

## 両性イオン構造のL-リジンを側鎖にもつポリメタクリルアミドの調製とアルブミンとの相互作用

白石浩平\*・光田益士\*・杉山一男\*

### Preparation of zwitterionic polymethacrylamide modified with L-lysine and interaction to Bovine Serum Albumin

Kohei SHIRAIISHI\*, Masushi KOHTA\*, and Kazuo SUGIYAMA\*

#### Abstract

In order to develop a novel blood compatible material, zwitterionic polymer, poly(*N*- $\epsilon$ -methacrylamide-L-lysine) [poly( $\epsilon$ -LysMA)], was prepared as followed. (i) *N*- $\epsilon$ -methacrylamide-*N*- $\alpha$ -acetyl-L-lysine methylester was obtained from *N*- $\alpha$ -acetyl-L-lysine methylester and methacryloyl chloride. (ii) the monomer was radically polymerized with 2,2'-dimethylazobisisobutyrate in absolute ethanol at 60°C for 20h. (iii) After deprotecting the resulting polymer with NaOH aq, zwitterionic poly( $\epsilon$ -LysMA) was neutrized, dialyzed with cellulose membrane against water and freeze-dried to give a white powder. The interaction between zwitterionic poly( $\epsilon$ -LysMA) and bovine serum albumin was also examined by fluorescence spectroscopy and using resonant mirror biosensor(LAsys).

*Key Words* ; L-lysine / zwitterionic polymer / blood compatible material / fluorescence spectroscopy / LAsys resonant mirror biosensor / albumin

#### 1. 緒言

体内に挿入され血管造影などの診断目的に利用されている医療器材カテーテルは、近年、薬剤注入や血管狭窄部の拡張など血管内治療として先進的な治療に応用が進んでいる。本技術を支える基盤は生体機能性と生体適合性を両得できるカテーテル材料および製法である。現在、ポリエチレン、ポリウレタン、ナイロン、テフロンなどの人工ポリマー材料が優れた力学的特性や成形加工性あるいは可滅菌性をもつことから、カテーテルなどの医療用材料として利用されている<sup>1-3)</sup>。一方、これら材料は生体適合性(抗血栓性)を獲得するため、ヘパリン等生体由来の抗凝固剤が使用されるが、抗凝血作用の発現には材料表面からの血中への溶出が必要で、しばしば出血傾向となる副作用を示す<sup>4)</sup>。また、ヘパリンは血漿タンパク質アンチトロンビン III (ATIII) との複合体形成によって抗血

栓性を発現するため、低 ATIII 血漿では抗凝固能を発現しにくいなどの問題もある。従って、医療器材としてこれらポリマー材料をさらに普及・拡大し、先端医療に至る利用を促すには、適用範囲が広くかつ安全性に優れた安価な生体(血液)適合性材料の開発が急務とされる<sup>1,2)</sup>。

材料表面に高いレベルの抗血栓性を獲得するためには血漿タンパク質の吸着・変性の抑制、血小板粘着抑制などの血液の異物反応を起させない表面の構築が必要で、例えば、細胞膜の表面を構成する両性イオン構造をもつ poly[2-(methacryloyl)ethylphosphorylcholine] [poly(MPC)] は血漿タンパク質の吸着・変性を抑制する等の生体膜類似機能を示し、poly(MPC) で表面改質された材料は優れた血液適合性を示すことが報告された<sup>5-9)</sup>。一方、poly(MPC)の両性イオン構造に類似し、イオンの結合・解離が可能な両性イオン構造をもつ

\*近畿大学大学院工業技術研究科物質化学専攻

Program in Material Chemistry, Graduate School of Industrial Technology, Kinki University.

