ルートを立てた。

Scheme 1



非天然アミノ酸をデザインする上で考えたことは、ペプチドのヘリックス主鎖からあまり離れないように色素部分を配置するように、アミノ酸部分の不斉炭素から色素部分までの距離を短くした方が良からうということであった。ヘリックス-色素間の距離が長いと、色素が規則正しく配向せず、ランダムになる恐れがあるためである。

この考えから、出発原料として、保護したセリンを用いることにした。

① 保護セリンのトシル化

アミノ基をBoc又はZで保護したL-セリンのベンジルステル (1 a or 1 b) を、常法に従い塩化トシルによりトシル化し (収率60~65%)、それぞれBoc-又はZ-Ser (OTos) -Bzl (2 a or 2 b) を得た。ラセミ化が起こっているか否かについては、今後の分析を待つ。

② トシル体とN-メチルアニリンとの反応

Boc-又はZ-Ser (OTos) -OBzl (2 a or 2 b) とN-メチルアニリンとの反応は、種々の条件を検討したところ、過剰のN-メチルアニリンを用いて、50度ぐらいの温度で反応時間を長くすることで、収率約40%でBoc-又はSer-(N-メチル-N-フェニルアミノ)-OBzl (3 a or 3 b) を得ることが判った。N-メチルアニリンの量が少ないと反応が遅く、反応温度を高くすると、副生成物が現れる。また、トリエチルアミン等の塩基成分を加えると、原料2の水素のβ脱離によるデヒドロアラニン誘導体の生成が見られるようであった。

③ アニリン型スクアリリウム色素を側鎖として持つ非天然アミノ酸 (4 a) の合成

Boc-Ser (N-メチル-N-フェニルアミノ)-OBzl (3 a) と1-(4-N, N-ジメチルアニリノ)-2-ヒドロキシ-1-シクロブテン-3, 4-ジオン (5) との反応は、一般的な、スクアリリウム色素の合成条件を用いることにより行うことができた。収率の低さが問題として残るが、これは立体障害の影響もあると思われる。アミノ酸保護基の変更、あるいはアニリンの種類を変えることにより、多少は改善されるものと思われる。

3. まとめ

種々のスクアリリウム色素の光電変換特性を測定することにより、その光電変換効率の高さから、光・電子機能を持つペプチドの側鎖に、アニリン型のスクアリリウム色素を導入することにした。また、アニリン型スクアリリウム色素を側鎖として持つ非天然アミノ酸を、セリン誘導体から合成する方法を確立した。

4. 実験の部

Boc-Ser (OTos) -OBzl (2 a)

Boc-Ser-OBzl (1 a) 7 g (23.7 mmol) とピリジン14 g の混合物に、氷水冷下塩化トシル4.74 g (24.9 mmol) を20分かけて投入する。投入後、室温で1時間攪拌し反応を終える。反応液を1N塩酸に注ぎ、ジクロロメタンで抽出する。さらに1N塩酸で2回、水で1回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥、減圧下で濃縮し、オイル状物を得る。これを室温で放置すると固化するので、ジイソプロピルエーテ

ル 70 ml を加え、不溶物を濾取することにより、化合物 (2 a) を得た (6. 51 g, 61. 1%)。

mp: 91. 6-92. 8°C

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3): \delta$ 7. 7(m, 2H), 7. 3-7. 4(m, 7H), 5. 3(brd, 1H), 5. 2(d, $J=12. 2\text{Hz}$, 1H),
5. 1(d, $J=12. 2\text{Hz}$, 1H), 4. 5(brd, 1H), 4. 4(dd, $J=2. 9, 10. 0$, 1H),
4. 3(dd, $J=3. 2, 10. 0$, 1H), 2. 4(s, 3H), 1. 4(s, 9H)

IR(KBr): cm^{-1} 1753, 1695, 1598

elem. anal.: calcd. as $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_7\text{S}$ H, 6. 05; C, 58. 78; N, 3. 12

found H, 6. 07; C, 58. 51; N, 3. 18

Z - Ser (O Tos) - OBzl (2 b)

Z - Ser - OBzl (1 b) 7 g (21. 3 mmol) とピリジン 12. 73 g の混合物に、氷水冷下塩化トシル 4. 25 g (22. 3 mmol) を 10 分かけて投入する。投入後、室温で 1 時間攪拌し反応を終える。反応液を 1 N 塩酸に注ぎ、ジクロロメタンで抽出する。さらに 1 N 塩酸で 2 回、水で 1 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥、減圧下で濃縮し、オイル状物を得る。これを室温で放置すると固化するので、ジイソプロピルエーテル 70 ml を加え、不溶物を濾取することにより、化合物 (2 b) を得た (6. 60 g, 64. 1%)。

mp: 72. 7-74. 8°C

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3): \delta$ 7. 7(m, 2H), 7. 3-7. 4(m, 12H), 5. 6(brd, $J=7. 8\text{Hz}$, 1H),
5. 0-5. 2(m, 4H), 4. 6(brd, $J=7. 8\text{Hz}$, 1H), 4. 4-4. 6(dd, $J=3, 10\text{Hz}$, 1H),
4. 3-4. 4(dd, $J=3, 10\text{Hz}$, 1H), 2. 4(s, 3H)

IR(KBr): cm^{-1} 1745, 1689, 1597

elem. anal.: calcd. as $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{NO}_7\text{S}$ H, 5. 21; C, 62. 10; N, 2. 90

found H, 5. 29; C, 61. 99; N, 2. 92

Boc - Ser (N - メチル - N - フェニルアミノ) - OBzl (3 a)

Boc - Ser (O Tos) - OBzl (2 a) 2 g (4. 45 mmol) と N - メチルアニリン 4. 77 g (44. 5 mmol) の混合物を 50 度のオイルバス上で 18 時間加熱する。加熱終了後、減圧下で過剰の N - メチルアニリンを除くことにより、黒褐色のオイル状物を得る。これをジクロロメタンに溶かし、水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮する。残さをジイソプロピルエーテルに溶かし、それに n ヘキサンを加えたときの上澄みをデカンテーションし、得られた溶液を濃縮することにより、擦ると結晶化するオイルを得る。これに n ヘキサンを加え、しばらく攪拌した後、不溶物を濾取することにより、化合物 (3 a) を得た。 (0. 65 g, 38. 0%)

mp: 72-77°C

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3): \delta$ 7. 2-7. 4(m, 7H), 6. 7(m, 3H), 5. 1(brd, $J=12. 2\text{Hz}$, 2H),
5. 2(brd, $J=12. 2\text{Hz}$, 1H), 4. 6(m, 1H), 3. 8(m, 1H), 3. 7(m, 1H),
2. 9(s, 3H), 1. 4(s, 9H)

IR(KBr): cm^{-1} 1755, 1693, 1606

elem. anal.: calcd. as $C_{22}H_{28}N_2O_4$ H, 7.34; C, 68.73; N, 7.29;
found H, 7.24; C, 67.99; N, 7.13;

Z-Ser (N-メチル-N-フェニルアミノ) -OBzl (3b)

Z-Ser (OTos) -OBzl (2b) 1.65 g (3.41 mmol) と N-メチルアニリン 5.36 g (50 mmol) の混合物を 50 度のオイルバス上で 15 時間加熱する。加熱終了後、減圧下で過剰の N-メチルアニリンを除くことにより、黒褐色のオイル状物を得る。この残さをカラムクロマトグラフィー (シリカゲル, クロロホルム) により単離精製することにより、化合物 (3b) を得た。(0.62 g, 43.4%)

mp: oil

1H NMR($CDCl_3$): δ 7.2-7.4(m, 12H), 6.7(m, 3H), 5.3-5.4(brd, 1H), 5.0-5.2(m, 4H),
4.7(m, 1H), 3.7-3.8(m, 2H), 2.9(s, 3H)

IR(KBr): cm^{-1} 1722, 1601

elem. anal.: calcd. as $C_{25}H_{26}N_2O_4$ H, 6.26; C, 71.75; N, 6.69;
found H, 6.24; C, 70.21; N, 6.62;

アニリン型スクアリリウム色素置換非天然アミノ酸 (4a) 合成

Boc-Ser (N-メチル-N-フェニルアミノ) -OBzl (3a) 0.015 g (0.3 mmol)、1-(4-N, N-ジメチルアニリノ)-2-ヒドロキシー-1-シクロブテン-3、4-ジオン (5) 0.065 g (0.3 mmol) を n-ブタノール 15 ml とベンゼン 15 ml の混合溶媒に加え、110 度のオイルバス上で 17 時間加熱還流させる。反応終了後、減圧下で濃縮し、残さをカラムクロマトグラフィーで単離精製することにより、化合物 (4a) を得た。(10 mg, 5.7%)

1H NMR($CDCl_3$) (Fig. 3): δ 8.4(d, $J=9.3$ Hz, 2H), 8.3-8.4(d, $J=9.0$ Hz, 2H),
7.4(m, 3H), 7.3(m, 2H), 6.8(m, 4H), 5.2-5.3(brd, 1H),
5.1-5.2(d, 1H), 5.0-5.1(d, 1H), 4.6(m, 1H),
3.8-3.9(m, 2H), 3.2(s, 6H), 3.1(s, 3H), 1.4(s, 9H)

IR(KBr): cm^{-1} 1716, 1701, 1587

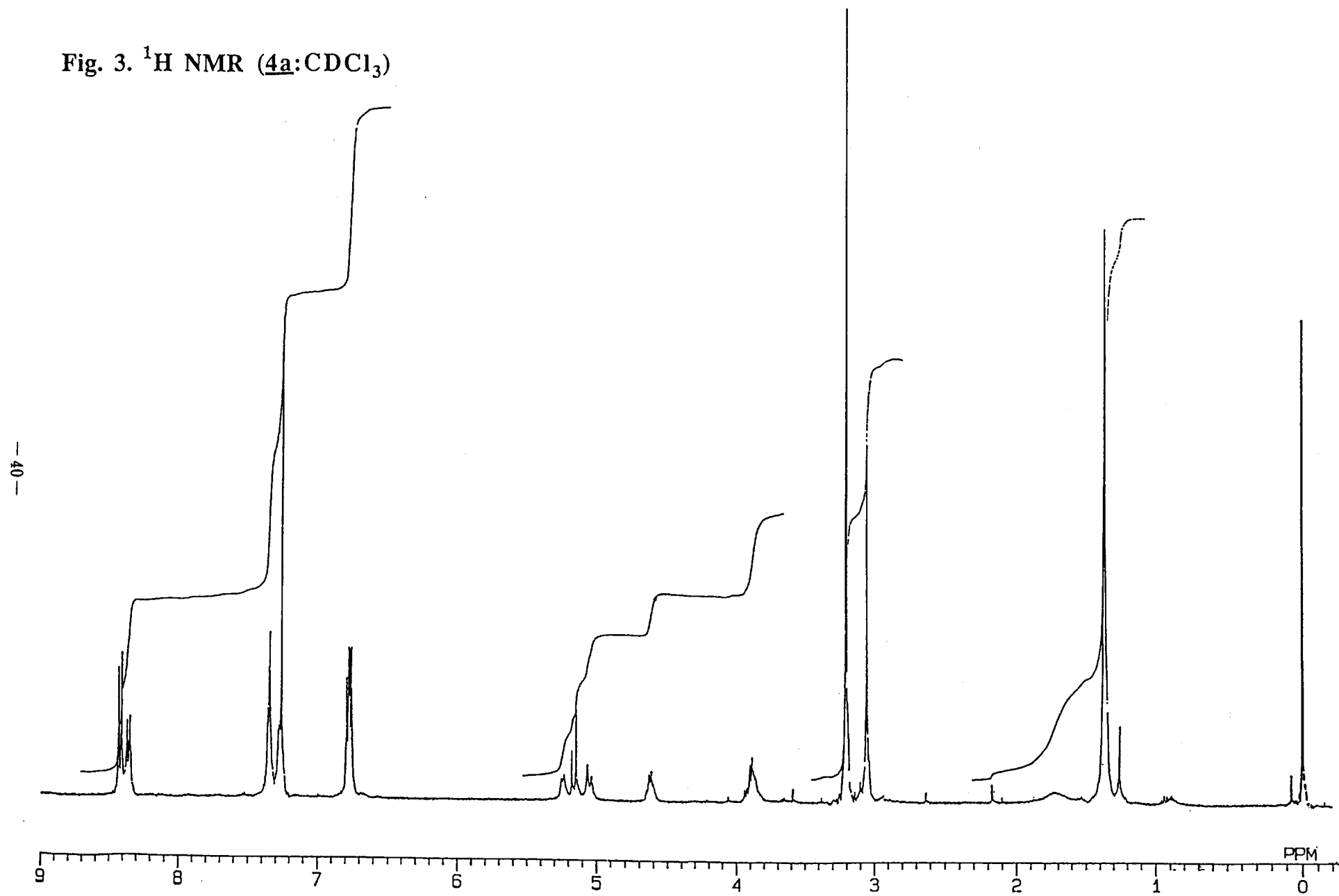
$\lambda_{max}(CHCl_3)$ (Fig. 4): 656 nm

[参考文献]

- (a) Huang, Songyu et al., Huadong Huagong Xueyuan Xuebao, 12(6), 745(1986).
(b) Huang, Songyu et al., Wuli Huaxue Xuebao, 4(3), 314(1988).
(c) V. Y. Merritt, IBM J. Res. Dev., 22(4), 353(1987).
(d) D. L. Morel et al., J. Phys. Chem., 88(5), 923(1984).
(e) D. L. Morel et al., J. Phys. Chem., 88(5), 934(1984).
- (a) Masahiko Sisido et al., J. Am. Chem. Soc., 105(4), 1041(1983).

- (b) Masahiko Sisido et al., J. Am. Chem. Soc., **105**(12), 4077(1983).
- (c) Masahiko Sisido et al., Macromolecules, **18**(5), 882(1985).
- (d) Masahiko Sisido et al., Macromolecules, **19**(8), 2187(1986).
- (e) Masahiko Sisido, Macromolecules **22**(8), 3280(1989).
- (f) Masahiko Sisido et al., J. Am. Chem. Soc., **111**(17), 6790(1989).
- (g) Masahiko Sisido et al., Macromolecules, **23**(6), 1665(1990).
- (h) Masahiko Sisido et al., J. Phys. Chem., **94**(7), 2734(1990).
- (i) Masahiko Sisido et al., J. Phys. Chem., **94**(16), 6237(1990).
- (j) Masahiko Sisido et al., J. Phys. Chem., **95**(9), 3847(1991).

Fig. 3. ^1H NMR (4a: CDCl_3)



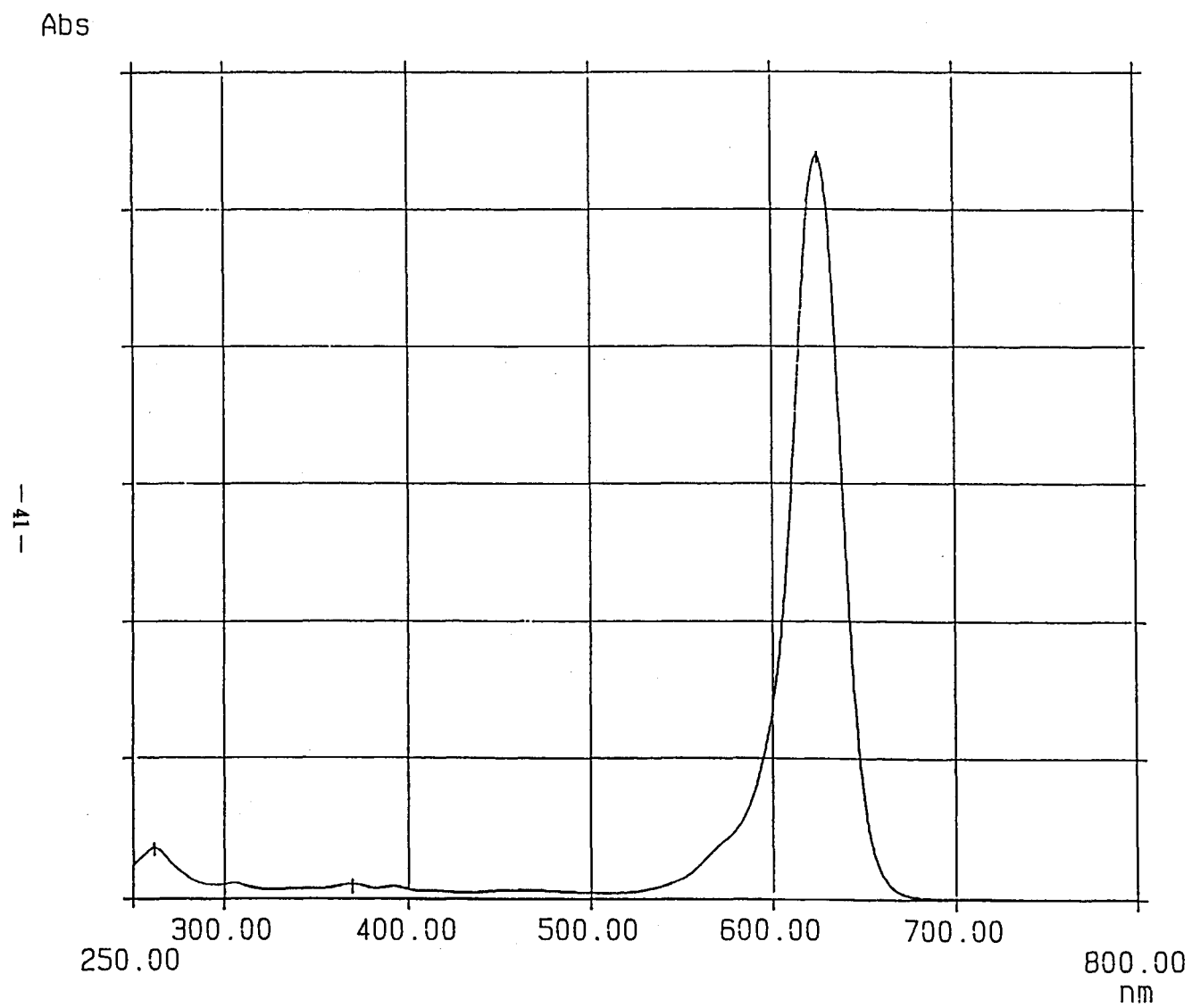


Fig. 4. absorption spectrum (4a)
(CHCl₃) λ_{max} =626nm

2. 4 酵素法によるペプチド合成の研究開発

大阪市立工業研究所

富永嘉男、杉原耿雄、島田裕司
室 哲雄、永尾寿浩

1. はじめに

近年、微量成分の単離・精製、ならびに分析技術のめざましい発展により、生体で各種の生理機能を発現しているペプチド類が数多く発見され、これらに対する関心が高まっている。一方、合成技術の進歩ともあいまって、生体に存在する生理活性ペプチドを越える優れた機能をもつ多様なペプチドの創製が予測され、ペプチドを機能性材料として利用することを目的とした工学分野への展開が期待されている。

ペプチドを合成する方法には、大きく分けて、生化学的手法と有機化学的手法の2つの手法がある。さらに前者は、最近目覚ましい進展をとげている遺伝子工学技術を用いる方法とプロテアーゼあるいはその関連酵素を用いる酵素合成法とに分けることができる。これらのうち酵素によるペプチド合成法は他の合成法にはない優れた点、たとえば、非天然アミノ酸の導入、反応中にラセミ化を伴わない、アミノ酸側鎖の官能基の保護を必要としない、などの特徴をもっている。しかし、この方法が基盤技術としての位置を確立するには、①酵素の基質および反応特異性による合成できるペプチドの限定、②基質への保護基の付加やその除去などの操作の困難さと複雑さ、③酵素の耐有機溶媒性など、まだ解決すべきいくつかの問題点がある。

優れた酵素によるペプチド合成法を確立するには、その主要な要素である酵素と反応系の検討が特に重要である。酵素に関しては、従来、ペプチド合成のために使用されている酵素のもつ水系でのペプチド分解の優先、狭い基質特異性、低い耐有機溶媒性など各種の欠点を補い、さらに優れた性質をもつ新規な酵素の開発が必須である。そのためには、酵素の給源として、種類が多く多様な性質をもつ微生物を対象に検索するのが合理的であり、まず、目的とする性能をそなえた酵素生産菌を獲得する効率的な検索方法を確立することが必要である。また、反応系に関しては、反応速度や収率に関係する基質および生成物の溶解性や、反応の平衡などに影響を及ぼす各種の因子を明らかにする必要がある。

本年度は、水系で合成活性が強く、基質選択性の高いペプチド結合活性をもつ微生物起源の酵素の検索方法の確立と、それを用いることによる目的菌の選択を中心に検討した。

2. 研究内容及び成果

2-1. 研究内容

(材料と方法)

① プラステイン反応用の基質

(i) 大豆タンパク質分解物 (SPH) の調製

脱脂大豆からアルカリ抽出したタンパク質 (10 g) を、0.04 N HCl (1,000 ml) で溶解した後、ペプシン (150 mg) を加え、40℃で、20～24時間加水分解し、エバポレーターで濃縮後、生じた不溶物を除き凍結乾燥した。

(ii) ペプトンとソイトンの分解物の調製

SPHの調製と同じ方法により、ペプシンで分解した後、エバポレーターで20%濃度まで濃縮した。

② セリシンの調製

繭 (20 g) に 1,000 ml の水を加え、100℃で1時間煮沸後、東洋濾紙 No. 2 で濾過し、得られた濾液をエバポレーターで2倍濃縮した。

③ プロテアーゼ活性の測定

(i) ミルクカゼイン分解活性

ミルクカゼイン 3 g を 0.1 N NaOH (50 ml) に溶解し、0.05 M Tris-HCl バッファー (pH 7.2) 200 ml を加え、塩酸で pH を 7.2 に調製後、水で 500 ml として 0.6% ミルクカゼイン溶液 (基質) を調製した。この基質 (5 ml) に、酵素 (1 ml) を加え、30℃で10分間反応後、TCA混液 (5 ml) を加え反応を停止した。つぎに、東洋濾紙 No. 131 を用いて濾過し、濾液の 275 nm の吸光度を測定した。なお、上記の条件下で1分間に1 μ g のチロシン相当量を遊離する酵素量を1単位と定義した。

(ii) 各種タンパク質に対する分解活性

0.112% ゼラチン (または、グリアジン、セリシン) 0.9 ml に、硫酸塩析酵素 (0.1 ml) を加え、40℃で一定時間反応後、その反応液 (0.1 ml) をサンプリングし煮沸することによって酵素反応を停止した。次に、この反応停止液に、0.5 M クエン酸バッファー (pH 5.0、1.4 ml)、ニンヒドリン溶液 (0.2 ml)、KCN-メチルセルソルブ (1 ml) を加え、100℃で15分

間煮沸した。その後、60%エタノール(3 ml)を加え、570 nm で吸光度を測定した。その増加した吸光度に 257 をかけ、遮離したアミノ基量をグリシン換算で求めた。

④ アラスチン合成活性の測定

(i) 培養アロア中の酵素活性の測定

S P H (40 mg) に培養アロア (0.2 ml) を加え、37℃で1~7日間反応後、生じた濁りを 660 nm で測定した。

(ii) 硫酸塩析酵素の活性測定

S P H (100 mg) を 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0, 0.25 ml) に溶かし、酵素液 (0.25 ml) を加え 37℃で反応した。一定反応時間後、生じた濁りを 660 nm で測定した。

⑤ 20% SDS 電気泳動法

アラスチン反応液 (200 μ g/ μ l) を、15% SDS で3倍希釈し、さらに水で6倍希釈した。次に、この希釈した反応液に、等量の SDS 変性バッファーを加え、37℃で一晩変性処理し、その 10 μ l を 20% SDS-PAGE に負荷し生成物を分析した。

⑥ 高圧濾紙電気泳動

反応液を東洋濾紙 No. 50 (30 X 60 cm) にスボットし、10℃、3000 V の条件下で 105~190 分間泳動した。なお、泳動バッファーとしてギ酸：酢酸：水 (3:9:8) を用いた。泳動後、濾紙上のアミノ酸やペプチドを 1% ニトリン溶液で呈色した。

⑦ パーパークロマトグラフィー

反応液を東洋濾紙 No. 50 (40 X 40 cm) にスボットし、n-ブタノール：酢酸：水 (4:1:2) を用いてクロマトグラフィーを行った。展開後、濾紙上のアミノ酸やペプチドを 1% ニトリン溶液で呈色した。

2-2. 成果と考察

2-2-①. アラスチン反応とこれに用いる基質の決定

アラスチン反応は、アロチア-ゼの縮合作用や転移作用により低分子量ペプチドからアラスチンとよばれるタンパク質状物質を合成する反応であることが知られている。なお、反応の際、溶液中の濁度の増加やゲル化といった現象が認められる。そこで、自然界から、優れたペプチド合成力をもつ酵素生産菌を検索するにあたり、数多くの菌株を処理するために、一次スクリーニングでは、この

アサライン反応を指標とすることにした。しかし、一般に、構造のはっきりとした低分子ペプチドを、しかも量的に多く入手することは非常に困難であるので、まずアサライン反応に用いることが可能な基質について検討した。

大豆タンパク質、ペプトン、ならびにソイトンのペプチン分解物、大豆ペプチド（ハイニユートPM、R）、加水分解コラーゲンペプチド（CCP-100）などにキモトリプシンを作用させ、アサライン反応時に観察される白濁化（ゲル化）を調べた。その結果、大豆タンパク質のペプチン分解物（SPH）のみに白濁化やゲル化が認められた。これらの結果より、一次スクリーニングでのアサライン反応の基質には、このSPHを採用した。

2-2-②. アサライン反応陽性菌株の検索（一次スクリーニング、その1-培養アロスをを用いた時のアサライン反応）

水系で優れたペプチド合成活性を有する酵素生産菌を検索するにあたり、まずペプチド合成反応としてよく知られているアサライン反応に着目し、その際に認められる濁りの生成やゲル化を指標にして、土壌から分離した菌株とタイツカルチャーを対象にスクリーニングを行った。具体的には、まず、菌株を下記の各種培地（7 ml）で試験管培養を行った。

細菌の場合——肉エキスを（0.5%または1%）、ペプトン（1%）、NaCl（0.5%）、（pH 7.0）

放線菌の場合——肉エキスを（0.5%）、ペプトン（0.5%）、グルコース（1%）（pH 7.0）

酵母、カビの場合——①酵母エキスを（1%）、ペプトン（3%）（pH 6.0）

②ペプトン（3%）、 NaNO_3 （0.1%）、 KH_2PO_4 （0.1%）、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ （0.05%）、オリブ油（0.5%）

27℃で2～4日間培養後、遠心分離で菌体を取り除き、培養アロスを得た。つぎに、この培養アロスをを用いて、アサライン合成活性とミルチカゼイン分解活性とを測定した。前者の場合、SPH（40 mg）に培養アロス（0.2 ml）を加え、37℃で1～7日間反応後、生成した濁りを660 nmで測定した。その結果、土壌からの分離した菌株ならびにタイツカルチャーを含めた約1000株のうち、44株にアサライン反応の陽性（濁りの生成）を認めた。その44株のうちから、アサライン合成活性の比較的強いもの27株を選び、アサライン合成活

性 (A_{660}) とミルクカゼイン分解活性 (PA) との比を求めた。 A_{660}/PA の値が大きいほど分解活性よりも合成活性が強いものと考えられる。そこで、ブラステイン反応をよく引き起こす酵素として知られているキモトリブシンとの比較をしたところ、約 15 株ほどにキモトリブシンよりも強い合成活性を認めたが、濁りの生成に長時間 (1~7 日間) を必要とした。この原因として、試験管培養の場合、微生物の酵素生産量が少ないことが考えられるので、つぎに、坂口フラスコを用いた培養を行い硫安塩析で濃縮した酵素を用いて、ブラステイン反応の経時変化を短時間内で追跡する必要がある。なお、選択したブラステイン反応陽性菌株は、細菌と放線菌であり、酵母やカビは含まれていなかった。

2-2-③. ブラステイン反応陽性菌株の検索 (一次スクリーニング、その 2 - 硫安塩析酵素を用いた時のブラステイン反応)

試験管培養で得られた培養ブロス (酵素液) を用いた場合、ブラステイン反応の濁りの生成に長時間 (1~7 日間) を必要とする原因の一つとして、酵素量に問題があると考えられる。したがって、高濃度の酵素液を用いて、より定量的にブラステイン反応を追跡する必要がある。そこで、上記の 27 株について、下記の培地 (70 または 100 ml) を含む坂口フラスコを用いて培養を行った。

細菌の場合――カツオ肉エキス (1%)、ペプトン (1%)、NaCl (0.5%)
(pH 7.0) (培養液 100 ml)

放線菌の場合――①牛肉エキス (0.5%)、ペプトン (0.5%)、グルコース (1%)
(pH 7.0) NaCl (0.5%) (培養液 70 ml)
②カツオ肉エキス (1%)、ペプトン (1%)、NaCl (0.5%)
(培養液 100 ml)

27℃で2または4日間振とう培養後、遠心分離で菌体を取り除き、得られた培養ブロスに硫安を 0.8 飽和になるまで加えて塩析し、硫安塩析酵素を調製した。

ブラステイン反応をよく引き起こす酵素として知られているキモトリブシンを対照として、得られた硫安塩析酵素 (ミルクカゼイン分解力をそろえたもの) の SPH に対する作用 (濁度の増加) を経時的に追跡した。その結果、大部分のものが反応初期にラグが観察され、強いものでは反応 2 時間以降に急激な濁度の増加が認められた (図 1~図 4)。表 1 に、4 時間目の濁度の増加と用いた硫安塩析酵素のミルクカゼイン分解力、ならびにこれらの比を示した。27 株中 6 株が、

キモトリプシンよりもより強い濁度の増加を示すことから、これらはミルクカゼイン分解活性あたりのプラステイン合成活性（ペプチド合成力）が強い酵素を生産すると考えられた。しかし、有望な菌株を選定する際、単に濁度の増加が大きいというだけでは的が絞りにくい。そこで、実際にプラステイン反応で認められた濁度の増加とペプチドの分子量の変化との関係を明らかにするためにSDS電気泳動法による反応物の分析を行った。また、さらには酵素の一つの性質である基質特異性を考慮した二次スクリーニングを実施した。

2-2-④. プラステイン反応陽性菌株の検索（一次スクリーニング、その3-SDS電気泳動法による分析）

先にも述べたように、有望な菌株を選定する際、単に濁度の増加が大きいというだけでは的が絞りにくいし、かつ、濁度の増加と反応生成物の分子量との関係が明らかではない。そこで、この点を明らかにするために、SDS電気泳動法による生成物の分析を行った。上記の硫酸塩析酵素を用いて調製したプラステイン反応液（200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）を、15% SDSで3倍希釈し、さらに水で6倍希釈した。次に、この希釈した反応液に、等量のSDS変性バッファーを加え、37℃で一晩変性処理し、その10 μl を20% SDS-PAGEに負荷し生成物を分析した。なお、マーカーとして、97.4 kDa、55.4 kDa、36.5 kDa、20.1 kDaの標準タンパク質を用いた。その結果、基質として用いたSPHは約7,000前後の分子量のところで幅の広いバンドを示したが、どの試験サンプルについてもSPHよりもより大きな分子量の位置にはっきりとしたバンドの生成は認められなかった（図5）。むしろSPHが分解を受けているように思われた。いずれにしても、このSDS電気泳動法による生成物の検出は困難であると判断した。

2-2-⑤. プラステイン反応陽性菌株の生産する酵素（硫酸塩析酵素）による各種タンパク質の加水分解（二次スクリーニング）

一次スクリーニングでプラステイン合成活性の強い27株が得られたが、これらからより目的にかなった酵素生産菌への的を絞るために、酵素の基質特異性を調べた。具体的には、プロテアーゼの縮合反応（合成反応）と加水分解反応とは正逆の反応であり、かつ基質特異性にも共通な点が多くあるという観点に立ち、アミノ酸組成に特徴を有するタンパク質（ゼラチン、グリアジン、およびセリシン）に対する加水分解作用をニンヒドリン定量法で追跡することとした。

(a) ゼラチンに対する加水分解作用

アミノ酸として特異的なイミノ基をもつプロリンやヒドロキシプロリン、ならびにグリシンを構成アミノ酸として比較的多く含有するゼラチンを基質に選択した時の硫酸塩析酵素の加水分解作用について検討した。その結果、表2に示すように約7株 (No. 4, 6, 8, 16, 24, 25, 26) の菌株が比較的よくゼラチンを加水分解していることがわかった。また、ミルクカゼイン分解活性1単位あたりのゼラチン分解力の比とプラステイン合成活性の比との関係を表3に示した。両者の間にははっきりとした相関関係が認められなかったが、この表より約8株 (たとえば、No. 2, 5, 8, 16, 17, 21, 26, 27など) の菌株が対照として用いたキモトリプシンよりも大きな比の値を示した。これらの菌株の生産する酵素は、ゼラチンの主たる構成アミノ酸であるプロリンやグリシンなどに強い親和性を示すものと考えられた。

(b) グリアジンに対する加水分解作用

構成アミノ酸としてグルタミン酸を比較的多く含有することが知られている小麦タンパク質のグリアジンを基質に選び、これに対する硫酸塩析酵素の加水分解作用について調べた。その結果、表4に示すように約11株 (No. 1, 2, 4, 6, 7, 8, 16, 23, 24, 25, 26) の菌株が比較的よくグリアジンを加水分解していることがわかった。また、ミルクカゼイン分解活性1単位あたりのグリアジン分解力の比とプラステイン合成活性の比との関係を表5に示した。両者の間にははっきりとした相関関係が認められなかったが、この表より、約9株 (たとえば、No. 1, 2, 4, 5, 8, 15, 17, 21, 27など) の菌株が対照として用いたキモトリプシンよりも大きな比の値を示した。これらの菌株の生産する酵素は、グリアジンの主たる構成アミノ酸であるグルタミン酸に強い親和性を示すものと考えられた。

(c) セリシンに対する加水分解作用

構成アミノ酸としてセリン、アラニン、グリシン、スレオニンなどを比較的多く含有することが知られている絹タンパク質のセリシンを基質に選び、これに対する硫酸塩析酵素の加水分解作用について調べた。その結果、表6に示すように約12株 (No. 1, 2, 4, 6, 7, 8, 11, 16, 19, 23, 24, 26) の菌株が比較的よくセリシンを加水分解していることがわかった。また、ミルクカゼイン分解活性1単位あたりのセリシン分解力の比とプラステイン合成

活性の比との関係を表7に示した。両者の間にははっきりとした相関関係が認められなかったが、この表より、約10株（たとえば、No. 1, 2, 4, 8, 15, 17, 18, 21, 26, 27など）の菌株が対照として用いたキモトリブシンよりも大きな比の値を示した。これらの菌株の生産する酵素は、セリシンの主たる構成アミノ酸であるセリン、アラニン、グリシンなどに強い親和性を示すものと考えられた。

2-2-⑥. 特定のジペプチドに対する作用

ペプチド合成反応と加水分解反応とは正逆の反応としてよく知られており、その両反応における基質特異性には共通な点が多くあることもわかっている。そこで、二次スクリーニングで調べた各種タンパク質に対する作用特異性の結果を参考に、基質とすべきジペプチド（プロリル-プロリン、グルタミル-グルタミン酸、アラニル-アラニンなど）を選定し、これらの高濃度条件下（0.3 M）における酵素作用について検討した。反応生成物を高圧濾紙電気泳動法で分析したところ、用いた基質の縮合あるいは転移物と考えられるペプチドを合成する菌株を数株得た。なお、詳細については検討中であり、今後、これらの結果を踏まえて目的にかなう菌株の選定を行う予定である。

3. まとめ

水系で優れたペプチド合成能をもつ新規酵素の生産菌検索法の決定と目的菌の選択を目指し、次の結果を得た。

1) 目的菌の検索の指標として、ペプチド合成反応として知られているブラステイン反応を採用した。この反応に用いる基質には、脱脂大豆から抽出したタンパク質をペプシンで加水分解して調製した高濃度のペプチド混合物が最適であった。

2) 土壌より分離した菌株とタイプカルチャを含めた約1000株を対象に、ブラステイン反応時に認められる濁度の増加現象を目安に目的酵素生産菌の一次スクリーニングを行い、濁度形成力の強い27株を得た。

3) アミノ酸組成に特徴を有するタンパク質に対する分解力を測定したところ、ゼラチンには7株、グリアジンには11株、セリシンには12株の菌株の生産する酵素がよく作用した。

