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２２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

計画研究代表者　A01　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 ･･･ 5
「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 ･･･ 9
「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　　九州大学 ･･･ 13
「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」

計画研究代表者　A02　ソフト界面の解析「ソフト界面を探る」

北野　博巳　　富山大学 ･･･ 17
「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 ･･･ 21
「ソフトインターフェースの高分子鎖構造直接観察と解析」

栗原　和枝　　東北大学 ･･･ 25
「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 ･･ 29
「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 ･･･ 33
「高分子イオン密生ソフト界面のナノ構造と機能の相関」

計画研究代表者　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 ･･･ 37
「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 ･･･ 41
「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
−アクティブに非特異的吸着を抑制する材料表面の設計−

前田　瑞夫　　理化学研究所 ･･･ 45
「ＤＮＡ密生相が示す特異な界面現象の解明と応用」

宮原　裕二　　東京医科歯科大学 ･･･ 49
「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 ･･････････････････････････････････ 53
「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」

公募研究代表者　A01　ソフト界面の創成「ソフト界面を創る」

岩﨑　泰彦　　関西大学 …… 57
「脂質流動界面のアレイ化と分子認識」

岸村　顕広　　東京大学 …… 61
「水中での高分子の自発的集合化に基づく動的界面の創製とその機能・メカニズム解析」

吉川　佳広　　産業技術総合研究所 …… 65
「バイオリソグラフィー手法の開発と表面加工への展開」

小山　靖人　　東京工業大学 …… 69
「インターロック構造を基盤とするソフト界面の新接着法」

陣内　浩司　　京都工芸繊維大学 …… 73
「高分子ブロック共重合体薄膜における２重らせんシリンダー構造の配向制御」

遊佐　真一　　兵庫県立大学 …… 77
「pH応答性インターフェースを持つ架橋ポリマーソームの創成」

渡邉　順司　　甲南大学 …… 81
「高速親水化ソフト界面が構築できるポリマーの創製と分子インプリンティング法への応用」

公募研究代表者　A02　ソフト界面の解析「ソフト界面を探る」

青木　裕之　　京都大学 …… 85
「単一分子検出による界面/薄膜における高分子鎖の物性解析」

魚崎　浩平　　物質・材料研究機構 …… 89
「時間分解振動分光法によるソフトマター界面構造の速度・分子論的追跡」

尾崎　幸洋　　関西学院大学 …… 93
「チップ増強ラマン散乱法による高分子超薄膜の相分離機構の研究」

珠玖　　仁　　東北大学 …… 97
「ダイナミックな細胞内外輸送現象の１細胞定量解析法」

瀧上　隆智　　九州大学 …… 101
「ソフト界面における自発的多重膜形成」

田中　敬二　　九州大学 …… 105
「ソフト界面における動的構造解析法の確立と界面拡散現象解明への展開」

塚原　剛彦　　東京工業大学 …… 109
「ＮＭＲによるソフト界面間隙の液相分子クラスターの分子構造とダイナミクス解析」

野々村　美宗　山形大学 …… 113
「小腸壁における脂質吸収プロセスのモデリング」

山本　雅博　　甲南大学 …… 117
「界面の分子スケールでの局所電気二重層効果による酸化還元反応速度の理論解析」

公募研究代表者　A03　ソフト界面の機能「ソフト界面を活かす」

青木　　寛　　産業技術総合研究所 ･･･ 121
「固液界面での分子ダイナミクスに基づく電気化学的な自己報告型遺伝子検出デバイス」

小柳津　研一　早稲田大学 ･･･ 125
「ラジカルポリマーゲルを用いた超高速電荷輸送ソフト界面の構築」

芹澤　　武　　東京大学 ･･･ 129
「高分子結合性ペプチドを用いた機能性ソフト界面の創製」

久本　秀明　　大阪府立大学 ･･･ 133
「生体分子複合固定ソフト界面に基づく増幅・濃縮型高感度イムノアッセイデバイスの開発」
～等電点電気泳動（IEF）濃縮型高感度イムノアッセイキャピラリーの開発と
マルチ IEF デバイスの試作～

松崎　典弥　　大阪大学 ･･･ 137
「細胞界面のナノ構造制御による機能性ハイブリッド組織の創製」

横山　昌幸　　東京慈恵会医科大学 ･･ 141
「高分子ミセルキャリヤーの免疫原性制御のためのインターフェース設計」

吉野　知子　　東京農工大学 ･･･ 145
「NSポリペプチドの特性解析と細胞磁気ラベリングへの応用」

和田　健彦　　東北大学 ･･･ 149
「生体高分子を足場とするソフトインターフェースを活用した超分子不斉光反応系の創製」

ソフトインターフェースの分子科学

総括班

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

平成22年度は、第４回、第５回の計2回の公開シンポジウムを行った。第４回公開シンポジウム（国立循環器病研究センター（7月1日））では、研究成果の発信に加え、関連分野の研究者を講師として招聘し講演をしていただくことで交流を深めた。また非公開の研究成果発表（領域会議）もあわせて行い、領域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った。第５回の公開シンポジウム（東京理科大学（2月3日、4日））では、公募研究グループの成果発信を中心に催された。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。総括班中心メンバーによる計２回の運営会議では、領域としての活動方針の策定を昨年度に引き続き行った。特に本年度は、「界面と水」をテーマにした勉強会（九州大学（8月10日、11日））や、共同研究促進を目的とした各領域メンバーの研究手法等を習得する「研修コース」（次頁参照）を企画運営した。

さらに本年度は、高原、栗原、前田らが中心となり、環太平洋国際化学会議 Pacifichem2010（ホノルル）において「ソフト界面の化学と物性・機能」に関する国際シンポジウムを企画・運営した。本領域メンバーからも数多く発表を行うことで、国外へ研究成果をアピールしたことに加え、米国、カナダ、オーストリア、中国、韓国など数多くの海外研究者らとの交流を深めることができた。

本年度は中間評価を受ける年にあたり、領域全体として「A （研究領域の設定目的に照らして、期待どおりの進展が認められる）」という評価を得た。研究領域内での個々の共同研究の推進、機能的な研究者間の連携、研究成果の公表、シンポジウムやワークショップの開催、書籍出版等に関する活動、さらには、若手研究者のための新しいスタイルの研修コースを設立し、若手研究者の育成を含め、将来展望を柱とした運営に関して　総括班の取り組みが評価された。

総括班活動記録

＜運営会議＞

第８回：国立循環器病研究センター（大阪府吹田市）：2010年7月1日

第９回：東京理科大学森戸記念館（東京都新宿区）：2011年2月3日

＜領域会議＞

第５回：国立循環器病研究センター（大阪府吹田市）：2010年7月2日

＜公開シンポジウム＞

第４回：国立循環器病研究センター（大阪府吹田市）：2010年7月1日

（内容）

領域代表あいさつ：前田瑞夫

研究報告「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」：高原淳

研究報告「表面力・共振ずり測定によるソフト界面の特性評価」：栗原和枝

特別講演「リビングラジカル重合による精密表面設計ー濃厚ポリマーブラシ系の実現」：
辻井敬亘（京都大学）

研究報告「ブロック共重合体を用いたナノドメイン構造表面における細胞初期接着挙動」：高井まどか

研究報告「界面における抗体とPEGのふるまい」：長崎幸夫

研究報告「DNA密生相が示す特異な界面現象の解明と応用」：前田瑞夫

第５回：東京理科大学森戸記念館（東京都新宿区）：2011年2月3日、4日

（内容）

研究報告「NSポリペプチドの特性解析と細胞磁気ラベリングへの応用」：吉野知子

研究報告「高分子ミセルキャリヤーの免疫原性制御のためのインターフェース設計」：横山昌幸

研究報告「高分子結合性ペプチドを用いた機能性ソフト界面の創製」：芹澤武

研究報告「ラジカルポリマーゲルを用いた超高速電荷輸送ソフト界面の構築」：小柳津研一

研究報告「固液界面での分子ダイナミクスに基づく電気化学的な自己報告型遺伝子検出デバイス」：青木寛

研究報告「生体高分子を足場とするソフトインターフェースを活用した超分子不斉光反応系の創製」：
和田健彦

研究報告「細胞界面のナノ構造制御によるハイブリッド血管組織の創製」：松崎典弥

研究報告「生体分子複合固定ソフト界面に基づく増幅・濃縮型高感度イムノアッセイデバイスの開発」：
久本秀明

研究報告「小腸壁における脂質吸収プロセスのモデリング」：野々村美宗

研究報告「ＮＭＲによるソフト界面間隙の液相分子クラスターの分子構造とダイナミクス解析」：塚原剛彦

研究報告「ソフト界面における動的構造解析法の確立と界面拡散現象解明への展開」：田中敬二

研究報告「ダイナミックな細胞内外輸送現象の１細胞定量解析法」：珠玖仁

研究報告「カーボンナノチューブを含むポリマーナノコンポジットのラマンスペクトル」：尾崎幸洋

研究報告「振動分光法によるソフトマテリアル表面の構造と機能のその場評価」：魚崎浩平

研究報告「単一高分子鎖の直接観察に基づく高分子ダイナミクスの評価」：青木裕之

研究報告「ソフト界面における自発的多重膜形成」：瀧上隆智

研究報告「光二量化反応でコアを架橋したpH応答性高分子ミセルの合成」：遊佐真一

研究報告「高分子ブロック共重合体薄膜における２重らせんシリンダー構造の配向制御」：陣内浩司

研究報告「バイオリソグラフィー手法の開発と表面加工への展開」：吉川佳広

研究報告「インターロック構造を基盤とするソフト界面の新接着法」：小山靖人

研究報告「水中での高分子の自発的集合化に基づく動的界面の創製とその機能・メカニズム解析」：岸村顕広

研究報告「脂質流動界面のアレイ化と分子認識」：岩**﨑**泰彦

＜国際会議＞

Chemistry and Functional Properties of Soft Interfaces, PACIFICHEM2010 (Honolulu, Hawaii, USA) ：2010年12月15、16、18日

＜ワークショップ＞
テーマ「ソフト界面と水」：九州大学箱崎キャンパス（福岡市東区）：2010年8月10日、11日
（内容）
「生体材料表面の設計と評価」：望月明（東海大学）
「高分子表面のシュミレーション」：森田裕史（産総研）
「食品と水」：村勢則郎（東京電機大）
「流体／水界面におけるプルフルオロアルカン-α,ω-ジオールの分子配向と多重膜形成」：
瀧上隆智（九州大学）
「水界面における高分子の凝集状態と熱運動性」：田中敬二（九州大学）
「MPCポリマーと水」：石原一彦（東京大学）
「生体高分子と水」：北尾彰朗（東京大学）
「ポリ(アクリル酸メトキシエチル)と水」：田中賢（山形大学）
「生体-高分子ー水」：安中雅彦（九州大学）
—ポスターセッション—

＜研修コース＞
「ラマン分光法による表面測定法」（関西学院大学 尾崎研究室）：2010年8月25日
「和周波発生（SFG）分光法による固/液界面計測」（(独)物質・材料研究機構 魚崎研究室）：2010年8月23日
「表面力・ずり測定法」（東北大学 栗原研究室）：2010年8月16日～18日
「ナノインプリンティングと表面濡れ性評価」（九州大学 高原研究室）：：2010年8月9日

＜ニュースレター発行＞
Vol.5：平成 22 年 9 月 10 日、Vol.6：平成 23 年 3 月 31 日

計画研究代表者　A01

ソフト界面の創成　「ソフト界面を“創る”」

温度応答性ソフトインターフェースの創成と生体分子認識制御

研究代表者：東京理科大学基礎工学部材料工学科・菊池明彦

１．緒言

クロマトグラフィー法は種々の化合物などの分離・分析に重要な手法として広く応用されている。一方で、生体由来分子、特にタンパク質や細胞などとの相互作用を制御する表面（担体）は、タンパク質の変性や、細胞の生存率を維持するために水系で用いられることがきわめて重要である。我々は、基材表面に水溶性感温性高分子をグラフトしたソフトインターフェースを構築し、温度変化に伴う界面の物性制御とともに生体分子との相互作用を制御する新しい基材設計を進めている。

本研究では、温度変化に応答して水への溶解性の変化するポリ（*N*-イソプロピルアクリルアミド）(PIPAAm)を修飾したソフト界面の調製とその物性解析、ならびに生体分子の相互作用解析を系統的に検討することを目的としている。PIPAAm は水中 32℃を境に、低温で溶解する一方、それ以上の温度では、側鎖イソプロピル基周囲の疎水性水和していた水分子のエントロピーの増大に伴って脱水和する結果、水に不溶となることが知られている。PIPAAm とその誘導体を固体表面に導入すると、その界面は転移温度よりも低温でグラフト鎖が水和・伸展して親水性のソフト界面を構築する一方、転移温度以上では、PIPAAm 鎖の脱水和に伴う凝集変化が起こりより疎水的な表面へと変化する、感温性ソフト界面を構築できる。

本年度の研究では、比較的鎖長を制御できる原子移動ラジカル重合法（ATRP）を適用し、界面開始 ATRP により、疎水化感温性高分子の導入とその界面物性制御、ならびに生体分子との相互作用を解析することを目的とし、研究を推進した。このために H22 年度は、特にフューズドシリカキャピラリー内腔表面に疎水性コモノマー共存下で、重合条件を制御しながら表面開始 ATRP を行い P(IPAAm-*co*-butyl methacrylate (BMA)) を導入した。各表面とステロイド類との相互作用の解析を行い、表面 P(IPAAm-*co*-BMA)層の温度変化に応答した水和・脱水和変化に伴う表面の疎水性化をステロイド類の保持挙動から検討した。

２．研究経過

(1)<u>P(IPAAm-co-BMA)修飾キャピラリーの調製</u>:内径 100μm のフューズドシリカキャピラリー内腔表面に、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 開始剤固定表面を調製した。この表面上で、所定量のモノマー（IPAAm、BMA）と、CuCl、tris(2-*N,N*-dimethylamino)ethyl)amine (Me_6TREN) を溶解した *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)溶液を 25℃でシリンジポンプを用いて連続的に通液し、IPAAm、BMA の共重合を表面開始 ATRP によって行った。このとき仕込みモノマー濃度を 1.0～2.5M に変化させて種々ポリマー修飾キャピラリーを調製した。重合時間は 6 時間で一定にした。反応後キャピラリー内部を十分洗浄した。

<u>ポリマー修飾キャピラリーと生体分子との相互作用解析方法</u>：調製したポリマー修飾キャピラリーをミクロ HPLC システム（ミクロ LC21、日本分光製）に接続し、所定温度に設定した恒温水槽中でカラム温度を制御した（±0.1°C）。このキャピラリー内に、種々疎水性度の異なるステロイド水溶液をカラム内に注入し、カラム温度変化に伴うステロイドの保持挙動（保持時間、溶出量変化等）から、キャピラリー内表面に修飾したポリマーと生体分子との相互作用の解析を行った。

(2)<u>P(IPAAm-co-BMA)修飾キャピラリーと生体分子との相互作用</u>

疎水性度の異なるステロイド分子として、コルチゾン(cor: log*P*1.47)、酢酸ヒドロコルチゾン(hca: log*P*2.30)、ならびにテストステロン(tes: log*P*3.32)を用いた。対照として、親水性化合物であるアデノシン(ade: log*P*-1.10)を基準物質に用いた。ここで、log*P* 値は、1-オクタノールと水に対する各化合物の分配係数 *P* の対数値である。モノマー濃度を 1.0～2.5M に変化させたとき、ホモポリマーである PIPAAm と P(IPAAm-*co*-BMA)とでステロイドの保持係数(=各温度でのステロイドの保持時間/親水性のアデノシンの保持時間)の変化を比較したところ、共重合体修飾表面において、重合時のモノマー濃度が低くても疎水

性ステロイドと比較的強い相互作用を示し、保持係数が大きな値をとることが明らかとなった。さらにモノマー濃度が高くなるほど特にテストステロンの保持係数の増大が顕著となった。一方、キャピラリー長を20cm から 100cm の間で変化させ 40℃におけるテストステロンの保持係数を算出すると、図 1 に示すように、BMA を共重合した P(IPAAm-*co*-BMA)表面でキャピラリー長に伴う保持係数変化の傾きが大きくなり、P(IPAAm-co-BMA)表面とテストステロンの相互作用がより大きくなっていた。これは、40℃で BMA を含む共重合体修飾表面が PIPAAm ホモポリマー表面と比較して大きな疎水性を有し、疎水性化合物であるテストステロンと大きな疎水性相互作用をした結果と考えられた。

