

領域番号：2005
領域略称名：ソフト界面

文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究（研究領域提案型）

平成20年度 研究報告書

「ソフトインターフェースの分子科学」

（研究期間）

平成20年度 ～ 平成24年度

領域代表者
独立行政法人理化学研究所
前田 瑞夫

目 次

【研究成果報告】

ソフトインターフェースの分子科学・総括班

A 0 1 「ソフト界面の創成（ソフト界面を創る）」

菊池 明彦	東京理科大学	3
「温度応答性インターフェースの創成と生体分子認識制御」		
高原 淳	九州大学	7
「表面微細加工とナノグラフト層形成によるソフトインターフェースの精密設計」		
三浦 佳子	北陸先端科学技術大学院大学	11
「生体機能性樹状高分子を用いたソフトインターフェースの設計」		

A 0 2 「ソフト界面の解析（ソフト界面を探る）」

北野 博巳	富山大学	15
「高分子ブラシの機能と近傍の水の動態との相関に関する研究」		
熊木 治郎	山形大学	19
「高分子多成分単分子膜の構造形成に関する研究」		
栗原 和枝	東北大学	23
「生体機能分子を固定化したソフト界面の表面力測定」		
佐藤 縁	産業技術総合研究所	27
「3次元ナノ相分離膜構造と高感度分子認識能の動的解析」		
松岡 秀樹	京都大学	31
「高分子イオン密生ソフト界面のナノ構造と機能の相関」		

【研究成果報告】

A03 「ソフト界面の機能（ソフト界面を活かす）」

高井 まどか	東京大学	35
「分子認識バイオインターフェースのナノ構築と細胞機能診断デバイスへの展開」		
長崎 幸夫	筑波大学	39
「高度分子認識を目指した生体分子と合成分子のなす超構造界面密生層の構築 -PEG ゲルマイクロパタン上における肝細胞スフェロイドの構築と評価-」		
前田 瑞夫	理化学研究所	43
「DNA密生相が示す特異な界面現象の解明と応用」		
宮原 裕二	物質・材料研究機構	47
「半導体／生体分子ナノ界面の構築と遺伝子トランジスタへの応用」		
山岡 哲二	国立循環器病センター研究所	51
「リガンド固定化相と細胞表面で形成されるソフト界面での動的現象の評価と応用」		

ソフトインターフェースの分子科学・総括班

研究代表者：理化学研究所・前田瑞夫

研究分担者：東 北 大 学・栗原和枝

研究分担者：東 京 大 学・高井まどか

研究分担者：九 州 大 学・高原 淳

研究分担者：筑 波 大 学・長崎幸夫

1. 緒言

本領域研究では、生体分子や高分子などのソフトマターが形成する動的な界面すなわちソフトインターフェースについて、表面の精密パターニング、精密ポリマーブラシによる界面相創製、ソフト界面領域の分子キャラクタリゼーションと物理化学的考察、抗体や DNA などが つくるソフト界面の分子認識特性解析、マイクロチップやデバイスへの応用、などを多面的・協奏的に研究することにより、新たな機能材料を開発するとともに、「ソフトインターフェースの分子科学」という学術領域を創出することを目的としている。自己組織化によるボトムアップ型の界面構築法や、ナノインプリントないしはリソグラフィーなどのトップダウン法と組み合わせた精密パターニングを先導してきた界面分子基盤の専門家（A01「分子基盤」）、各種分光法や X 線・中性子散乱・反射率測定、原子間力顕微鏡、表面力測定、界面電気化学測定など界面解析の専門家（A02「分子計測」）、さらにタンパク質や核酸、多糖類そして細胞までを自在に操ることのできる機能界面の専門家（A03「分子認識」）が一堂に会する点に領域において、それらの緊密な連携のもとに新たな学術領域の創成を目指し、そのための方針策定、運営・支援、研究者交流・育成、国内外への研究成果発信などを、総括班として強力に推進していく。

2. 研究経過

本年度は領域立ち上げ年度にあたり、領域研究を構成するメンバー相互の間の十分な研究情報の交流と意志の疎通を図ること、ならびに本領域の周知に重点を置いた。総括班中心メンバーによる第1回ならびに第2回運営会議、領域メンバー全員参加による第1回領域会議（スタートアップ会議）を開催し、研究情報交流の機会を設けた。また本領域の周知ならびに外部との交流の機会を設けることを目的に、第1回公開シンポジウムを東京で開催し、総勢120名ほどの参加者を得た。関連する分野の研究者を講師として招聘し講演をしていただくとともに、本領域の趣旨、意義ならびに計画等についての詳細を報告した。さらに、評価グループ（岡野、梶山、小林、中西）は、高い見地から本領域研究運営についての助言を与えた。

領域 web ページ (<http://www.riken.jp/soft-kaimen/>) の立ち上げ、ニュースレターVol. 1 の発行、さらには、領域代表者の前田が中心となって、各地で開催された国際会議、研究会、シンポジウム等に積極的に参加、講演をすることで、本領域内外との研究情報の交流に努めた。

総括班活動記録

<運営会議>

第1回：理化学研究所東京連絡事務所：2008年11月22日

第2回：理化学研究所東京連絡事務所：2008年12月20日

第3回：テレコムセンタービル西棟2階：2009年1月27日（総括班評価グループを含む）

第4回：理化学研究所東京連絡事務所：2009年3月23日

<領域会議>

第1回：理化学研究所東京連絡事務所：2008年12月20日

（内容）

領域の概要と目標：前田瑞夫

研究計画説明：計画研究代表者全員

総括と事務連絡

<公開シンポジウム>

第1回：タイム24ビル（東京都江東区青海）：2009年1月27日

（内容）

領域代表のあいさつ・領域の紹介：前田瑞夫

研究紹介「親水性ポリマーブラシを用いたソフト界面の構造制御」：高原 淳

研究紹介「表面力より見る高分子電解質ブラシの特性」栗原和枝

研究紹介「ポリエチレングリコール密生層の構築と機能」長崎幸夫

特別講演「ゲルの摩擦と潤滑-生体界面低摩擦の謎に迫る」 龔 劍萍（北海道大学）

研究紹介「リン脂質ポリマーによる界面制御と医療診断デバイスの創製」：高井まどか

ポスター発表：全計画研究 13 件

<ニュースレター>

第1巻：平成21年3月23日発行

A01

ソフト界面の創成 「ソフト界面を“創る”」

1. 緒言

ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) は水中 32℃を境に低温で溶解、より高温で不溶化変化する熱刺激応答性高分子である。この高分子を材料界面に修飾すると、修飾界面は、温度変化に応答して低温で親水性を、32℃以上の高温で疎水性をそれぞれ示す温度応答性表面となる。この温度応答性表面が形成できる。温度応答性表面の合成には、これまで、片末端や側鎖に反応性官能基を持つ PIPAAm を固定する方法や放射線重合をするなどの方法がこれまで検討されてきた。一方で、近年、原子移動ラジカル重合 (ATRP) を用いて、表面に高分子ブラシを調製する方法が検討されている。本研究では、鎖長と密度、ならびに鎖組成を制御して調製される温度応答性高分子ブラシ表面のソフトインターフェースとしての特性を詳細に解析するとともにこの表面と生体分子との相互作用制御を通じた分離システムへの応用を検討していくことを目的とする。

平成 20 年度は、PIPAAm 修飾表面の調製をガラス表面、ガラス毛细管表面、ならびにフューズドシリカキャピラリー表面でそれぞれ検討し、温度変化に応答した表面ぬれ性の確認や生体分子との相互作用について初期の検討を行った。

2. 研究経過

【実験】 本年度は、PIPAAm を ATRP でカバーガラス表面、ガラス毛细管表面、ならびにフューズドシリカキャピラリー内腔面での修飾を検討した。カバーガラス、ならびにガラス毛细管の場合は、ピラニア溶液にて洗浄したガラスに、カバーガラスの場合は気相法で、ガラス毛细管の場合は溶液法でそれぞれ表面に 2-(m, p-クロロメチルフェニル) エチルトリクロロシランを反応させ ATRP 開始剤を導入した。シリカキャピラリー (内径 100 μm) の場合は、水酸化ナトリウム水溶液を通過して洗浄したものに溶液法で ATRP 開始剤を導入した。

各開始剤導入表面について、所定量の IPAAm モノマー、 CuCl 、 $\text{Tris}(2-(\text{N}, \text{N}-\text{dimethylamino})\text{ethyl})\text{amine}$ の共存下、25℃で重合を行い、PIPAAm ブラシ表面を調製した。カバーガラス、ガラス毛细管上に修飾した場合は、表面物性の一つとして温度変化に対する水に対する接触角の変化を測定し、表面に PIPAAm が導入されたことを確認した。フューズドシリカキャピラリーの場合には、疎水性の異なるモデル低分子化合物のコルチゾンとテストステロンの保持時間変化を確認して表面修飾ができていないかを確認した。

【結果と考察】 はじめに、カバーガラスに PIPAAm ブラシを導入したとき、この修飾表面の水に対する接触角変化を測定した。結果を図 1 に示す。モノマー、触媒等の濃度は一定のまま反応時間のみを制御して調製した表面の接触角

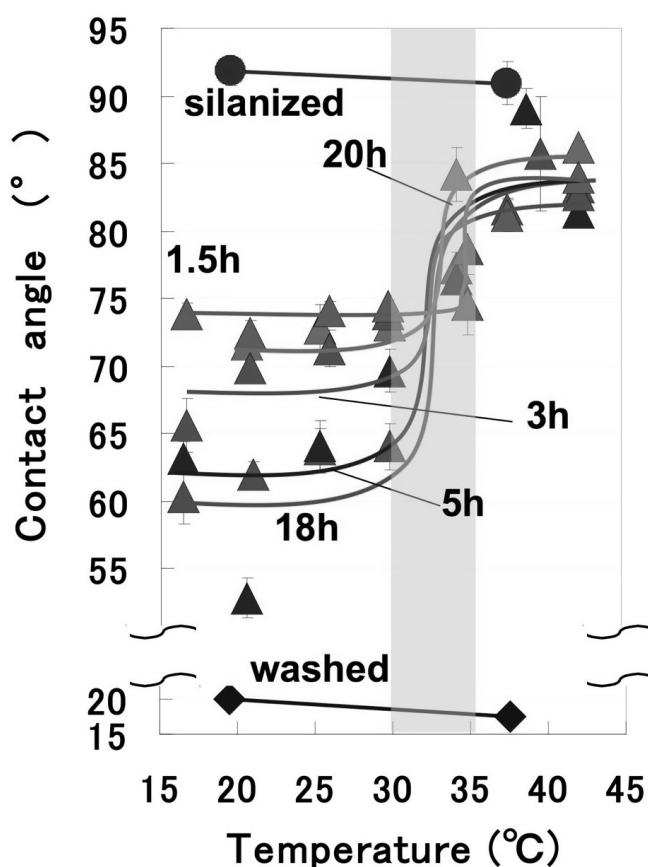


Fig. 1. Temperature-dependent water contact angle changes.

変化を測定したところ、PIPAAm ブラシを導入することにより、各修飾表面は温度変化に応答して 32℃を境に高温側で大きな接触角を、より低温側で小さな接触角を示した。反応時間を 1.5h～18h の間で変化させたところ、反応時間の増大に従って低温側の接触角がより小さな値を示し、PIPAAm 鎖長の増大とともに表面がより親水的になることが示された。このことは、PIPAAm 鎖長の増大とともに PIPAAm 鎖が伸長してより多くの水分子が鎖近傍に存在していることを示すものと考えられる。しかし、20h で反応させたものでは、低温側の接触角変化が他のものよりも小さくなった。これは、反応がうまくいかなかったものと考えられる。

続いて、ガラス毛细管内腔表面に ATRP により PIPAAm を導入した結果を図 2 に示す。ガラス毛细管における接触角測定は、毛细管内の水のメニスカスの高さを測定し、次式で算出した。

$$h = 2 \cdot \gamma \cdot \cos\theta / \rho \cdot g \cdot r$$

ここで、 h :メニスカス高さ(mm), γ :各温度における水の表面張力(dyne/cm), ρ :水の密度(g/m^3), g :重力加速度(m/s^2), r :毛细管内半径(mm)をそれぞれ表す。図に示すように毛细管内径により多少の差はあるものの 40℃で接触角が大きく、20℃では小さな値を示し、可逆的に変化した。このことからガラス毛细管内面に PIPAAm が修飾できたものと考えられる。さらに、毛细管の場合でも、温度変化に応答したメニスカス高さ変化から図 1 に示すような 32℃近傍で非連続的に接触角が変化する結果が得られ、PIPAAm の導入に成功したことが明らかとなった。

そこで、フューズドシリカキャピラリー内腔表面に ATRP 法により PIPAAm を導入し、このキャピラリーを HPLC システムに接続して、疎水性度の異なるステロイドホルモンの保持時間変化を調べ、保持時間の違いから表面への PIPAAm の導入を検討した。PIPAAm 修飾キャピラリー (内径 $100\ \mu\text{m}$) の温度を循環恒温水槽に浸漬しながら制御してステロイドの溶出挙動の変化を調べた結果を図 3 に示す。20℃では、コルチゾン、テストステロンともに 1 つのピークで溶出したものの、キャピラリー温度を 40℃にすると、2 つのピークが認められた。1 つめの保持時間はコルチゾンに相当し、2 つめのピークはテストステロンの保持に伴うものであった。さらに 50℃にするとテストステロンの保持時間は延長した。コルチゾンとテストステロンでは、テストステロンのほうが水-オクタノール系での分配係数 P の対数($\log P$)が大きく、疎水性が高いことから、この結果は、温度変化に伴って PIPAAm 鎖の脱水和に基づく表面の疎水性変化により、より疎水性のテストステロンと疎水化 PIPAAm 表面との相互作用が増大した結果と考えることができる。以上によりフューズドシリカキャピラリー内に PIPAAm を ATRP 法により導入できたことが明らかになった。

【今後の方針】

ATRP 法による PIPAAm ならびにその誘導体ブラシ表面の構築を解析するために、種々条件で調製した PIPAAm 表面の乾燥状態、並びに水和状態における表面形状観察を原子間力顕微鏡などにより行っていく。さらに表面の水に対するぬれ性変化や、タンパク質との相互作用解析を行い、PIPAAm 表面の特性を明確化していく。

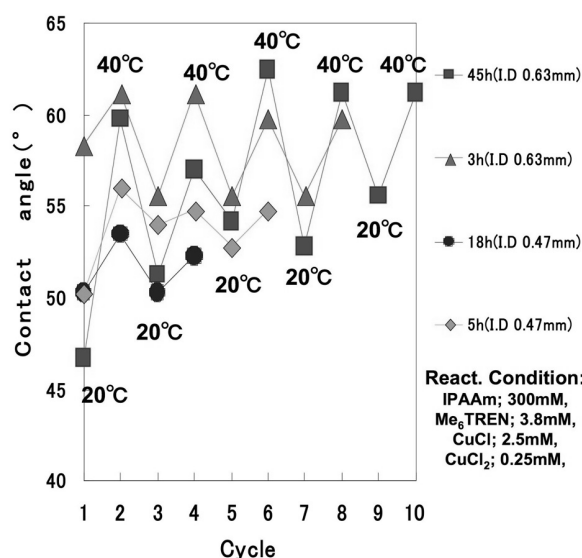


Fig. 2. Contact angle changes with repeated temperature cycles between 20 and 40℃ for PIPAAm-grafted glass capillary tubings.

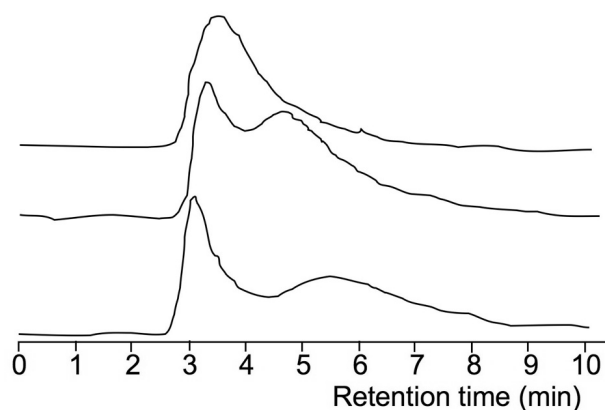


Fig. 3. Temperature-dependent elution changes of cortisone (left peak) and testosterone (right peak) at 20℃ (upper), 40℃ (middle), and 60℃ (lower).

Preparation of Thermoresponsive Interfaces for Modulation of Biomolecular Interactions

Akihiko KIKUCHI

Department of Materials Science and Technology, Tokyo University of Science

2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, JAPAN

Tel: (0)4-7122-9686, Fax: (0)4-7122-1499, E-mail: kikuchia@rs.noda.tus.ac.jp

Poly(N-isopropylacrylamide) (PIPAAm) is well-known thermoresponsive polymer; the PIPAAm in the aqueous solution showed temperature dependent soluble/insoluble changes around 32° C. Introduction of PIPAAm to the solid surfaces induces aqueous wettability changes. Previously, we introduced PIPAAm to the solid surfaces by using one-end functionalized PIPAAm. However, in this procedure, surface density of the PIPAAm was relatively low and the surface functional groups reacted with end-functional PIPAAm at the most of 60%. Thus to introduce PIPAAm at quite high density, another method should be considered. To solve this problem, surface-initiated atom transfer radical polymerization (ATRP) was applied to prepare thermoresponsive soft interfaces. In this study, we investigated the preparation of PIPAAm-grafted soft interfaces by ATRP method, and temperature-dependent surface property alterations were examined in terms of the wettability changes.

First, 2-(m,p-chloromethylphenyl)ethyltrichlorosilane was introduced to glass coverslips or capillary tubings made from glass or fused silica. Then, known amount of IPAAm monomer, and catalysts for ATRP was dissolved in N,N-dimethylformamide (DMF) and initiator-immobilized glass coverslips were immersed to this solution. Then, reaction proceeded to a definite time at 25° C. in the case of glass capillary or fused silica capillary, monomer solutions containing ATRP catalysts were continuously injected using syringe pump. These modified surfaces were used for measurement of temperature-dependent wettability changes as well as the interaction with biomolecules; cortisone and testosterone as model hydrophobic molecules.

Thermoresponsive wettability of PIPAAm-modified surfaces showed contact angle transition around 32° C regardless of the reaction time. In addition, water wettability at low temperature side decreased with increasing reaction time for up to 18h. This was probably due to the increased hydration of extended PIPAAm chains with increasing reaction time. Thus, IPAAm ATRP may be controlled with reaction temperature. Then, surface-initiated IPAAm polymerization was performed on inner surface of glass capillaries or fused silica capillary. Similar temperature-dependent wettability changes was also observed for PIPAAm-modified glass capillaries.

Next, we investigated surface property alteration for fused silica capillary interfaces by observing the steroid retention. At low temperature where PIPAAm was hydrated, both cortisone and testosterone eluted in one peak, while with increasing temperature, more hydrophobic testosterone elution retarded. Although more detailed examination should be performed, surface initiated ATRP is successful for PIPAAm introduction. We will continue to investigate the properties of PIPAAm-modified surfaces.

業績リスト

1. 原著論文

1) Aya Mizutani, Akihiko Kikuchi, Masayuki Yamato, Hideko Kanazawa, Teruo Okano, “Preparation of thermoresponsive polymer brush surfaces and their interaction with cells”, Biomaterials, **29**, 2073-2081 (2008).

2. 著書・総説

3. 会議発表

1) 第 19 回高分子ゲル研究会講座, 2008.12.8 東京・(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター別館 11 階第 1 会議室, “生体分子の分離を目指す温度応答性カラムの創製” 菊池明彦 要旨集 p.23-26 (**招待講演**)

2) 高分子学会 08-6 ポリマーフロンティア 21, 2009.2.20, 東京工業大学百年記念館フェライト会議室(東京), “温度応答性表面のバイオデバイスへの応用”, 菊池明彦 要旨集 p.27-32 (**招待講演**)

研究代表者：九大・先導研 高原 淳

研究分担者：九大・先導研 小林 元康

1. 緒言

微細加工後等の手法で調製した比表面積の大きな材料表面に種々の官能基や高分子鎖を導入し機能性を賦与することにより、これまでの材料にくらべ優れた生体機能性のソフトインターフェースデバイスが実現可能となる。そのための手法として本研究では表面微細加工技術によるパターンニングあるいは電界紡糸法(ESD)の二種類の手法と表面開始重合を複合化した新規ソフトインターフェース構築法を検討する。

本年度は表面開始ラジカル重合のための官能基（例えば Br 基）を有し、電界紡糸で可能な高分子を分子設計・合成し、ESD によるナノファーバーファブリック調製のための基盤技術を確立することを目的として研究を行った。

2. 研究経過

1) 高分子固体表面からの制御ラジカル重合

高分子固体の表面化学組成制御のモデル実験としてポリ(フッ化ビニリデン-*co*-トリフルオロエチレン)(P(VDF-*co*-TrFE))を用いて高分子固体表面からの制御ラジカル重合を検討した。Figure 1 はその反応スキームである。アルゴン置換したガラス容器に P(VDF-*co*-TrFE) (VDF/ TrFE = 75/25, mol/mol)のフィルム(厚さ: 80 μm)、塩化銅(I)、ペンタメチルジエチレントリアミン、アクリル酸 *t*-ブチル、2-クロロイソ酪酸エチルを順次加え 383 K にて 18 時間反応させることでフィルム表面にポリアクリル酸 *t*-ブチル(P*t*BA)をグラフトした。得られたフィルムを *p*-トルエンスルホン酸および炭酸水素ナトリウム水溶液で処理することでグラフトポリマーをポリアクリル酸(PAA)、ポリアクリル酸ナトリウム(PAANA)へと変換した。また、触媒およびモノマーを 4,4'-ジメチル-2,2'-ビピリジル、スチレンに換え、383 K で 24 時間反応させることでポリスチレン(PS)のグラフトを行った。さらに、得られた PS グラフトフィルムを濃硫酸と反応させることによってグラフトポリマーをポリスチレンスルホン酸(PSSA)へと変換した。各反応後のフィルムは十分洗浄と乾燥を行った後、全反射赤外分光法(ATR-IR)、X 線光電子分光法(XPS)から構造確認を行い、接触角測定により表面濡れ性を評価した。

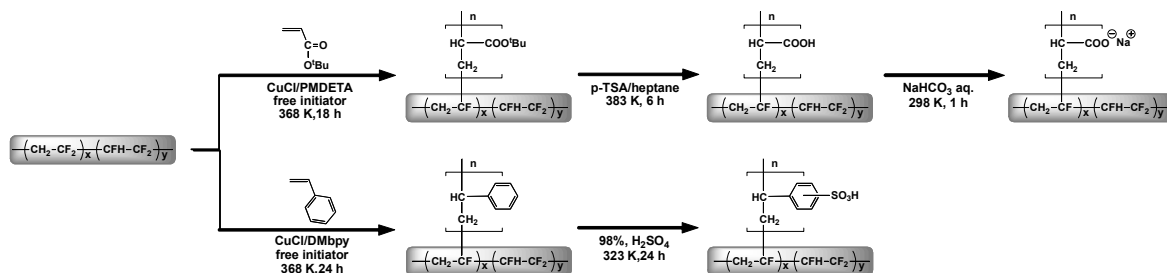


Figure 1 ポリ(フッ化ビニリデン-*co*-トリフルオロエチレン)(P(VDF-*co*-TrFE))フィルム表面の直接制御ラジカル重合による表面化学組成制御のスキーム

表面開始重合前後での P(VDF-*co*-TrFE)フィルム表面の ATR-IR スペクトルを測定した。アクリル酸 *t*-ブチルの表面開始重合後の ATR-IR スペクトルから、1720 cm^{-1} 付近にカルボニル基の伸縮振動によるピーク、2950 cm^{-1} 付近にメチル基の C-H 伸縮振動によるピークが新たに観測されており、フィルム表面に P*t*BA がグラフトされていることが明らかとなった。また、スチレンの表面開始重合後では 1500, 1600 cm^{-1} の芳香環の C=C 伸縮振動によるピーク、3000~3100 cm^{-1} の芳香環における C-H 伸縮振動のピーク、695 cm^{-1} の芳香環の環変角振動のピークが観測されていることから、同様にフィルム表面へ PS がグラフトされていることが示唆される。XPS 測定、NMR 測定によっても同様に P*t*BA、PS のグラフト化に対応する化学

構造変化に関する知見が得られており、フィルム表面からグラフト重合が進行したことを確認した。さらに、グラフトした **PtBA** の酸加水分解および中和反応によりグラフトポリマー側鎖のエステル基がカルボン酸ナトリウム塩へと変換したと、**PS** のスルホン化によりグラフト鎖をポリスチレンスルホン酸に変換したことを ATR-IR および XPS 測定から確認した。

各反応段階における基板表面の水に対する静的接触角を測定した。**PtBA** グラフトフィルムでは、グラフトポリマーが **PtBA** の時は最表面に存在する疎水性の *t*-ブチル基の影響とフィルム表面の粗さによってフィルム表面の接触角は 105 ° まで増加しており、より疎水性の表面が生成した。続いて加水分解、ナトリウム塩基対形成によりグラフトポリマーが親水性の **PAA**、**PAANa** に変換されたことで接触角は 61°、15° と大幅に低下し、親水性の表面へと変化した。一方、**PS** グラフトフィルムでは、95° とわずかに疎水性となり、**PSSA** に変換されたことで接触角は 21° まで低下し、親水性の表面を形成することが可能であった。これらの水に対する接触角の変化から表面にグラフトしたポリマーの濡れ性に対応して **P(VDF-co-TrFE)** フィルム表面の濡れ性も変化していることが確認できた。このようにフッ化ビニリデン系高分子フィルムを溶解することなく表面から直接ポリマーを成長させることで、表面のみにバルクとは異なった特性を付与することが可能であり、グラフトポリマーの選択によってバルクの性質を損なうことなく **P(VDF-co-TrFE)** フィルムの表面物性を制御できることが明らかとなった。