4) プロリンやグルタミン酸など特定のアミノ酸からなる合成ジペプチドに対して合成力を示す菌株を数株得た。なお、詳細については検討中である。

Action of various enzymes (150 U/ml) on SPH

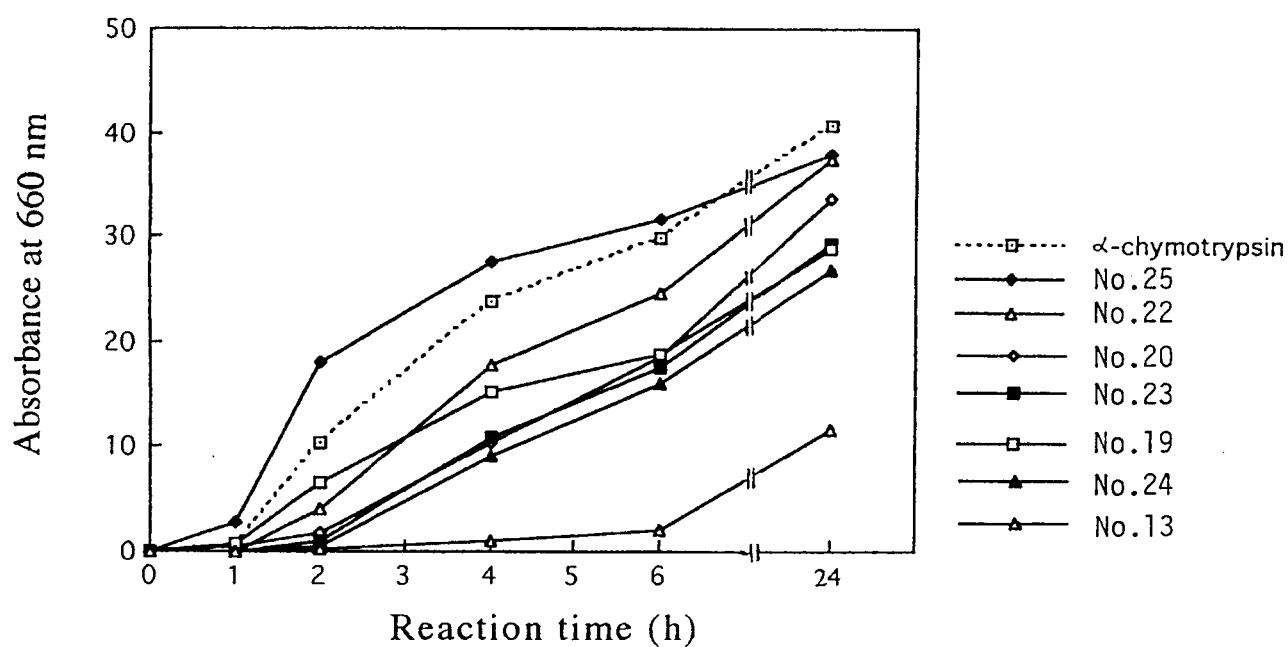
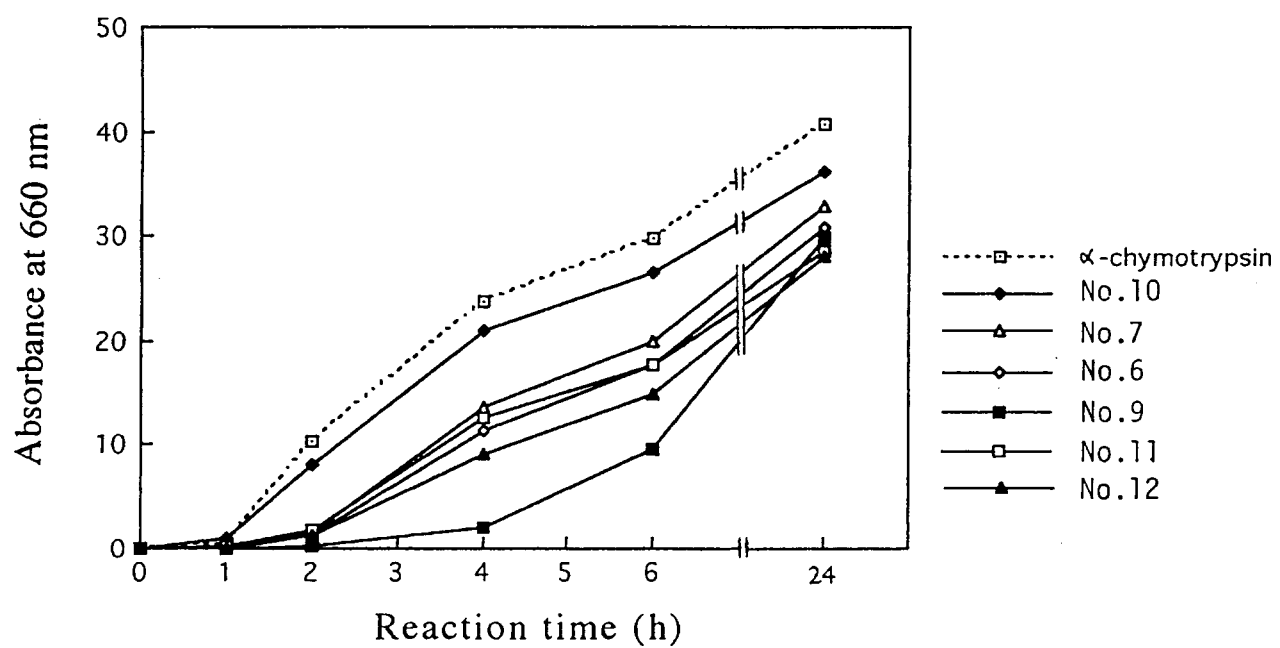
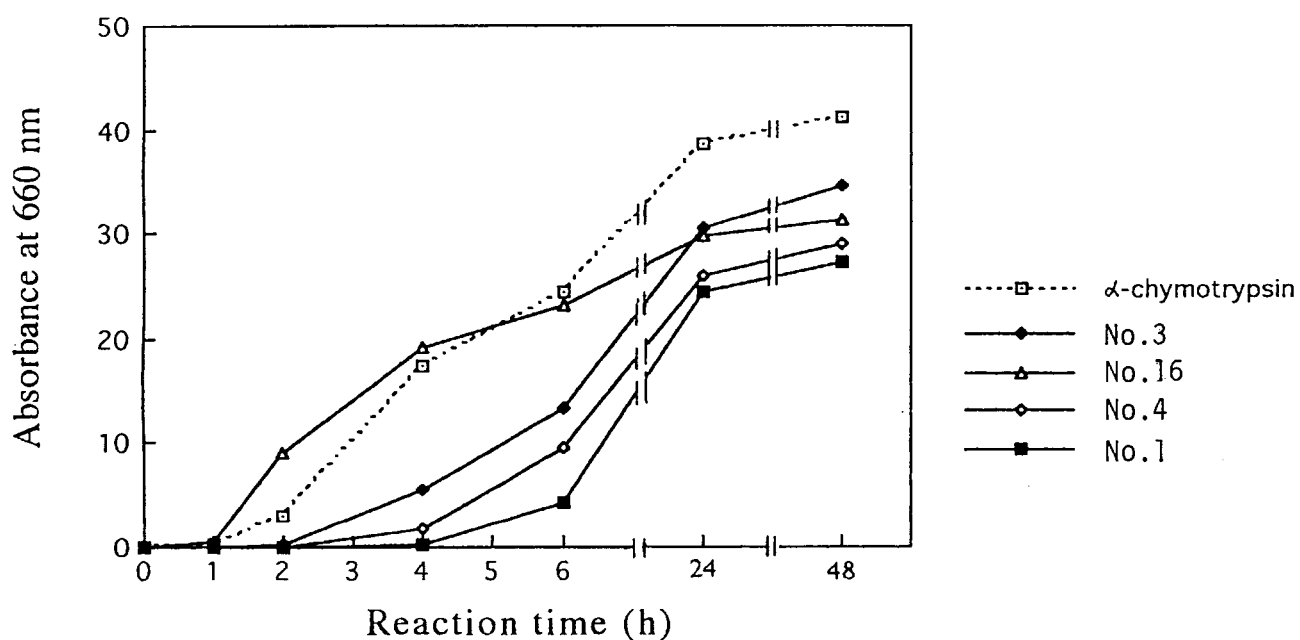


図1.大豆タンパクペプシン分解物 (SPH) に対する酵素作用 (150U/mlの系)

Action of various enzymes (100U/ml) on SPH



Action of various enzymes (75 U/ml) on SPH

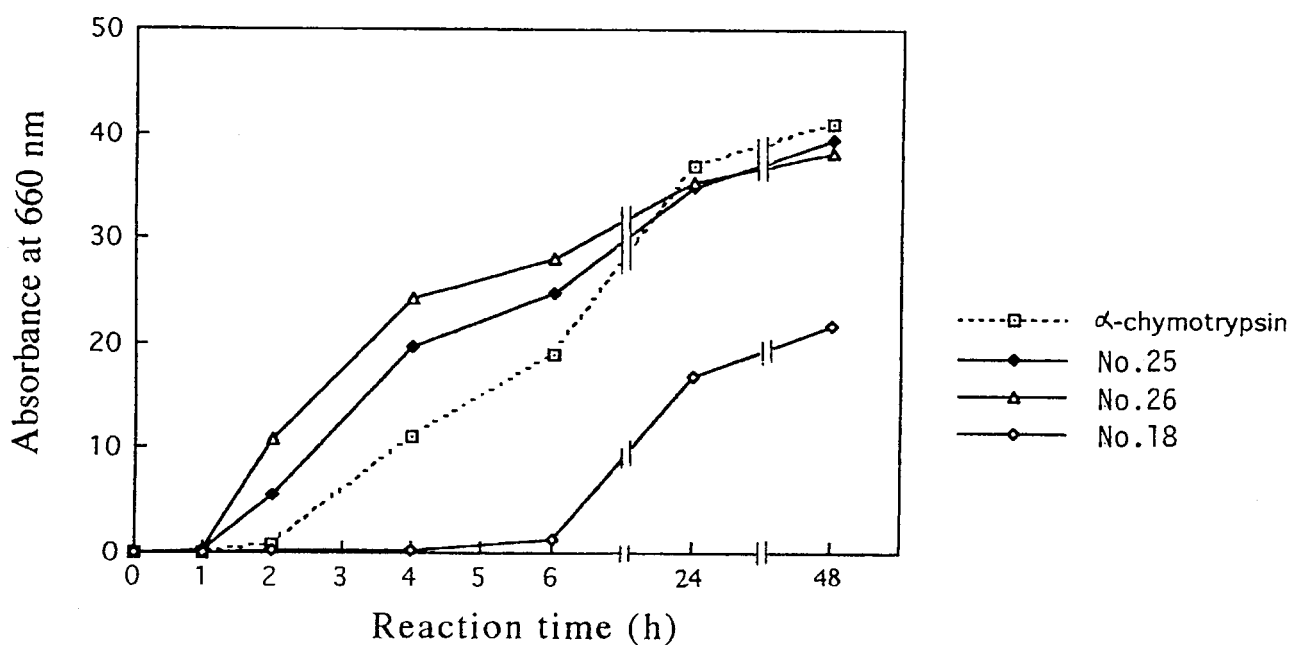
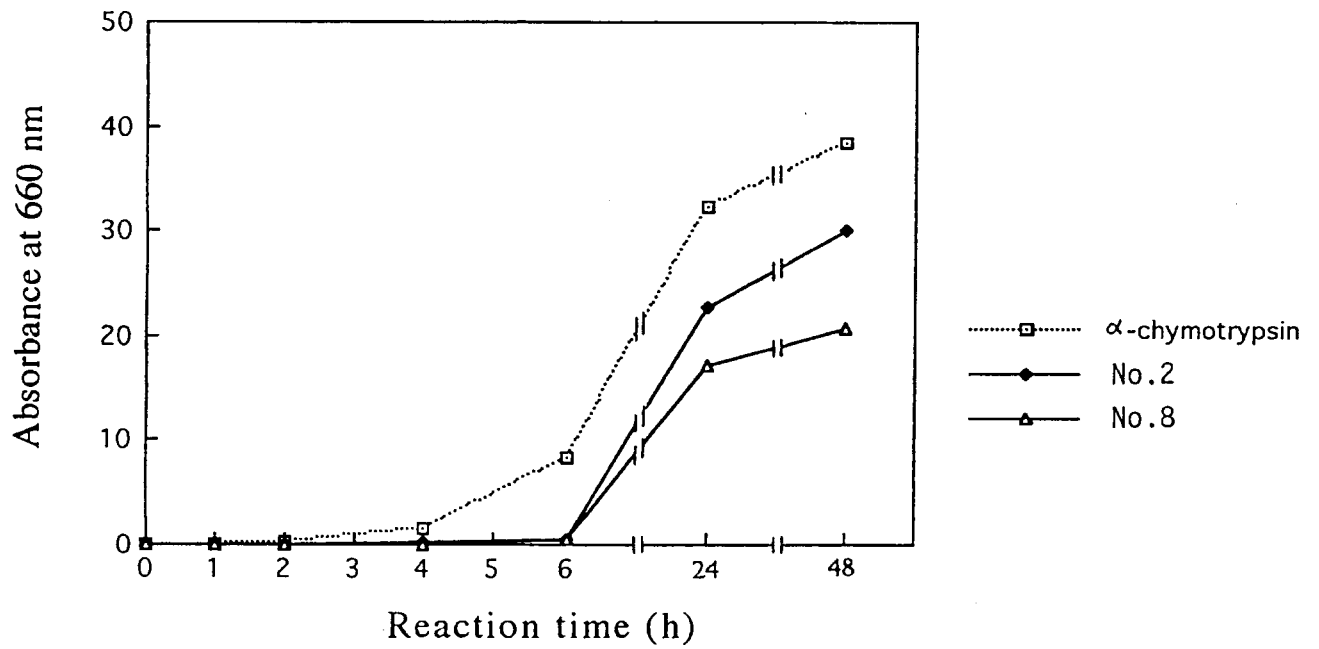


図2.大豆タンパクペプシン分解物 (SPH) に対する酵素作用 (100U/mlと75U/mlの系)

Action of various enzymes (50U/ml) on SPH



Action of various enzymes (25 U/ml) on SPH

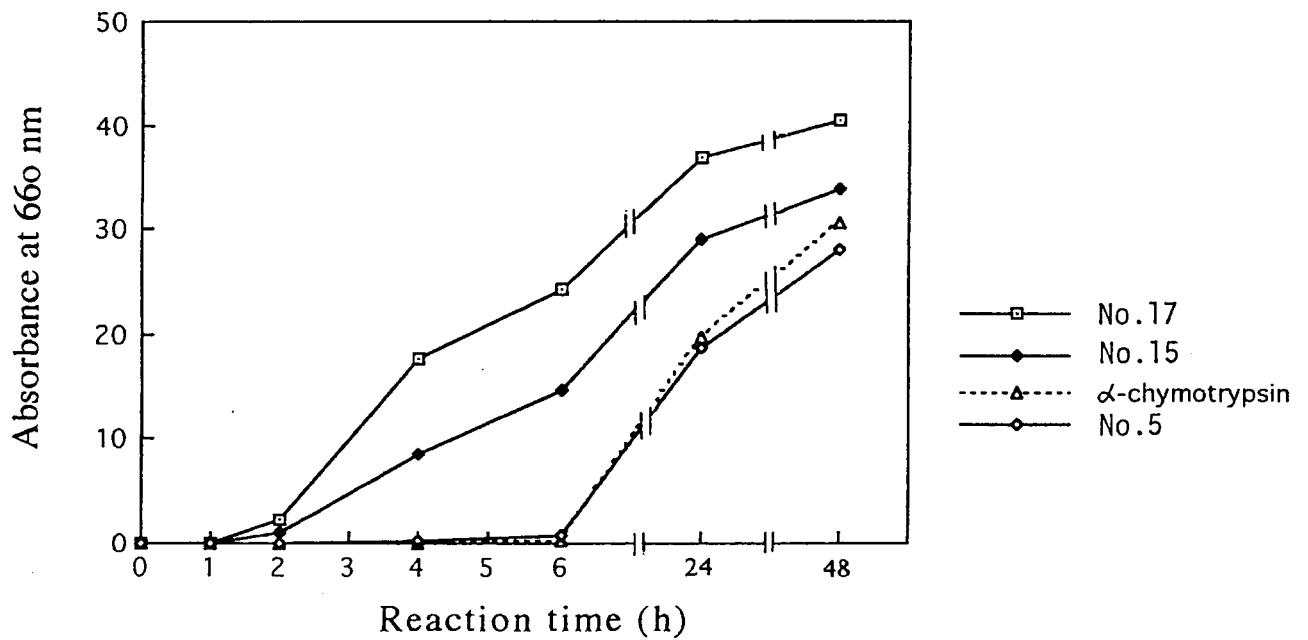


図3.大豆タンパクペプシン分解物 (SPH) に対する酵素作用 (50U/mlと25U/mlの系)

Action of various enzymes (12.5 U/ml) on SPH

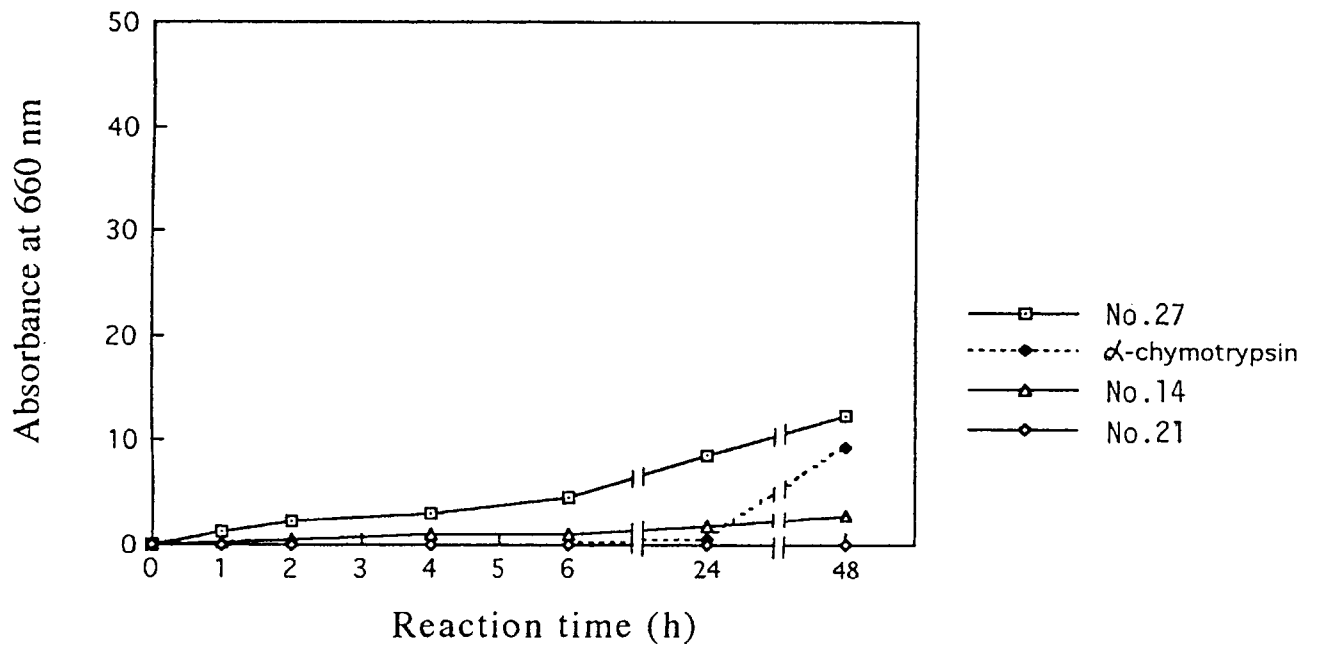


図4. 大豆タンパクペプシン分解物 (SPH) に対する酵素作用 (12.5 U/mlの系)

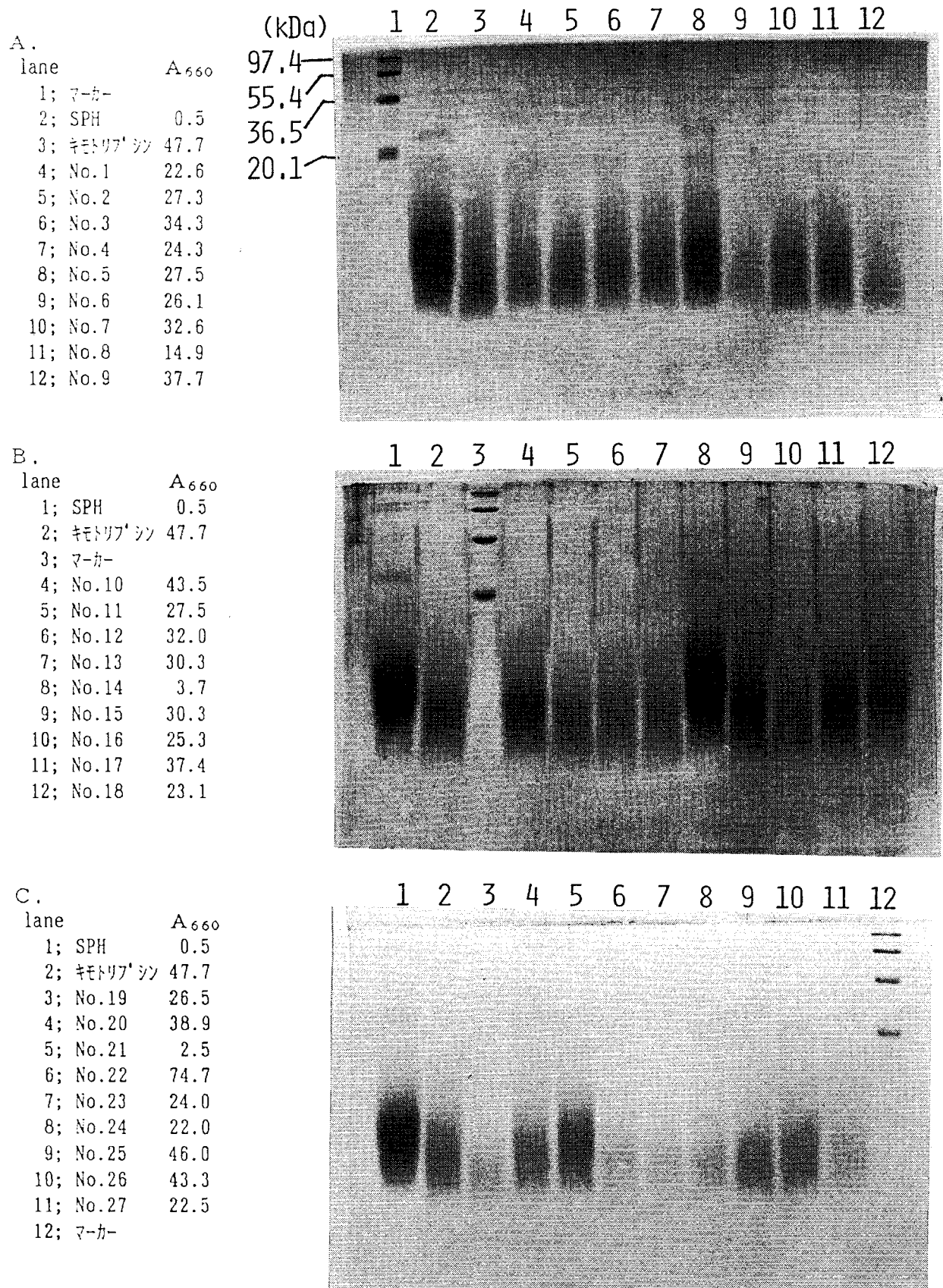


図5. SDS電気泳動法によるプラステイン反応生成物の分析

Molecular Markers : 97.4 kDa (phosphorylase b), 55.4 kDa (glutamate dehydrogenase)
36.5 kDa (lactate dehydrogenase), 20.1 kDa (trypsin inhibitor)

表1. プラステイン反応陽性菌株の生産する酵素（硫酸塩析酵素）によるプラステイン合成活性とミルクカゼイン分解力との関係（一次スクリーニング）

菌 株	A ₆₆₀ (4 hr)	P A (U/ml)	$\frac{A_{660}}{P A}$
No. 1	0.38	100	0.0038
No. 2	0.17	50	0.0034
No. 3	5.48	100	0.0548
No. 4	1.7	100	0.017
No. 5	0.29	25	0.012
No. 6	11.3	150	0.075
No. 7	13.6	150	0.090
No. 8	0.13	50	0.0026
No. 9	2.0	150	0.013
No. 10	20	150	0.13
No. 11	12.7	150	0.084
No. 12	9.1	150	0.060
No. 13	1.0	150	0.006
No. 14	1.1	0	—
No. 15	9.7	25	0.38
No. 16	16.9	75	0.225
No. 17	19.6	25	0.784
No. 18	0.23	75	0.003
No. 19	15.1	150	0.10
No. 20	10.4	150	0.069
No. 21	0	12.5	0
No. 22	17.7	150	0.118
No. 23	10.8	150	0.072
No. 24	9.1	150	0.060
No. 25	20.0	75	0.27
No. 26	24.2	75	0.32
No. 27	3.1	12.5	0.25

キモトリブシン	23.8	150	0.158
	17.4	100	0.174
	11.0	75	0.147
	1.5	50	0.030
	0.13	25	0.005
	0	12.5	0

P A：ミルクカゼイン分解活性、A₆₆₀：濁度の増加（4時間）

表2. プラステイン反応陽性菌株の生産する酵素（硫安塩析酵素）によるゼラチンの加水分解（二次スクリーニング）

菌 株	PA (U/ml)	$\frac{A_{660}}{PA}$	ゼラチン [-NH ₂] (μ g/ml)
No. 1	235	0.0038	192
No. 2	125	0.0034	160
No. 3	251	0.0548	151
No. 4	228	0.017	202
No. 5	66	0.012	92
No. 6	678	0.075	233
No. 7	414	0.090	155
No. 8	94	0.0026	266
No. 9	9550	0.013	198
No. 10	300	0.13	90
No. 11	506	0.084	158
No. 12	365	0.060	152
No. 13	769	0.006	170
No. 14	0	—	30
No. 15	68	0.38	63
No. 16	222	0.225	257
No. 17	50	0.784	79
No. 18	159	0.003	109
No. 19	483	0.10	188
No. 20	374	0.069	91
No. 21	30	0	155
No. 22	760	0.118	89
No. 23	1262	0.072	186
No. 24	630	0.060	232
No. 25	600	0.27	213
No. 26	184	0.32	220
No. 27	23	0.25	138
キモトリブシン	2100		52
	75	0.147	

PA：ミルクカゼイン分解活性、A₆₆₀：濁度の増加（4時間）
ゼラチン [-NH₂]：生成したアミノ基量（ μ g/ml）

表3. ミルクカゼイン分解活性に対するゼラチン分解力とブラスティン合成活性との関係（二次スクリーニング）

菌 株	$\frac{A_{660}}{PA}$	$\frac{\text{ゼラチン } [-NH_2]}{PA}$
No. 1	0.0038	0.817
No. 2	0.0034	1.28
No. 3	0.0548	0.601
No. 4	0.017	0.885
No. 5	0.012	1.39
No. 6	0.075	0.344
No. 7	0.090	0.374
No. 8	0.0026	2.83
No. 9	0.013	0.021
No. 10	0.13	0.30
No. 11	0.084	0.312
No. 12	0.060	0.416
No. 13	0.006	0.221
No. 14	—	—
No. 15	0.38	0.926
No. 16	0.225	1.15
No. 17	0.784	1.58
No. 18	0.003	0.685
No. 19	0.10	0.390
No. 20	0.069	0.243
No. 21	0	5.16
No. 22	0.118	0.117
No. 23	0.072	0.147
No. 24	0.060	0.368
No. 25	0.27	0.355
No. 26	0.32	1.19
No. 27	0.25	5.99
キモトリブシン	0.147	0.025

PA：ミルクカゼイン分解活性、 A_{660} ：濁度の増加（4時間）
 ゼラチン $[-NH_2]$ ：生成したアミノ基量（ $\mu g/ml$ ）

表4. プラスティン反応陽性菌株の生産する酵素（硫安塩析酵素）によるグリアジンの加水分解（二次スクリーニング）

菌 株	PA (U/ml)	$\frac{A_{660}}{PA}$	グリアジン [—NH ₂] (μ g/ml)
No. 1	235	0.0038	254
No. 2	125	0.0034	219
No. 3	251	0.0548	167
No. 4	228	0.017	265
No. 5	66	0.012	75
No. 6	678	0.075	247
No. 7	414	0.090	212
No. 8	94	0.0026	357
No. 9	9550	0.013	124
No. 10	300	0.13	90
No. 11	506	0.084	114
No. 12	365	0.060	179
No. 13	769	0.006	198
No. 14	0	—	8
No. 15	68	0.38	62
No. 16	222	0.225	202
No. 17	50	0.784	84
No. 18	159	0.003	150
No. 19	483	0.10	77
No. 20	374	0.069	115
No. 21	30	0	129
No. 22	760	0.118	93
No. 23	1262	0.072	211
No. 24	630	0.060	276
No. 25	600	0.27	185
No. 26	184	0.32	181
No. 27	23	0.25	95
キモトリブシン	2100		32
	75	0.147	

PA：ミルクカゼイン分解活性、A₆₆₀：濁度の増加（4時間）
グリアジン [—NH₂]：生成したアミノ基量（ μ g/ml）

表5. ミルクカゼイン分解活性に対するグリアジン分解力とプラス
テイン合成活性との関係（二次スクリーニング）

菌 株	$\frac{A_{660}}{PA}$	$\frac{\text{グリアジン} [-NH_2]}{PA}$
No. 1	0.0038	1.08
No. 2	0.0034	1.75
No. 3	0.0548	0.665
No. 4	0.017	1.16
No. 5	0.012	1.14
No. 6	0.075	0.364
No. 7	0.090	0.512
No. 8	0.0026	3.80
No. 9	0.013	0.013
No. 10	0.13	0.30
No. 11	0.084	0.225
No. 12	0.060	0.490
No. 13	0.006	0.257
No. 14	—	—
No. 15	0.38	0.911
No. 16	0.225	0.910
No. 17	0.784	1.68
No. 18	0.003	0.943
No. 19	0.10	0.159
No. 20	0.069	0.307
No. 21	0	4.3
No. 22	0.118	0.122
No. 23	0.072	0.167
No. 24	0.060	0.438
No. 25	0.27	0.308
No. 26	0.32	0.984
No. 27	0.25	4.13

キモトリブシン	0.147	0.015

PA：ミルクカゼイン分解活性、 A_{660} ：濁度の増加（4時間）
グリアジン $[-NH_2]$ ：生成したアミノ基量（ $\mu g/ml$ ）

表6. プラスティン反応陽性菌株の生産する酵素（硫酸塩析酵素）によるセリシンの加水分解（二次スクリーニング）

菌 株	PA (U/ml)	$\frac{A_{660}}{PA}$	セリシン $[-NH_2]$ ($\mu g/ml$)
No. 1	235	0.0038	266
No. 2	125	0.0034	203
No. 3	251	0.0548	193
No. 4	228	0.017	271
No. 5	66	0.012	45
No. 6	678	0.075	311
No. 7	414	0.090	220
No. 8	94	0.0026	309
No. 9	9550	0.013	163
No. 10	300	0.13	100
No. 11	506	0.084	218
No. 12	365	0.060	166
No. 13	769	0.006	157
No. 14	0	—	38
No. 15	68	0.38	87
No. 16	222	0.225	218
No. 17	50	0.784	108
No. 18	159	0.003	180
No. 19	483	0.10	209
No. 20	374	0.069	132
No. 21	30	0	97
No. 22	760	0.118	69
No. 23	1262	0.072	256
No. 24	630	0.060	342
No. 25	600	0.27	160
No. 26	184	0.32	208
No. 27	23	0.25	144
キモトリブシン	2100		32
	75	0.147	

PA：ミルクカゼイン分解活性、 A_{660} ：濁度の増加（4時間）
セリシン $[-NH_2]$ ：生成したアミノ基量（ $\mu g/ml$ ）

表7. ミルクカゼイン分解活性に対するセリシン分解力とプラステイン合成活性との関係（二次スクリーニング）

菌 株	$\frac{A_{660}}{PA}$	$\frac{\text{セリシン} [-NH_2]}{PA}$
No. 1	0.0038	1.13
No. 2	0.0034	1.62
No. 3	0.0548	0.769
No. 4	0.017	1.19
No. 5	0.012	0.682
No. 6	0.075	0.459
No. 7	0.090	0.531
No. 8	0.0026	3.29
No. 9	0.013	0.017
No. 10	0.13	0.333
No. 11	0.084	0.430
No. 12	0.060	0.455
No. 13	0.006	0.204
No. 14	—	—
No. 15	0.38	1.28
No. 16	0.225	0.982
No. 17	0.784	2.16
No. 18	0.003	1.13
No. 19	0.10	0.432
No. 20	0.069	0.353
No. 21	0	3.23
No. 22	0.118	0.091
No. 23	0.072	0.203
No. 24	0.060	0.543
No. 25	0.27	0.266
No. 26	0.32	1.13
No. 27	0.25	6.26
キモトリプシン	0.147	0.015

PA：ミルクカゼイン分解活性、 A_{660} ：濁度の増加（4時間）
セリシン $[-NH_2]$ ：生成したアミノ基量（ $\mu g/ml$ ）

2. 5 非天然アミノ酸のペプチドへの導入方法の研究開発

研究機関 財団法人蛋白質研究奨励会

研究者名 芝 哲 夫
豊 島 正
山 本 敏 弘
高 田 克 巳

1. はじめに

本プロジェクトの目的は重要な機能を有する非天然アミノ酸を含む機能性材料を、分子レベルでの精密な機能設計が可能なバイオ材料であるペプチドを用いて開発することにある。

例えば、分子間相互作用等の機能を有するペプチドの中にはGla含有ペプチド、糖ペプチド等があり、酸性、塩基性条件下で不安定なものが多く見られる。これら不安定なペプチドの一般的合成法を開発することは本プロジェクトを推進するために重要な課題である。

本研究では、不安定な構造を有するペプチドを自由に合成でき、このプロジェクト全体に広く応用できる一般的な方法を開発することを目的とし、図1に示すような計画をたてた。すなわち保護した不安定なアミノ酸の合成を行い、ペプチド合成を行った後に不安定なアミノ酸が分解または修飾を受けることなくその保護基を脱離する方法を開発する方法である。そのために今年度は保護アミノ酸の合成法、ならびにそれを用いての脱保護条件検討を行った。

不安定なペプチドとしては糖結合ペプチドを取り上げ、アリルオキシカルボニル、フェナシル、*t*-ブトキシカルボニル基等比較的温和な条件で除去できる保護基を選択し、不安定な化学構造を有するペプチドの合成に使用可能な保護アミノ酸の合成を行った。糖鎖の水酸基をアリルオキシカルボニル基、アミノ基を*t*-ブトキシカルボニル基、カルボキシ基をフェナシル基で保護した糖結合アミノ酸誘導体を合成し、この誘導体を用いて、亜鉛-酢酸、トリフルオロ酢酸により脱保護を行い、アリルオキシカルボニル基を分解することなくフェナシル、*t*-ブトキシカルボニル基を除去することができた。本年度に得られた知見よりこの化合物はペプチド合成への応用が可能で有用なシントーンとなり得ると考えられる。

2. 研究内容及び成果

有用な機能を有する非天然アミノ酸を含むペプチドはしばしば不安定な場合があり、その様なペプチドを合成する場合には温和な条件下で最終脱保護し不安定なペプチドを分解することなく単離することが必要である。本研究ではその一つの例として酸性、塩基性条件下で不安定な糖ペプチドをとりあげ、その一般的な合成法を開発するために本年度は糖鎖結合アミノ酸残基の保護誘導体の合成を行った。

糖鎖としては糖蛋白質、糖脂質の非還元末端に存在するシアル酸(N-アセチルノイラミン酸)を用いアミノ酸にはアスパラギン酸を選択し両者をスペーサーを介して結合することによりモデル化合物としての糖鎖結合アミノ酸の合成を行った。

まず、N-アセチルノイラミン酸をスペーサーを介してグリコシド結合によりアスパラギン酸と結合させるために、スペーサーと結合するためのグリコシルドナーの合成を図2に示すように行った。まずN-アセチルノイラミン酸(1)をピリジン中、無水酢酸を反応させることにより完全アセチル体に導いた。ついでジアゾメタンと反応させメチルエステル体(2)を得た。これに塩化水素を塩化アセチル中作用させることにより、塩化物(3)に変換し、精製することなく直接チオ酢酸のカリウム塩を働かせ、2位S-アセチル体を得た。次にナトリウムメチラートによりS-アセチル基のみを選択的に除去しヨウ化メチルを反応させた。この際、O-アセチル基の一部が脱離したためメチル化後、再アセチル化することにより、収率を向上させることができた。

つぎに2位Sメチル体を用いて、スペーサー部との結合を行った。スペーサー部としてはエタノールアミン誘導体(10)を用いた。これは図4に示すようにエタノールアミンをジ-tert-ブチルジカルボナートを用いて、tert-ブトキシカルボニル化することにより得た。Sメチル体をDMTST(ジメチルメチルチオスルホニウムトリフルオロメタンスルホナート)により活性化し化合物10と反応しグリコシド結合を形成させた。ここで2位の立体配置の異なる異性体の存在比(α : β)はNMRより約3:1であることが判明した。しかし、この段階では薄層クロマトグラフィーにより α 、 β 体が分離しなかったため混合物のまま次の反応に用いた。

次に図3に示すように、化合物(6)の保護基をアリル系の保護基に変換するため、アセチル基、およびメチルエステルを除去した。続いてカルボン酸をセシウム塩に変換した後、アリルブロミドを反応

しアリルエステルに変換後、遊離の水酸基を完全アリルオキシカルボニル化し化合物(8)を得た。この段階で薄層クロマトグラフィーにより α 、 β 体が分離したのでシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離し α 体を用いて次の反応を行った。

糖鎖と結合するためのアスパラギン酸誘導体を図4に示すように合成した。N- α -トキシカルボニルアスパラギン酸 β - α -トチルエステルから出発してまずフェナシルブロミドと反応させフェナシルエステルに導いた。このものをトリフルオロ酢酸により処理し、 α -トキシカルボニル基と α -トチルエステルを共に切断した。つぎに遊離のアミノ基を再び α -トキシカルボニル化し化合物(11)を得た。

次にアスパラギン酸誘導体と結合するため化合物(8)をトリフルオロ酢酸により α -トキシカルボニル基を切断し、アミノ基を遊離にした。これと化合物(11)とを1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを用いて縮合した。

このようにして得た化合物(9)のグリコシド結合の立体配置を確認するため糖鎖部分のを遊離にし α 結合のみを切断する酵素・ノイラミニダーゼにより切断反応を行うことにした(図5)。アリルオキシカルボニル基およびアリル基をナトリウムメトキシドおよび水酸化ナトリウム処理によりそれぞれ除去し、得られた遊離の化合物(12)をノイラミニダーゼにより処理するとグリコシド結合が切断され化合物13、14が得られ、グリコシド結合は α 結合であることが確かめられた。

このようにして得た化合物(9)をトリフルオロ酢酸により α -トキシカルボニル基を切断しアミノ基遊離の化合物(15)へ変換できた。また、酢酸中-金属亜鉛で処理することにより、カルボン酸遊離の化合物(16)へ導いた(図6)。これらの化合物(15)、(16)を用いると、アミノ基側へもカルボキシル側へもペプチド鎖を延長できるため非常に有用な合成中間体となり得ることが明らかとなった。

今後この誘導体を用いることにより最終脱保護をパラジウム錯体を用いて行う一般法を開発するため一歩前進したと思われる。

3. まとめ

本研究では、不安定な構造を有するペプチドを自由に合成でき、このプロジェクト全体に広く応用できる一般的な方法を開発することを目的とし、本年度はまず糖ペプチドを取り上げ、糖鎖の水酸基をパラジウム錯体により中性条件で脱保護できるアリルオキシカルボニル基を導入したアミノ酸誘導体を合成することができた。この誘導体はアリルオキシカルボニル、フェナシル、*t*-ブトキシカルボニル基により糖鎖の水酸基、カルボキシル基、アミノ基を保護してあるので、それぞれの保護基を選択的に脱保護できるためペプチド合成には非常に有用なものである。