次に、モノマー濃度 2M で、BMA1mol%の条件で ATRP による共重合を行ったキャピラリーと、PIPAAm キャピラリーカラムを用い、温度変化に伴う種々ステロイドの保持係数の変化を Fig. 2 に示した。PIPAAm では、20℃から 30℃の間で保持時間が大きく変化したが、P(IPAAm-*co*-BMA)では、PIPAAm に比してより低温から疎水性ステロイドの相互作用が起こっていることがわかる。

さらに、コルチゾンとテストステロンの混合溶液をサンプルに用い、PIPAAm と P(IPAAm-*co*-BMA)とで温度変化に応答した溶出挙動を調べた。PIPAAm では 20℃のとき、コルチゾンとテストステロンのピーク分離はほとんどできず、わずか 0.33 分のみの差が見られたのに対し、P(IPAAm-*co*-BMA)の場合では、同じ 20℃で両者のピーク分離が見られ、ピークトップでの保持時間の差は 0.8 分であった。P(IPAAm-*co*-BMA)では、より低温で生体分子との相互作用が生起することを示しており、このことは、熱変性の可能性のある生理活性物質の分離をより低温で行うことができることを示しており、興味深い。

今後は、タンパク質等の分離を検討するとともに、分光学的手法等を用いることにより、水中での表面の物性解析を行っていく予定である。

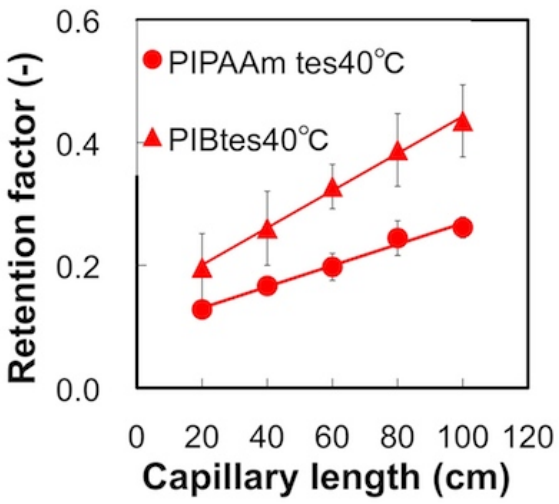


Fig. 1 Effect of capillary lengths on retention of testosterone at 40°C.

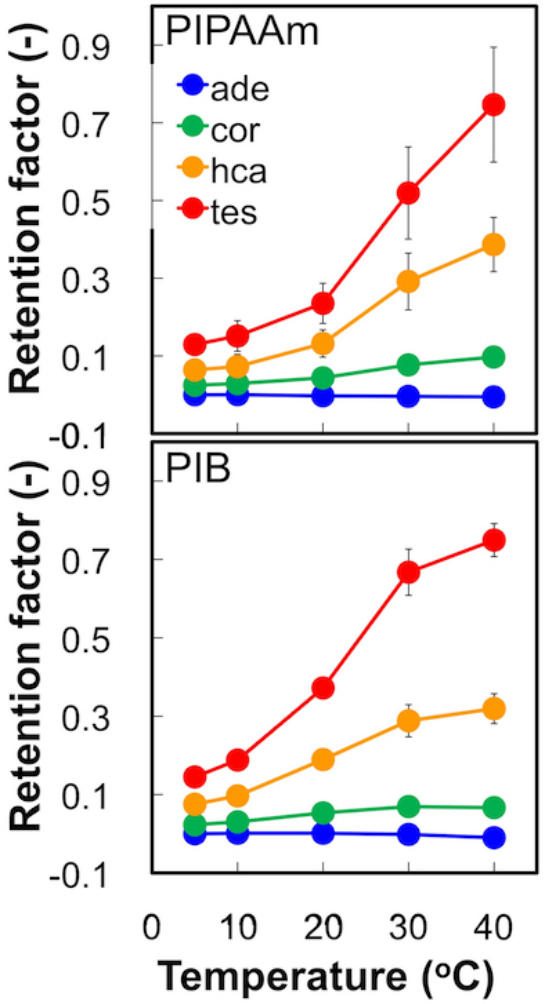


Fig. 2 Comparison of retention factor for steroids on PIPAAm- or P(IPAAm-co-BMA)(PIB)- modified capillary.

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.04-7122-9686, Fax04-7122-1499, 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 with regulated chaing lengths to the solid surfaces by applying surface-initiated atom transfer radical polymerization (ATRP) to prepare thermoresponsive soft interfaces. We have investigated the biomolecule interaction on PIPAAm brush grafted fused silica capillary as microcolumn matrixes. This year, we investigated the preparation of hydrophobized PIPAAm-grafted soft interfaces by surface-initiated ATRP method, and temperature-dependent surface property alterations were examined in terms of the biomolecule interaction changes by means of microHPLC method.

First, 2-(*m,p*-chloromethylphenyl)ethyltrichlorosilane was introduced to fused silica capillary with inner diameter of 100μm. Then, known amount of IPAAm and butyl methacrylate (BMA) monomers with predetermined concentrations and composition, and catalysts for ATRP was dissolved in *N,N*-dimethylformamide (DMF). On the inner surface of the initiator immobilized fused silica capillary, monomer solutions containing ATRP catalysts were continuously injected using syringe pump. These modified surfaces were used for measurement of temperature-dependent changes in the interaction with biomolecules; cortisone, hydrocortisone acetate and testosterone as model hydrophobic molecules. Adenosine was used as standard hydrophilic molecule.

We investigated surface property alteration for thermoresponsive polymer modified fused silica capillary interfaces by observation of the steroids retention. Fisrt, we modified inner surface of fused silica capillary by changing monomer concentration where monomer composition was set at BMA of 1 mol%. Testosterone retention factor was always larger for P(IPAAm-co-BMA) modified capillary than that for PIPAAm homopolymer-modified surface. With increasing monomer concentration, pronounced interaction of hydrophobic steroids was apparent. We then investigate the effect of capillary lengths on retention of testosterone. On both PIPAAm and P(IPAAm-co-BMA) testosterone retention increased with increasing chain length. The results indicated that the stronger interaction occurred on more hydrophobic P(IPAAm-co-BMA) surfaces than that on PIPAAm homopolymer surface at 40° C.

Temperature dependent retention factor changes for several steroids with different hydrophobicities were observed for PIPAAm-grafted, and P(IPAAm-co-BMA)-grafted capillaries. On PIPAAm surfaces, retention factor increased between 20 and 30° C, where PIPAAm chains changes its hydration state to dehydrated one. To the contrary, in case of P(IPAAm-co-BMA) grafted surfaces showed stronger interaction even at lower temperature, especially for the most hydrophobic substance, testosterone.

These results indicated that we modulate biomolecule interaction on thermoresponsive polymer-modified surfaces by introducing hydrophobic comonomer to PIPAAm at lower tempera ture compared to the homopolymer PIPAAm surfaces. This may be suitable for modulated interaction of proteins those often show thermal denaturation.

We will continue to investigate the properties of thermoresponsive polymer-modified surfaces in terms of the spectroscopic analysis.

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) A. Mizutani, K. Nagase, A. Kikuchi, H. Kanazawa, Y. Akiyama, J. Kobayashi, M. Annaka, T. Okano, Effective separation of peptides using highly dense thermo-responsive polymer brush-grafted porous polystyrene beads, J. Chromatogr. B. Anal. Technol. In Biomed. Life Sci., **878**(24), 2191-2198 (2010).

2) A. Mizutani, K. Nagase, A. Kikuchi, H. Kanazawa, Y. Akiyama, J. Kobayashi, M. Annaka, T. Okano, Preparation of thermo-responsive polymer brushes on hydrophilic polymeric beads by surface-initiated atom transfer radical polymerization for a highly resolutive separation of peptides, J. Chromatogr. A., **1217**(38), 5978-5985 (2010)

２．著書・総説
1)菊池明彦，バイオマテリアルの基礎，前田・塙・石原編，日本医学館(東京)，pp. 118-124.

３．会議発表
1) A. Kikuchi, T. Asoh, Thermoresponsive surfaces for separation of bioactive molecules, 2010 International Advanced Drug Delivery Symposium, National Tsing Hua University, Taiwan, 2010.4.29-30. (招待講演)

2) A. Kikuchi, T. Asoh, Thermoresponsive interfaces for separation and analysis of biomolecules toward rapid drug monitoring, 2010 International Syposium of the Intelligent Drug Delivery System, Seoul, Korea, 2010.5.6-7.(招待講演)

3) 菊池明彦，森山洋匡，河原論史，麻生隆彬，感温性ソフトインターフェースを有するキャピラリー内表面の調製と生体分子との相互作用，第 59 回高分子学会年次大会,パシフィコ横浜, 2010.5.26-28.

4) 高山陽亮，麻生隆彬，菊池明彦，第 59 回高分子討論会，北海道大学, 2010.9.15-17.

5) 高山陽亮，麻生隆彬，菊池明彦，第 32 回日本バイオマテリアル学会大会，グランドプリンス広島, 2010.11.29-30.

6) Akihiko Kikuchi, Taka-Aki Asoh, Thermoresponsive soft interfaces for modulated interaction with biomolecules, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PacifiChem 2010), Honolulu, Hawaii, 2010.12.15-20.

7) Akihiko Kikuchi, Taka-Aki Asoh, Thermoresponsive soft interfaces for regulated interaction of biomolecules, International Conference on Biomaterials Science in Tsukuba (ICBS2011), 2011.3.15-18

8) Yosuke Takayama, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi, Design of hydrophobized thermoresponsive interfaces and control of biomolecule interaction, International Conference on Biomaterials Science in Tsukuba (ICBS2011), 2011.3.15-18

9) Masayuki Seo, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi, Preparation of thermoresponsive interfaces with immobilized metal ion affinity ligands by surface-initiated atom transfer radical polymerization, International Conference on Biomaterials Science in Tsukuba (ICBS2011), 2011.3.15-18

４．その他　（例えば特許など）
なし

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

研究代表者:九州大学先導物質化学研究所・高原　淳
連携研究者:九州大学先導物質化学研究所・
大塚　英幸、西原　正通、小林　元康
九州大学大学院工学府・矢野　貴大、篠原　貴道

１．緒言

表面微細形状と表面化学修飾はソフトインターフェースの設計で極めて重要である。本研究では先ず表面修飾可能な官能基（例えば Br 基）を有し、かつ様々なナノ・ミクロ形状が精密に制御可能な高分子を合成し、そのフィルム表面に対してマイクロ・ナノインプリンティングによるパターニング、あるいは基板上への高分子溶液のエレクトロスプレーデポジション(ESD)によるナノファーバー不織布調製を行い、様々な形態を有する表面を形成する。さらにそれら表面へ表面開始原子移動ラジカル重合(ATRP)を利用して、さまざまな表面特性を有するポリマーナノグラフト層を形成し、様々な表面３次元形態、表面物理化学的性質と分子運動特性を有するソフトインターフェースを調製することを目的とする。本報告書では１）エレクトロスプレーデポジション(ESD)によるＰＶＡ誘導体ナノファーバー不織布調製と表面化学修飾、２）表面に微細構造を有するポリ乳酸(PLA)の調製と細胞培養挙動に関して得られた成果を報告する。

２．研究経過

２．１　エレクトロスプレーデポジション(ESD)によるＰＶＡ誘導体ナノファイバー不織布調製と表面化学修飾

PMMA に関してはナノファイバーの表面物性制御技術をほぼ確立した[1,2]。本年度はＰＶＡ誘導体ナノファイバー不織布調製と表面化学修飾について検討した。PVA に 2-ブロモイソブチル酸ブロミドを反応させ PVA-*co*-poly(vinyl bromodimethylacetate) (PVA-*co*-PVB)を合成した。次に PVA-*co*-PVB を水/DMF (70/30, v/v)混合溶媒に溶解させ、10 wt%溶液とし、エレクトロスピニング法によりファイバーを紡糸した。得られたファイバーは SEM、広角 X 線回折により分析した。ファイバー表面に存在するブロモ基から methyl methcrylate (MMA)の原子移動ラジカル重合(ATRP)を 413K、24 h にて行い、PMMA グラフト PVA ファイバー膜を得た。

得られたPVA-*co*-PVBの組成はPVA/PVB = 94 /6であることを^{1}H NMRから確認した。エレクトロスピニング法により紡糸したPVA-*co*-PVBファイバーの直径は約400 nmであり、ファイバー表面は平滑であることをSEMにより確認した。ポリマー粉末及びファイバーのX線回折パターンからPVAの結晶構造由来のピークが認められたが、ファイバーの回折ピークは比較的ブロードであり、結晶化度は低いことが示唆された。これは溶媒の気化が非常に早いために結晶化が阻害されたためであると考えられる。次にPVA-*co*-PVBファイバーを用いてMMAの表面開始ATRPを行った。このファイバーのXPSスペクトルにはPMMA由来のカルボニルのピークが観測された。SEM観察からファイバーは繊維形状を維持しており、ファイバー径が約500 nm程度まで増大していることから、数十 nm程度のグラフト層が形成していると考えられる。得られたファイバー膜の水に対する静的接触角

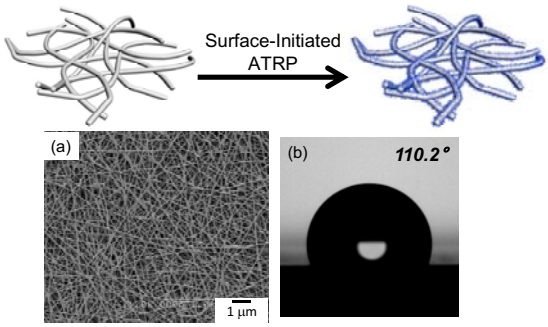


Figure 1. (a) SEM image of PVA-*co*-PVB–*g*-PMMA, and (b) static contact angle against water on PVA-*co*-PVB-*g*-PMMA non-woven fiber mat.

が110.2°であったのに対し、同様に調製したPMMAグラフトススピンキャスト膜の値77.5°であった。これはファイバー不織布間隙に空気層を取り込み、不均一な濡れ(Cassie-Baxter model)の状態をとっていることから接触角の値が増加したと考えられる。今後さらにグラフトポリマー種を変化させてナノファイバー不織布の表面物性を系統的に変化させる。

２）表面に微細構造を有するポリ乳酸(PLA)の調製と細胞培養挙動

ナノインプリント（NIL）法とは、凹凸を有するモールドを材料表面に押し付けそのパターンを材料表面に転写する表面微細加工法である。本研究では、バイオデバイスへの応用を指向し、ポリ乳酸フィルム（PLA）への NIL による表面微細構造の形成および散乱手法による精密評価を行った。また、NIL フィルム上での細胞培養を行い表面微細構造が細胞培養挙動に及ぼす影響を検討した。溶融プレス法により膜厚 200 μm に調製した PLA フィルムに対し NIL を行った。NIL には Line/Space = 400 nm/600 nm (LS 500) のパターンが形成されたモールドを用い、条件を押付温度 353 K、押付圧力 20 MPa とした。NIL 後の表面形状を SEM により観察し、周期構造のサイズを放射光を用いた小角 X 線散乱測定（SR-SAXS）により評価した。また、NIL フィルム上での細胞培養を行い表面微細構造が細胞培養挙動に及ぼす影響を検討した。

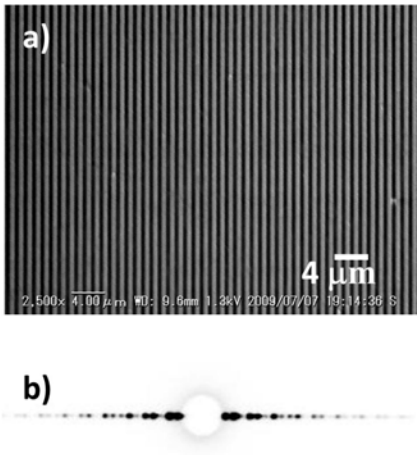


Fig.2 (a) SEM image and (b) corresponding diffraction pattern of NIL_PLA with L/S pattern of 500 nm.