ポリマー材料にも同様な血液適合性が期待されることから、両性イオン構造のアミノ酸 L-Serine を修飾した poly(*O*-methacryloyl-L-serine) [poly(SerMA)] が調製された。両性イオン構造の SerMA を一成分とするコポリマーは、血漿タンパク質の吸着抑制のみならず Adenosine-5'-diphosphate による血小板凝集を阻害する等の生体親和性を示すことを報告している<sup>10-11)</sup>。さらに poly(SerMA)は pH に応答してポリマー側鎖のイオン化状態が変化して鎖全体の正負荷電が変化する両性電解質ポリマーで、血液の主成分で吸着により血小板付着を抑制するアルブミンを変性することなく相互作用することも示された<sup>12)</sup>。

本研究では、両性イオン構造をもつアミノ酸ユニットを担持したポリマーの生体適合性に関する研究の一環として poly(SerMA)の構造類似体で、アミノ酸と重合性官能基との結合がエステル結合よりも親水性の高いアミド基をもつ poly(*N*- $\epsilon$ -methacrylamide-L-lysine) [poly( $\epsilon$ -LysMA)] を新規に調製し、ウシ血清アルブミン(BSA)との相互作用を蛍光分光法ならびに共鳴ミラー法による生体分子間相互作用解析 (IASys) から検討した。

## 2. 実験

### 2-1. 試薬

*N* $\alpha$ -acetyl-L-lysine methylester hydrochloride (Ac-Lys-OMe $\cdot$ HCl; 渡辺化学) は市販品をそのまま使用した。メタクリル酸クロリド (東京化成, b.p. 38°C / 90 mmHg) は減圧蒸留して直ちに反応に使用した。重合開始剤 2,2-dimethylazobisisobutyrate (MIBE; 和光純薬)は石油エーテルから再結晶して用いた。Ethanol, *N,N*-dimethylformamide (DMF), triethylamine (TEA) などの溶媒類は常法に従って精製したのち使用した。ウシ血清アルブミンは (BSA; SIGMA) は市販品をそのまま使用した。また、phosphate buffer saline (PBS, ピアース) は市販の調製キットを超純水に溶解して作製した。

### 2-2. poly( $\epsilon$ -LysMA)の合成

塩化カルシウム管を備えた還流冷却管および滴下ロートを備えた 200 mL の 4 つ口フラスコに Ac-LysMA-OMe (13mmol), TEA (40mmol) を精製 DMF120mL に溶解した。氷冷下で 30 mL の DMF に溶解したメタクリル酸クロリド (20mmol) を約1時間かけて滴下した後、さらに室温で約 5

時間反応した。生成したトリエチルアミン塩酸塩をろ過後、ろ液を減圧下に濃縮乾固した。残渣に 50 mL のヘキサンを加えて得た白色粉末結晶をろ過、真空乾燥後  $\alpha$ -アミノ基およびカルボキシル基が保護されたモノマー, *N*- $\alpha$ -acetyl-*N*- $\epsilon$ -methacrylamide-L-Lysine methyl ester (Ac-Lys-MA-OMe) を得た。収率: 81.31%。m.p. 70.1~72.5°C,  $[\alpha]_D^{25} = 15.2^\circ$ 。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 1.4 [s, 2H, -CH<sub>2</sub>], 1.6 [s, 2H, -CH<sub>2</sub>], 1.8 [d, 2H, -CH<sub>2</sub>], 1.9 [s, 3H, -CH<sub>3</sub>], 2.0 [s, 3H, -CH<sub>3</sub>], 3.3 [d, 2H, -CH<sub>2</sub>], 3.8 [s, 3H, -CH<sub>3</sub>], 4.5 [s, 1H, -CH<], 5.4 [s, 2H, =CH<sub>2</sub>], 5.8 [s, 2H, =CH<sub>2</sub>], 6.1 [br, 1H, -NH-], 6.5 [s, 1H, -CONH-]。元素分析: C<sub>19</sub>N<sub>2</sub>H<sub>34</sub>としての計算値: C : N : H = 57.79% : 8.14% : 10.37%, 実測値: C : N : H = 57.10% : 8.32% : 9.63%。