今後、この誘導体を用いて不安定なペプチドを合成する方法を開発していく予定である。

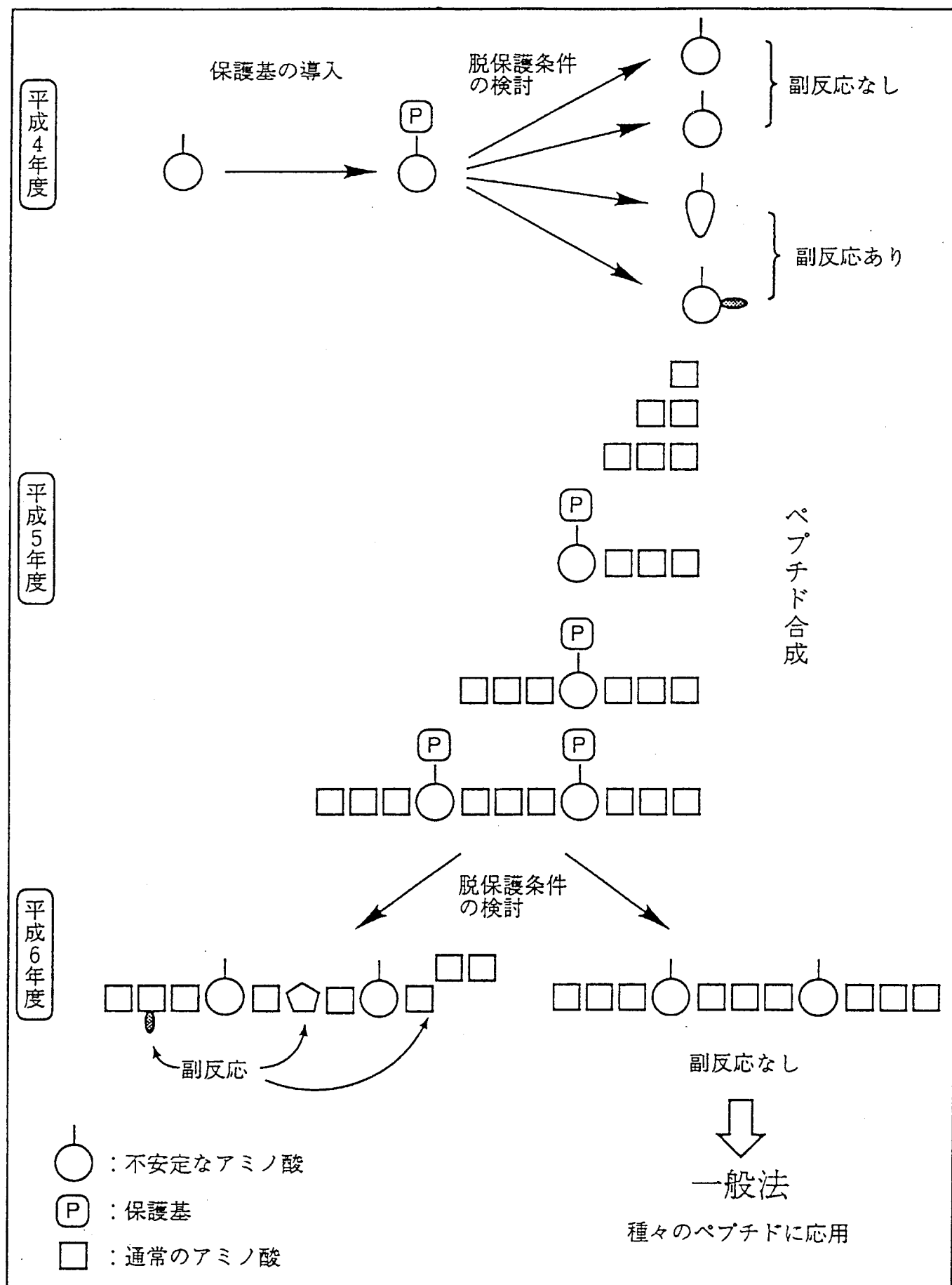
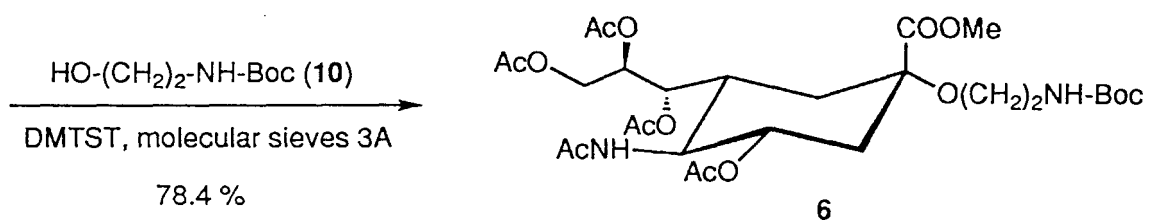
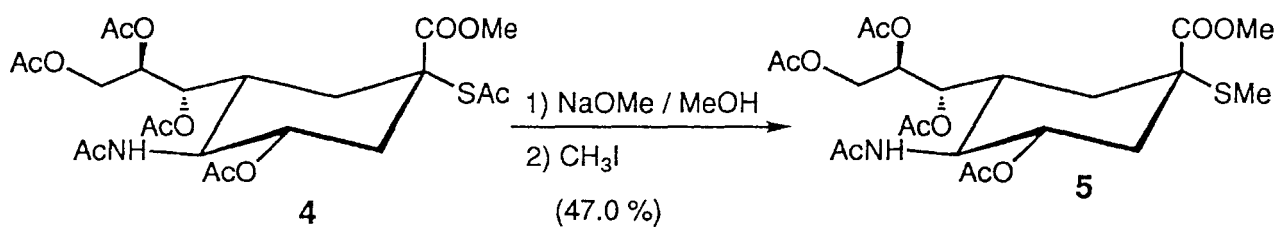
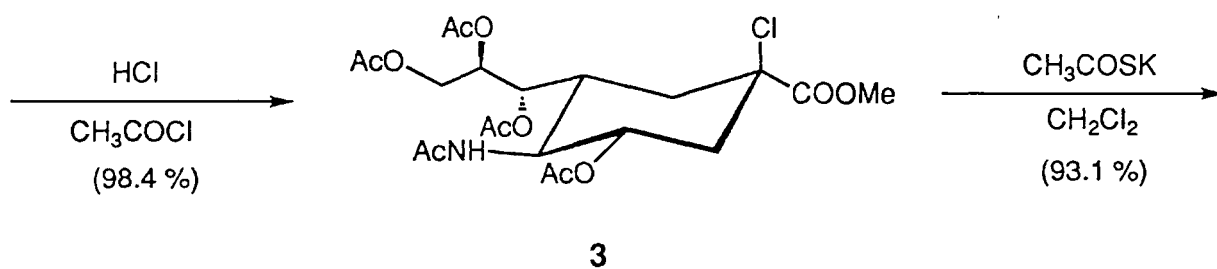
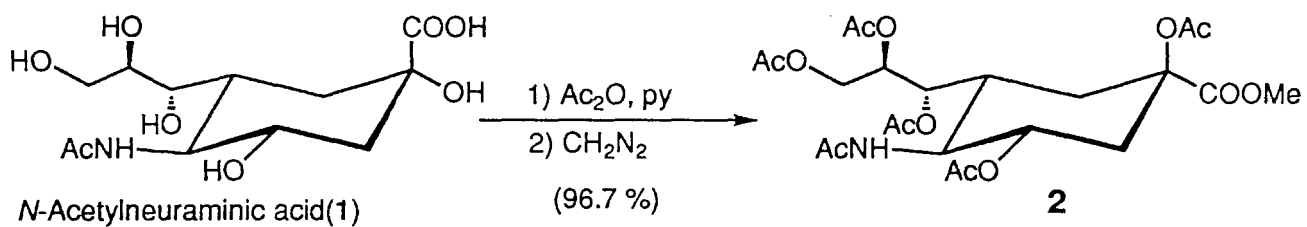
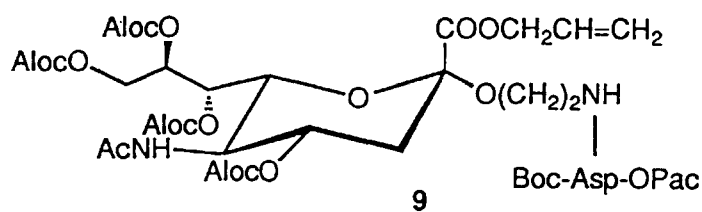
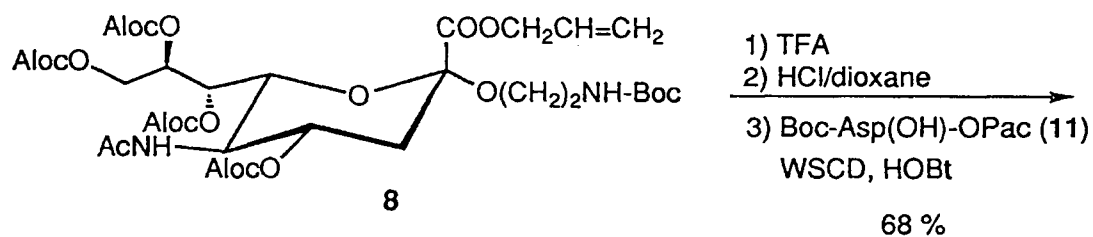
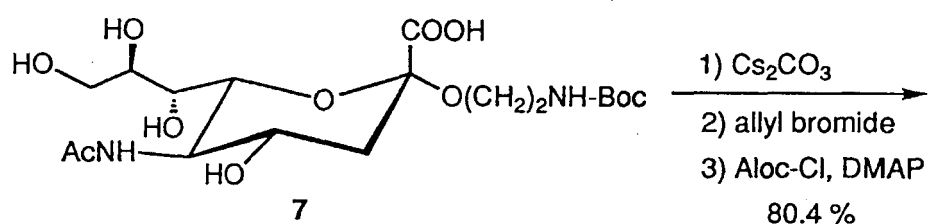
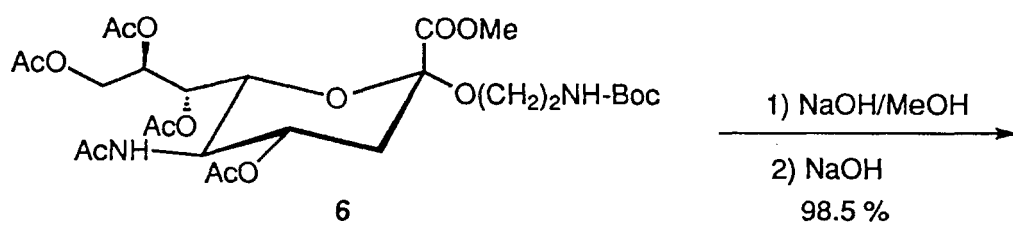
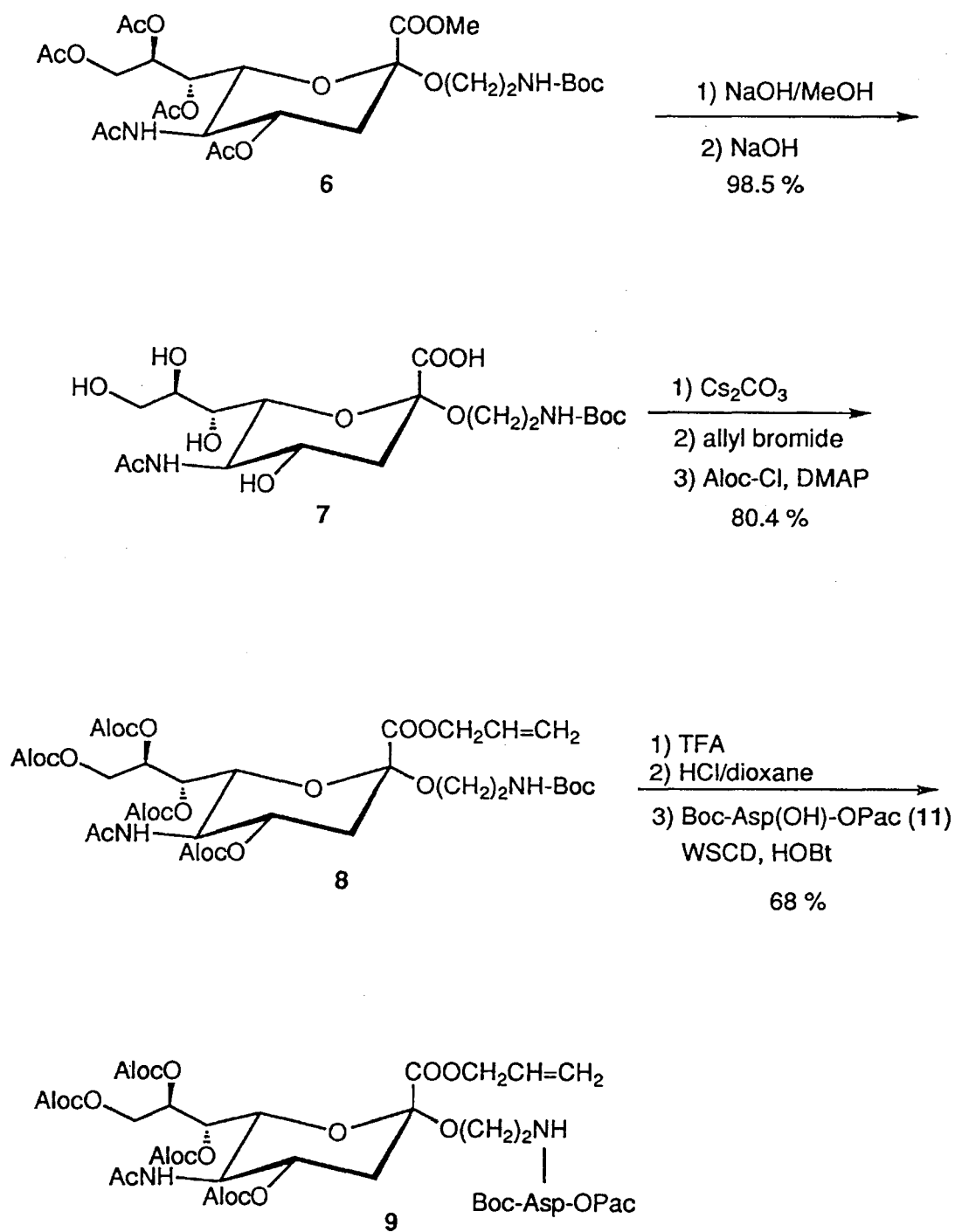
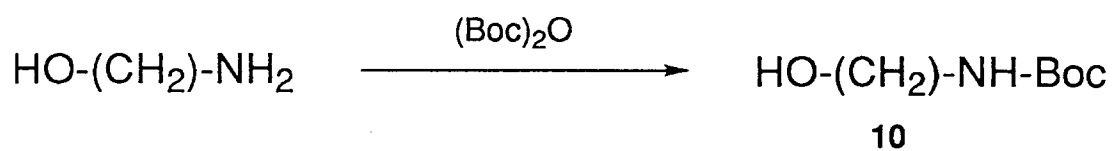


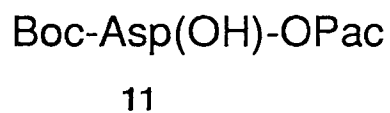
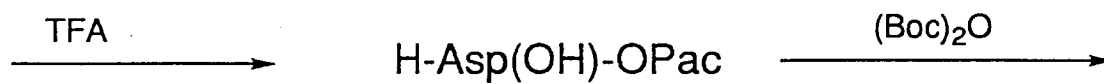
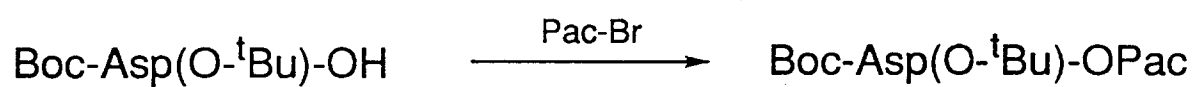
図 1






 3





☒ 4

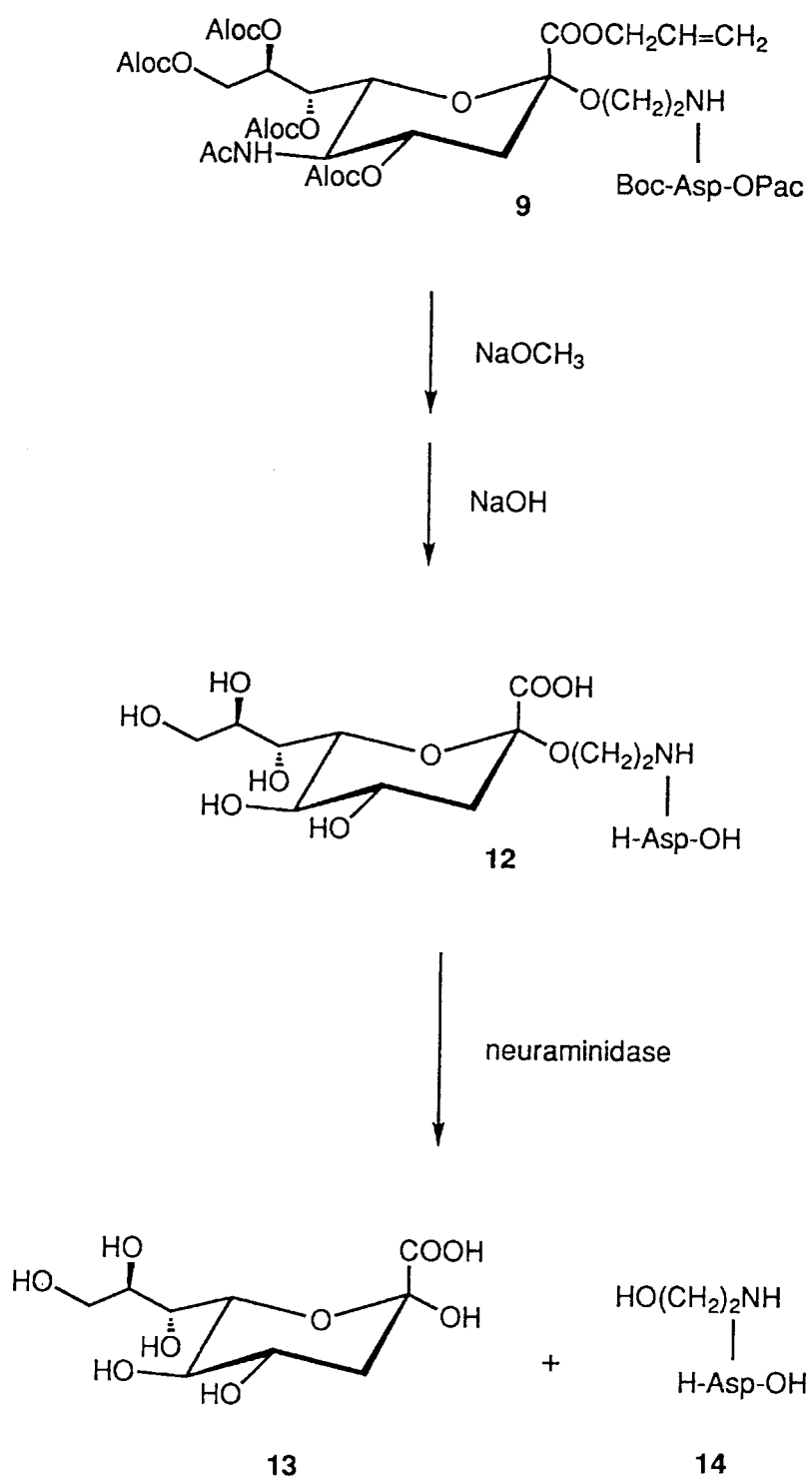


图 5

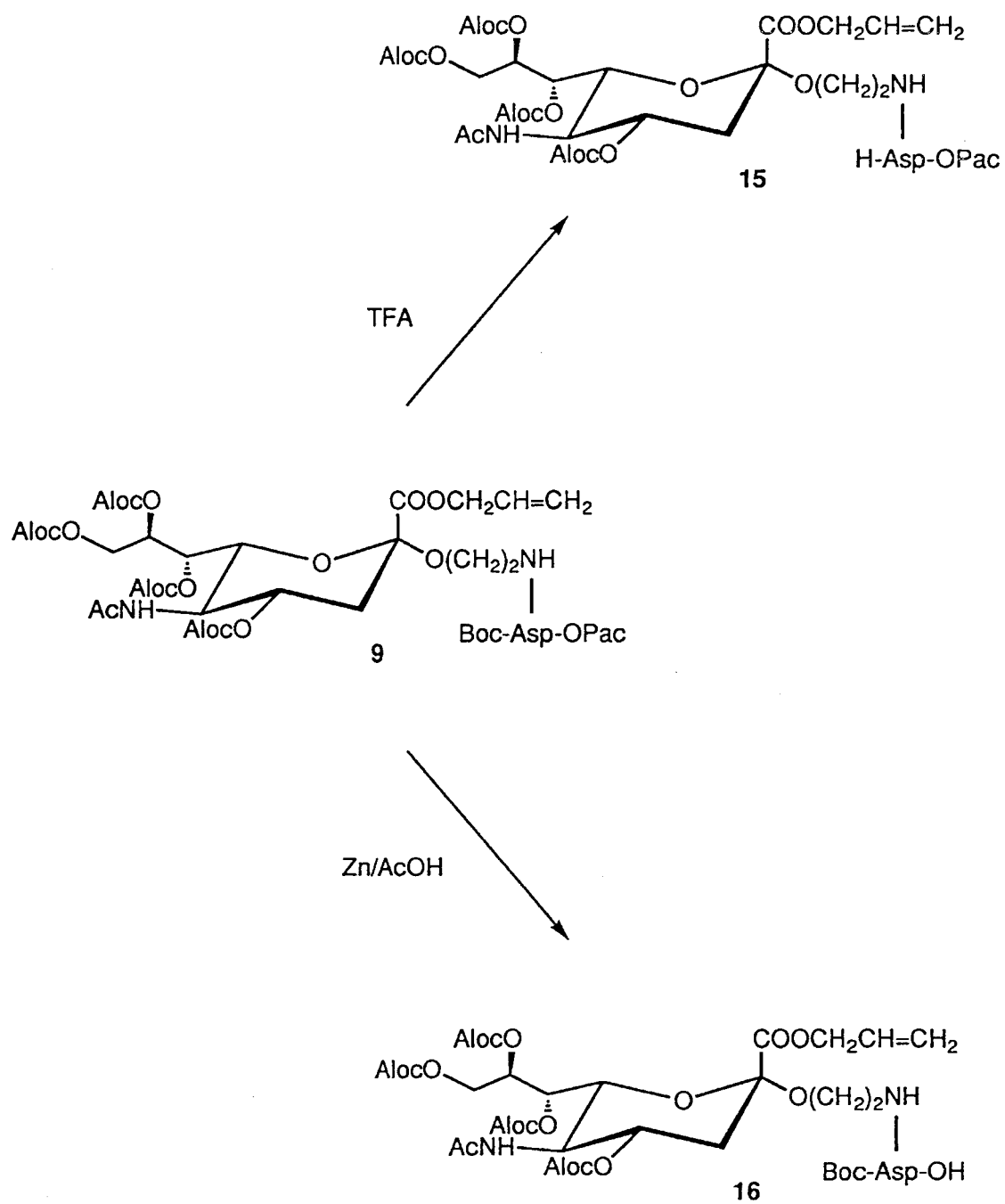
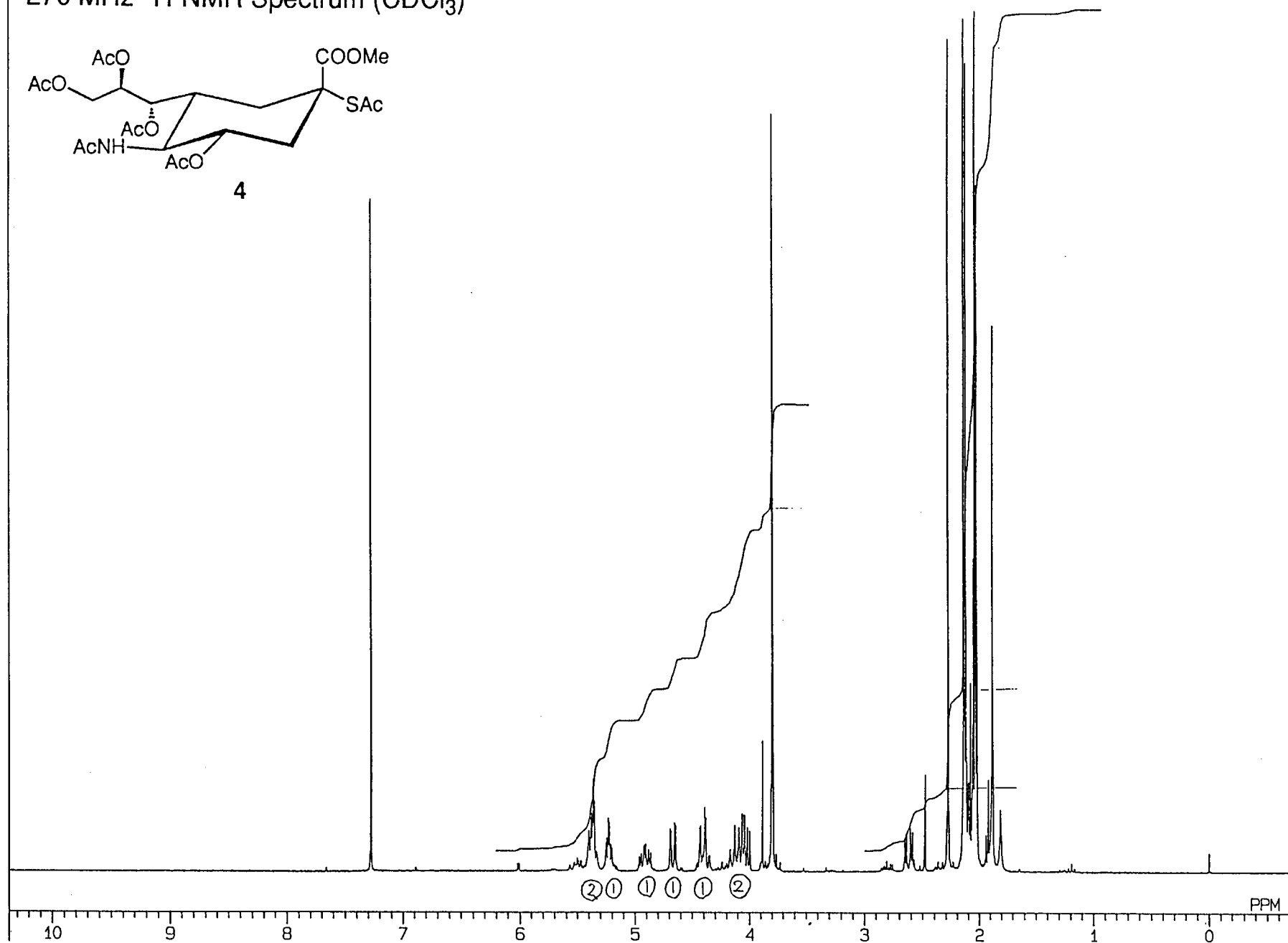
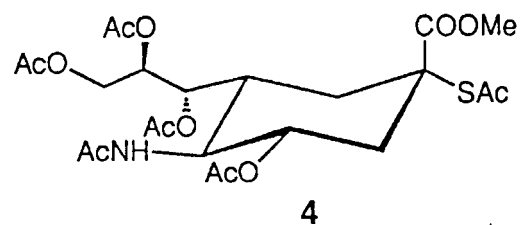
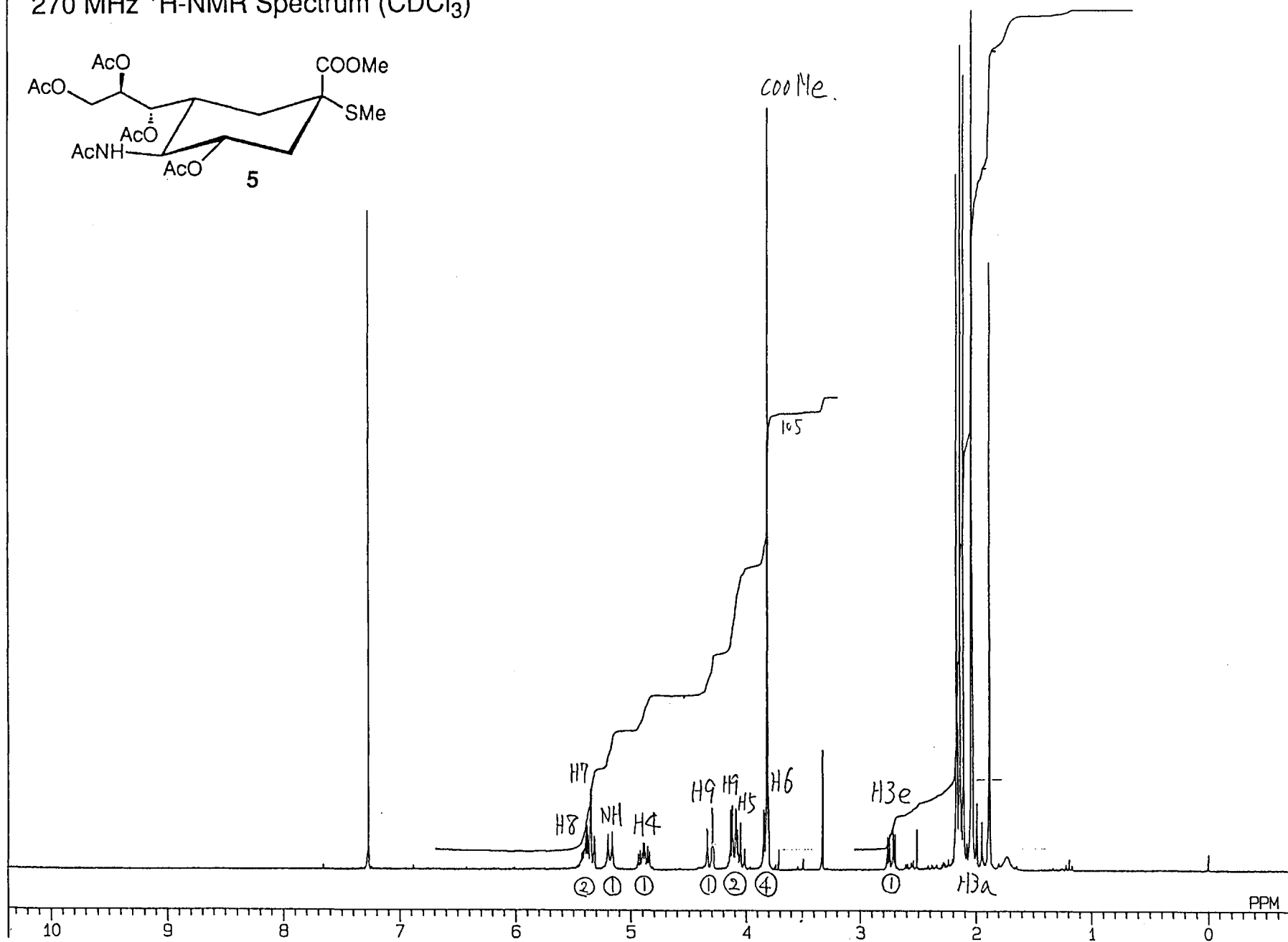
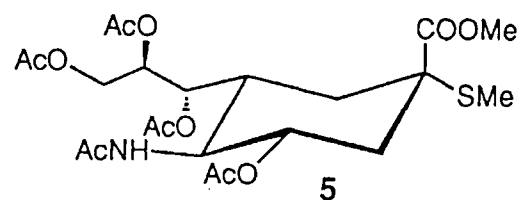


Fig 6

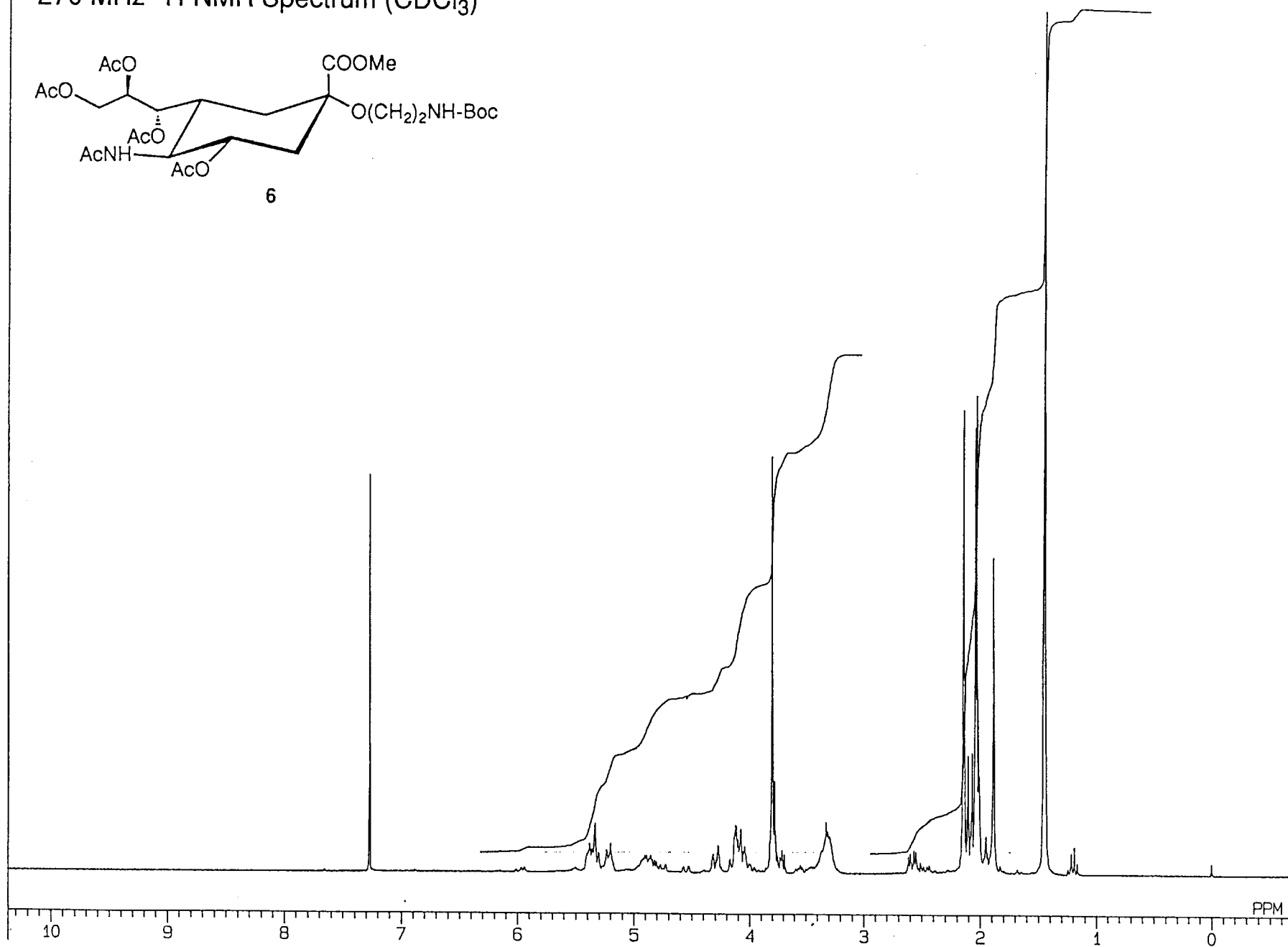
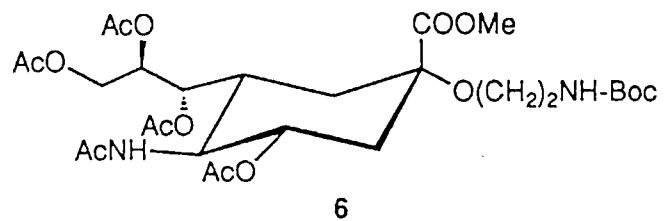
270 MHz ^1H -NMR Spectrum (CDCl_3)



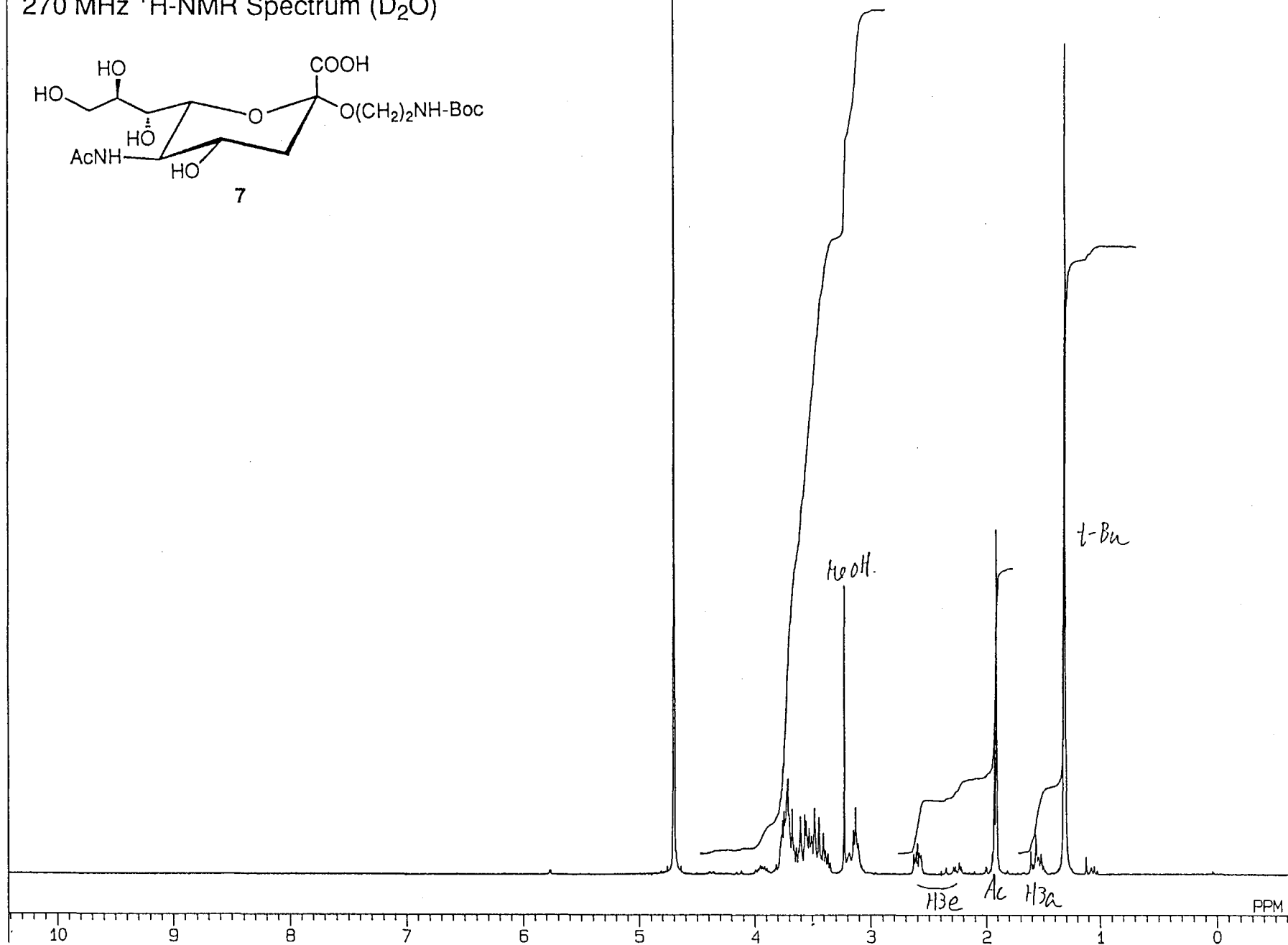
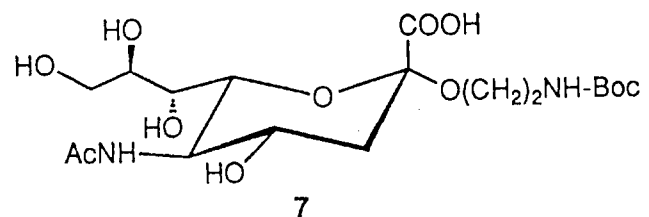
270 MHz ^1H -NMR Spectrum (CDCl_3)



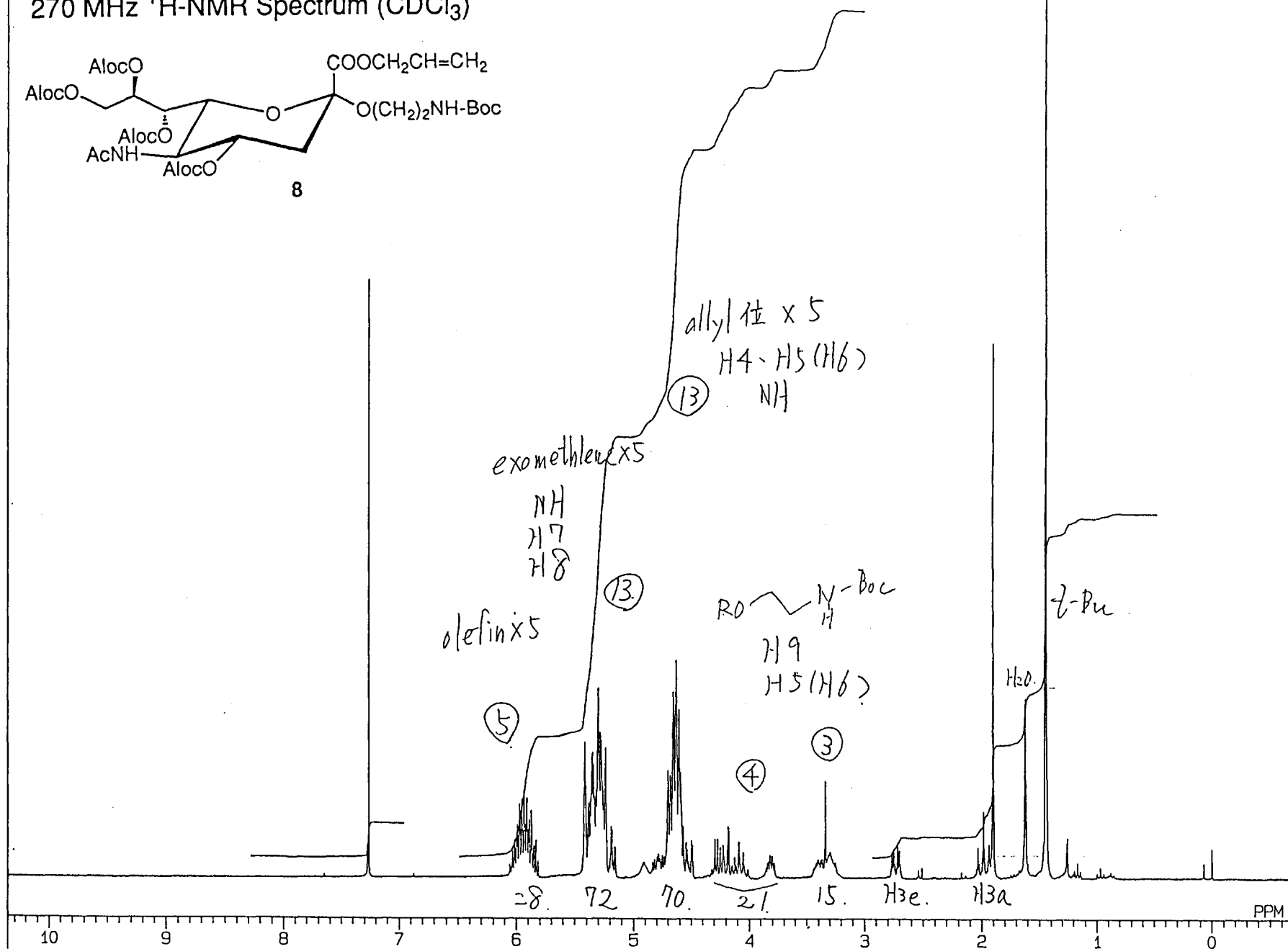
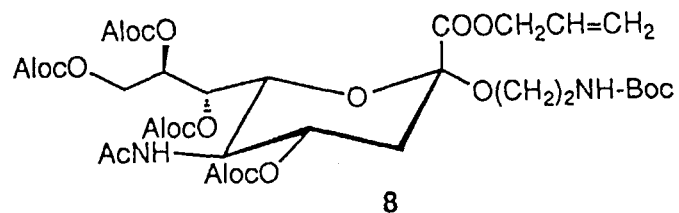
270 MHz ^1H -NMR Spectrum (CDCl_3)