Fig.2(a)に NIL 後の PLA フィルム（NIL_ PLA）の SEM 像を示す。モールド形状を反映した表面周期構造が観察された。Fig.2(b)に NIL_PLA の SR-SAXS 測定により得られた二次元散乱像を示す。NIL_PLA から得られた散乱パターンにおいて、周期的な散乱が明確に観測された。この散乱は、平滑 PLA フィルムにおいて観察されなかったことから、表面微細構造に由来する。また、高次のピークが明瞭に観測され NIL 法により作製した表面周期構造は高い規則性を有することが明らかとなった [3)]。構造体の大きさを評価するため、断面形状を方形と仮定しラウエ関数を用いた q_x 方向の強度プロファイルのフィッティングを行った。求められた line 幅はモールドの Space 幅とほぼ一致し、SR-SAXS により構造体の評価が可能であることが示された。さらに、表面微細構造が細胞培養挙動に及ぼす影響を検討するため NIL_PLA 上で線維芽細胞の細胞培養を行った。培養実験には、マウス線維芽細胞 NIH3T3 を用いた。Fig.3 は NIL_PLA 上で培養した細胞の形態を示す SEM 像である。細胞が足場表面のパターンに沿って進展している様子が観察された。一方で、線幅 200 nm 以下の NIL_PLA フィルム上で培養した細胞は球状であった。これらより、表面微細構造を制御することで細胞形態の制御が可能であることが示唆された。

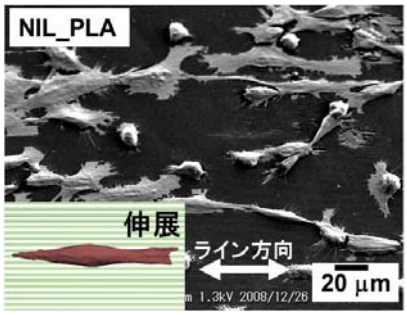


Fig. 3 SEM image of fibroblast cell on the surface of NIL_PLA with L/S of 500 nm after incubation for 3 hr at 310 K.

文献

1) T. Yano, W.-O. Yah, H. Yamaguchi, Y. Terayama, M. Nishihara, M.Kobayashi, A. Takahara, Chem. Lett. 39, 1110-111(2010).
2) T. Yano, W.-O. Yah, H. Yamaguchi, Y. Terayama, M. Nishihara, M.Kobayashi, A. Takahara, Polym. J. in press.
3) T, Shinohara, T. Shirahase, D. Murakami, T. Hoshino, M. Kikuchi, J.-I. Koike, H. Masunaga, H. Ogawa, A. Takahara, Mater. Sci. Eng. in press.

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

Atsushi Takahara, Hideyuki Otsuka, Masamichi Nishihara, Motoyasu Kobayashi, Takahiro Yano, Takamichi Shinohara

Institute for Materials Chemistry and Engineering, Graduate School of Engineering, Kyushu University
744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan
Tel and Fax: + 81-092-802-2515, E-mail: takahara@cstf.kyushu-u.ac.jp

Since surfaces and interfaces of soft materials play an important role in various technological applications, precise control of soft interfaces would greatly promote the innovation of materials science and technology. In order to control the characteristics of soft interfaces, it is necessary to control surface topography and surface chemistry of soft materials. In this study, in order to achieve above object, 1) electro-spinning was applied to prepare the non-woven nanofiber surface with controlled surface chemistry, 2) nanoimprinting was applied to bio-plastics and characterize their surface characteristics.

Functional nanofibers have been paid great attentions such as environment, medical and nanoscience. Electrospinning is one of the efficient preparation methods for nanofibers. Electrospinning is feasible to obtain nano-ordered polymer fibers under an atmospheric pressure and at room temperature. Submicron-order fibers and its non-woven fiber mat were prepared by electrospinning process using 10 wt% aqueous solution of poly(vinyl alcohol)-*co*-poly(vinyl bromodimethylacetate) (PVA-*co*-PVB) (PVA/PVB = 94/6, mol/mol), which has the initiators of atom transfer radical polymerization (ATRP). X-ray diffraction from the fiber showed weak diffraction pattern attributed to the crystal structure of PVA, however the degree of crystallinity was low due to theinhibition of crystallization during spinning process. Surface-grafted PMMA on the surface of the fiber mat was prepared by ATRP at 40°C for 24 h. The thickness of the grafted fiber was estimated to be less than 100 nm by SEM image. The contact angle of 110.2° on non-woven fiber mat grafted PMMA was obtained while on the spin-coated PVA-*co*-PVB-*g*-PMMA film was 77.5° as the control sample. This difference would be due to the Cassie-Baxter wetting state caused by the presence of air among of micro-fibers.

Nano-imprint lithography (NIL) is a low-cost, high-resolution and large area patterning method. The precise and nondestructive evaluation methods of nano-imprinted polymer thin films have been required. In this study, we attempt to characterize nano-imprinted structure on the basis of microscopic and scattering techniques. Surface nano-structure on PLA film was fabricated by nano-imprinting with line/space (LS) patterned mold. The formation of surface nano-structure on PLA film was confirmed by scanning electron microscopy. Diffraction experiment of NIL_PLA film was carried out by using synchrotron radiation source at SAXS beam-line in SPring-8. The diffracted patterns from NIL_PLA film were clearly observed up to higher order ones suggesting highly regular pattern fabrication on PLA film. Also, the diffraction intensity could be fitted by rectangular LS model. These indicate that surface nano-structure could be precisely characterized by SR-SAXS. In order to discuss the influence of surface topography on cell growth behavior, NIH3T3 fibroblast cell was incubated on the NIL PLA film. It was observed that cell formed spheroid like structure under L/S of 200nm. However, cell spread along the L/S direction above L/S of 500 nm.

業績リスト

１．原著論文

4) T. Yano, W.-O. Yah, H. Yamaguchi, Y. Terayama, M. Nishihara, M.Kobayashi, A. Takahara, Preparation and Surface Characterization of Surface-modified Electrospun Poly(methyl methacrylate) Copolymer Nanofibers, Chem. Lett. 39, 1110-111(2010).
5) T,-T, Reddy, A. Kano, A. Maruyama, A. Takahara, Synthesis, Characterization and Drug Release of Biocompatible/ Biodegradable Non-toxic Poly(urethane urea)s Based on Poly(ε-caprolactone)s and Lysine-Based Diisocyanate, J. Biomater Sci. Polym. Ed., 24, 1483-1502(2010).
6) N. Morishige, Y.Takagi, T. Chikama, A. Takahara, T. Nishida, Three-Dimensional Analysis of Collagen Lamellae in the Anterior Stroma of the Human Cornea Visualized by Second Harmonic Generation Imaging Microscopy,Investigative Ophthalmology and Visual Science, 52, 911-915(2011).
7) T, Shinohara, T. Shirahase, D. Murakami, T. Hoshino, M. Kikuchi, J.-I. Koike, H. Masunaga, H. Ogawa, A. Takahara, Characterization of Surface Microstructures on Bio-based Polymer Film Fabricated with Nano-imprint Lithography by Synchrotron Radiation Small Angle X-ray Scattering. Mater. Sci. Eng. in press.

２．会議発表

1) 篠原貴道, 白波瀬朋子, 狩野有宏, 丸山　厚, 高原　淳: ナノインプリント法によるバイオベースポリマーブレンドフィルムへの表面微細構造形成と細胞培養挙動, 第 59 回高分子年次大会, パシフィコ横浜 (2010).
2) 矢野貴大、葉永安、山口央基、寺山友規、西原正通、小林元康、高原　淳: 電界紡糸ファイバーの表面化学修飾とその特性評価, 第 59 回高分子年次大会, パシフィコ横浜 (2010).
3) A. Takahara, Interfacial Properties and Dynamics of Polymer Brushes, ISPAC2010, Pohang, Korea, May (2010). （招待講演）
4) T. Shinohara, T. Shirahase, D. Murakami, T. Hoshino, M. Kikuchi, A. Takahara, Characterization of Surface Microstructures on Bio-based Polymer Film Fabricated with Nano-imprint Lithography, Korea-Japan Forum 2010 on Organic Materials for Electronics and Photonics, Fukuoka, Japan (2010).
5) 矢野貴大、葉永安、山口央基、寺山友規、西原正通、小林元康、高原　淳: 表面開始 ATRP を利用した電界紡糸ファイバーの構造・物性制御, 第 59 回高分子討論会, 北海道大学 (2010).
6) 篠原貴道, 白波瀬朋子, 星野大樹, 菊地守也, 高原　淳: ナノインプリント法によるポリ乳酸フィルムへの表面微細周期構造の形成と散乱法・顕微手法を用いた精密構造評価, 第 59 回高分子討論会, 北海道大学 (2010).
7) 井上満美子, 徐航, 西原正通, 小林元康, 高原　淳: 交互吸着法によるポリアニオンとカチオン性ナノ粒子のステンレス基板上への積層とその表面・界面特性解析, 第 59 回高分子討論会, 北海道大学 (2010).
8) 高原　淳、小林元康、ソフト界面の精密構造制御とその特性解析第 59 回高分子討論会, 北海道大学 (2010).（招待講演）
9) A.Takahara, Chain Conformation of Zwitter Ionic Polymer in Solution and Concentrated Brush State, AOFSRR2010, Pohang, Korea (2010). （招待講演）
10) 篠原貴道, 白波瀬朋子, 星野大樹, 菊地守也, 高原　淳: ナノインプリント法により表面微細構造を賦与したポリ乳酸薄膜の顕微・散乱手法による精密構造解析, 第 19 回ポリマー材料フォーラム, 名古屋国際会議場 (2010).
11) T. Yano, W. O. Yah, H. Yamaguchi, Y. Terayama, M. Nishihara, M. Kobayashi, H. Otsuka, A. Takahara, Precise Control of Surface Physicochemical Properties for Electrospun Poly(methyl methacrylate) Derivative Fibers by Surface Initiated Radical Polymerization, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii, USA (2010).
12) T. Shinohara, T. Shirahase, A. Takahara, Fabrication of Micro- and Nano-structures on Flexible Bio-based Polymer Films, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii, USA (2010).

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

研究代表者： 九州大学大学院工学研究院化学工学部門　三浦佳子

研究分担者： 九州大学大学院工学研究院化学工学部門　星野友

１．緒言

高分子、生体分子といったソフトマターでは界面での振る舞いが多様で材料の性質や生体の分子認識を制御している。それ故、ソフトマターの界面を制御することによって優れた機能を持つ材料の開発や生体機能の制御が可能になる。我々の研究グループでは特に生体機能の制御を目指したソフト界面の開発を行っている。

人工的にソフト界面を制御するためには、精密な高分子素材で界面を構築することが重要である。精密な高分子としては、リビングラジカル重合などによる精密重合を利用して構築する高分子、また単一の精密な分子量とサイズを有する樹状高分子デンドリマーなどがあげられる。特にデンドリマーという、樹状高分子においては、分子量分布のない、精密な分子構造を持っている。そのため、これを用いれば界面の性質を制御することは比較的容易である。

本研究では樹状高分子を中心にして精密な高分子を用いた界面の構築を行い、特に生体機能についての解析を行っている。

２．研究経過

（１） タンパク質の特異的認識の制御とその応用

生体シグナルは、レセプタータンパク質と生体分子リガンドの相互作用によって成り立っている。生体シグナル分子の“強さ”は、その物質の性質によるだけでなく、生体リガンドが数点の相互作用を作る、多価的な相互作用によって影響を受ける。多価的リガンドはレセプターとの相互作用を強め、衝突の頻度も上昇させる。

我々は、こうした生体シグナル分子を配した高分子材料の開発を進めている。特に糖鎖シグナルにこれまで着目してきた。糖鎖とタンパク質の相互作用は、特に多価効果が強く関係する。糖鎖を樹状高分子の末端や精密高分子の側鎖に結合させた界面によって、リガンドの密度を制御することができ、生体分子認識能を調整できる。硫酸化 GlcNAc、マンノース（Man）、グロボビオース（Gb2）とデンドリマーを利用した複合材料界面の創出と生体分子認識性の解析を行った。

これまでに硫酸化グルコサミンの樹状高分子界面で、アルツハイマー病アミロイドβの相互作用やアミロイド化の制御を達成してきた。本年度研究では、硫酸化糖鎖を結合させたデンドリマー分子や高分子の溶液中でのアミロイド化に及ぼす影響について調べた。硫酸化 GlcNAc デンドリマーについては、アミロイドβと強い相互作用を持ち、顕著に線維化を進展させる作用があった。一方で、未修飾の GlcNAc を結合させたデンドリマ―についてはアミロイド形成を阻害する作用があった。アミロイド形成に対する硫酸化 GlcNAc の作用は、線状高分子によっても検討し、硫酸化 GlcNAc の密度が高くなると、結合が強くなるが線維化を促し、密度が小さくなると線維形成を阻害することを見出した。このように硫酸化糖デンドリマ―、ポリマーを検討することでタンパク質のアミロイド化を制御し、時として形も制御できることを見出した。

また、Gb2 については、腸管出血性大腸菌産性毒素である志賀毒素のリガンドであることが知られている。志賀毒素はほぼ第４世代 PAMAM デンドリマーと同じ大きさであり、Gb2 結合デンドリマーを用いることで、志賀毒素に対する強い相互作用を示す界面を作製した。このような界面は糖鎖の密度と糖鎖の種類によって特異的に志賀毒素と強く相互作用することがわかった。志賀毒素については、Gb2－デンドリマー界面を利用することでバイオセンシングへと応用することも可能である。

一方で、本年度研究では単純に糖鎖が多価になった界面だけでなく、糖鎖が孤立した空間を形成する界面の作成についても検討した。デンドリマーの末端は分子が密集しているが、中心部分は分子鎖が疎になっている。分子鎖中央にジスルフィド結合を有するシスタミンコアの PAMAM デンドリマーを還元に

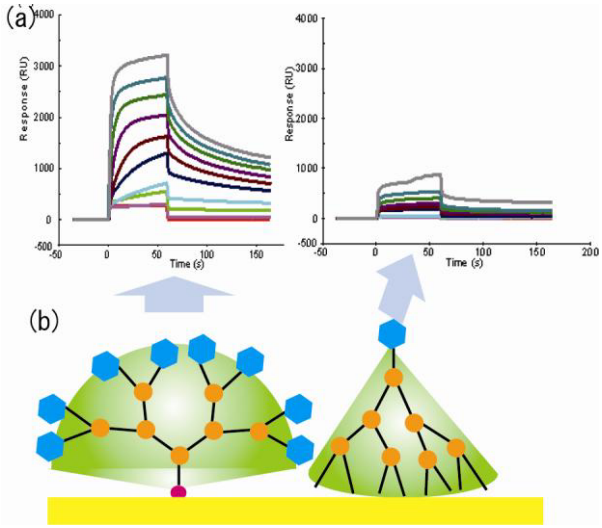


図１　デンドリマーの末端とコアを利用した糖鎖の密度制御。(a)密度を制御したマンノース固定化界面の SPR プロファイル。(b) 糖密度制御の模式図

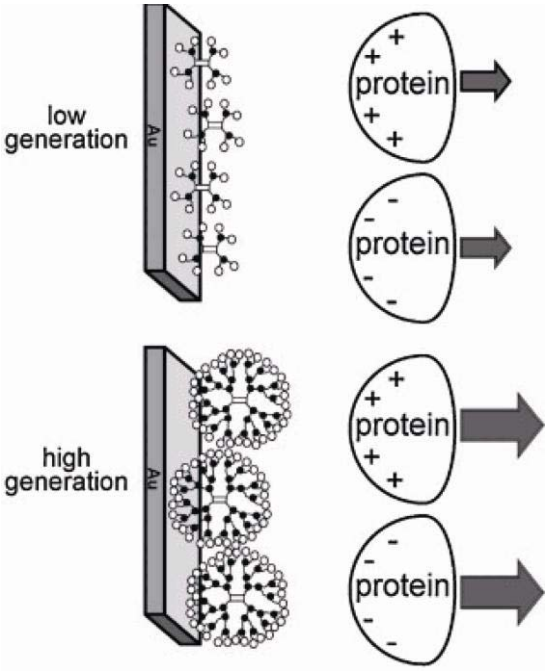


図２　デンドリマー界面でのタンパク質の吸着性。デンドリマーの世代の高い界面ではタンパク質の吸着が抑えられる。

よって分割することで、中心部を露出させてマンノースを結合させた。分子末端に糖を持つデンドリマー、コア部分にマンノースを持つデンドリマー及びコントロール基材を利用して、タンパク質(ConA), 大腸菌（*E. coli.* ORN-178）の接着を観察した(図１)。分子末端に密集した糖鎖を持つデンドリマー界面では、糖―タンパク質の強い相互作用を示し、大腸菌の接着量も多かった。糖が疎である場合にはタンパク質と糖鎖の相互作用はやや弱く、一応の大腸菌の接着性が見られ、コントロールとは差異が認められた。デンドリマーの特性を生かした、生体分子の空間制御ができることがわかった。