2) 制御ラジカル重合官能基を有する高分子の分子設計

エレクトロスプレーデポジション(ESD)後に表面の親水性・疎水性を表面開始グラフト重合により自在に制御できる高分子を分子設計し、合成を検討した。具体的には Figure 2 に示すようにメタクリル酸メチルとメタクリル酸 2-トリメチルシリロキシエチルとの原子移動ラジカル重合(ATRP)によるランダム共重合を行い、適切な条件で加水分解することで側鎖にヒドロキシ基を 8mol% 有するポリマーを得た。これに 2-ブロモイソブチル酸ブロミドを反応させ、ヒドロキシ基を臭化アルキルエステルに置換した。この臭化アルキル基は ATRP 開始能を持つ官能基であり、これを基点として新たなグラフトポリマーを生長させることが可能である。今後、ESD 法によりこのランダム共重合体のナノファイバーを調製し、その繊維表面に適切なポリマーをグラフトすることで表面の親・疎水性の制御を試みる計画である。

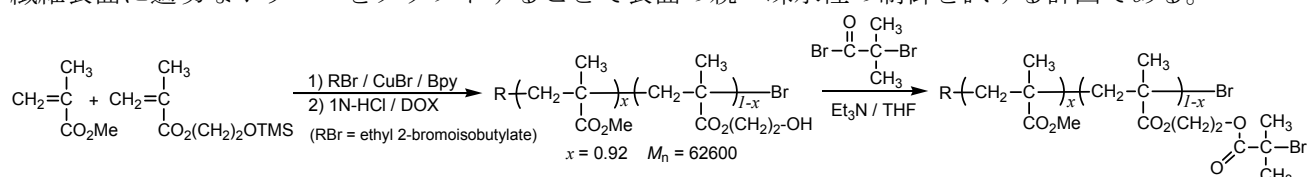


Figure 2. 表面開始グラフト重合用ポリマーの合成

3) ナノファイバー調製

ESD 法により調製するナノファイバーのモデルとして生分解性ポリウレタンを用いた。エレクトロスプレー現象は、先端のとがった微細な注射針に高電圧を加えることで電界集中により針の先端液体がスプレーする現象である。ESD 法でポリマーの溶液をスプレーし、ナノサイズのパーティクルやファイバー (ナノファイバー) を形成させながら、静電気力を利用して基板などに堆積・固定させる。SPUU は methyl 2,6-diisocyanatohexanoate (LDI)、1,4-ブタンジアミン (BDA)、ポリカプロラクトンジオール (PCL) の比率を変化させてプレポリマー法により合成した。サンプル名は PCL(PCL の M_n)(PCL 重量分率)BDA で表記した。SPUU の溶液の場合もエレクトロスプレー現象は観測され、濃度が薄い条件では粒子とファイバーが形成されたが、高濃度溶液にすることにより均一なファイバーを形成した。Fig.3 は 12 wt%の(DMF/THF)混合溶液から調製した PCL(1250)(71)BDA のマイクロファイバー不織布の SEM 像である。これはナノファイバーを連続的に積層したものである。今後は 1) で調製した高分子を利用したナノファイバーの調製を検討し、その表面化学組成の制御を行う。

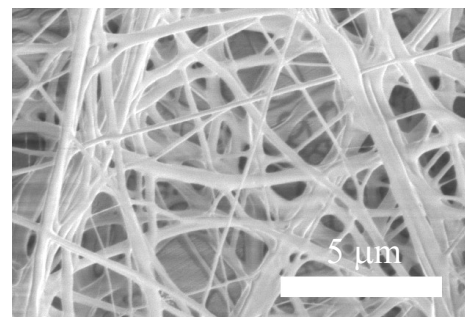


Figure 3 12 wt%の(DMF/THF)混合溶液から調製した PCL(1250)(71)BDA のマイクロファイバー不織布の SEM 像

Precise Design of Soft Interfaces through Surface Nano-fabrication and Nano-graft Layer Formation

Atsushi Takahara, Motoyasu Kobayashi
Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University

744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395
TEL 092-802-2517, FAX 092 802-2518, E-mail:takahara@cstf.kyushu-u.ac.jp

In order to control the biological event at the surfaces and interfaces of soft materials, precise surface structure design and property control are necessary. Purpose of this research project is to propose a method to fabricate soft interfaces through surface nano-texture control and surface nano-graft layer formation.

In order to confirm the initiation of polymerization capability, surface-initiated atom transfer radical polymerization (ATRP) of tert-butyl acrylate (*t*BA) and styrene were directly carried out from non-modified surface of a poly(vinylidene fluoride-*co*-trifluoroethylene) [P(VDF-*co*-TrFE)]film. ATR-IR measurement of the resulting films exhibited the infrared absorption peaks due to the carbonyl and C-H bonds from PtBA grafted film surface, and peaks of C=C bonds in aromatic ring from polystyrene grafted film surface. The resulting grafted poly(*t*BA) was converted to poly(acrylic acid sodium salt) by hydrolysis and neutralization. On the other hand, grafted polystyrene was converted to poly(styrene sulfonic acid) by sulfonation. Water contact angle of P(VDF-*co*-TrFE) film surface was drastically reduced from 91 to 15 degree by the effect of immobilization of hydrophilic polymer.

As mentioned above, a halogen-carbon bond in a polymer can act as an initiation site of ATRP to generate a graft polymer, which can control the surface properties of the halogen-containing polymer materials. We prepared a random copolymer having alkylbromide moiety by ATRP of methyl methacrylate (MMA) and 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). The unit ratio of MMA/HEMA in the copolymer was 98/8 (mol/mol). Each hydroxy group of HEMA unit was converted 2-bromoisobutyloxy ester by the additional reaction of 2-bromoisobutyloxy bromide and the copolymer. The resulting copolymer is expected to form a nanofiber and to be covered with a nano-graft layer prepared by surface-initiated ATRP from the alkylbromide sites on the fiber surface.

Preliminary experiment on electro spray deposition (ESD) of polymer was carried out for biodegradable segmented poly(urethaneurea) (SPUU). SPUU with 75wt% polycaprolactone diol (PCL) was synthesized via a standard two-step prepolymer method using lysine-based diisocyanate (LDI) and PCL with $M_n=1250$ as a soft segment, LDI and 1,4-butanediamine (BDA) as a hard segment. In ESD experiment, morphological change of the electrospray deposited microstructure is expected when the concentration of polymer solutions was changed. It was shown that higher concentration of solution favored to form uniform fibers without beads-like structure. A repeated deposition of nanofiber with transverse movement of substrate gives non-woven fabrics of SPU nanofibers.

業績リスト

1. 原著論文

- 1) T. Kimura, M. Kobayashi, M. Morita, A. Takahara, Preparation of Poly(vinylidene fluoride-co-trifluoroethylene) Film with a Hydrophilic Surface by Direct Surface-initiated Atom Transfer Radical Polymerization without Pretreatment" Chem. Lett., 38(5), 446-447 (2009).
- 2) M. Kobayashi, H. Yamaguchi, Y. Terayama, Z. Wang, K. Ishihara, M. Hino, Structure and Surface Properties of High-density Polyelectrolyte Brushes at the Interface of Aqueous Solution, Macromol. Symp. in press.

2. 著書・総説

- 1) M. Kobayashi, Z. Wang, Y. Matsuda, M. Kaido, A. Suzuki, A. Takahara, Tribological Behavior of Polymer Brush Prepared by the "Grafting-from" Method", in S. S. Kumar Ed. "Polymer Tribology", Imperial College Press, 2009, pp582-602.
- 2) 小林元康、高原 淳、高分子超薄膜のトライボロジー特性、高分子、58, 204-208 (2009).

3. 会議発表

- 1) A. Takahara, M. Kobayashi, Design of Soft Interfaces through Biomimetic Approach, Ninth International Symposium on Biomimetic Materials Processing(BMMP-9), Jan、名古屋(2009).
- 2) 高原 淳、小林元康、表面ナノ形態と表面化学組成制御による材料表面の親・疎水性制御、創造機能化学第 116 委員会(平成 20 年度 1 月期研究調査報告)、1 月、東京(2009).
- 3) 高原 淳、小林元康、バイオインターフェースのためのソフトマテリアルの構造制御技術、生体医工学会九州支部講演会、3 月、福岡(2009).

4. その他 (例えば特許など)

1. 緒言

生命現象は細胞界面における生体分子認識現象が深くかかわっている。例えば、細胞の接着、分化や病原体の細胞感染、疾病の発症は、生体分子とタンパク質の分子認識及びそれに基づくシグナル伝達によって成り立っている。こうした生体分子認識は、生体外マトリックスによる超分子構造、糖脂質の集合構造など精妙で微細な生体分子空間によって制御されている。それ故、生体機能や分子認識現象を制御するためには、精緻な構造が必要となる。しかしながら、生体分子の空間配置の詳細は未だ分かっておらず、生体分子界面の設計は試行錯誤的に行われている。明確にリガンドの微細配置を制御した材料を作成するのに有効と考えられる。

また、タンパク質や細胞の材料への接着、吸着などの人工材料界面での生体分子認識においても、材料の性質が大きな役割を果たしている。その際に官能基の精密な配置や密度が生体分子界面の性質に寄与することが徐々に分かってきた。しかしながら、これを精密に制御して検証する術は限られている。

界面の性質を精密にコントロールする手法としては、光リソグラフィーを用いた方法が一般的に検討されてきた。光リソグラフィーは半導体産業を中心として発達したもので、メゾスコピック領域での界面制御には有効であるが、光の波長(180–250nm)を超えて分子を配置することはできない。そのため、有機分子の性質を決定づけるようなオームストロングでの官能基の精密配置には有機分子の精密設計が欠かせない。

一方で、デンドリマーは一分子で精密なナノ構造を持つ分子であり、これをビルディングブロックとして、分子集合体や界面を創製すれば、官能基や生体分子の精密な空間配置のコントロールが可能になり、生体分子の機能を詳細に検討できる。本研究では、自己組織化単分子膜を中心とした、デンドリマー及び糖デンドリマー単分子膜の創製とその基本的な性質の解明を行った。

2. 研究経過

(1) 糖鎖結合デンドリマーの合成とその生体機能の解析

細胞表面の糖鎖はタンパク質と相互作用することで、生体の認識信号として働き、細胞の接着や分化、病原体の細胞感染などに関与している。この糖鎖とタンパク質との相互作用は、単独では小さいが、糖鎖が集合化すると多価効果が働き、飛躍的に強くなることが知られている。そこで、糖鎖の密度を人工的に制御する手法として、デンドリマーの末端に糖鎖を結合した糖デンドリマーを合成し、これを利用

した糖鎖機能界面の創製と生体機能の界面を行った。

糖は多くの水酸基を有する多官能性化合物であるため、糖鎖の誘導体化は一般に煩雑なものになる。そこで、我々はデンドリマーの構築には糖と拮抗しない反応としてクリック反応を選び、これによってデンドリマーの合成を行った(図1)。加えて、基板上にアセチレン基を固定化した薄膜を形成して、糖デンドリマーの固定化を行った。薄膜の形成については、各種分光法などによって確認した。得られた薄膜については表面プラズモン(SPR)を利用することで、糖認識タンパク質(レクチン)を用いた生体分子認識について定量的に調べた。すると、マンノースを結合さ

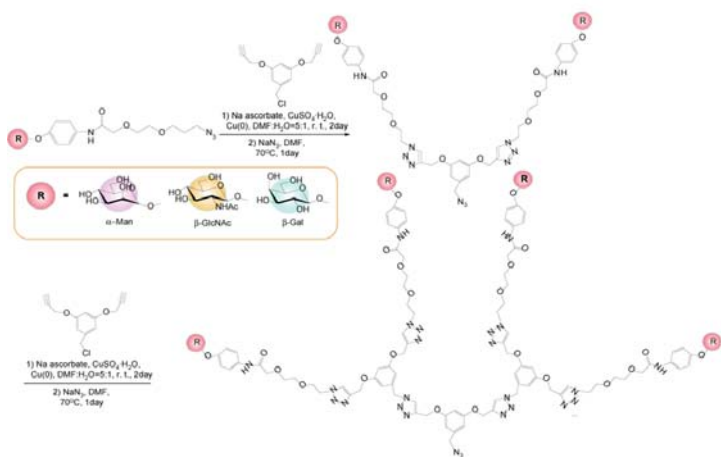


図1 糖鎖結合デンドリマーの合成と多価化合物の構造

せたデンドリマーでは、特異的なレクチン(ConA)の認識がデンドリマー世代の上昇による糖鎖の末端密度の上昇と共に、強く結合することがわかった。一方で、ガラクトースを結合したデンドリマーでは、特定のデンドリマー世代で、認識が強くなった。このようにデンドリマー固定化薄膜では、糖認識における、多価効果の様子について、定量的に調べることができた。また、タンパク質における多価効果の発現には差異があることも明らかにした。

(2) 硫酸化糖結合デンドリマーによるタンパク質アミロイド化の制御

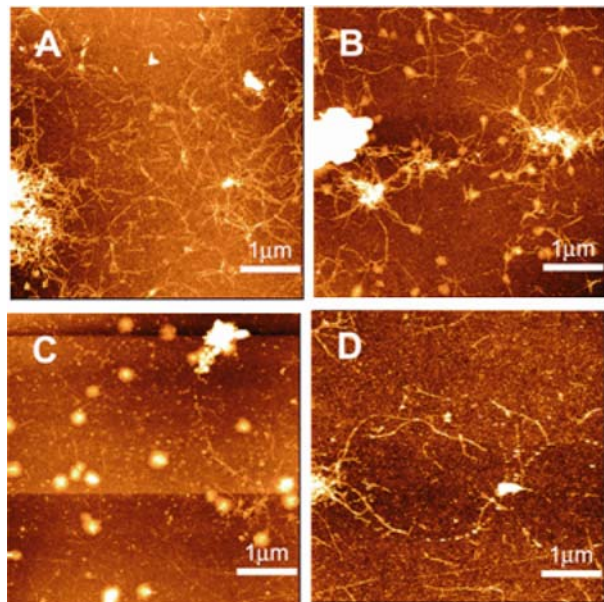


図 2 硫酸化糖界面におけるアミロイド β の形状 (A) 単価糖鎖上のアミロイド β 、(B) 二価の糖鎖上のアミロイド β 、(C) 三価の糖鎖上のアミロイド β 、(D) コントロール基板上

細胞表面に存在するグリコサミノグリカンは高度に硫酸化された糖クラスターであり、種々の生体機能に関与していることが知られている。特に、最近グリコサミノグリカンが、アルツハイマー病の病原体である、アミロイド β タンパク質の変性に関与することが分かってきて注目を集めている。

そこで、(1)と同様の手法で、硫酸化糖クラスターを合成して、これを固定化した界面を調製した。この界面を利用して、アミロイド β (1-42)と硫酸化糖クラスターの相互作用を調べた。アミロイド β は、多価効果によって、糖鎖のダイマー構造以上のクラスターに強く結合することがわかった。糖クラスター界面上で、アミロイド β をインキュベートしたところ、糖鎖の価数によって、タンパク質の凝集体の形状が大きく異なり、価数が高くなるほど、球状の形態を呈することがわかった(図 2)。アミロイド β の形状はタンパク質の毒性と強く関係することから、興味深い。

(3) デンドリマー自己組織化膜の創製とタンパク質吸着性の制御

細胞や基材界面のタンパク質などの生体分子の吸着現象は、特異的な認識機構が介在する場合もあれば、静電的な相互作用などが介在し、界面の構造が大きく寄与している。デンドリマーは分子のサイズや末端官能基の構造や密度などに明らかな特徴があるため、これを固定化したモデル界面を用いることで、生体機能性界面として有用な機能が期待できると考えた。

アミン末端を持つポリアミドアミンデンドリマーは金へと吸着して、自己組織化単分子膜を形成した。この薄膜へのタンパク質の吸着について、SPR を利用して調べた。ポリアミドアミンデンドリマーでは表面がカチオンにチャージしている。等電点が、負である、BSA やフィブリンノーゲン、正であるリゾチームの接着について検討を行った。静電的に相互作用する BSA などは、特に世代数が低い 0-2 場合には界面に吸着する性質を示し、高い世代のデンドリマー界面では、吸着しなかった。リゾチームの場合は、静電相互作用が働かないと考えられるが、低い世代では吸着した。そして、4 世代目以降のデンドリマー界面では殆どタンパク質が吸着しない、不活性界面であることがわかった。

今後の研究では SAM を中心としたデンドリマー界面作成の手法について、一層研究を重ねて、デンドリマー界面を利用した、生体機能性材料の設計を行いたい。

Design of Soft Interface with Bioconjugate Dendrimers
Yoshiko Miura
Japan Advanced Institute of Science and Technology

1-1 Asahidai, Nomi, Ishikawa, 923-1292, Japan
TEL +81-761-51-1641, FAX+81-761-51-1645, E-mail miuray@jaist.ac.jp

The biological phenomena are strongly related to the biomolecular recognition at the interface such as cell adhesion and pathogen invasion. The biomolecular recognitions are controlled by the well-ordered display of the biosignal molecules at the cell surfaces. It is important to control the display of the biosignal molecules in the well-defined nano level. We tried to combine the biosignal molecules to dendrimer to control the display. In this investigation, we studied the formation of interface with dendrimer.

First, we synthesized the saccharide-conjugate dendrimer with α -Man, β -GlcNAc and β -Gal via click chemistry, and the glycodendrimers were immobilized on the gold substrate, and the affinities with sugar recognition proteins (lectins) were measured by surface plasmon resonance (SPR). The glyco-dendrimer immobilized substrates showed specific lectins such as α -Man to ConA due to the multivalent effects. The multivalent effects were dependant on the combination of saccharide and lectins. For example, the interaction between α -Man and ConA was amplified by the higher generation of dendrimers, but that between β -Gal and RCA₁₂₀ was not simply amplified by the multivalency. The substrate with glycodendrimer became the tool to analyze the saccharide-protein interactions.

Then, we prepared the substrate with multivalent sulfonated GlcNAc, and investigated the interaction with amyloid b(A β (1-42)) peptide with SPR, AFM and FTIR-RAS. The interaction of A β (1-42) with sulfonated GlcNAc was amplified by multivalency, but the modest valency of sulfonated GlcNAc showed the strongest interaction to A β (1-42). The morphology of A β (1-42) was investigated with the substrates with various valency of sulfonated GlcNAc. A β (1-42) was incubated with the substrates. The fibril formation was observed with the monovalent sulfonated GlcNAc, and the round object formation was observed with higher valent sugars. The results showed that the glyco-dendrimer substrates were the good model of the glyco-cluster on the cell membrane to reveal the mechanism of the unknown biological phenomena including diseases.

We also prepared a novel dendrimer interface using polyamidoamine dendrimers (PAMAM dendrimer) on the gold substrate, and investigated the biological properties of the dendrimer interface. Since the dendrimer interface had the multiple amine groups, the dendrimer immobilized substrate showed the proteins with negative net charge. But the protein affinities were reduced with the higher generation of dendrimers. The condensed functional groups at the dendrimer interface showed the specific properties to protein affinities.

We succeeded in the preparation of the dendrimer interface and investigated the basic properties of the biological functions in 2008.

業績リスト

1. 原著論文

- 1) T. Fukuda, S. Onogi, Y. Miura, Preparation and Properties of Dendritic Sugar Immobilized Surface, *Trans. Mat. Soc. Jpn*, 33, 733, 2008.
- 2) The monolayer of α -Man via Si-C bond formation and protein recognition, K. Funato, N. Shirahata, Y. Miura, *Thin Solid Films*, accepted
- 3) Y. Miura, S. Onogi, K. Yamamoto, Synthesis of Glycodendrimer via Click Chemistry and Protein Affinities, *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn*, 33, 729, 2008.
- 4) Y. Miura, K. Yamamoto, K. Yasuda, Y. Nishida, K. Kobayashi, Inhibition of Alzheimer Amyloid Aggregation with Sulfate Glycopolymers, *Advances in Science and Technology*, 57, 166-169, 2008.
- 5) Y. Miura, T. Yamauchi, H. Sato, T. Fukuda, The Self-Assembled Monolayer of Saccharide via Click Chemistry: Formation and Protein Recognition, *Thin Solid Films*, 516, 2443, 2008.

2. 著書・総説

- 1) 糖質有機薄膜を用いた生体検出, 三浦 佳子, *表面*, 46, 9, 443, 2008.

3. 国際会議発表

- 1) Y. Miura, Glyco-Nano Interface, IUMRS 2008, December Nagoya
- 2) M. Toyoshima, T. Fukuda, Y. Miura, Preparation and Biological Properties of Glycopolymer Modified Gold Nanoparticles, IUMRS 2008, December Nagoya
- 3) H. Akabane, K. Funato, Y. Miura, Synthesis of a Neamine Copolymer that Binds to the Ribosomal RNA, IUMRS 2008, December Nagoya
- 4) K. Funato, N. Shirahata, Y. Miura, Self-Assembled Monolayer of Micropatterned Sugar on Silicon Using a Si-C bond, IUMRS, 2008, December Nagoya
- 5) S. Sakamoto, Y. Saito, N. Yui, Y. Miura, Synthesis and Biological Properties of Glycosaminoglycan Mimic Polyrotaxane, IUMRS, 2008, Nagoya.

A02

ソフト界面の解析 「ソフト界面を“探る”」

高分子ブラシの機能と近傍の水の動態との相関に関する研究

研究代表者: 富山大学理工学研究部・北野博巳

研究分担者: 富山大学理工学研究部・源明 誠

1. 緒言

医用材料やバイオセンサーを作成する際には、タンパク質等の非特異吸着が常に問題となる。これを解決する手段として種々の生体不活性材料の開発が試みられてきたが、高分子ブラシもその一つである。本研究では、高分子ブラシの機能と水の構造との相関を調査することを目的とし、まず新規生体不活性ブラシの構築を試みた。さらに、高分子ブラシの水和構造評価に大きな役割を果たすことが期待される振動分光法を、優れた血液適合性が見いだされている高分子薄膜に適用した。

2. 研究経過

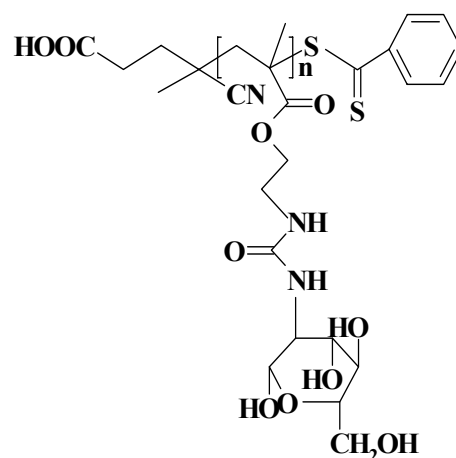
2. 1 ポリグルコシルウレアブラシのタンパク質吸着抑制効果

制御ラジカル重合の一種である可逆的付加解裂連鎖移動反応(Reversible addition-fragmentation chain transfer, RAFT)は使用可能なモノマーや溶媒が多岐にわたり、得られたポリマーの分子量を制御することができるという特長を有している。本研究では、RAFT 法により得られた Glucosylurea ethyl methacrylate (GUMA)の重合体を、ガラス上に単粒子吸着させた金コロイド上にブラシとして集積させた。さらに局在表面プラズモン共鳴法 (Localized surface plasmon resonance, LSPR) により、タンパク質の同ブラシへの吸着性の評価、検討を行なった。また、糖に対する親和性を有するレクチンの特異吸着の有無についても評価を行なった。

開始剤(4,4'-Azobis(4-cyanopentanoic acid))、及び連鎖移動剤(4-Cyanopentanoic acid dithiobenzoate) を用いて GUMA を重合した (Scheme 1)。得られたポリマーの末端を NaBH_4 により還元した Poly-GUMA-SH を用いて金コロイド基板上にポリマーブラシを構築させた。

タンパク質のポリマーブラシに対する吸着特性を LSPR より検討したところ、BSA や lysozyme、 γ -globulin、fibrinogen の吸着が大きく抑えられ、タンパク質の非特異吸着に対するポリグルコシルウレアブラシの強い抑制効果が見いだされた。一方、RAFT 重合により得られたアニオン性ポリマーおよびカチオン性ポリマーからなるブラシの場合、PGUMA ブラシに比べ BSA が多く吸着していた。

さらに糖結合性タンパク質であるレクチンと、ポリマー構造上に糖を持つ PGUMA-SH ブラシとの相互作用を LSPR 法より観察を行なった。グルコース、マンノースに対する親和性を有する Concanavalin A (Con A) や N-アセチルグルコサミンに対する親和性を有する小麦胚芽レクチン (WGA) の吸着がほとんどなかった。これは PGUMA 中の糖が、天然の糖類には例がない C2 炭素を経由して高分子主鎖と結合しているため、レクチンに認識されなかったと考えられ、これまでに試みられているグルコース担持ポリマー-PMEGlc [3]などの糖担持ポリマーとは異なる GUMA の特異的な性質が見出された。



Scheme 1. Chemical Structure of PGUMA.