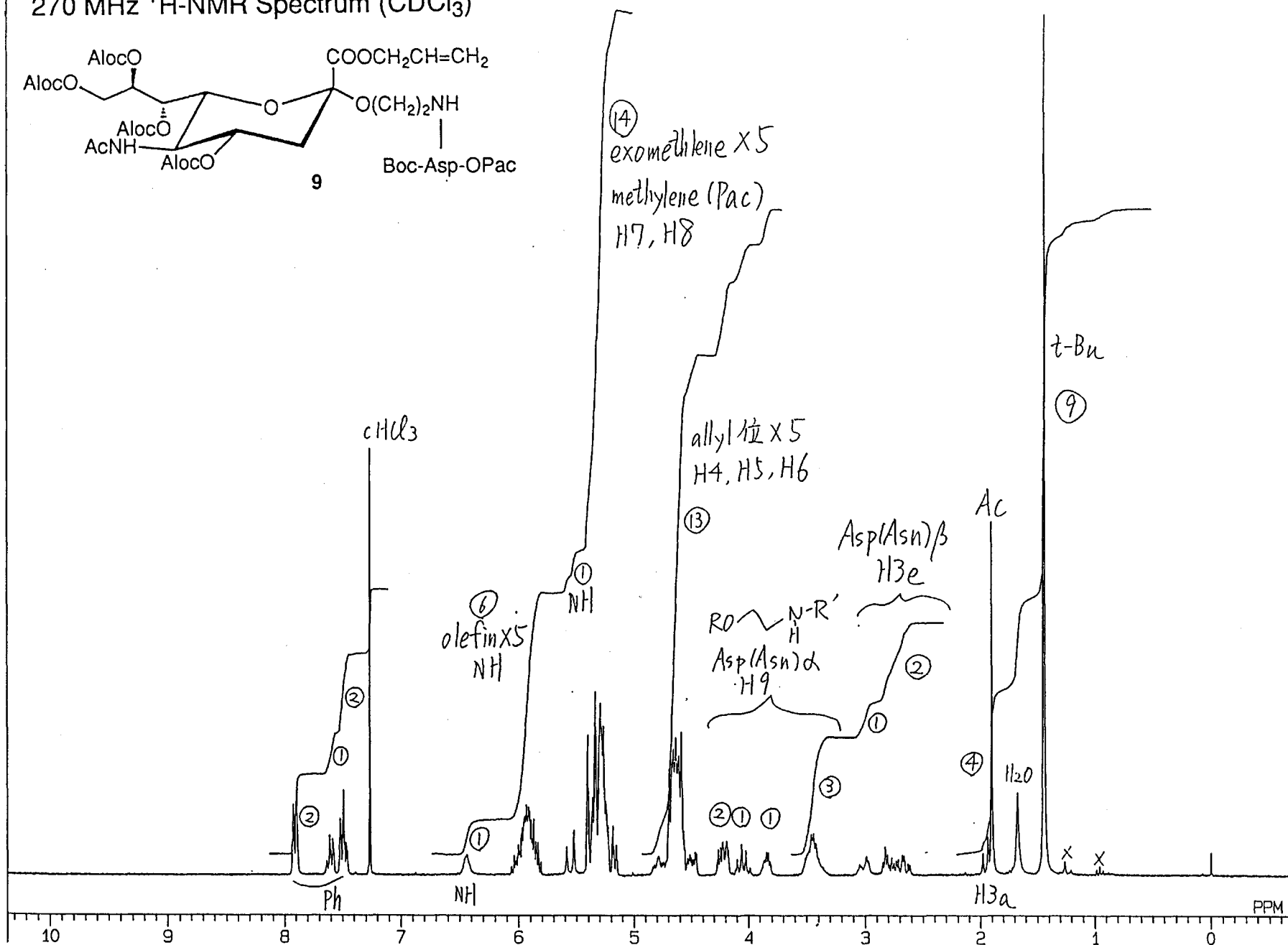
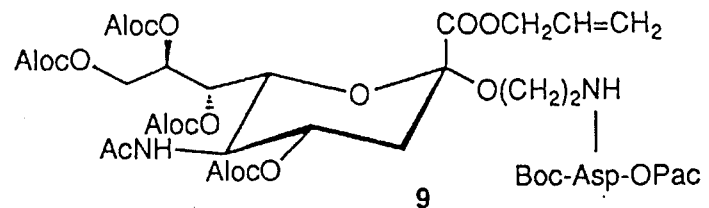
270 MHz ^1H -NMR Spectrum (D_2O)



270 MHz ^1H -NMR Spectrum (CDCl_3)



270 MHz ^1H -NMR Spectrum (CDCl_3)



270 MHz ^1H -NMR Spectrum (CDCl_3)

Boc-Asp(OH)-OPac

11

CHCl_3

186

3H

2H

5H

NH

①

44

Pac- CH_2

①

α

β

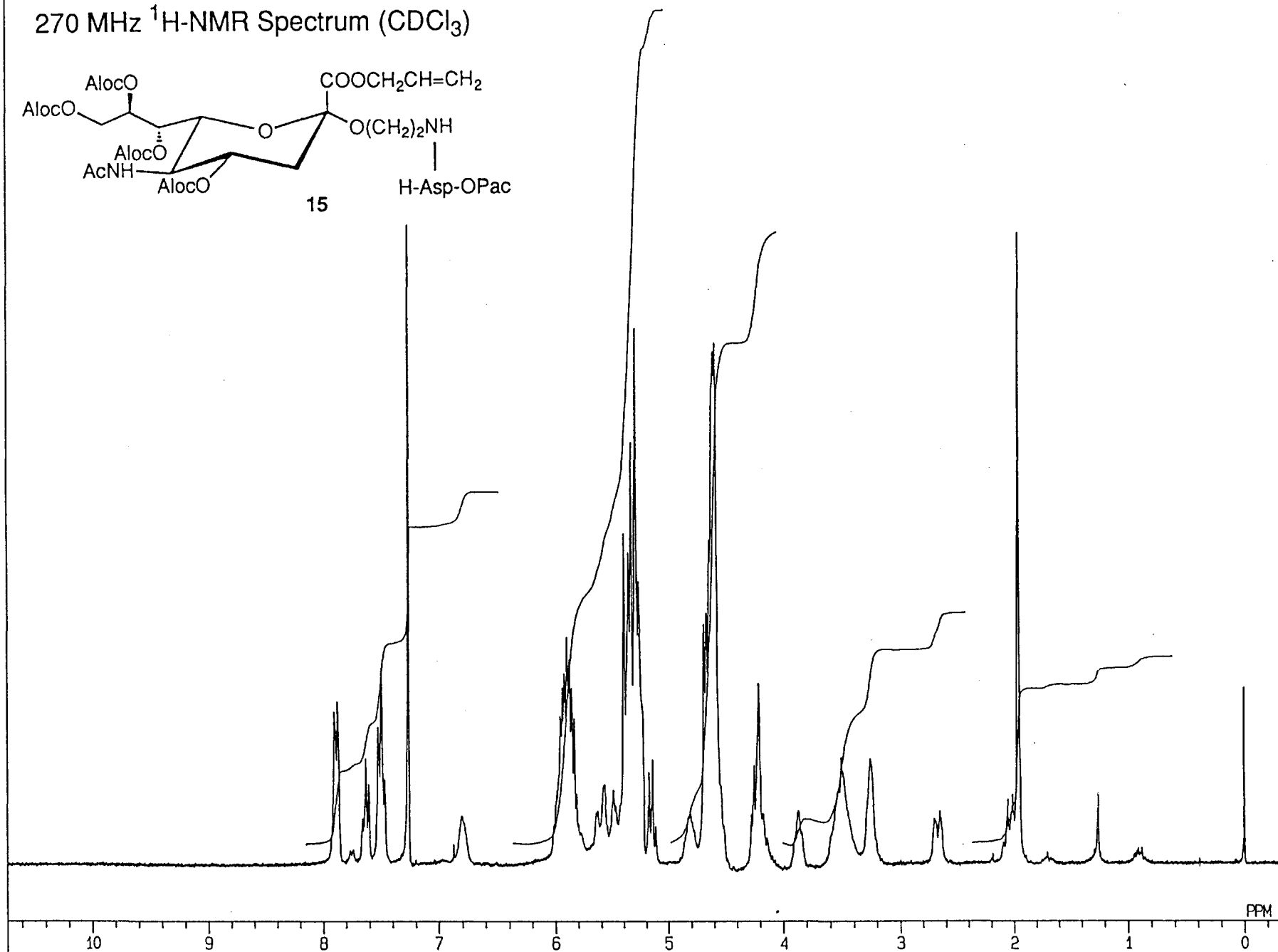
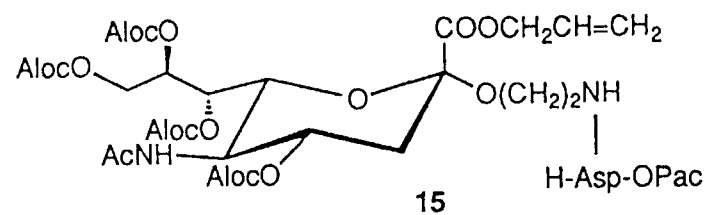
②

44

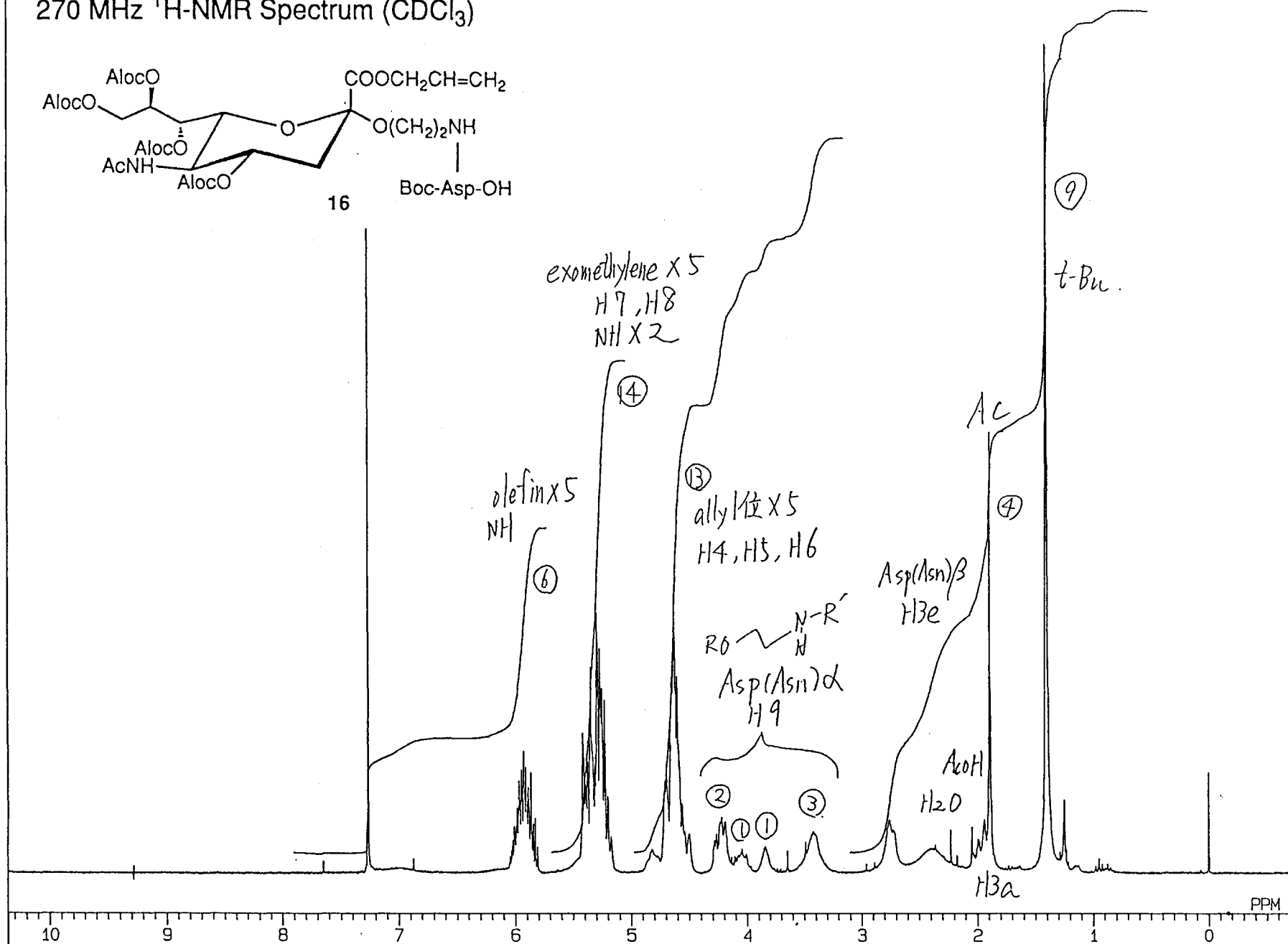
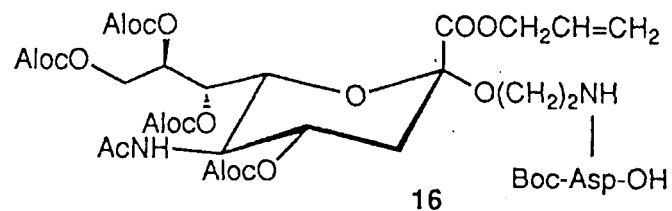
⑨

PPM

270 MHz ^1H -NMR Spectrum (CDCl_3)



270 MHz ^1H -NMR Spectrum (CDCl_3)



3. 機能性分子の材料化技術の研究開発成果

3、1、基板形成技術の研究開発

(株) イオン工学研究所

高木俊宜

江原襄

1、はじめに

有機機能性材料のペプチド系機能材料の研究開発計画に於いて 他の研究機
で試作された材料の光電効果用基板と光触媒効果用の基板を研究する事によ
り 材料化の検討を行う。

2、研究内容と成果；

基板材料の選択；バイオ材料の基板としてバイオ材料と化学的に安定である
事、物理的に安定で堅固な材料である事、光学特性が優れていてかつイオン
工学的技術を用いて修飾可能である事、光電特性に優れた光物性を有した材
料である事、電気電導度等の電気的特性を比較的広い範囲でイオン工学的手
法を用いて変えられる事、等の特性を有している材料が必要である。これ
の条件を満たす材料は多くない、調査研究の結果 TiO_2 が最も本研究目的
に適していると考えられる。

基板としての TiO_2 は化学的に非常に安定な酸化物であり、物理的にも
堅固である。光学的には透明であり、添加物を加える事で半導体化する事
出来る特徴がある、そこでバイオ機能材料の特に光電効果等の機能測定用の
基板として適している。イオン工学的方法のイオン注入法により基板の
表面の電導性を任意の抵抗値に変えたり傾斜機能材料とすることが出来る材
料である事は、バイオ機能性材料の機能を取り出すに必要な条件である。

そこで まず TiO_2 を基板の主材料とした研究を行った。

TiO_2 の基板の特徴的諸物性、特に光触媒効果等に関する基板の特性研究
成果を報告する。

A．基板の基礎研究としての 光触媒効果に関する研究成果

B．有機光電材料の基礎研究成果。

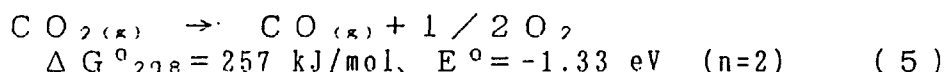
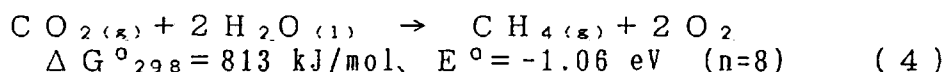
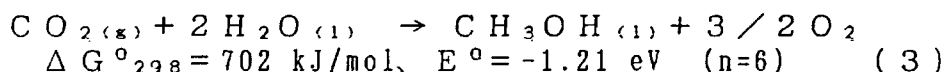
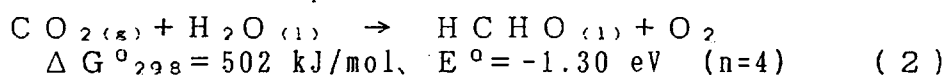
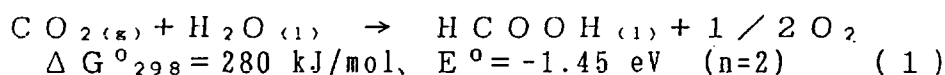
A. 基板の基礎研究としての光触媒効果に関する研究成果

1. 緒言

近年、環境問題で地球の温暖化（Greenhouse effect）が頻繁に問われている。地球温暖化の主な原因は、産業革命以来の急速なエネルギー消費の増加に伴い、大気中に排出された大量の二酸化炭素と考えられている。大気中の二酸化炭素の濃度は確実に年間1.3～1.5 ppmの割合で増加しており、対策を講じなければ、将来地球の生態系に大きな変化をもたらすと考えられている。^{1) 2)} その対策については、まさにエネルギー問題として世界中でいろいろ検討されている。この二酸化炭素問題の基本的な対応策は、化石燃料資源の消費を抑えることにある。したがって、省エネルギーの推進や、さらには代替エネルギーの使用とその関連技術の開発が重要になることは言うまでもない。しかし、全世界的に現在の経済成長が続いた場合、エネルギー消費の伸びは避けられない。したがって、省エネルギーや代替エネルギー開発の推進とともに、排出された二酸化炭素を回収し、固定化できる技術が温暖化対策の一つとして重要になってくる。また、地球温暖化のみでなく、限りある炭素資源の確保という観点からも二酸化炭素を回収し再利用を考えることは、人類の生存にとって不可欠の課題である。

二酸化炭素の固定化の手段として物理的固定化（深海底への貯蔵など）、生物的固定化、化学的固定化などいろいろな方法が提案されている。このうち化学的な固定法として電気化学的な固定化、^{3) - 6)}

メタンなどの化合物を合成できる可能性が示唆されている。^{14) 15)}
 二酸化炭素の光触媒還元反応は式(1)～(5)で示され、おもに懸濁系で、光触媒としては酸化チタンや硫化亜鉛などの半導体触媒を用いて行われている。^{10) 24) 25)} 実際、表1に示すように各種の光触媒による二酸化炭素の還元反応が報告されているが、^{15) 26) 27)} それらの光触媒反応の効率は極めて低く、また光触媒活性を支配する因子については不明瞭な点が多い。



そこで本研究では、微粒子酸化チタンとして種々の表面特性の情報
 が得られることの期待できる、触媒学会参照酸化チタン触媒を用
 いて、二酸化炭素の水による還元反応を固相-気相系にて行い、酸
 化チタン触媒の活性および二酸化炭素の水による光触媒還元反応の
 反応機構についての検討を行うことを目的とした。

二酸化炭素の接触水素化、^{7) 8)} 光触媒を用いた人工光合成型の固定化などが挙げられる。^{9) 10)} しかし、電気化学的な固定化には電力が不可欠であり、また、接触水素化では水素を生成するためのエネルギーと熱を必要とするので、常にエネルギー供給の問題が付随することになる。クリーンで無尽蔵な太陽エネルギーを用い、常温で稼働する人工光合成型の二酸化炭素固定化が、近い将来において切望される重要な課題となることは必然のことと思われる。

酸化チタンをはじめとする金属酸化物などの半導体微粒子にそのバンドギャップ以上のエネルギーを持つ光を照射すると、半導体の価電子帯 (VB) で正孔 (h^+) が、伝導帯 (CB) で電子 (e^-) が生成する。このようにして光生成した電子と正孔の一部は表面に拡散して、電子は還元反応を、正孔は酸化反応を起こす (図 1)。このような作用は 1971 年に本多・藤嶋らにより酸化チタン電極での水の光増感分解が発見されて以来、¹¹⁾ 光エネルギーの化学エネルギーへの変換の点で注目され光触媒作用として研究も活発に行われるようになった。さらに、光触媒の研究は水と様々な有機化合物からの水素発生、新規な有機合成への応用が盛んになり、近年では水中の有害物質の除去や地球規模の環境問題との関連から二酸化炭素の固定化、 NO_x ・ SO_x 等の除去のための環境触媒として期待されている。^{12) - 20)} また、硫化物などのカルコゲナイド系半導体を含めて、その粒径をナノサイズのクラスターにすることで量子サイズ効果を発現させ、触媒のみならず非線形光学材料としての利用の可能性も考えられる。^{21) - 23)}

光触媒を用いた人工光合成型の二酸化炭素固定化の研究は多数行

2. 結果と考察

2-1 銅イオン担持酸化チタン触媒 (Cu/TiO₂(A))

を光触媒とする二酸化炭素の水による還元反応

酸化チタンなどの半導体触媒上に微量の金属を担持させた系では、光照射によって生成した電子と正孔は互いに金属上と半導体触媒上とに電荷分離し、異なったサイト上でそれぞれ還元と酸化反応を誘起する事が知られている。¹⁵⁾ 結果として光触媒反応の収率が向上するとともに、担持しない場合とは異なる反応機構および生成物の選択性の変化が起こることが予想される。例として、酸化チタン上に微量の白金を添加することにより水の光分解反応の効率が向上することが知られている。^{52) 53)}

一方、銅イオンまたは銅電極を用いた二酸化炭素の還元反応に関する研究が活発に行われている。^{6) 49)} 銅電極を用いた水溶液中での二酸化炭素の還元反応では、メタンおよびメタノールの生成に対して高活性を示すことが報告されている。⁴⁹⁾ 一方、Cu-ZnO系触媒を使用してのメタノール合成反応は、工業的に重要であるのみならず、学問的にも注目を集めている。^{2) 54) -56)} 一方で、NO_xの分解反応においてはCu/ZMS-5触媒が高活性を示すことが知られている。^{57) -59)} このように銅触媒が関与する反応は特徴的な反応が多く、また多種多様な触媒としての特性を持っている。

参照酸化チタン上で二酸化炭素の水による光触媒還元反応を行い、JRC-TiO-4触媒を用いた場合にその反応収率が最も高くなることを見いだした。そこで、次にこのJRC-TiO-4触媒を担体として銅イオンを

含浸法により担持し、二酸化炭素の水による光触媒還元反応を行い、その反応活性および選択性におよぼす銅イオンの担持効果について検討を行った。

図1は、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 水溶液より調製した $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ 触媒上での、二酸化炭素の水による光触媒還元反応におけるメタン生成収量におよぼす銅担持量変化の影響を示している。 $(\text{CO}_2: 1$

$24 \mu\text{mol}$, $\text{H}_2\text{O}: 372 \mu\text{mol}$, 光照射時間: 4 h) $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ 上での二酸化炭素の光触媒還元反応では、参照酸化チタン上における二酸化炭素の還元反応の場合に同様に、メタンが主生成物として得られ $\text{C}_2 \cdot \text{C}_3$ 生成物もわずかに生成することが解った。しかし、メタン生成収量は銅無担持の場合よりも減少し、銅担持量 $0.2 \text{ wt}\%$ 付近で最小となった。この結果は、銅の担持によってメタン生成が抑制されることを示するものである。つまり、酸化チタン上の二酸化炭素の還元サイトもしくはメタン生成サイトが銅の担持により占められてしまうことが考えられる。また、高担持領域において銅担持量が増加するに従い、メタン生成収量が幾分増加することが解る。これは、担持した銅がメタン生成サイトとして働くためではないかと考えられる。

次に、メタン生成におよぼす銅イオンの価数の変化の影響を検討するために、 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ を水素還元し反応を行った。図1に見られるように、 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ を水素還元する事により光触媒活性の向上が認められ、銅担持量 $0.4 \text{ wt}\%$ 付近で最大となった。水素還元を行うと、酸化チタン上に担持された銅イオンはほとんど0価として存在していることが予想され、酸化チタン上に光照射して生成する電子および正孔の電荷分離がより促進されることが考え

られる。銅の低担持領域においては Cu^0 により電荷分離が促進されるが、高担持量領域においては、0価の銅が逆に電子と正孔の再結合サイトとして働いている可能性を示唆している。水素還元を行った場合の銅の価数については、今後の検討課題である。

2-2 銅イオン担持酸化チタン触媒 ($\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{B})$)

を光触媒とする二酸化炭素の水による還元反応

酸化チタン上への銅イオンの担持を含浸法で行っているが、含浸する溶媒の種類が異なることによって銅イオンの担持状態が変化し、光触媒反応の反応効率および選択性が変化する可能性が十分に考えられる。かかる観点より、 CuCl_2 水溶液を用いて $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{B})$ 触媒の調製を行い、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 水溶液より調製した $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ 触媒との反応性および選択性の違いについて検討した。

$\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{B})$ 触媒上で二酸化炭素の水による光触媒還元反応を行うと、参照酸化チタンおよび $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ の場合と同様にメタンが主生成物として得られ、副生成物として $\text{C}_2 \cdot \text{C}_3$ 生成物もわずかに生成することが解った。しかし、参照酸化チタンおよび $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ 触媒の場合には認められなかった、新たな生成物としてメタノールの生成が認められた。メタノールが二酸化炭素の還元生成物として得られたということは極めて重要なことであり、実用的観点から非常に注目すべき結果であると考えられる。

図2には、 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{B})$ 触媒上での光触媒還元反応による

メタンとメタノール生成収量におよぼす銅担持量変化の影響を示している。(CO₂: 71 μmol, H₂O: 71 μmol, 光照射時間: 4 h) Cu/TiO₂(A)の場合と同様に、無担持の場合に比べて、メタン生成収量は銅の担持によって抑制されることが解る。メタン生成収量は、銅担持量0.3wt%の時に最小となった。一方、メタノールの生成収量は、銅の担持量を増加させることにより増加し、銅担持量0.3wt%のときに最大となった。Cu/TiO₂(B)触媒上でのメタン生成に関しては、Cu/TiO₂(A)の場合と同様な銅イオンの効果が考えられる。メタノールの生成に関しては、銅を担持させた場合にのみ生成していることより、銅イオンがメタノール生成サイトとして働いていることが推測される。これらCu/TiO₂(A)およびCu/TiO₂(B)触媒における選択性の違いは、銅イオンの担持状態および銅イオンの価数の状態に、大きく依存していることが予想される。(これらの詳細については2-6にて述べる。)

2-3 Cu/TiO₂(A)およびCu/TiO₂(B)触媒 上での生成物収量に及ぼすH₂Oの導入量の影響

図3には、触媒としてCu/TiO₂(A)およびCu/TiO₂(B)を用い、二酸化炭素の導入量をそれぞれの触媒について一定とし、H₂Oの導入量を変化させたときのメタンおよびメタノールの生成収量の変化が示してある。(Cu/TiO₂(A):0.2wt%, CO₂:124 μmol, Cu/TiO₂(B):0.3wt%, CO₂:71 μmol, 光照射時間:4h) 図に見ら

れるように、 H_2O の導入量を増加すると、 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ 触媒の場合にはメタンの生成収量が、 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{B})$ 触媒の場合ではメタンおよびメタノールの生成収量が増加することが解る。この結果は、参照酸化チタンにおける結果(3-1-3)とより良い一致を示しており、銅イオン担持酸化チタン上での二酸化炭素の水による還元反応においても、吸着水が重要な役割を果たしていることが解る。 H_2O 導入量の増加によりメタンおよびメタノールの生成収量が増大するのは、 H_2O の光分解反応により生成する水素ラジカルおよび OH ラジカルの生成量が増加し、水素源および OH 基源が多くなるためだと考えられる。

2-4 ESRを用いた銅イオン担持酸化チタン触媒上の銅イオンのキャラクタリゼーション

Cu^{2+} に6個の H_2O が配位すると、 Cu^{2+} のエネルギー準位はJohn-Teller効果のために、 Ti^{3+} の d^1 軌道の分裂と同様に正対称場を示す。⁶⁰⁾従って、 Cu^{2+} が式(11)および(12)に示される2つの g 値を持つスペクトルを与えることになる。(Cu^{2+} のスピン-軌道相互作用定数 $\lambda = 830\text{cm}^{-1}$) 一方、 Cu^{2+} のESRシグナルでは、核スピン($I = 3/2$)に起因する強度の等しい4本の超微細構造が観測されることが考えられる。⁶⁰⁾

図4は、 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ および $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{B})$ 触媒それぞれについて CO_2 と H_2O を導入し、光照射を行った後に観測されるESRシグナルを示している。(銅担持量:0.1wt%,光照射:室温

にて4h, ESR測定: 77K, 反応物: CO_2 : $124 \mu\text{mol}$, H_2O : $372 \mu\text{mol}$) Cu/TiO_2 (A) 触媒では $g_{\text{iso}} = 2.13$ のシグナルおよび Ti^{3+} に帰属されるシグナルが観測される。 $g_{\text{iso}} = 2.13$ のシグナルは Cu^{2+} に起因するもので、シグナルには異方性および Cu^{2+} の核スピンの起因する超微細構造がほとんど見られない。これは Cu^{2+} の濃度が高く、 Cu^{2+} がお互いに磁場の影響を及ぼし合うためにシグナルがブロードになったものと考えられる。言い換えれば、 Cu^{2+} が TiO_2 上にアグリゲーション（集合）した種の存在を示すものである。^{61) - 63)} また、 TiO_2 結晶格子中に進入しバルク格子中に存在する Cu^{2+} 種も、同様なシグナルを示すことが報告されているが、⁶⁴⁾ 触媒の前処理の温度が 723 K と比較的低いことより、この種である可能性は極めて低いと考えられる。

一方、 Cu/TiO_2 (B) 触媒においては Cu/TiO_2 (A) では観測されなかった $g = 2.37$, $g = 2.05$, $A = 129\text{G}$ の異方性を示すシグナルが観測される。このシグナルは Cu^{2+} に起因するシグナルで、 Cu^{2+} が tetragonal 構造で TiO_2 上に孤立して担持されている種の存在を示唆するものである。^{62) 65)} また Cu/TiO_2 (A) で観測されたブロードなシグナルが、 Cu/TiO_2 (B) 上でも見られアグリゲーションした Cu^{2+} 種が存在していることが解る。 Cu/TiO_2 (B) の場合には、これら2種類の Cu^{2+} 種に起因する ESR シグナルがオーバーラップしていることが推測される。以上の ESR の結果より、 Cu/TiO_2 (A) 触媒の場合と比較して、 Cu/TiO_2 (B) 触媒上では孤立した Cu^{2+} 種が多く存在していることが解った。

次に、 Cu/TiO_2 (A) および Cu/TiO_2 (B) 触媒それ

それについて、 Cu^{2+} に起因するESRシグナルのシグナル強度を比較してみると、 Cu/TiO_2 (A) 触媒上の Cu^{2+} に起因するシグナル強度は、 Cu/TiO_2 (B) 触媒上におけるそれよりも強いことが解る。このことは、 Cu^{2+} イオンとして存在している Cu が、 Cu/TiO_2 (B) 触媒上よりも Cu/TiO_2 (A) 触媒上の方により多く存在していることを示唆している。測定している試料の銅担持量は、 Cu/TiO_2 (A) および Cu/TiO_2 (B) いずれも0.1wt%であるので、 Cu^{2+} 以外の Cu (Cu^+ および Cu^0) は、 Cu/TiO_2 (B) 上に於いてより多く存在していることを示唆しているものと考えられる。(このことに関する詳細な考察については、3-2-5にて行う。) 言い換えれば、 Cu/TiO_2 (B) 触媒上の Cu は、 Cu/TiO_2 (A) 触媒上の Cu よりも、より還元された状態で存在していることを示している。この銅イオンの状態の相違は、先に述べた Cu/TiO_2 (A) および Cu/TiO_2 (B) 上での二酸化炭素の光触媒還元反応の選択性に、大きく影響を及ぼしているものと推測される。

2-5 XPSを用いた銅イオン担持酸化チタン触媒上の銅イオンのキャラクタリゼーション

XPSを用いた銅に関する研究は、多数行われている。⁵⁴⁾⁻⁵⁶⁾ これはXPS測定が表面分析法であり、非破壊的分析であると同時に、銅に関して言えば、銅の価数の同定 (Cu^0 , Cu^+ , Cu^{2+}) および銅の定量が可能なためである。

図5には、 Cu^0 でのXPS Wide scan スペクトルを示している。
66) XPSは、X線を試料に照射し、このとき試料から放出される光電子の運動エネルギーを分光して試料の分析を行う方法であるが、この場合に光電子スペクトルに付随してオージェ電子によるスペクトルも同時に得られる。(オージェ電子分光法: AES (Augerelectron spectroscopy)) 図22に $\text{Cu}(\text{LMM})$ によるAESスペクトルが観測されるのはそのためである。(LMM: L殻の空孔をM殻の電子が満たし他のM殻の電子が放出されるときにのオージェ電子) 銅の価数状態を検討を行う場合には、しばしば $\text{Cu } 2p_{3/2}$ 準位の電子によるXPSスペクトル、ならびに $\text{Cu}(\text{LMM})$ オージェ電子によるAESスペクトルが用いられる。

図6～8には、 Cu^0 , Cu^+ , Cu^{2+} イオンの同定のための参照試料としての Cu , Cu_2O , CuO それぞれについての、XPSスペクトルおよびAESスペクトルを示している。酸化チタン上に担持した銅イオンは、電荷的に考えて($\text{Ti}^{4+}-\text{O}^{2-}$)上の O^{2-} に担持されていることが予想されるので、酸素原子を含む Cu_2O , CuO の2種を、銅の価数を同定するための参照として用いた。これら3種の $\text{Cu } 2p_{3/2}$ XPSスペクトルを比較すると、まず CuO では、主ピークの結合エネルギー値(Eb)が最も高く、またこの主ピークに付随して高結合エネルギー側にサテライトピークが観測される。このサテライトピークは2p電子が原子外へ放出される過程で配位子の軌道($\text{O } 2p$)から Cu の3d空軌道への電荷移動型の電子励起、すなわちshake upにより生じるピークである。一方、 Cu_2O および CuO では、 CuO で観測されたサテライトピークが観測されない。このことは、 $\text{Cu } 2p_{3/2}$ XPSスペクトルでの Cu^+ と Cu^0 の識別

が困難であることを示唆している。

次に、これら3種のCu(LMM)AESスペクトルを比較すると、Cu₂Oのピークが最も高いEb値を示し、一方でCuのピークのEb値が、Cu⁺のEb値よりも1 e V程度低くなることが解る。このことは、AESスペクトルを測定することによりCu⁺とCu⁰の区別が可能であることを示唆している。以上より、Cu 2 p_{3/2} XPSスペクトルおよびCu(LMM)AESスペクトルを測定することにより、Cu⁰, Cu⁺, Cu²⁺の同定が可能であることが解る。

図9は、所定の前処理を行った後のCu/TiO₂(A)触媒(Cu/TiO₂:1.0wt%)におけるXPSスペクトル、およびAESスペクトルを示している。Cu 2 p_{3/2} XPSスペクトルのピークのEb値、およびCu(LMM)AESスペクトルのピークのEb値を、上記の参照試料による結果と比較してみると、Cu/TiO₂(A)触媒上の銅イオンはおもにCu⁺として存在していることが解った。一方、Cu²⁺に起因するサテライトピークが幾分観測される。このことは、Cu²⁺が幾分存在していることを示唆するものである。以上の結果より、Cu/TiO₂(A)触媒上の銅イオンは、おもにCu⁺もしくはCu²⁺として存在することが解った。

一方、図10には所定の前処理を行った後のCu/TiO₂(B)触媒(Cu/TiO₂:1.0wt%)におけるCu 2 p_{3/2} XPSスペクトル、およびCu(LMM)AESスペクトルを示している。Cu/TiO₂(A)触媒の場合と同様に、これらのスペクトルによる結果と上記の参照試料による結果を比較してみると、Cu/TiO₂(B)上の銅イオンもCu/TiO₂(A)上の銅イオンと同様に、おもにCu⁺として存在していることが解った。しかし、Cu/TiO₂(A)

では幾分観測された Cu^{2+} に起因するサテライトピークが観測されなかった。また、AES スペクトルの E_b 値が 1 eV 程度 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ での E_b 値よりも高エネルギー側にシフトしていることが解った。この結果は、 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{B})$ 上の Cu^+ が、 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ 上の Cu^+ よりも多く存在していることを示している。つまり、 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{B})$ 上の銅イオンは、 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ 上の銅イオンよりも、より還元された状態で存在していることを示唆している。このことは、2-4 での ESR による結果と一致しており、 Cu の担持状態を考察する上で、また反応における選択性の違いを考察する上で非常に重要であることを示唆するものである。

$\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ および $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{B})$ 触媒を調製する際に銅を Cu^{2+} として担持させたが、XPS の結果を見る限り、これら銅イオンはおもに Cu^+ として存在している。一方、ESR による結果では、 Cu^{2+} がどちらの触媒においても存在していることを示している。XPS の測定において、 Cu^{2+} があまり観測されなかった理由として以下に述べる様なことが考えられる。

- ① X 線の照射により生成する光電子が、 Cu^{2+} を Cu^+ に還元してしまう可能性があること。
- ② ESR 測定では、銅担持量 $0.1\text{wt}\%$ においても十分 Cu^{2+} を検出できる。これに対して XPS では、銅担持量 $1.0\text{wt}\%$ 以上の Cu 担持量が存在しなければ測定が困難であること。つまり、検出感度が ESR と XPS では異なること。

しかし、上記のことを考慮に入れたとしても、 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ および $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{B})$ どちらの触媒においても、銅の価数は Cu^+ が主成分であることは確実である。酸化チタン上に担持された

Cu^{2+} が Cu^+ に還元されたのは、おそらく酸化チタンの高い還元力によるものではないかと推測される。このことに関する考察は、今後の検討課題である。

2-6 銅イオンの担持状態についての考察

E S RおよびX P S測定により得られた結果から、 Cu/TiO_2 (A) および Cu/TiO_2 (B) 触媒上の銅イオンに関して次のような担持状態が考えられる。

Cu/TiO_2 (A) 触媒上の銅イオンは、アグリゲーションした状態のCu種として存在しており、Cuの価数はおもに1価であるが、2価のCuも幾分存在している。一方、 Cu/TiO_2 (B) 触媒上の銅イオンでは、アグリゲーションした状態のCu種と高分散に担持された孤立Cu種の2種類が存在しており、銅の価数はほとんどが1価である。2価の銅も微量ながら存在しているが、 Cu/TiO_2 (A) に比べてその数は少ない。つまり、 Cu/TiO_2 (B) 触媒上のCuは、 Cu/TiO_2 (A) 上のCuよりも幾分還元された状態で存在している。また、酸化チタン上に担持された銅イオンは、電荷的に $(\text{Ti}^{4+}-\text{O}^{2-})$ 上の O^{2-} に担持されており、 CuO および Cu_2O の形で存在していると考えられている。⁶⁷⁾

Cu/TiO_2 (A) および Cu/TiO_2 (B) 触媒上の銅イオンの担持状態がこのように異なるのは、銅イオンを担持させる際に Cu/TiO_2 (A) では $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 水溶液を、 Cu/TiO_2 (B) においては CuCl_2 水溶液を用いたためである。 CuCl_2

水溶液より調製した Cu/TiO_2 (B) 触媒では、 Cl^- が触媒表面上に残留している可能性が考えられ、このために Cu/TiO_2 (A) とは異なった銅の担持状態になるのではないかと考えられる。このことに関する詳細については、今後の検討課題である。

2-7 二酸化炭素の水による光触媒還元反応での銅イオンの役割についての考察

銅イオンを用いた二酸化炭素の還元反応に関する研究は多数行われており、その一つとして挙げられるものが光電気化学的な二酸化炭素の電解還元反応である。ここでその例を挙げ、光電気化学的な二酸化炭素の電解還元反応について簡単に述べることにする。

Fujishimaらは、カソード電極としてP型半導体である CuO を用いて光照射下で電解還元を行った場合に、二酸化炭素の還元反応が進行し主生成物としてメタンが得られ、一方で、カソード電極として同じくP型半導体の Cu_2O を用いて光照射下で電解還元を行った場合には、主生成物としてメタノールが、副生成物としてメタンが得られるという結果を報告している。⁴⁹⁾ CuO 電極上での光化学的な二酸化炭素の電解反応の反応機構は、3-1-6にて述べた銅電極を用いた二酸化炭素の電解反応での反応機構と同様に、二酸化炭素分子より中間体として $\text{CO}_2^{\cdot-}$ アニオンラジカルが生成し、その後さらに還元されて CO や炭素原子が生成し、この炭素原子が水素原子と反応してメタンを生成すると考えられている。これに対して Cu_2O 電極上でのメタノールの生成は、メタン生成に必要な電位よ