（２）樹状高分子界面によるタンパク質の吸着性の制御

ソフト界面に対するタンパク質の接着は官能基の構造だけでなく、ソフト界面層の膜厚や分子層の構造、密度などによって大きな影響を受ける。デンドリマーを固定化した界面では分子鎖の末端密度や分岐度についてはデンドリマーの世代数を変化させることで容易に変えることができる。デンドリマーを固定化した自己組織化界面を用いて、タンパク質の吸着に及ぼす影響を調べ、分岐高分子を用いたタンパク質忌避活性について調べた。

先ず、アミン末端を持つデンドリマー（G1-G4）について、について金基板上に対する Au-N 結合を利用した自己組織化膜を形成させた上で、タンパク質として Lysozyme, BSA, Fibrinogen を用いた上でこれらの吸着を測定したところ、全てのタンパク質においてデンドリマーの世代数が高い場合が忌避活性が高いことがわかった。分子斥力を計算したところ、分岐によって末端鎖密度が上昇すると、分子斥力が顕著に大きくなり、忌避活性に寄与することが示唆された。

次にデンドリマー末端にオリゴ PEG、カルボン酸、アミン、ホスホリルコリンなどの種々の官能基を結合させた上で、Au-S 結合形成を通じたデンドリマー自己組織化膜の形成を行い、更にタンパク質忌避活性を調べた。G1 と G4 のデンドリマーについて各種の官能基を結合させ、タンパク質忌避活性を調べた。G1 のデンドリマーに比べて、G4 のデンドリマーはいずれの場合もタンパク質忌避活性が向上し、オリゴ PEG やホスホリルコリンといったタンパク質忌避活性の高い官能基を結合させた場合には、未修飾の基板に対するタンパク質の結合に対して 1/10 程度の結合の場合にもなることが見出され有効なタンパク質忌避活性を示すことがわかった。

Soft-Interface Design by Biofunctional Dendritic Macromolecules

Yoshiko Miura
Department of Chemical Engineering, Kyushu University
744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka, 819-0395, Japan
Tel,+81-92-802-2749, Fax,+81-92-802-2769, E-mail: miuray@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

Yu Hoshino
Department of Chemical Engineering, Kyushu University

The interface property plays important roles in the soft materials with polymers and biomolecules. The control of soft-interface enables the fabrication of novel functional materials and the regulation of biological molecular recognition. In order to fabricate the well-defined soft-interface, the soft interfaces with fine polymers have been developed, using polymers via living radical polymerization and dendrimers. Especially, dendrimers have uniform structures, and so the interfaces with dendrimer easily provide the fine and uniform soft-interface. In this investigation, we have prepared the soft-interface with dendritic molecules for bio-interface.

(1) The Molecular Recognition with Glycol-Dendrimer Interface

The molecular recognition between proteins and ligands depends on not only the protein and ligand, and the multivalent effect of the densely packed ligands. We have investigated the molecular recognition ability of saccharide modified dendrimer interface with GlcNAc, sulfonated GlcNAc, Man and globobiose (Gb2).

In this year's research, the denderimers with GlcNAc and 6-sulfo-GlcNAc were investigated as interaction with Amyloid beta peptide (Aβ). The PAMAM dendrimer with 6-sulfo-GlcNAc interacted with Aβ(1-40) strongly, and induced the fibril formation. On the other hand, the PAMAM dendrimer with GlcNAc (without sulfonated group) totally inhibited Aβ aggregation. The sugar-ball with GlcNAc interacted with Aβ and the hydrated water on the Aβ, and exhibited strong inhibition effect on Aβ aggregation.

Gb2 (Galα1-4Glc) is ligand of Shiga toxins, which was connected to G4 PAMAM dendrimer interface, and the interaction between Gb2-dendrimer was measured with SPR. Since the molecular size of G4 PAMAM dendrimer and Shiga toxin was almost the same, the Gb2-modified PAMAM dendrimer interface showed the strong interaction with Shiga toxin due to the appropriate multivalent effect. The dendrimer with α-Gal showed weaker interaction because of ligand specificity, and the Gb2-dendrimer with lower sugar density also showed weaker interaction, indicating the sugar structure and the multivalency was important in Shiga toxin interaction.

（2） Bioinert Surface Properties of Dendrimer Interface

Interactions between proteins and biomaterial surfaces correlate with many important phenomena in biological systems, and such interactions have been used to develop various artificial biomaterials and applications. The protein adsorption of soft material depends on the functional group and the molecular density at the interface.

First, the PAMAM dendrimer interface with G1-G4 was immobilized on the gold substrate via Au-N bond. The protein adsorptions onto dendrimer were reduced with generation of dendrimers, and the G4 dendrimer monolayer showed the smallest adsorption bound. The amount of protein adsorption consisted with steric repulsion energy, which suggested bioinert properties of the dendrimer with higher generation

Then, the PAMAM denerimers interface with oligo PEG, carboxylic acid, amine and phosphoryl choline group was also prepared via Au-S bond. The dendrimer interface of G4 with PEG or PC inhibited the protein adsorption, and the amount of protein bound in G4-PAMAM-PEG interface was about 10 % of the reference Au interface. The dendrimer brush formed densely packed polymer brush, which was advantageous to the development of bioinert surface.

業績リスト

１．原著論文

1) Jin Ishii, Masayuki Toyoshima, Miyuki Chikae, Yuzuru Takamura, Yoshiko Miura, “Preparation of Glycopolymer-modified Gold Nanoparticles and a New Approach for a Lateral Flow Assay”, Bull Chem Soc. Jpn, Vol.84, No. 5, 466-470 (2011).

2) Erino Matsumoto, Tomohiro Fukuda, Yoshiko Miura, “Bioinert Surface to Protein Adsorption with Higher Generation of Dendrimer SAMs” Colloid and Surfaces B, Vol. 84, No. 1, 280-284 (2011).

3) Masaya Wada, Yuta Miyazawa, Yoshiko Miura, “A Specific Inhibitory Effect of Multivalent Trehalose toward Ab(1-40) Aggregation” Polymer Chemistry, in press.

4)Kouji Funato, Keiko Fukuda, Yoshiko Miura, “Monoalyer Formation of Hydrocarbons with Various Reactive Groups via Photochemical Reaction on Si(111)-H Surface, Trans. Mat. Res. Soc. Jpn. Vol.35, No. 4, 797-799 (2010).

5)Tomohiro Fukuda, Erino Matsumoto, Nobuhiko Yui, Yoshiko Miura, “Peculiar Wettability Based on Orientational Change of Self-Assembled Hemispherical PAMAM Dendrimer Layer”, Chem. Lett. Vol.39, No.9, 923-925 (2010)

6) Yoshiko Miura, Hikaru Mizuno, “Interaction Analyses of Amyloid beta Peptide (1-40) with Glycosaminoglycan Model Polymers, Bull Chem. Soc. Jpn, Vol.83, No. 9, 1004-1009 (2010).

7) Tomohiro Fukuda, Erino Matsumoto, Shunsuke Onogi, Yoshiko Miura, “Aggregation of Alzheimer Amyloid b Peptide (1-42) on the Multivalent Sulfonated Sugar Interface”, Bioconjugate Chem, Vol.21, No. 6, 1079-1086(2010).

２．著書・総説

1) 三浦佳子、“糖鎖集積材料によるバイオセンシング”、高分子、Vol. 54, No.6, 410-411(2010).

2) 三浦佳子、“糖鎖集積化によるバイオマテリアルの開発 “、粉体工学会誌、Vo.48, No.3, 124-131(2010).

3) 三浦佳子、バイオマテリアルの基礎、“糖鎖機能界面”、日本医学館、pp156-160(2010).

4) 三浦佳子、“糖鎖高分子を用いた生体機能材料の開発”、科研費 NEWS, Vol. 4, 9(2010).

３．会議発表

1) 三浦佳子、“糖鎖集積化によるバイオマテリアルの開発”、紛体工学会夏期シンポジウム

2) 三浦佳子、“精密糖鎖高分子界面を用いた機能材料の設計” 理系マドモワゼル講演会

3) 三浦佳子、“糖鎖高分子界面を用いた生体機能材料の創製”、九州地区高分子若手研究会

4) 三浦佳子、“生理活性糖の不思議、そしてその応用” 、第４７回化学工学コロキウム

5) 三浦佳子、 “糖鎖高分子を利用した生体ナノ材料” 高分子学会北陸支部福井地区講演会

6) Tomohiro Fukuda, Erino Matsumoto, Shunsuke Onog, Yoshiko Miura ,” Control of amyloidosis on the multivalent sulfonated sugar”,Pacifichem

7) Yoshiko Miura, “Dendritic sugar interface and biological functionality” ,Pacifichem

8) Yoshiko Miura, Tomohiro Fukuda, “Multivalent Sulfonated Sugar Interface to Control the Aggregation of Amyloid beta Peptide”, MRS-J

9) 松本 絵里乃, 福田 知博, 三浦 佳子,” デンドリマー SAM の形成とタンパク質吸着活性評価”, 日本 MRS

10) 三浦佳子、“樹状高分子を利用した糖鎖の集積化と生体機能の制御、第４回バイオ関連化学シンポジウム

11) 三浦佳子、豊島雅幸、松岡真未、“自己組織性糖鎖高分子による機能性材料の創製” ,第 59 回高分子討論会

12) 福田 知博、松本 絵里乃、小野木 俊介、三浦 佳子、“デンドリチック硫酸化糖鎖表面におけるアミロイド β(1-42)の結合挙動解析”、第 59 回高分子討論会

13) 福田知博、林由起子、松本絵里乃、三浦佳子、“ポリアミドアミンデンドリマー修飾体による自己組織化膜の形成と解析、第５８回高分子学会年会

14) 三浦 佳子、福田 知博, “デンドリティック糖クラスターによる生体機能材料の開発”,第 20 回バイオ高分子シンポジウム

計画研究代表者　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：富山大学大学院理工学研究部・北野博巳

研究分担者：富山大学大学院理工学研究部・源明　誠

１．緒言

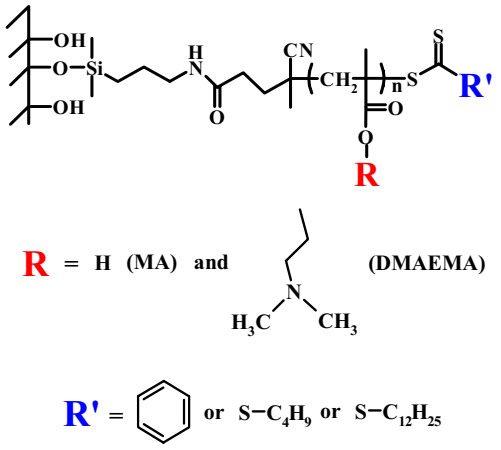
医用材料やバイオセンサーを作成する際には，タンパク質等の非特異吸着が常に問題となる．これを解決する手段として種々の生体不活性材料の開発が試みられてきたが，高分子ブラシもその一つである．本研究では，高分子ブラシの機能と水の構造との相関を調査することを目的とし，まず正あるいは負電荷を側鎖に有する単量体残基が同数含まれている両性高分子ブラシを、可逆的付加解裂連鎖移動(Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer, RAFT) 重合法により調製し、その生体適合性を評価した。

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和周波発生(Sum Frequency Generation, SFG) 法を，両性高分子ブラシ近傍の水の構造解析に適用した．

２．研究経過

２．１　両性高分子ブラシ表面へのタンパク質の非特異的吸着挙動

アミノ基を導入したガラス表面に、アゾ型開始剤である 4,4'-Azobis (4-cyanopentanoic acid) (V-501) を縮合剤を用いて固定化した。さらに、連鎖移動剤を共存させて、様々な条件で、アニオン性モノマー Methacrylic acid (MA) およびカチオン性モノマー 2-(Dimethyl-amino)ethyl methacrylate (DMAEMA) を重合した。



Scheme 1. Amphoteric Polymer Brush-Modified Glass via RAFT Polymerization.

同時に生成する遊離の両性高分子の分子量制御を評価したところ、M_w/M_n が 1.3 - 1.5 と比較的小さいことや、エリプソメトリーにより測定した高分子ブラシの膜厚と重合時間の比例関係から、重合がリビング的に進行していることが判明した。両性高分子ブラシのグラフト密度は、0.12 - 0.15 chain/nm^2 と算出された。

未修飾基板、APTS 処理基板、アゾ型開始剤 V-501 修飾基板、種々のポリマーブラシ修飾基板の接触角及び表面ゼータ電位は、明瞭な表面特性の変化を示した。特に、MA と DMAEMA がほぼ等量含まれている両性高分子ブラシは、双性イオン型高分子ブラシと同様に高い親水性を示し、無電荷に近い状態で存在していることが明らかとなった。

各基板に対するタンパク質 BSA、Lysozyme の吸着を BCA 法により評価したところ、カチオン性モノマーとアニオン性モノマーがほぼ等量含まれている両性高分子ブラシがタンパク質の吸着を抑制することが判明した。また、ドデシル型の連鎖移動剤を用いて作製した基板に比べ、ブチル型の連鎖移動剤を用いて作製した基板の方がタンパク質の吸着を抑制した。これは、末端に導入されたアルキル鎖が短くなることで、水中において不安定であるアルキル部位の露出が抑えられ、界面自由エネルギーが減少したためだと考えられる。さらに、pH 7.4 では、正電荷を帯びている Lysozyme および負電荷を帯びている BSA の双方の吸着が抑制された。これらのことから、両性高分子ブラシの吸着抑制能はタンパク質の電荷に影響されないことが示された。

肝ガン由来の HEPG2 および胎児腎臓由来の HEK293 についてブラシへの付着挙動を観たところ、両性ブラシではほとんど付着が観られなかった。またイオンビームでパターンを作成したところ、ブラシを除去したところには多量の細胞付着が観られたが、未照射の領域には付着せず、明瞭なパタン像が得られた。

以上の結果から、アニオン性モノマーとカチオン性モノマーがほぼ等量含まれている両性高分子ブラシは、双性イオン型高分子ブラシと同様に、その高い親水性、分子内での電荷の打ち消しによる無電荷に近い環境により、タンパク質吸着や細胞付着に対する高い抑制効果を示しているものと考えられる。

２．２　和周波発生法による両性高分子ブラシ近傍の水の構造解析

上記の両性高分子ブラシを半円筒型溶融石英プリズム上に構築し、ブラシ近傍の水の構造を、界面の情報が選択的に得られる和周波発生 (SFG) 法により検討した。SFG では、界面にある対称中心を有する分子の情報はシグナルとして検出されない。

測定の結果、MA と DMAEMA を当量含む両性高分子ブラシ近傍では、MA あるいは DMAEMA のみからなる高分子ブラシと比較して、水の O-H 伸縮振動シグナルに由来する SFG 強度がはるかに小さく、ブラシ表面での水分子の強い配向が起きていないことを示していた。このことは、正味の電荷がゼロに近い両性高分子ブラシのタンパク質吸着や細胞付着抑制効果と、同ブラシが近傍の水の構造を大きくは乱さないことの間には強い相関があることを示していた。

これまでに、Raman 分光法や赤外分光法を用いて、両性高分子水溶液や両性高分子薄膜中の水の構造が大きく乱れてはいないことを報告してきた。

本研究で得られた、正あるいは負電荷を有する単量体残基を同数有する両性高分子ブラシが、近傍の水を強く配向させてはいないという結果は、これまでの傾向と良く一致している。

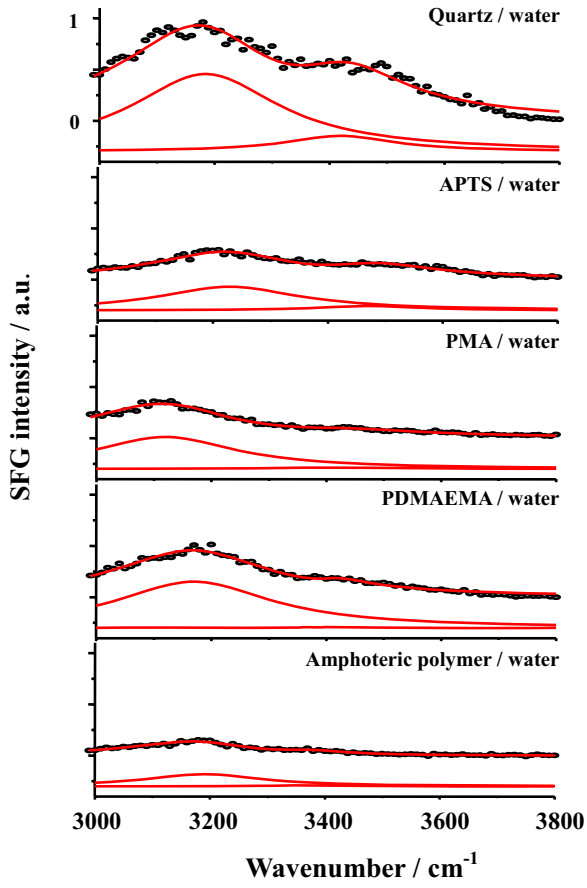


Figure 1. The SFG spectra in the OH stretching region of (a) bare, (b) APTES, (c) PolyMA brush, (d) PolyDMAEMA brush and (e) Poly(MA-*r*-DMAEMA) brush (1 : 1)-covered quartz prism in contact with liquid water. Polarization combinations of SFG, visible and IR were *s*, *s* and *p*, respectively.