2. 2 ポリ(メタ)アクリレート中の水の再結晶化挙動に関する研究

昇温過程で生じる水の結晶化は、再結晶化と呼ばれている。一般に、高分子-水系における再結晶化は、アモルファス氷 (ASW) から結晶氷 (氷 I_h) への相転移と考えられている。これまでは水溶性高分子系に限って知られていたが、優れた血液適合性が見いだされている水に不溶なポリ(2-メトキシエチルアクリレート) (PMEA) 中にも再結晶化水が存在することが、最近報告された。当該系も、熱量測定 (DSC) に基づきASWの氷 I_h への相転移と解釈されているが、DSCは、その測定原理から、その場測定はできない。

そこで本研究では、その場測定が可能でOH伸縮振動に対して高い感度を有する赤外分光法を用いて、固体高分子中における水の再結晶化挙動について検討した。

ポリ(2-メトキシエチルアクリレート) (PMEA), ポリ(n -ブチルアクリレート) (PBA) 中に収着した水の赤外スペクトルは、一定湿度雰囲気暴露したポリマーと減圧乾燥したポリマーの差スペクトルとして得た。温度依存測定は、冷却速度 0.25 - 5.0 K $\cdot$ min $^{-1}$, 昇温速度 0.5 - 4 K $\cdot$ min $^{-1}$ で 298 K - 170 K の範囲で行った。

Figure 1A は、冷却速度 5.0 K $\cdot$ min $^{-1}$, 昇温速度 0.5 K $\cdot$ min $^{-1}$ における PMEA 中の水の温度依存性である。冷却過程において、収着水は全ての温度領域で氷 I_h とは全く異なる形状をとり、結晶化しないことがわかった。昇温過程においては、211 K - 267 K の温度領域で氷様のスペクトルが得られ、再蒸着が確認された。このときの吸収強度の大幅な増加から PMEA 中に分散した単分子水が蒸着様の過程のみで結晶化したことが判明し、アモルファス氷からの相転移ではないことが明らかになった。

一方、冷却速度が 0.25 K $\cdot$ min $^{-1}$ と遅い場合 (**Figure 1B**)

には、冷却過程でも結晶化が確認された。この結晶化は明確な液化を経ずに蒸着様の過程により進行した。さらに昇温過程でも、**Figure 1A** と同様に蒸着様の過程による再結晶化が確認された。このように、PMEA 中の水の結晶化および再結晶化はいずれも蒸着過程でなされており、再結晶化現象は冷却によって、ある温度以下で拡散できなくなった水が昇温により再び拡散可能になることで生じると考えられる。

また PBA (**Figure 2**) では、冷却過程において低波数領域に液体水と考えられる波形が現れた。その後、水の過冷却限界温度 (T_H) である 238 K 付近で氷様の波形が得られ、結晶化したことを確認した。昇温過程では氷様の波形を保ちながら減少し、273 K において吸収強度の急激な変化が観られた。これは、冷却過程における PBA 中の水は、PMEA とは異なり、明確な液化を経て結晶化すること、また、昇温過程における氷 I_h の減少は PBA $\cdot$ PMEA 共に、融解が主経路ではなく、昇華によりなされていることを示している。

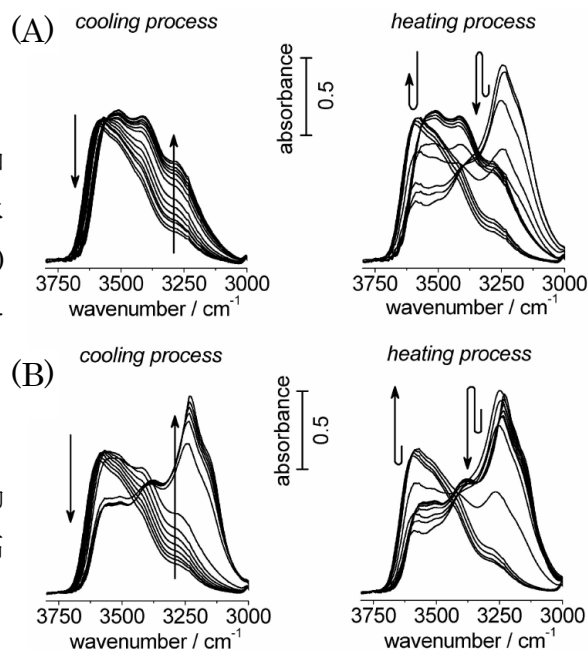


Figure 1. Temperature dependences of IR spectra of water sorbed into PMEA in a temperature region of 298 K - 170 K at a cooling process (left) and at a heating process (right). (A) cooling rate of 5.0 K $\cdot$ min $^{-1}$ and heating rate of 0.5 K $\cdot$ min $^{-1}$; (B) cooling rate of 0.5 K $\cdot$ min $^{-1}$ and heating rate of 0.5 K $\cdot$ min $^{-1}$.

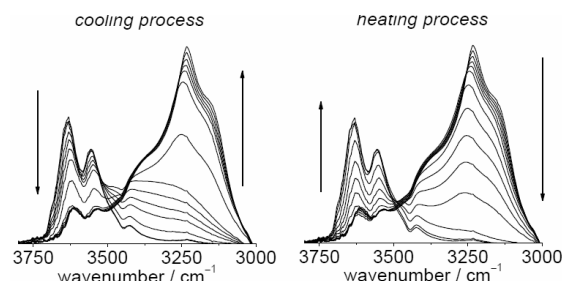


Figure 2. Temperature dependences of IR spectra of water sorbed into PBA in a temperature region of 298 K - 170 K at a cooling rate of 0.5 K $\cdot$ min $^{-1}$ and at a heating rate of 0.5 K $\cdot$ min $^{-1}$.

Study on Correlation of the Function of Polymer Brushes with the Dynamic Properties of Vicinal Water

Hiromi Kitano and Makoto Gemmei-Ide

Graduate School of Science and Technology, University of Toyama
Gofuku 3190, Toyama 930-8555, Japan.

In the first year of this research project, both a construction of polymer brush having anti-biofouling properties and an investigation of water structure sorbed into polymer thin films having blood compatibility were examined.

1. Anti-Biofouling Properties of a Telomer Brush with Pendent Glucosylurea Groups

A thiol group-carrying telomer with pendent *D*-glucosylurea groups (Poly(glucosylureaethyl methacrylate)-SH, PolyGUMA-SH) was obtained by reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization of GUMA in the presence of 4,4'-azobis(4-cyanopentanoic acid) (initiator) and 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate (chain transfer agent), and subsequent reduction with NaBH₄. The thiol-carrying telomer was accumulated on a colloidal gold-immobilized glass substrate as proven by the increase in absorbance at 550 nm ascribable to localized surface plasmon resonance (LSPR), respectively. The adsorption of various proteins to the surface of the telomer brush was examined by the LSPR method, too. The PolyGUMA brush showed a significant resistance against non-specific adsorption of proteins such as lysozyme, bovine serum albumin, immunoglobulin G and fibrinogen. Furthermore, sugar binding proteins, concanavalin A (Con A, with an affinity for mannose and glucose) and wheat germ agglutinin (WGA, with an affinity for *N*-acetylglucosamine), were not adsorbed to the GUMA-carrying brush, which is in contrast with the prompt and distinct binding of these proteins to the telomer brushes composed of 2-methacryloyloxyethyl *D*-glucopyranoside (Con A) and 1-*O*-(6'-methacrylamido)-hexyl-2-*N*-acetoamido-2-deoxy-*D*-glucopyranoside residues (WGA). The glucosylurea group-carrying telomer brush prepared here might be quite useful to provide a "bio-inert (anti-biofouling)" surface in bio-medical fields.

2. Recrystallization of Water in a Non-Water-Soluble Polymer Examined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA) with Low Water Content

Crystallization of water occurs not only during cooling but also during heating: the latter is frequently called "recrystallization" (or "cold crystallization"). Recrystallization temperature, T_R , of water (hyperquenched glassy water, HQGW) has been reported to be ~150 K. Aqueous solutions are also recrystallizable and their T_R s are usually higher than that of HQGW. In the case of a high concentration, recrystallization can be easily observed without a special technique such as preparation of HQGW in various aqueous solutions such as glycerol, sucrose, polyvinylpyrrolidone, and poly(ethylene glycol) aqueous solutions. The most cases reported are aqueous solutions, i.e., binary systems composed of a water-soluble solute and water. Based on this knowledge, crystallization of water during heating, so-called "recrystallization of water", in PMEA was investigated by temperature-variable Fourier transform infrared spectroscopy. Recrystallization in a polymer/water system is generally understood to be phase transition from glassy water (condensed water) to crystalline water. However, infrared spectral changes of the PMEA/water system with low water content indicated that the formation of ice I_h during heating occurred by a vapor deposition process rather than by a crystallization process.

業績リスト

1. 原著論文

- 1) Fujishita, S.; Inaba, C.; Tada, S.; Gemmei-Ide, M.; Kitano, H.; Saruwatari, Y., Effect of Zwitterionic Polymers on Wound Healing. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 2309-2315 (2008).
- 2) Gemmei-Ide, M.; Kitano, H., Crystal Growth of Ice I_h by Re-vapor-deposition and Diffusion Suppression of Monomolecular Water in a Polymer Solid: Spectroscopic Observation of Phase Transition of Water Sorbed into Polystyrene. *J. Phys. Chem. B* **112**, 13499-13502 (2008).
- 3) Gemmei-Ide, M.; Kitano, H., Recrystallization of Water in a Non-Water-Soluble Polymer Examined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Poly(2-methoxyethylacrylate) with Low Water Content. *J. Phys. Chem. B* **112**, 12863-12866 (2008).
- 4) Gemmei-Ide, M.; Kitano, H., Spectroscopic Evidence of Phase Transition of Monomolecular Water in Solid Polystyrene. *J. Phys. Chem. B* **112**, 2764-2766 (2008).
- 5) Zakir Hossain, S. M.; Shinohara, H.; Kitano, H., Drug Assessment Based on Detection of L-Glutamate Released from C6 Glioma Cells Using an Enzyme-Luminescence Method. *Anal. Chem.* **80**, 3762-3768 (2008).
- 6) Kitano, H.; Nakada, H.; Mizukami, K., Interaction of wheat germ agglutinin with an *N*-acetylglucosamine-carrying telomer brush accumulated on a colloidal gold monolayer. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **61**, 17-24 (2008).
- 7) Mizukami, K.; Takakura, H.; Matsunaga, T.; Kitano, H., Binding of *Ricinus communis* agglutinin to a galactose-carrying polymer brush on a colloidal gold monolayer. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **66**, 110-118 (2008).
- 8) Kitano, H.; Nagaoka, K.; Tada, S.; Gemmei-Ide, M.; Tanaka, M., Structure of Water Incorporated in Amphoteric Polymer Thin Films As Studied by FTIR Spectroscopy. *Macromol. Biosci.* **8**, 77-85 (2008).
- 9) Kitano, H.; Takahashi, Y.; Mizukami, K.; Matsuura, K. Kinetic study on the binding of lectin to mannose residues in a polymer brush. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **70**, 91-97 (2009).
- 10) Kitano, H.; Kago, H.; Matsuura, K., Temperature Responsive Polymer Brush Constructed on a Colloidal Gold Monolayer. *J. Colloid Interface Sci.* **331**, 343-350 (2009).
- 11) Tada, S.; Inaba, C.; Mizukami, K.; Fujishita, S.; Gemmei-Ide, M.; Kitano, H.; Mochizuki, A.; Tanaka, M.; Matsunaga, T., Anti-Biofouling Property of Polymers with a Carboxybetaine Moiety. *Macromol. Biosci.* **9**, 63-70 (2009).

2. 著書・総説

- 1) 北野博巳 源明誠 「高分子材料の機能と水和構造の相関」 日本接着学会誌 **44**, 485-490 (2008).
- 2) 北野博巳 源明誠 「生体適合性と水和」 高分子 **58**, 74-77 (2009).
- 3) Kitano, H.; Mizukami, K., Sensing Capabilities of Self-assembled Monolayer Using Localized Surface Plasmon Spectroscopy in “Bottom-Up Nanofabrication: Supramolecules, Self-Assemblies, and Organized Films. Vol. 3” (Ariga, K.; Nalwa, H. S.. Eds.) American Scientific Publishers, pp.395-415 (2009).

高分子多成分単分子膜の構造形成に関する研究

研究代表者：山形大学理工学研究科・熊木治郎

1. 緒言

水面上に展開した高分子単分子膜は、高分子の2次元状態の優れたモデルである。高分子が形成する多彩なインターフェースの構造・機能を知る上で、その最も薄い極限状態である高分子単分子膜の挙動を知ることは、極めて有用だと考えられる。高分子単分子膜は、低分子単分子膜に比べて、耐熱性、機械強度に優れるため、電子・電気材料、オプトエレクトロニクス材料等の実用材料への応用を視野に入れて、活発に研究が行われてきた。しかしながら、現在でも高分子単分子膜の構造については不明な点が多い。

ここでは、多成分の高分子からなる高分子単分子膜について検討を行い、高分子2次元膜の特徴を知ることが目的に検討を行った。具体的には、①poly(methyl methacrylate) (PMMA) と poly(nonyl acrylate) (PNA) のブレンド系、及びこの2成分ブロックからなるジブロック共重合体系の相分離構造、②isotactic 及び syndiotactic PMMA (it-, st-PMMA) が水面上で形成するステレオコンプレックスの形成挙動、について検討を行った。その結果、前者は、相溶状態と階層的相分離状態が表面圧で可逆的にスイッチする系であることがわかった。相分離の挙動から2次元高分子相溶系がどのような構造を取っているかを推察することが可能である。後者では、2次元高分子系で相溶性を議論する際に、膜の圧縮速度を十分に考慮することが必要であることが、新たにわかった。従来、検討されてきた高分子多成分単分子膜の相溶性について、データの見直しが必要になる場合があると考えられる。

2. 研究経過

(1) PMMA/PNA 多成分高分子単分子膜が形成する可逆的な階層的相分離構造形成

a. 相溶性

ブレンド系の π -A 曲線は、組成に応じて 15mN/m 近傍にプラトーな転移領域を示した。転移領域より低表面圧では占有面積は両成分の加成的性を、転移領域よりわずかに上の 17mN/m ではメジャーな成分のみに相当する面積を、22mN/m の高表面圧では、PMMA 成分のみに相当する面積を示した。AFM 観察結果を踏まえると、図1に示すように、低圧領域では相溶、17mN/m ではメジャー成分が下層でマイナー成分がその上に積層し、高表面圧領域では PMMA が下層でその上に PNA が積層した構造を持っているものと推定される。

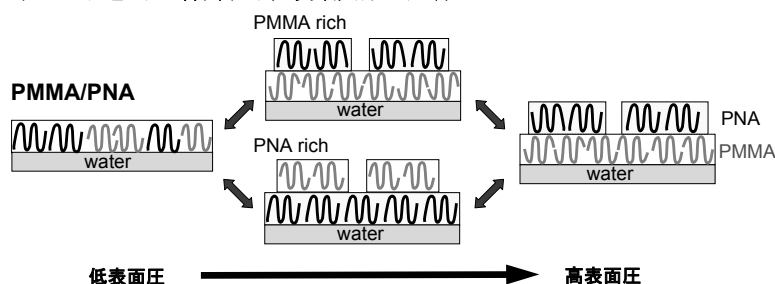


図1 PMMA/PNAブレンド単分子膜の可逆的、階層的相分離。

b. 相分離の可逆性

図2に、PMMA/PNA (=50/50wt) のブレンド膜を表面圧を転移点前後で変化させながらマイカに積層した場合の AFM 像を示した。1mN/m では相分離は観察されず、転移点以上の 17mN/m にすると PMMA 膜上に PNA が積層した階層的相分離構造を示す。この相分離は時間とともに成長するが、表面圧を転移点以下の 1mN/m に低下させると直ちに相溶系に戻る。再び転移点以上に圧縮すると相分離を形成するが、その構造は初めに圧縮した際の構造と同じであり、1mN/m にした際に相溶系に瞬時に戻っていたことを示している。このように、PMMA/PNA 系は表面圧により相溶状態／階層的相分離構造を可逆的に形成する系であることがわかった。

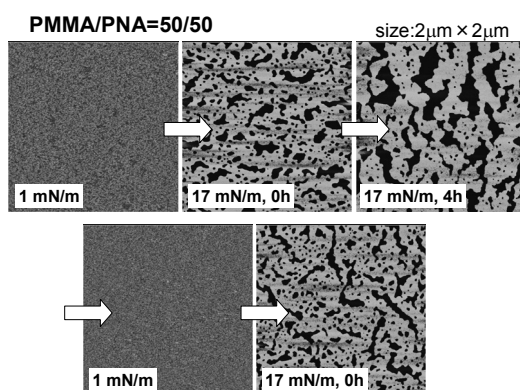


図2 マイカに積層したPMMA/ PNA (50/50) 混合単分子膜のAFM高さ像。

PMMA-*b*-PNA ブロック共重合体系でも、同様に低表面圧領域では相溶であり、高表面圧領域では、片方の成分が下層で単分子膜を形成し、その上にもう一方のブロック共重合体成分が積層した階層的相分離

構造を形成した。ブロック共重合体の階層的相分離は、ブレンドとは異なり、ブロック鎖の構造を反映して相分離が成長することはないが、この相分離も可逆的であり、一旦高表面圧で相分離させた後、低表面圧に戻すと直ちに相溶系に戻る。

(2) it-, st-PMMA の水面上でのステレオコンプレックス形成挙動

水面上の高分子単分子膜中で超分子構造を形成する系が知られている。2次元状態でどのように複数の分子が超分子構造を形成するのかを知ることは、2次元膜を理解する上で重要であると考えられる。ここでは、it-, st-PMMA 混合単分子膜が圧縮により、ステレオコンプレックス(SC)を形成する挙動を表面圧-面積 (π -A) 曲線、AFM (図3、4) で検討した。

図4に示すように、0 mN/m では it-PMMA は孤立鎖で存在しているのに対して（注：分子量が小さいため、粒子状に見えている）、st-PMMA は分子鎖が凝集した構造を取っており、2相に分離している。通常の圧縮速度(0.5 mm/s、圧縮時間：約 18 分)で圧縮すると、1 mN/m で明確な相分離構造を形成し、15 mN/m では it-/st-PMMA の界面を中心として SC が形成される。圧縮速度を 1/50 の 0.01 mm/s(圧縮時間：約 13h)に遅くすると、1 mN/m で明確な相分離を示さなくなり、15 mN/m では、ほぼ定量的に SC が形成されることがわかった。it-PMMA、st-PMMA はそれぞれ希薄状態で膨張膜、凝集膜であり、通常の圧縮では kinetically にその構造を保ったまま、相分離構造を形成し、SC が両相の界面を中心に生成したのに対して、低速で圧縮した場合は、1 mN/m 近傍で、熱力学的に安定な相溶状態を経由するため、SC がほぼ定量的に生成したのと考えられる。 π -A 曲線からも、低速で圧縮した方が、5 mN/m 近傍の SC 形成に由来するプラトーが明確に観察されており、SC が良好に形成されていることがわかる (図

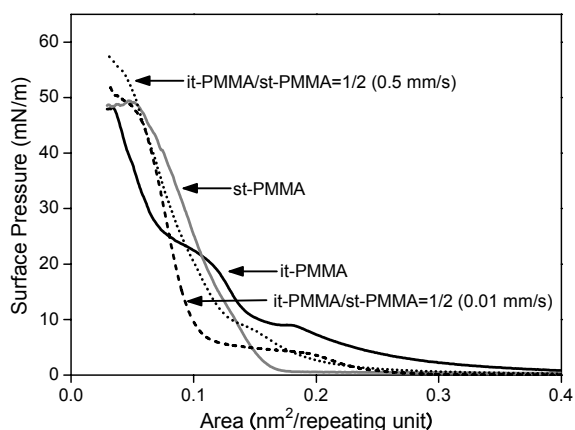


図3 it-PMMA, st-PMMA、及びその混合物の π -A 曲線

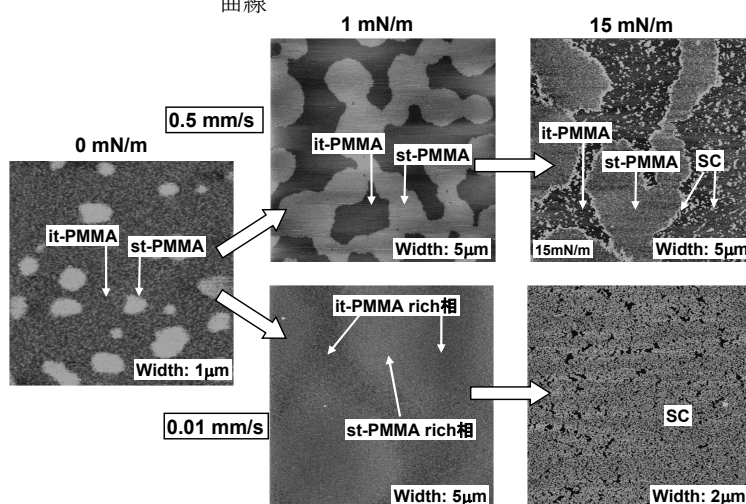


図4 異なる速度で圧縮したit-PMMA/ st-PMMA (1/2) 混合単分子膜のAFM高さ像。圧縮速度：0.5 mm/s (上段) , 0.01 mm/s (下段)。

3)。

従来、多成分高分子ブレンド系の相溶性については、多くの検討が行われてきたが、圧縮速度についてはあまり考慮されていない。膨張膜と凝集膜を形成する高分子を成分とするブレンド系では、高速で圧縮すると見かけ上、2相に相分離する可能性が高く、凝集状態での本来の相溶性を誤って判断している可能性がある。

3. まとめ

以上示したように、高分子多成分単分子膜の構造を検討することで、高分子2次元膜の構造、特性をより詳しく知ることが可能になると期待される。

なお、AFMによる各種環境下での高分子鎖観察については、①熱処理用の顕微鏡サンプル加熱装置、②超低速圧縮用LB膜製造装置、の設置を終え、加熱処理による高分子鎖の構造変化をバッチ処理で検討する研究に着手している。今後は、環境対応型AFMの機器選定・設置を進め、バッチ処理での検討を進めながら in situ 観察へと検討を進めていく予定である。

Morphology and Structure Formation in the Monolayers Composed of Multicomponent Polymer Systems

Jiro Kumaki

Department of Polymer Science and Technology, Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University

4-3-16, Yonezawa, Yamagata 992-8510, Japan.

Tel/Fax: 0238-26-3071, E-mail: kumaki@yz.yamagata-u.ac.jp

Polymer Langmuir monolayers spread on a water surface are an ideal model for polymer chains in two dimensions. It should be helpful to study the polymer monolayers as the ultimate thin structure of the polymer interfaces in order to understand them. However, our understanding of the polymer monolayers is still very limited. In this study, we investigated the morphology and phase separation behaviors of polymer blend monolayers using surface pressure–area isotherms (π –A) and atomic force microscopy (AFM).

The first system we used was the poly(methyl methacrylate) (PMMA) and poly(nonyl acrylate) blends. The mixed monolayer was miscible at a low π , but reversibly phase separated into a hierarchical phase separation at a high π , with the monolayer of a major component being spread on the water surface, on which the minor component separated out, resulting in a hierarchical phase separation. The phase separation grew with time, but upon reduction of the surface pressure into the miscible region, the phase separation immediately disappeared, and subsequent increase in the surface pressure caused growth of the phase separation similar to that from the miscible state, indicating that the blend monolayer converted to the original miscible state immediately upon reduction of the surface pressure. Thus, this system showed a reversible phase separation depending on the surface pressure.

The second system was a mixture of isotactic and syndiotactic PMMAs (it-, st-PMMA), the mixed monolayer of which is known to form a multi-stranded stereocomplex composed of it- and st-PMMA helices upon compression. We found that the stereocomplexation was highly sensitive to the compression rate of the monolayer. At a normal compression rate of 0.5 mm/s by the moving barrier, the blend monolayer formed a clear phase separation of the it- and st-PMMA domains at 1 mN/m, and formed a PMMA stereocomplex only at the interface between the two domains at 10 mN/m. On the other hand, at the lower compression rate of 0.01 mm/s, the blend did not form a clear phase separation at 1 mN/m, and quantitatively formed a stereocomplex at 10 mN/m. It-PMMA and st-PMMA form expanded and condensed monolayers, respectively, thus, it-PMMA and st-PMMA exist as isolated chains and condensed films in a dilute state on the water surface, respectively. At the fast compression rate, the blended film kinetically formed the phase separation, which caused insufficient stereocomplex formation. On the other hand, at the slower compression rate, the blend formed a thermodynamically miscible phase, and as a result, the stereocomplex was quantitatively formed. The present results showed that the compression rate dependence should be carefully evaluated in order to determine the precise miscibility of the blended monolayers.

業績リスト

1. 原著論文

- 1) Yuhtaro Sasaki, Naoyuki Aiba, Jiro Kumaki, Reversible Hierarchical Phase Separation of Poly(methyl methacrylate) and Poly(nonyl acrylate) Blends in the Langmuir Monolayers, *in preparation*.
- 2) Naoyuki Aiba; Yuhtaro Sasaki; Jiro Kumaki, Strong Compression Rate Dependence of Phase Separation and Stereocomplexation of Isotactic and Syndiotactic Poly(methyl methacrylate) Mixtures in the Langmuir Monolayers, *in preparation*.

