

遺伝子組換え技術を用いたユニフォームポリマーの合成

矢野一久

Synthesis of Uniform Polymers with Recombinant DNA Technique

Kazuhiya Yano

1. はじめに

高分子は、低分子化合物が数百、数千と結合したものであり、その分子量は、数万にも数十万にも達する。その分子量の大きさゆえ、高分子は、低分子にはない特徴、いわゆる高分子性を有する。高分子は、その巨大な分子量にも関わらず、溶媒に溶解する。また、分子鎖同士の絡み合いにより、タフネスが増大する。それらの特徴を活かして、繊維、フィルムおよびプラスチック材料として我々の身近ないたるところで使われている。

高分子は、その巨大さゆえに、どうしても不均一である。しかし、その不均一性が、巨大な高分子に加工性を付与している。高分子を構造材料として使用する限りは、その不均一性は全く問題ではなく、むしろ加工性の向上という点で重要な意味を持つ。しかし、近年、高分子の極限性能、あるいは、今までにない全く新しい機能を引き出すという目的で、高分子の立体構造を制御する検討が行われ始めている。立体構造を制御するためには、高分子の不均一性をなくしたユニフォームなポリマーの合成が必須である。

本稿では、ユニフォームポリマーを合成できる唯一の方法である遺伝子組換え技術を用いた重合法の最近の動向を中心に、高分子化学、遺伝子組換え技術の歴史的変遷を併せて解説する。

2. 均一なポリマーを合成する試み

2.1 リビング重合

一般に、高分子は、その大きな分子量に起因して、長さ、1次構造、立体構造に幅広い分布があ

る。この幅広い分布は、高分子の加工性に大きく寄与しているが、高分子に不均一性を与えており、極限性能、あるいは新機能を引き出すという意味では妨げになる。高分子の不均一性を減らす1つの方法としてリビング重合がある。これは、開始反応の速度が成長反応の速度に較べて非常に大きいという条件のもとで、連鎖移動反応、停止反応を無くし、重合の成長末端が常に生きている状態で重合を行い、同じ長さのポリマーを得ようとするものである。Fig. 1に示すように、高分子の重合は、大きく分けて付加重合と重縮合に分けられるが、それらのうちアニオン重合、カチオン重合、配位重合などの付加重合の系においてリビング重合が報告されている。

重縮合の場合は、縮合反応が起こる確率を p とすると、数平均分子量(\bar{M}_n)と重量平均分子量(\bar{M}_w)の比は、 $\bar{M}_w/\bar{M}_n = 1 + p^2$ の関係があり¹⁾、全てが同じ長さのポリマーを得ること($\bar{M}_w/\bar{M}_n = 1$)は理論的に不可能である。

最初にリビング重合が報告されたのは、アニオン重合の系であった。アニオン重合の場合は、共役系の炭化水素モノマーの場合に、活性種の成長アニオンが安定となるためにリビング重合が進行しやすい。1956年、Szwarcがスチレンの系でリビング重合を発見した²⁾。この場合の分子量分布の尺度である数平均分子量(\bar{M}_n)と重量平均分子量(\bar{M}_w)の比は、 $\bar{M}_w/\bar{M}_n = 1.03$ と小さく(Fig. 2)、分布の狭いポリスチレンが得られている。さらにカチオン重合^{3, 4)}、配位重合^{5, 6)}などでもリビング重合が進行する系が見つまっている。リビング重合では、モノマーが全て消費された後も末端が

キーワード

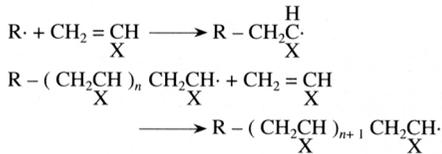
ユニフォーム, ユニフォームポリマー, 遺伝子組換え技術, 立体構造, 1次構造, 分子量, プロテイン, DNA, 繰り返し構造, 重合, ポリマー, 高分子

活性であるので、はじめのモノマーによる重合終了後に、異なるモノマーを導入することにより、ブロック共重合体を合成することが可能である。スチレンとブタジエンあるいは、イソプレンからなるブロック共重合体は、熱可塑性エラストマー

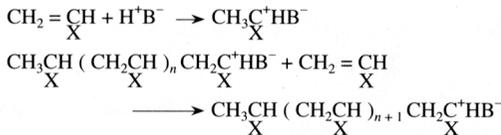
Addition Polymerization



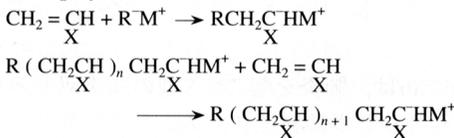
Free radical polymerization



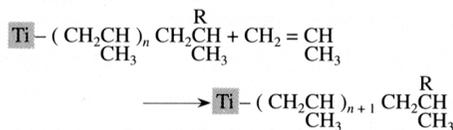
Cationic polymerization



Anionic polymerization



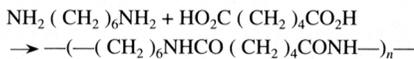
Coordination catalyst polymerization



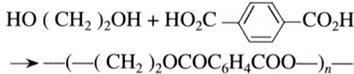
Condensation Polymerization



Polyamide



Polyester



Polycarbonate

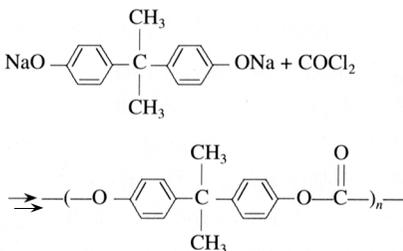


Fig. 1 Classification of polymerization.

として工業的に生産されており、リビング重合による唯一の成功例である。

2.2 立体規則性重合

リビング重合は、高分子の不均一性の中から、長さの分布を無くし、均一な長さを有するポリマーを得ようとする重合法であるが、ポリマーの物性には長さより立体構造の寄与の方が大きく、立体構造を制御したポリマーの合成の方が重要である。ポリマーの立体構造は、モノマーの触媒への配位・挿入に対して重合活性点での立体的な規制が大きな影響を与えるため、配位重合において多くの研究がなされている。

1955年、Nattaは、 $AlEt_3$ - $TiCl_4$ からなるエチレン重合触媒 (Ziegler触媒) の $TiCl_4$ を $TiCl_3$ に還元した触媒系を開発し、エチレンだけでなく、他のオレフィン、ジエン、アセチレン等のモノマーが重合することを見出した⁷⁾。この触媒系は、Ziegler-Natta触媒と言われている。このZiegler-Natta触媒で重合したポリプロピレンは、Fig. 3^{5,9)}に示すようにアイソタクチック、シンジオタクチックなどの立体規則性を有している最初のポリマーである⁸⁾。Nattaが発明した $TiCl_3$ - $AlEt_2Cl$ 系触媒を用いて重合したポリプロピレン (PP) は、アイソタクティシティーが約90%であり、立体構造が非常によく規制されている。それに関わらず、工業製品として使用するには結晶性が不十分であり、アタクティック成分を抽出除去する工程が必要であった。1975年、三井石油化学、Montedison社では、 $MgCl_2$ 担持型Ti触媒に電子供与体を組み合わせる

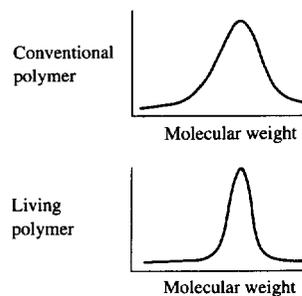


Fig. 2 Difference of molecular weight distribution between a conventional polymer and a living polymer.