２．３　種々のポリ(メタ)アクリレート中の微小水の熱摂動による状態変化

昨年度までに、高分子材料の血液適合性の発現に関与するとされる poly(2-methoxyethylacrylate)中の水の再結晶化は、これまで考えられていたようなアモルファス氷から結晶氷への転移(低温結晶化 Cold crystallization) によるものではなく、単分子水の昇温過程における蒸着様変化、すなわち再蒸着過程(Revapor deposition)により生成されることを明らかにした。

本年度は、血液適合性を示さない Poly(methylacrylate) (pMA), poly(*n*-butylmethacrylate) (pBMA), poly-(2-ethoxyethylacrylate) (pEEA)および poly(2-ethoxyethylmethacrylate) (pEEMA)について、温度可変赤外分光法により材料中の微小水の評価をしたところ、熱摂動による様々な水の状態変化が観測された(Table 1)。いずれのポリマー中の水も、これまでの示差走査熱量法による評価では、不凍水のみが存在すると報告されてきたが、赤外分光学的には、明確な状態変化が捉えられた。血液適合性に必須とされてきた水の再結晶化は、今回評価したすべての材料において観測されたが、いずれも低温結晶化ではなく、再蒸着過程を経ていることが判明した。また、再蒸着の開始温度は、ポリマーのガラス転移温度と良い相関を示した。

本研究結果によれば、ポリ(メタ)アクリレート中で起こる熱摂動による水の状態変化と当該材料の血液適合性の発現との間には、明確な相関関係は認められなかった。

Table 1. State Change of the Sorbed Water Observed.

Polymer	pMA	pBMA	pEEA	pEEMA
	Cooling process			
Condensation	–	Yes	Yes	–
Freezing	–	Yes	Yes	–
Vapor deposition	–	Yes	Yes	–
	Heating process			
Revapor deposition	***Yes***	***Yes***	***Yes***	***Yes***
Cold crystallization	–	–	–	–
Sublimation	Yes	Yes	Yes	Yes
Melting	–	Yes	–	–
Vaporization	–	Yes	–	–

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 Engineering, University of Toyama
Gofuku 3190, Toyama 930-8555, Japan

In 2010, a relationship between anti-biofouling properties of an amphoteric polymer brush on a glass substrate and a water structure in the vicinity of the polymer brush was examined.

1. Anti-biofouling Properties of Polyamphoteric Polymer Brush.

An amphoteric copolymer brush of methacrylic acid (MA) and 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA) was prepared by reversible addition-fragmentation chain-transfer (RAFT) polymerization using both a free chain transfer agent (*n*-butylsulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-methyl propionic acid) and a radical initiator (4,4' -azobis(4-cyanopentanoic acid)) covalently fixed to a glass substrate. An aqueous solution of the copolymer, Poly(MA-*r*-DMAEMA), which was simultaneously obtained in liquid phase, had a sufficiently small polydispersity in its molecular weight. The copolymer brush showed effective suppression of non-specific adsorption of albumin (bovine serum) and lysozyme (egg white) to the brush. In contrast, both negatively charged PolyMA and positively charged PolyDMAEMA brushes significantly adsorbed the proteins irrespective of their net charges. Upon ion beam irradiation, furthermore, a hollow space with a designed shape could be made on the glass substrate, and both HEK293 and HepG2 cells non-specifically adhered to the space, forming aggregates, while no adhesion to the non-treated area on the brush was observed. These results suggest that the amphoteric polymer brushes will be useful materials for biomedical applications.

2. Structure of Water in the Vicinity of Amphoteric Polymer Brush As Revealed by Sum Frequency Generation Technique.

A polyampholyte brush was prepared on the surface of quartz prism by the surface-initiated reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization (RAFT) of MA and DMAEMA at a monomer ratio of 1 : 1. The sum frequency generation (SFG) method indicated that water molecules at the amphoteric polymer brush-water interfaces were not largely oriented in comparison with those at the surface of both bare and the initiator-modified quartz prisms. Furthermore, water molecules at the surface of amphoteric polymer brush were relatively less oriented than that at the surface of negatively charged PolyMA and positively charged PolyDMAEMA brushes. The small perturbation effect of amphoteric polymer brush on the structure of vicinal water was in accordance with the tendency of aqueous solution and thin films of amphoteric polymers observed by using Raman and infrared spectroscopies, respectively. Since the amphoteric polymers are biocompatible, the importance of small perturbation effect on the interfacial water to afford biocompatibility to any materials was suggested.

3. Change in the State of Water Sorbed into Various Poly(meth)acrylates by thermal Perturbation.

State change of water sorbed into four poly(meth)arylates (poly(methylacrylate), poly(*n*-butylmethacrylate), poly(2-ethoxyethylacrylate) and poly(2-ethoxyethylmethacrylate)), which are not blood-compatible, by temperature perturbation was examined by temperature variable FT-IR. According to previous reports on the basis of DSC experiments, all of water in the four polymers is "non-freezing water". However, contrary to this, various changes in the state of water such as condensation, freezing, and vapor deposition during cooling, and recrystallization (revapor deposition), sublimation, melting, and vaporization during heating were observed. Among these state changes, recrystallization of water has been proposed to be the KEY for biocompatibility of polymeric materials. However, the present results did not give a clear relation between recrystallization phenomenon and their biocompatibilities.

業績リスト

１．原著論文

1) Gemmei-Ide, M.; Ohya, A.; Kitano, H. “Thermally Latent Water in a Polymer Matrix” J. Phys. Chem. B 114, 4310-4312 (2010).

2) Miki, R.; Kimura, S.; Ueda, H.; Shimamura, T.; Numajiri, S.; Seki, T.; Juni, K.; Kitano, H.; Morimoto, Y. “Suitability of Synthetic Copolymer Membranes as a Human Skin Alternative for In Vitro Skin Permeation Testing” Alternatives to Animal Testing and Experimentations (AATEX), 15, 14-27 (2010).

3) Okubo, T.; Suzuki, H.; Kitano, H.; Ohno, K.; Mizutani, M.; Tsuchida, A. “Drying dissipative structures of colloidal crystals of silica spheres coated with polymer brushes of poly(carboxymethyl betaine)” Colloid Polym. Sci., 288, 1233-1243 (2010).

4) Okasaka, Yu; Kitano, H. “Direct spectroscopic observation of binding of sugars to polymers having phenylboronic acids substituted with an ortho-phenylazo group” Colloids Surfaces B: Biointerfaces 79, 434- 439 (2010).

5) Kitano, H.; Kondo, Y. Saito, D.; Gemmei-Ide, M.; Morita, H.; Kanayama, N. “Recognition of peptide inhibitor by β-secretase at an exterior surface of SAM” Colloids Surfaces B: Biointerfaces 78, 155-162 (2010).

6). Kitano, H.; Suzuki, H.; Matsuura, K.; Ohno, K. “Molecular Recognition at the Exterior Surface of Zwitterionic Telomer Brush” Langmuir 26, 6767-6774 (2010).

7) Kitano, H.; Kondo, T.; Suzuki, H.; Ohno, K. “Temperature-Responsive Polymer Brush Constructed on a Glass Surface by Atom Transfer Radical Polymerization” J. Colloid Interface Sci. 345, 325-331 (2010).

8) Suzuki, H.; Murou, M.; Kitano, H.; Ohno, K.; Saruwatari, Y. “Silica particles coated with zwitterionic polymer brush: Formation of colloidal crystals and anti-biofouling properties in aqueous medium” Colloids Surfaces B: Biointerfaces, 84, 111-116 (2011)

9) Kitano, H.; Suzuki, H.; Kondo, T.; Sasaki, K.; Iwanaga, S.; Nakamura, M.; Ohno, K.; Saruwatari, Y. “Image Printing on the Surface of Anti-biofouling Zwitterionic Polymer Brush by Ion Beam Irradiation” Macromol. Biosci., 11, 557-564 (2011)

２．著書・総説

1) Kitano, H.; Gemmei-Ide, M. “Structure of Water in the Vicinity of Amphoteric Polymers As Revealed by Vibrational Spectroscopy” J. Biomater. Sci., Polym. Ed. 21, 1877-1893 (2010).

３．会議発表

1) Kitano, H.; Suzuki, H.; Matsuura, K.; Ohno, K. “Molecular Recognition at the Exterior Surface of Zwitterionic Telomer Brush” Pacifichem 2010, Honolulu (2010).

2) Kitano, H.; Hayashi, A.; Kanayama, N.; Saruwatari, Y. “Anti-biofouling Properties of a Telomer Brush with Pendent Glucosylurea Groups” Pacifichem 2010, Honolulu (2010).

3) Kondo, T.; Kitano, H.; Ohno, K. “Anti-biofouling Properties of Amphoteric Polymer Brush Constructed on a Glass Substrate” Pacifichem2010, Honolulu (2010).

ソフトインターフェースの高分子鎖構造直接観察と解析

研究代表者：山形大学大学院理工学研究科　熊木治郎

１．緒言

高分子が形成する多彩なインターフェースの構造・特性を知る上で、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、極めて有用であると考えられる。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が、現在でも構造・特性については不明な点が多い。我々は、原子間力顕微鏡（AFM）を用いて、高分子単分子膜を分子レベルで検討し、構造・特性を明らかにする検討を進めている。また、ソフトインターフェースは各種環境に応じてフレキシブルに応答する界面であり、その挙動を AFM で検討するためには、in situ で各種環境下（温度、高湿度、溶媒蒸気等）で分子レベルで観察することも重要であり、これについても検討を進めている。

我々は既に、①isotactic poly(methyl methacrylate) (it-PMMA)が形成する２次元折りたたみ鎖結晶の融解挙動を検討し、in situ で分子鎖レベルの融解が観察できること、また融点が３次元固体に比べて数十度低下していることを見出し報告している。本年度は、融点低下に及ぼす基板の影響を検討したので報告する。また、②poly(n-nonyl acrylate)/PMMA 系多成分単分子膜は、低表面圧では相溶系であり、PNA に可溶化された PMMA の分子鎖を観察できることを見出している。本年度は、分子鎖の広がりの分子量依存性について検討を進めたので報告する。

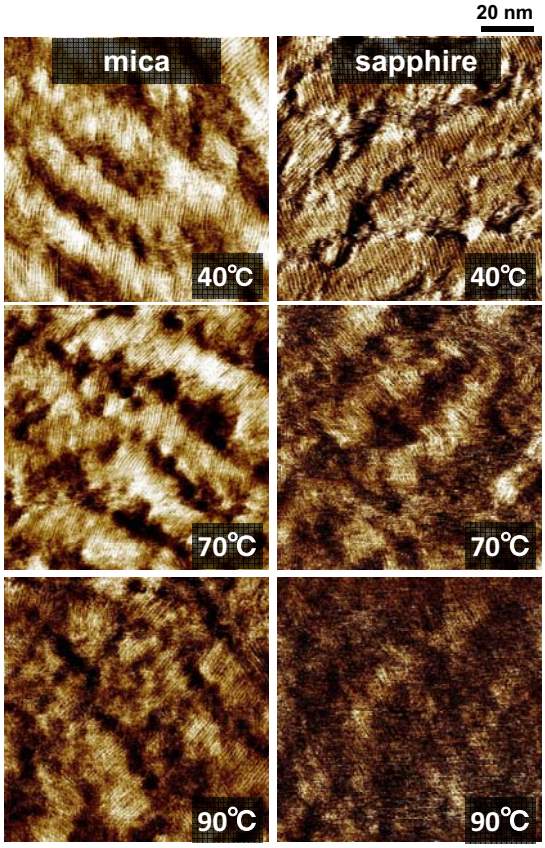


図１. it-PMMA(Mn:176K)２次元折りたたみ鎖結晶の高倍 AFM 位相像．基板:(左)マイカ，(右)サファイア．(in-situ 観察)

２．研究経過

(1) ＰＭＭＡ２次元折りたたみ鎖結晶の溶融挙動

it-PMMA は、水面上で単分子膜を形成し、膜を圧縮すると結晶化して、２次元折りたたみ鎖結晶を形成する。我々は、その構造を分子鎖レベルで直接 AFM 観察できることを見出して報告している[1]。この結晶は、２次元結晶であり、３次元状態の結晶と構造・特性等が大きく異なることが予想される。事実、高温 AFM を用いて、in situ で融解挙動を観察すると、融点がバルクに比べて、数十度低下していることを見出している。この低下の原因を検討するために、基板の影響について評価を行った。図 1 には、it-PMMA(M_n=176k)の２次元折りたたみ鎖結晶を、マイカ、サファイア基板にそれぞれ１層積層し、融解挙動を高温 AFM を用いて in situ 観察した結果を示した。低温では、ラメラに垂直な方向に分子鎖が約 1.2nm の間隔でパッキングして折りたたみ鎖結晶を形成していることが観察される。温度を上げると、マイカでは９０℃近傍で融解が開始するが、サファイア基板を用いた場合は、９０℃でほぼ完全に融解しており、４０˚C 以上の温度で既に融解が始まっていることが分かる。図２には、AFM 像のラメラの幅、結晶面積率（AFM 像で結晶が占める面積、結晶化度の目安）をプロット

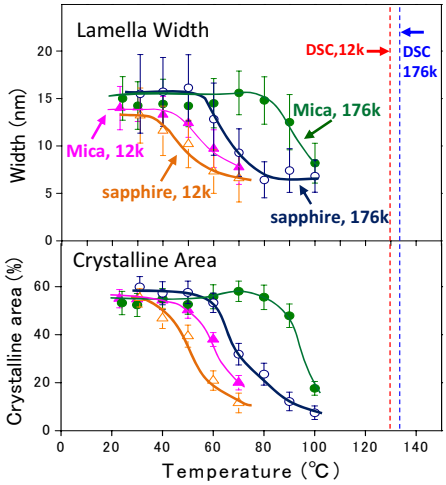


図 2. it-PMMA ２次元折りたたみ鎖結晶の融解挙動の分子量、基板依存性．(上)ラメラ幅、(下)結晶化度．

した。示差走査熱量計(DSC)で測定した３次元の融点も合わせて示した。①高分子量体(176k)、低分子量体(12k)とも、bulk に比べて大幅に融点が低下しており、特に低分子量体で低下の度合が顕著である。②マイカとサファイア基板の結果を比較すると、いずれの分子量の場合も、サファイア基板の方が融点の低下が大きいことが分かる。表１に観察された融点をまとめた。

	T_m (°C)	
	Mn:176k	Mn:12k
mica	90	50
sapphire	60	40
bulk	134	131

表 1. it-PMMA の２次元（マイカ、サファイア基板）、３次元結晶の融点.