2. 著書・総説

- 1) Jiro Kumaki, Shin-ichiro Sakurai, Eiji Yashima, High-Resolution Atomic Force Microscopy of Synthetic Helical Polymers, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 737-746.

3. 会議発表

- 1) ポリマーブレンド LB 膜の可逆的な階層的相分離構造形成、佐々木雄太郎、相場直幸、熊木治郎、第 58 回高分子学会年次大会、平成 21 年 5 月 27 - 29 日 (予定)。

4. その他 (招待講演)

- 1) 熊木治郎、高分子鎖の高分解能原子間力顕微鏡観察、第 9 回表面力セミナー、東北大学多元研、平成 21 年 3 月 6 日。
- 2) 熊木治郎、合成高分子の高分解能原子間力顕微鏡観察、09-1 高分子ナノテクノロジー研究会、東京工業大学、平成 21 年 6 月 25 日 (予定)。

生体機能分子を固定化したソフト界面の表面力測定

研究代表者: 東北大学多元物質科学研究所・栗原和枝

研究分担者: 東北大学多元物質科学研究所・水上雅史

1. 緒言

研究代表者は、表面力測定を中心手段として、分子間・表面間相互作用を明らかにし、「力」を観測量として複雑系を研究する新しい研究領域を確立したいと研究を行ってきた。当測定を初期から20年近く行っており、これまでに高分子電解質層の相転移や固-液界面に水素結合性のマクロクラスター形成を発見するなど、独自の領域を拓き、当該分野で世界をリードしている。

生体分子の相互作用評価では、表面への酵素分子の配向固定化法の開発とその表面力測定により、酵素反応の素過程の具体的な評価、タンパク質-DNA 間の特異的相互作用力の検出などに成功している。

また、表面力、即ち表面間に働く力の距離依存性は、表面の荷電状態、固さ・柔らかさ、立体構造、界面エネルギー、界面の液体の組織構造形成など、固-液界面のキャラクタリゼーションにユニークな情報を与え、これらの環境応答（塩濃度、pH、温度など）をその場で評価できる。これらは、ソフト界面の学理を考える上での基本情報であり、また、材料としての物性・機能制御にも重要である。従って、ソフト界面の分子科学には、表面力測定を中心とするアプローチは不可欠であると考え、分子認識ならびに固-液界面評価を中心として研究を進めることとした。

本研究は、2つの表面間の相互作用の距離依存性を直接評価できる表面力測定を中心手段とし、分子認識など、固-液界面における分子膜の特性を明らかにし、ソフト界面の分子科学に寄与することを目的とし、さらに、生体分子間の相互作用、医用材料表面の評価を可能とする方法論の開発を目指す。具体的には、遺伝情報転写に関わるタンパク質群、および糖などの生体機能分子を対象とし、様々な生体分子の配向制御した固定化法の開発、DNA の転写制御に関与するタンパク質群の相互作用の直接測定、また表面における水和構造の評価を行う。さらに、領域内の他の研究者の扱う高分子ブラシ層ならびに分子認識系の評価を行い、その特性を明らかにし、ソフト界面の分子科学の確立に資する。

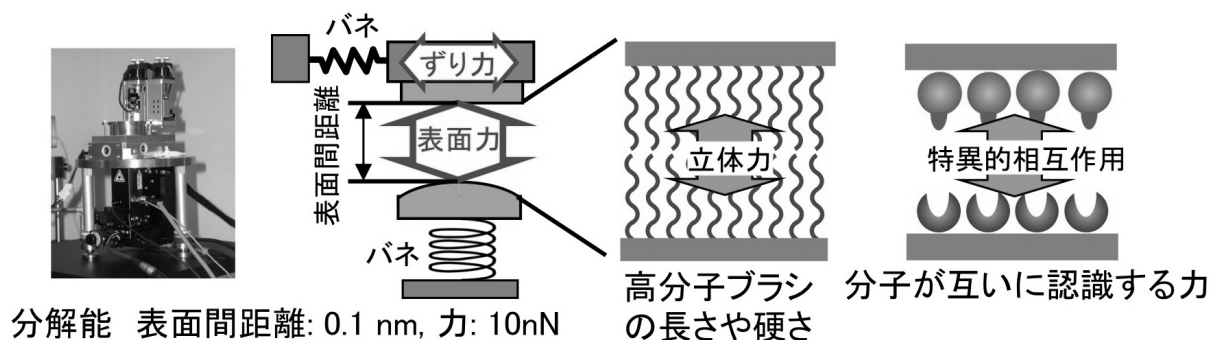


図1 表面力測定と研究対象としている相互作用力の模式図

2. 研究経過

本年度は、表面力測定のためのタンパク質の配向固定化法として、タグユニットとしてグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) ならびにマルトースバインディングプロテイン (MBP) を用いた方法を確立した。さらに開発した方法により転写因子タンパク質 SigB と、その阻害因子タンパク質 RsbW を固定化し、その間の相互作用力の直接測定とその熱ショック時の変化¹⁾について検討した。

また、糖鎖について界面の分光を開始した。以下に、上記の結果を中心に報告する。

【タンパク質分子の表面への配向固定化法の開発と相互作用力の直接測定】

従来の表面力測定において、我々はタンパク質分子を固体表面に配列制御して固定化するために、表面を金属キレート単分子膜で修飾し、この金属キレート膜とタンパク質につけたポリヒスチジンタグ(His-tag)との間の相互作用を利用する手法を開発し、適用してきた²⁾。本年度は、表面力測定を幅広い生体分子に適用するために、現在、汎用的に用いられているタグユニットとしてグルタチオン-S-トランフェラーゼ (GST)、ならびにマルトースバインディングプロテイン (MBP) を用いたタンパク質固定化法を検討・確立した (図 2)。

この方法を用いて、黄色ブドウ球菌の転写因子タンパク質 SigB と、その阻害因子タンパク質 RsbW を表面に配向固定化し、これらのタンパク質間の相互作用力をコロイドプローブ原子間力顕微鏡法により直接評価した (図 3)。この転写系に対し、共同研究者が検討していた熱ショックによる転写活性への機構との対応について調べた。

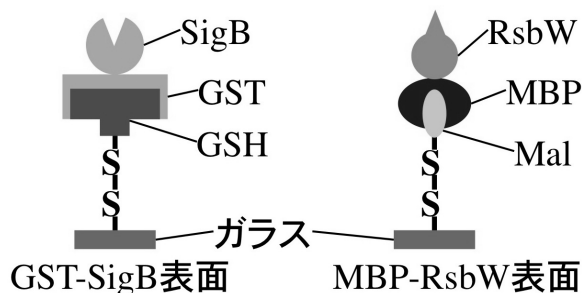


図 2 表面に配向固定化したタンパク質 SigB と RsbW の模式図。

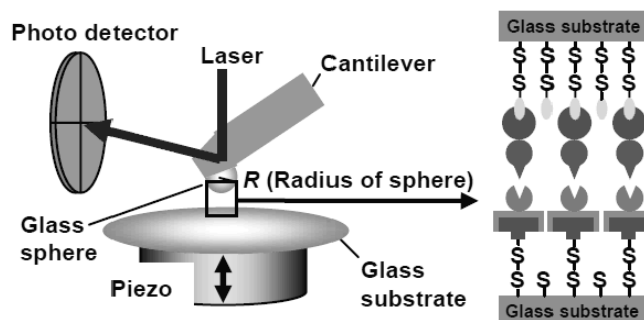


図 3 タンパク質固定化表面間の相互作用測定模式図。

① アミノ酸置換が及ぼす SigB / RsbW 間相互作用への影響の検討

SigB にはアミノ酸変異体 (VNK type、IDQ type) が存在し、その違いにより菌体中の SigB の蓄積量が異なることが知られている。¹⁾ これらのアミノ酸変位体と RsbW との相互作用力を測定し、蓄積量との相関を検討した。どのタイプの SigB も RsbW との相互作用測定においてジャンプアウト (接着力) が観測され、この接着力の大きさを平均を算出すると VNK type、IDQ type とともにほぼ同じ値が得られた。このことから、報告されている SigB 蓄積量の違いには他の因子が関わっているものと考えられる。

② 熱処理による SigB / RsbW 間相互作用への影響

SigB には熱ストレス応答性があり、48℃の熱をかけると転写活性が変化することが知られている。¹⁾ そこで、この SigB / RsbW 間相互作用への熱の影響の評価を行った。得られた接着力の大きさを熱処理時間毎に平均値で比較すると、熱処理時間 0.5 min、1 min のとき、熱処理前の接着力よりも小さくなった。一方、熱処理時間 1.5 min、3 min、10 min では熱処理前と接着力はほとんど変わらなかった。このことから、熱処理の影響はほんのわずかな時間内で生じていることが考えられる。以上のように、熱処理により SigB / RsbW 間の相互作用が変化することが分かった。また、このことから、短い熱処理時間では SigB / RsbW 間の親和性が下がり、長い熱処理時間では親和性が保たれていることが考えられる。

熱による SigB、RsbW タンパク質の構造変化は IR スペクトル (アミド I/II のピーク強度比) 変化により観察した。熱処理時間が長くなるにつれピーク強度比が減少しており、SigB で構造変化が生じていると考えられる。一方、MBP-RsbW は熱処理時間に対してピーク強度比がばらばらであった。これは、RsbW が様々な構造をとっている、あるいは構造が熱に対して単に不安定であることが考えられる。熱処理による SigB / RsbW 間相互作用の変化は、主に SigB の構造変化に伴うものと考えられる。

1) Y. Inose, S. L. Takeshita, T. Hidaka, M. Higashide, A. Maruyama, H. Hayashi, K. Morikawa and T. Ohta, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **52**, 259 (2006).

2) R. Ishiguro, D. Y. Sasaki, C. Pacheco, K. Kurihara, *Colloids Surf. A*, **146**, 329-335 (1999).

Study on Soft Interfaces with Immobilized Biofunctional Molecules

by Surface Forces Measurements

Kazue Kurihara and Masashi Mizukami

Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University

2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan

Tel +81-(0)22-217-5673, Fax +81-(0)22-217-5674, E-mail kurihara@tagen.tohoku.ac.jp

We aim to elucidate the properties and functions such as molecular recognition of molecular films at the solid-liquid interfaces using the surface forces measurement as a main tool, and contribute to the soft interface science in a flame of biofunctional chemistry. Specific interaction involved in biological reactions is one of the most important molecular recognitions. Questions include (1) what protein pairs interact, (2) how do they recognize each other, (3) what are the locations and the sequence of a binding site, and (4) what are their functions? The direct forces measurement provides useful information for understanding the interactions between biological molecules. For such studies, it is important to immobilize proteins on the substrate with known arrangement, in order to avoid the contribution of non-specific interactions. We have developed the method to immobilize the proteins in desired orientation using the interaction between the poly-histidine tag of proteins, and succeeded to study interaction involved in the complex formation between two enzyme subunits and a substrate, and a protein and a DNA.

In this year, we developed a new procedure for immobilizing proteins in a desired orientation by employing affinity tags, glutathion-S-transferase (GST) and maltose binding protein (MBP), and investigated the interaction forces between proteins, i.e., SigB, a transcription factor, and RsbW, an anti-SigB factor, using colloidal probe AFM. For the surface modification, the ligands for GST and MBP, i.e. glutathione (GSH) and maltose, respectively, were introduced to silica surfaces by a silanization reaction, and the tagged proteins, SigB-GST and RsbW-MBP, were then adsorbed on the surfaces. The surface modification procedures were characterized by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and AFM. The interactions between SigB and RsbW were measured in terms of the amino acid substitution for SigB as well as the heat treatment for appropriate time of period.

(1) Interactions between two types of SigB and RsbW

Two types of SigB having three amino acid substitutions (VNK type and IDQ type) are found in bacteria at different quantities. The effect of SigB amino acid substitutions on the interactions between SigB and RsbW was examined. The adhesions were observed between both type of SigB and RsbW, indicating the presence of the specific interactions between these proteins. However, no significant differences in the interaction forces were seen using the two types of SigB. The difference in the quantities of SigB in bacteria could be affected by the other factor than the amino acid substitutions.

(2) The effect of heat treatment on the interactions between SigB and RsbW

Under stressed circumstances, SigB plays an important role on posttranslational regulatory network by dissociation from RsbW. The thermal stressed responses on the interaction between SigB and RsbW were determined with the treatment time. When the heat treatment time was 0.5 min and 1 min, the adhesions between SigB and RsbW were smaller than those of untreated samples. However, when the heat treatment time was further increased, the obtained adhesion was close to the value of untreated samples. The changes in the interaction between SigB and RsbW could occur in rather short time. FT-IR spectral measurements of SigB and RsbW indicated that the structural changes in SigB can be the main cause of the changes in the interaction.

業績リスト

1. 原著論文

- 1) M. Mizukami and K. Kurihara, "A New Physical Model for Resonance Shear Measurement of Confined Liquids between Solid Surfaces", *Rev. Sci. Instrum.* **79**, 113705-1~113705-6 (2008).
- 2) H. Sakuma, K. Kurihara, "Fourier-transform Resonance Shear Measurement for Studying Confined Liquids", *Rev. Sci. Instrum.* **80**, 013701-1~013701-4 (2009).
- 3) H. Mizuno, T. Haraszi, M. Mizukami, K. Kurihara, "Nanorheology and Nanotribology of Two-Component Liquid Crystal", *SAE Int. J. Fuels Lubr.* **1**, 1517-1523 (2009).
- 4) 水上雅史, 栗原和枝, 鈴木伸, 松平政臣, 山辺秀敏, 安東勲雄, 「表面力装置による金属-高分子接着の評価」, 色材協会誌, 印刷中.

2. 著書・総説

- 1) 栗原和枝, 「固-液界面の液体のナノ構造形成評価と制御」表面科学, **30**, No.3, pp162-167 (2009).
- 2) 栗原和枝, 水上雅史, 「固体表面の液体分子の自己組織化」, “自己組織化ハンドブック”, 材料編, 第 7 章 複合材料, 第 5 節 表面修飾, 2 項, 印刷中.
- 3) 水上雅史, 栗原和枝, 9章1節4項「原子力間顕微鏡」, 9章1節5項「表面力測定」, “現代界面コロイド化学の基礎”, 丸善株式会社, 印刷中.
- 4) 栗原和枝, 7 章 2 節 1 項「展開単分子膜」, 7 章 2 節 2 項「膜の累積化と LB 膜」, “現代界面コロイド化学の基礎”, 丸善株式会社, 印刷中.
- 5) 粕谷素洋, 栗原和枝, 1 章 2 節 1 項「超分子における分子間力」“超分子サイエンス&テクノロジー”, 株式会社エヌ・ティー・エス, 印刷中.

3. 会議発表（招待講演）

- 1) 栗原和枝, 「表面力測定から見る界面現象」, 東京大学ナノバイオ・インテグレーション研究拠点, 東京大学, 2008/11/14.
- 2) 水上雅史, 「共振ずり測定による液体ナノ薄膜の特性評価」, SPM による機械特性評価セミナー, 日本ビーコ本社(東京), 2008/12/5.
- 3) 栗原和枝, 「表面力測定より見る高分子電解質ブラシの特性」, ソフトインターフェースの分子科学第一回公開シンポジウム, タイム 25 ビル(東京), 2009/1/27.
- 4) M. Mizukami, K. Kurihara, "Molecular Analysis of Liquid Adsorption at the Solid/Liquid Interfaces: Surface Forces Measurement and Surface Selective Spectroscopy", The Biennial Australian Colloid and Interface Symposium and the 10th Australia-Japan Colloid and Interface Science Symposium, Adelaide (Australia), 2009/2/1-5 (Keynote).
- 5) 栗原和枝, 「表面力測定から見る固-液界面の新しい描像」, 高分子学会北海道支部会員増強セミナー—ソフト界面を創る、探る、活かす—, 北海道大学, 2009/3/13 (特別講演).
- 6) 栗原和枝, 「環境ナノテクノロジー」, 日本化学会第 89 回春季年会シンポジウム企画 環境ナノテクノロジー—石油リファイナリーの転換と省エネに貢献するナノテク—, 日本化学会 産学交流委員会, 日本大学(千葉), 2009/3/30.

4. その他

原著論文発表 1) の A New Physical Model for Resonance Shear Measurement of Confined Liquids between Solid Surfaces, M. Mizukami and K. Kurihara, *Rev. Sci. Instrum.* **79**, 113705 (2008). は Virtual Journal of Nanoscale Science & Technology の December 1, 2008 に選ばれた。

3次元ナノ相分離膜構造と高感度分子認識能の動的解析

研究代表者：産業技術総合研究所生物機能工学研究部門・佐藤 縁

研究分担者：産業技術総合研究所生物機能工学研究部門・丹羽 修

研究分担者：産業技術総合研究所生物機能工学研究部門・吉岡恭子

1. 緒言

固体基板表面上への有機薄膜構造体構築技術としての自己組織化単分子膜法は、1980年代より、Sagivらによりシリコン- O 系の結合を利用した膜形成、続いてNuzzoとAllaraによる金-S結合を利用した膜形成が報告され、これらを契機として急速に発展し、化学的にも物理的にも安定な膜形成法として各方面に幅広く導入されてきた。末端に機能性官能基として酸化還元能、親疎水基、光応答性基などの導入も行われ、現在では簡便で安定な基板修飾方法の一つとして定着している。膜の機能評価法として、走査型トンネル顕微鏡 (STM) 観察、赤外分光法による評価、電気化学法による評価などが考案されてきたが、これらは「単一分子からなる均一系の膜」、基板も主として「金表面」上というごく限られた系の評価には有効であるという状況であった。

近年、生体分子を直接認識する人工修飾薄膜分野において、高分子膜修飾と合わせて上記自己組織化単分子膜修飾が採用されてきている。目的の生体分子を効率よく認識するためには、1) 認識部位 (膜側) - 生体分子 (検出側) との相互作用がきわめて弱い場合が多いこと、2) 夾雑物質の影響を排除する必要があること、3) 生体分子が膜構成分子に比較して非常に巨大な分子である場合が多い、等を考慮して認識膜を構築する必要がある。これらを踏まえて我々は、効果的な生体分子認識系の構築のために、認識部位を有する分子と非特異的な吸着を抑制する分子とでハイブリッド膜を構築し、これが生体分子の検出に大変有効であることを手始めに確認した。ハイブリッド単分子膜が生体分子の認識に有効であることについては研究例がいくつかあるが、単分子膜内の縦横方向においてどのように認識部位を分散させた場合により高い分子認識能を有するののかについて系統立てての研究は未だほとんどなされていない状況である。基板材料の方も、非特異的な吸着が起こりにくく汎用性のあるカーボン材料等新規な材料が開発されてきているが、これを生体分子認識分子層構築の基板材料として積極的に利用している例はほとんど見られず、複合膜構造と機能発現の評価技術については金-アルカンチオール均一系単分子膜ほど進んでいない。単一分子による薄膜については各種分光手法・知見も蓄積されてきているが、複合膜の系では金-S-アルキル単分子層に用いられてきた手法そのままを採用できない場合が多く、3次元ナノ構造の有用性を動的な分子膜構造変化から明らかにしていく必要もある。

今年度は、まず、基板上への認識分子・非特異吸着抑制分子からなるハイブリッド膜が生体分子 (タンパク質) の高感度認識において有効であることを実証し、この薄膜の有するセンシング能や基本特性について詳細に検討した。これらの知見を元に、次年度以降、新規基板材料の検討、分子認識薄膜の分子層・認識機構の新規評価法の確立等を進めていくこととした。

2. 研究経過

糖-レクチン (タンパク質) の相互作用は、抗原-抗体の相互作用などと比較すると大変弱い (解離定数 KD : 糖-レクチン (10^{-4} ~ 10^{-5} 程度)、抗原-抗体 (10^{-9} 程度))、溶液内ではある程度検出可能であっても基板上での検出は難しい場合が多かった。このような弱い相互作用の系でも、基板上で安定に感度よく検出できる系を構築するため、1) 分子認識部位の効率的な配置、2) 感度を下げてしまう原因となる非特異的な吸着の抑制、に関して検討を行った。

まず、分子認識部位の基板上での効率的な配置について検討を行った。弱い相互作用である糖-レクチンの高効率な認識系を作製することを念頭におき、認識分子としてマルトシドドデカンチオール分子 (MalC12SH)、基板へのタンパク質の非特異的な吸着を抑制する分子として、水酸基末端チオールを採用

した。当初、非特異吸着を防ぐ分子として、親水性の高い分子が効率的に非特異吸着抑制能を発揮する場合が多いことから各種鎖長の水酸基末端チオール類を用いた。金基板上にマルトシドドデカンチオール分子 100% で構築した単分子膜と比較して、水酸基末端チオールを混合し、ハイブリッド膜とした場合、水酸基末端チオール分子の割合が増加するにつれてレクチン（コンカナバリン A ; Con A）の認識量（吸着量）が増加していることが確認できた（図 1）。仕込み比において 10%、実測比では 29% のマルトシド分子（水酸基末端分子が 71%）のとき、Con A 分子の吸着量は最高値（約 1.8×10^8 分子/cm²）を示した。認識部位の分散度が高感度認識に有効であることは実証できたが、分散状況に関する詳細な検討については次年度以降に引き続き検討することとした。

感度を下げる直接の原因となる、基板および認識部位以外への非特異的なタンパク質の吸着をできるだけ防ぐため、当初用いていた水酸基末端チオール分子から、積極的に吸着抑制が期待できる短鎖エチレングリコールアルカンチオール分子を用いることとした。ポリエチレングリコール (PEG) 高分子材料は以前から非特異吸着を防ぐ材料として研究が進められ、様々な基板へと使用されているものである。これを元に、ポリエチレングリコール高分子材料の持つ柔軟性・親水性による非特異吸着抑制能と、アルカンチオール類が緻密な膜構成を行える点とを組み合わせ、非特異吸着抑制材料を新規に設計し、非特異吸着の効率的な抑制を試みた。ポリエチレングリコール鎖のうち、機能発現に有効な最小単位とされるエチレングリコールユニット数 3 のトリエチレングリコール基と、緻密に膜構成が可能な直鎖アルカンチオール (n=2, 4, 6, 8) を併せ持つ分子 (TEGCnSH) を合成し、まずこの分子単独で分子層を構築し、非特異吸着抑制能を検討した（図 2、3）。各分子の吸着量は、アルカリ溶液中 (0.5 M KOH 溶液) で金基板より分子を還元脱離させる手法により評価した（図 3）。膜構成に直接関与する、アルカンチオール鎖が長くなるにつれて単位面積あたりの吸着分子数が増加し（脱離ピーク電流量より評価）、分子間の相互作用も強固になり（脱離電位により評価）、分子の吸着形態も単一になってきており（脱離ピークの半値幅より評価）、より緻密な膜構築が行われていることを確認した（図 3）。この分子は緻密に膜構築されているため、非特異吸着を完全に抑制することも確認した。特に従来の高分子材料では抑えにくかった低分子量のペプチド分子（分子量 400 程度）も、高分子量の生体分子（タンパク質等、分子量数十万）も僅か本単分子層一層で完全に抑えられることを確認できた。

これらの特徴を確認できた TEGCnSH 分子を用いて、MalC12SH 分子と金表面にハイブリッド膜を作製し、レクチン（Con A）の認識を行った。非特異的な吸着がこの TEGCnSH 膜により効率的に抑えられることから、ノイズ応答を下げることができ、結果として S/N 比の高い応答を得ることができた。

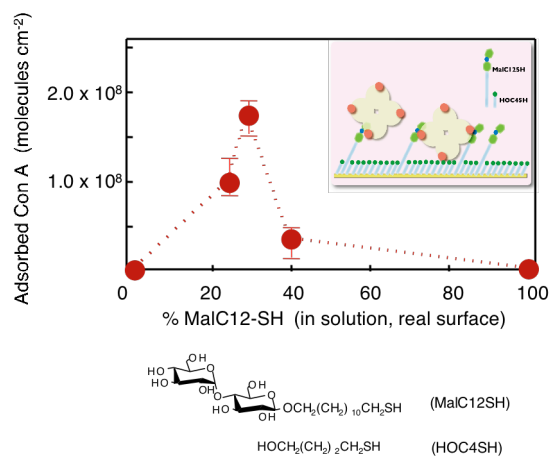


図 1. MalC12SH と OH 末端アルカンチオール混合膜上での Con A の吸着量。

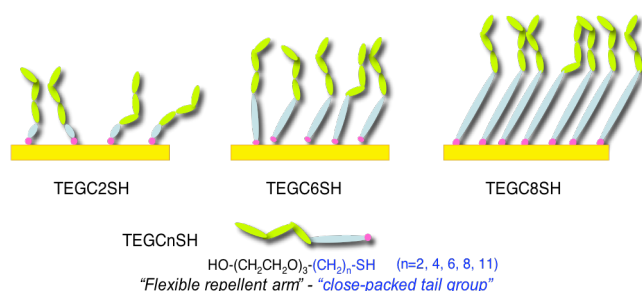


図 2. 各種アルカンチオール鎖の TEGCnSH 膜のモデル図。

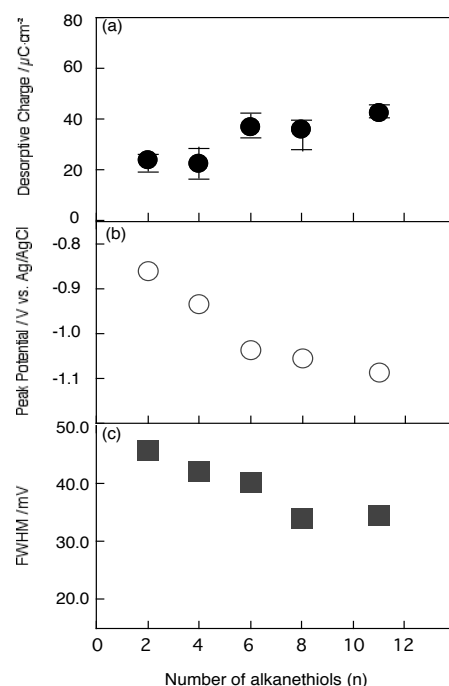


図 3. 各種 TEGCnSH 膜の電気化学特性。(a)脱離電流量、(b)脱離電位、(c)ピーク半値幅。

Effective Protein Recognition on the Glycosylated Self-Assembled Monolayer

Yukari Sato, Osamu Niwa and Kyoko Yoshioka

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST),

Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

Tel: 029-861-6158, Fax: 029-861-6177, E-mail : yukari-sato@aist.go.jp

Weak interactions such as hydrogen bonding, hydrophobic interaction received great interest in recent years relevant to molecular recognition for developing various biosensors or for understanding biological system. Solid state surfaces modified with thin functional organic layers has been often used to evaluate bimolecular interactions because the solid surface is suitable for developing array based sensing devices combined with optical detection and imaging. Nano-level controls of three dimensional structure of surface organic layers will show important roles for the recognitions of weaker interactive biomolecules. We demonstrated that three dimensional structure constructed from the long chain -carbohydrate molecules and short non-interactive molecules can be realized perfectly recognition interface for detection of weak interactions.