りも多少マイルドな電位で生成し、その電流効率は銅の純度や電解質の純度に著しく依存することが報告されている。⁴⁹⁾還元条件がマイルドであると、二酸化炭素の還元反応で生成する炭素原子の周りの水素原子濃度が低く、 OH^- の形で吸着しているものが近くに存在していることが予想され、また、水素原子の炭素原子に対する攻撃速度が遅いため、水素原子が2個あるいは3個ついた段階で炭素原子と銅との結合が切れ、近くにある水酸イオンの酸素原子と炭素が結合しアルコールが生成するものと考えられている。このようにメタノールの生成には、電位および電極状態の微妙なバランスが必要不可欠であると考えられている。

ここで2-1および2-2の結果より、銅イオン担持酸化チタン触媒上での二酸化炭素の水による光触媒還元反応において、 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ 触媒上ではメタンが、 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{B})$ 触媒上ではメタンおよびメタノールの生成が認められた。また、2-6での考察より、 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ および $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{B})$ 触媒上の銅はおもに1価(Cu_2O)、ならびに少量の2価(CuO)として存在していることが考えられた。これらの結果は、上述した CuO および Cu_2O 電極上での光化学的な二酸化炭素の電解還元による結果と何らかの関連性を持っていることが考えられる。以上の結果および考察を総合すると、銅担持酸化チタン上における二酸化炭素の水による光触媒還元反応でのメタンおよびメタノール生成に関して、次に述べるような銅イオンの状態が考えられる。

- ①メタン生成・・・酸化チタン上およびアグリゲーションしたCu種(CuO , Cu_2O)上で生成す

ることが考えられる。

- ②メタノール生成・・・高分散状態で存在する孤立 Cu_2O 種上に生成することが考えられる。但し、このメタノールを生成する Cu_2O 種は、配置的に高分散状態とアグリゲーション状態した種との微妙なバランスの上に存在していることが考えられる。また、 CuO 種との微妙な数の上での関係（ CuO 種が少ない程よい）および配置関係が考えられる。

$\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{B})$ 触媒上でメタノールが生成するのは、 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{A})$ と比較して、その銅イオンの担持状態が、複雑かつ微妙なバランスを必要とするメタノール生成条件を満たしていたためであると考えられる。 $\text{Cu}/\text{TiO}_2(\text{B})$ 触媒上での反応結果より、銅担持量0.3wt%の場合にメタノール生成条件を満たす Cu_2O が最も多くなることが解る。このメタノール生成条件についての詳細の検討は、今後の検討課題である。

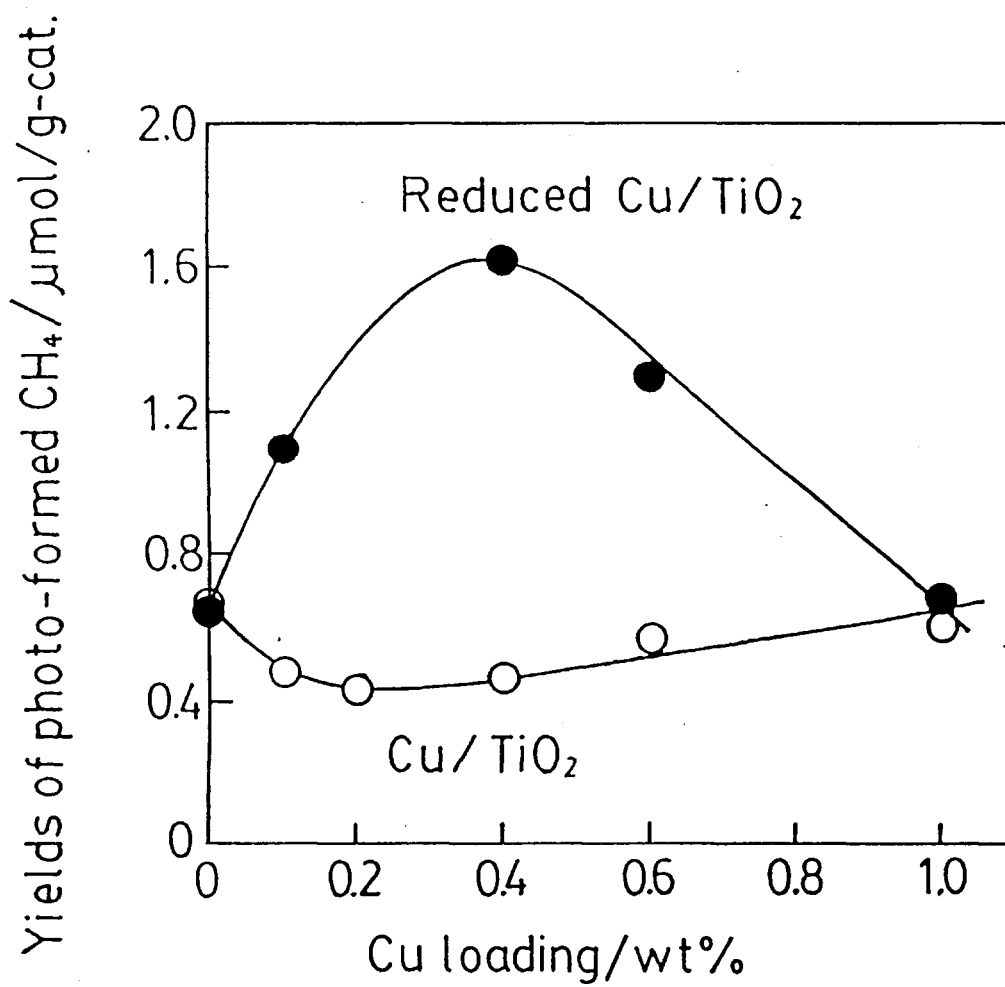


図 1 . Cu/TiO_2 (A) 触媒上でのメタン生成に対する銅担持量変化の影響

(CO_2 : $124 \mu\text{mol}$, H_2O : $372 \mu\text{mol}$,

光照射時間 : 4 h)

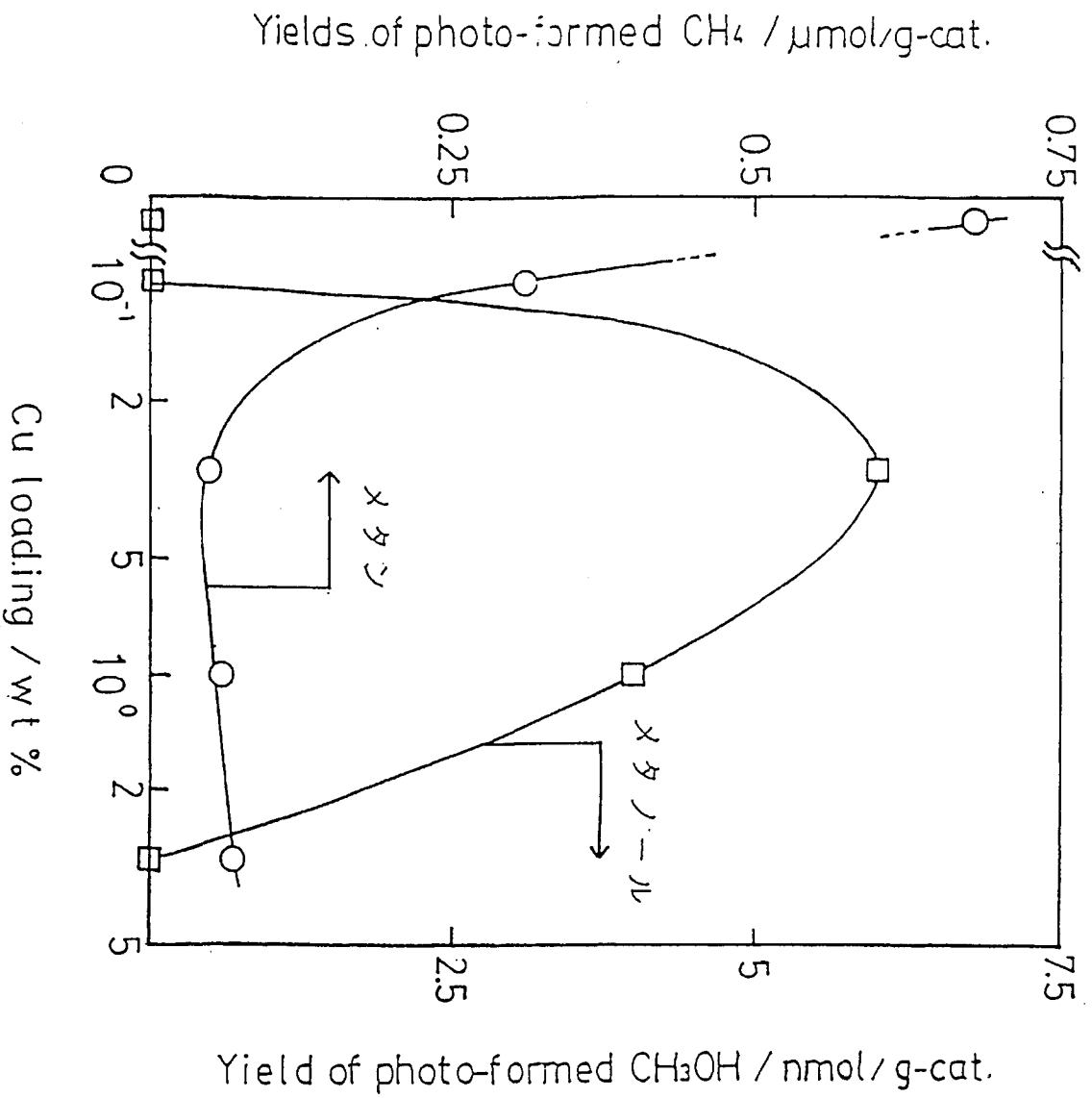


図 2 Cu/TiO₂ (B) 触媒上でのメタンおよびメタノール生成に対する銅担持量変化の影響
(CO₂: 71 μmol , H₂O: 71 μmol , 光照射
時間: 4 h)

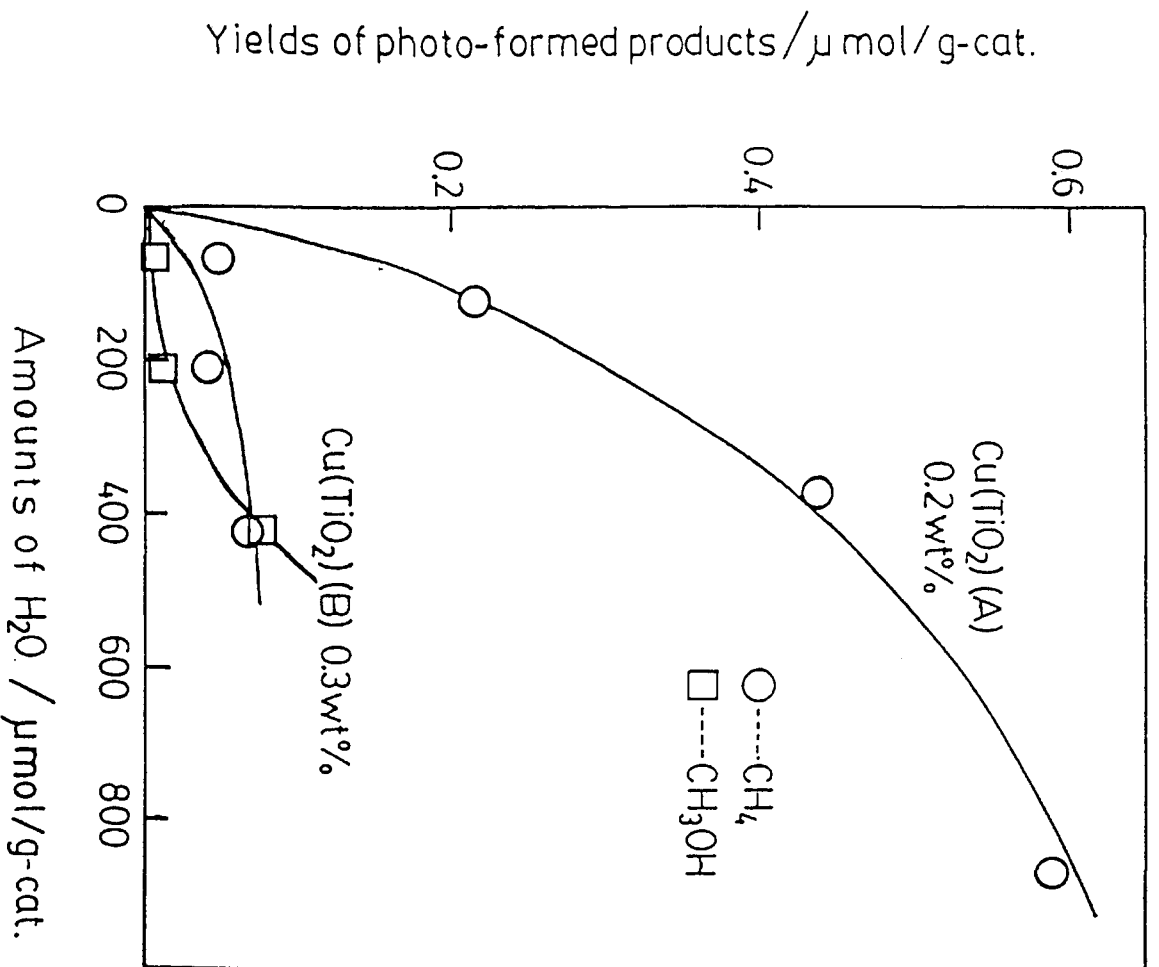


図 3 Cu/TiO_2 (A) および Cu/TiO_2 (B) 触媒上で
の光触媒反応の収量におよぼす H_2O 導入量変化の影響
(Cu/TiO_2 (A): 0.2wt%, CO_2 : $71 \mu\text{mol}$, Cu/TiO_2 (B): 0.3wt%,
 CO_2 : $124 \mu\text{mol}$, 光照射時間: 4h)

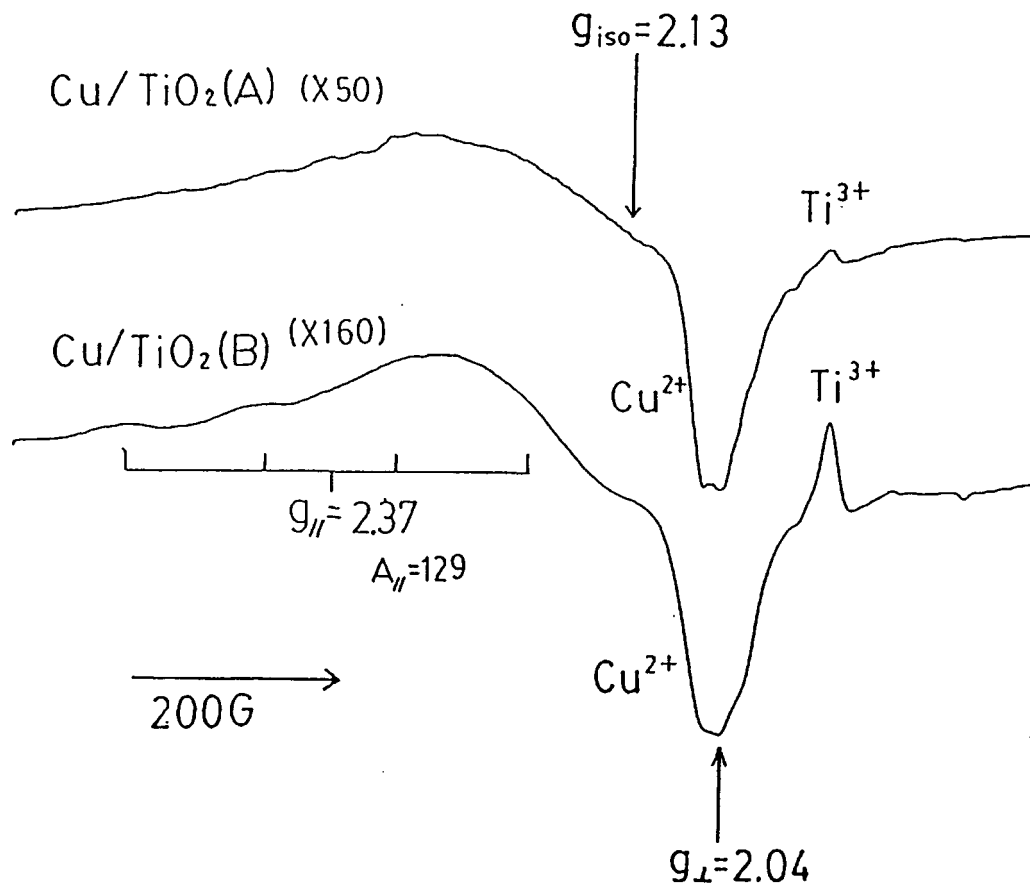


図4 $\text{Cu/TiO}_2(\text{A})$ および $\text{Cu/TiO}_2(\text{B})$ 触媒上に CO_2 と H_2O を導入、光照射を行った後に観測される ESR シグナル

(銅担持量: 0.1 wt%, 光照射: 室温にて 4h, ESR 測定: 77K,

反応物: CO_2 : 124 μmol , H_2O : 372 μmol)

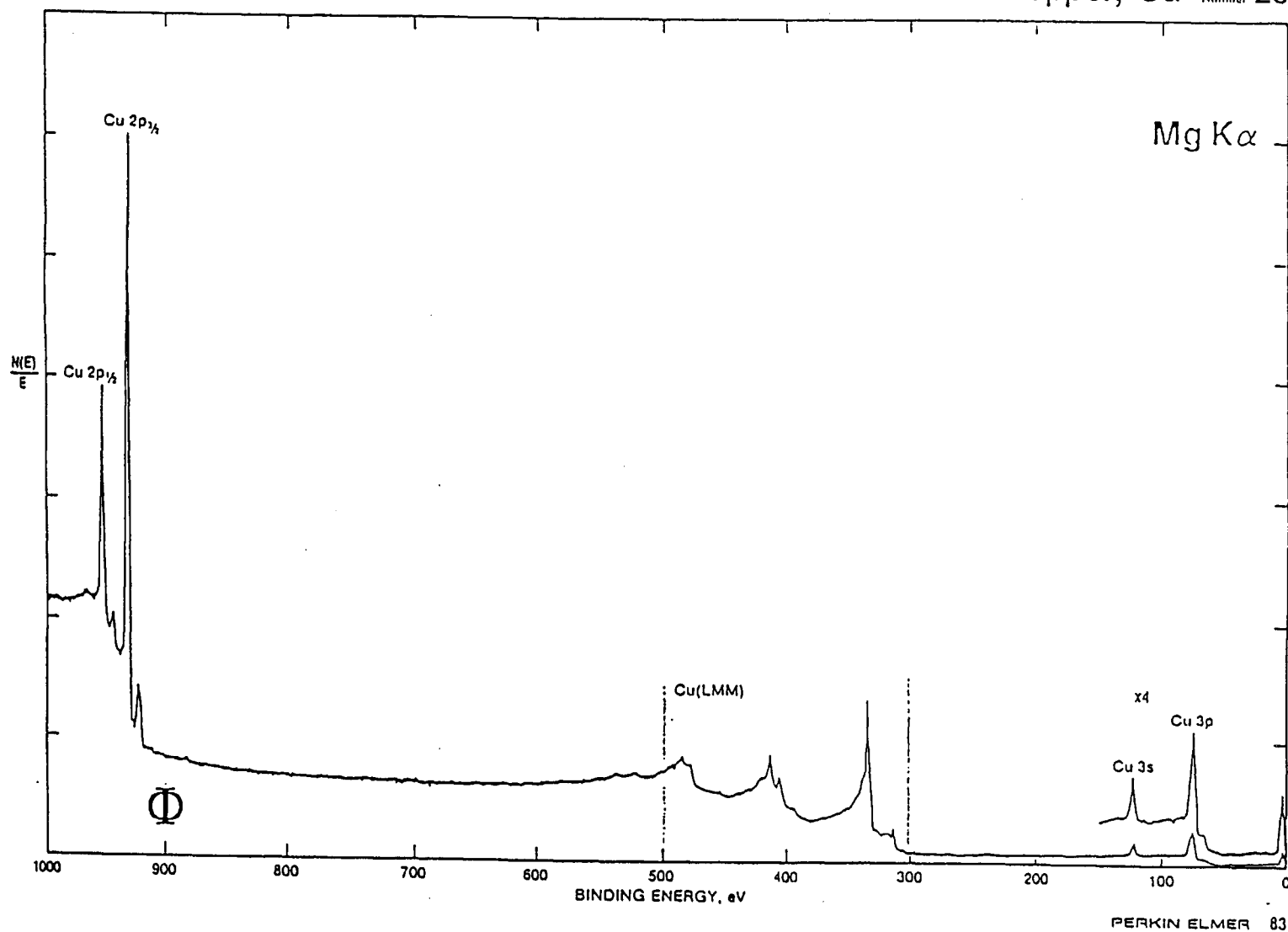


図5 Cu⁰におけるXPS Wide scan スペクトル

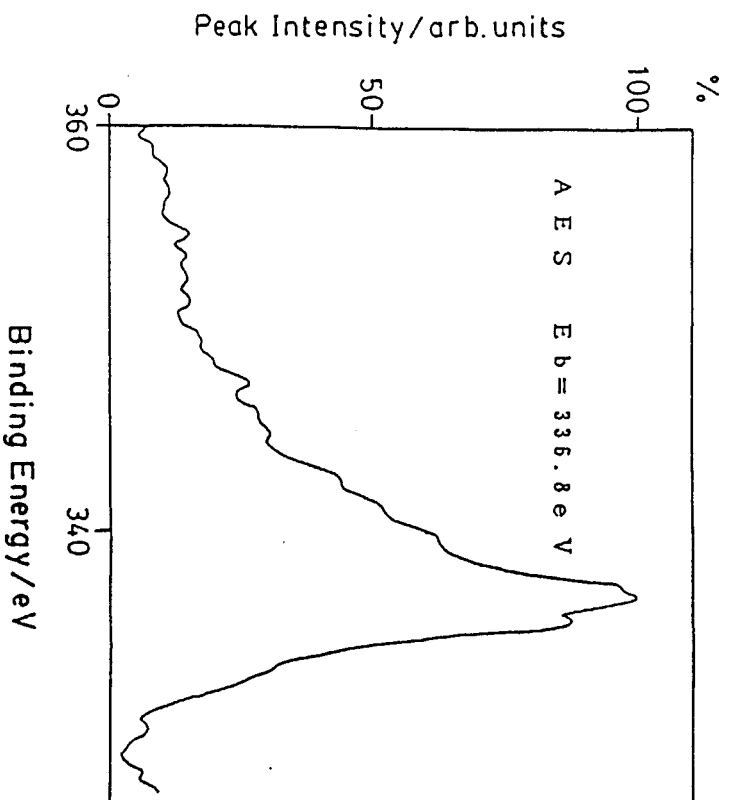
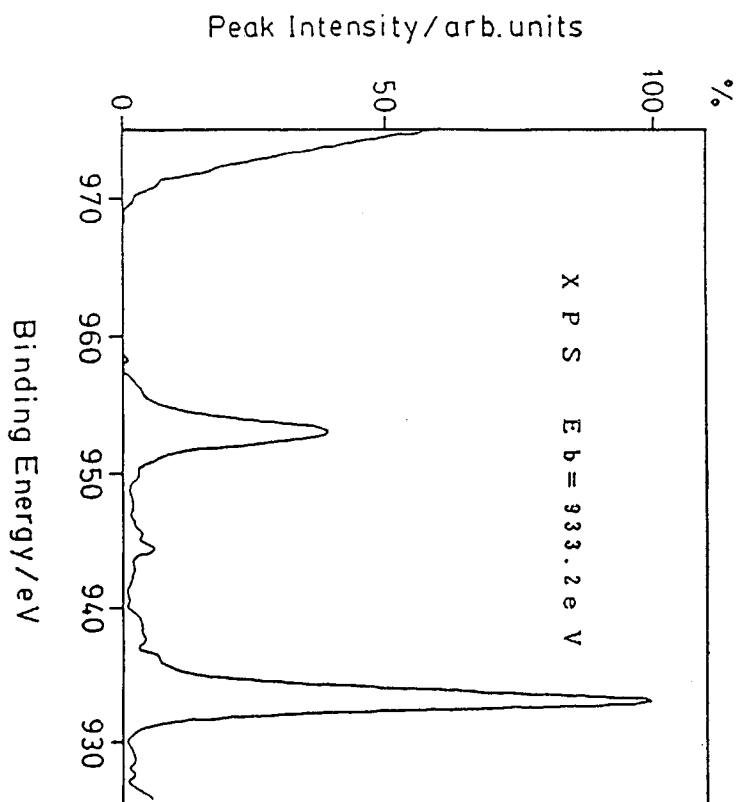


図 6 CuにおけるCu 2p_{3/2} XPSスペクトルおよびCu (LMM) AESスペクトル

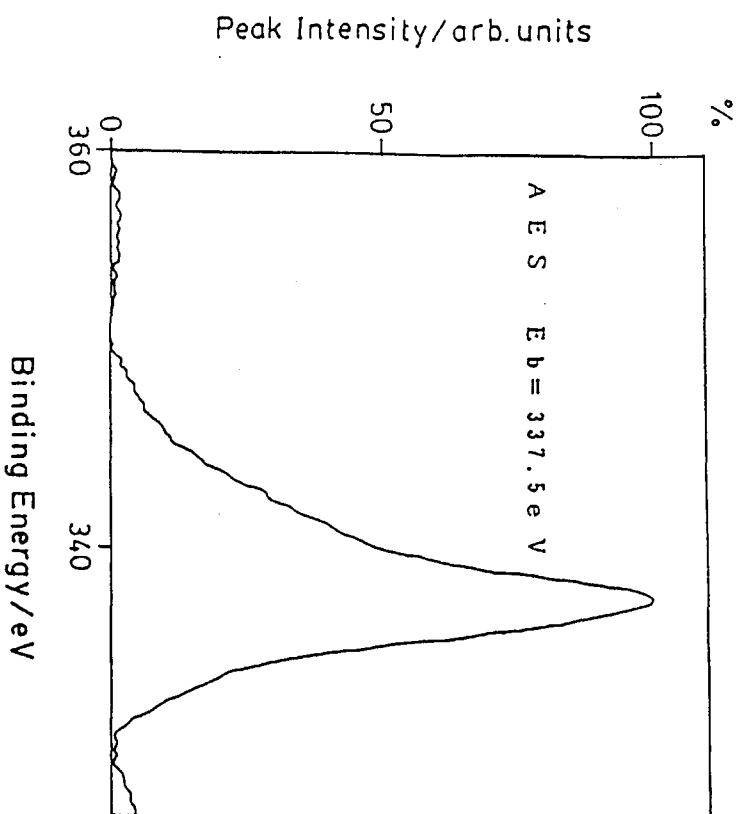
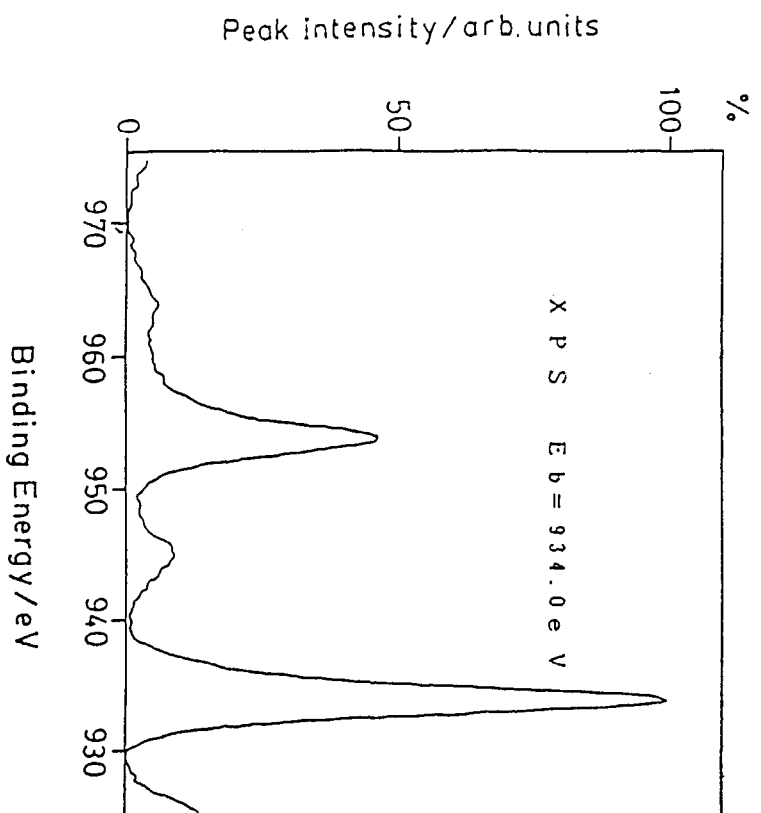


図7 Cu₂OにおけるCu 2p_{3/2} XPSスペクトルおよびCu (LMM) AESスペクトル

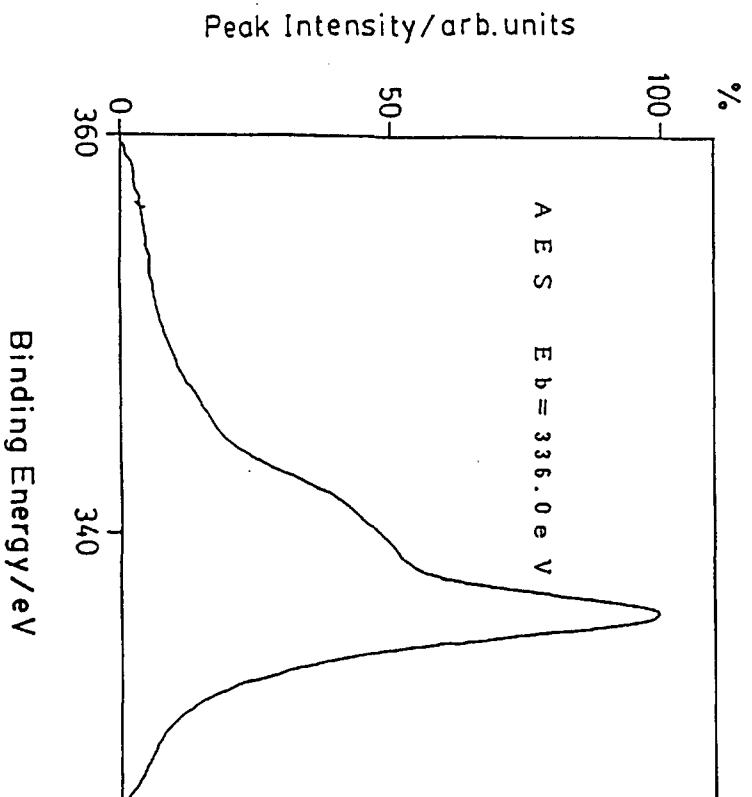
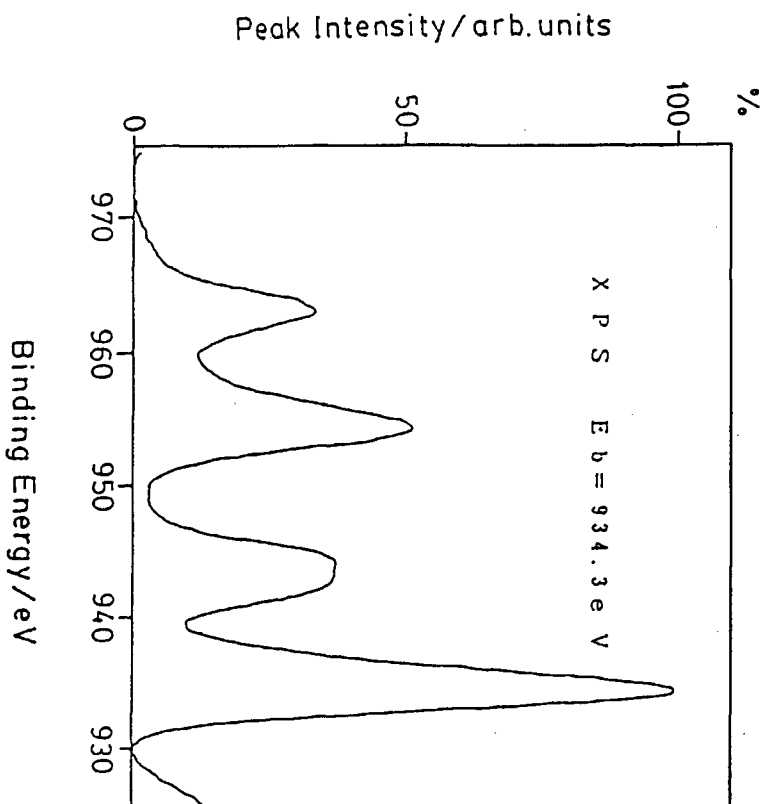


図 8 CuOにおけるCu2p_{3/2} XPSスペクトルおよびCu (LMM) AESスペクトル

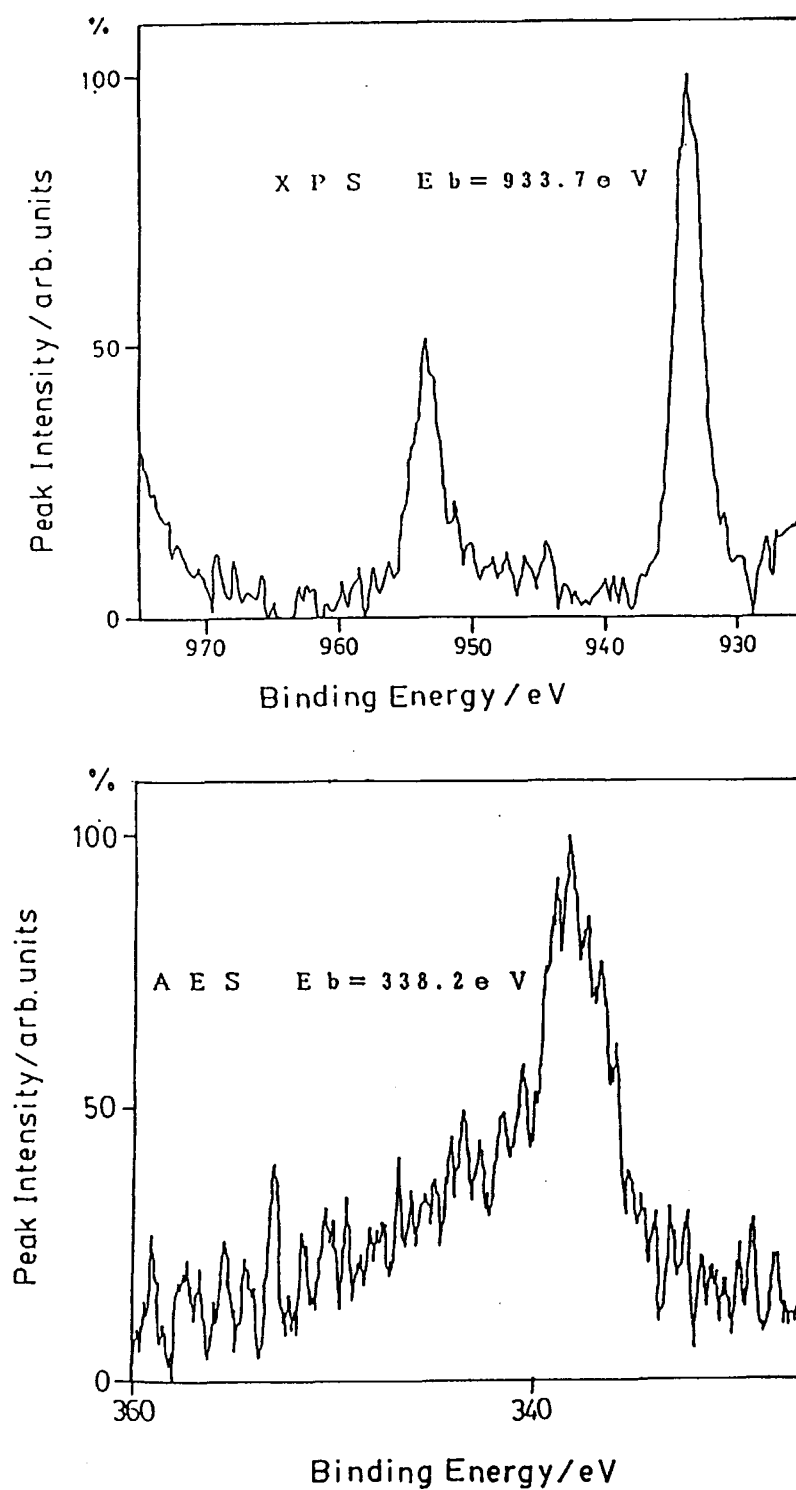


図 9 Cu / TiO_2 (B) 触媒における $\text{Cu } 2p_{3/2}$ XPS スペクトルおよび Cu (LMM) AES スペクトル
(Cu / TiO_2 : 1.0 wt%)

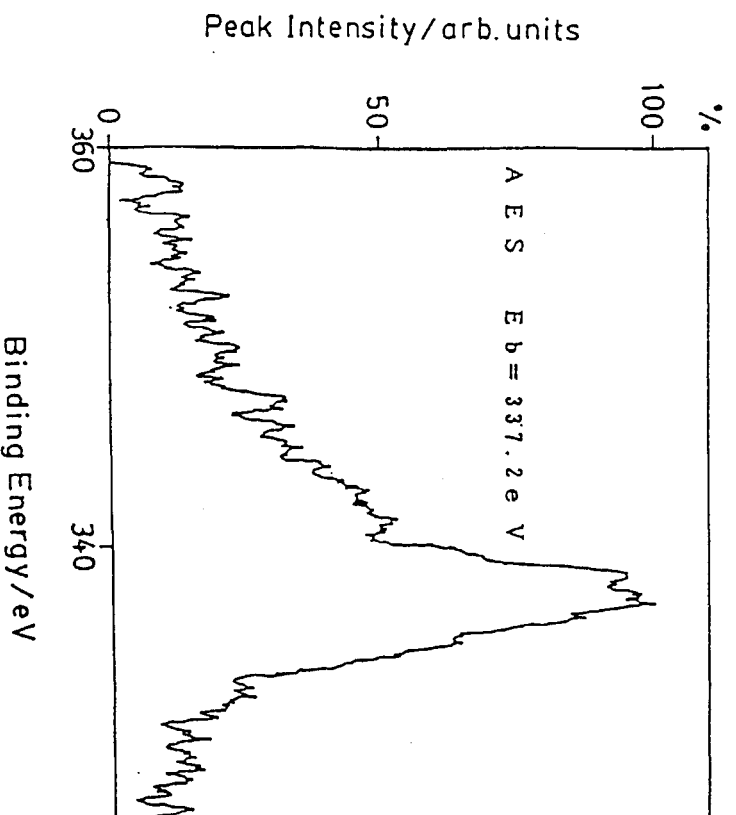
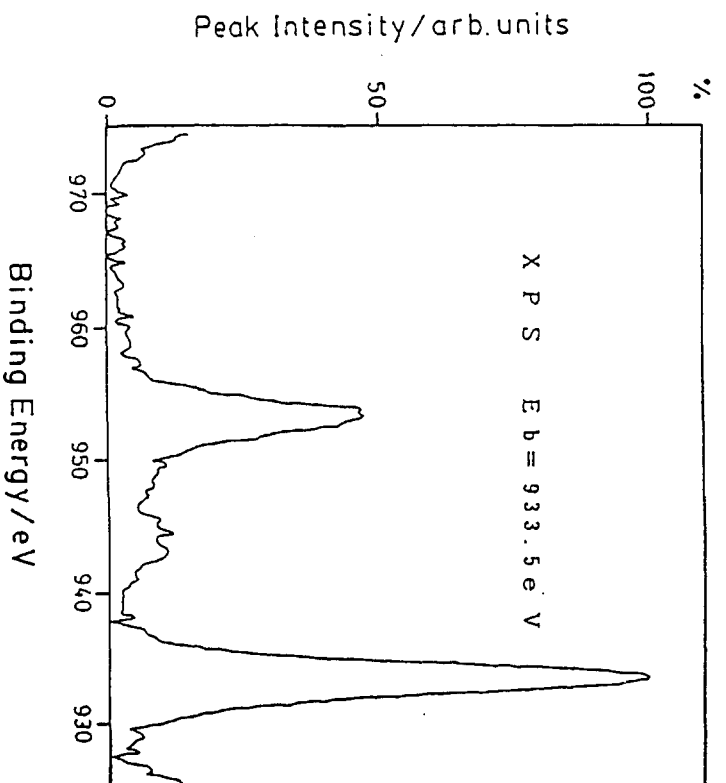


図 10 Cu/TiO_2 (A) 触媒における $\text{Cu } 2p_{3/2}$ XPS スペクトルおよび Cu (LMM) AES スペクトル
(Cu/TiO_2 : 1.0 wt%)

1. 目的 光電変換機能を持つスクワリリウム色素 (SQ) をアミノ酸の置換基に導入したペナチドを創製し、透明電極基板上に固定して有機二層型光電変換素子を作製するための下準備実験として、電極基板上に電解酸化重合によって調整されたポリ3-メチルチオフェン (PMeT) 薄膜について、脱フーゾ前後で高分解能SEMによる観察を行った。

2. 実験 スライドガラス上に金をスパッタした透明金電極 (30mm×26mm) を作製し、I⁺金板を対極として3-メチルチオフェンの電解酸化重合を行い、PMeTの薄膜を金電極上に約200nmの膜厚で被覆した。得られたPMeT薄膜を過塩素酸テトラエチルアンモニウムを支持電解質として0.1M含む炭酸プロピレン (PC) 溶液中で -1V および -3V を印加することによって脱フーゾ処理を行った。電子顕微鏡観察には日立S-900形高分解能走査型電子顕微鏡 (高分解能SEM) を用いて行った。試料を3mm×5mm×1mmの大きさにカットし、銀ペーストで5mm×10mm×1mmの銅製の試料ホルダーに固定したのち十分に乾燥させたのち高分解能SEMの観察に供した。

3. 結果 電解酸化重合ポリマー薄膜のモルホロジーは、用いるモノマーの構造、フーパントの性質、および膜厚に大きく依存することが知られている¹⁾。Fig.1 に本実験で得られた膜厚約200nmのClO₄⁻をフーパントとするPMeTの脱フーゾ前 (a)、脱フーゾのレベルを -1V (b)、および -3V (c) にした時の脱フーゾ後の高分解能SEM写真を示す。いずれも神経細胞様のポリマーがファイリル状ポリマーによってネットワークを形成しているのが見られ、その構造が脱フーゾ後も保持されていることがわかる。ファイリルの直径は10-50nmの広い範囲で分布しているが、脱フーゾによりファイリルの直径が少しずつ縮小しているように見える。

文献

1) G. Tourillon and F. Garnier, J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed., 22, 33-39 (1984).