２次元結晶の融点降下の原因として、薄膜になったことによる表面自由エネルギーの効果だけでなく、基板の影響を大きく受けることが明らかになった。今後、基板の表面自由エネルギーを系統的に変化させ、基板が２次元結晶の融点に与える影響を明確化したいと考えている。

なお、in-situ AFM で昇温して結晶融解を観察した後、降温時の再結晶化を観察すると、両者にほとんどヒステリシスがなく、本研究で観察している融解過程は結晶の単なる崩壊過程を見ているのではなく、可逆的な転移（２次元融点）を測定していることを確認している。

本研究は、高分子結晶の融解挙動を in situ で分子レベルで観察できること、また２次元結晶の融点が３次元結晶に比べて大幅に低下することを初めて示したものであり、２次元結晶の融解挙動をさらに検討することで、基板上の超薄膜の性質をより明確化できるものと期待される。

(2) 相溶系ポリマーブレンド単分子膜に可溶化した高分子鎖の直接観察

高分子単分子膜は、機能膜として精力的に研究が行なわれてきたが、現在でも膜中の高分子鎖のパッキングという高分子材料にとって最も基本的なことが明確ではない。分子鎖パッキングを明確にするためには、直接 AFM で観察するのが最も有効であるが、主鎖の太い特殊なポリマーを除いて、汎用の高分子を観察することは、AFM の分解能の制約のために、現在でも不可能である。

我々は、PMMA（Tg=105℃）と poly(n-nonyl acrylate)(PNA) (Tg=-89℃)（いずれも atactic）が、低表面圧（<17mN/m）では分子相溶した均一膜を形成することを見出しており[2]、また、PMMA 少量添加組成では、柔らかい PNA マトリックスに可溶化した PMMA 孤立鎖が AFM で観察できることを見出している。この系を使えば、従来検討することができなかった２次元膜中での高分子鎖のパッキングを明確化できる可能性がある。

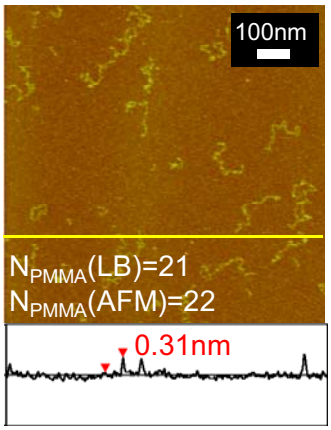


図 3. マイカに１層積層した PMMA(292K)/PNA(13K)=1/100 単分子膜の AFM 高さ像。

図３に、均一一相領域の PMMA/PNA(1/100 wt/wt)単分子膜の AFM 高さ像を示した。高さの高い鎖状物は、①LB 積層条件から予想される PMMA 分子数と一致すること、②サイズの妥当性から、PNA 中に可溶化された PMMA 孤立鎖であると結論できる。マトリックスの分子量を一定(PNA(13K)）にして、PMMA 鎖の回転半径を PMMA の分子量を変えて観察した結果を図４に示した。分子の回転半径は分子量の 0.45 乗であり、２次元の理想鎖の指数 0.5 に近いが、２次元の理想鎖(３次元の理想鎖の２次元投影)に比べて面積で４～６倍と大きく広がっており、マトリックスの PNA 分子と強く相互侵入していることが分かる。これは、de Gennes が予想した個々の分子鎖が強く凝集して segregate した２次元膜の構造とは著しく異なっている。また、PMMA の広がりは、マトリックスの PNA の分子量の影響を全く受けず、３次元とは異なる特異な挙動をとることも確認している。

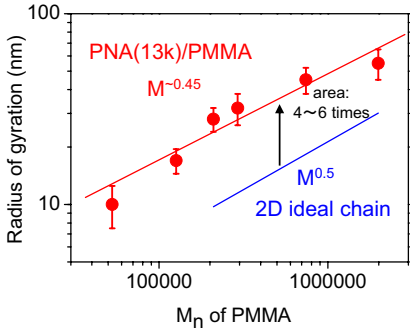


図４. PMMA/PNA(13K)単分子膜中の PMMA 鎖の回転半径の PMMA 分子量依存性.

本系は、相溶性ポリマーブレンド膜に可溶化したポリマー鎖を AFM で観察した初めての例である。ここで検討している系は、単一のポリマー系ではなくブレンド系であり、そのためにこのような特異な分子鎖の広がりを示している可能性もあるが、マトリックスポリマーの種類を系統的に変えること等により、今後２次元膜の構造を明確化できるものと考えている。

文献 (1) J. Kumaki, T. Kawauchi, E. Yashima, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5788.
(2) Y. Sasaki, N. Aiba, H. Hashimoto, J. Kumaki, *Macromolecules* **2010**, *43*, 9077.

Direct Observation and Analysis of Polymer Chain Structures in Soft Interfaces

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

4-3-16, Jonan, Yonezawa, Yamagata 992-8510, Japan.
Tel/Fax: +81-238-26-3071, E-mail: kumaki@yz.yamagata-u.ac.jp

In order to understand the structures and functions of polymer interfaces, it should be helpful to study polymer monolayers as the ultimate two-dimensional (2D) structure of the interface. Polymer chains with an appropriate hydrophilic group in the repeating unit are known to spread on a water surface as a monolayer, which is an ideal model of polymer chains in the 2D states, therefore, have been the subject of intense studies. However, our understanding of the polymer monolayers is still limited. For these several years, we have been studying polymer monolayers using atomic force microscopy (AFM) and have shown that the method is a powerful tool to obtain molecular level information that cannot obtained by other methods. In this study, we investigated (1) substrate effect on the melting point depression of a 2D folded-chain-crystal of isotactic poly(methyl methacrylate) (it-PMMA) and (2) the radius of gyration of PMMA chains solubilized in a miscible polymer blend monolayer.

(1) Substrate effect on the melting point depression of the 2D folded-chain-crystal of it-PMMA

Previously, we reported that it-PMMA spread on a water surface crystallized to form 2D folded-chain crystals upon compression, the molecular image of which could be successfully resolved by AFM (Kumaki et al, *JACS* **2005**, *127*, 5788). Since, properties of the 2D crystal might be very different from those of the 3D crystal, we studied melting behavior of the 2D crystal deposited on mica in situ using a high-temperature AFM, and found that the melting point of the 2D crystal was 40-80 degree lower than the bulk crystal. In this study, we investigated substrate effect on the melting point depression of the 2D crystal. As shown in Table 1, the melting point depression was more significant when the 2D crystal was deposited on sapphire, indicating that the melting point depression is surely affected by the substrate, in addition to surface free energy effect due to reduction of the thickness of the crystal. Systematic evaluation of the substrate effect may improve our understanding of the 2D films.

		T_m (°C)	
		Mn:176k	Mn:12k
2D crystal	on mica	90	50
	on sapphire	60	40
3D crystal		134	131

Table 1. Melting point of 2D folded-chain crystals of it-PMMA prepared by Langmuir-Blodgett technique on mica and sapphire, determined by high-temperature AFM, along with that of 3D crystal measure by DSC.

(2) Radius of gyration of PMMA chains solubilized in a miscible polymer blend monolayer

Polymer monolayers are extensively studied for possible application for functional ultra-thin films, however, basics of the monolayer such as chain packing are still not clear. Direct observation of the chain packing by AFM is most promising way, but the present resolution of AFM is not sufficient to resolve them except for extraordinarily thick polymers. Recently, we found a polymer blend monolayers composed of PMMA and poly(n-nonyl acrylate) (PNA) are miscible at low surface pressures (Kumaki et al, *Macromolecules* **2010**, *43*, 9077), and PMMA single chains solubilized in PNA monolayer were visualized by AFM. In this study, we evaluated the radius of gyration (R_g) of the PMMA chain in PMMA/PNA monolayer, and found it scaled on the molecular weight as $Rg \sim M^{0.45}$, the scaling of which is close to that of 2D ideal chain, but the chains significantly interpenetrated to the PNA chain, and spread several times wider than the 2D ideal chain. This result is very different from de Gennes's highly segregated model for 2 D polymer film.

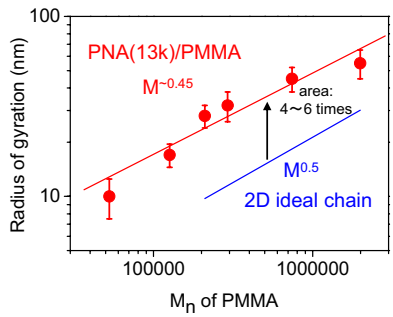


Figure 1. Scaling of Radius of gyration of 2D PMMA chains solubilized in PNA(13K) monolayer. The radius of gyration of the 2D ideal chain is also indicated.

業績リスト

１．原著論文

1) N. Aiba, Y. Sasaki, *J. Kumaki, “Strong Compression Rate Dependence of Phase Separation and Stereocomplexation between Isotactic and Syndiotactic Poly(methyl methacrylate)s in a Langmuir Monolayer Observed by Atomic Force Microscopy”, *Langmuir* **2010**, *26*, 12703-12708.

2) Y. Sasaki, N. Aiba, H. Hashimoto, *J. Kumaki, “Reversible Hierarchical Phase Separation of a Poly(methyl methacrylate) and Poly(n-nonyl acrylate) Blend in a Langmuir Monolayer”, *Macromolecules* **2010**, *43*, 9077-9086.

3) *J. Kumaki, T. Kajitani, K. Nagai, K. Okoshi, E. Yashima, “Visualization of Polymer Chain Conformations in Amorphous Polyisocyanide Langmuir-Blodgett Films by Atomic Force Microscopy”, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5604-5606. *Highlights in Nature Asia Materials*, June 7, 2010.

２．会議発表

1) 高梨ゆま、熊木治郎、イソタクチック PMMA 二次元折りたたみ鎖結晶の融解挙動、第５９回高分子学会年次大会、パシフィコ横浜、横浜（2010）.［国内学会　ポスター］

2) 杉原孝樹、熊木治郎、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、第５９回高分子学会年次大会、パシフィコ横浜、横浜（2010）.［国内学会　ポスター］

3) J. Kumaki, “High-Resolution Atomic Force Microscopy of Helical Polymers in Langmuir-Blodgett Films”, Chirality 2010 (ISCD-22), Sapporo, Japan, July 13-15, 2010.［国際学会　口頭］

4) 熊木治郎、高分子 LB 膜の高分解能原子間力顕微鏡観察、高分子学会 10-1 高分子表面研究会、東京（東京理科大）(2010-10-22).［招待講演］

5) 熊木治郎、高分子の原子間力顕微鏡観察、高分子学会 10-5 ポリマーフロンティア２１、東京（東京工業大学）(2011-1-28).［招待講演］

6) 高梨ゆま、熊木治郎、AFM によるイソタクチック PMMA 二次元折りたたみ鎖結晶の融解挙動観察、第５９回高分子討論会、北大、札幌(2010).［国内学会　口頭］

7) 杉原孝樹、橋本紘志、熊木治郎、高分子多成分単分子膜の可逆的な階層的相分離形成、第５９回高分子討論会、北大、札幌(2010).［国内学会　口頭］

8) 柴田恒一郎、中野遼、川口正剛、熊木治郎、基板上における気相ラジカル重合の AFM 観察、2010 高分子学会東北支部研究発表会、山形大、米沢(2010.11.18-19).［国内学会　口頭］

３．新聞発表

1) 知の最前線･山形大大学院理工学研究科(43) 熊木治郎研究室（教授、原子間力顕微鏡による高分子鎖観察）、山形新聞　(2011-9-6).

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**したいと考えて研究を行っている。**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、また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。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、独自な領域を拓いている。また、**ポリヒスチジンタグによる表面への酵素分子の配向固定化法を開発**し、酵素のサブユニットを表面に配向固定化し、基質存在下で相互作用を測定し、**酵素−基質複合体の相互作用を初めて直接的に観測**している。

本研究課題では、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を行い、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)。

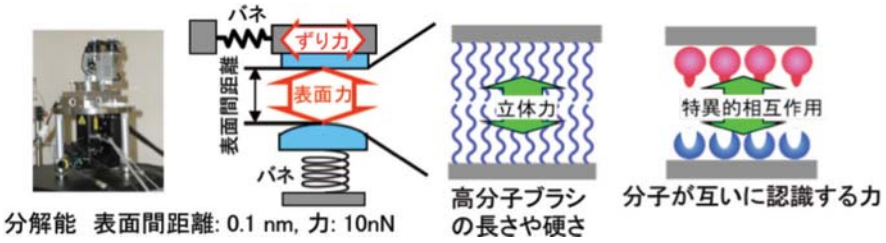


図 1 表面力測定と研究対象としている相互作用力の模式図

２．研究経過

本年度は、昨年度に研究を開始した枯草菌の胞子形成時に機能するホスホリレーシグナル伝達系に属するセンサータンパク質である KinA の活性化状態と不活性状態において、シグナル伝達中間体である Spo0F との相互作用の評価について、ひきつづき検討を進めた。また、研究代表者らが開発した不透明試料の評価が可能であるツインパス型表面力装置を用いて、領域内で研究されている高分子ブラシの一例である金表面に調製したポリエチレングリコール(PEG)チオール自己組織化膜(SAM)の評価を開始した。

(1) ホスホリレーシグナル伝達タンパク質間相互作用の直接測定

生体は外部環境の変化に適応するために、DNA やタンパク質を複雑に相互作用させ、機能を発現している。例えば、枯草菌は栄養環境の悪化を感知すると、胞子を形成するシステムを有する。枯草菌が胞子を形成する際に機能するホスホリレーシグナル伝達系は、ATP により自己リン酸化された KinA (KinA-P) から Spo0F に渡されたリン酸基がさらに他のシグナル伝達タンパク質へ次々と受け渡してゆくことで胞子形成遺伝子群の発現誘導を行うプロセスである (図 2)。リン酸基伝達は補因子 Mg^{2+}、Ca^{2+}を含む溶液中で in vitro の活性が報告されているが [1)]、反応素過程の詳細は解明されていない。本研究では、コロイドプローブ原子間力顕微鏡 (AFM) を用いてセンサータンパク質である KinA のリン酸化、非リン酸化状態における KinA/Spo0F 間相互作用の直接測定を行った。

図 2 ホスホリレーシグナル伝達系

(i) 同一タンパク質間相互作用の評価

まず、KinA/KinA、Spo0F/Spo0F 間の相互作用力の pH 依存性を測定し、それぞれの表面の荷電状態、等

電点を評価し、表面への固定化のタンパク質の構造に対する影響を調べた。KinA 固定化表面間では、pH 5.5～pH 4.6 で電気二重層斥力がほぼ消失し、この pH 以上、および以下では電気二重層斥力が観測された。これより、表面に固定化した KinA の等電点は 5.5～4.6 と考えられる。KinA の一次構造から予測される等電点は 5.5 であることから、KinA が変性せず、構造を保ったまま固定化できたと考えられる。Spo0F 同士の表面力曲線では、pH 4.7～4.3 で電気二重層斥力の消失が観察され、Spo0F の一次構造から予測される等電点は 4.7 であるため、Spo0F も同様に構造を保ったまま固定化できたと考えられる。

(ii) KinA/Spo0F 間相互作用の評価

KinA/Spo0F 間における接近時の表面力曲線では、補因子 Mg^{2+}、Ca^{2+}、および ATP の添加、非添加にかかわらず電気二重層斥力のみ検出され、特異的な相互作用変化は得られなかった。図 4 に引き離し時に観測された典型的な表面力曲線を示す。補因子 Mg^{2+}、Ca^{2+}非存在時においては ATP の添加により相互作用変化が見られなかったが (図 4(a))、補因子存在下では (図 4(b))、ATP 非添加時の平均接着力が 0.049 ± 0.125 mN/m であるのに対し、ATP 添加時は 0.092 ± 0.045 mN/m であった。これは、KinA が補因子および ATP の添加によってリン酸化されたことにより、KinA/Spo0F 間に特異的な相互作用が生じたためと考えられる。