ことにより、プロピレンの重合活性と立体規則性の両方を劇的に向上させる画期的な触媒系を見いだした⁹⁾。重合活性と立体規則性の向上により、触媒とアタクティックポリマーのポリマーからの除去工程が不必要になり高品質なポリプロピレンの製造技術が確立した¹⁰⁾。

Kaminskyは、 AlMe_3 と水との反応から得られるメチルアルミノキサン ($\text{Al}(\text{Me})\text{O}$)₁₀₋₂₀とジルコノセン化合物を組み合わせた触媒がエチレンの高活性触媒となることを見いだした¹¹⁾。このメチルアルミノキサンと TiCl_4 、 $\text{Ti}(\text{OEt})_4$ 、 CpTiCl_3 などのTi化合物からなる触媒系を用いてスチレンを重合するとシンジオタクティシティがほぼ100%の結晶性ポリスチレンが得られる¹²⁾。このポリスチレンの融点(267℃)は、アイソタクティックポリマーの融点(225℃)に較べて高くなっている。

他の試みとして、ジケテン、 β -プロピオラクトンなどの環状化合物の放射線固相重合により、高度に配向した結晶性ポリマーを得ようというトポケミカル重合^{13, 14)}、尿素やチオ尿素の結晶格子内に重合性モノマー(オレフィン、ジエン)を包接した包接化合物に、放射線を照射することにより立体構造の規制されたポリマーを得ようという包接重合¹⁵⁾、また、これらの重合体は1次元の重合体のみを与えるが、粘土を用いて2次元的な重合体を得ようとする試みもある¹⁶⁻¹⁸⁾。

以上、均一なポリマーを得ようとする試みにつ

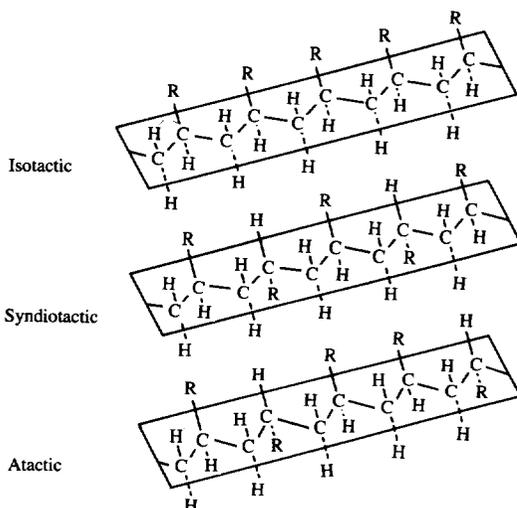


Fig. 3 Stereoregularity of polymer.

いて総括してきたが、これらは全て、従来技術の延長上にあるために、合成したポリマーの100%が全く同じ長さ、または、全く同じ立体規則性を有するという事は不可能であった。そこで、次に全く新しい概念に基づくポリマー合成法、すなわち、遺伝子組換え技術を用いたポリマー合成法について概観する。

3. 遺伝子組換え技術の発展

3.1 遺伝物質の解明

1869年、F. Miescherは、膿を薄い塩酸で洗い出した。膿は、死んだ白血球が主成分で、大きな細胞核が含まれている。彼は、この核から新しい物質を取り出しヌクレイン(核物質)と名付けた。ヌクレインは酸性で、リンを多量に含んでおり、後にリン酸と糖と4種類の塩基(グアニン(G)、アデニン(A)、シトシン(C)、チミン(T))からなっていることが明らかにされ(Fig. 4⁶⁰⁾)、1929年には、DNA(デオキシリボ核酸)とRNA(リボ核酸)の2種類あることが突き止められた。1928年、F. Griffithは、肺炎を起こすS型の肺炎双球菌を熱処理して殺した後、その処理したS型菌を悪条件下で培養して生じた肺炎を起こさないR型の菌と混ぜてハツカネズミに注射した。するとハツカネズミは肺炎を起こし、その血液からは殺されていたはずのS型菌が発見された。O. T. Averyは、「何かが肺炎菌の性質を変えるに違いない」と疑い実験を始め、10年後の1944年に、それがDNAであることを見いだした¹⁹⁾。すなわち、DNAが遺伝情報を有することを唱えた。その後1953年に、J. D. WatsonとF. H. C. CrickがDNAの2重らせんモデルを提唱し(Fig. 5⁶¹⁾)、DNAが遺伝物質であることを広く示した。1960年代には、DNAを高分子のまま変性することなく精製する技術が進み、遺伝過程の各段階に働く種々の酵素が発見された。

3.2 基礎技術の発見

細菌には自己防衛機能があり、自株のDNAは攻撃しないが、侵入した外来のDNAを分解する酵素が存在し、制限酵素(restriction endonuclease)と呼ばれている。1970年ジョンスホプキンス大学のSmithらは、Haemophilus influenzae d株の抽出液から自分以外のDNAのみを分解する酵素を見い

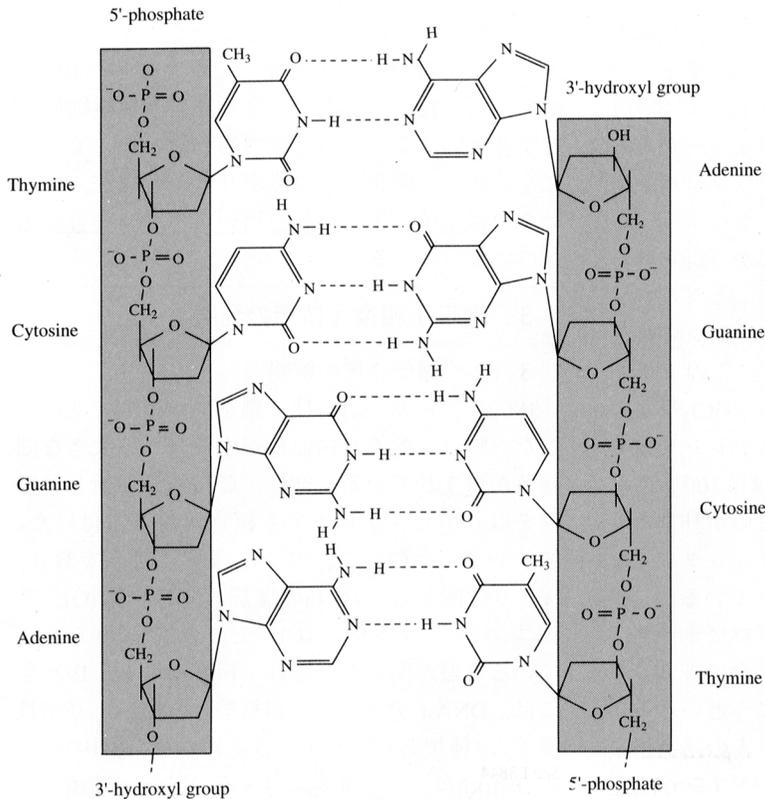


Fig. 4 Structure of DNA.