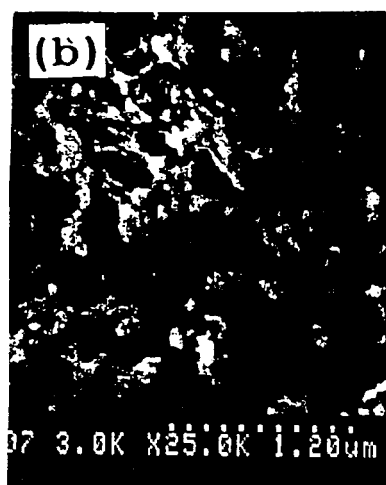
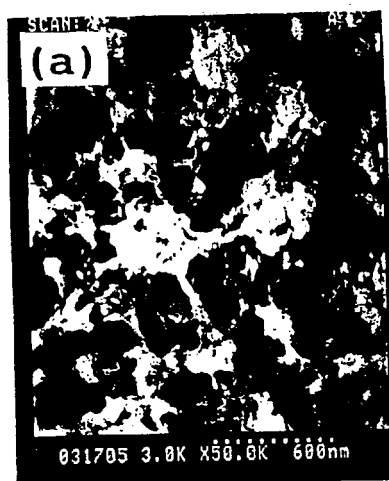


Fig. 1. Scanning electron microscopy analysis of (a) PMeT doped with ClO_4^- , (b) PMeT undoped at -1 V, and (c) PMeT undoped at -3 V.

3 章 ま と め

本研究が開始されてまだ間が無い故にペプチド有機機能材料で光電効果が期待される材料の試作も出来ていない段階であるので、まず本研究目的に副った基礎的研究より開始した。

その第一の成果としてまとめたペプチド系光触媒材料についてはむしろ光触媒性基板TiO₂上に光触媒活性を試みることを行った。また有機光電効果材料材料の基体の構造の電子顕微鏡による研究である。

参考文献

- 1) 化学, 45, (1991).
- 2) 荒川裕則, 触媒, 31, 558 (1989).
- 3) K.W.Frese, J. Electrochem. Soc., 138, 3338 (1991).
- 4) 米山宏, 化学と教育, 38, 174 (1990).
- 5) 堀善夫, 表面, 28, 941 (1991).
- 6) M.Azuma, K.Hashimoto, M.Hiramoto, M.Watanabe,
and T.Sakata, J. Electrochem. Soc., 137, 1772 (1990).
- 7) C.Schild, A.Wokoum, R.A.Koppel, and A.Baiker,
J. Phys. chem., 95, 6341 (1991).
- 8) Z.Xu, Z.Qian, and H.Hattori, Bull. Chem. Soc. Jpn.,
64, 3434 (1991).
- 9) J.C.Hemminger, R.Carr and G.A.Somorjai, Chem. Phys. Lett.,
57, 100 (1978).
- 10) T.Inoue, A.Fujishima, S.Konishi and K.Honda, Nature,
277, 637 (1979).
- 11) A.Fujishima, K.Honda, Nature, 238, 37 (1972).
- 12) "光触媒" 窪川裕, 本多健一, 斉藤泰和 編著
朝倉書店 (1988).
- 13) "触媒のはたらき" 田部浩三 著 化学同人 (1988).
- 14) M.Anpo and K.Chiba, J. Mol. Catal., 74, 207 (1992).
- 15) 安保正一, 千葉勝一, 友成雅則, 表面, 9, 156
(1991).
- 16) 安保正一, 機能材料, 10, 30 (1990).

- 17) 安保正一, 野村幸生, 表面, 30, 253 (1991).
- 18) 堂面一成, 表面, 26, 450 (1988).
- 19) D.F.Ollis, Environ. Sci. Technol., 19, 480 (1985).
- 20) R.W. Matthews, Water Res., 20, 569 (1986).
- 21) S. Miyazaki and Yoneyama, Denki Kagaku, 58, 37 (1990).
- 22) J.M. Nedeljkovic, M.T. Nenadovic, O.I. Mocic, and A.J. Nozik,
J. Phys. Chem., 90, 12 (1986).
- 23) A.J. Nozik, F. Williams, M.T. Nenadovic, T. Rajh,
and O.I. Micic, J. Phys. Chem., 89, 397 (1985).
- 24) H. Inoue, T. Trimoto, T. Sakata, H. Mori, and H. Yoneyama,
Chem. Lett., 1483 (1990).
- 25) R.L. Cook, R.C. Macduff, and A.F. Sammells, J. Electrochem.
Soc., 135, 3069 (1988).
- 26) "Energy Resources through Photochemistry and
Catalysis", Ed. M. Gratzel, Academic Press, New York, (1983).
- 27) S. Sato and J.M. White, J. Am. Chem. Soc., 102, 7206 (1980).
- 28) M. Anpo, M. Yabuta, S. Kodama, Y. Kubokawa,
Bull. Chem. Soc. Jpn., 59, 259 (1986).
- 29) M. Anpo, Res. Chem. Intermedi., 11, 67 (1989).
- 30) 向井美保, 大阪府立大学 応用化学科 卒業論文,
(1989).
- 31) 中弥浩明, 大阪府立大学院工学研究科 応用化学専攻
修士論文, (1986).
- 32) M. Anpo, N. Aikawa, S. Kodama, and Y. Kubokawa, J. Phys. Chem.,
88, 2569 (1984).

- 3 3) M. Anpo, N. Aikawa, and Y. Kubokawa, J. Phys. Chem., 88,
3998 (1984).
- 3 4) G. N. Schrauzer and T. D. Guth, J. Am. Chem. Soc.,
99, 7189 (1977).
- 3 5) M. Anpo and M. Tomonari, Denki Kagaku, 57, 1219 (1989).
- 3 6) M. Anpo, M. Tomonari, S. Coluccia, M. Che, and M. A. Fox,
Bull. Chem. Soc. Jpn., 64, 543 (1991).
- 3 7) 化学便覧, 改訂 2 版, 基礎編 II p. 953 (1975).
- 3 8) 千葉勝一, 大阪府立大学院工学研究科 応用化学専攻
修士論文, (1992).
- 3 9) 相川規一, 大阪府立大学院工学研究科 応用化学専攻
修士論文, (1982).
- 4 0) 島 考人, 大阪府立大学院工学研究科 応用化学専攻
修士論文, (1985).
- 4 1) 石谷治, 指宿堯嗣, 鈴木雄次, 日高久夫, 光化学討論会
講演要旨集, p. 137 (1991).
- 4 2) 桑田啓治, 伊藤公一 編著, "電子スピン共鳴入門",
南江堂, p. 164 (1980).
- 4 3) V. A. Shvets, V. B. Kazansky, Kinet. Katal., 12, 935 (1971).
- 4 4) L. I. Durbulyavichus, Yu. A. Zarifyants, S. N. Karyagin,
V. F. Kiselev, Kinet. Katal., 14, 1526 (1973).
- 4 5) R. F. Howe and M. Gratzel, J. Phys. Chem., 89, 4495 (1985).
- 4 6) M. Gratzel and R. F. Howe, J. Phys. Chem., 94, 2566 (1989).
- 4 7) P. H. Kasai, Acc. Cem. Res., 4, 229 (1971).

- 48) 栗田雄喜生 著, "電子スピン共鳴入門", 講談社,
p. 32 (1989).
- 49) 橋本和仁, 光化学, 15, 26 (1991).
- 50) K.R.Thampi, J.Kiwi, and M.Gratzel, *Nature*, 327, 506 (1987).
- 51) G.Munuera, U.R.Arnau and A.Saucedo, *J.Chem.Soc.,
Faraday Trans.1*, 75, 736 (1979).
- 52) 窪川裕, 安保重一, 触媒, 23, 189 (1981).
- 53) 窪川裕, 安保重一, 表面化学, 4, 200 (1983).
- 54) 岡本康昭, 表面化学, 11, 76 (1990).
- 55) 岡本康昭, 触媒, 27, 36 (1985).
- 56) 荒川裕則, 佐山和弘, 岡部清美, 第2回"CO₂固定化研究会
"研究発表講演会, 講演予稿集, p. 5 (1992).
- 57) M.Iwamoto, H.Yahiro, K.Tanda, N.Mizuño, Y.Mine and
S.Kagawa, *J.Phys.Chem.*, 95, 3727 (1991).
- 58) 岩本正和, 水野哲考, 触媒, 32, 462 (1990).
- 59) 岩本正和, 化学, 45, 97 (1990).
- 60) 数坂昭夫, 触媒, 23, 396 (1981).
- 61) M.W.Anderson and L.Kevan, *J.Phys.Chem.*, 91, 4174 (1987).
- 62) 野村幸生, 大阪府立大学院工学研究科 応用化学専攻
修士論文 (1991).
- 63) 栗田雄喜生 著, "電子スピン共鳴入門", 講談社,
p. 23 (1989).
- 64) A.Amorelli, J.C.Evans and C.C.Rowlands, *J.Chem.Soc.,
Faraday Trans.1*, 85, 4111 (1989).

- 6 5) 岩本正和, 八尋秀典, 大柴薫, 伴野靖幸, 岡本史人,
触媒, 32, 91 (1990).
- 6 6) Handbook of X-ray Photoelectron spectroscopy,
Perkin Elmer, p.83.
- 6 7) K.Hadjivanov, D.Klissurski, M.Kantcheva, A.Davydov,
J.Chem.Soc., Faraday Trans., 87, 907 (1991).

3. 2 基板修飾技術に関する研究開発

鐘淵化学工業株式会社

谷 紱孝

鈴木 和雄

1. はじめに

機能性ペプチド、特に分子識別機能などの高度な機能を発現させるためのペプチドについては、これをSOLUBLEな状態で用いることは医薬などで若干試みられているが、これを材料に固定して機能を発現させることは難度が高く、ほとんど行われていない。その理由はペプチド側の設計の問題もあるが、主としてペプチドを固定する基板材料および固定化技術が確立されていないためである。

さらに分子識別、光電変換機能などを有する機能性ペプチドを対象とする場合、そのデバイス化が必須であり、基板への単なる固定にとどまらず、ペプチドを基板上の必要な部位に固定する、パターン形成が重要な要素技術となるが、これは非常に高度な技術であり、これまでほとんど試みられていない。

我々はペプチドの固定化基材および固定法を最適化し、これに分子識別機能などを有するペプチドをパターン形成的に固定してペプチドの実用機能を高効率に発現させることを目標としている。この課題に取り組むに当たり、光化学反応によるペプチド固定法を深耕し、これを最適化することにより、これまで半導体産業などで培われてきたリソグラフィー技術を本課題に適用することを目指す。

具体的には、これまで種々試行されてきた光化学反応による生体分子固定技術の中から、本課題に最も適したものを選び、基板材料およびその処理方法の検討、さらにリソグラフィー技術の適用可能性の検討と合わせて、基板上への固定化ペプチドによるパターン形成を実現するとともに、分子識別等の実用機能の発現をはかる。

今回は、固定化技術の評価に適したモデルペプチドおよび基板材料を選定し、さらに研究対象とする光固定化技術についても調査を行い、候補となる光固定化技術を選定してそのフィジビリティを評価した。さらに、機能性ペプチドを固定化した際に高効率に機能を発現させるために、基板表面の修飾方法についても検討しているので、併せて報告する。

2. 研究内容及び成果

2. 1 モデルペプチド及び基板材料の選定

2. 1. 1 モデルペプチドの選定

機能性ペプチドの機能発現のためには、そのコンホメーションが重要な鍵をにぎっていると考えられる。従って、本研究で用いるモデルペプチドとしては、特定の機能を有し、かつ特定のコンホメーションで機能を発現するものが適している。この条件を満たすペプチドとして、我々はスカベンジャーレセプターのコラーゲン様ドメインを選択した。

スカベンジャーレセプターはマクロファージ表面に存在する変性LDLのレセプターとして知られている¹⁾。その構造は6つのドメインに分けられ、その中でもコラーゲン様ドメインは特徴的な三重鎖構造を有し、変性LDLなどに結合する重要な部分であり、72残基のアミノ酸残基からなる(Fig. 1)。陽性荷電の多くのアミノ酸を含むため変性LDLのように負に荷電した化合物と結合するのに適した構造を示しており、特にコラーゲン様ドメインのカルボキシル末端側から約20残基が変性LDL結合の際に重要な役割を担っていることが示唆されている。

今回は、以下の5種類のコラーゲン様ドメイン部分ペプチドを合成し、特にカルボキシル末端から21残基の部分ペプチドについて、樹脂らの切断・脱保護及び精製を実施したので報告する。

・ C末から21残基；S C R 21

G P P G P P G E K G D R G P P G Q N G I P G F P G L I G T P
G L K G D R G I S G L P G V R G F P G P M G K T G K P G L N
G Q K G Q K G E K G S G

・ C末から38残基；S C R 38

G P P G P P G E K G D R G P P G Q N G I P G F P G L I G T P
G L K G D R G I S G L P G V R G F P G P M G K T G K P G L N
G Q K G Q K G E K G S G

・ C末から46残基；S C R 46

G P P G P P G E K G D R G P P G Q N G I P G F P G L I G T P
G L K G D R G I S G L P G V R G F P G P M G K T G K P G L N
G Q K G Q K G E K G S G

- ・ C 末から 59 残基 ; S C R 59

G P P G P P G E K G D R G P P G Q N G I P G F P G L I G T P
G L K G D R G I S G L P G V R G F P G P M G K T G K P G L N
G Q K G Q K G E K G S G

- ・ コラーゲン様領域の全ペプチド ; S C R all

G P P G P P G E K G D R G P P G Q N G I P G F P G L I G T P
G L K G D R G I S G L P G V R G F P G P M G K T G K P G L N
G Q K G Q K G E K G S G

< ペプチド自動合成 >

ペプチド自動合成機 (Applied Biosystem 社 Model 431A Peptide Synthesizer) を用いて、t-Boc 法により以下のスカベンジャーレプターのコラーゲン様ドメインのカルボキシル末端側部分ペプチドを合成した。

< 樹脂からのペプチドの切断と保護基の除去 >

S C R 21 について、以下の方法に従い樹脂からのペプチドの切断と保護基の除去を行った。

樹脂 100mg にチオアニソール 100 μ l、エタノール 50 μ l を加え、室温で 10min 攪拌した。ここにトリフルオロ酢酸 (TFA) 1ml を加え約 10min 攪拌し、さらにトリフルオロメタンスルホン酸 (TFMSA) 100 μ l を滴下し、室温で 25min 攪拌した。反応終了後、溶液を冷ジエチルエーテル (DEE) 中に滴下した。濾取・洗浄の後に TFA による再溶解、冷 DEE による再沈澱・洗浄を行い、得られた沈澱物を 2N 酢酸水溶液に溶解し、凍結乾燥により粗生成物を得た。

< 精製及び確認 >

粗生成物を高速液体クロマトグラフィ (カラム: オクチルシリカ) を用いて精製した。精製前後のペプチドのオクチルシリカカラムからの溶出挙動を Fig. 2 に示す。

また、精製ペプチドをアミノ酸シーケンサー (Applied Biosystem 社 Model 477A Protein Sequence Report) により解析し、アミノ酸配列が S C R 21 に一致することを確認した。

2. 1. 2 基板材料の選定

光電変換機能を有する機能性ペプチドを固定化する場合、基板材料に電子伝達能を付与することにより、新たな、またはより高い機能の発現が期待される。

我々は「電子伝達」をキーワードに、

① アモルファスシリコン

② 導電性高分子

の二種類の基板材料に着目した。

アモルファスシリコンは典型的な半導体として広く知られている。

一般にアモルファスシリコンは水素原子を添加することによってアモルファス状態を保っており、その表面には「 $-Si-H$ 」が存在していると考えられる。

基板材料として考える場合、表面へのペプチドの固定化が必要となるが、現在「 $-Si-H$ 」表面へのペプチドの共有結合的固定化方法は知られていない。一方、酸化によりアモルファスシリコン表面は「 $-Si-OH$ 」になるが、ガラス表面の修飾等から、この「 $-Si-OH$ 」表面への共有結合を介したペプチドの固定化は可能である。

そこで、我々は直接アモルファスシリコン表面にペプチドを固定化する方法を調査しつつ、一方で表面を酸化した後にペプチドを固定化する方法を検討することとし、まずモデル基板としてガラスを用いた検討を開始している。その詳細については後述する（2. 2. 3 参照）。

二種類目の基板材料である導電性高分子とは、文字どおり導電性を有する高分子のことであるが、一般に導電性高分子は種々の有機溶媒に不溶であるため、加工が困難であり、基板材料として利用しにくい。そこで、我々はポリ(3-メチルチオフェン) (PMeT) に着目した。

PMeTは電解酸化重合により合成するため、電極表面にPMeT膜が生成する。したがって、直接これを基板材料として利用できる。

PMeT表面にペプチドを固定化する方法としては、フェニルチオ基を有する架橋試薬を利用する方法（2. 2. 2 参照）を考えている。

ここではPMeTの重合法を示す。

< PMeTの重合 >

重合溶液（0.3M 3-メチルチオフェン／（0.1M Et₄NClO₄／炭酸プロピレン50ml））50mlを三口容器に加え、N₂ガスを通気した。10min後、対極（Pt）及び試料極（基板：Au蒸着スライドガラス）を溶媒で洗浄してから、容器にセットし、脱酸素N₂ガスを通気（5min）した。

電極に25mAの定電流を通電した（Au上が黒色になっていく）。30min後、通電を止め、両電極を溶媒で洗浄してから、アノード溶液（0.1M Et₄NClO₄／

炭酸プロピレン) 50mlにセットした。その後、-3.0V (定電圧) で2min通電し (N2は通気しない)、電圧を印加したまま溶液から電極を出した。

溶媒で洗浄し、基板を傾けて溶媒を除いてから減圧乾燥した。

2. 2 光固定化反応のフィジビリティスタディ

2. 2. 1 調査

基板上への固定化ペプチドによるパターン形成を実現するために、これまで研究されてきた光化学反応による生体分子固定技術を文献検索等により調査した。

その結果、主に三通りの方法がとられていることが明らかになったので、以下に代表的なものを記す。

A. 光照射により共有結合を生じる官能基の利用

(1) フェニルアジド基

フェニルアジド基 (Fig. 3) は、光照射によりナイトレンを経由して近傍の炭素原子と共有結合を形成するため、微小領域にタンパク質や合成ペプチドを化学固定する方法として利用されている。

フェニルアジド基を利用する方法としては、基板上にこれを導入する方法、及びリガンドに導入する方法の二種類が考えられる。

前者として、松田らはフェニルアジド基を有するモノマーを種々のモノマーと共重合することにより、様々な表面特性を有する光反応性の高分子膜を得ている²⁾。また、V.Klingler-Dabralらは、ガラス繊維表面にアミノプロピルトリエトキシランを介してフェニルアジド基を導入した³⁾。

一方、後者では、松田らがp-アジド安息香酸等をタンパク質等と縮合する事により、光反応性のリガンドを合成している²⁾。また、相羽らは、同様の方法によって光反応性キトサンを合成し、材料表面に光固定化した⁴⁾。

(2) フェニルアジド基 & N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基

SANPAHやHSABといったタンパク質の架橋剤 (Fig. 4) が、Pierce Chemical Co.から入手可能である。一般にこれらの架橋剤を用いる場合は、まずタンパク質と反応させて光反応性のリガンドを合成する ((1) 後者)。

一方、第一ステップとしてこれらの架橋剤を光固定化すると、基板上にタンパク質等と共有結合可能な活性基をパターン形成的に導入できると考えられる。

(3)3-トリフルオロメチル-3-フェニル シ・アジリソ

上記官能基 (F i g. 5) は光照射により、カルベンを経由して新たな共有結合を生じる。

V.Klingler-Dabralらは、ガラス繊維表面にアミノプロピルトリエトキシシランを介して上記官能基を導入し、光照射によって合成ペプチドを固定化した³⁾。

(4)アジド基 or ジアゾケトン基

上記官能基はA l 2 O 3やS i O 2表面に吸着した後に、光照射によりアジド基はナイトレンやイソシアナート基を介して、ジアゾケトン基はケチンを介して、それぞれ表面の水酸基と共有結合を生成する (F i g. 6)。

D.A.Holdenらは、アジド基やジアゾケトン基とA l 2 O 3やS i O 2表面の水酸基との光固定化による表面改質を行った⁵⁾。

B. 光照射により除去される保護基の利用

(1)光反応性アミノ保護基

S.P.A.Fodorらは、光照射により除去されるアミノ保護基を利用して、パターン形成的にガラス表面上でペプチドの固相合成を行った⁶⁾。

まず、基板表面のアミノ基と光反応性アミノ保護基を有するアミノ酸を縮合させる。フォトマスクを介して光照射すると、光を照射した部分だけ保護基が脱離してアミノ基が露出するため、次に縮合させるアミノ酸は光を照射した部分にのみ反応し得る。Fodorらはこれを繰り返し、基板上の一辺100 μ mの格子毎に異なるペプチドを合成した (F i g. 7)。

光反応性アミノ保護基は、一般に以下のものが知られている⁷⁾。

Z (N O 2)

Z (3,5(OMe))

D D Z

N V O C

(2)光反応性カルボキシル保護基

松田らは、0-ニトロベンジルエステル基が光照射により開裂してカルボキシル基を生成することを利用し、パターン形成的にカルボキシル基を生成させた後に水溶性カルボジイミドをもちいてタンパク質を固定化した⁸⁾。

C. 光照射による化合物の変性を利用

小谷野らは、ビオチンとアビジンの特異的結合を応用し、基板表面にタンパク質で微細パターンを形成した⁹⁾。

基板上にビオチンを固定化した後に、フォトマスクを介して光照射すると、光照射を受けたビオチンは不活性化することによりアビジンとの親和力を失う。これを利用して、フォトマスクに従ったパターンにタンパク質を固定化した (Fig. 8)。

2. 2. 2 フィージビリティスタディ-1

: フェニルアジド基を有する架橋試薬による固定化

上記調査結果の中から、片末端にフェニルアジド基を有する架橋試薬を利用する方法 (A. (2)) について、そのフィージビリティを検討した。

具体的には、sulfo-SANPAHと基板との光反応により、基板表面に活性エステル基 (N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基) を導入し、これに細胞接着活性を持つフィブロネクチンの部分ペプチドを固定化した。また、基板表面の細胞接着性を評価することにより、そのフィージビリティを調べた。

sulfo-SANPAH:

< 固定化 >

sulfo-SANPAH 1mg を 0.5M クエン酸緩衝液 (pH 5.0) 5ml に溶解し、この溶液をポリカーボネート平板上に添加し、UV照射を 10min 行った。洗浄後、新たに sulfo-SANPAH 溶液を添加し、さらに 10min の UV照射を行った。

洗浄後、フィブロネクチンの部分ペプチド溶液 (100 μ g/ml ほう酸緩衝液) を平板上に添加し、室温で 2h 反応した。

< 細胞接着性 >

UV照射により活性エステル基を導入した後に部分ペプチドを添加した表面 (UV照射面) と、sulfo-SANPAH添加時にUV照射せず、部分ペプチドを添加した表面 (UV非照射面) について、 2.0×10^6 cells/ml の細胞懸濁液を通液し、それぞれの細胞接着性を比較した。

UV照射面はUV非照射面に比べ、明らかに良好な細胞接着性を示した (Fig. 9)。したがって、UV照射により sulfo-SANPAH のフェニルアジド基が反応して基板表面に活性エステル基が導入され、これを介して部分ペプチドが固定化されたことが分かった。

以上の検討から、片末端にフェニルアジド基を有する架橋試薬を利用した今回の光固定化方法には、フィージビリティがあると考えられる。

2. 2. 3 フィージビリティスタディ－2

：基板表面の修飾（ガラス表面でのMAPs形成）

2. 2で述べた様に、我々は本研究に使用する基板材料の一つとしてアモルファスシリコンに着目しており、その表面へのペプチド固定化方法の一つとして酸化によりアモルファスシリコン表面を「 $-Si-OH$ 」とする方法を考えている。この「 $-Si-OH$ 」表面はガラスの表面に類似しており、我々はまずモデルとしてガラスを用いている。

また、これに併せてマルチプル抗原ペプチド（MAPs）法を検討している。MAPsは本来抗ペプチド抗体を生産する際に利用するために開発されたものであり¹⁰⁾、Fig. 10に示すようにLysが分枝した構造を持っている。このMAPsを基板上に導入することにより、

①リガンドを高密度に固定化できる

②リガンドが高密度に固定化されることにより、リガンド間で相互作用が起こり、その機能が高効率に発現する

の効果が期待できる。

今回は、ガラス表面にアミノ基を導入し、これを開始点としてペプチド固相合成によりMAPs構造を形成させることを検討しているので報告する。

具体的には、Fig. 11に示すスキームに従い以下の方法で合成を進めている。

< 酸処理 >

ガラス中のアルカリ成分を除去するため、酸処理を行った。

スライドガラス（ $cm \times cm$ ）を0.1N HNO_3 水溶液中に浸漬し、75℃で3時間処理した。その後、洗浄液が中性になるまで水洗を続け、エタノール洗浄後乾燥した。

< APTES処理 >

表面にアミノ基を導入するため、APTESにより処理した。

2.0%APTES／95%エタノール水溶液を調製し、この溶液中に酸処理ガラスを10min浸漬した。エタノール洗浄によって過剰のAPTESを除去した後に、110℃で45minの熱処理を行い、アミノ化ガラスを得た。

APTESは水存在下で加水分解してシラノールを生成する。生成したシラノールはガラス表面のOH基と水素結合することにより、ガラス表面に吸着する。吸着APTESは熱処理により多数のシロキサン結合を生成して重合する¹¹⁾。

< Z-Lys(Z)化 >

得られたアミノ化ガラスをDCMで洗浄した。Z-Lys(Z)1.0mmol／DCM100ml中

にアミノ化ガラスを浸漬し、N₂通気化10min攪拌した。ここにジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 2.0mmol / DCM 100mlを加え、室温で攪拌した。3時間後DCC 1.0mmolを再添加し、さらに3時間反応させた。反応終了後、DCMで洗浄してから乾燥した。

注) Z基: ベンゾイルオキシカルボニル基

< Z基の除去 >

Z-Lys(Z)化ガラスを25% HBr / AcOH中に浸漬し、室温で1時間攪拌した。反応終了後メタノールにより洗浄・乾燥した。その後5%ジイソプロピルエチルアミン / DCM中に5min × 2回浸漬することにより、HBr塩になっているアミノ基を非プロトン化した。

< MAPsの形成 >

「Z-Lys(Z)化」、「Z基の除去」を繰り返し、ガラス上にMAPsを形成した。

以上のようにガラス表面にMAPsを合成したが、現在のところその構造についてはまだ確認されていない。

今後は、まずMAPs構造を確認する。さらに光反応性保護基をMAPsに組み込むことにより、パターン形成的にモノマーを固定化することを検討する予定である。

3 まとめ

我々は、分子識別機能などを有するペプチドをパターン形成的に固定してペプチドの実用機能を高効率に発現させることを目標としており、光固定法を調査・最適化すること、基板材料およびその処理方法の検討、さらにリソグラフィー技術の適用可能性の検討と合わせることで、この課題に取り組んでいる。

今回は、固定化技術の評価に適したモデルペプチドおよび基板材料を選定した。さらに研究対象とする光固定化技術について調査を行い、候補となる光固定化技術を選定してそのフィジビリティを評価した。さらに、機能性ペプチドを固定化した際に高効率に機能を発現させるために、モデル基板としてガラスを用い、基板表面の修飾方法についても検討した。

モデルペプチドについては、特定の機能を有し、かつ機能発現の際のコンホメーションが明らかになっていることに着目し、スカベンジャーレセプターのコラーゲン様ドメインを選んだ。

また、ペプチド自動合成機を利用してこのコラーゲン様ドメインの部分ペプチドを5種類合成し、そのうちカルボキシル末端から21残基の部分ペプチドSCR21について樹脂からの切断・脱保護及びHPLCによる精製を行い、精製SCR21を得た。

基板材料については、「電子伝達」をキーワードにアモルファスシリコン及び導電性高分子に着目した。

アモルファスシリコンについては、これにペプチドを直接的に固定化する方法はまだ調査中であり、現在のところ表面酸化により生じるOH基を利用する方向で検討を進めている。

また、導電性高分子については基板としての利用のしやすさから、特にポリ(3-メチルチオフェン)に注目し、これを合成した。

研究対象となる光固定化技術について機械検索等によりこれを調査し、過去に

- ・ 光照射により共有結合を生じる官能基を利用
- ・ 光照射により除去される保護基を利用
- ・ 光照射による化合物の変性を利用

する方法が研究されていることが明らかになった。

また、調査結果から、特に片末端にフェニルアジド基を有する架橋試薬を利用する方法を選択し、そのフィジビリティを検討した。

ポリカーボネート板上にこの架橋試薬を介して細胞接着性のペプチドを固定化し、細胞接着実験を行ったところ、光(UV)照射を受けた部分のみが高い細胞接着性を示した。この結果から、フェニルアジド基を有する架橋試薬を用いることにより、ペプチドをパターン形成的に固定化できることが示唆された。

最後にアモルファスシリコンにペプチドを固定化する方法について、モデル基板としてガラスを用いることとし、さらに高密度の固定化・高効率な機能発現を目指してガラス基板上にマルチプル抗原ペプチド(MAPs)の形成を検討しており、その方法について報告した。

今回、モデルペプチド(スカベンジャーレセプターのコラーゲン様ドメイン)及び基板材料(アモルファスシリコン/ポリ(3-メチルホキシ))を選定し、さらにフェニルアジド基を有する架橋試薬を用いることによりペプチドをパターン形成的に固定化できることが示唆された。また、ガラス基板上でのMAPs形成についてその方法を検討中である。

今後はポリ(3-メチルホキシ)上にフェニルアジド基を有する架橋試薬によりモデルペプチドをパターン形成的に固定化すること、及びアモルファスシリコンのモデル基板としてのガラス基板上に形成したMAPsの構造を確認し、光反応性保護基を利用してペプチドによるパターン形成を実現すること、さらにはパターン形成的に固定化されたペプチドの基板上での構造や機能発現の解明を目指す。

[謝 辞]

報告を終えるにあたりポリ(3-メチルホキシ)の合成に関し御指導を頂いた大阪府大工学部応用化学科の上原 赫助教授に深甚なる謝意を表します。

[参考文献]

- 1) 内藤 眞, 児玉 龍彦, 医学のあゆみ, 157, 848(1991)
- 2) 松田 武久, Polymer Preprints, Japan, 38(7), 2214(1989)
松田 武久, 化学と工業, 43, 1488(1990)
松田 武久, 高分子, 41, 714(1992)
- 3) V. Klingler-Dabral, et al., Chimia, 45, 43(1991)
- 4) 相羽 誠一他, 高分子論文集, 48(12), 811(1991)
- 5) D. A. Holden, Tetrahedron, 43(7), 1671(1987)
- 6) S. P. Fodor, et al., Science, 251, 767(1991)
- 7) V. N. R. Pillai, Synthesis, 1980, 1(1980)
M. Bodansky, et al., "PEPTIDE SYNTHESIS(2nd ed.)", (John Wiley & Sons, Inc.)
29(1976)
- 8) 菅原 隆, 松田 武久, 人工臓器, 21(1), 186(1992)
- 9) 小谷野 武他, Polymer Preprints, Japan, 41(3), 1134(1992)
- 10) J. P. Tam, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85, 5409(1988)
- 11) 工業材料, 40(8), 82(1992)
工業材料, 40(9), 82(1992)

3.3 ペプチドの結合試薬の開発

兵庫県立工業技術センター

藤村 庄・安井三雄・毛利信幸

松下 啓・井上守正・隅田 卓

原田 修・前川季義・新井祥文

3.3.1 はじめに

機能性を持つペプチドを、基板に固定化し、その機能を充分に発揮させるには、当該ペプチドを高密度に集合配向化させるとともに、ペプチドと基板を結合させる接着剂的な働きをする結合試薬（リンカー）が必要となる。リンカーに要求される基本的な性質は①一端で機能性ペプチドと結合し、他端で基板と結合する2官能性であること、②ペプチドを機能発現に好都合なように高密度に配向させられること、などである。ペプチドを基板に固定化し材料化する試みは従来全く見られないが、ペプチドに類似する酵素タンパク質の固定化に関しては、バイオリアクターに見られるように盛んに開発が試みられている。しかし、工業的な実用化に達した例は非常に少ない。その最大の要因は、酵素タンパク質を固定化することでその活性が90%近くも低下することにあると考えられる。この活性低下の原因の一つは、現状の固定化技術が、酵素タンパク質表面のアミノ酸残基と基材表面の官能基を結合試薬を用いて架橋結合させるものであり、結合に使用される酵素タンパク質のアミノ酸残基が、酵素タンパク質の活性部位やその近傍にある場合は酵素としての機能を阻害することになる。

この問題をクリアーするためには、基板と結合する官能基を活性中心から離れた部位に指定する方法が考えられる。しかしこのような官能基指定は酵素タンパク質等の場合、現在の技術では不可能と考えられる。一方、ペプチドに関しては、その合成技術が近年長足の進歩を遂げつつあり、この合成の分子設計段階で機能中心から離れた任意の部位に基板と結合可能な官能基を持つリンカーを組み込むことが可能と考えられる。このリンカー設計には以下の点が考慮されなければならない。

- ① リンカーと基板の結合には、ペプチドの官能基などの関与しない結合様式でなければならない。
- ② リンカーや基板の修飾部分は通常不活性であり、両者が接触したり、あるいは試薬や光

照射等によって活性化されて、結合を生じるものが望ましいし、必要な程度に安定でなければならない。

③リンカーのアミノ酸修飾基はペプチド合成の障害になってはならないし、ペプチドの機能発現を妨げてはならない。

④結合反応はペプチドの機能を損なってはならない。

本研究は上記の条件を満たすリンカーを開発することにあるが、そのために、あらかじめリンカーとアミノ酸を結合させたリンカーアミノ酸を合成し、このリンカーアミノ酸をペプチド合成の際、ペプチド分子中の任意の位置に組み込むことを基本構想とした。

これらのリンカーアミノ酸の基板との結合に係わる結合様式はその基板の種類によって反応様式が異なり、さらに、設計されたペプチド分子の機能によっても異なることが予想される。そこで本年度は基板を①合成樹脂基板、②導電性基板の2種類を想定して、技術調査を行うと共に、導電性基板への化学修飾法や、基板へ固定化された極微量のペプチド定量方法の確立などに関する基礎的研究を行った。

3.3.2 二重結合導入に関する研究調査

合成樹脂基板にペプチドを固定化するためペプチドに二重結合を導入し、リンカーアミノ酸を作成するためには、二重結合が導入できるようなアミノ酸残基を選択する必要がある。側鎖に1個の二重結合が導入できるようなアミノ酸残基は以下の4種が考えられる。

①アスパラギン酸やグルタミン酸のような β -や γ -カルボキシル基の利用。

②セリン、スレオニン、及びチロシンのような水酸基の利用。

③リジンのような ϵ -アミノ基の利用。

④メチオニンのような硫化アルキル基の利用。

次にこれらに導入する二重結合種としてはアリル型二重結合を選び、アリルアルコールと上記アミノ酸残基中のカルボキシル基とのエステル化反応を中心として調査を行った。

(1) エステル化によるアリル基の導入。

カルボキシル基からの導入は前述のアスパラギン酸とグルタミン酸の α -、 β -、および γ -カルボキシル基とのエステル化について検討した。エステル化を行うに際して、これらのアミノ酸の α -、 β -、および γ -カルボキシル基の解離恒数(pK_a 値)を比較すると、それぞれ、3.4~3.8、3.9~4.0、および4.4~4.5である¹⁾。三つのカルボキシル基では γ -カルボキシル基がもっともエステル化を受けやすいと考えられる。従って、アミノ酸(X)として

は、グルタミン酸を選び、その γ -カルボキシル基のエステル化を検討することが妥当と考えられた。

アミノ基からの導入に関してはHorst Kunzらがアリルクロロフォルレート($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OCCl}$)をアミノ基のブロック化剤として用いた研究を報告している²⁻³⁾。

(2) エステル化以外のアリル基の導入技術。

塩化アリル($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{Cl}$)を用いてセリン、あるいはチロシンのOH基と反応させて導入を図ることが期待できる。

いずれにしても、標題のリンカーの開発を目的とし、アミノ酸にアリルアルコールのような二重結合を導入した研究例はなく、アミノ酸合成におけるブロック化剤としての目的にとどまっている²⁻⁵⁾。

3.3.3 リンカーとしてのチオール、ジスルフィド基の利用

3.3.3.1. はじめに

チオール、ジスルフィド類が、金表面に自己集合的に単分子膜を形成して、吸着すること、しかも、その吸着はイオウ分子が金表面に結合する構造となっていることが報告されている⁶⁻⁹⁾。このチオール、ジスルフィド基の性質を利用すると、含イオウ有機化合物を仲介にしてさまざまな機能性分子を金表面に配列集合できる可能性がある。

本研究では機能性ペプチドを金基板上に集合配列させる手段として、このチオール、ジスルフィド類の性質に着目し、これらの基をリンカーとしてペプチドに組み込むことを前提として、研究を進めている。今年度はその基礎的研究として、チオールの金表面への吸着と金表面の性質の変化を検討した。

3.3.3.2. 実験方法

3.3.3.2.1. チオールの金表面への吸着

n-オクタデシルメルカプタン(以下ODMと略す; ALDRICH製)と4-アミノベンゼンチオール(以下ABTと略す; ALDRICH製)で金線(直径; 0.5 mm, 長さ; 20 mm)を修飾した。ODMによる金線の修飾は、洗浄した金線をODMのn-ヘキサン溶液(20 mg/30ml)に室温で1昼夜浸漬することにより行った。ABTによる金線の修飾は、ABTのエチルアルコール溶液(20 mg/30ml)を用い、ODMと同様の処理で行った。ODMによる金線修飾の確認は、浸漬処理後(化学吸着処理後)の金線をn-ヘキサンで十分洗浄した後、3 mmol/lの $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ と1

m mol/lのKClの水溶液を用い、三角波ボルタングラムで行った。ABTによる金線修飾確認は、化学吸着処理後の金線をエチルアルコールと水で充分洗浄の後、cytochrome c のりん酸バッファー水溶液(pH=7.0)を用い、ODMと同じく三角波ボルタングラムで行った。