次に, Ac-LysMA-OMe(13mmol)と MIBE(0.13mmol)を 15 mL の無水エタノールに溶解し, 60°C で 20h 振り混ぜながら重合した。減圧下に溶媒を留去して得た残渣から熱ヘキサンを用いて未反応モノマーを抽出したのち, ろ過, 真空乾燥して, 白色粉末状のポリマーを得た。得られたポリマーは 2N NaOH 水溶液に加えてかき混ぜながら室温で 24 時間反応して脱保護した。さらに, ポリマーの等電点付近まで 0.1N 塩酸で中和した後, アセチルセルロース製透析膜 (分画分子量: 3500, Cell-Sep™ : MWCO: 3500, Membrane Filtration Products, Inc.) で超純水を用いて, 透析外液の電気伝導度がほぼ超純水の値になるまで 14 日間透析したのち, 凍結乾燥して白色粉末の poly( $\epsilon$ -LysMA)を得た。

### 2-3. 相転移温度

1wt.%のポリマー水溶液をガラス製キュベット (光路長 10mm) に入れ, 温度調整器を備えた紫外可視分光光度計 (Shimadzu 製紫外可視分光光度計 UV160A) に静置した。測定は室温付近から 0.5°C ずつ昇温させ, 各温度で 10min 間保持した後, 600nm の透過率測定から下限臨界共溶温度 (LCST) を求めた。

### 2-4. 蛍光測定

0.05 wt.%の BSA を含む PBS 溶液に poly( $\epsilon$ -LysMA) 0.05 wt.%の PBS 溶液 (pH = 5.7) を加えたのち, 温度調整器を備えた Shimadzu 製蛍光分光光度計 RF-1500 を用いて, 37°C で 280nm の励起光による蛍光 (350nm) 強度変化を追跡した。

## 2-5. 生体分子間相互作用解析

poly( $\epsilon$ -LysMA) と BSA との相互作用は共鳴ミラー法を用いる生体分子間相互作用解析装置 (IASys : Affinity Sensors, Saxon Hill Cambridge, UK) を用いて 25°C で検討した<sup>13)</sup>. 0.1M の *N*-hydroxysuccinimide (NHS) と 0.4M の 1-ethyl-3-(dimethyl-aminopropyl)carbodiimide (EDC) でカルボキシメチルデキストランキューベットのカルボキシル基を活性化した後, 10mM のギ酸緩衝液 (pH = 5.0) に溶解した BSA (200  $\mu$ g/ml) を 50  $\mu$ l 添加して BSA の N 末端による固定化を行なった. BSA 固定化における共鳴角変化から, 表面に約 1 ng/mm<sup>2</sup> の BSA を固定化したカルボキシメチルデキストランセンサーを得た. 次に LysMA ユニットに対して 5, 10, 20, 40mM 濃度の poly( $\epsilon$ -LysMA) を BSA 固定化キューベット上に加えて, 共鳴角の変化を追跡した. 相互作用解析後, 100mM の glycine-HCl (pH = 4.0) 溶液を添加して poly( $\epsilon$ -LysMA) を解離させた. 結合・解離パラメータは Fast Fit software (Affinity Sensors) を用いて求めた.

## 2-6. 機器分析

元素分析は acetanilide (WAKO) を標準試料として SiberHenger 製 VarioEL で測定した. ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) は TOSOH  $\alpha$  4000, 3000, 2500 カラムを用いて酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 (pH = 5.5) を移動相として polyethyleneglycol 換算で分子量を求めた. pH はガラス電極を用いて MettlerTOLEDO MA235 pH/ion アナライザで測定した. 比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$  は JascoP-1020 を用いて測定した.