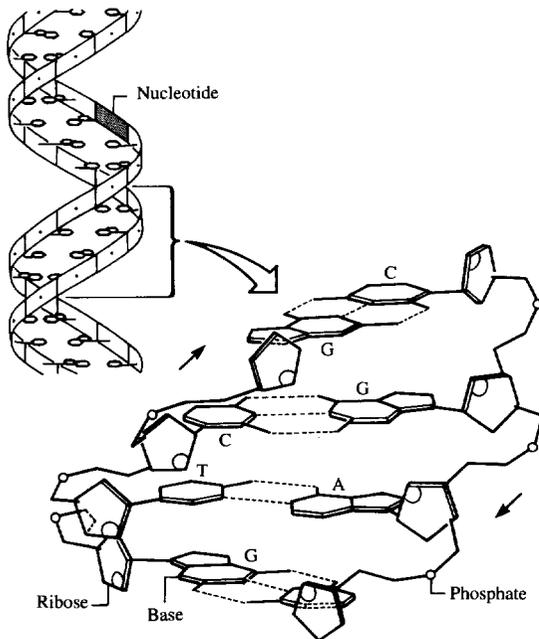


Fig. 5 Watson-Crick model of DNA.

だした²⁰⁾。そして、この酵素によって切断された断片の塩基配列が一定であることから、この酵素が特定の塩基配列を認識して切断するということを発見した²¹⁾。同じ頃カリフォルニア大学のBoyerらは、薬剤耐性因子を持つ大腸菌から現在*EcoR I*と呼ばれる制限酵素を精製した²²⁾。その後、コールドスプリングハーバー研究所のRobertsは、約30種の菌種について制限酵素を調査し、約100種類の酵素活性を見いだした²³⁾。このような特定の塩基配列を認識する制限酵素の発見によって、巨大なDNAを自由自在に切断する技術が得られた (Fig. 6⁶²⁾)。

1970年、MandelとHigaは大腸菌の形質転換法を発見した²⁴⁾。

大腸菌を塩化カルシウムで処理すると菌膜の透過性が増大して、DNAと混ぜるだけでこれを菌体内に取り込ませることができるといもので、実際には、λファージを大腸菌に導入することに成功した。2年後スタンフォード大学のCohenらは、R6-5という薬剤耐性を有する環状プラスミドを用いても彼らの方法が適用でき、それによって大腸菌が薬剤耐性を獲得することを見いだした²⁵⁾。

プラスミドとは、宿主染色体からは物理的に独立して自立複製し、安定に遺伝できる染色体外遺伝因子である。プラスミドは、自己複製のための遺伝情報、DNA複製開始点、宿主中で安定に保持されるための遺伝情報を有しており、任意のDNAを組み込み細菌中で増殖させることができるので、クローニングに必須である。1972年、Clewellは、コリシンE1を生産するプラスミド (ColE1) が導入された大腸菌に、クロラムフェニコールを添加することにより、そのプラスミドだけが増え続け、最終的に細胞内に2000~3000コピーにも達することを見いだした²⁶⁾。この場

合、少量の培養液で大量のDNAを得ることができるが、ColE1耐性菌がかなりの頻度で自然発生するのが欠点である。Cohenらが用いたプラスミドpSC101は、テトラサイクリン耐性を示すが、細胞あたりのコピー数が小さく、外来DNAが挿入されているかどうかを判断できない。RSF2124は、ColE1に由来するプラスミドで、アンピシリン耐性の遺伝子を持っているが、これらの中では、最も大きく扱にくい(7.8MDal)。1977年、Bolivarらは、R7268プラスミドを出発点として²⁷⁾、RSF2124のアンピシリン耐性遺伝子、pSC101のテトラサイクリン耐性遺伝子、およびColE1様のプラスミドpMB1由来の複製単位を持つpBR322を開発した²⁸⁾(Fig. 7)。現在このプラスミドの誘導体が数多く使用され、様々なクローニング実験に応用されている。

3.3 遺伝子組換え技術の確立

1973年、スタンフォード大学のCohenらとカリフォルニア大学のBoyerは、Boyerの発見したEcoR I制限酵素で、R6-5とCohenの開発したpSC101の2種類のプラスミドを切断し、両DNA末端の相補性の1本鎖部分をつなぎ合わせて、DNAリガーゼで連結して2本鎖環状DNAを作成した。この組換えDNAを形質転換により大腸菌C600株に導入し、この菌が、pSC101からのテトラサイクリン耐性とR6-5からの薬剤耐性を共に有することを見いだした²⁹⁾(Fig. 8)。さらに彼らは、ブドウ状球菌Staphylococcus aureusの薬剤耐性因子p1258に含まれるペニシリナーゼ遺伝子をpSC101につなぎ、大腸菌がペニシリン耐性になることを発見した³⁰⁾。また、カエルの1種Xenopus laevisのリボソームRNAの遺伝子をpSC101につないで導入し、真核生物のDNAも大腸菌中で増殖させることができることを見いだしている³¹⁾。彼らの実験は、制限酵素で切断したものをリガーゼで

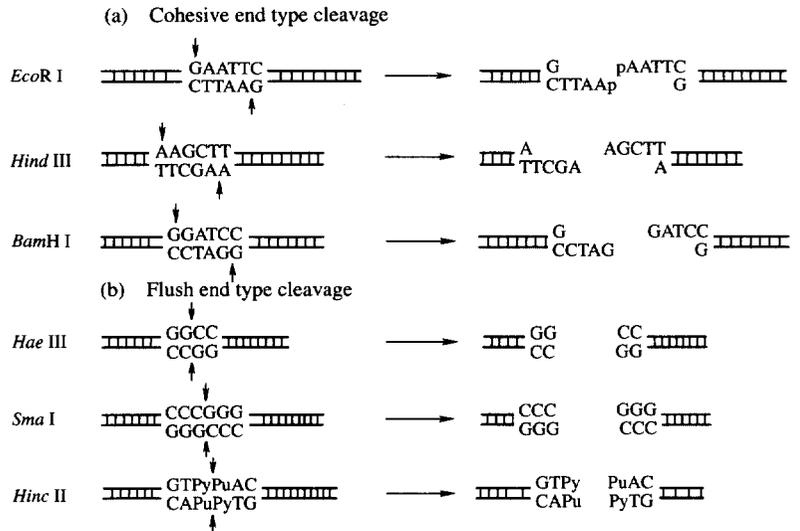


Fig. 6 Cleavage with restriction endonucleases.