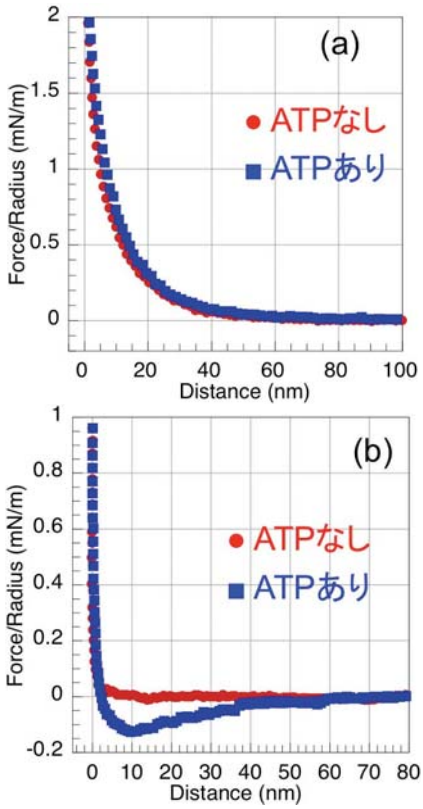


図 4 リン酸化/非リン酸化状態における KinA-Spo0F 間の表面力曲線(引き離し) (a) Mg^{2+},Ca^{2+}なし (b) Mg^{2+},Ca^{2+}あり。

(2) 表面力測定による金基板に吸着した PEG チオール SAM の吸着特性評価

PEG による表面修飾は、タンパク質吸着の抑制に用いられており、その吸着構造と抑制効果の相関の解明は重要な課題である。PEG 修飾表面の調製にはいくつかの方法があり、金基板に SH 基との結合により自己組織化膜を調製する方法が一般的に用いられている。今年度は、表面力測定に使用可能なナノメートルレベルで平滑な金基板の調製、およびチオールを末端にもつ PEG 鎖による金基板表面の修飾を水晶発振子マイクロバランス法(QCM)により確認し、表面力測定を開始した。

(i) 表面力測定のための金表面の調製: 表面力測定で距離依存性を精密に議論するためには、大面積で平滑な基板の調製が必要となる。今回、SAM 膜調製基板として用いる金表面を以下の方法で調製を行った。原子レベルで平滑な雲母劈開面に金を蒸着し、金表面側を表面力装置で用いる半円柱形状の石英ディスクにエポキシ樹脂で貼り付けた後、雲母シートのみを剥離することで、2 乗平均粗さが 0.2 nm 程度の平滑な金表面を得た (図 5)。つぎに、得られた金表面間の $KClO_4$ 水溶液中の表面力曲線を測定したところ、遠距離からの指数関数に従う斥力、および距離 30 nm 程度からの引力(Jump-in)が観測された。斥力の減衰長は 0.1 mM 中で 29.7 ± 1.5 nm, 1 mM 中で 9.2 ± 0.2 nm となり、デバイ長(0.1 mM: 30.4 nm, 1 mM: 9.6 nm)と一致したことから、電気二重層斥力であることが確認された。一方、近距離の引力(Jump-in) は van der Waals 力によると考えられる。これらの結果から作製した金表面は清浄・平滑で表面力測定に使用可能であることが確かめられた。

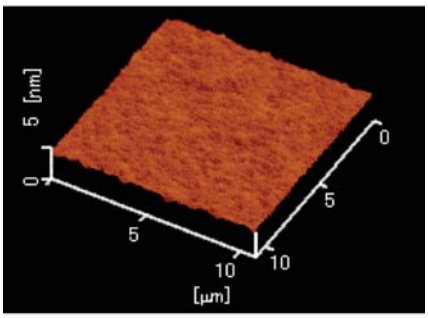


図 5 調製した金表面の AFM 像

(ii) 金表面に吸着した PEG ブラシ層の構造評価: 上記の金表面を用いて、チオール基を末端にもつ PEG の吸着膜を調製し、純水中で表面力測定を行い、PEG 鎖による立体斥力を観測し、その構造評価を開始した。水晶発振子マイクロバランス(QCM)、および表面プラズモン共鳴分光法による PEG 鎖の構造評価と合わせて、PEG 鎖の構造を詳細に評価し、分子量依存性についても検討を進める。

Soft Interfaces with Immobilized Biofunctional Molecules Studied 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

This research aims to elucidate the properties of biofunctional molecules using the surface forces measurement as a main tool, and contribute to the soft interface science in a flame of biofunctional chemistry. Molecular recognition is one of the most important specific interactions involved in biological reactions. It is essential to distinguish (1) interacting protein pairs, (2) how they recognize each other, (3) locations and sequence of an interaction site, and (4) 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 poly-histidine tagged 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 study, we applied this method for phosphorelay protein interactions. We also started the study on the adsorption of thiol-terminated poly (ethylene glycol) polymers (PEG) on a gold surfaced using twin-path surface forces apparatus, quartz crystal microbalance (QCM) and surface plasmon resonance spectroscopy.

(1) Study of phosphorelay protein interactions by surface force measurement

The *Bacillus subtilis* KinA protein is a histidine protein kinase that controls sporulation in response to nutrient deprivation and several other conditions. In the first step of this series of phosphorylation reactions, KinA binds ATP and autophosphorylates at a histidine residue. The phosphoryl moiety on KinA is then transferred to a single-domain response regulator Spo0F. In this year, we started the study on the interactions between KinA and Spo0F using a colloidal probe AFM. KinA and Spo0F having six histidines at the *N*-terminus were overproduced in *E. coli*, and immobilized on glass substrates using Langmuir Blodgett deposition films of a chelate amphiphile. The condition of surface modification was determined using quartz crystal microbalance and AFM images. The effect of divalent ions of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the interaction forces between KinA and Spo0F were investigated.

(2) Characterization of Thiol-Terminated Poly(ethylene glycol) (PEG) Adsorbed on Gold Surfaces Using Twin Path Surface Force Apparatus.

We characterized the adsorption layer of thiol-terminated poly (ethylene glycol) polymers (PEG) of different molecular weights on a gold surface in pure water using twin-path surface force apparatus (Twin-Path SFA). We also performed the quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D), and surface plasmon resonance (SPR) on these adsorbed PEG. From these results, we discussed about structures of the PEG brushes adsorbed on gold surfaces.

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) K. Kurihara, “Polyelectrolyte Brushes Studied by Surface Forces Measurement”, *Adv. Colloid Interface Sci.* **158**, 130-138 (2010).
2) H. Matsubara, F. Pichierri, and K. Kurihara, “Unraveling the properties of OMCTS under nanoscale confinement. Atomistic view of the liquid-like state from molecular dynamics simulation”, *J. Chem. Phys*. **134**, 044536-1-12 (2011).
3) 水上雅史, 杉原 理, 山辺秀敏, 安東勲雄, 黒川幸子, 栗原和枝, “表面力装置による金属-高分子接着の評価2”, *色材協会誌*, **84**, 87-91 (2011).
4) T. Kamijo, M. Kasuya, M. Mizukami, and K. Kurihara, “Direct Observation of Double Layer Interactions between the Potential Controlled Gold Electrode Surfaces Using the Electrochemical Surface Forces Apparatus”, *Chem. Lett.*, **40**, 674-675 (2011).
5) D. Fukushi, M. Kasuya, H. Sakuma, K. Kurihara, “Fluorescent Dye Probe for Monitoring Local Viscosity of Confined Liquids”, *Chem. Lett.*, in press.

２．著書・総説

1) 水上雅史, 栗原和枝, “共振ずり測定に基づく液体ナノ潤滑のモデル化”, *トライボロジスト*, **55**, 24-30 (2010).
2) 粕谷素洋, 栗原和枝, “表面力測定による有機-無機固体表面の評価”, *セラミックデータブック 2010*, **38**, 121-124 (2010).
3) 中野真也, 栗原和枝, “表面力測定の原理とその応用展開”, *ふぇらむ*, **15**, 36-37 (2010).
4) 粕谷素洋, 水上雅史, 栗原和枝, “束縛液体の科学”, *現代界面コロイド科学の辞典*, 2 章 5 節, 丸善, 52-53 (2010).
5) 粕谷素洋, 栗原和枝, “表面力測定”, *現代界面コロイド科学の辞典*, 3 章 13 節, 丸善, 106-107 (2010).
6) 水上雅史, 栗原和枝, “ナノレオロジー・ナノトライボロジー”, *CSJ カレントレビュー04 界面の分子科学*, 13 章, 化学同人, 144-150 (2011).

３．会議発表（招待講演）

1) 栗原和枝, “生体機能分子に関する表面力測定”, 第 20 回バイオ・高分子シンポジウム, 東京大学先端科学技術研究センター (東京) 2010/7/28.
2) 栗原和枝, “表面力測定による材料のナノ物性計測”, 北海道大学グローバル COE 物質科学イノベーション講演会, 北海道大学 (札幌) 2010/11/4.
3) K. Kurihara, “Hydrogen-bonded Molecular Macrocluster Formation on Silica in Binary Liquids”, 18th International Symposium on Surfactants in Solution, Melbourne, Australia, 2010/11/17 (Plenary lecture).
4) K. Kurihara, “Surface forces measurement for materials nano-technology”, The 9th Japan-France Workshop on Nanomaterials, Toulouse, France, 2010/11/25.
5) K. Kurihara, “Surface forces measurement for nano-materials science”, Workshop Honoring Professor Kazue Kurihara, Paris, France, 2010/11/29.
6) M. Mizukami, “Surface Forces Study on Organization of Liquids Adsorbed at Solid-Liquid Interfaces in Binary Liquid Mixtures”, The third workshop on frontier materials and processes, Albi, France, 2010/12/9.
7) K. Kurihara, “Surface Forces Measurements to Evaluate Biological Molecular Recognition”, Pacifichem 2010, Honolulu, Hawaii, 2010/12/18.
8) K. Kurihara, “Surface Forces Measurement for Nano-Materials Science”, A. E. Alexander Lectureship2011, The Fifth Biennial Australian Colloid & Interface Symposium, Hobert, Australia, 2011/1/31.
9) K. Kurihara, “Surface Forces Measurement for Nano-Materials Science”, A. E. Alexander Lectureship2011, University of Sydney, Australia, 2011/2/4.
10) K. Kurihara, “Surface Forces Measurement for Green Nanomaterials Science”, The 2011 WPI-AIMR Annual Workshop, Sendai, Japan, 2011/2/23.

４．その他　（例えば特許など）

受賞

Kazue Kurihara, A. E. Alexander Lectureship Award, Chemical Society of Australia (2011/1).

アウトリーチ活動

1) 栗原和枝, “分子の間の力を測る”, 出前講座「ユニバーサイエンス」, 山形県立山形西高校
2) 栗原和枝, “表面力測定”, 仙台電波高専の生徒への表面力測定の講義, 東北大学

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バイオメディカル研究部門・佐藤　縁

研究分担者：産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門・吉岡恭子

１．緒言

電極表面や固体基板表面を機能性有機分子薄膜で直接修飾し、基板とその上の修飾層を分子認識の場として機能させる研究が活発に行われている。疾病マーカーなど、検出したい生体分子を感度良く実サンプルから取得し検出するためには、生体分子の持つ、ある分子種との特異的な相互作用を利用して検出する場合が多い。その際、１）認識部位（膜側）-生体分子（検出側）との相互作用が弱いこと、２）特異性、選択性の維持、３）夾雑物質による応答の妨害、など、各種の問題があり、また、4)基板の性質と単分子膜の安定な構築についても細かく検討していく必要がある。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前年度までに段階を踏んで確認し報告してきた。生体分子認識分子種と認識にあずからない分子との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、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かについて系統立てた研究を進めた結果、基板垂直方向に関しては、認識部位と非特異吸着抑制膜の高さの差はCH2ユニットで6ユニット程度、分子膜横方向に関しては、糖鎖分子が10％程度以下の時に、糖とレクチンの相互作用も強まり、反応効率も上がり、結果的に高感度認識につながることを実験的に確認できた。

このように、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たので、今年度は、これまでモデルとして検出を行ってきた植物レクチン、コンカナバリンA（Con A）から、実際に疾病マーカー候補分子として期待されている動物レクチンの一種である、ガレクチン類の高感度・高選択的な検出を行った。また、糖とレクチンの弱い相互作用が、電気化学的に膜を変化させることで強まることを確認したので、この件についても実際の測定に向けて展開を続けた。

２．研究経過

糖とレクチン（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ものである（解離定数 KD：糖−レクチン（10^{-4}〜10^{-5} 程度）、抗原−抗体（10^{-9} 程度））。糖−レクチン相互作用は、特異的な認識ではあっても、これを利用しての基板での検出については、その相互作用の弱さから非常に困難となる場合が多かった。

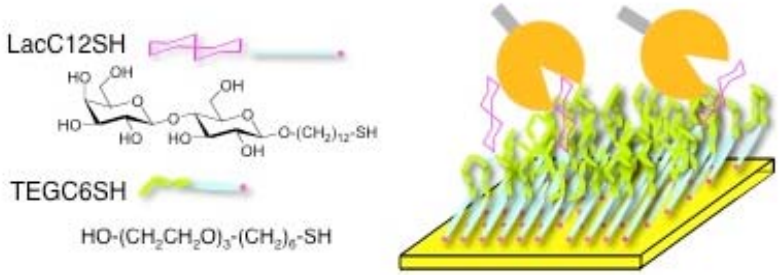


図 1.ラクトシド末端アルカンチオールの構造（左）、非特異吸着抑制分子 TEGC6SH の構造(左)、およびガレクチン認識膜モデル図(右).

このような弱い相互作用の系でも、（１）認識部位を膜内で希釈すること（5-10%）、（２）認識部位の周りを非特異吸着抑制分子で緻密、かつ自由度高く埋めるように修飾すること、（３）非特異吸着分子の垂直方向の高さは、認識部位よりも CH2 ユニットで 4-6 ユニット分低く設定すること、により比較的高

感度に検出できることを、昨年、一昨年にて実験的に確認してきた。

近年、ガンなどをはじめ各種疾病との関連や免疫関係に深く関連があると研究が進んできた、ガレクチン類を高感度かつ簡便に検出するために、これまでの知見を応用して、新たにラクトシド末端−アルカンチオール類、ガラクトシド末端アルカンチオール、ラクトサミン末端−アルカンチオール類他を設計、合成し、膜構築に用いた。図１のモデル図に示すように、末端の認識部位をラクトースとしたアルカンチオール類と、非特異吸着を抑制するためのテトラエチレングリコール（TEGCnSH）類のうち、アルキル鎖長が(CH2)6 の TEGC6SH とにより、混合吸着膜を作製した。(図 1、右図)。

ガレクチンの検出においても、認識部位である糖鎖末端分子が膜内で希釈されている方が検出効率が高いことが確認できた。消化器系のガンなどの疾病との関連の深いとされるガレクチン−4 の場合、TEGC6SH とラクトース末端分子とでで構成した膜において、膜内に 4%程度糖鎖末端を存在させた場合に最も効率的に検出可能となることを確認した。この実験結果は、これまでにモデルとして取り扱ってきたコンカナバリン A（ConA）の高感度認識の際に、認識する糖鎖を数％に膜内で希釈することで高感度認識を実現できたこととも一致した。

ガレクチン類は糖鎖を認識し結合する様式などにより、いくつかの種類に分類される。ガレクチン４，８では認識部位が 2 カ所存在し、それぞれ結合が行われる。ガレクチン−３については糖鎖との認識部位は 1 カ所であり、結合様式もガレクチン−４，８とは異なる。この認識方法の違いは、SPR 挙動にもはっきりと現れており、各ガレクチンの認識膜への結合・解離の速度定数は次のようになった（表 1)。

	Model	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Gal-3	1:1 binding	1.76E+3	1.86E-3	1.06E-6
Gal-4	Heterogeneous ligand	1. 1.30E+4	1.76E-3	1.36E-7
		2. 1.72E+5	1.45E-2	8.47E-8
Gal-8	Heterogeneous ligand	1. 8.97E+3	1.39E-5	1.55E-9
		2. 9.61E+6	2.37E-1	2.46E-8

表 1.　ガレクチン-3、4,　8 について、LacC12SH 分子（ラクトシド末端アルカンチオール）と TEGC6SH 分子混合膜上での結合・解離速度定数.（ ガレクチン-4,8 は認識部位を二つ有する）

他のガレクチン（ガレクチン−1,7,9 ほか）についても、認識に最適な糖鎖末端をいくつか検討し、アフィニティの違いなどを詳細に検討している。今後、簡便な認識・ガレクチンの種類の識別方法の提案を含めてさらに詳細に検討する予定である。

このように元々非常に弱い相互作用の糖−レクチンの認識ではあるが、分子認識膜構成時に電気化学活性基含有分子種を採用し、分子認識の際に電位を変化させることで認識部位近傍の電気化学的性質を変化させ、高感度認識が行える可能性についても新規に検討を行った。糖鎖アルカンチオールと電気化学活性部位を有するフェロセニルアルカンチオールにて混合膜を作成し、この表面を用いて Con A の認識を確認したところ、フェロセングループが酸化・還元する電位で Con A の認識が十数倍異なることを認識した。電位により膜構造全体が変化し、糖とレクチンの相互作用がより強まる形になるのか、膜の柔軟性が影響を与えているのか、現在、水晶振動子マイクロバランス法などと合わせて、膜構造と認識効果の変化について検討を引き続き進めている。

Lectin Recognition on Mixed Densified Monolayer of Carbohydrate – Tri(ethylene glycol) terminated Alkanethiol

Yukari Sato, Kyoko Yoshioka

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan
Tel: +81-2—861-6158, Fax: +81-29-861-6177, e-mail: yukari-sato@aist.go.jp

Lectins are widely utilized as tools in the field of carbohydrate biochemistry. Some lectins are well known to have specific interaction with certain carbohydrate. Especially, galectins, or beta- galactoside binding lectins, are detected deep in tumor tissue and recognized as diagnostic and prognostic markers of cancer and serious diseases. The detection of galectin has the potential to contribute usefully in clinical, biochemical and other areas. However the galectin-carbohydrate (glycan) interaction is usually very weak (KD=1E-3~1E-6) and previous reports only achieved sub-μM level detection limits. On the other hand, non-specific adsorption form the sample solution also becomes serious problems for detection of galectins. We demonstrated that carbohydrate ligand and tri (ethylene glycol) – alkanthiols (TEGCnSH) hybrid monolayers had excellent properties for recognizing the lectins.