12-Mercaptododecyl beta-D-maltoside (MalC12SH) was synthesized and used as the recognition part for lectin, Concanavalin A (Con A). 4-Mercaptobutanol (HOC4SH) and Con A were used as received. The interface was built up on the gold substrate. The interface structure and the number of adsorbed Con A molecules were monitored by surface plasmon resonance (SPR) measurement (Biacore T-100, 2000 and Handy SPR system). The ratio of adsorbed MalC12SH / HOC4SH molecules was evaluated by electrochemical measurement.

MalC12SH - HOC4SH mixed monolayers were constructed on the gold surface. The number of adsorbed Con A molecules and Con A adsorption were monitored by SPR measurements and converted into the real adsorbed numbers of Con A molecules. In the case of 100 % ligand monolayer, the maximum adsorption of Con A is 3.9×10^6 molecules / cm^2 . The value of maximal Con A adsorption increases gradually with decreasing the ratio of MalC12SH in the two components. The special point on adsorption of Con A was corresponding to 29.0 % MalC12SH in the real two-component monolayer surface. The ratio of each component in the real molecular layer was decided by electrochemical reductive desorption method. In this case, the number of adsorbed Con A molecules reached maximum, 1.8×10^8 molecules / cm^2 . This value is 45 times larger than that of 100% MalC12-SH monolayer. Dissociation constant (K_D) between the maltoside on the surface and Con A in solution became quite smaller in the case of our 3D interface (8.9×10^{-7} (M)).

Our findings demonstrate that the precisely controlled organic 3D structure was key for obtaining strong affinity between the carbohydrate and lectin. The relationship between the surface layer structure and functions is also investigating.

We synthesized and used tri(ethylene glycol) terminated alkanethiols (TEGC_nSH, n=2, 4, 6, 8, 11) as protein repelling modifiers. The signal to noise (S/N) ratio was improved significantly when using longer EGC_nSH molecules such as EGC₆SH and EGC₈SH. Preventing non-specific molecular adsorption and achieving a high S/N ratio were attributable to a densely packed MalC12SH / EGC_nSH monolayer. In particular, the EGC_nSH packing density was the key to improving the ability to prevent adsorption. The number of adsorbed EGC_nSH monolayers on the gold surface was evaluated with the electrochemical reductive desorption method.

業績リスト

1. 原著論文

- 1) Y. Sato, K. Yoshioka, M. Tanaka, T. Murakami, M. N. Ishida, and O. Niwa, “Recognition of lectin with a high signal to noise ratio: carbohydrate-tri(ethylene glycol)-alkanethiol co-adsorbed monolayer”, *Chem. Commun.*, 4909–4911 (2008).

2. 著書・総説

- 1) 丹羽修、栗田僚二、「マイクロ流路を利用した高感度心疾患マーカーセンサー」、新しい地平をひらく 分析手法の最前線（編者 北森武彦）、23 章、174–180 ページ、化学同人。

3. 会議発表

国際会議発表

- 1) Y. Sato, K. Yoshioka, M. Tanaka, T. Murakami, and O. Niwa, “Effective Lectin Recognition on the Carbohydrate-/Protein-Resistant Alkanethiol co-adsorbed Monolayer”, The joint international meeting of Electrochemical society and Electrochemical society of Japan (PRiME 2008), October, 16th, 2008, Honolulu, Hawaii, USA.
- 2) K. Yoshioka, Y. Sato, M. Tanaka, T. Murakami, and O. Niwa, “ConA Recognition with High S/N Ratio on the Hybrid Monolayer of Carbohydrate and Tri(ethylene glycol) Terminated Alkanethiols”, The joint international meeting of Electrochemical society and Electrochemical society of Japan (PRiME 2008), October, 14th, 2008, Honolulu, Hawaii, USA.
- 3) Y. Sato, K. Yoshioka, M. Tanaka, T. Murakami, and O. Niwa, “Protein-Resistant Surface Prepared with Oligo(ethylene glycol) Alkanethiolate Monolayer”, CRC International Symposium on Bio-interface and Biomass Conversion, October, 30th, 2008, Sapporo.

招待講演

- 1) 丹羽 修、「バイオセンサー-表面科学を利用した高感度センシング-」(社)日本計量機器工業連合会 研究発表会、2008 年 10 月 28 日。

依頼講演

- 1) 佐藤 縁、丹羽 修「ソフトナノ界面による高感度タンパク質認識」産総研オープンラボ バイオ、医療応用へ向けたマテリアル・デバイス開発、2008 年 10 月 21 日（つくば）。

4. その他 （特許）

- 1) 田中睦生、澤口隆博、佐藤 縁、丹羽 修、吉岡恭子、「生体関連物質計測デバイス、人工臓器用表面修飾材料」、特願 2008-211376。

1. 緒言

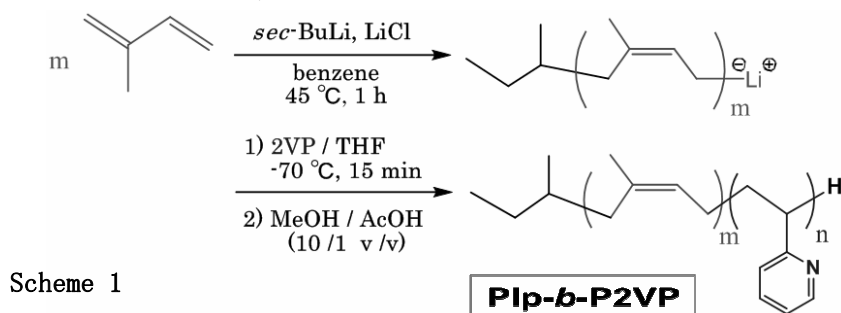
イオン性鎖と疎水鎖からなるイオン性両親媒性高分子は、ある条件下にて、界面不活性性を示すなど特異な分子物性を示すとともに、自己組織化により、水溶液中でミセル、水面で単分子膜を形成する。これら、自己組織体での親水性イオン鎖は、片末端を界面に固定化され、密生した特異なソフト界面、すなわち、高分子電解質ブラシを形成している。これは有限の厚みを持つ界面であるとともに、高分子鎖が密に配向していること、イオン密度が極度に高いことなどの特殊状況にある。我々は、強酸性鎖、弱酸性鎖を有する、様々なイオン性両親媒性ジブロックコポリマーをリビング重合法により合成し、それらが形成するミセル、単分子膜のナノ構造とその変化を、小角散乱法、動的散乱法、X線反射率法(XR)などにより精査してきた。その結果、水面単分子膜中のイオン性親水鎖層は、単純なブラシ層を形成しているのではなく、疎水層直下に、親水鎖が密に吸着した「絨毯層」を形成しており、条件に応じて、その下にブラシ層が形成されることを見いだした。そして、これら「絨毯層のみ」構造と「絨毯層＋ブラシ層」構造間で、ブラシ密度や添加塩濃度により、転移現象が現れることを確認した。また、強酸性ブラシのナノ構造の添加塩濃度依存性には、一定塩濃度まで構造が変化しない「臨界塩濃度」が存在することを見いだしたが、弱酸性ブラシでは、ブラシ層の厚さは、添加塩濃度の増加に伴い、いったん膨張し、その後収縮するという、全く異なる挙動をとることが分かった。これらより、イオン性高分子ブラシでも、少なくとも強酸性、弱酸性ブラシでは、その形成機構が異なることが示唆されている。

本研究では、イオン性高分子ブラシの形成機構をより明確とし、ナノ構造と機能発現の相関に関する知見を得るため、カチオン性高分子を新たに合成し、その水面単分子膜中のカチオン性高分子ブラシ鎖のナノ構造とその転移を、表面圧-面積曲線(π -A 測定)およびXR 測定により、系統的調査を行った。

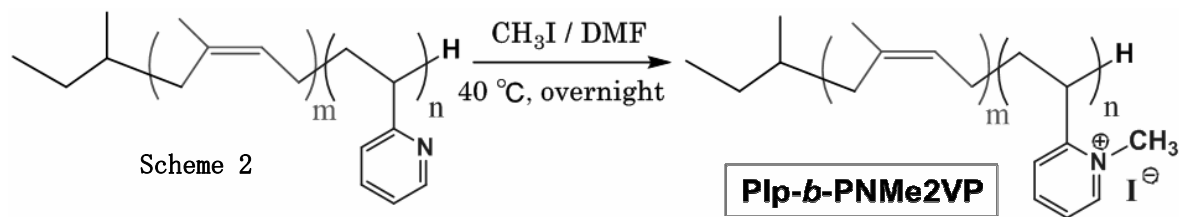
2. 研究経過

2-1. 試料

カチオン性両親媒性ブロックポリマーとして、ポリイソブレンとポリビニルピリジンのジブロックポリマーをリビングアニオン重合法により、合成した。(スキーム1)



そして、ピリジン部位をメチル化にて四級化することにより、カチオン性ブロックポリマーを得た。(スキーム2)



種々のブロック鎖長のポリマーを合成したが、疎水鎖が十分長く、安定な単分子膜を形成した $m:n=100:58$ のポリマーについて、検討を行った。(Mw/Mn=1.09, 四級化度: 58%)

図1は、純水上に展開した単分子膜からの XR 曲線の表面圧依存性である。明瞭な Kiessig フリンジが観察されており、均一な単分子膜の形成が示唆される。また、LB トラフにより膜を圧縮し、表面圧が増加するとともに、Kiessig フリンジは、小角側へ移動しており、膜厚が増加していることが分かる。このプロファイルを用いて、疎水層と絨毯層からなる 2-box モデル、または、疎水層、絨毯層、ブラシ層からなる 3-box モデルにてフィッティングし、各層の厚さと各界面の粗さを評価するとともに、図2のような界面（水面）に垂直方向の電子密度プロファイルを得た。

10mN/m, 15mN/m などの低表面圧条件では、水面下には、絨毯層のみが観察されたのに対し、それ以上の表面圧では、絨毯層の下に、ブラシ層の形成が確認され、その厚さは、圧縮に伴い増加していた。これは、絨毯層のみ構造から、絨毯層+ブラシ層構造へのブラシ密度変化による転移である。これにより、絨毯層の形成と、二種構造間の転移は、アニオン性高分子ブラシに限らず、カチオン性でも観察され、イオン性高分子ブラシに対して普遍的なものであることが確認された。

図3は、各層の厚さのブラシ密度変化をヒストグラムで表したものである。比較のため、以前研究を行ったポリアクリル酸(PAA)ブラシ、ポリスチレンスルホン酸(PSS)ブラシの結果も併せて示した。ブラシ層が生成する「臨界ブラシ密度」は、 0.4 nm^{-2} 附近であり、強酸性の PSS ブラシの値 0.12 程度に比べて大きな値となっており、むしろ弱酸性ブラシの PAA の値に近い。また、ブラシ層の厚さもブラシ密度の増加とともに厚くなっており、PAA と類似しており、ある密度でブラシが一気に生成し、その厚さがあまり変化しない PSS ブラシとは異なる挙動に見える。四級化ビニルピリジンは、強塩基性であり、PSS との類似性が予想される場所であるが、これらの結果と、添加塩濃度依存性において明確な臨界塩濃度が観察されなかったことから、その低めの四級化度のために、むしろ弱イオン性ブラシと似た挙動を示したと考えられる。現在、四級化したモノマーを直接重合することにより、四級化度 100%の試料合成を試みている。

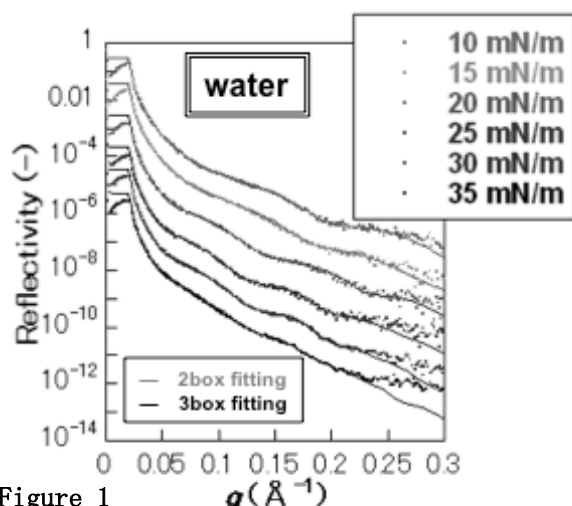


Figure 1
XR profiles for Plp-b-PNMe2VP monolayer (m:n = 108:58) on water surface

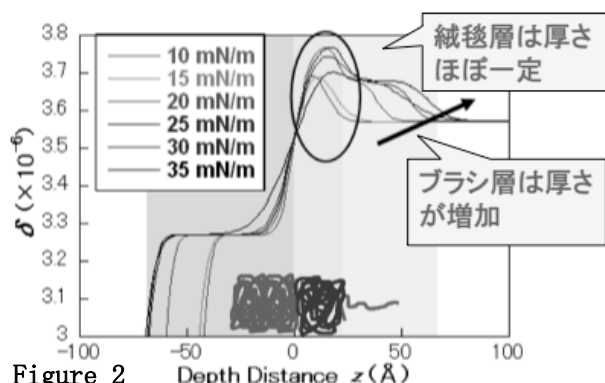


Figure 2
Density profiles for Plp-b-PNMe2VP monolayer (m:n = 108:58) on water surface

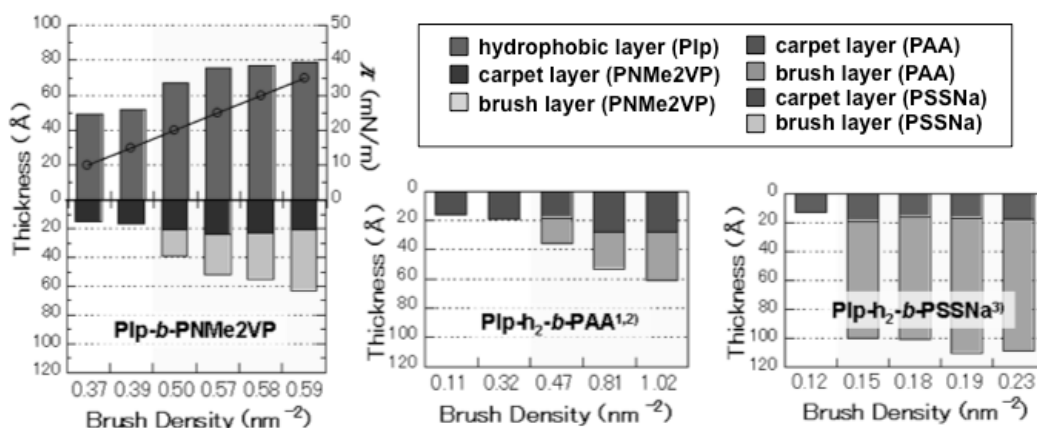


Figure 3 Thickness of each layer of the monolayer on the water as a function of the brush density

Correlation between Nanostructure and Functionality for

Polyelectrolyte Brush Soft Interface

Hideki Matsuoka

Department of Polymer Chemistry,

Kyoto University

Katsura, Nishikyo, Kyoto 615-8510, Japan

Tel: 075-383-2596, Fax: 075-383-2599, E-mail: matsuoka@star.polym.kyoto-u.ac.jp

Ionic amphiphilic diblock copolymers, which consist of hydrophobic and hydrophilic ionic segments, show very unique character such as non-surface activity under suitable condition. Since these polymers are amphiphilic, they form self-assemblies such as polymer micelle in aqueous solution and polymer monolayer on the water surface. In these self-assemblies, the ionic chains form polyelectrolyte brush. For micelle, it is 3D spherical brush, and for monolayer, it is 2D brush. We have been investigating the nanostructure of polyelectrolyte brush in these systems by small-angle scattering, dynamic light scattering, X-ray reflectivity (XR) techniques.

Recently, we have investigated the nanostructures of poly(styrene sulfonate) (PSS) brush and poly(acrylic acid) (PAA) brush in the monolayer by XR, and have found different behavior for these strongly ionic and weakly ionic brushes. For both, we observed “carpet-only” structure and “carpet+brush” structure, and transition between these structures by the change of brush density. However, quite different behavior was observed for salt concentration dependence. For PSS brush, the critical salt concentration, where no structural change was observed) were found, but for PAA brush, the brush thickness increased by salt addition and then decreased. From these observations, the brush formation mechanism has been thought to be different, at least for weakly and strongly anionic polymer brushes.

In this study, as the first attempt, cationic polymer brush was investigated to clarify the similarity and difference from anionic systems. The cationic amphiphilic diblock copolymer, poly(isoprene)-*b*-poly(quarternized vinylpyridine) was synthesized by living anionic polymerization followed by quarternization by methyl iodide. The degree of polymerization was 100 and 58 for hydrophobic and hydrophilic blocks, respectively. M_w/M_n was 1.09.

The XR profiles from the monolayer on the water surface showed clear Kiessig fringes, which mean uniform monolayer formation. By model fitting, the nanostructure and its change of the monolayer were evaluated. The transition between “carpet-only” and “carpet+brush” structures by the change of brush density was observed also for this cationic polymer brush. Hence, this transition is universal for ionic polymer brush systems. However, the critical brush density, where this transition occurs, was about 0.4 chains/nm², which is close to that for weakly ionic PAA brush, but much smaller than that for strongly ionic PSS brush (about 0.1). Also, the critical salt concentration was not clearly observed for this cationic polymer brush. This observation might be due to low degree of quarternization (0.58). Now, we are trying to synthesize fully quarternized polymers by polymerization of quarternized monomers.

1. 原著論文

- 1) P.S. Mohanty, H. Dietsch, L. Rubatat, A. Stradner, K. Matsumoto, H. Matsuoka and P. Schurtenberger
Synthesis and characterization of novel functional electrosterically stabilized colloidal particles prepared by emulsion polymerization using a strongly ionized amphiphilic diblock copolymer
Langmuir, **25**(4), 1940-1948 (2009).
- 2) Emiko Mouri, Yoshitaka Okazaki, Kohji Yoshinaga, Hideki Matsuoka
X-ray Reflectometry Confirms Polymer-grafted Silica Particle Monolayer Formation at the Air-Water Interface
J. NanoSci. Nanotech., **9**(1), 327-333 (2009).
- 3) H. Matsuoka, Y. Suetomi, K. Matsumoto,
Nanostructure of Poly(Acrylic Acid) Brush and its Transition in the Amphiphilic Diblock Copolymer Monolayer on the Water Surface
Langmuir, submitted.

2. 著書・総説

- 1) 松岡秀樹 (分担執筆)「高分子技術者のためのソフトマター入門」, 丸善 (印刷中)
- 2) 松岡秀樹 (分担執筆)「第3版 現代界面コロイド化学の基礎」, 丸善 (印刷中)

3. 国際会議発表 (招待講演)

- 1) H. Matsuoka, "Non-Surface Active Amphiphilic Polymers and their Application as an Emulsifier for Synthesis of Polyelectrolyte Grafted Nanoparticles.", 21st JSPS Core to Core, Advanced Particle Handling Science Seminar. Katsura Campus, Kyoto Univ., 2008.10.14
- 2) H. Matsuoka, "Non-Surface Active Amphiphilic Block Copolymers --- Unique Properties, Micellization, and its Application.", 3rd Taiwan-Japan Workshop on Neutron Scattering of Bio-Materials and Soft-matters for Nanotechnology and Biotechnology), December 4-6, 2008 CO-OP INN KYOTO Kyoto, Japan
- 3) H. Matsuoka, "Polyelectrolyte Brush at the Air/Water Interface --- Effects of Brush Density and Salt Concentration on its Nanostructure and Transition", 5th Annual International Symposium of Polymer Gel Research Center of Yeungnam University, March 12 - 14, Yeungnam University, Daegu, Korea
- 4) H. Matsuoka, "Ionic Amphiphilic Diblock Copolymers --- "Non"-Surface Activity, Micellization, Polyelectrolyte Brush Formation ---", Korea Chemical Society, Annual Meeting 2009, Seoul, Korea, April 16-17, 2009

4. 国際会議発表 (一般発表)

- 3rd Taiwan-Japan Workshop on Neutron Scattering of Bio-Materials and Soft-matters for Nanotechnology and Biotechnology), December 4-6, 2008 CO-OP INN KYOTO Kyoto, Japan
1. F. Ozaki, H. Matsuoka, Synthesis and structural investigation by SANS of self-standing crosslinked diblock copolymer membrane containing fluorine and sulfonic acid
2. F. Ozaki, H. Matsuoka, Dynamic properties and salt effect on polyelectrolyte grafted nanoparticle synthesized by emulsion polymerization without foam formation
3. T. Yamada, H. Matsuoka, Studies on Monolayer Formation of Cationic Diblock Copolymers at the Air/Water Interface by XR Technique
4. R. R. Nayak, H. Matsuoka, Synthesis and Characterization of Non-Surface Active Cationic Diblock Copolymers and their Micellization Behavior in Aqueous Solution

A03

ソフト界面の機能 「ソフト界面を“活かす”」

1. 緒言

再生医療や組織工学が急速に発達し、また生体適合性をもつバイオマテリアルが強く求められている中で、生体の構成単位である細胞と材料とのバイオインターフェースで起こる様々な相互作用を解析することは重要な意味を持つ。しかし、実際の系は多様な外因が複雑に絡み合った結果として現れ、個々の相互作用がどのような因果関係があるのか明らかになっていない。そこで、このような複雑系を単純化させ、つまり細胞と細胞間の相互作用をなくすことで、独立した一つの細胞とマテリアル間の相互作用を直接評価することができれば、マテリアルに対する細胞機能性を正確に解明することができ、新しいマテリアル創製による組織工学の発展、疾病の新規診断方法、さらには創薬研究開発に貢献できると考えた。そこで本研究では、バイオインターフェースの設計の指標となる細胞-材料間の接着初期の相互作用を定量的に解析することを目的とする。細胞は材料表面において、細胞同士および細胞-材料間で相互作用しながら生存する。細胞-材料間相互作用のみを解析するためには細胞間相互作用を除去することが必要不可欠である。細胞同士の相互作用を除去するために、図1に示すような細胞接着/非接着表面を明確に制御した基板をポリマーの精密重合法により作製する。細胞非接着部分にはタンパク質の吸着及びその後の細胞接着を抑制することで知られる 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) のグラフトポリマー層を使用する。細胞接着部分は様々な機能性を有するモノマーをパターン状にグラフト重合させる。また、基板への付着物の物理特性を検出できる水晶振動子マイクロバランス(QCM-D)を用いて細胞の接着挙動の定量的な解析を行う。QCM-Dは測定された Δf (振動数変化)および ΔD (損失エネルギー変化)から、質量変化や粘弾性変化を解析する装置である。光グラフト重合により細胞の接着/非接着を制御した基板を用いた細胞接着挙動のQCM-Dによる測定は、材料-細胞間相互作用の定量的な解析に繋がると期待される。

一方、細胞機能を診断するマイクロチップシステムは、試薬、サンプル量が少なくさらに、短時間での測定が可能となり、実験室レベルの研究用ツールとして期待されている。近年、特に組織工学の分野において、マイクロ流体チップを用いた細胞培養環境の時間的制御技術が盛んに研究されている。しかし、細胞の活性の経時的な評価手法は限られており、これを実現するシステムの開発は今後ますます重要となると考えられる。そこで、細胞機能をリアルタイムで診断するツールとしてのマイクロチップシステムを開発することを本研究では目的とする。