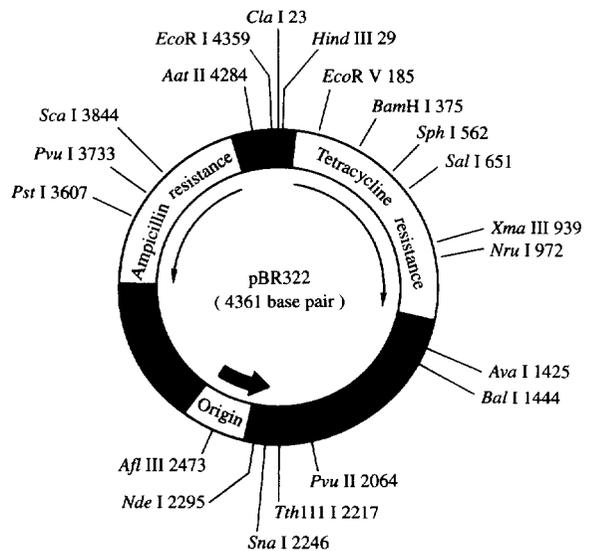


Fig. 7 Structure of pBR322.

プラスミドにつなぎ、形質転換した大腸菌中で増殖させるという非常に簡便なものである。また、大腸菌中でブドウ状球菌やカエルなどの異種生物の遺伝子が発現したという事実は、分子生物学上非常に意義の深いものであった。この1973年に遺伝子組換え技術が確立したと言われている³²⁾。

4. 遺伝子組換え技術を用いたポリマーの合成

4.1 化学合成したDNAの発現

遺伝子組換え技術を用いたポリマー合成の流れとしては、Fig. 9⁶³⁾に示すように、化学合成により所望のアミノ酸に対応する遺伝子を合成する、プラスミド（又は、ファージなどの他のベクター）に挿入する、大腸菌中（あるいは、酵母、放線菌など）で発現させるという手順になる。

大腸菌中では、通常、生産されていないタンパク質を作ることになる場合が多く、目的のポリマーの種類によっては、発現されないこともある。

Fig. 10⁶³⁾に各々の過程での問題点を示す。挿入した遺伝子の安定性、mRNAが合成されるかどうか、翻訳がすんなりゆくかどうか？ できたポリマーは安定か？ 大腸菌に対する毒性はないかなど多くのハードルがあり、これらを全てクリアしないと目的のポリマーは合成されない。

合成されたポリマーは、挿入DNAを鋳型として生産されているため、その長さは、全く同一になる。また、タンパク質の場合、Fig. 11⁶⁴⁾に示すように単位結晶構造としては、分子内水素結合を有しらせん状に伸びている α ヘリックス、分子間水素結合を有しシート状になっている β シート

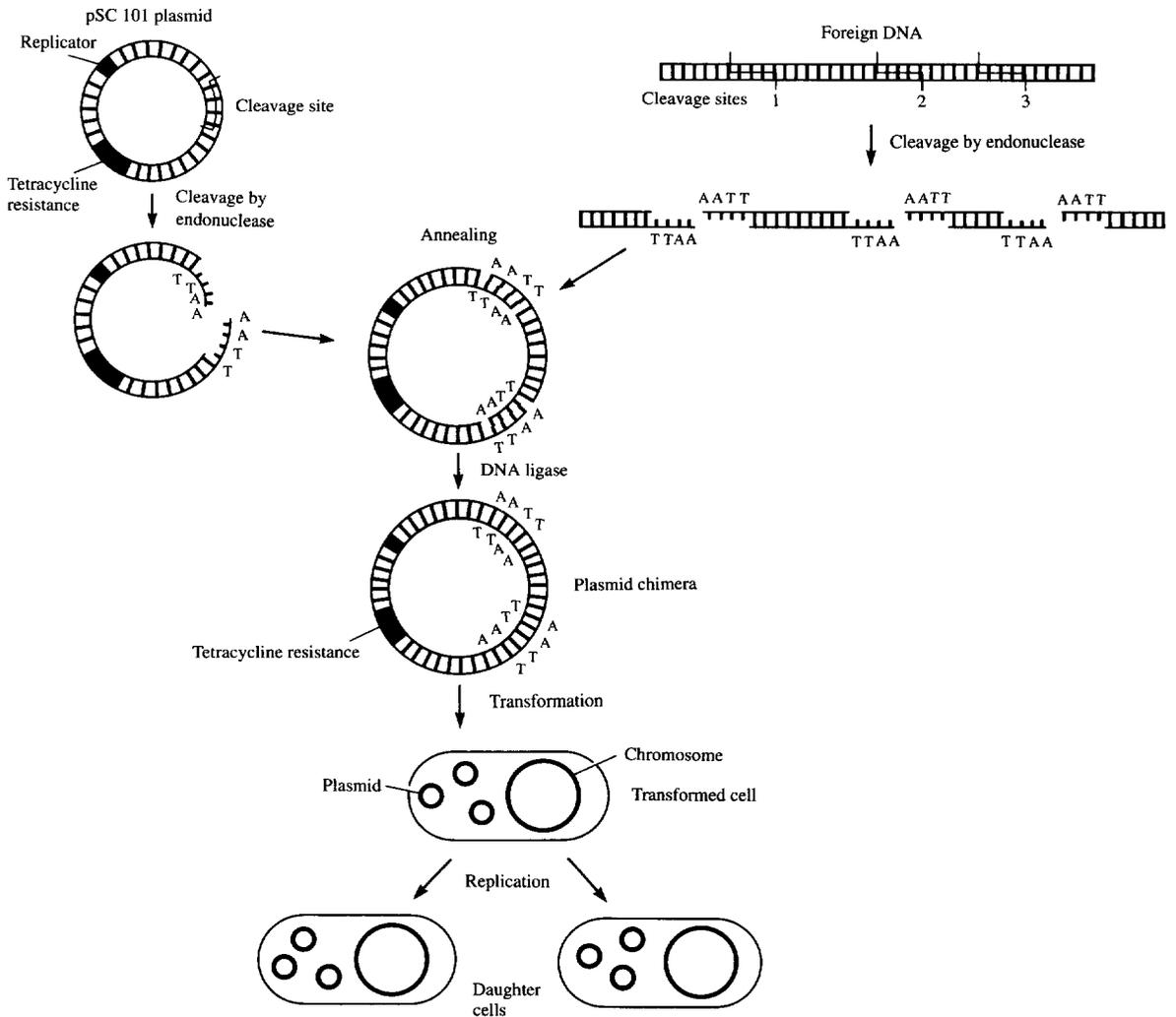


Fig. 8 Cloning of tetracycline resistant plasmid.