## 3. 結果と考察

### 3-1. poly( $\epsilon$ -LysMA) の調製とキャラクタリゼーション

poly( $\epsilon$ -LysMA) の合成経路を Scheme1 に示す.  $\alpha$ -アミノ基をアセチル基, カルボキシル基をメチルエステルとして保

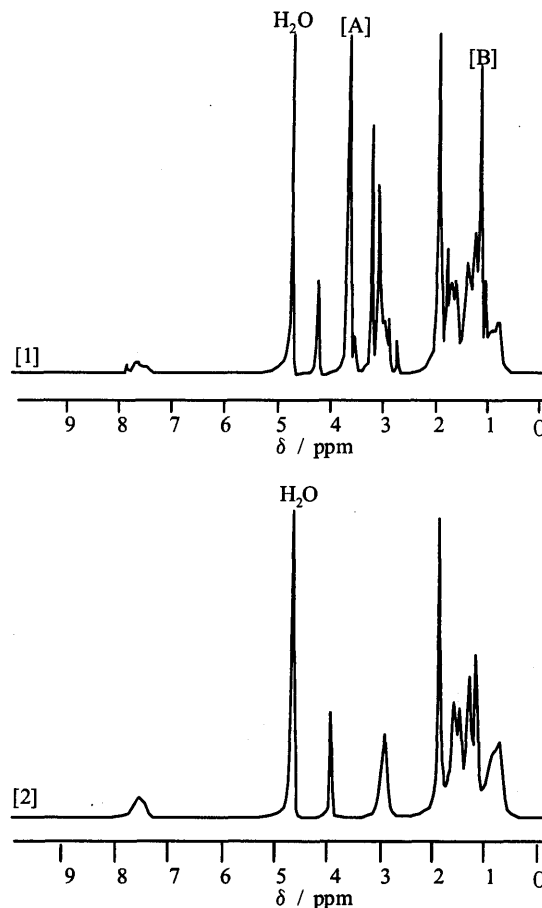
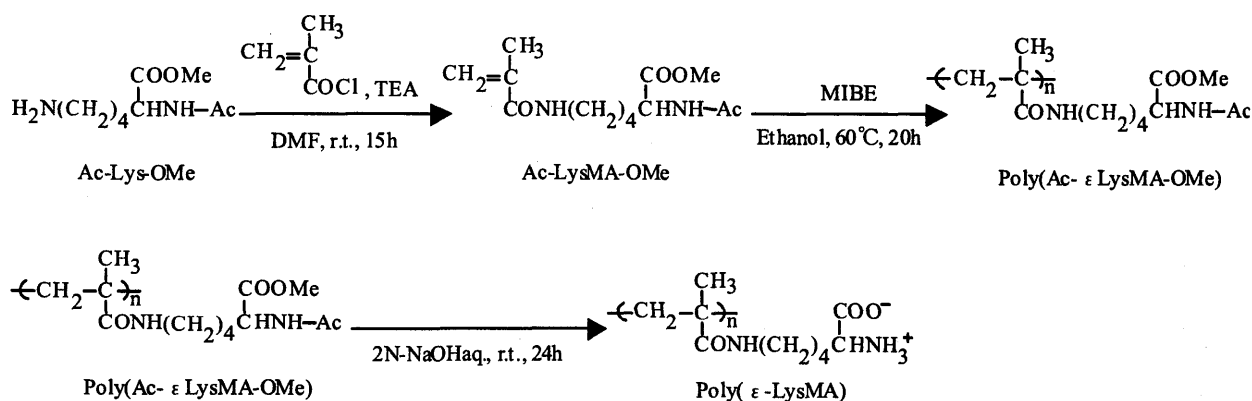


Fig.1 <sup>1</sup>H NMR spectra of poly(Ac-LysMA-OMe) [1] and poly( $\epsilon$ -LysMA) [2] in D<sub>2</sub>O at room temperature. [A] : methyl group, [B] : acethyl group.



Scheme1. Preparation of zwitterionic poly( $\epsilon$ -LysMA)

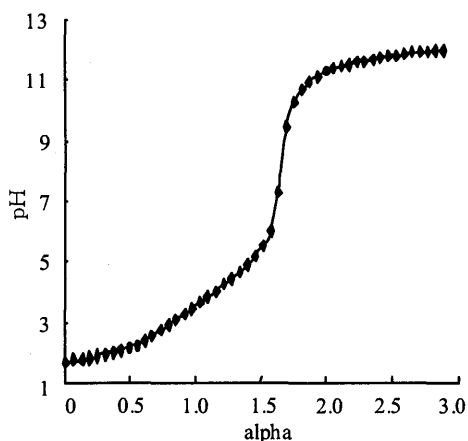


Fig.2 Titration curve of poly( $\epsilon$ -LysMA) solution in water in 0.1mol/l aqueous NaOH. Alpha represents the neutralization coefficient, [poly( $\epsilon$ -LysMA)]=0.1wt. %