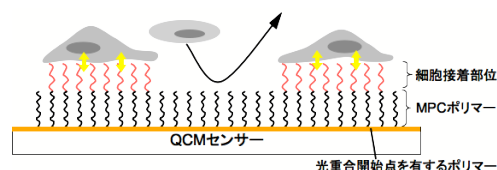


図1. 細胞接着/非接着を制御した表面構造

2. 研究経過

2.1 光グラフト重合を用いたバイオインターフェースの構築と細胞接着挙動のQCM-Dによる解析

図1に示す細胞認識パターン化界面の構築を目指し、タンパク質の非特異吸着の抑制を目的とし、poly((2-ethylhexyl methacrylate)_x-co-(4-vinylbenzylN,N'-diethyldithiocarbamate)_{100-x}) (PEV[100-x]) を光開始剤としたリビングラジカル重合法により MPCポリマーブラシ層を形成した。MPCポリマーブラシ層へのタンパク質吸着量評価は、光開始剤含有量の異なるPEVによりポリマーブラシ密度の制御、さらにUV照射時間による鎖長制御により行った。タンパク質固定化部位の作製においては、methacryl polyethylene glycol conjugated with N-succinimidyl carbonate をモノマーとして用い、poly(MPC)表面からフォトマスクを介してUV照射時間を制御しパターン化ポリマー膜を形成した。また、QCM上での細胞挙動を検討するため、PEVをQCMの金基板にスピンコーティングした後、同基板を0.3 mol/LのMPCモノマー水溶液中で5時間UV照射($\lambda = 365 \pm 50$ nm)することで、表面からMPCを光グラフト重合させた。

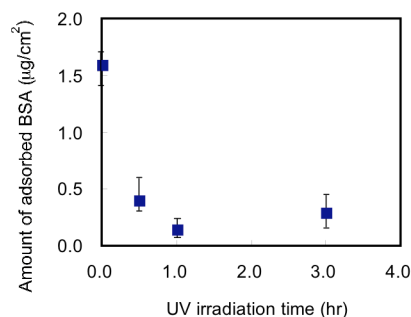


図2. poly(MPC)鎖長の異なる表面へのBSA吸着量

種々の光開始剤（PEV10～40）を用い、UV 照射時間 0～3.0hr で MPC のグラフト重合を行い、牛血清アルブミン（BSA）の吸着量を micro-BCA 法により検討した結果、PEV30 を用いた場合は図 2 に示すような挙動を示し、1.0hr でグラフト重合した表面で、BSA の吸着量が最も減少した。重合時間 1.0hr での BSA 吸着量を比較すると、PEV10>PEV40>PEV20>PEV30 であった。MPC ポリマー鎖密度と鎖長の異なるそれぞれの表面形態を原子間力顕微鏡(AFM)により観察したところ、BSA の吸着量はポリマー鎖密度と表面のナノレベルでの凹凸構造に大きく依存し、ポリマーブラシの密度が高く、かつ平滑な形態の表面が、タンパク質の非特異的吸着を効果的に抑制可能であることがわかった。

そこで、タンパク質の非特異的吸着の抑制された条件の表面を用いて、細胞初期接着挙動の QCM-D を用いた解析を行った。QCM-D 装置に設置された金基板および MPC グラフトポリマー基板に無血清培地を 2 分間流した後、血清入り培地を 1 時間流し、タンパク質を吸着させた。その後、無血清培地でリンス後(2 分間)、 2.0×10^2 cells/mm² の密度で細胞懸濁液を流した。インキュベーション中の細胞接着挙動を Δf 、 ΔD ならびに D-f プロットにより解析した。金基板と MPC グラフト基板における QCM-D の D および f の変化は MPC グラフト基板ではわずかであり、一方、金基板上では大きかった。これは顕微鏡観察における各基板の細胞接着挙動に対応した。特に金基板における QCM-D データでは、3 時間を境に傾きの異なる 2 つの領域に分けられた。顕微鏡観察では同基板上に接着した細胞に大きな変化は見られなかったため、吸着タンパク質層を介した接着細胞の特異的な変化を定量できたことが示唆された。今後、細胞特異的、非特異的領域を制御したパターンニング基板を用いて、細胞-材料間の相互作用の解明をめざす。

2.2 マイクロチップを用いた細胞計測システムの開発

作製したマイクロチップシステムの概要図を図 3 に示す。培養部での細胞の呼吸活動によって出される二酸化炭素が分離膜を透過し反応部に溶け込むと、その溶存濃度の変化に応じて pH が変化するため、これを pH センサーによって測定する。我々のシステムの特徴の 1 点目は pH センサーとして pH-sensitive field-effect transistor (pH-FET) を用いたことである。pH-FET は速く安定した pH 応答性を持ち、小型であり、同一試料の多機能分析を行う上で有利である。2 点目は、高い気体透過性を持つことで知られる polydimethylsiloxane (PDMS) を分離膜として用いたことである。PDMS 分離膜を用いることで細胞培養培地中での細胞生成物や緩衝剤による pH 変化による影響を除き、二酸化炭素の溶存の効果のみを評価できる。また、PDMS 膜は、作成が容易であり、マイクロチップ内にシステムを組み込む際に有利である。

マイクロチップは PDMS (Silpot184[®])で作成した膜を酸素プラズマ処理(85 W, O₂:17 Pa, 10 s)した後、接合して作製した。分離膜はスピコート(5000 rpm, 60 s)によって作成した。反応部には 0.01M の NaHCO₃ 水溶液を満たした。2 つのチップを作製し、一方のチップには HeLa 細胞の懸濁液(10^6 cells/ml)を細胞培養部に添加し、培養中の細胞の呼吸活性を経時的に観察した。もう一方には培地のみを入れた。

測定結果を図 4 に示す。グラフは HeLa 細胞を滴下したチップでの pH 変化分から、培地のみを滴下したチップでの pH 変化分を差し引いて算出したものである。よって、ここに示した pH 変化は細胞の呼吸活性のみの効果によるものである。培養中、反応部の pH は緩やかに減少しているが、これは細胞の増加等によって細胞培養部の二酸化炭素濃度が増加したためだと考えられる。

我々は作製したシステムを用いてマイクロチップ中の細胞の呼吸量の経時的な変化を観察することができた。しかし、細胞の呼吸活性の定量的な評価を実現するためには、より少ない細胞数の呼吸変化を測定できるよう、培養部及び反応部の大きさ、チップの材料等について検討していく必要がある。

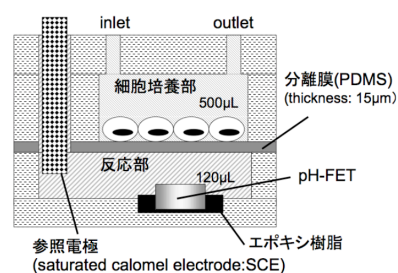


図 3. マイクロチップの概要図

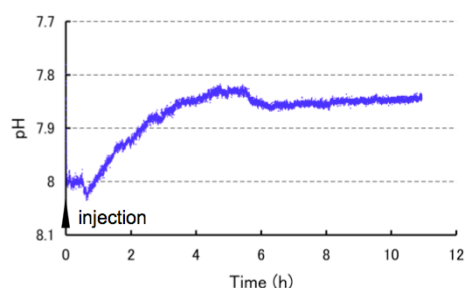


図 4. 細胞培養中の反応部の pH 変化 (37 °C, CO₂: 2.7%)

Nano-fabrication of Molecular Recognition Biointerfaces and
Application to Cell Analysis Microchip

Madoka Takai

Department of Materials Engineering, The University of Tokyo,

7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656

Tel:03-5841-7125, Fax:03-5841-8647, E-mail:takai@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

An understanding of cell-material interactions is significantly important for tissue engineering and cellular biology. However, present studies treated large number of cells approximately to confluent state and various effects including cell-cell interactions are condensed. Therefore, it is necessary for accurate analysis of cell-material interactions to the exclusion of cell-cell interactions on various nanostructured response interface. And for quantitative understanding of these events, microfluidic bioreactors are expected opportunities to study cells under simulated physiological microenvironments. Because microfluidic systems enable spatial and temporal control of cell behavior by complex biochemistry. In order to evaluate microenvironment of cell culture, it is necessary to integrate bioanalytical tools into the microsystems. In this study, we investigate initial cell attachment behavior on response or non-response surfaces constructed with nanoscale structure, and fabricate cell analysis microchip.

At first, micropatterned biointerfaces especially on polymeric substrates were studied for investigation of cell-surface interactions. To create such surface, the well-known biocompatible cell-membrane-like surface based on 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) brush type and micropatterned biorecognition layer were constructed by living radical polymerization using photoiniferter. The macrophotoiniferters comprised of 2-ethylhexyl methacrylate (EHMA) and 4-vinylbenzyl *N,N*-diethyldithiocarbamate (VBDC) were synthesized with various of VBDC content from 10% to 40% (termed as PEV10, 20, 30, 40). In the presence of aqueous solution of 0.3 M MPC monomer, the photoiniferter-coated substrates were irradiated with UV lamp (365 nm) at room temperature and poly(MPC) brushes were created on the substrate. The density and length of the poly(MPC) chains which are the very important factors in suppressing nonspecific protein adsorption were controlled by composition of VBDC on the macrophotoiniferter and irradiation time, respectively. We found that beside the hydrophilicity, moderate chain density, moderate chain length, and smooth surfaces were the important factors to be considered for preparing nonbiofouling surfaces. After finding the best condition for preparing the nonbiofouling poly(MPC)-modified surfaces, cell-materials interaction was analyzed by quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) which has been widely used in biology and biotechnology, increasingly in biosensors fields. Next step, we will evaluate the cell response on poly(MPC) and regulated-patterned biorecognition interfaces.

Second topics is a fabrication of cell analysis microchip. A new microchip device for real-time analysis of cellular respiratory activity on poly(dimethylsiloxane) (PDMS) membrane with integration of carbon dioxide sensor based on pH-sensitive field-effect transistor (pH-FET) was developed. Controlling the thickness of PDMS membrane, response curves of the CO₂ gas under soda water flow and respiratory activity of HeLa cells on PDMS substrate were monitored as a pH-shift. The pH-FET integrated microdevice having gas permselective PDMS membrane can contribute to basic understanding of biological mechanisms in the field of tissue engineering. In future, several sensors analysis of cellular behavior are integrated in the microchip systems.

業績リスト

1. 原著論文 (著者、タイトル、雑誌名、巻号、始めと終わりのページ、年号)

- 1) Y. Himuro, M. Takai, K. Ishihara, Poly(vinylferrocene-co-2-hydroxyethyl methacrylate) mediator as immobilized enzyme membrane for the fabrication of amperometric glucose sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 136 122-127 (2009)
- 2) Y. Xu, M. Takai, K. Ishihara, Suppression of Protein Adsorption on a Charged Phospholipid Polymer Interface, *Biomacromolecules*, 10 (2), 267-274 (2009)
- 3) N. Tajima, R. Matsuno, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara, A Novel Interface for High-Sensitive Immunoassay Using Orientation Controlled Protein A and Non-biofouling Phospholipid Polymer Surface, *Tans. Mater. Res. Soc. Jpn*, in press
- 4) K. Nishizawa, T. Konno, M. Takai, and K. Ishihara, Stabilization of Bioconjugated Phospholipid Polymer Nanometer Scaled Structures for Highly-sensitive Immunoassay, *Tans. Mater. Res. Soc. Jpn*, in press
- 5) M. Takai, J. Sibarani, K. Ishihara, Micropatterned Biorecognition Surfaces on Nonbiofouling Polymer by Living Radical Photopolymerization for High Sensitivity Biosensing, *Proc. of MRS*, in press

2. 著書・総説

- 1) K. Ishihara, K. Nishizawa, Y. Goto, M. Takai, Bioinspired Polymer Surfaces for nanodevices and Nanomedicine, *Adv. Sci. Technol.*, **57**, 5-17 (2008). (総説)
- 2) 高井まどか、James Sibarani, Yan Xu, 石原一彦、リン脂質ポリマーを用いたマイクロ流体デバイスのバイオインターフェイス制御、高分子論文集、65 (3), 228-234 (2008). (総説)
- 3) 高井まどか、微量血液診断チップ、次世代医療のための高分子材料工学、監修 秋吉一成、岸田晶夫、シーエムシー出版、263-373、2008 (著書)

3. 国際会議等発表

- 1) J. Sibarani, M. Takai, K. Ishihara, Dual Function surface prepared on polymeric substrate for highly Sensitive Immunoassay-based microarray biosensors, *Proc. of μ -TAS 2008*, 250-252 (2008).
- 2) T. Shirai, M. Takai, T. Sakata, Y. Miyahara, and K. Ishihara Microchip Analysis of Cellular Respiratory Activity on PDMS Membrane having Gas Permselective Property, *Proc. of μ -TAS 2008*, 640-642 (2008).
- 3) M. Takai, J. Sibarani, J-H Seo and K. Ishihara, Preparation of Nonbiofouling Interfaces by Bioinspired Phospholipid Polymer for Medical Microchip Applications, 8th International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-8), January 2008, Nagoya
- 4) M. Takai, J. Sibarani, K. Ishihara, Micropatterned Biorecognition Surfaces on Nonbiofouling Polymer by Living Radical Photopolymerization for High Sensitivity Biosensing, The 2008 MRS spring meeting, March, 2008, San Francisco
- 5) M. Takai, and K. Ishihara, Nonbiofouling Surface on Microchips for High Resolution Biosensing, Interfinish 2008 congress, June, 2008, Korea
- 6) M. Takai, E. Watarai, K. Ishihara, Analysis of initial cell attachment on material surfaces by quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) measurements, Nanobio-Seoul 2008, October, 2008, Korea
- 7) N. Tajima, R. Matsuno, T. Konno, M. Takai and K. Ishihara, A Novel Interface for High-Sensitive Sensing Using Orientation Controlled Protein A and Biofouling Phospholipid Surface, The IUMRS International Conference in Asia 2008, December 2008, Nagoya
- 8) K. Nishizawa, T. Konno, M. Takai and K. Ishihara, Nanostructured Phospholipid Polymer Biointerface for Highly Sensitive Immunoassay Microchip, The IUMRS International Conference in Asia 2008, December 2008, Nagoya

高度分子認識を目指した生体分子と合成分子のなす超構造界面密生層の構築

-PEG ゲルマイクロパタン上における肝細胞スフェロイドの構築と評価-

研究代表者：筑波大院数理物質科学・長崎幸夫

研究分担者：筑波大院数理物質科学・吉本敬太郎

研究分担者：筑波大院数理物質科学・原 暁非

1. 緒言

生きた細胞や組織を検出素子として利用し、低分子化合物や生体高分子（核酸およびタンパク質）などの薬理作用や細胞毒性を評価するためのハイスループットなアッセイ用基板が、生化学や医薬分野において利用されている。例えば、無数に作り出される医薬品候補物の安全性や効能を調べる目的で日々動物実験が繰り返され、犠牲になる動物の数は計り知れない。従って、実際の臓器に近い働きをする細胞チップを作ること、動物実験の代替となる薬物動態シミュレーターシステムを構築することは医薬分野において非常に大きな意義を持つ。また、生化学や再生医療の分野では、ES 細胞や幹細胞をはじめとする各種細胞の機能や分化誘導機構を調べるための機能性細胞培養用皿は、重要なツールとして期待されている。このように、細胞アレイは生物のおかれた周囲の環境を評価・把握することを目的とした二次元プラットフォームであり、一般的にはマイクロメートルオーダーに分画した微細なパタンに細胞接着性領域と非接着性領域を構築させ、その上で細胞や組織を培養する合成分子と生体分子からなる集積型バイオデバイスである。

創薬の視点からすると、肝臓細胞を固定化したアッセイ基板は最も重要な細胞アレイの一つである。肝臓は薬物代謝をはじめ、ビタミンの貯蔵、アミノ酸の抽出など、500 種類以上もの機能を担っている臓器であり、1976 年にコラゲナーゼを使用して高い機能を維持した成熟ラットの肝細胞分離法（コラゲナーゼ灌流法）が確立されて以来、分離肝細胞を使用した研究が盛んに行われている。しかしながら、生体内の肝細胞は肝細胞同士や肝非実質細胞、細胞外基質と高度に相互作用し、三次元的で高密度な生体組織中で機能を発現しているため、細胞アレイ上で生体内と同等の環境を再現することは困難とされている。通常の単層細胞培養法では肝細胞採取後数日ほどしか生存状態を維持できず、機能面でも肝細胞に特異的なアルブミン産生、アンモニア除去および多種にわたる基質を水酸化するシトクロム P-450 活性が 2-3 日で低下し、やがて消失することが知られている。このような背景のもと、生体外で高活性な肝細胞培養法およびその細胞アレイの開発が医薬分野を中心とする各分野において期待されている。

我々は、上述した問題を解決することを目的として、フォトリソグラフィ技術により作成したポリエチレングリコール（PEG）ゲルのマイクロパタン表面を用いて肝臓細胞の凝集体（スフェロイド）アレイを作製し、高活性な細胞培養用マイクロアレイの構築に成功した。本報告書では、本年度の研究成果である肝癌細胞と胎生肝細胞のスフェロイド形成ならびに機能評価に関する検討を行った。

2. 研究経過

2. 1 PEG ゲルパタンのネガーポジ型細胞培養床への展開と肝癌細胞スフェロイドアレイの構築

1950 年代にマウスの悪性細胞が凝集塊を形成し、構造的にヒトの腫瘍に類似していることが発見された。1985 年には、肝細胞が浮遊球状の三次元的に凝集した肝細胞スフェロイドの機能についてはじめて報告がなされた。スフェロイドは、従来の二次元的な単層培養と比較して長期培養が可能であり、単層培養した細胞よりも活性が高いという特長を有することが明らかとなり、その調整法に注目が集まった。しかしながら、初期に報告された調製法はどれも浮遊状態のものであり、細胞アレイへなどのチップ化を検討する際には、スフェロイドの基板への固定化技術が必要であった。また、凝集体が巨大化した細胞スフェロイドの中央部分では、栄養や酸素不足による壊死の発生が問題となり、スフェロイド自体のサイズを規定する技術の確立が必要であった。

我々の研究グループでは、PEG ブラシの代わりに PEG ゲルのパタンを利用した培養を行うことによりユニークな細胞パタン形成や高活性な肝癌細胞のスフェロイドの構築・培養が可能となることを見出した。両末端メタクリロイル PEG を光重合開始剤と一緒にスピニングし、フォトリソによって直径 100 μ m のスポットを 100 μ m 間隔にガラス上に作成し、内皮細胞の培養を行ったところ、メタノール溶媒を用いてパタン化ゲル表面を構築した場合、ゲルに細胞は接着せず非ゲル領域に細胞が接着した（図 1 PEG gel pattern A）。一方、水とメタノールの混合溶媒で調製した PEG ゲルには細胞が接着し、その周

辺は逆に細胞が接着しなくなる現象が確認された(図1 PEG gel pattern B)。コーティング溶媒はPEG ゲル化を行う前に完全に蒸発留去しているため、本現象は表面のわずかな違いを細胞が認識した結果発現している極めて興味深い現象であると言える。PEG gel pattern B の形成には、溶媒中の含水率の変化によりガラスに対する PEG の吸着特性が変化すること、さらに構築したPEG ゲルの親水性・疎水性が大きく変化することが要因であることが、タンパク質吸着実験、接触角測定、X 線光電子分光法などの測定結果から明らかとなった。また、細胞接着性 PEG ゲルドメインが形成された pattern B に肝癌細胞である FLC-4 を播種した場合、100 μm の大きさを持つ均一なスフェロイドアレイの構築が可能であった。通常、PEG ゲル表面に細胞を固定化する場合、細胞接着性を付与させるためにペプチド等の修飾が必要であるが、pattern B の PEG ゲル表面は未修飾であるにもかかわらず肝癌細胞を接着し、スフェロイドを形成できる点が極めて特長的な表面である。構築したスフェロイドのアルブミン活性は、内皮細胞と共培養したスフェロイドと同程度であることから、本スフェロイドアレイは新しい薬物試験用肝細胞アレイとして期待できる。

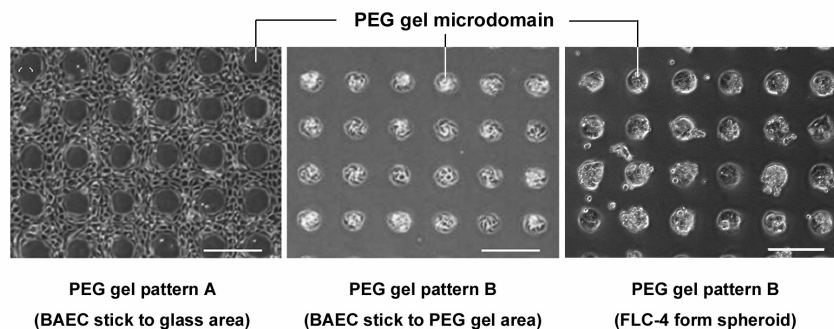


図 1 PEG ゲルパターン上に内皮細胞を播種したパターン(左、中央)と gel pattern B に肝癌細胞 (FLC-4) を播種して構築したスフェロイドアレイ(右)

2. 2 胎生肝細胞スフェロイドアレイの構築と分化誘導制御

未成熟で肝細胞に完全に分化していない胎生肝細胞は、分化誘導評価や分化前後肝臓の応答評価へのツール、さらに胎児性臓器を再生医療に用いる際の代替評価法を構築する細胞材料として注目を集めている。従来の胎生肝細胞研究は単層培養系で評価されたものが殆どであり、スフェロイドアレイ形状での活性評価を行った研究例は行われていなかった。そこで、我々が見出してきた「スフェロイドアレイ培養技術」をマウス胎児由来の肝細胞に適用し、同細胞のスフェロイドアレイの構築、ならびに構築したスフェロイドの分化誘導及び活性評価を行った。

今までに検討を行ってきた成熟肝・肝癌細胞は凝集力が強く、少ない細胞数で短期間にスフェロイドを形成するが ($1.8 \times 10^3 \text{ cells/mm}^2$ 程度で 2 日間培養)、細胞サイズが小さく凝集力の弱いマウス胎生肝細胞においては、 $2.2 \times 10^5 \text{ cells/mm}^2$ の高細胞濃度条件下で 7 日間培養した場合にスフェロイド形成することが明らかとなった。構築したスフェロイドのアルブミン産生量は単層培養の系に比べて高いことが明らかとなり、21 日の長期培養期間中でも維持されることが明らかとなった。さらに、胎生肝細胞の分化誘導の指標となる P-450 の活性評価を行ったところ、肝非実質細胞 (NPCs) を足場としたスフェロイドアレイに分化誘導因子のオンコスタチン M (OSM) を添加した場合にのみ、大きな活性が観測されるという非常に興味深い結果が得られた。

今後は、様々な足場細胞との共培養系における活性の変化や分化制御機能の付与などの調査・検討を行い、構築したアレイ上におけるスフェロイドの分化誘導時期を時空間的に制御できる機能性スフェロイドアレイの開発など、再生医療に貢献し得る肝細胞培養システム構築を目指す。

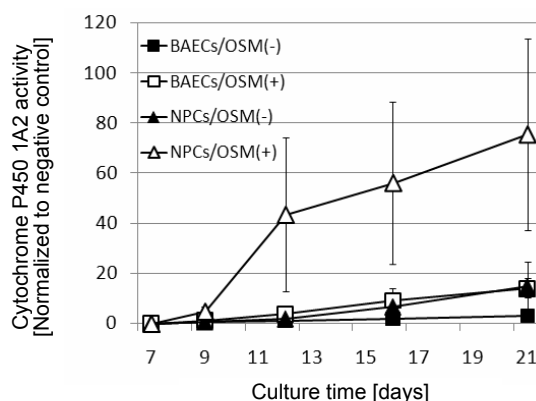


図 2 PEG ゲルパターン上に構築した胎生肝細胞の P-450 活性の変化

Construction of Molecular Recognition Field on Interphase Based on Superstructure Bio-interphase Formation by Biological and Synthesized Molecules

Nagasaki Yukio, Yoshimoto Keitaro, and Xiaofei Yuan
Graduate School of Pure and Applied Science, University of Tsukuba,

1-1-1 Ten-noudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan.
Tel and Fax: + 81-029-853-5749, E-mail: Nagasaki@nagalabo.jp

Recent progress in cell culture and microfabrication technologies has stimulated researches on the integration of cell cultures and sensors on a chip. New high-throughput techniques based on cells and tissues microarrays will not only contribute to understand fundamental cell biology but also facilitate clinical and pharmaceutical analysis of molecular targets, because living cells can monitor the targets through the physiological changes that are induced in them by exposure to drugs and environmental perturbations, such as toxicants, pathogens or other agents. Primary hepatocyte are the most useful candidates for constructing cell- and tissue-based biosensors, because hepatocyte plays many roles in drug metabolism *in vivo*. However, primary hepatocytes rapidly lose their liver-specific functions under conventional two-dimensional cell culture conditions.

Multicellular spheroids exhibit a characteristic *in vivo*-like morphology and cellular environment that can be used to determine gene expression and the biological behavior of cells; this is attributed to the retention of the 3-D architecture and establishment of important cell–cell contacts. Thus, tumor spheroids have served as models for a variety of experimental studies. Alternatively, cell-based bioassays that use primary hepatocyte act as attractive and important methods for studying the specific functions of the liver. In this work, we revealed the new techniques for constructing spheroid arrays, which were constructed by hepatic cancer cells and fetal mouse liver cells.

We present the novel technique for constructing inverted cell-adhesion patterns on PEG gel modified glass surfaces by photoirradiation using same photomask and materials. The PEG gel micropatterns were prepared by photolithographic technique using a photomask with 100 μm aligned cavities after spin-coating of a mixed solution of α -methoxy- ω -methacryloyl-PEG (PEG-DMA) and a photoinitiator on glass surfaces. When methanol was used as a casting solvent for the spin-coating (Method A), the circular PEG gel domains with a diameter of 100 μm were fabricated on the surface, and as would be predicted, seeded bovine aortic endothelial cells (BAECs) adhered to the glass area on the constructed surface to form a BAECs sheet with 100 μm aligned cavity. In contrast, it was rather surprising for us that a complete inverted cell pattern was formed when the PEG gel pattern surface was prepared using methanol/water co-solvent (Method B). Furthermore, when hepatoma cancer cells were seeded on the constructed surface prepared by Method B, they formed a spherical multicellular aggregate (spheroid) on the unmodified PEG gel domains without feeder cells. The reason of the inverted spheroid cell array was investigated in detail in this study.