の2種類しかなく、それ以外は、明確な構造を持たないランダム構造となる。これらは、ポリマー中のアミノ酸組成に大きく影響を受けるので³³⁾、ポリマー設計時に α ヘリックスあるいは β シート構造をとりやすいアミノ酸を選択することにより、全く同一の立体構造をとるポリマーを合成することが可能である。したがって、遺伝子組換え技術を用いることにより、今までの重合法では決して達し得なかった、分子量、組成、立体構造が全く同一なユニフォームポリマーを合成することができる。

4.2 自然界に存在するタンパク質の合成

タンパク質をその機能から大きく分類すると構造タンパク質と機能タンパク質とに分けられる。機能タンパク質は、酵素など種々の反応に関与するタンパク質で、分子量もそれほど大きくなく、一般に繰り返し配列を持たない。構造タンパク質は、分子量も大きく、ある程度の短周期の繰り返し配列を有している。これに属するタンパク質としては、コラーゲン、フィブロイン、ケラチン、ヒストン、トロポミオシン、マリンプロテインなどがある³⁴⁾。これらの中でも、コラーゲン、フィブロイン、エラスチン、マリンプロテインについては、構造がよく調べられており、遺伝子組換え技術によるいくつかの合成例がある。

コラーゲンは動物の結合組織を構成する主要タンパク質成分であり、ヒトでは、総タンパク質の約30%近くを占めている。構造的には、3本の左巻きのヘリックス（このうち2本は同一のもの）が集まって1本の右巻きのヘリックスになっているという特徴を有する。それらのうちの2本のヘリックスの化学的特徴は、グリシンが3個ごとに存在し、プロリン含有量が多くその半分がヒドロキシル化されていることで、繰り返し単位として(GlyProHyp)が提案されている(Gly: グリシン, Pro: プロリン, Hyp: ヒドロキシプロリン)。グリシンおよびプロリンは、20種類の天然のアミノ酸に含まれるが、ヒドロキシプロリンは、非天然のアミノ酸であり、遺伝子組換えの手法で導入することは無理である。そこで、ヒドロキシプロリンの代わりにプロリンを用いた(GlyProPro)を基本単位としたタンパク質を遺伝子工学の手法を

用いて合成することになる。生体内でも合成後、酵素によりヒドロキシル化という工程を経る。Salernoらは、グリシンおよびプロリンのコードン(遺伝暗号)としてそれぞれGGT, CCGを適用し、2繰り返しユニット(18塩基対)からなるオリゴDNAを合成した。セルフライゼーション(自己縮合反応)により高分子量化した後、繰り返し単位数が32からなるDNAを得て、プラスミド中に挿入し、タンパク質の発現実験(ポリマー合成)を行った³⁵⁾。イミュノプロットング法によりコラーゲン前駆体蛋白が大腸菌中で合成されたこ

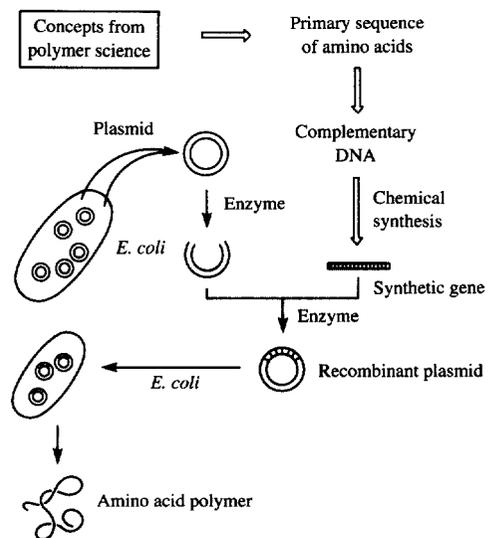


Fig. 9 Principle of the synthesis of uniform polymers.

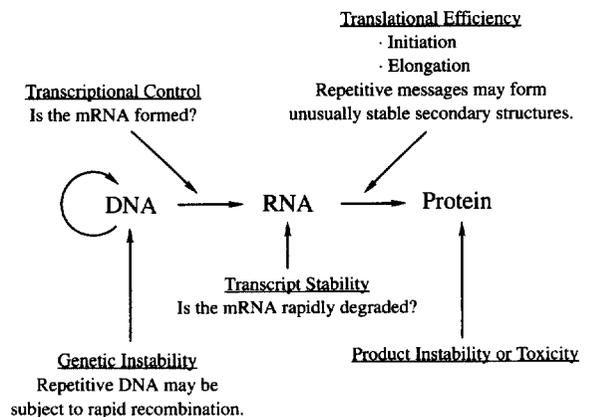


Fig. 10 Potential problems in biosynthesis.

とを確認したが、挿入遺伝子はひどく不安定であり、その長さが単位ユニットの9塩基対にまで低下してしまうという結果であった³⁶⁾。繰り返し遺伝子の脱離・縮小化は、パリンδροミック（回文式）な遺伝子を挿入した場合によく起こる現象であり³⁷⁾、ノンパリンδροミック（非回文式）な遺伝子を用いることによりある程度は避けることができる³⁸⁾。

絹糸から外側を覆っているゴム状タンパク質のセリシンを除いた繊維状物質をフィブロインと言いい、グリシン、アラニン、セリンなどの小さいアミノ酸から構成され、典型的な β シート構造をとっている。カイコの1種である*Bombyx mori*のフィブロインの単位ユニットが、(GlyAlaGlyAlaGlySer)であることから³⁹⁾、Ferrariらは、この基本単位を6個含むユニットモノマーDNAを合成後セルフラ

イゲーションして、基本単位が160個からなるポリマーDNAを得た。このポリマーDNAを大腸菌中で発現させて、シルクライクなポリマーを得ている⁴⁰⁾。Cappelloらは、このシルクライクなポリマーにフィブロネクチンのファンクショナルサイトである (GlyAlaAlaValThrGlyArgGlyAspSerProAlaSerAlaAlaGlyTyr) をフィブロインの基本単位6に対して1の割合で導入し、繊維芽細胞との親和性を持たせたポリマーを合成している⁴¹⁾。このポリマーは医薬用途として有望である。また、シルクライクポリマーにエラスチンの繰り返し基本単位である (ValProGlyValGly)⁴²⁾ を数ブロックで挿入し、ブロック共重合ポリマーを発現させている⁴³⁾。エラスチンを共重合することにより、ポリマーの結晶性が低下し、ゴムのようになるという結果が得られた。

Waiteらは、貝が岩などに付着するときに出す分泌物に着目し、その分析を行った⁴⁴⁾。それは、水中で接着効果を示していることから、環境に安全でしかも耐水性のある接着剤として期待できる。分泌物は、プロテイン、コラーゲンなどのファイラー、硬化剤からなるコンポジットであり、その中で特にプロテインは、貝の種類により特定の繰