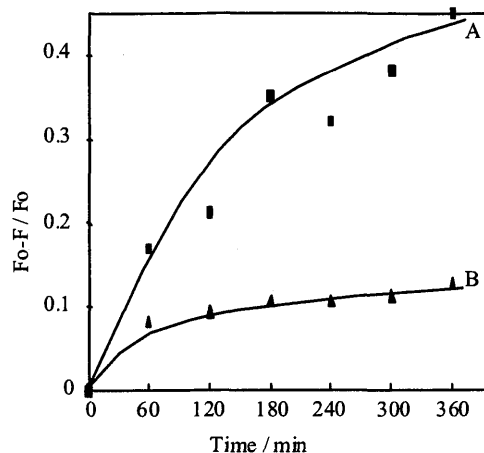


Fig.4 Time vs.  $F_0-F/F_0$  relations in the presence of poly( $\epsilon$ -LysMA) or PEG;  $F_0$  and  $F$  represent the fluorescence intensity based on BSA without polymer or that with polymer, respectively in PBS at 37°C. [Polymer]=0.05wt%, [BSA]=0.05wt%, at pH 5.7,  $\lambda_{EX}=280\text{nm}$ .

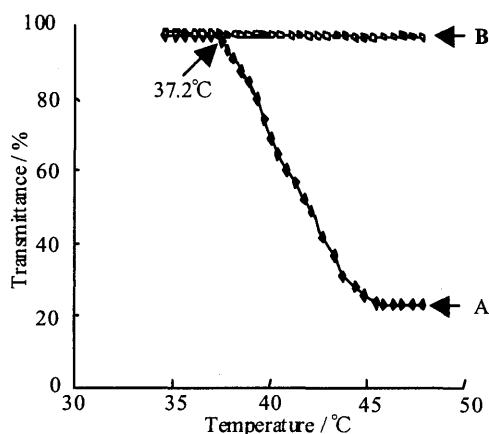


Fig.3 Effect of temperature on the transmittance of 0.5wt.% Polymers in water. A: Poly(Ac-LysMA-OMe), B: Poly( $\epsilon$ -LysMA)

護した L-Lysine と methacryloyl chloride を反応してモノマーを得た後、エステル系アゾ開始剤 MIBE を用いてラジカル重合して収率 97.44% でポリマーを得た。次に生成ポリマーを NaOH 水溶液で脱保護した。ポリマーの  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (Fig.1) から、メチル基およびアセチル基の保護基に由来するピークが脱保護後には消失した。また、脱保護前ポリマーは水、エタノール、クロロホルム、テトラヒドロフラン、DMF 等の有機溶媒に可溶でヘキサンに不溶であったが、脱保護後は水のみ可溶であった。脱保護後のポリマー分子量は 123,000 で pH 滴定から、poly( $\epsilon$ -LysMA) は pH 6.6 に等電

点をもつ両性電解質ポリマーであることを認めた (Fig.2)。poly( $\epsilon$ -LysMA) は光学活性をもつ両性イオン構造のポリマーで、遊離アミノ酸と同様に等電点付近で  $[\alpha]_D^{25}$  が変化する pH 応答性の光学活性ポリマーであった<sup>14)</sup>。なお、脱保護前のポリメタクリルアミドは水中約 40°C で下限臨界共溶温度 (LSCT) を示す温度応答性ポリマーであった (Fig.3)。