3.3.3.2.2. 修飾による金表面の変化の測定

Fig. 3-3-1 に示した電気化学測定装置を用いて、電気化学的非線形応答を測定した。関数波発生器は、菊水電機(株)製のFUNCTION GENERATER Model 459AL、ポテンシオンスタットは、北斗電工 製のPOTENTIONSTAT HA501であり、データ処理はNEC PERSONAL COMPUTER PC9801で行った。入力電圧は、周波数 1 Hzの正弦波($E = E_0 + E_1 \sin \omega t$; $E_0 = 0.25V$, $E_1 = 0.25V$, $\omega = 2\pi$)である。

作用極には、前述の金線あるいはチオールで修飾した金線、対極には黒鉛、対照極には $Ag^+/AgCl$ (KClの飽和溶液)を用いた。

3.3.3.3. 実験結果と考察

3.3.3.3.1. チオールによる金表面の修飾

エリプソメーター、FTIR、XPSなど近年の分析機器の発展とともに、固体表面の状態の把握が、少しずつ容易になってきている。本研究では、金電極修飾の確認を、酸化還元応答を行う物質を用いる三角波ボルタングラムで行った。この三角波ボルタングラムでは、非常に簡単な測定で電極修飾の成否が確認できる。

ODMで金電極を修飾した場合、金表面を絶縁体になるアルキル鎖が覆うことになり、導電性がなくなる。この性質を利用するとODMによる電極修飾の成否が確認できる。すなわち、3 m mol/l $K_3Fe(CN)_6$ と1 m mol/l KClの混合水溶液を用いて、 $Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+}$ の酸化還元反応に対する金電極の応答を見ることにより確認できる。Fig. 3-3-2がそのボルタングラムであり、裸の電極の場合にはこの反応に応答するが、修飾電極では応答しなくなる。このように、非常に簡単な方法で金電極の修飾を確認することが可能であることがわかる。それとともに、浸漬するという処理で、金電極を非常に簡単に修飾できることがわかる。

修飾させるチオールをABTにすると、修飾金電極は $K_3Fe(CN)_6$ のFeの $2+ \leftrightarrow 3+$ の反応に応答するようになる。そこで、金電極では応答せず、ABT修飾電極で応答するcytochrome cの酸化還元を利用して、ABTによる修飾の確認を行った。Fig. 3-3-3がそのボルタングラムであり、裸の金電極では応答しないが、修飾金電極ではこの酸化還元タンパク質に明確に応答していることがわかる。このように、マーカーとなる酸化還元物質を代えることによって、金表面の修飾の成否を簡単に確認できた。

以上のように、チオールは金表面を非常に簡単に修飾するので、機能性ペプチドの所定の位置にSを持つ化合物（例えばシスチン）を組み込めば、金表面に機能性ペプチドを導入することが可能であると考えられる。

また、ODMは、末端にチオール基を持つ直鎖の炭化水素であり、S原子を介して金表面と結合していると言われている¹⁰⁾。したがって、ODMによる修飾金電極表面には、炭化水素が並んで入る状態が考えられるため、ペプチドなどの金表面への導入には適していない。しかし、ABTによる修飾ではODMと同様にSを介して金表面に結合しているが、金表面とは逆の方向にベンゼン環、アミノ基が順次並んだ構造になっていると考えられる¹¹⁾ので、このアミノ基を介して、ペプチドなどの有機化合物を結合できる可能性があると考えられる。

3.3.3.3.2. 修飾による金表面の性質の変化

固体－液体界面の電気化学的性質は非線形性を持っている。すなわち、Fig. 3-3-1に示した電気化学系においては、容量（キャパシタンス）と電導度（コンダクタンス）が電圧に依存して変化する。このため、正弦波の電圧を入力すると、応答電流には、入力電圧と同じ周波数の基本波のほかに高調波も現れ、さらに、この入力電圧と応答電流で描ける電圧(E)－電流(I)ループは、楕円の歪んだものになる。（線形の場合は、楕円または円）

この電気化学的非線形性には、固体表面の性質や固－液界面での液体の性質が現れるので、修飾金電極による電気化学的非線形性を調べることによって、固体表面の変化や性質を推定できることになる。

そこで、裸の金電極とABT修飾電極を用いて、3基本味覚物質の水溶液中での電気化学的非線形応答を調べた。味覚物質は、塩味(KCl, Na₂SO₄, CaCl₂)、酸味(酢酸、こはく酸、しゅう酸)、甘味(シュクロース、フラクトース、マルトース)であり、それぞれ10 mmol/lとした。

それぞれの水溶液におけるE－IループをFig. 3-3-4～Fig. 3-3-6に示した。

裸の電極におけるE－Iループは、楕円形から歪んだものになっており、しかも、各味覚のカテゴリーごとに異なる形になっている。このように電気化学的非線形性には、水溶液についての情報が現れる。

つぎにABTで修飾した電極でのE－Iループは、裸の電極とは異なる楕円の歪んだ形になっており、しかも、その形は裸の電極の時のように各味覚のカテゴリーごとに異なる形になった。このように、電気化学的非線形性には水溶液中の溶質に対する応答と共に、電極表面の情報すなわち表面をABTで修飾したということも現れていることが分かる。

したがって、修飾電極による電気化学的非線形応答を測定することによって、表面修飾

の状態や修飾電極の機能を把握するための情報の1つを入手することができるがわかる。

3.3.4 水晶振動子法による基板へのペプチド固定量の測定方法の開発

3.3.4.1. はじめに

機能性ペプチドを基板に高密度に配向固定化することは、そのペプチドの機能を効率的に発揮させるために必要不可欠と考えられる。しかし、固定化されたペプチドの量を正確に測定する方法は知られていない。固定化されたペプチドの量の正確な測定は、その機能の評価に関連して極めて重要であると考えられる。タンパク質やポリマーのような高分子物質の固定量の測定は、従来、吸着媒である基板の重量増加を天秤で測定するか、固定化残液の濃度変化から間接的に固定化量を推定する方法が取られてきた。天秤による測定は天秤の精度に関連して大量の試料を要し、また固定化残液の濃度変化は分光光度計の精度に規制されて、微量の固定化量を正確に測定することが困難であった。さらにこれらの方法は、固定化のプロセスを連続的に測定しその動的経過を把握することは不可能である。近年、水晶振動子はその周波数シフト量より、ナノグラムオーダーの重量変化を検出できる可能性があるとして、匂い物質の測定などに利用され始めている。¹²⁾ 水晶振動子の周波数はその環境によって影響されるが、電極表面の重量変化によっても影響されることが知られている。この方法によれば 10^{-9} g の重量変化を連続的に測定できる可能性がある。水晶振動子は空気中では大変安定な発振をするが、ほとんどの回路は溶媒中では不安定化したり異常発振をすることが多い。しかし最近、いくつかの回路は水溶液中でも安定な発振をすることが報告された。¹³⁾ そこで、微少量のペプチドの基板表面への固定化量測定の手法を開発するためにこの、圧電水晶振動子法(PQC)を利用することを試みた。ペプチドのモデルとしては、親水基と疎水基を合わせ持つ数平均分子量約10,000のアクリル系コポリマーを合成し、固定化基板モデルとして、水晶振動子の電極上にカルボキシメチルセルロース(CMC)のキャスト膜を作成した。

3.3.4.2. 実験方法

3.3.4.2.1. 振動周波数の測定装置

直径5mmの銀電極を両面に持つ温度変化に対して安定なATカット水晶振動子を用いた。この水晶振動子は基本発生周波数が5~15MHzの範囲のものであり、Fig. 3-3-7 に示し

た発振回路に取り付け、さらにこの回路をFig. 3-3-8に示したような測定装置を作成して取り付けた。測定データーはGP-IB経由でパーソナルコンピュータに取り込み処理した。溶液中での発振回路は外部ノイズや浮遊静電容量に極めて敏感であるため、測定装置の周辺をアルミホイルで電磁シールドした。周波数測定は $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 、R. H. が $60 \pm 5\%$ の部屋で行った。

3.3.4.2.2 水晶振動子表面へのCMCキャスト膜の作成

希塩酸溶液中で1.5Vに印加された白金電極を用いて、水晶振動子電極表面にAgClの薄膜を作成した。そのうえに適宜希釈したCMC水溶液をマイクロシリンジを用いて $2\mu\text{l}$ 滴下し、電極表面に均一に広げ、風乾の後、絶乾にした。さらにこのキャストされた水晶振動子はベンゼンで希釈したtolylene 2,4-diisocyanate に短時間漬けた後、 120°C で2時間加熱し、その後ベンゼンで洗浄した。この処理水晶振動子はさらにアセトンで8時間ソクスレー抽出を行った。

3.3.4.2.3 アクリルコポリマー溶液の調製

2-hydroxyethyl-methacrylate (2-HEMA) と methylmethacrylate (MMA) の共重合物はキシレン中で滴下法によって合成した。¹⁴⁾ MMAと2-HEMAの仕込み比は重量比で100:0, 95:5, 90:10, 80:20, 60:40, 50:50の5種類とした(それぞれのコポリマーを以降H-0, H-5, H-10, H-20, H-40, H-50 と称す)。合成したコポリマーの性状はTable 3-3-1に示した。合成したそれぞれのコポリマーはn-ヘキサン-アセトン混合溶媒で溶媒分画した後、アセトンで適宜希釈して用いた。

3.3.4.3 実験結果と考察

3.3.4.3.1 周波数シフトに及ぼす電極上の重量変化

空気中での電極上の重量変化と共振周波数変化の関係をFig. 3-3-9に示す。水晶振動子の発振周波数のシフト(df) は(1)式に示すように、電極上の重量変化に依存する。¹⁵⁾

$$df = -2 \frac{F^2}{v \cdot S \cdot \rho_q} \cdot \Delta M \quad (1)$$

ここで、Fは基本共振周波数(Hz)、Sは電極面積(cm^2)、厚み方向へのバルク波の伝播速度($3,320 \text{ m/s}$)、 ρ_q は水晶の密度($2.65 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$)、 ΔM は電極上の重量変化(g)である。いま、電極の直径が5mmで基本共振周波数が10MHzの場合、(1)式は次式で表されることになる。

$$df = -1.17 \times 10^9 \cdot \Delta M \quad (2)$$

このことは、PQC法では数Hzの周波数変化が10ngの重量変化に相当することを意味している。Fig. 3-3-9から明らかなように、空気中では(2)式に従って、電極上の重量増加に伴い、周波数は直線的にシフトした。しかし、 10^{-8} g以下および 10^{-5} g以上の領域では発振が不安定化したりして十分な結果は得られなかった。

3.3.4.3.2 水晶振動子の共振周波数シフトに及ぼす溶媒の影響

水晶振動子は空気中では(1)式に従って安定な発振を示すが、溶媒中では不安定な回路が多い。そこでFig. 3-3-7に示したような3種の発振回路を作成し、それぞれにCMCをキャストされていない5~15MHzの水晶振動子を取りつけて水、ベンジルアルコール、ベンゼン、n-ヘキサン、アセトン、エチルアルコール中で共振周波数を測定した。A回路を除いて全ての溶媒中で安定な発振を示したが、C回路が基本共振周波数の広い領域で安定であった。それゆえ以降の実験はC回路を用いた。溶媒の種類が共振周波数に及ぼす影響はFig. 3-3-10に示した。全ての基本共振周波数領域でシフト値はn-ヘキサン、アセトン、ベンゼン、ベンジルアルコール、エチルアルコール、水の順で増加した。これはFig. 3-3-11に示したようにそれぞれの溶媒の密度の影響を受けたものと考えられる。一方、CMCをキャストした電極においては、溶媒の種類によってシフト量が異なったことから、キャストされたCMCが溶媒を1部吸着した可能性がある。しかし、CMCの膨潤によって固定化の有効表面積が変化しないことは、CMCのキャスト量を変えて実験することによって確認した。これはおそらく、CMCへの溶媒の選択吸着が起こったためと考えられる。

3.3.4.3.3 水晶振動子の周波数シフト量に及ぼすポリマー濃度の影響

CMCがキャストされていない水晶振動子を0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 1.0,%濃度のそれぞれのコポリマー溶液に浸漬し、周波数シフト量を測定したところ、いずれのコポリマー溶液でも、濃度の増加と共に周波数シフト量は増加し、その増加量はコポリマーの種類には関係しなかった(Fig. 3-3-12)。このことは、コポリマーはCMCがキャストされていない電極には吸着されておらず、シフト量はコポリマー溶液の密度のみに依存していることを示している。このことはFig. 3-3-13に示したようにLangmuir plotsからも推定された。

3.3.4.3.4 固定化量の測定

CMCキャスト膜表面へのコポリマーの固定化量は、(2)式より次式で与えられる。

$$\Delta M = (f_{cmcP} - f_{cmcS} - dfp) / -1.17 \times 10^9 \quad (3)$$

ここで f_{cmcP} はCMCをキャストした電極のそれぞれのコポリマー溶液の各濃度における共振周波数シフト量、 f_{cmcS} はCMCをキャストした電極のそれぞれの溶媒による共振周波数

シフト量、dfpはCMCをキャストしていない電極のそれぞれのコポリマー溶液の各濃度における共振周波数シフト量である。この式に従って、それぞれのコポリマーのCMC膜への固定化量を計算し、Langmuir plotsの1部をFig. 3-3-13に示した。いずれのコポリマーでも直線となることより、CMC膜表面へ固定されたコポリマーはH-0を除いて単分子膜状であることがわかった。H-0はMMAホモポリマーであり、親水性の強い表面には吸着されていなかった。Langmuir式より飽和吸着量を計算し、単位面積当りの固定化量をTable 3-3-2に示した。固定化量は $122\text{ng}/\text{cm}^2 \sim 306\text{ng}/\text{cm}^2$ であり、コポリマー組成において親水性を示すと考えられる2-HEMA量の増加に伴い、固定化量は増加した。

以上のことから、PQC法はナノグラムオーダーの重量変化を精度よく測定できることが明らかになり、この方法は合成樹脂ポリマーやタンパク質、あるいはペプチドなど、溶液からの単分子膜状の吸着量や固定化量の測定に利用できる可能性が見いだされた。

3.3.5 まとめ

機能性ペプチドを基板に固定化し材料化する手法として、リンカーアミノ酸の合成について調査を行うと共に、機能性ペプチドを導電性基板に集合配列させるリンカーとしてのチオール、ジスルフィド基の可能性について検討した。その結果、チオール、ジスルフィド基を合成ペプチドに組み込むことにより、導電性基板にペプチドを配向固定化できる可能性のあること、また、界面の状態の一部を電気化学的非線形性の測定で評価できる可能性のあることを見いだした。

また、微小表面に吸着・固定化された高分子の定量方法として圧電水晶振動子法を検討したところ、溶液中でナノグラムオーダーの重量変化を測定することができた。この方法により、微小な表面にペプチド単分子膜のようにごく微量の固定化が行われた場合でも、十分に計測が可能であることが明らかになった。

3.3.6 文献

- 1) 浜口浩三：“タンパク質分子”，岩波書店（東京），1985，p.11.
- 2) Horst Kunz, Carlo Unverzagt: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 23(6), 436 (1984).
- 3) Horst Kunz, Herbert Waldman: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 23(1), 71 (1984).
- 4) D. Cantacuzene, C. Gurreiro: *Tetrahedron Lett* 28(43), 5153 (1987).
- 5) Peter J., Belshaw, et al, *Synth. Commun.*, 20(20), 3157 (1990).
- 6) Bain C.D., Evall J., Whitesides G.M.: *J. Am. Chem. Soc.*, 111(18), 7155-7164 (1989)

- 7) Nuzzo R.G., Zegarski B.R., Dubois L.H.: J. Am. Chem. Soc., 109(3), 733-740 (1987)
- 8) Sabatani E., Rubindtein I., Moaz R., Sagiv J.: J. Electroanal Inter Facial Electrochem., 219(1/2), 365-371(1987).
- 9) Porter M.D., Bright T.B., Allara D.L., Chidsey C.E.D.: J. Am. Chem. Soc., 109(12), 3559-3568 (1987).
- 10) Nuzzo R.G., Fusco F.A., Allara D.L.: J. Am. Chem. Soc., 109(8), 2358-2368 (1987)
- 11) Sun L., Thomas R.C., Crooks R.M., Ricco A.J.: J. Am. Chem. Soc., 113(22), 8550-8552 (1991).
- 12) Okahata Y. and Arig K.: Thin Solid Films, 180, 51-56 (1989).
- 13) Nomura T., Maruyama M.: Anal. Chem. Acta, 147, 365-369 (1983).
- 14) Fujimura T.: Inoue M.: Nokuza Gakkaishi, 37, 719-726 (1991).
- 15) Sauerbrey G. Z.: Z. Phys. 155, 206-234 (1959).

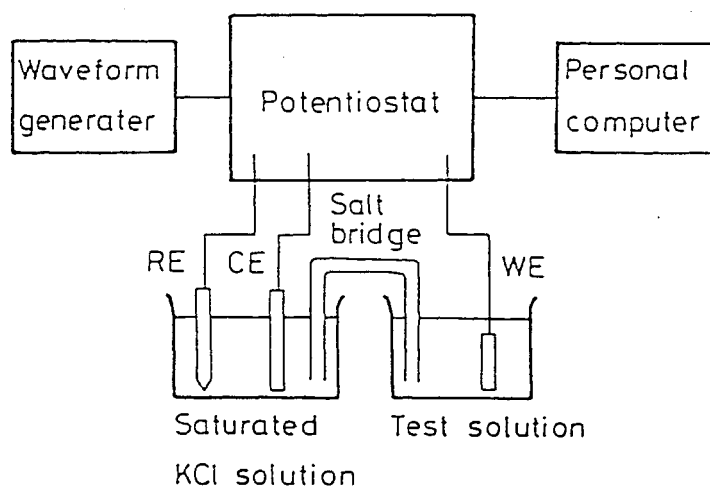


Fig. 3-3-1 Experimental apparatus

WE; Working electrode, CE; Counter electrode (Graphite)
 RE; Reference electrode (Ag/AgCl)

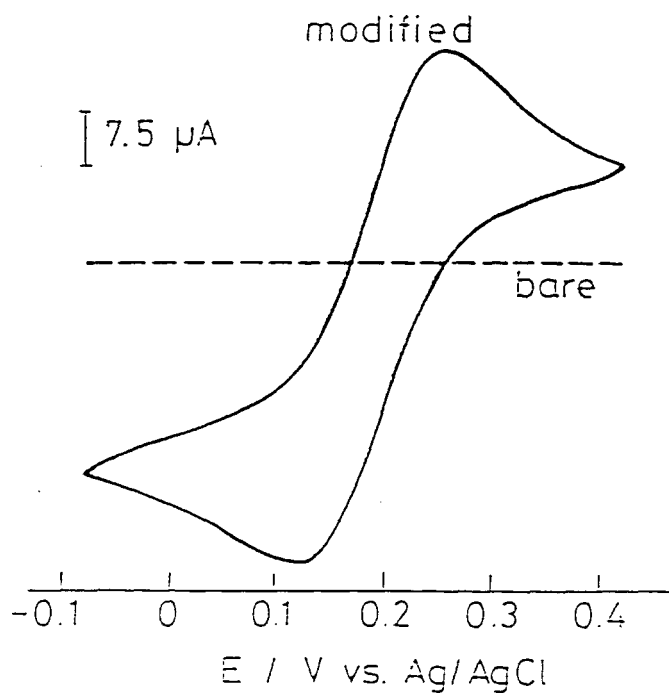


Fig. 3-3-2 Deltoid wave voltammogram for 3mmol/l $K_3Fe(CN)_6$ in 1mmol/l KCl aqueous solution

solid line; with a modified electrode

broken line; with a bare electrode

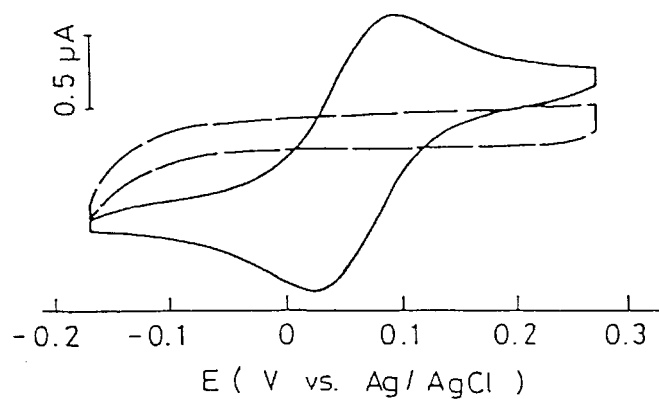


Fig. 3-3-3 Deltoid wave voltammogram for 100mg/30ml cytochrome c in phosphate buffer solution (pH=7.0)
 solid line; with a modified electrode
 broken line; with a bare electrode

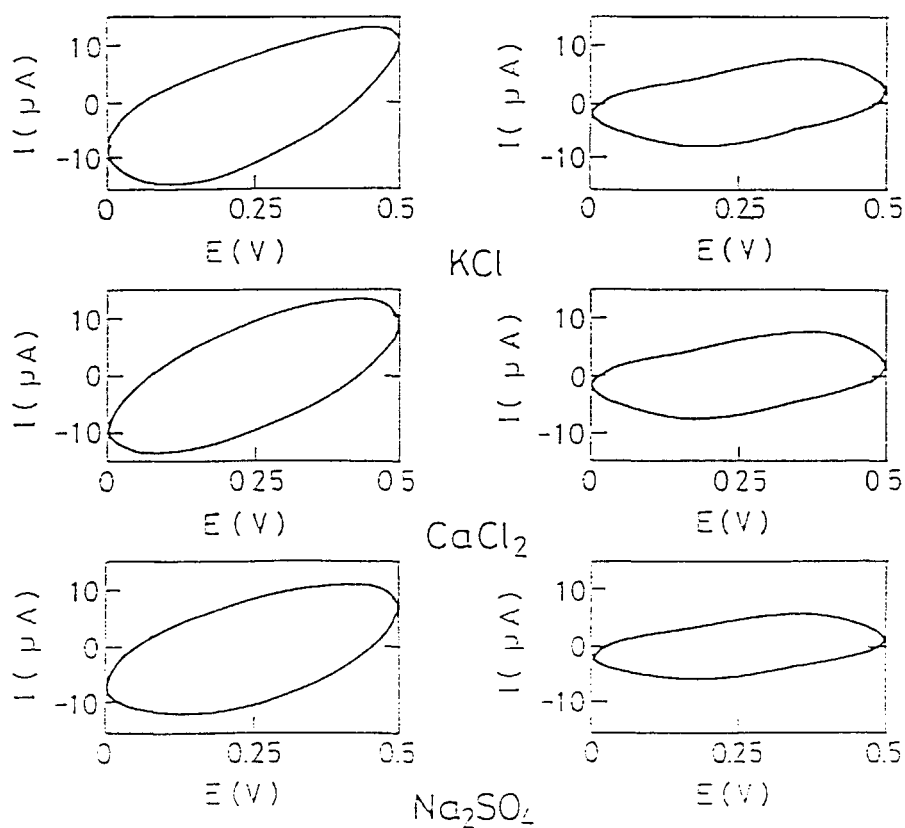


Fig. 3-3-4 Current-voltage (I-E) loops for some aqueous salt solutions of 10meq./l
 left side; with a bare electrode
 right side; with a modified electrode

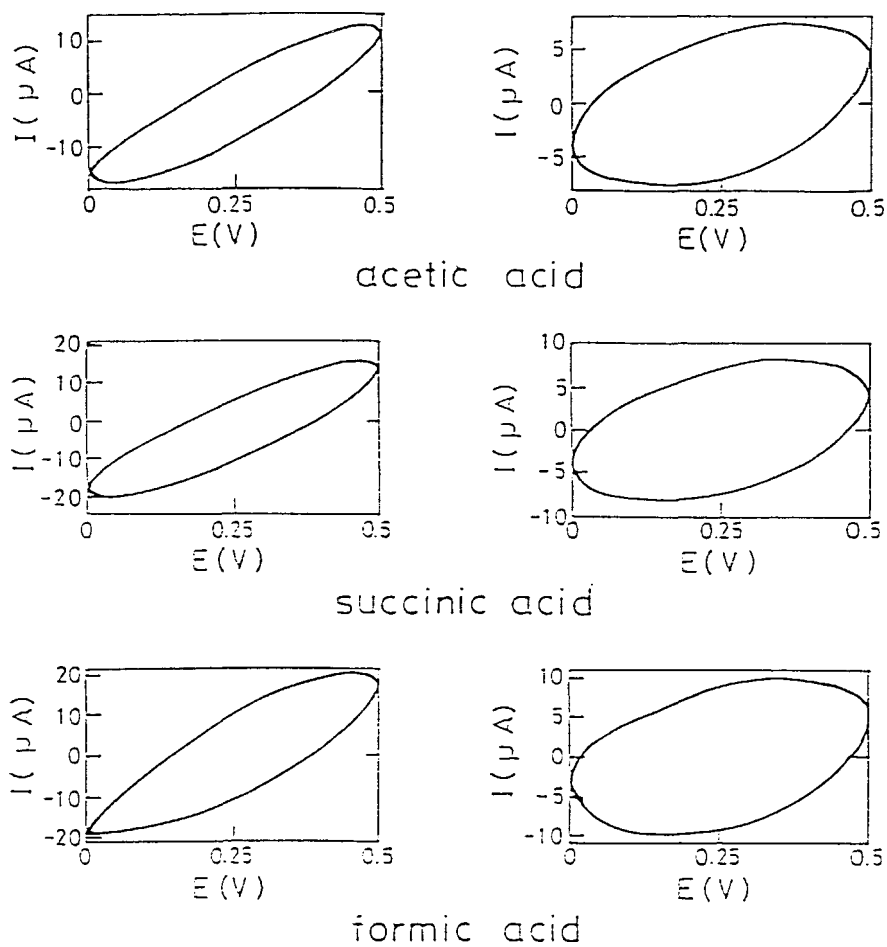


Fig. 3-3-5 Current-voltage (I-E) loops for some aqueous acid solutions of 10meq./l
left side; with a bare electrode
right side; with a modified electrode

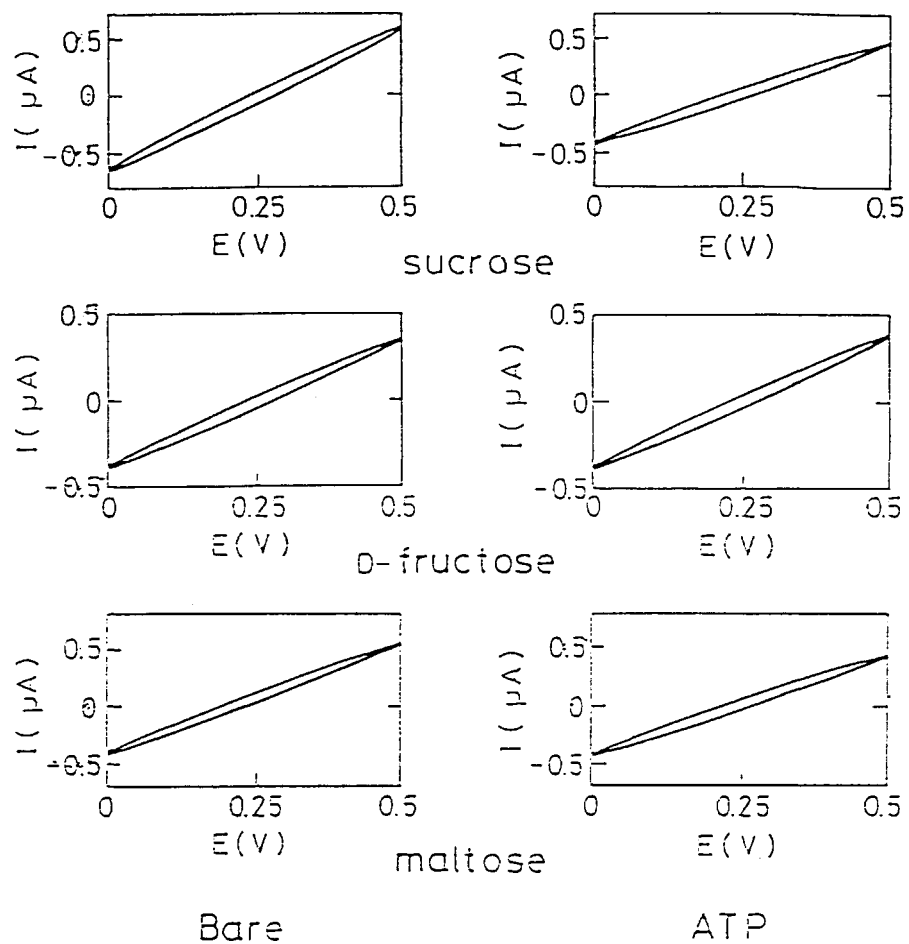


Fig. 3-3-6 Current-voltage (I - E) loops for some aqueous sugar solutions of 10meq./l
left side; with a bare electrode
right side; with a modified electrode

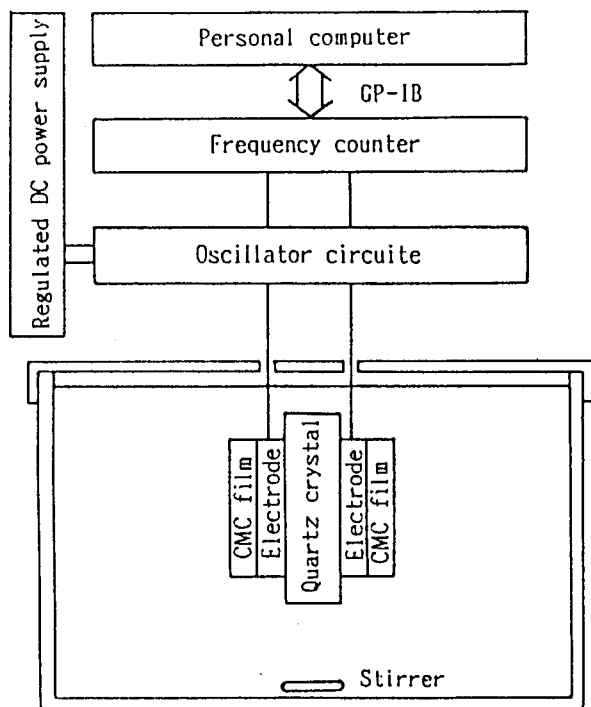
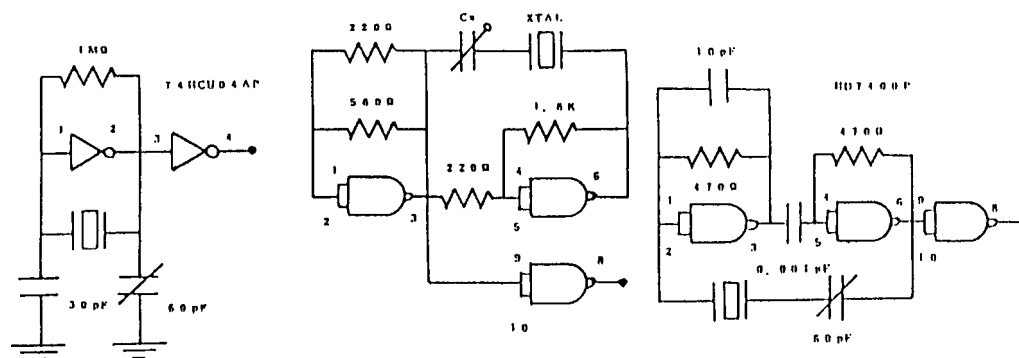


Fig. 3-3-7 Frequency measurement system.



A: c-MOS oscillator circuit, B: Normal TTL oscillator circuit, C: Normal TTL oscillator circuit.

Fig. 3-3-8 Oscillation circuit assemblies.

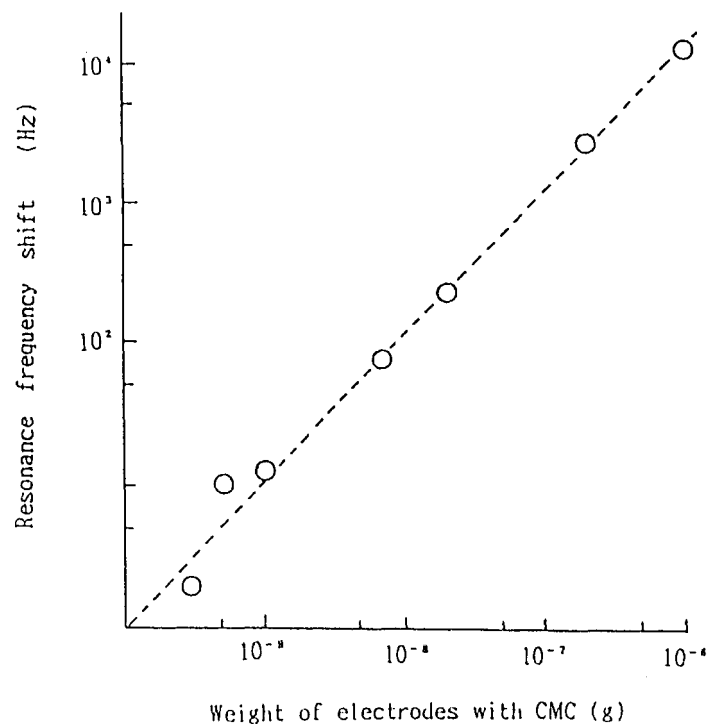


Fig. 3-3-9 Dependence of resonance frequency shifts on the weights of electrodes cast with CMC

Legend: ○: measured values. Dashed line is calculated from Equation (1).

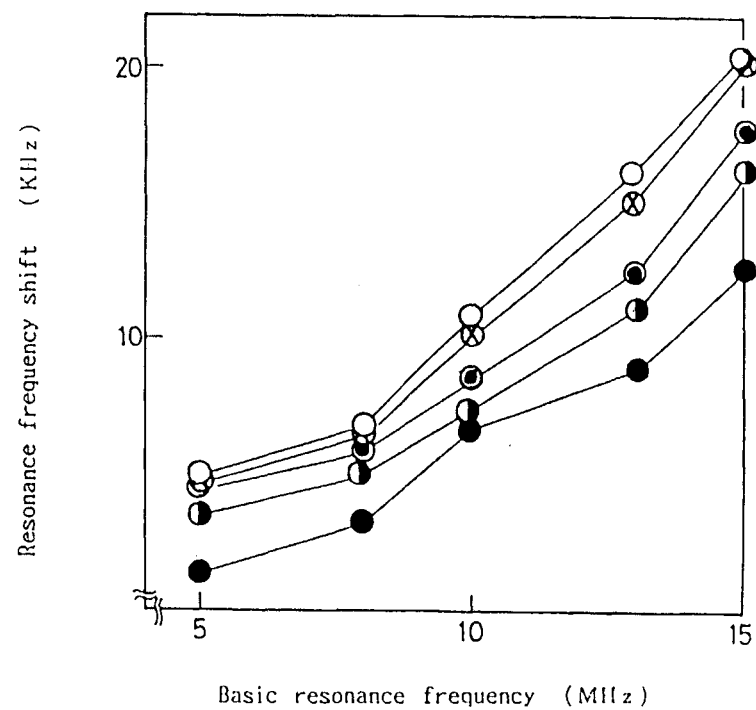


Fig. 3-3-10 Dependence of resonance frequencies on solvents.

Legend: ○: Water, ⊙: Ethyl alcohol, ●: n-Hexane, ◐: Acetone, ⊖: Benzyl alcohol.

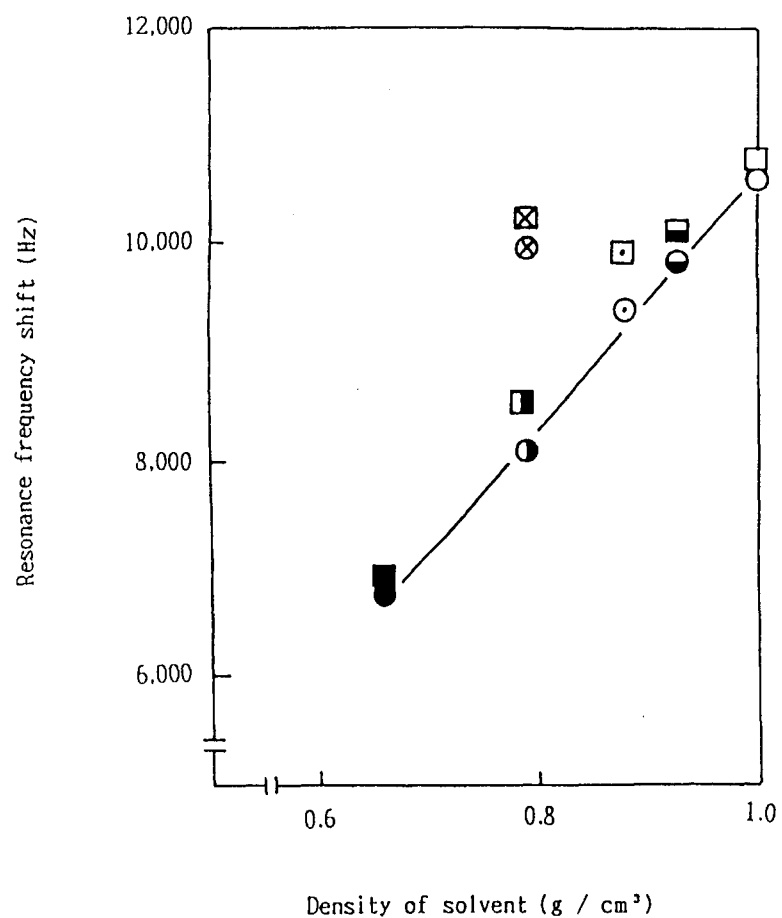


Fig. 3-3-11 Dependence of resonance frequency shifts of CMC cast electrodes and non-treated electrodes on the densities of the solvents used.

Legend : ■: n-Hexane, □: Acetone, ▣: Benzene, ▤: Benzyl alcohol, □: Water, ⦿: Ethyl alcohol. These symbols are the resonance frequencies of the CMC-cast electrode. Other symbols are the same as in Fig. 4.

Note : The values of densities for solvents are taken from a reference¹⁰⁾.

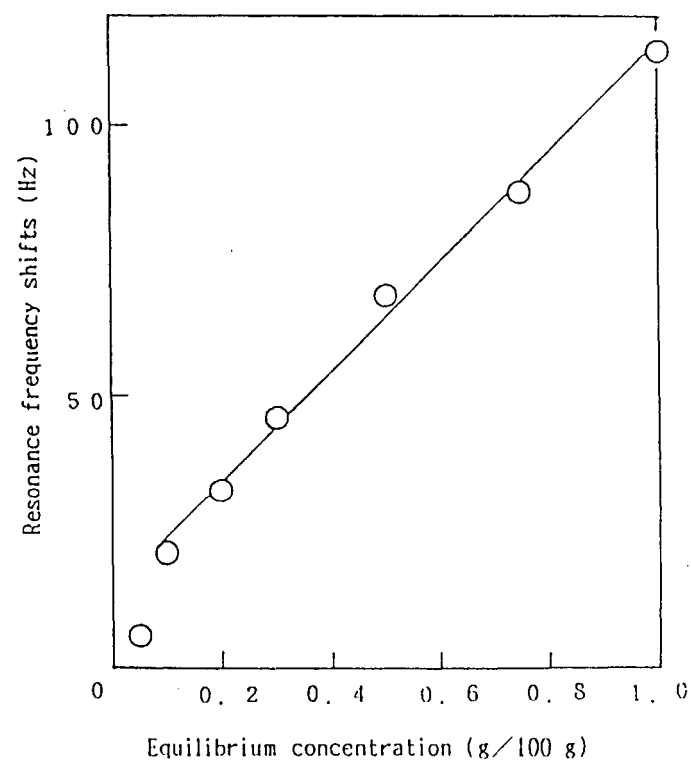


Fig. 3-3-12 Dependence of resonance frequency shifts on equilibrium concentrations for acrylic copolymer.