Among the hepatic cells, fetal mouse liver cells (FMLCs) have been studied as a new material for growing artificial livers and for liver-cell implantation, because they are regarded as a suitable cell source for implantation and regeneration due to their genetic normality and potentially proliferative activity *in vitro*. Although some researchers have surveyed the hepatic activity of FMLCs in monolayer cultures or 3-D cultures, such as gel encapsulation cultures and cultures in a porous reticulated polyvinyl formal resin, the spheroid formation of FMLCs and the culturing of such spheroids in a two-dimensional array have never been reported. We succeeded in constructing a two-dimensional array of FMLC spheroids with uniform size and number on a PEG-gel micropatterned surface. The FMLC spheroids on the constructed array showed long-term viability and high hepatic activity. Especially, co-culturing with NPCs upregulated the hepatic activity of the FMLC spheroids. This novel cell-chip technology and the findings in this study could provide an interesting new approach to the construction of tissues and organs for regenerative medicine.

業績リスト

1. 原著論文

1. Oishi Motoi, Sumitani Shogo, Bronich Tatiana K., Kabanov Alexander V., Boska Michael D., Nagasaki Yukio: Novel Tumor-specific 19F-MRS/I Nanoprobe based on pH-Responsive PEGylated Nanogel: pH-Dependent 19F-Magnetic Resonance Studies. Chemistry Letters: 38(2),128-129(2009).
2. Oishi Motoi, Tamura Atsushi, Nakamura Takahito, Nagasaki Yukio: A Smart Nanoprobe Based on Fluorescence-Quenching PEGylated Nanogel Containing Gold Nanoparticles for Monitoring the Cancer Response to Therapy. Advanced Functional Materials: 19(6) 827-834(2009).
3. Yoshimoto Keitaro, Hoshino Yuki, Ishii Takehiko, Nagasaki Yukio: Binding Enhancement of Antigen-Functionalized PEGylated Gold Nanoparticles onto Antibody-Immobilized Surface by Increasing the Functionalized Antigen using α -sulfanyl- ω -amino-PEG. Chemical Communications: 5369-5371 (2008).
4. Yoshimoto Keitaro, Hirase Takumi, Nemoto Seiko, Hatta Tamao, Nagasaki Yukio: Facile Construction of Sulfanyl-terminated Poly(ethylene glycol)-brushed Layer on a Gold Surface for Protein Immobilization by the Combined Use of Sulfanyl-Ended Telechelic and Semi-Telechelic Poly(ethylene glycol)s. Langmuir 24: 9623-9629 (2008).
5. Kamimura Masao, Miyamoto Daisuke, Saito Yu, Soga Kohei, Nagasaki Yukio: Design of poly(ethylene glycol)/streptavidin co-immobilized upconversion nanophosphors and their application to fluorescence biolabeling. Langmuir 24: 8864-8870 (2008).
6. 長崎幸夫: 生体環境下で機能する PEG 化多孔質無機ナノ粒子の設計と評価 高分子論文集 65: 409-415 (2008).
7. Yuan Xiaofei, Iijima Michihiro, Oishi Motoi, Nagasaki Yukio: Structure and Activity Assay of Nanozymes Prepared by the Co-immobilization of Practically Useful Enzymes and Hydrophilic Block Copolymers on Gold Nanoparticles. Langmuir 24: 6903-6909 (2008).
8. Nagasaki Yukio: PEG-b-polyamine Stabilized Bionanoparticles for Nanodiagnostics and Nanotherapy. Chemistry Letter 37: 564-569 (2008).
9. Miyamoto Daisuke, Oishi Motoi, Kojima Keiji, Yoshimoto Keitaro, Nagasaki Yukio: Completely Dispersible PEGylated Gold Nanoparticles Under Physiological Conditions: Modification of Gold Nanoparticles With Precisely Controlled PEG-b-polyamine. Langmuir 24: 5010-5017 (2008).

2. 著書・総説

1. 大石 基、長崎幸夫、“ナノゲルによるピンポイント治療・診断システムへの展開、【応用編】第6章、“ナノゲルによるピンポイント治療・診断システムへの展開”、吉田 亮監修、(株)シーエムシー出版 (2008).
2. 市野正洋、長崎幸夫、“医療用ゲルの最新技術と開発”、【材料編】第7章、“ゲルの微細加工と細胞のマイクロパターンニング”、吉田 亮監修、(株)シーエムシー出版 (2008).

3. 会議発表

1. Kojima R, Yoshimoto K, Takahashi E, Ichino M, Miyotoshi H, Nagasaki Y: Spheroid Array of Fetal Mouse Liver Cells on PEG-gel Micropatterned Chip: Enhanced Hepatic Activity and Induced Differentiation, SAT-3/PTW-3, Tokyo International Exchange Center, Tokyo (2009). [国際学会 ポスター]
2. 小島 綾太、吉本 敬太郎、高橋 絵美子、市野 正洋、三好 浩稔、長崎 幸夫: 高活性な胎生肝細胞の構築と分化誘導、医薬探索・開発のための細胞アッセイ技術シンポジウム、産業技術総合研究所臨海副都心センター別館 11 階会議室、東京、(2009). [国内学会 ポスター]
3. Kojima R., Yoshimoto K., Takahashi E., Ichino M., Miyoshi H., Nagasaki Y.: Construction and Evaluation of Fetal Mouse Liver Cell Spheroid on Patterned Cell Array Chip, IUMRS-ICA2008, Nagoya Congress Center, Aichi, Japan (2008). [国際学会 ポスター]
4. 小島 綾太、高橋 絵美子、市野 正洋、吉本 敬太郎、三好 浩稔、長崎 幸夫: 精密パターン化 PEG ゲルチップ上におけるマウス胎生肝細胞スフェロイドアレイの構築と評価、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008, 東京大学、東京 (2008).[国内学会 ポスター]

4. 特許出願

- 1) 長崎幸夫、小島綾太、吉本敬太郎、胎生肝細胞のスフェロイドを含む培養細胞構築法、特願：2008-328057 (2009).

DNA 密生相が示す特異な界面現象の解明と応用

研究代表者：理化学研究所前田バイオ工学研究室・前田瑞夫

研究分担者：理化学研究所前田バイオ工学研究室・宝田 徹

研究分担者：理化学研究所前田バイオ工学研究室・藤田雅弘

1. 緒言

我々の研究グループでは、一本鎖 DNA がグラフトされた poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) の自己組織化を利用した DNA 担持ナノ粒子の構築法を確立してきた。二重鎖 DNA を表層に密生させたナノ粒子のコロイド安定性が、DNA 自由末端側の塩基対構造に明敏に応答することを初めて見出した。すなわち、自由末端に一塩基ミスマッチが存在すると、高濃度塩存在下でもナノ粒子は安定に分散しているのに対し、完全相補の場合、粒子は凝集してしまう。これは、DNA 密生相 (DNA ソフト界面) とバルクとの境界面における分子構造のわずかな変化が、マクロでダイナミックな特異現象を誘起していることを意味する。本研究では、DNA 鎖と PNIPAAm との共重合体 (DNA コンジュゲート) の自己組織化を利用した DNA 担持ナノ粒子の作製、ならびに DNA 末端塩基対構造に応答する特異なコロイド安定性のメカニズムの解明を目的とする。さらに、この特異現象に基づいた簡便かつ正確な遺伝子診断などの新規ナノバイオ素子の開発を行うことを目指す。本年度は、DNA 担持ナノ粒子の分散・凝集状態における構造解析の観点から特異な界面現象の解明を試みた。PNIPAAm の代わりに、疎水核として金ナノ粒子を用いたモデル実験を行うことで、大型放射光施設 (SPring-8) における溶液小角 X 線散乱法による測定系を構築することに主眼をおいた。

2. 研究経過

金ナノ粒子は直径 15 nm、40 nm のもの、修飾する DNA として 15、30、45 塩基のものを用いた。測定対象にしたのは、金ナノ粒子、一本鎖 DNA を担持した金ナノ粒子 (Au15-ssDNA15 など)、完全相補鎖で二重鎖形成させた金ナノ粒子 (Au15-dsDNA15 など) である。DNA 担持金ナノ粒子の場合、0.1 M NaCl を含む 10 mM PBS バッファー (pH 7.0) に分散させ、粒子の濃度は 1.0 OD に調製した。凝集状態は終濃度 1M NaCl 存在下で実現させた。溶液 SAXS 測定は、SPring-8 の BL45XU ビームラインにて行った。X 線の波長 (λ) は 0.09 nm である。カメラ長約 2,200 mm で CCD に 2-D SAXS パターンを記録した。すべての測定は室温にて行った。このときの SAXS パターン例を Fig. 1 に示す。NaCl 濃度が 0.1M の場合では、ss および dsDNA 担持金ナノ粒子の形状に由来する同心円状の散乱パターンが得られる。2-D SAXS パターンを円環平均することで得られる 1-D プロファイルのフィッティング解析の結果、粒径の多分散性を考慮した剛体球の理論散乱強度 (形状因子) とよく一致する。すなわち粒子は分散状態にある。ただし、疎水核である金ナノ粒子のみの形状因子でよく一致することから、DNA 密生相の構造情報は観測された散乱強度には含まれていないと考えられる。中性子小角散乱法との併用が必要と思われる。

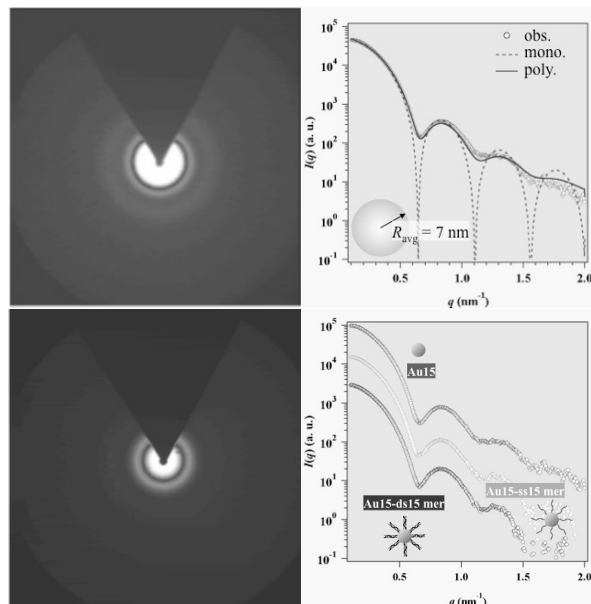


図 1. (a) 粒径 15 nm の金ナノ粒子の 2-D SAXS パターン. (b) 円環平均後のプロファイル. 青色実線が多分散性を考慮した理論散乱曲線. (c) 分散状態における Au15-dsDNA15 の 2-D SAXS パターン. (d) Au15、Au15-ssDNA15、Au15-dsDNA15 の SAXS プロファイルの比較.

NaCl 濃度が 1M の場合 (Fig. 2b)、分散状態の散乱パターンとは異なり、強度の大きい鋭いピークが観察される。これは、DNA 担持金ナノ粒子が X 線の回折を引き起こす間隔にまで接近している、つまり凝集していることを意味する粒子間干渉のピークである。凝集状態の SAXS 強度は金ナノ粒子の形状因子に粒子間干渉の情報(構造因子)を乗じたものに比例するので、凝集状態の SAXS データを分散状態の SAXS データで除することで構造因子を算出できる。Au15-dsDNA15 に対する構造因子を Fig. 2d に示す。構造因子のピークは、凝集構造が結晶様の秩序性を有することを意味するある規則性に従って位置しているが、ブロードでかなりの乱れを有することがわかる。そこでパラクリスタル理論に基づく散乱曲線とのフィッティングから構造因子を解析し、最近接粒子間距離などの構造パラメーターを抽出することにした。規則構造として面心立方格子 (FCC) を仮定した場合、構造因子と比較的良好一致をみた (Fig. 3)。全試料に対して抽出された最近接距離から金ナノ粒子の直径を差し引くことで表面間距離を求めた。DNA 塩基数に対して表面間距離をプロットした結果を Fig. 4 に示す。表面間距離は表層に密生している DNA の鎖長に応じて変化していることがわかる。

この粒子間距離をもとにすると、異なる粒子上の DNA 自由末端同士の会合状態を考察することが可能となる。もし表面間距離が固定化されている DNA 鎖長の 2 倍であれば、自由末端同士に何らかの相互作用が働いて DNA 担持ナノ粒子が凝集することになる。Fig. 4 中にある二つの実線は、B 型を仮定したときの塩基数に対する等倍ならびに 2 倍の DNA 鎖長を表している。いずれの表面間距離も中間状態にあり、自由末端同士の相互作用を積極的に支持するものではない。表面間距離は、また、DNA のグラフト密度にも依存しているようである。さらに粒径の大きい疎水核を用いた場合には、より近接する傾向にある。これらの傾向は凝集メカニズムを解明する上で重要な知見となりうることから、粒径や DNA 鎖長やグラフト密度などを変えた網羅的研究を遂行する予定である。また、PNIPAAm を疎水核とした系についても本格的な検討を行い、DNA 界面が示す特異性、あるいは普遍性などを追求したいと考えている。さらには、本領域内研究者と連携しながら、中性子散乱法による構造解析や原子間力顕微鏡を用いた相互作用解析も積極的に推進していきたい。

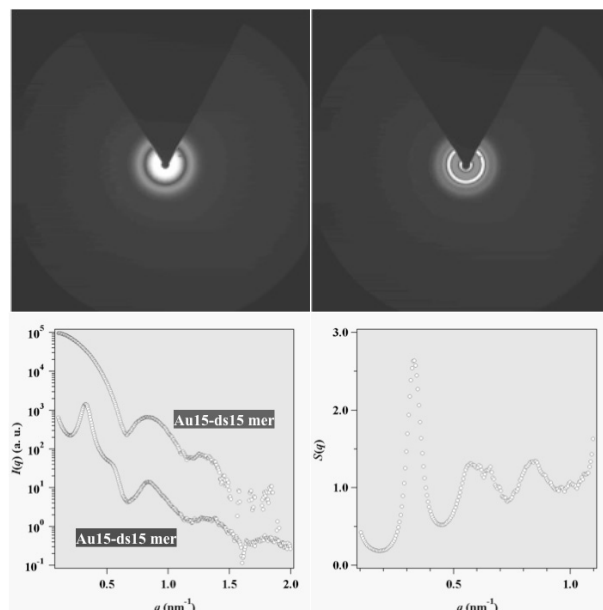


図 2. Au15-dsDNA15 の分散状態 (a) と 1M NaCl 存在下での凝集状態 (b) からの 2-D SAXS パターン. 円環平均後のプロファイル (c) とそれらから求まる構造因子 (d).

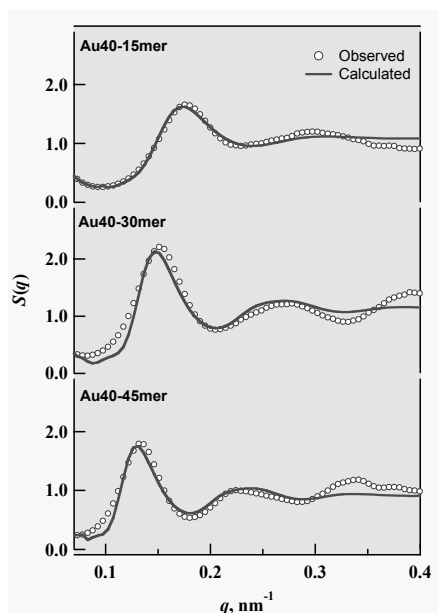


図 3. 1M NaCl 存在下での凝集状態における Au40-dsDNA15、-dsDNA30、-dsDNA45 の構造因子と理論散乱曲線。

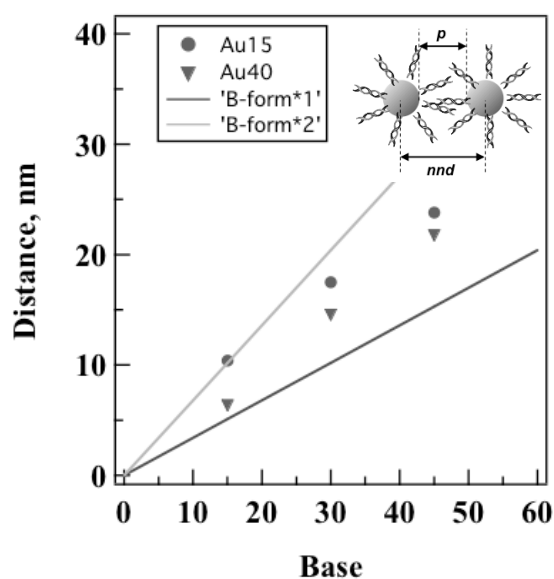


図 4. 粒子表面間距離 (p) と塩基数との関係。実線は、B 型 DNA を仮定したときの鎖長を表している。

Elucidation and application of sequence-specific phenomena of DNA-grafted nanoparticles

Mizuo Maeda, Tohru Takarada, and Masahiro Fujita
Bioengineering Laboratory, RIKEN
Hirosawa 2-1, Wako-shi, Saitama 351-0198
Phone: 048-467-9312, Fax: 048-462-4658, e-mail: mizuo@riken.jp

We have designed and constructed colloidal nanoparticles functionalized with DNA through self-assembly of poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)-*graft*-DNA. The nanoparticles aggregate upon hybridization of surface-anchored DNA with full-match complementary DNA at high salt concentrations, while the colloidal dispersion of the nanoparticle is stable for hybridization with single-base mismatched one. The reason of this stability, however, still remains unknown. This research group aims to design well-defined DNA conjugated polymers, and clarify the origin of the colloidal stability responding to base pair at the distal end of DNA. Furthermore, we will develop new nanobio-devices by taking advantage of the peculiar properties. In this year, the aggregation of the nanoparticles was studied by synchrotron radiation small-angle X-ray scattering (SAXS). Here, we used gold nanoparticles with DNA as a model sample, instead of the nanoparticles comprising PNIPAAm-*graft*-DNA, in order to establish the methodology of SAXS experiments.

Gold nanoparticles with the diameter of 15 and 40 nm and DNA with 15, 30, and 45 bases were used. The gold nanoparticles with DNA were suspended in 10 mM PBS buffer (pH = 7.0) including 0.1 M NaCl, and the concentration of the particles was about 1.0 OD. The solution SAXS measurements were carried out in the BL45XU beamline station of SPring-8 (wavelength: $\lambda = 0.09$ nm). Camera length was about 2,200 mm. All 2-D SAXS images were taken with a CCD camera at 25 °C. SAXS images of bared gold particles, gold particles with single-strand DNA and with double-strand DNA were diffused scattering patterns. The circularly averaged 1D profiles were well fitted with a theoretical scattering curve of polydispersed hard sphere, that is, the form factor of gold particle. This means that the nanoparticles are dispersed in the buffer.

The gold nanoparticles with double-strand DNA at 1M NaCl gave SAXS pattern with intense concentric rings. The scattering peaks arise from the interference between the particles, or aggregation. The information on aggregation state, structure factor, was derived from the SAXS profiles of aggregation and dispersion states. The structure factor was fitted with a theoretical curve by a paracrystal theory, assuming that the crystal lattice is face-centered cubic. From the curve fitting, the nearest-neighbor distances, resulting in the distances between the surfaces of gold nanoparticle, were estimated. It was found that the nearest-neighbor distance, the distance between the surfaces of particles increases with the length of double-strand DNA.

If there is an attractive force between the distal ends of double-strand DNA, the distance between the surfaces would be twice the length of the DNA. Assuming the double-strand DNA is B-form, the observed distances for all samples were shorter than the double length of DNA, deducing that double-strand DNAs overlap each other. Furthermore, the distance between the surfaces seems to depend on the graft density of DNA, and on the size of gold nanoparticle.

業績リスト

1. 原著論文

- 1) RAFT-generated Polyacrylamide-DNA Block Copolymers for Single-nucleotide Polymorphism Genotyping by Affinity Capillary Electrophoresis; Naoki Kanayama, Hideaki Shibata, Ayumi Kimura, Daisuke Miyamoto, Tohru Takarada, Mizuo Maeda, *Biomacromolecules*, 10, 805-813 (2009)
- 2) Simple and Rapid Colorimetric Detection of Cofactors of Aptazymes Using Noncrosslinking Gold Nanoparticle Aggregation; Atsushi Ogawa, Mizuo Maeda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 6517-6520 (2008)
- 3) Adsorption Characteristics of P(3HB) Depolymerase as Evaluated by Surface Plasmon Resonance and Atomic Force Microscopy; Nobuhiko Matsumoto, Masahiro Fujita, Tomohiro Hiraishi, Hideki Abe, and Mizuo Maeda; *Biomacromolecules*, 9, 3201-3207 (2008).

2. 著書・総説

- 1) DNA 担持ナノ粒子を用いるバイオ分析；宝田徹、前田瑞夫、化学フロンティア②⑩、89-93 (2009).
- 2) DNA 担持ナノ粒子が示す特異な界面現象；宝田徹、前田瑞夫、化学と教育、56、232-235 (2008).
- 3) ソフト界面で見られる不思議な現象；前田瑞夫、化学、63、40-45 (2008).

3. 会議発表

- 1) DNA Conjugate Polymers and Nanoparticles; Mizuo MAEDA, 14th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, 平成 21 年 2 月 16 日 (Utha, USA)
- 2) DNA 密生相が示す特異な界面現象の解明と応用；前田瑞夫、新学術領域研究「ソフトインターフェースの分子科学」第 1 回公開シンポジウム、平成 21 年 1 月 27 日 (東京)
- 3) DNA Nanomaterials for Biosensing; Mizuo Maeda, CNBI ナノバイオマテリアル国際シンポジウム、平成 20 年 11 月 18 日 (東京)
- 4) DNA 担持金ナノ粒子の凝集メカニズムの解析；藤田雅弘、片淵佳純、伊藤和輝、金山直樹、宝田徹、前田瑞夫、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008、平成 20 年 11 月 18 日 (東京)
- 5) DNA 二重鎖を担持した金ナノ粒子を用いる水銀 (II) イオンの簡便・迅速検出；金山直樹、宝田徹、前田瑞夫、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008、平成 20 年 11 月 18 日 (東京)

4. その他 (例えば特許など) なし

半導体／生体分子ナノ界面の構築と遺伝子トランジスタへの応用

研究代表者：(独) 物質・材料研究機構・宮原裕二

研究分担者：東京大学・松元亮

1. 緒言

我々はこれまで、電界効果トランジスタ (Field Effect Transistor、FET) 原理に立脚した種々のバイオセンサー開発に取り組んできた。¹⁻³ これは、シリコン表面の電荷密度がゲート絶縁膜近傍の電荷に鋭敏である性質に基づき、ゲート絶縁膜上で様々な分子認識反応を行わせ、生体分子や細胞の分子電荷の動態を解析するものである。⁴ この FET 法は、分子固有の電荷を直接の検出対象とする全くの非侵襲計測法であり、リアルタイム計測が可能で、レーザーや光学系が不要であるため小型化に有利であること、また半導体微細加工技術による高密度・超並列化が容易に行える点など、ハイスループットシステム化において求められる主要要件を潜在的に網羅したユニークな検出法といえる。我々はこれまでに、FET 原理に立脚した電位計測方式による遺伝子配列解析や遺伝子多型解析技術を世界に先駆けて提案・実証してきた。^{1,2}

一方、FET 法の最大の弱点の一つに、その短い検出距離制限が挙げられる。例えば、抗原・抗体のような巨大分子、また、40 塩基以上の比較的長鎖の DNA を検出対象とした場合には、その定量性が著しく低下する。これには溶液／ゲート絶縁膜界面の電気二重層の幅 (デバイ長) が関係している。抗体分子の典型的な大きさは約 10nm であるのに対し、生理的塩濃度溶液中でのデバイ長は 1nm 程度である。したがって、抗体をゲート絶縁膜表面に固定化した場合、溶液中の抗原は電気二重層の外で抗体と結合することとなり、その結果、抗原の電荷は対イオンにより遮蔽され、FET による検出は原理的に困難となる。

我々のグループでは、上述のようなデバイ長による検出距離の制限を克服して長鎖 DNA の検出を可能とする、いわば「信号伝達素子」としての動的ナノ界面の創出に取り組む。

平成 20 年度は、「スマートゲル」と呼ばれる刺激応答性の高分子ゲルを FET ゲート上へ化学的に修飾し、これを信号変換層として利用することで、デバイ長によらず生体分子を定量的に検出する手法について検討した。その中で、高分子ゲル／ゲート界面において化学刺激 (生体分子濃度) を電気刺激 (FET の電気特性変化) へと高効率に変換する動作機序を、実験、理論の両面から明らかにした。⁵

参考文献

- [1] T. Sakata, Y. Miyahara, *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, 22, 1311.
- [2] T. Sakata, Y. Miyahara, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2225.
- [3] A. Matsumoto, N. Sato, T. Sakata, K. Kataoka, Y. Miyahara, *J. Solid State Chem.*, **2009**, 13, 165-170.
- [4] P. Bergveld: *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **1970**, 17, 70.
- [5] A. Matsumoto, N. Sato, T. Sakata, R. Yoshida, K. Kataoka, Y. Miyahara, *Adv. Mater.*, **2009**, in press.
- [6] K. Kataoka, H. Miyazaki, M. Bunya, T. Okano, Y. Sakurai, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12694.
- [7] A. Matsumoto, S. Ikeda, A. Harada, K. Kataoka, *Biomacromolecules* **2003**, 4, 1410.
- [8] A. Matsumoto, T. Kurata, D. Shiino, Y. Murata, K. Kataoka, *Macromolecules* **2004**, 37, 1502.