### 3-2. poly( $\epsilon$ -LysMA) と BSA との相互作用

生体親和性を認めた poly(SerMA) は BSA と結合性を示す両性電解質ポリマーであったことから<sup>12)</sup>、poly(SerMA) と類似して繰り返し単位あたりにアミノ基とカルボキシル基を同時に含む poly( $\epsilon$ -LysMA) の BSA との相互作用を検討した。所定量の BSA を含む PBS 溶液に poly( $\epsilon$ -LysMA) を添加時の時間と蛍光強度の変化を poly( $\epsilon$ -LysMA) 無添加 (control) および同濃度の polyethyleneglycol (PEG; Mw: 50000) 存在下と比較して Fig.4 に示す。ここで、 $F$  および  $F_0$  は測定開始から 60min 毎に測定した蛍光強度を示す。図から BSA 中の芳香族置換基の存在する環境変化を示す  $F_0-F/F_0$  は PEG, poly( $\epsilon$ -LysMA) の添加により増大し、その後ほぼ一定となっている。蛍光強度変化の増大は添加ポリマーと BSA が相互作用を示したためと考えられ、PEG よりも poly( $\epsilon$ -LysMA) は BSA との相互作用が強いと考えられる。BSA と相互作用をより詳しく検討するため、共鳴ミラーによる生体分子間相互作用解析装置 (IASys) による検討を行なっ

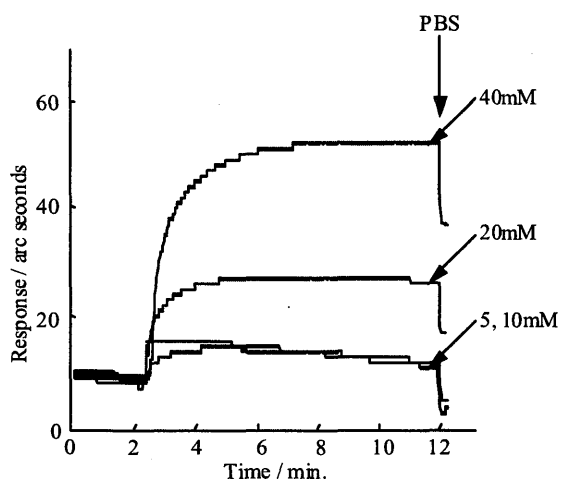


Fig.5 Binding assay between BSA and poly( $\epsilon$ -LysMA) using the IA sys resonant mirror biosensor. The concentration of poly( $\epsilon$ -LysMA) was varied ranging from 5, 10, 20, 40 mM for LysMA units at pH 7.4 in PBS at 25°C.

た. poly( $\epsilon$ -LysMA)中の LysMA ユニット濃度として 5~40mM の poly( $\epsilon$ -LysMA)を BSA 固定化カルボキシメチルデキストランキューベットに添加すると, 時間経過に伴う共鳴角の変化が認められ, 共鳴角は poly( $\epsilon$ -LysMA)濃度の増大とともに大きくなった. 一方, 100mM の PEG 添加では共鳴角が徐々に増加する特異的相互作用は認められなかった. また, 結合解析後に PBS を加えて解離挙動を検討した結果, 共鳴角は急激に減少した(Fig.5). 共鳴角の増大は BSA と poly( $\epsilon$ -LysMA)が特異的相互作用することを示し, PBS 置換にともなう急激な共鳴角の減少は結合解離と対応し, 結合が非共有結合的に生起していることも示す. カーブフィッティングによって求めた結合・解離パラメータは結合定数 ( $K_{ass}$ )  $3.0 \times 10^4$  ( $M^{-1}S^{-1}$ ), 解離定数 ( $K_{diss}$ )  $1.6 \times 10^{-2}$  ( $S^{-1}$ ), アフィニティ定数は  $5.2 \times 10^1$  ( $M$ ) であった. アルブミンには血小板を粘着させるレセプターがないこと, コロイド化学的反発によって血小板や他の分子を粘着・吸着しない性質が知られておる<sup>15, 16</sup>. 血漿中に多量に存在するアルブミンは材料との接触により瞬時に付着することにより材料に生体親和性が発現すると考えられる. BSA との有意な相互作用を示す両性イオン構造の poly(SerMA)は BSA の三次元構造の変化(変性)を認めていないことから, poly(SerMA)と構造が類似しエステル結合よりも親水性の高いアミド結合をもつ poly( $\epsilon$ -LysMA)にも poly(SerMA)同等あるいはそれ以上の生体親和性ポリ

マーとしての高い機能を発現が期待される. poly( $\epsilon$ -LysMA)の生体(血液)適合性の評価は構造異性体である poly( $N\epsilon$ -methacrylamide-L-Lysine)も含めて包括的に検討を進めている.