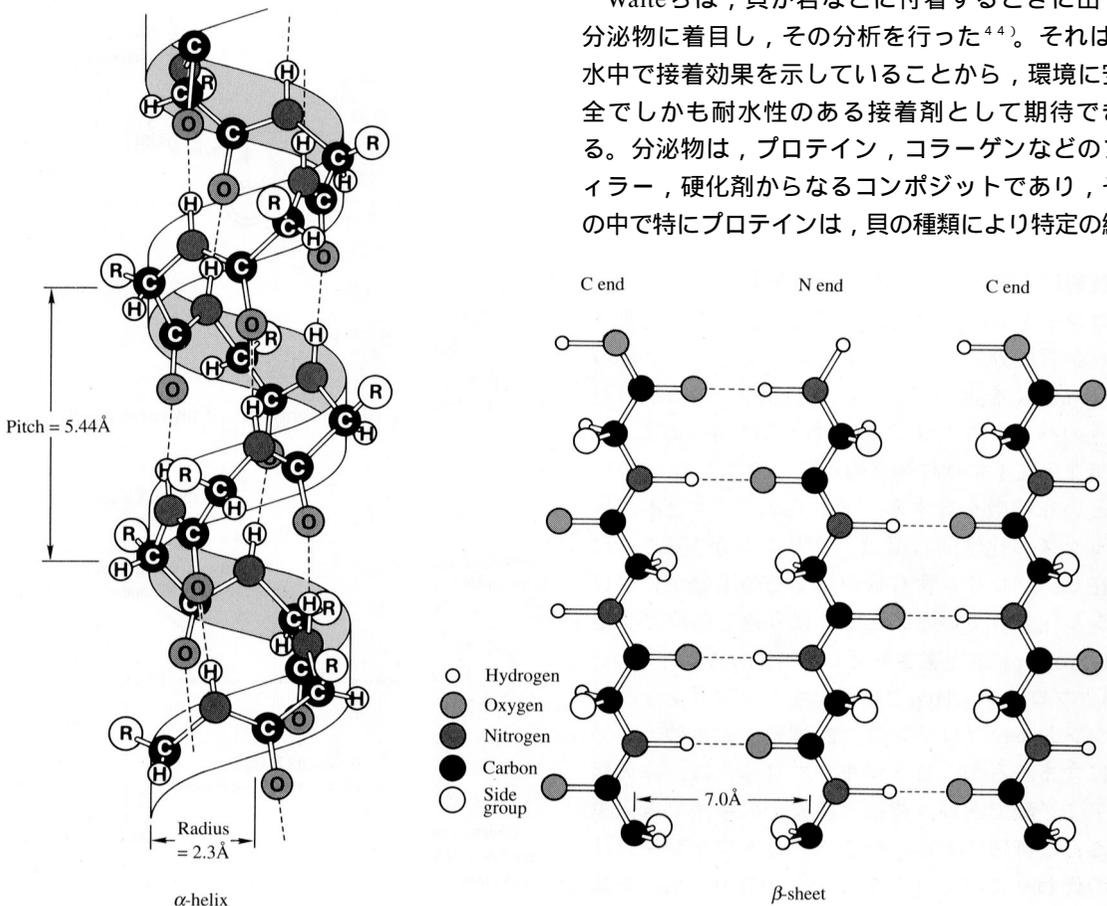


Fig. 11 Structure of protein.

り返し構造を持つことが分かった⁴⁵。Salernoらは、Mytilus edulisの分泌する10アミノ酸を基本単位とするプロテイン (AlaLysProSerTyrHypHypThrDopaLys) (Dopa = 3,4-dihydroxy phenylalanine; Hyp = Hydroxy proline) に相当する (Dopa, Hypは非天然のアミノ酸なのでそれぞれPhe, Proに変換) 30塩基対からなる化学合成したモノマーをライゲーションして120から600塩基対のマルチマーを得た。このうち600塩基対のマルチマーを2種類の大腸菌中で発現させている⁴⁶。タンパク質発現に促進効果のあるλPLプロモーターを利用したE. coli K12 IG110中では、プロテアーゼ(タンパク質分解酵素)による分解のためにマリンプロテインの収率は非常に低かったが、T7プロモーターを利用したE. coli BL21中では、全タンパク質の40~60%がマリンプロテインであり、高収率であった。ただ、この系においても若干のDNA遺伝子のデリージョンが見られた。

4.3 人工的に設計されたポリマーの合成

タンパク質のアミノ酸組成と立体構造は、1対1で対応し、適当なアミノ酸を組み合わせるにより、合成したポリマーにαヘリックスあるいはβシートなどの明確な構造を与えることが可能となる。そこで、所望の立体構造をとるようにポリマーのデザインを設計し、新しい機能・特性を持つポリマーを合成しようという試みが、活発に行われている。

DeGradoらは、アミノ酸の1次構造とタンパク質立体構造の関係を調べ、ミオヘミスリン、アポフェリチン、タバコモザイクウィルスコートプロテイン、チトクロームCなどのプロテインが異なる1次構造をとっているにも関わらず、同じ4ヘリックスバンドル構造を示すことに着目した⁴⁷ (Fig. 12)。これらのプロテインは、両親媒性(αヘリックスの片面が疎水性で他の片面が親水性)であり⁴⁸、彼らは、両親媒性の1次構造として (GlyGluLeuGluGluLeuLeuLysLysLeuLysGluLeu-

LeuLysGly) をデザインし、E. coli中でポリマーの発現実験を試みている⁴⁹。

Lawtonらは、(AsnLeuAlaPheValAlaGlnTrp) からなるαヘリックスモノマーを化学合成し、36bpから576bpまでのDNAをプラスミドに挿入してプロテインAとのフュージョンポリマーを発現させた⁵⁰。臭化シアンで開裂することにより目的ポリマーを得た。このポリマーは、分子内でアミノ酸組成が変化しており、それに伴い屈折率の変化も期待できることから、光学フィルター、非線形光学材料への応用を考えている。

Tirrellらは、ポリ(GlyAla)がβシート構造をとること⁵¹、プロリンがβターンを開始すること⁵²、プロリンとグルタミン酸がβシートを形成しにくいこと⁵³から、(AlaGly)₃ProGluGlyを基本単位とするポリマーをデザインし (Fig. 13)、E. coli中で発現実験を試みた⁵⁴ (Fig. 14)。100mg/10Lの高収率で目的のポリマーを得ることができた。得られたポリマーは、(AlaGly)部分がβシートを形成し、ProGluGly部分が折り返しとなり、Fig. 15に示す立体構造をとることが期待される。さらに彼らは、βシート部分が長くなった(AlaGly)₄-ProGluGlyについても発現を試みている⁵⁵。しかしながら、これらのポリマーのX線回折の結果は、βシート部分の厚さ30Åに相当するピークを示さなかった。分子モデリングを行ったところ、全ての



Fig. 12 Structure of four helix bundle.

```

Stop Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Pro Glu Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Pro Glu Gly Ala
AAT TCG TAA GGT GCC GGC GCT GGT GCG GGC CCG GAA GGT GCA GGC GCT GGT GCG GGC CCG GAA GGT GCC G
GC ATT CCA CGG CCG CGA CCA CGC CCG GGC CTT CCA CGT CCG CGA CCA CGC CCG GGC CTT CCA CGG CCTAG
EcoR I      Ban I                                     Apa I      Ban I      BamH I

```

Fig. 13 Monomer DNA sequence of $\{(\text{AlaGly})_3\text{ProGluGly}\}_n$.