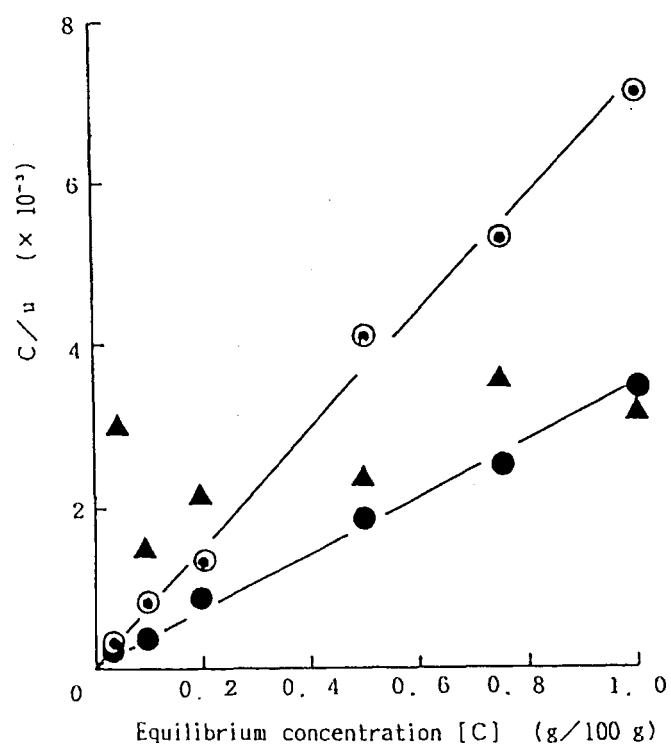


Fig. 3-3-13 Langmuir plots of adsorptions.

Legend: $\odot$: H-10 adsorbed on a CMC film, $\bullet$: H-40 adsorbed on a CMC film,
 $\blacktriangle$: non-cast electrode in copolymer solution (H-40).

Table 3-3-1 Synthesized copolymer series.

Designations	Monomer compositions (Weight ratios)	Weight-average molecular weights (M_w)	Number-average molecular weights (M_w)	Radii of gyration ($\text{\AA}$)	M_w/N_w
H - 0	MMA:2-HEMA 100:0	18.9×10^3	11.5×10^3	28.6	1.64
H - 5	MMA:2-HEMA 95:5	20.0×10^3	9.5×10^3	32.6	2.10
H - 10	MMA:2-HEMA 90:10	19.5×10^3	11.8×10^3	32.0	1.65
H - 20	MMA:2-HEMA 80:20	21.1×10^3	10.4×10^3	34.1	2.02
H - 40	MMA:2-HEMA 60:40	19.8×10^3	10.6×10^3	34.5	1.87
H - 50	MMA:2-HEMA 50:50	20.5×10^3	11.5×10^3	35.8	1.78

Note: Radii of gyration were calculated from intrinsic viscosities according to Flory's equation.

Table 3-3-2 Saturated amounts of adsorption on CMC films on electrodes.

Polymer series No.s	Saturated amounts of adsorption calculated from the values of resonance frequency shifts. (ng/cm^2)	Saturated amounts of adsorption calculated from radii of gyration in polymer solutions. (ng/cm^2)
H - 0	0	118
H - 5	122	91
H - 10	138	94
H - 20	173	83
H - 40	285	81
H - 50	306	75

3. 4 分子識別能をもつバイオ材料の創製とその安定化技術の研究開発

株式会社 クラレ

稲井公二、中路修平、檜垣達彦、和田徹

1. はじめに

ペプチドの安定化技術は分子識別能を有するバイオ材料を実用化する上で極めて重要な技術であり、本研究では分子識別能を有するタンパクをモデルとしたペプチドの合成とそのペプチドの安定化技術の開発を目標とする。平成4年度は合成するペプチドの一次構造の選定と評価手法の選定を行ない、その成果を以下に報告する。

2. 研究内容及び成果

2. 1 合成する一次構造の選定

分子識別能を有するペプチドの選定にあたり、モデルとなるタンパクを文献検索などにより選び出した。調査したモデルとなるタンパクと、それに結合する分子の組み合わせの例を表1に示す。タンパクと結合する分子には、タンパク分解酵素、レセプタ、集合体を形成するタンパク、ビオチン等の化合物などがあり、これらの物質と結合するタンパクの結合部位をモデルとしたペプチドを合成し、分子識別能を有するペプチドを探索する方法が適していると考えている。ここでは、まずフィブリノーゲン (γ B鎖) とトロンビン、ヒルジンとトロンビンの組み合わせから検討することにした。

フィブリノーゲン γ B鎖 (文献1) とヒルジンのアミノ酸配列 (文献2) を表2に示す。フィブリノーゲン γ B鎖のアミノ酸配列436-453とヒルジン54-65がトロンビンを阻害することが報告されており (文献3)、これらのアミノ酸配列を参考にペプチドを合成しトロンビン分子の識別能を後述する方法で調べた。

また、トロンボモジュリンとトロンビンとが結合すること、プラスミンとフィブリノーゲンとが結合することなどが知られており、それらの結合部位のペプチドを作製することにより分子識別能を有するペプチドを得ることが可能である。表1に示すタンパクの一次構造を合成するペプチドの候補として選定した。

2. 2 ペプチドの合成

マルチピンペプチド合成法 (文献4、5) を用いペプチドを作製した。合成法の概略を図1に示す。なお、この合成法は多種類のペプチドを同時に合成でき、ピンに固定化された状態でペプチドが得られるなどの特長があり、本研究での分子識別ペプチドの1次スクリーニングに適している。

[試薬および方法]

Chiron社製MIMOTOPE DESIGN KIT、Cambridge Research Biochemicals社製活性エステル化F-mocアミノ酸を使用し、合成法はMIMOTOPE DESIGN KITのマニュアルに記載されている方法を用いた。

[合成したペプチド]

フィブリノーゲン γ B 442-453 TEYDSLYPEDDL

ヒルジン56-65 FEEIPEEYLQ

ポリグリシン(ネガティブコントロール) GGGGGGGG

上2つの配列は、トロンبینを阻害するペプチド(文献3)の配列を参考にし、アンチトロンبینIII等のトロンبین結合部位との相同性を考慮に入れ、合成する配列を決定した。

2. 3 分子識別能の評価法の選定

ペプチドの分子識別能の評価は、ペプチドに結合する分子を定量することにより可能で、分子識別される分子の溶液の中にペプチドを固定化したピンを浸漬することによって行なった。浸漬後の残存量と高塩濃度溶液中での溶出量の定量により検討した。ここでは分子識別ペプチドとして上記のフィブリノーゲン γ B 442-453、ヒルジン56-65、ネガティブコントロールとしてポリグリシンを用いた。

[試薬]

・緩衝液A(洗浄液も同成分)

100mM NaCl 10mM CaCl_2 50mM Tris (pH8.0)

・トロンبین液

2U/ml ウシトロンبین

1% ウシ血清アルブミン

100mM NaCl 10mM CaCl_2 50mM Tris (pH8.0)

・溶出液(0.1M、0.5M、1M、1.5M、2M、3M)

それぞれ0.1M、0.5M、1M、1.5M、2M、3M NaCl

1% ウシ血清アルブミン

10mM CaCl_2

50mM Tris (pH8.0)

[方法]

測定法の概略を図2に示すが、条件は以下の通りである。

1) ペプチドは上記マルチピンペプチド合成法で作製した。

2) トロンビンとの反応は37℃振とう下で行ない、吸着は1時間、洗浄は30分間、溶出は各液15分間の条件であった。また、ポリスチレン製96穴マイクロプレートを用い、各穴に150 μ l液を入れ行なった。

3) 残存あるいは溶出したトロンビンの測定は蛍光性合成ペプチド3093(ペプチド研究所製)を用い、Moritaらの方法により行なった(文献6)。(蛍光性合成ペプチド3093: Boc-Val-Pro-Arg-MCA)

[結果]

吸着後のトロンビン残存量を図3に、各溶出液へのトロンビン溶出量を図4に示す。フィブリノーゲン γ B442-453、ヒルジン56-65の両ペプチドで、図3では残存量の低下が、図4では溶出量の増加がみられ、残存量、溶出量いずれの測定によっても分子識別能(結合能)の評価が可能であることを示しているが、後者が感度も高くこれらの測定には適している。また、溶出液のNaCl濃度0.5Mで、結合しているトロンビンの大部分が溶出するが、原理的にみて高塩濃度の方が望ましいため、3M NaCl溶出液への溶出量を測定することにする。

トロンビンを使った場合の評価法をまとめると、トロンビンを吸着させた後洗浄し、3M NaClを含む溶出液で溶出し、その液中のトロンビン活性を測定する方法で分子識別能の測定が可能である。この方法により測定した結果を図5に示す。

このように分子識別能の測定は、吸着後の減少量から求めることも可能であるが、結合した分子を溶出させ、溶出量を測定する方法が感度が高く適している。溶出した分子の定量はタンパク分解酵素の場合は、蛍光性合成ペプチド等で活性を測定する方法が、その他のタンパクの場合酵素免疫測定法などが適しており、今後これらの評価法を用いることにした。

2. 4 安定性評価法の選定

ペプチドの分子識別能の低下は、加熱による分解やタンパク分解酵素による分解が主たる原因であると考えられており、その評価法の選定を行なった。

[方法]

加熱による分解は、蒸留水中で80℃4時間加熱後の分子識別能(結合能)の変化を測定することにより、タンパク分解酵素による分解は70 μ g/mlのパパイン溶液中に1時間インキュベーション後の分子識別能の変化を測定することにより行なった。分子識別能の測定は前項2. 3に示した方法で行なった。

[結果]

加熱後の分子識別能は約40～80%に低下し、タンパク分解酵素処理後の分子識別能

は15～80%に低下した(図6)。ペプチドの種類により安定性の差は認められるが、このような方法で安定性の評価が可能である。

3. おわりに

本年度は、タンパク分解酵素等と結合するタンパクをモデルとした分子識別ペプチドの一次構造の選定、分子識別能の評価方法の選定や安定性の評価法の選定をした。

参考文献

- 1)Rixon, M.W.,et al.:Nucleotide sequence of the gene for γ chain of human fibrinogen. Biochemistry, 24: 2077, 1985
- 2)Dodt, J.,et al.:The complete amino acid sequence of hirudin, a thrombin specific inhibitor. Application of color carboxymethylation. FEBS Lett.,165: 180, 1984
- 3)Glen, L. et al.:Inhibition of thrombin's clotting activity by synthetic peptide segments of its inhibitors and substrates. Biochem. Biophys. Res. Commun. 169: 437,1990
- 4)岡橋暢夫,他:合成ペプチドを用いたエピトープの同定法ーエピトープスキャン法. 実験医学,10:2117,1992
- 5)Geysen, H. M. et al.:Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. J. Immunol. Methods,102:259,1987
- 6)Morita. T. et al. :New fluorogenic substrates for .alpha.-thrombin, factor Xa, kallikreins and urokinase. J. Biochemistry, 82: 1495, 1977

表1. タンパクを分子識別する物質

タンパク	タンパクを識別する物質
	(タンパク分解酵素)
フィブリノーゲン	トロンビン
ヒルジン	トロンビン
トロンボモジュリン	トロンビン
アンチトロンビンIII	Xa因子
フィブリノーゲン	プラスミン
α 1-アンチトリプシン	トリプシン
	(レセプタ)
フィブロネクチン	GPIIb IIIa
コラーゲン	GPIa
	(タンパク以外の化合物)
アビジン	ビオチン

表2 フィブリノーゲンおよびヒルジンのアミノ酸配列

(a) フィブリノーゲン γ B

Fibrinogen gamma-B chain - Human

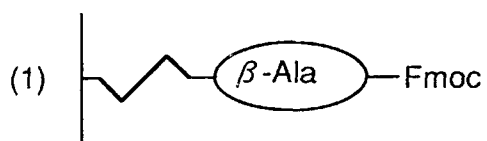
	5	10	15	20	25	30
1	M S W S L H P R N L I L Y F Y A L L F L S S T C V A Y V A T					
31	R D N C C I L D E R F G S Y C P T T C G I A D F L S T Y Q T					
61	K V D K D L Q S L E D I L H Q V E N K T S E V K Q L I K A I					
91	Q L T Y N P D E S S K P N M I D A A T L K S R K M L E E I M					
121	K Y E A S I L T H D S S I R Y L Q E I Y N S N N Q K I V N L					
151	K E K V A Q L E A Q C Q E P C K D T V Q I H D I T G K D C Q					
181	D I A N K G A K Q S G L Y F I K P L K A N Q Q F L V Y C E I					
211	D G S G N G W T V F Q K R L D G S V D F K K N W I Q Y K E G					
241	F G H L S P T G T T E F W L G N E K I H L I S T Q S A I P Y					
271	A L R V E L E D W N G R T S T A D Y A M F K V G P E A D K Y					
301	R L T Y A Y F A G G D A G D A F D G F D F G D D P S D K F F					
331	T S H N G M Q F S T W D N D N D K F E G N C A E Q D G S G W					
361	W M N K C H A G H L N G V Y Y Q G G T Y S K A S T P N G Y D					
391	N G I I W A T W K T R W Y S M K K T T M K I I P F N R L T I					
421	G E G Q Q H H L G G A K Q V R P E H P A E T E Y D S L Y P E					
451	D D L					

(b) ヒルジン

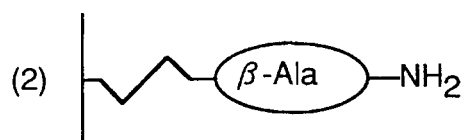
Thrombin inhibitor (hirudin) - Medicinal leech

	5	10	15	20	25	30
1	V V Y T D C T E S G Q N L C L C E G S N V C G Q G N K C I L					
31	G S D G E K N Q C V T G E G T P K P Q S H N D G D F E E I P					
61	E E Y L Q					

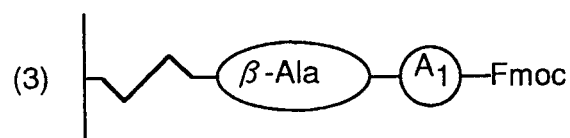
(以上のアミノ酸配列は国立遺伝学研究所のDDBJにより検索した)



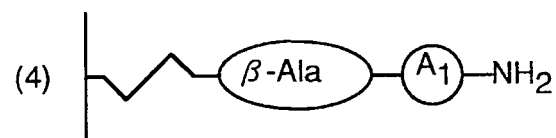
ピペリジンによるFmoc基の除去



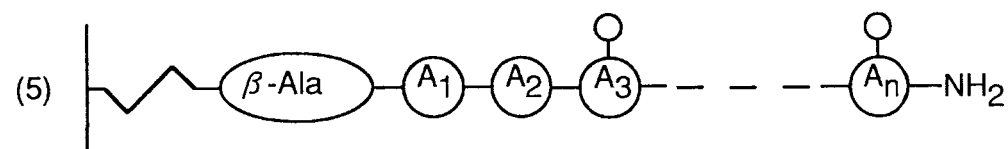
新しいFmocアミノ酸の縮合



ピペリジンによるFmoc基の除去



新しいFmocアミノ酸の縮合
(3)(4)を繰り返してFmocアミノ酸
を順次縮合



保護基を外す

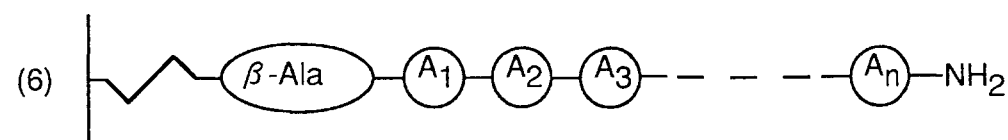


図1. マルチピンペプチド合成法

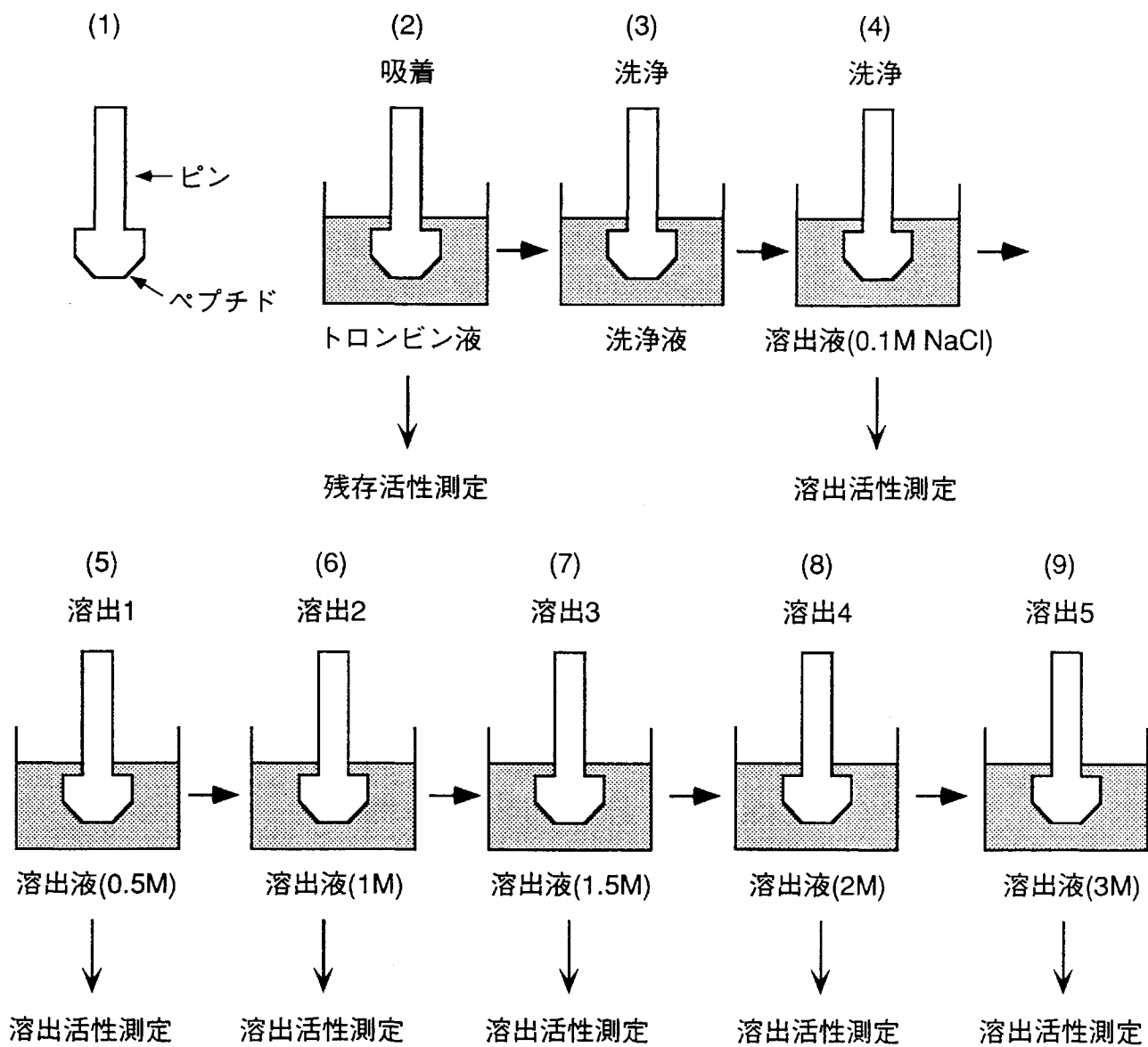


図2 トロンビン識別能の測定法

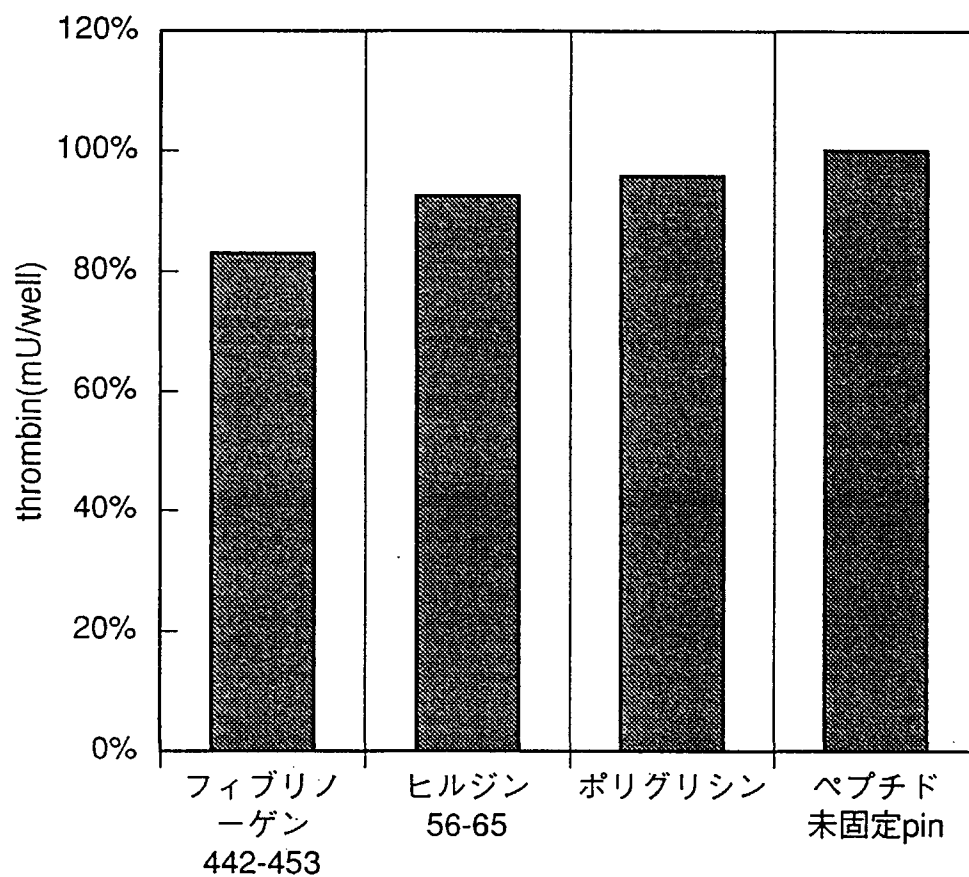


図3. ペプチド固定化ピンへのトロンビン吸着

0.3U/well(2U/ml)のトロンビン液に1時間浸漬した後の残存トロンビン活性

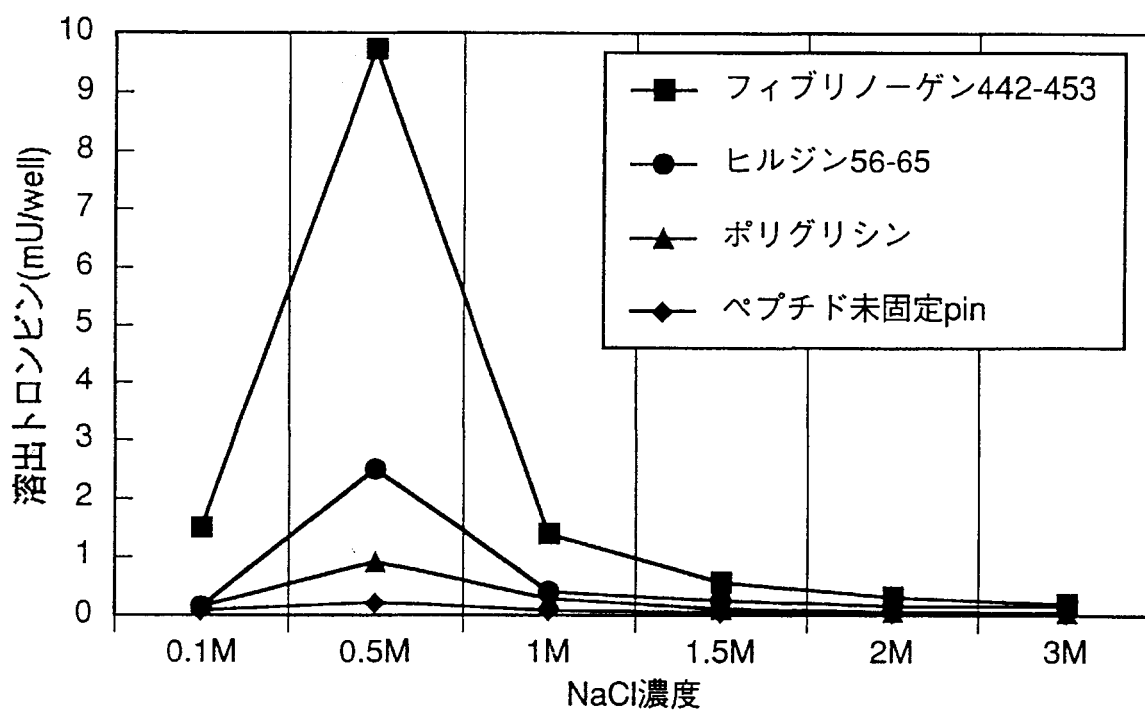


図4. 溶出液中のトロンビン量

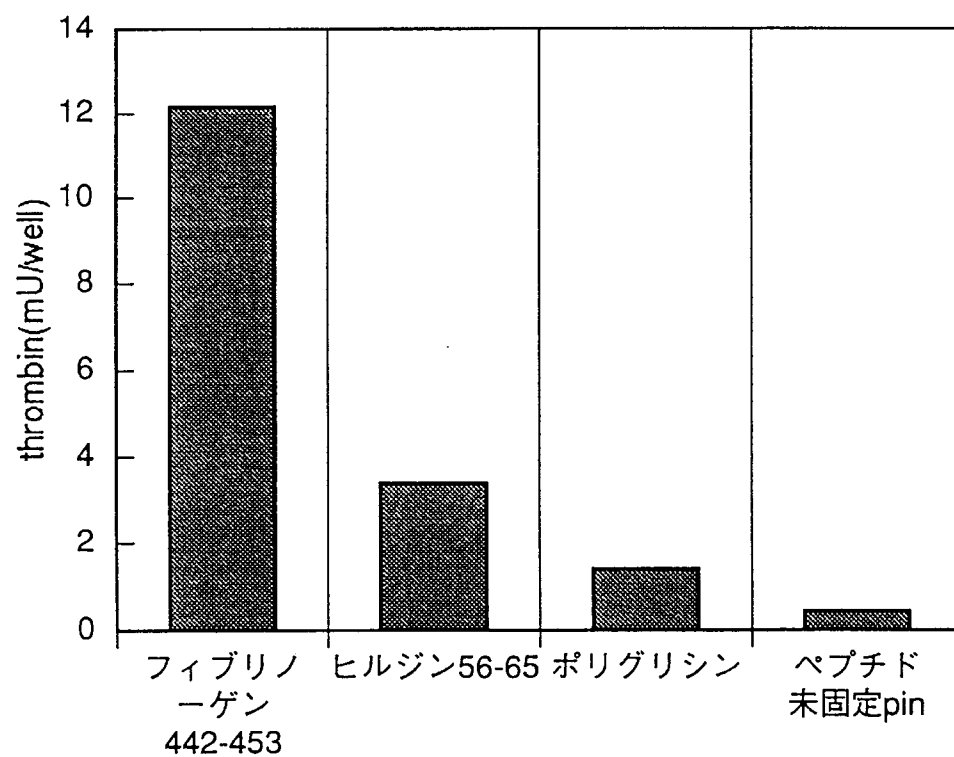


図5. 溶出液(3M NaCl)で溶出したときのトロンビン活性

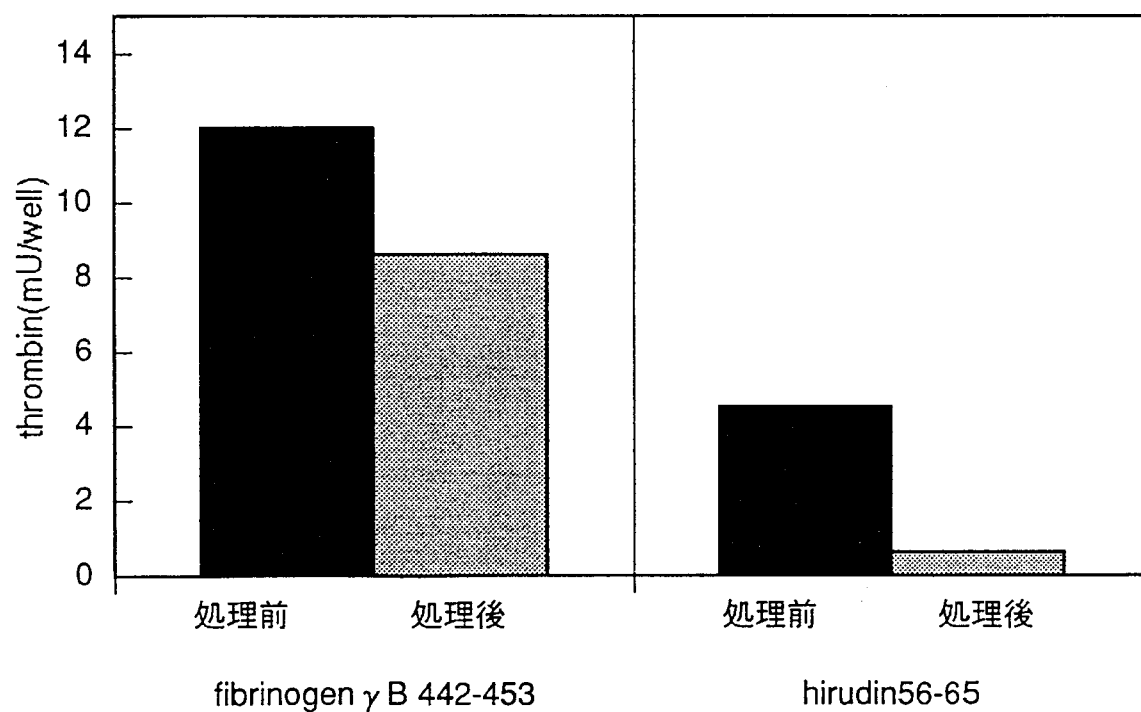


図6. パパイン(70 μ g/ml)で処理前後の分子識別能
トロンビンの吸着溶出により測定

4. 総合調査研究

4. 総合調査研究

(財)大阪科学技術センター

川原田 肇

駒田伊知朗

4-1. 総合調整委員会の組織と活動

4-1-1. 組織

総合調整委員会は、本プロジェクトを産・官・学が一体となって一元的かつ効率的に推進するために組織されたものでそのメンバー構成を資料1に示す。本プロジェクトのリーダーである大阪工業技術試験所の吉川暹生体分子工学研究室長を委員長として、研究を実施する各機関の研究者が主体になっているが、アドバイザーとして学界から2先生に参画していただいた。又、オブザーバーとして新エネルギー・産業技術総合開発機構の服部和治氏と近畿通産局の八島毅祐氏に可能な限り出席していただくようにした。

4-1-2. 活動

本年度は2回開催したので、それぞれの内容について以下に簡単に述べる。

4-1-2-1. 第1回委員会

平成5年2月1日に開催した。当日の議題は次の通りである。

- (1) 今までの経緯
- (2) 委員会の設置要綱
- (3) 本年度の研究計画
- (4) 分子設計装置について
- (5) 研究実施状況
- (6) 今後の取り組み

以上の課題について報告、説明、討議を行い、プロジェクト全体の状況の把握と今後の課題についての全員の意思統一が出来た。

4-1-2-2. 第2回委員会

平成5年3月29日に開催した。当日の議題は次の通り。

- (1) 事務手続進捗状況
- (2) 研究実施状況
- (3) 工技院実行協議用資料
- (4) 電子メールの導入

以上の議題について報告、説明、討議を行ったが、ほぼ順調に研究が進捗していることが確認された。又、次年度の基本計画となる工技院実行協議用資料の説明が吉川委員長より行われた。

4-2. 先進バイオ材料に関する文献調査

本年度の調査研究は「先進バイオ材料の技術動向」というテーマで従来技術について調査する計画になっている。先進バイオ材料の材料の素材はペプチドであるので、ペプチドに関する確立された技術と知見を中心に調査することにした。調査は大きく2つに分けて行った。一つは従来技術を短期間に容易に把握できる総説の収集と選択であり、もう一つは短鎖の天然ペプチドのリスト作成である。以下、それぞれについて記す。

4-2-1. ペプチドに関する総説の収集と選択

本プロジェクトを遂行するにはペプチドに関する様々な要素技術が必要であり、研究実施体制もそのように作られている。従って調査も各要素技術について行う必要がある。そのような観点から次の項目について総説を中心に集めることにした。

- ・ペプチドの構造設計
- ・ペプチドの合成技術
- ・非天然アミノ酸の合成とペプチドへの取り込み
- ・ペプチドの構造解析
- ・ペプチドの生理活性
- ・ペプチドの材料化と機能発現

これらの項目について、最近の和雑誌を中心に調査し、計15の総説と報文を選択した。以上の項目の他に、本プロジェクトの基本構想を示した吉川氏の小論文を序章とし、後述の天然ペプチドリストを巻末に付して別冊の「調査報告書」とした。その構成は資料2の通りである。

4-2-2. 天然ペプチドの情報検索

ペプチドに関する技術群の総括的理解とともに、既知の天然ペプチドにどのようなものがあるのかを完全に把握することも本プロジェクトの研究を進める際の基礎情報として有意義であると考えて文献検索を行った。ペプチドの大きさについての定義は定かではないが、今回は30アミノ酸以下について調査した。調査項目は、名称、配列、文献、keywordとした。

検索は(財)蛋白質研究奨励会に依頼したが、同財団では既にかかなり整理した形で情報が収集、保管されていたので、それを有効に利用させて貰った。詳しくは「調査報告書」に述べられているが、その内容は次の通りである。

1. はじめに
2. 検索の方法
3. 遺伝子の核酸の配列によって配列の決められているペプチド
 - 3-1 天然ペプチドの配列長分布
 - 3-2 ペプチドの生物種による分類
 - 3-3 全ペプチドのリスト
4. 遺伝子の核酸の配列によって配列の決められていないペプチド
5. おわりに

「調査報告書」にも記されているように、文献名、keyword等から成る抄録は、研究者が利用し易いようにフロッピーディスクの形で「調査報告書」巻末に添付した。

4-2-3. まとめ

先進バイオ材料の技術動向調査として、ペプチドに関する従来技術の総説を中心とする文献の収集選択と30アミノ酸以下の全天然ペプチドのリスト作成を行った。そして、これらについて別冊の「調査報告書」としてまとめた。

先進バイオ材料研究開発センター総合調整委員会名簿

(五十音順、敬称略)

委員長

大阪工業技術試験所	有機機能材料部生体分子工学研究室長	吉川 暹
-----------	-------------------	------

(官界)

大阪工業技術試験所	有機機能材料部生体分子工学研究室主任研究官	湯元 昇
大阪市立工業研究所	所長	富永 嘉男
兵庫県立工業技術センター	開発部長	新井 祥文

(学界)

大阪大学	理学部 生物学科 助教授	後藤 祐児
大阪府立大学	工学部 応用化学科 助教授	上原 赫

(産業界)

(株)イオン工学研究所	研究部 第三プロジェクト 室長	江原 襄
鐘淵化学工業(株)	総合研究所 中央研究所 主席研究員	谷 敍孝
協和発酵工業(株)	四日市研究所	清水 幾夫
(株)クラレ	倉敷工場 メディカル研究開発室 主任研究員	中路 修平
サントリー(株)	(財)サントリー生物有機科学研究所 主任研究員	大船 泰史
田辺製薬(株)	応用生化学研究所 主任研究員	沼波 憲一

(団体)

(財)大阪科学技術センター	技術振興部 主席調査役	川原田 肇
(財)蛋白質研究奨励会	ペプチド研究所研究部 主任研究員	豊島 正

(資料2)

はじめに

(財)大阪科学技術センター 会長 成松 啓 二

序 章：ペプチド工学の展望

吉川 暉「ペプチド工学の可能性」Bioindustry、36. 5-6 (1992)

第1章：ペプチドの構造設計

赤松美紀、藤田稔夫「オリゴペプチドの疎水性の解析と予測」有機合成化学協会誌、49. 836-845 (1991)

第2章：ペプチドの合成技術

相本三郎「蛋白質の化学合成」蛋白質核酸酵素、37. 410-418 (1992)

豊島 正他「Total Synthesis of Nephritogenic Glycopeptide, Nephritogenoside」Tetrahedron Lett., 33. 363-366 (1992)

室 哲雄、富永嘉男「プロテアーゼによるジペプチドの縮合反応について」科学と工業 63 (10). 430-437 (1989)

第3章：非天然アミノ酸の合成とペプチドへの取り込み

大船泰史「Stereoselective Routes toward the Synthesis of Unusual Amino Acids」Accounts of Chemical Research, 25. 360-366 (1992)

菊川 正、田井 晰「不均一立体区別触媒による光学活性物質の合成とファインケミカルズへの利用」触媒、34. 182-190 (1992)

宍戸昌彦「非天然アミノ酸の生化学系への取り込み」ペプチド工学研究会講演要旨 (1992)

芝 哲夫「Chemistry of Lantibiotics」New Aspects of Organic Chemistry II、429-454 (1992)

第4章：ペプチドの構造解析

高尾敏文、下西康嗣「FAB質量分析の実際とペプチド・蛋白質一次構造解析への反応」生理物理、32. 41-45 (1992)

後藤祐児「球状蛋白質のモルテン・グロビュール状態」生理物理、31. 8-13 (1991)

第5章：ペプチドの生理活性

上野民夫「植物に活性を示すペプチドとその周辺」ペプチド工学研究会講演要旨 (1992)

第6章：ペプチドの材料化と機能発現

上原 赫「光電変換機能材料」ペプチド工学会研究会講演要旨(1992)

B.O'Regan & M.Gratzel「A low-cost,high-efficiency solar cell based on dye-sensitized colloidal TiO_2 films」Nature, 353. 737-739 (1991)

中路修平他「Development of Specific Immunoabsorbent Containing Immobilized Synthetic Peptide of Acetylcholine Receptor for Treatment of Myasthenia Gravis」

Proceedings of 4th International Congress of the World Apheresis Association (1992)

第7章：天然ペプチドの情報検索

川原田肇、駒田伊知朗

5. ま と め

大阪工業技術試験所

吉 川 暹

平成4年度の研究計画のうち機能性分子の創製の項目では、主として非天然アミノ酸や機能性分子の選択とその合成へのフィージビリティの確認を行う点が課題であった。また、機能性分子の材料化技術の項目では、基板の選択と手法の選定を行うことが目標であった。この様な計画のもとに実施された各テーマの成果の概要は以下の通りである。

まず、ペプチドの構造機能設計の研究では、機能性ペプチドのモデルとなる低分子化合物を選び、その構造解析を行った。ついでそのペプチド化のための分子設計手法の選定に着手した。

配座制御技術の研究では、グルタミン酸の6員環アナログ等を配座制御アミノ酸の候補として選びその合成ルート、保護基の選択等についての検討を行った。

光・電子機能をもつペプチドの研究では、色素置換非天然アミノ酸としてスクアリウム色素を選定し、その合成方法の確立を図った。

酸素方によるペプチド合成の研究では、水系での合成活性が強く気質選択性と高いペプチド結合活性を持つ微生物起源の酵素の検索方法の確立と目的菌の選択を中心に検討が行われた。

非天然アミノ酸のペプチドへの導入方法の研究では、不安定アミノ酸のモデルとして糖鎖結合アミノ酸に着目しその合成と保護基の導入を図った。

基板形成技術の研究では、光電子機能を持つバイオ材料の基板として酸化チタンを選び、これへの含浸法による銅の担持を行った。この基板は二酸化炭素固定化に対して触媒活性を有し、高いメタノール生成能を持つことがわかった。また、金電極上に3-メチルチオフェンの電解重合膜を基盤として調整し、その微細構造を走査型電子顕微鏡により観察した。

基板修飾技術の研究では、基板に固定するモデルペプチドとしてLDLリセプターを選定し、そのフラグメントの合成及び単離を行った。また、基板としては合成高分子を選び、ペプチドの位置選択的な固定化のための光化学的方法のフィージビリティスタディーを実施し実現性への目処を得た。

ペプチドの結合試薬の研究では、ペプチドを固定するための基板として高分子及び導電性基板を想定し、アリール基やチオール基の結合試薬としての可能性を検討した。

分子識別能をもつバイオ材料の創製とその安定化技術の研究では、トロンビン分子を分子識別の対象として選び、対となるペプチドの一次構造を選定し、そのいくつかについて合成を行った。またその分子識別能の評価手法についても確立を図った。

以上のように、平成4年度の研究期間は実質的には3ヶ月強であったにもかかわらず、各機関ともに所期の目的を達成し、バイオ材料の創製対象や手法の選定がなされると共に研究開始に向けた実質的な取り組みがなされ、所期の成果が得られた。

先進バイオ材料の創製加工技術の研究開発成果報告書

平成 5 年 3 月発行

編集・発行 財団法人 大阪科学技術センター

〒550 大阪市西区靱本町 1 - 8 - 4

財団法人 大阪科学技術センター

T E L 06(443)5321

F A X 06(443)5319

禁無断転載