#### 4 結論

両性イオン構造の L-リジンを側鎖にもつポリメタクリルアミド poly( $N\epsilon$ -methacrylamide-L-lysine) [poly( $\epsilon$ -LysMA)] を  $\alpha$ -アミノ基をアセチル基, カルボキシル基をメチル基で保護した L-リジンを出発原料としてメタクリルアミドとしてラジカル重合によってポリマーを得た. ポリマーを塩基触媒存在下で脱保護して, 両性イオン構造の L-リジンをもつ poly( $\epsilon$ -LysMA)を得た. poly( $\epsilon$ -LysMA)の等電点は pH6.6 のほぼ中性付近であった. 生体適合性材料としての基礎的知見を得るために poly( $\epsilon$ -LysMA)と選択的吸着によって抗血栓性を発現するアルブミン (BSA) との相互作用を蛍光分光法および生体分子間相互作用解析装置 (IA sys) を用いて検討した結果, poly( $\epsilon$ -LysMA)が BSA と相互作用することを認めた.

#### 5 謝辞

本研究は 2000 年度近畿大学学内助成, 2000~2001 年度財団法人マツダ財団, および 2001~2002 度日本学術振興会 (No.13650957), 2002~2003 度日本学術振興会 (No.14580840), 2003~2004 度日本学術振興会 (No.15500334)の援助によって行なわれたものであり, ここに感謝の意を表します.

#### 6 文献

- (1) 坂本力, 牧田幸三, 高分子, **43** (3), 110 (2000).
- (2) 大城猛, 生体材料, **8** (1), 23 (1990).
- (3) 長岡昭二, 表面技術, **46** (10), 44 (1995).
- (4) D.Gray, and A. Richard, *Drug Intell. Clin. Pharm.*, **18**, 398 (1984).
- (5) K. Ishihara, N. P. Ziats, N. Nakabayashi, and J. M. Anderson, *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**, 1397 (1991).
- (6) K. Ishihara, H. Nomura, T. Mihara, K. Kurita, Y. Iwasaki, and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **39**, 323 (1998).
- (7) K. Sugiyama, K. Kato, M. Kido, K. Shiraishi, K.

- Ohga, K. Okada, and O. Matsuo, *Macromol. Chem. Phys.*, **199**, 1201(1998).
- (8) K. Sugiyama, K. Shiraishi, K. Okada, and O. Matsuo, *Polym. J.*, **31**, 883(1999).
- (9) K. Sugiyama, K. Shiraishi, and T. Matsumoto, *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem Ed.*, **41**, 1992 (2003).
- (10) K. Shiraishi, T. Ohnishi, K. Sugiyama, K. Okada, and, O. Matsuo, *Chem. Lett.*, 863(1997).
- (11) K. Shiraishi, T. Ohnishi, and K. Sugiyama, *Macromol. Chem. Phys.*, **199**, 2023(1998).
- (12) 白石浩平, 三浦浩二, 浅見剛, 光田益士, 杉山一男, 高分子論文集, **60** (1), 30(2003).
- (13) K. Okada, S. Ueshima, H. Fukao, and O. Matsuo, *Arch. Biochem. Biophys.*, **393** (2), 339(2001).
- (14) 白石浩平, 光田益士, 杉山一男, 未発表データ.
- (15) D. J. Lyman, L.C.Metcalf, D. Albo. Jr., K. F. Richards, J. Lamb, *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs.*, **20**, 474(1974).
- (16) M. S. Munro, R. C. Eberhart, N. J. Maki, B. E. Brink, W. J. Fry, *ASAIO. J.*, **6** , 65(1983).