β シート内分子が β シート形成に必要な分子内水素結合をすることは歪みがあり無理であるということが分かったので、次に彼らは、 $(\text{AlaGly})_3\text{GluGly}$ を基本単位とするポリマーをデザインした^{5,6}。このポリマーのX線回折結果は、予想された値を示

し、分子内で β シート構造をとっていることが明らかになった。折り返し部分のアミノ酸数を奇数 (ProGluGly) から偶数 (GluGly) に変えたことにより、 (AlaGly) 部分が平行に配置することができるようになったためと、彼らは考えている。

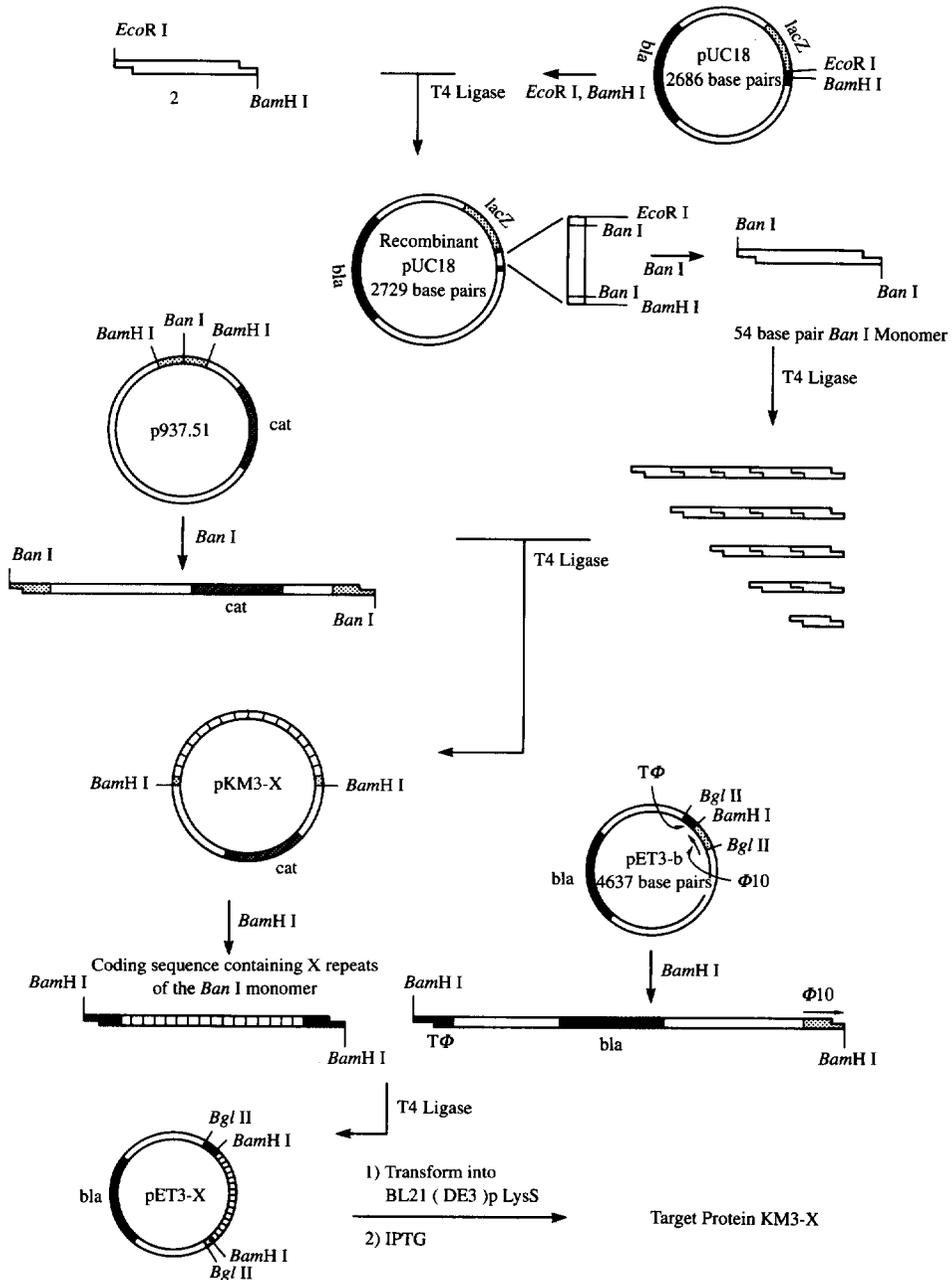


Fig. 14 Strategy for cloning and expression of $[-(\text{AlaGly})_3\text{ProGluGly}]_n$.

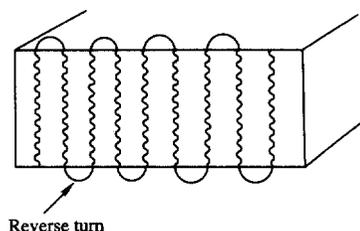


Fig. 15 Expected structure of $\{(\text{AlaGly})_3\text{ProGluGly}\}_n$

ポリ (γ -ベンジル α , L-グルタメート) (PBLG) は, α ヘリックス構造をとり, その溶液が液晶性を示すことが知られている。そこで, 彼らは, このポリマーを遺伝子組換えの手法を用いて合成することを試みた。 γ -ベンジル α , L-グルタメートは, 非天然のアミノ酸であることから, 遺伝子組換えの手法を用いることはできない。そこで, グルタミン酸を中心としたHGluAsp(Glu₁₇Asp)₄GluGluOHの構造式で示されるポリマーをE. coli中で発現させた⁵⁷⁾。得たポリマーを市販の分子量分布の尺度である \bar{M}_w/\bar{M}_n が1.2および1.38のポリ (α , L-グルタミン酸) (PLGA) と共に電気泳動した結果, ゲル状にスポットで現れ, 遺伝子組換えの手法で合成したポリマーは, 非常に均一であることを証明した (Fig. 16)。

通常, 遺伝子組換えの手法を用いた場合, 使用できるアミノ酸は天然アミノ酸の20種類に限られる。ところが, 突然変異により天然のアミノ酸と形・特性の似た非天然のアミノ酸を導入できるオクトロフという株があり, それをうまく利用することにより非天然のアミノ酸の導入が可能である。彼らは, セレノメチオニン (SeMet) を組み込むことを検討した⁵⁸⁾。(GlyAla)₃GlySeMetからなる基本ユニットを考え, SeMet存在下で大腸菌を増殖させることにより, SeMetが100%挿入されたポリマーを得ることに成功している。

5. 終わりに

遺伝子組換え技術を用いることによりユニフォームなポリマーを合成することが可能になった。ユニフォームポリマーは, 従来の重合法では, 決して得ることができなかった全く新規な材料である。高分子のタフネスと均一な構造を合わせ持つ

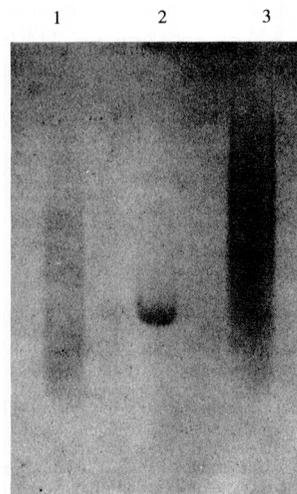


Fig. 16 Comparison of molecular weight distribution of HGluAsp(Glu₁₇Asp)₄-GluGluOH with two commercial PLGAs on a 12% polyacrylamide gel. Lane 1, PLGA of molecular weight 9050 and polydispersity Index 1.20; Lane 2, HGluAsp(Glu₁₇Asp)₄GluGluOH; Lane 3, PLGA of molecular weight 21,000 and polydispersity Index 1.38.