2. 研究経過

著者らがこれまでに開発したフェニルボロン酸含有型グルコース応答性ゲル (NB10 ゲル) を FET ゲート表面に導入し、化学シグナルから体積相転移を経て電気シグナルに変換することにより“デバイ長フリー”に生体分子を検出可能なバイオ FET 作製法とその基本特性について検討した。水中において解離したフェニルボロン酸基化合物は、グルコースとの可逆的なコンプレックス形成能を有するため、これを体積相転移性的高分子ゲルネットワークに組み込んでグルコース濃度を変化させると、高分子ゲル内の

イオン浸透圧変化に同期した可逆的な体積相転移が引き起こされる。⁶⁻⁹ 一般に、高分子ゲルの膨潤過程は、(1) 溶質分子の高分子ネットワーク中への拡散、(2) 溶媒和に伴う高分子鎖の緩和、(3) 高分子鎖の溶媒中への拡散、という3つのステップにより進行するが、NB10 ゲルのグルコースに応答した過程においては(2)のステップが律速となった Case II transport (図1) と呼ばれるタイプのものであることが過去の研究から明らかになっている。⁸ Case II transport においては、ゲル表面から内部へ進行する水和した膨潤相と、ゲル内側の脱水収縮相との間に、明確な緩和界面 (Swelling front) が観測される。この Swelling front は一定速度でゲル内側へと進行し、これがゲルマトリックスの他端に達するか、他の Swelling front と遭遇することで消失し、次のステップ(3)を経て完全膨潤状態へと至る。

この NB10 ゲルにより FET のゲートを修飾する

ことで、デバイ長に規定されことなく、グルコース分子を検出できることが確認された (図2)。⁵ NB10 ゲルのような親水性アクリルアミドゲルの重量は殆どが水によるものであり、その膨潤度の変化は含水量の変化とほぼ同義とみなせる。ここで、水の比誘電率はおよそ 80 であるのに対し、凝縮 (収縮) 状態の高分子鎖のそれはおよそ 2-3 と著しく小さなものである。したがって、NB10 ゲル修飾ゲート FET における信号変換機序としては、ゲルマトリックス中への水流入による見かけの誘電率変化が重要な役割を担うものと考えられた。事実、NB10 ゲル薄膜の体積相転移前後での電気容量測定より、その比誘電率は十倍程度も変化することが確かめられた。⁵ このような見かけの誘電率変化による FET しきい値電圧変化に対する寄与を、FET の動作関数から定性的に説明することにも成功した。⁵ 分子の有する電荷の直接検出のみならず、体積相転移に伴う誘電率変化を検出パラメータとすることで、FET 法に依拠しながらも、グルコースのような電荷を持たない分子の検出をも可能としたことは今後の FET 法の適用範囲を飛躍的に拡張する点で特筆すべきものと言える。また、スマートゲルには、ここで取り上げたグルコース分子以外にも、様々なイオン種、抗原・抗体反応、癌腫瘍マーカー、DNA 配列などを特異的に認識するものも多数報告されており^{10, 11}、これらの検出系にも本法と同様に応用が可能であるものと考えられる。

- (1) 溶媒分子の拡散
- (2) 溶媒和による高分子網目の緩和
- (3) 高分子網目の溶媒中への拡散

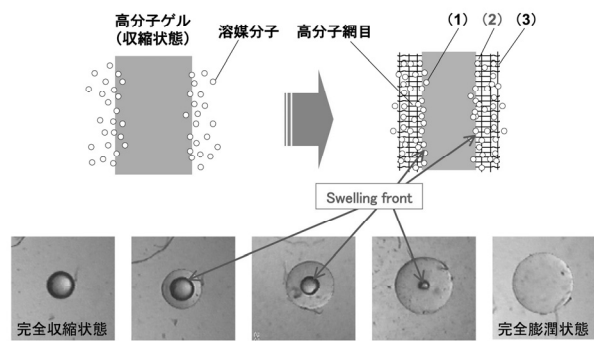


図1. NB10 ゲルの膨潤メカニズム。

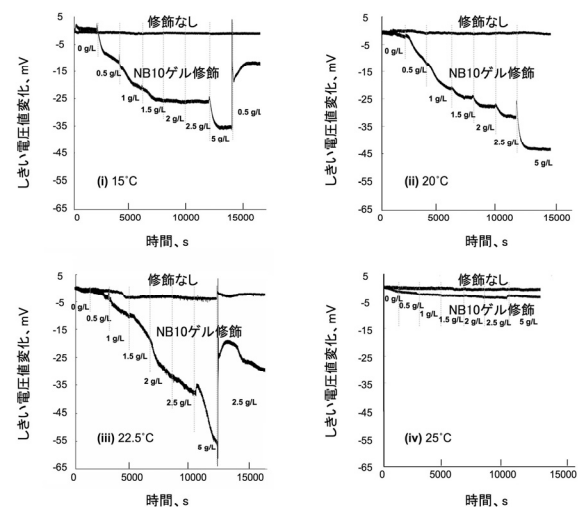


図2. NB10 ゲル修飾ゲート FET のグルコースに応答したしきい電圧値変化: (i) 15°C, (ii) 20°C, (iii) 22.5°C, (iv) 25°C.

参考文献

- [9] A. Matsumoto, R. Yoshida, K. Kataoka, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 1038.
- [10] T. Miyata, M. Jige, T. Nakaminami, T. Urugami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 766.
- [11] T. Miyata, N. Asami, T. Urugami, *Nature* **1999**, 399, 766.

Design of Semiconductor/Biology Nano-Interface for Development of Genetic Transistor

Yuji Miyahara¹ and Akira Matsumoto²

¹ Biomaterials Center and International Center for Materials Nanoarchitectonics,
National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-004, Japan,

² Center for NanoBio Integration, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku,
Tokyo 113-8656, Japan

Tel: +81-29-860-4506, Fax: +81-29-860-4714, E-mail: MIYAHARA.Yuji@nims.go.jp

Field effect transistor (FET) based technique provides an attractive detection platform, in which intrinsic molecular charges immobilized onto the FET gate surface can be transduced into electrical signals. Any molecular events involving charge density changes, by arranging them onto the gates surface, can directly be detected as a mode of modified characteristics of the FET as a result of electrostatic interactions between intrinsic molecular charges and the thin-insulator-segregated silicon electrons.

The major shortcoming of the technique derives from its susceptibility to counterions. In other words, FET-based charge detection is inherently permitted only within a short distance of the electrical double layer or “Debye length”, which could range up to several nanometers at most with minimized environmental ionic strength, leading to an upper-limit of the molecular weight for which quantitative charge detection can be feasibly performed.

Here we developed a unique way of exploitation of a stimulus responsive polymer gel enabling a FET-based, but nonetheless virtually “Debye length-free” universal molecular detection. The FET gate has been modified with a stimulus responsive polymer gel that is called “smart gel. As a key property of the volume phase transition of the smart gels, the property changes commencing from the gel/outer aqueous media interface can geometrically propagate across a macroscopic thickness of the gel layer.

The FET gate surface was modified with a glucose-responsive polymer gel so to obtain a “Debye length-free” glucose-sensitive FET. Phenylboronic acid based glucose-responsive polymer gel, NB10, which is a thoroughly synthetic and well-characterized glucose-responsive material originally developed by our group, was covalently introduced to the FET gate surface in the form of 50 nm thickness layer. Remarkably, the signal propagation has taken place despite the considerably large 50 μm gel thickness, a length several orders of magnitude larger than the theoretical Debye length. Also importantly, the present gel transition-based system has provided itself with an ability to detect an electrically neutral moiety such as glucose. Altered apparent permittivity of the gel due to the change in the swelling degree or the water content during the transition was identified experimentally as well as theoretically as a mode to modify electrical property of the FET, accomplishing a “Debye length-free” glucose detection.

Many other types of stimulus-responsive gels have been reported to which the present detection scheme should be readily and universally applicable. For example, polymer gels can be designed to perceive immunoreactions, tumor-specific biomarkers and DNA hybridizations. Further work is currently underway to address these possibilities.

業績リスト

1. 原著論文 (著者、タイトル、雑誌名、巻号、始めと終わりのページ、年号)

- 1) T. Sakata, Y. Miyahara, Direct transduction of allele-specific primer extension into electrical signal using genetic field effect transistor, *Biosensors and Bioelectronics* 22, 1311-1316, **2007**.
- 2) T. Sakata, Y. Miyahara, DNA Sequencing Based on Intrinsic Molecular Charges, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 2225-2228, **2006**.
- 3) A. Matsumoto, N. Sato, T. Sakata, K. Kataoka, Y. Miyahara, Glucose-sensitive Field Effect Transistor Using Totally Synthetic Compounds, *J. Solid State Electrochem.* 13, 165-170, **2009**.
- 4) A. Matsumoto, N. Sato, T. Sakata, R. Yoshida, K. Kataoka, Y. Miyahara, Chemical to Electrical Signal Transduction Synchronized with Smart Gel Volume Phase Transition, *Adv. Mater.* **2009**, *in press*.
- 5) A. Matsumoto, S. Ikeda, A. Harada, K. Kataoka, Totally Synthetic Glucose Responsive Polymer Bearing a Novel Phenylborate Derivative as a Glucose-sensing Moiety Operating at Physiological pH Conditions, *Biomacromolecules* 4, 1410-1416, **2003**.
- 6) A. Matsumoto, T. Kurata, D. Shiino, Y. Murata, K. Kataoka, Swelling and Shrinking Kinetics of Totally Synthetic, Glucose-responsive Polymer Gel Bearing Phenylborate Derivative as a Glucose-sensing Moiety, *Macromolecules* 37, 1502-1510, **2004**.
- 7) A. Matsumoto, R. Yoshida, K. Kataoka, Glucose Responsive Polymer Gel Bearing Novel Phenylborate Derivative as a Glucose-sensing Moiety Operating at Physiological pH Conditions, *Biomacromolecules* 5, 1038-1045, **2004**.
- 8) T. Sakata, A. Matsumoto, Y. Miyahara, Bio-transistor for Genetic Analysis, *Function and Materials* 22, 25-34, **2007**.
- 9) Y. Miyahara, T. Sakata, A. Matsumoto, C. Kataoka, Detection of Biomolecular Recognition Using Biotransistor, *Chemical Sensors* 24, 118-120, **2008**.

2. 著書・総説

- 1) 松元亮、宮原裕二「バイオトランジスタを用いた生体分子検出チップ」(NTS Inc.) , バイオチップ実用化ハンドブック, *in press*.
- 2) 松元亮、宮原裕二「糖尿病治療に向けたインテリジェント型インスリン除法制御高分子材料の開発」(シーエムシー出版) , *Bio industry*, **2009**, 26(2), 65-71.
- 3) 松元亮、宮原裕二「スマートゲルを用いた動的界面ゲートバイオトランジスタ」、「高分子技術者のためのソフトマター入門」(丸善株式会社)、*in press*.
- 4) Yuji Miyahara, Toshiya Sakata, and Akira Matsumoto, “genetic analysis based on field effect transistors”, in “principle of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems”, by Springer Science + Bussiness Media. LCC. (**2008**) 14, 311-377.

3. 会議発表

NanoBio-Seoul 2008、Materials Research Society Fall Meeting 2008、International Symposium on Molecular and System Life Sciences、つくば医工連携フォーラム 2009、第7回ライフサイエンスシンポジウム、Korea-Japan Joint Symposium 2009; Biomaterials and Regenerative Medicine-II、第5回ナノバイオシンポジウム、MANA International Symposium 2009、東京大学ナノバイオ・インテグレーション研究拠点シンポジウム、Workshop between NIMS and Moscow State Univ.、日本化学会第89回春季年会、The 5th International Conference On Microtechnologies In Medicine And Biology など。

4. その他

日経産業新聞掲載(片岡一則、松元亮)「血中糖濃度に合わせ放出(東大が糖尿病治療技術)」(2008. 7. 31)
NanoBio Seoul Poster Award 受賞 (松元亮) (2008. 10. 31)

リガンド固定化相と細胞表面で形成されるソフト界面での動的現象の評価と応用

研究代表者：国立循環器病センター研究所 生体工学部・山岡 哲二

研究分担者：国立循環器病センター研究所 生体工学部・馬原 淳

1. 緒言

ソフト界面で起こるダイナミックな現象の1つに細胞ローリングがある。たとえば白血球は、糖鎖とセレクチンとの連続的な相互作用により、血管内壁をローリングすることで炎症部位へと集積する。この特異的な集積メカニズムは、細胞ローリング現象によるものである。本研究では、リガンド修飾したソフト界面上で起こる細胞のローリング現象を詳細、かつ動的に解

析し、その特性ゆえに発揮される機能を、新たなバイオマテリアル開発へと応用する。これまでに、シリコンチューブに対して、ポリアクリル酸のグラフト鎖を導入したリガンド固定化ソフト界面を構築し、この界面を用いた新たな細胞分離マテリアルを開発した。こ

れは、幹細胞表面レセプターに対する抗体をソフト界面へ固定化することにより、組織幹細胞をこのソフト界面上で分離できるものである (Figure 1)。こ

の分離メカニズムは、ソフト界面に固定化された抗体と細胞表面レセプターとの連続的な相互作用によるものである。このことから、ソフト界面上でのリガンド分子の固定化構造やその密度は、細胞の分離精度に大きく影響する。本年度は、幹細胞を効率的に分離するための新たなソフト界面の検討と、この界面上における組織幹細胞の分離挙動について検討した。

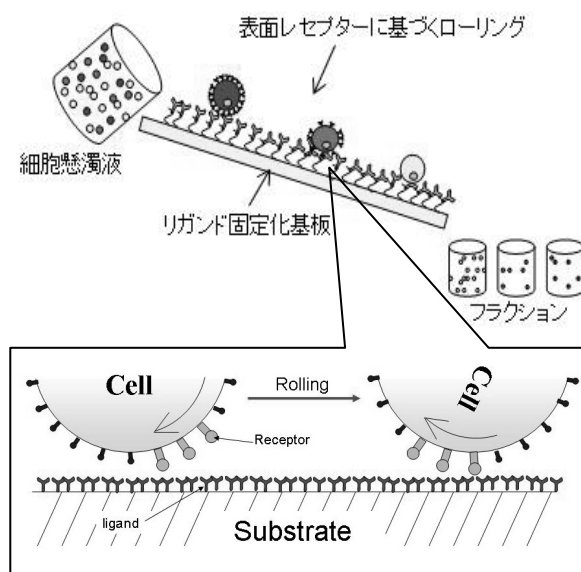


Figure 1 Cell separation mechanisms on ligand-immobilized surface.

2. 研究経過

これまでに開発した抗体固定化ソフト界面は、シリコンチューブ表面にポリアクリル酸のグラフト鎖を導入し、この側鎖に対して抗体を共有結合させたものを用いてきた。この構造は、グラフト鎖に多くの抗体が結合できる為、高密度な抗体固定化が達成できる。さらに、界面上に導入された高分子側鎖に対してリガンドである抗体を固定化するため、高分子鎖の運動性による抗体の高いモビリティが期待でき、ソフト界面の構築にきわめて有効な手段であると考えている。しかし一方で、活性化したシリコンチューブ界面でのグラフト重合による高分子鎖の導入法では、高分子鎖の密度や鎖長を精密に制御することは難しい。すなわち、側鎖へと固定化される抗体固定化密度やその量を厳密にコントロールすることができないため、ソフト界面上におけるこのような因子の影響を評価するためには別のアプローチが必要である。そこで本年度は、界面における抗体固定化量とその密度をコントロールできる新たな手法として、シランカップリング剤を用いたガラス表面での界面構築と、細胞分離挙動について検討した。

ガラス表面に対するリガンド固定化法として、シランカップリング剤を用いた官能基導入による手法を用いた。まず、リガンドとなる抗体を固定化する為、3-Aminopropyltriethoxysilane によりアミノ基を導入した。X 線光電子分光法 (XPS) により、ガラス表面へのシランカップリングの導入について検討した。その結果、深さ方向の解析において表面から 16nm の範囲でのみ 400 eV 付近にアミノ基由来の XPS シグナルを検出した (Figure 2)。また、接触角の解析でも、シランカップリング処理後において接触角が 35 °C から 65 °C へと変化していることが示された。このことから、単層で官能基が導入されていることを確認した。さらに、蛍光標識抗体をシランカップリング処理ガラスチューブ内に固定化した結果、チューブ内腔に固定化された抗体由来の蛍光シグナルを確認することができた (Figure 3)。以上のことから、単層でリガンドとなる抗体を均一に固定化されたソフト界面を構築することができた。

作製した抗体固定化ガラスチューブを用いて、この界面上における間葉系幹細胞の分離挙動を検討した。まず、マウス的大腿骨から骨髓細胞を採取して、培養皿に接着する細胞分画を間葉系幹細胞 (MSC) として分離した。その細胞懸濁液を crude MSC として、作製したガラスチューブにより精製した。固定化するリガンドとして抗マウス CD34 抗体を選択した。ガラス内腔における抗体の固定化密度を算出するために、CD34 抗体に対するペルオキシダーゼ標識 2 次抗体で標識し、基質の発色を分光器により定量することで算出した。その結果、固定化量は、 $12 \mu\text{g}/\text{m}^2$ であり、グラフ鎖に固定化した場合と比較して、20 倍程度低いことが判明した。次に、このガラスチューブを用いて細胞懸濁液の分離をおこなった。 $2 \times 10^4 \text{ cells}/\text{ml}$ の crude MSC をレオダイナ製のインジェクターにより導入し、リン酸緩衝液の液流により界面上に細胞を流した。溶出した細胞フラクションを $12.5 \mu\text{l}$ ずつ採取し、溶出量をプロットしたのが Figure 4 となる。その結果、抗体が固定化されることで溶出時間が遅延する細胞ポピュレーションが示された。これは、ソフト界面上でのリガンドと表面レセプターとの相互作用によるものと考えられる。今後、この界面により精製された細胞の分化挙動を検討することで分化挙動が異なる MSC ポピュレーションの存在を明らかにできるものと期待される。

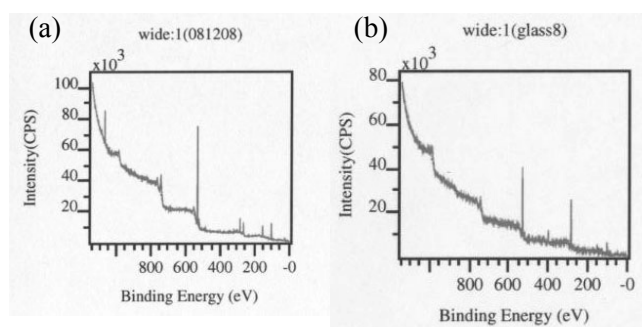


Figure 2 Surface analysis of (a) non-coated glass and (b) 3-aminopropyltriethoxysilane-coated glass by XPS.

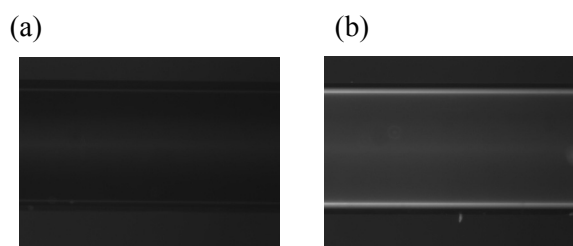


Figure 3 Fluorescent image of (a) IgG-FITC antibody unmodified and (b) modified column.

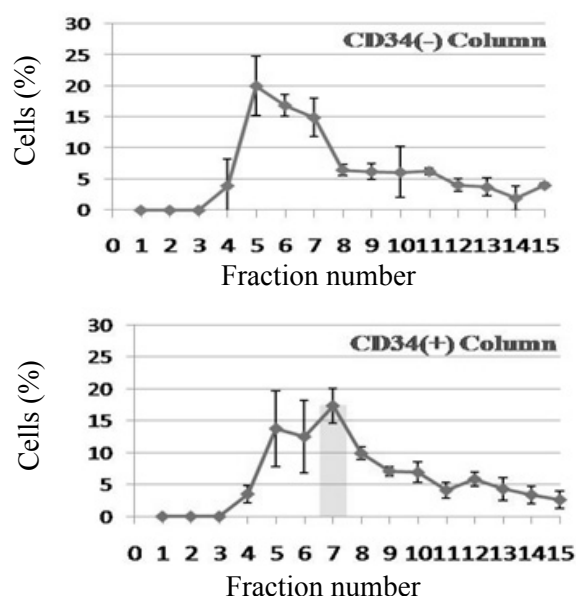


Figure 4 Elution pattern of MSCs on antiCD34 antibody-immobilized glass column.

Evaluation and Application of Dynamic Motion on Soft Interface
Between Immobilized Ligand and Cell Surface

Atsushi Mahara and Tetsuji Yamaoka

Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center

National Cardiovascular Center Research Institute

5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565

Tel: 06-6833-5012 (ext2637), Fax: 06-6835-5476, E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

Cell rolling is dynamic interaction between soft interfaces and cell surface. Accumulation of leukocyte in inflammation response is derived from specific interaction between selectin on endothelial cells and leukocyte surface. This process is called by leukocyte cell rolling. In this project, dynamic motion of cell rolling process on soft interface was analyzed, and the property was applied for novel biomaterials design. In recent study, we develop the antibody-immobilized surface for the cell separation based on cell rolling process. AntiCD34 antibody-immobilized surface of silicone tube was constructed as soft interface and mesenchymal stem cells (MSCs) was rolled on the surface. As the results, rolling cells on the surface was dynamically interacted with the immobilized antibody, and specific cell populations were isolated. Therefore, chemical structure and its density of immobilized ligand were largely affected with the cell separation profile. Silane coated glass surface was investigated for the novel ligand-immobilized surface, and elution profile of MSCs using this interface was evaluated.

Silane coupling agents is used for the surface modification of glass surface, because functional group is flexibly introduced on the glass surface as single layer. At first, glass surface was treated with 3-aminopropyltriethoxysilane/MeOH solution. To investigate a chemical structure of the surface, component of the surface elements were analyzed using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). As the results, XPS signal of amine group was detected at 400 eV during the 16nm depth area. Contact angle of silane coated glass surface was changed to 65 degrees from 35 degrees of non-coated glass surface. Next, fluorescence-labeled antibody was immobilized on the silane treated surface of glass, and its surface was monitored using fluorescence microscopy. Fluorescence signal derived from the immobilized antibody was uniformly observed on the glass surface. From these results, antibody-immobilized interface could be constructed on the glass surface.

We apply this interface for the MSCs separation. Bone marrow was acquired from femur of C57BL6 mice, and adherent cells on plastic culture dish of bone marrow were isolated as crude MSCs. AntiCD34 antibody-immobilized glass tube was prepared as separation column for crude MSCs. The crude MSCs was flushed into the column, and eluted cells suspension of 12.5 μ L from end of the column were fractionated. After the separation, eluted cell number was counted. When crude MSCs was flushed into unmodified column, a lot of cells were eluted in fraction 5 and 6. However, the delayed cell population was observed when the cells injected into the antibody-immobilized column. These results suggested that the cells in delayed fraction interacted with the immobilized antibody of the surface.

業績リスト

1. 著書・総説

- 1) 馬原 淳・山岡哲二『幹細胞分離法とポピュレーション解析』、次世代医療のための高分子材料工学、p168-177、2008
- 2) 馬原 淳『幹細胞分離カラムの開発』、バイオマテリアル<生体材料>、26巻、第4号、p276-281、2008

3. 会議発表

- 1) 馬原 淳・岡田 華奈・森反 俊幸・山岡 哲二、“抗体固定化界面を用いた細胞分離と機能評価”、第57回高分子討論会
- 2) 馬原 淳・岡田 華奈・森反 俊幸・山岡 哲二、“リガンド固定化界面を利用した組織幹細胞分離法の開発”、生体医工学シンポジウム 2008
- 3) 馬原 淳・岡田 華奈・森反 俊幸・山岡 哲二、“リガンド固定化流路による幹細胞サブポピュレーションの分離”、バイオマテリアル学会シンポジウム 2008
- 4) 馬原 淳・岡田 華奈・森反 俊幸・山岡 哲二、“細胞移植治療における幹細胞分離基材の開発”、第46回日本人工臓器学会大会
- 5) Atsushi Mahara and Tetsuji Yamaoka, “Direct separation of stem cell subpopulations on a novel ligand-immobilized column”, The TERMIS-NA 2008 Annual Conference & Exposition
- 6) 馬原 淳・岡田華奈・森反俊幸・山岡哲二、“リガンド固定化界面で分離された間葉系幹細胞の分化能評価”、第8回日本再生医療学会総会

2009 年 5 月 15 日発行

文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究（研究領域提案型）

「ソフトインターフェースの分子科学」

領域代表者：

独立行政法人理化学研究所

前田バイオ工学研究室・主任研究員

前田 瑞夫

e-mail softinterface@jmcjp.com

URL <http://www.riken.jp/soft-kaimen>

〒305-8573 茨城県つくば市天王台 1-1-1

筑波大学数理物質科学研究科

新学術領域研究事務局（担当：長崎 幸夫）

TEL: 029-853-5749 FAX: 029-853-5749