ことにより, 今までにない化学的特性・物理的特性を示す可能性がある。また, かなり緻密なポリマー設計が可能であり, 例えば, ポリマーの立体構造とある特性の関係など多くの有益な知見を得ることができ, それらの情報を他のポリマーシステムにフィードバックできる。

遺伝子組換え技術を用いたユニフォームポリマーの合成検討は, まだ始まったばかりであり, 挿入遺伝子の安定性, ポリマー発現システム, ポリマーの分離・精製方法, 加工方法などまだまだ解決しなければいけない問題点が多い。今後, そのユニフォームという特徴の本質を見極めた全く新しいコンセプトに基づく新材料の開発が望まれる。

参 考 文 献

- 1) P. J. Flory (岡小天, 金丸競共訳): 高分子化学, (1980), 304, 丸善
- 2) Szwarc, M., et al.: J. Am. Chem. Soc., 78(1956), 2656
- 3) Miyamoto, M., et al.: Macromolecules, 17(1984), 265
- 4) Faust, R. and Kennedy, J. P.: Polym. Bull., 15(1986), 317

- 5) Doi, Y., et al. : *Macromolecules*, 12(1979), 814
- 6) Yasuda, H., et al. : *J. Am. Chem. Soc.*, 114(1992), 4908
- 7) Natta, G. : *Atti Accad. Naz. Lincei Cl. Sci. Fis. Mat. Nat. Rend.*, 8-4(1955), 61
- 8) 佐々木平之, 高木謙行 : *プラスチック材料講座7 ポリブ
ロピレン樹脂*, (1969), 261p., 日刊工業新聞社
- 9) 柏典夫, 他3名 : 特公昭56-39767
- 10) 柏典夫, 木岡譲 : *化学工業*, 523(1985), 59
- 11) Sinn, H. and Kaminsky, W. : *Adv. Organomet. Chem.*,
18(1980), 99
- 12) Ishihara, N., et al. : *Macromolecules*, 19(1986), 2464
- 13) 岡村誠三編 : *放射線高分子化学*, (1969), 402p. 地人書館
- 14) Chatani, Y. : *Prog. Polym. Sci. Jpn.*, 7(1974), 149
- 15) 竹本喜一 : *分子集合体*, 化学総説 No. 40, (1989), 18, 学
会出版センター
- 16) Panayotov, I. M. and Rashkov, I. B. : *Makromol. Chem.*,
175(1974), 3305
- 17) Tieke, B. and Wegner, G. : *Makromol. Chem. Rapid
Commun.*, 2(1981), 543
- 18) Inoue, H. and Yoneyama, H. : *J. Electroanal. Chem.*,
233(1987), 291
- 19) 丸山工作 : *ブルーバックス 分子生物学入門 誰にでも
わかる遺伝子の世界*, (1987), 157p., 講談社
- 20) Smith, H. O. and Wilcox, K. W. : *J. Mol. Biol.*, 51(1970),
379
- 21) Kelly, T. J., Jr. and Smith, H. O. : *J. Mol. Biol.*, 51(1970),
393
- 22) Yoshimori, R. N. : *A Genetic and Biochemical Analysis of
the Restriction and Modification of DNA by Resistance
Transfer Factors*, (1971), Ph. D. Thesis, Univ. of California,
San Francisco Medical Center
- 23) Roberts, R. J. : *Gene*, 4(1978), 183
- 24) Mandel, M. and Higa, A. : *J. Mol. Biol.*, 53(1970), 159
- 25) Cohen, S. N., et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69(1972),
2110
- 26) Clewell, D. B. : *J. Bacteriol.*, 110(1972), 667
- 27) Old, R. W. and Primrose, S. B. (関口睦夫, 穴井元昭, 中別
府雄作共訳) : *遺伝子操作の原理*, (1991), 55, 培風館
- 28) Bolivar, F. R., et al. : *Gene*, 2(1977), 75
- 29) Cohen, S. N., et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70(1973),
3240
- 30) Chang, A. C. Y. and Cohen, S. N. : *Proc. Natl. Acad. Sci.
USA*, 71(1974), 1030
- 31) Morrow, J. F., et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71(1974),
1743
- 32) 工業技術院総務部技術調査課編 : *バイオインダストリ
- その可能性を探る -*, (1982), 78, 通商産業調査会
- 33) Chou, P. Y. and Fasman, G. D. : *Adv. Enzymol.*, 47(1978),
45
- 34) 大井龍夫 : *タンパク質 構造・機能・進化*, (1988), 215,
化学同人
- 35) Goldberg, I., et al. : *Gene*, 80-2(1989), 305
- 36) Goldberg, I. and Salerno, A. J. : *Mater. Reseach. Soc. Symp.
Proc.*, 174(1990), 229
- 37) Brutlag, D., et al. : *Cell*, 10(1977), 509
- 38) Hartley, J. L. and Gregori, T. J. : *Gene*, 13(1981), 347
- 39) Lucas, F., et al. : *Biochem. J.*, 66(1957), 468
- 40) Ferrari, F. A., et al. : *WO 88-03533*
- 41) Cappello, J. : *MRS Bull.*, 17-10(1992), 48
- 42) Sandberg, L. B., et al. : *New Engl. J. Med.*, 304(1981), 566
- 43) Cappello, J., et al. : *Biotechnol. Prog.*, 6(1990), 198
- 44) Waite, J. H. : *Biochemistry*, 24(1985), 5010
- 45) Laursen, R. A., et al. : *Mater. Research Soc. Symp. Proc.*,
174(1990), 237
- 46) Salerno, A. J. and Goldberg, I. : *Polym. Prepr. (Am. Chem.
Soc., Div. Polym. Mater.),* (1992), 398
- 47) Eisenberg, D., et al. : *Proteins Struct. Funct. Genet.*,
1(1986), 16
- 48) Chothia, C. : *Annu. Rev. Biochem.*, 53(1984), 537
- 49) DeGrado, W. F., et al. : *Cold Spring Harbor Symp. Quant.
Biol.*, 52(1987), 521
- 50) Lawton, C. W., et al. : *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*,
174(1990), 251
- 51) Fraser, R. D. B., et al. : *J. Mol. Biol.*, 11(1965), 706
- 52) Chou, P. Y. and Fasman, G. D. : *J. Mol. Biol.*, 115(1977),
135
- 53) Chou, P. Y. and Fasman, G. D. : *Biochemistry*, 13(1974),
211
- 54) McGrath, K. P., et al. : *J. Am. Chem. Soc.*, 114-2(1992),
727
- 55) Creel, H. S., et al. : *Macromolecules*, 24(1991), 1213
- 56) Krejchi, M. T., et al. : *Polym. Prepr.*, 32-1(1991), 411
- 57) Zhang, G., et al. : *Macromolecules*, 25-13(1992), 3601
- 58) Dougherty, M. J., et al. : *Macromolecules*, 26(1993), 1779
- 59) 鶴田慎二 : *新訂高分子合成反応*, (1979), 137, 日刊工業
新聞
- 60) 向井常博, 他3名 : *遺伝子 (第三版)*, (1990), 67, 東京化
学同人
- 61) ref. 60), p.68
- 62) 日本農芸化学会 : *物質生産のための遺伝子工学*, (1983),
5, 朝倉書店
- 63) Tirrell, D. A., et al. : *MRS Bull.*, 16-7(1991), 24
- 64) ref. 60), p.13 ~ 14

著 者 紹 介



矢野一久 Kazuhisa Yano

生年 : 1958年。

所属 : 高分子材料研究室。

分野 : 新規高分子材料の合成。

学会等 : 高分子子学会, 日本農芸化学会会
員。