We prepared carbohydrate ligands for recognition of lectins/galectins and tri (ethylene glycol) (TEG) terminated short alkanethiol molecules (TEGCnSH, Cn=(CH_2)n, n=2, 4, 6, and 8) for constructing ultra thin protein resistant monolayers on a gold surface. The affinity between the carbohydrate surface and certain lectins was evaluated by SPR measurements. The packing density of the each monolayer was evaluated by electrochemical measurement.

TEGCnSH was a smart amphoteric modifier that consisted of a flexible and hydrophilic arm and an alkylchain tail for constructing close packing in a monolayer. The combination of TEG terminated short alkanethiol and carbohydrate ligand in the hybrid interface contributed to the highly sensitive detection of lectins. We successfully detected nano molar level lectins (Con A and others) on the carbohydrate- TEGCnSH hybrid monolayer, even though the affinity between the lectins and carbohydrates were very weak. As regards maltoside density, we found that a 100% maltoside monolayer was unsuitable for detecting Con A, but a maltoside molecule concentration of 10% (modification condition) in the hybrid monolayers was the most suitable ratio for Con A recognition. The recognition between the Con A and maltoside group changed from monovalent binding to bivalent binding as the maltoside part was diluted in the recognition interface. Ideal multivalent recognition was achieved even in the monolayer recognition field.

We also tried to detect lectins (galectins) from the sample containing much higher concentrations of serum proteins without molecule labeling or an immunological method.

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) K. Yoshioka, Y. Sato, T. Murakami, M. Tanaka, and and *O. Niwa, “One-Step Detection of Galectins on Hybrid Monolayer Surface with Protruding Lactoside ”, *Anal. Chem.*, 82, 1175-1178 (2010).

2) T.Murakami, K. Yoshioka, Y. Sato, M. Tanaka, O. Niwa, and S. Yabuki, “Synthesis and Galectin-Binding Activities of Mercaptododecyl Glycosides Containing a Terminal beta-Galactosyl Group”, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 21, 1265-1269 (2011).

3) M. Tanaka*, T. Sawaguchi, Y. Sato, K. Yoshioka, O. Niwa, “Surface Modification of GC and HOPG with Diazonium, Amine, Azide, and Olefin Derivatives”, *Langmuir*, 27, 170-178 (2011).

２．著書・総説

１）佐藤 縁、丹羽 修「4.3 節　電気化学分析」、環境分析ガイドブック（編集委員長　原口　紘炁)、丸善 2010 年.

２）佐藤　縁（座談会形式）、「新しい局面を迎えた　界面の分子科学」日本化学会編、1 章、2011 年、化学同人.

３．会議発表

1)（依頼講演）佐藤　縁、吉岡恭子、村上悌一、田中睦生、丹羽修、“糖鎖含有ナノ相分離単分子膜表面を利用したガレクチンの検出”、第 59 回高分子討論会、札幌、2010 年 9 月 16 日.

2) 吉岡恭子、佐藤　縁、村上悌一、田中睦生、丹羽修、“3 次元ナノ相分離膜を利用したレクチンの高感度検出”、日本分析化学会第 59 年会、仙台、2010 年 9 月 17 日.

3) Yukari Sato, Kyoko Yoshioka, Teiichi Murakami, Mutsuo Tanaka, and Osamu Niwa, ″Galecin Recognition on the Carbohydrate and Tri(ethylene glycol)-Alkanethiol Densified Hybrid Monolayer″, The 61st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Nice, France, September, 30, 2010.

4) Yukari Sato, Kyoko Yoshioka, Teiichi Murakami, Mutsuo Tanaka, and Osamu Niwa, ″Sensitive and selective detection of lectins on hybrid monolayer surface with protruding carbohydrate group″, Pacifichem 2010, Honolulu, U.S.A., December, 16, 2010.

４．その他　（例えば特許など）

1) 佐藤　縁、村上悌一、吉岡恭子、丹羽　修、“タンパク質の高感度認識基板”、特願2010-257711.

2) 田中睦生、吉岡恭子、佐藤　縁、丹羽　修、“表面修飾シリコン基板”、特願2010-189219.

高分子イオン密生ソフト界面のナノ構造と機能の相関

研究代表者：京大院工学研究科・松岡秀樹

１．緒言

疎水鎖の十分に長いイオン性両親媒性ブロックコポリマーを水面上に展開すると，高分子単分子膜を形成し，イオン性の親水鎖は，高分子電解質ブラシとなる．高分子電解質ブラシは高分子イオンが密生した特殊な状況にあり，固体表面間の摩擦を著しく低下させるなど，新たな表面修飾法として注目されている．その機能発現の根本を解明するには，そのナノ構造と，形成条件や外部条件に応答した構造変化・転移を解明し，それらの相関を解析する必要がある．

我々は，弱酸性，強酸性等様々な水面高分子電解質ブラシのナノ構造とその転移について，表面圧-面積（π-A）曲線，Ｘ線反射率測定（XR）および中性子反射率測定(NR)等により系統的に研究を行い，重要な知見を蓄積している．その一つは，「絨毯層」の存在である．水面上には疎水鎖層が形成されるが，その直下の水面下にはブラシは形成されず，疎水鎖が密に吸着した絨毯層が形成される．(Fig.1)これは疎水鎖層が直接水と接触する状態は界面自由エネルギーが高くなり不利であるため，その低減のために生成するものと考えられる．その厚さは，強酸性鎖で，10Å 程度，弱酸性鎖で，15～30Å 程度である．ブラシ密度が低い，すなわち単位面積あたりのイオン性鎖の数が少ない場合は，イオン性親水鎖はすべて絨毯層形成に費やされ，ブラシ層は形成されない．ブラシ密度が十分に高い場合，絨毯層の下にブラシ層が形成される．この転移が起きる密度を我々は「臨界ブラシ密度」と呼び，強酸性ブラシの場合，0.12chains/nm^2 程度であり，ブラシ鎖長には依存しないが，添加塩濃度には依存する．弱酸性ブラシの場合は，0.3-0.5chains/nm^{2}程度であり，鎖長に依存するが，添加塩濃度にはほとんど影響されない．また，弱酸性ブラシは，添加塩濃度の増加に伴い，その厚みはいったん増加し，極大を示した後低下する傾向を示すが，強酸性ブラシの場合，臨界塩濃度(csc)と名付けた一定濃度まではナノ構造は全く影響されず，それを超えた塩濃度で急速にブラシ厚が減少し，ついには絨毯層のみの構造へ転移する．この臨界塩濃度は 0.2M 程度であり，ブラシ内のイオン濃度 2M 程度に比し，1/10 程度である．このような事実は，強イオン性，弱イオン性それぞれでブラシの形成機構が異なっていることを示唆するものと考えられる．

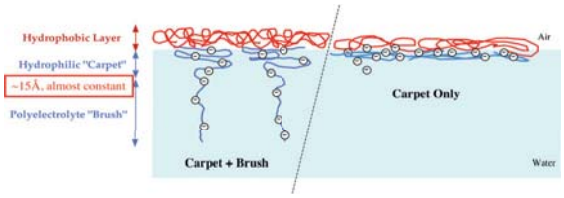


Fig.1 水面高分子電解質ブラシの絨毯層＋ブラシ層構造（左）と絨毯層 only 構造

また，ポリスチレンスルホン酸ブラシの臨界塩濃度は，添加塩のイオン種に依存し，Hoffmeister 順列と同等の $Li^+<Na^+<K^+$となることを見いだした．これは，構造形成イオンの方が，ブラシ層内に入りやすいことを意味しており，ブラシ層内の水が，高度な構造を形成している可能性を示唆するものと考えている．本研究では，絨毯層の形成や臨界ブラシ密度，臨界塩濃度の普遍性を精査するため，カチオン性のブラシについて，系統的検討を行った．また，その生体適合性の高さから，領域内で多くの研究が行われている両イオン性のベタインブラシについても検討を開始した．

２．研究経過

図 2 に示すカチオン性両親媒性ブロックコポリマーを RAFT 重合法により合成し，その水面単分子膜に対して，表面圧-面積曲線（π-A 曲線）測定および X 線反射率測定(XR)を行うことにより，カチオン性ブラシのナノ構造とその転移を検討した．やはり，絨毯層＋ブラシ層の 2 層構造形成が観察され，その普遍性が確認された．一方，NaCl 添加による csc の存在も確認できたものの，分子構造が類似する PSS ブラシの csc が 0.2M 附近であったのに対し，QBm ブラシでは，一桁低い 0.01M 附近と見積もられた．これは，PSS ブラシでは，対イオン固定度が９２％程度であるのに対し，QBm では，99%以上であることを意味する．これはカチオン性ブラシの特徴という

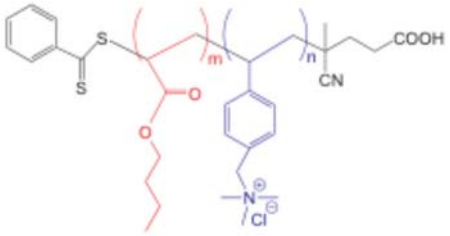


Fig.2 カチオン性両親媒性ジブロックコポリマー poly(*n*BA-*b*-QBm)

わけではなく，QBm が四級化アンモニウムカチオンであることに由来すると考えられる．四級化アンモニウムカチオンは，Na^+などが構造形成イオンとして第一種，K^+などが，構造破壊イオンとして第二種に分類されるのに対し，疎水性が高く嵩高い第三種イオンに分類されるイオンであるためと考えられる．QBm ホモポリマー水溶液の電導度測定により，対イオン固定度を見積もってみたところ，やはりかなり高い値となることが示唆され，上記解釈を支持する結果となった．なお，この単分子膜のπ-A 曲線は，専有面積が大きいところから表面圧の上昇が見られ，広いプラトー領域を経て，急激に表面圧が再上昇する特異な挙動を示した．後述のベタインブラシでも同様な傾向が見られたことから，アクリル系疎水鎖を有する単分子膜の特徴と考えられる．

ベタインブラシの研究では，図 3 に示すカルボキシベタインを親水鎖とするブロックコポリマーを用いた．カルボキシベタインモノマー(GLBT)は，計画班員である富山大学・北野教授の仲介をいただき，大阪有機化学工業社より提供を受け，ポリマーは，公募班員である兵庫県立大学・遊佐先生の助言をいただきながら，RAFT 重合法により合成した．

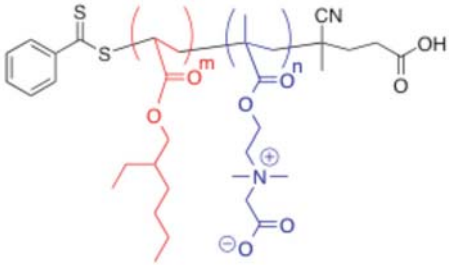


Fig.3 ベタイン含有両性両親媒性ジブロックコポリマー poly(EHA-*b*-GLBT)

このポリマーの水面単分子膜のπ-*A* 曲線を図 4 に示す．やはり大きな専有面積 *A* から表面圧の上昇が始まり，広いプラトー領域を経て，再上昇する特異な曲線となった．この再上昇部分の専有面積 A は，他のブラシ系で表面圧が上昇する領域に対応しており，ブラシ形成を示唆するものである．プラトー領域部分での構造調査のため，BAM 観察を行った．(図 4 の挿入写真)
表面圧が上昇し始めるあたりから小さな構造体（クラスター）の形成が観察され，プラトー領域では，その成長が観察された．

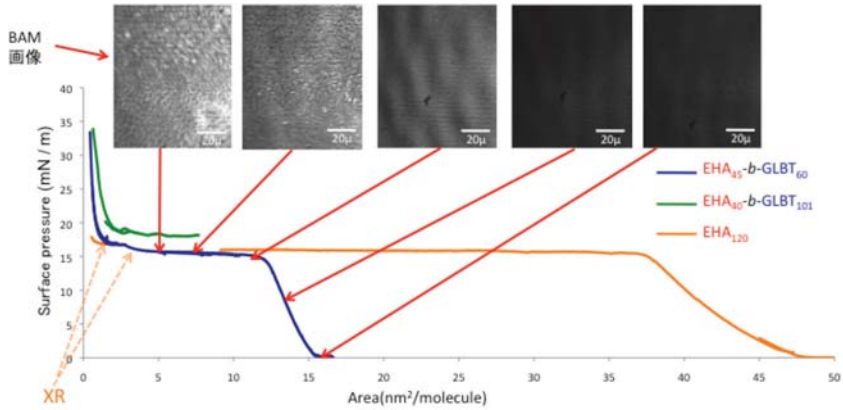


Fig.4 EHA_{120}, EHA_{45}-*b*-$GLBT_{60}$ および EHA_{40}-*b*-$GLBT_{101}$ 水面単分子膜の π-A 曲線と BAM 像．EHA ホモポリマーでもプラトー領域が観察されることから，この領域は疎水鎖由来と考えられる．

図 4 に示す 2 点にて，XR 測定を行ったところ， A=3nm^2 では，疎水層と絨毯層の二層構造，A=0.75nm^2 では，それに加え，ブラシ層の形成が確認され，この間に臨界ブラシ密度が存在することが確認された．その値は，0.75 chain/nm^2 と見積もられ，アニオン性およびカチオン性ブラシに比し，非常に高い値となった．これはベタインが両性イオンであり，分子内塩を形成しているため，実質イオン性としては振る舞っておらず，ブラシ形成が立体的要因で引き起こされていることを示唆するものと考えられる．

また，図 5 に示すように，ブラシが形成されている 2 段めの表面圧上昇部分の条件で，NaCl の添加を行ったところ，塩濃度増加に伴い，π-A 曲線は，高面積側へシフトした．これは，アニオン性およびカチオン性ブラシが低面積側へシフトしたのに対し，全く逆の傾向である．これは塩の添加による遮蔽効果により分子内塩としての性質が弱まり，イオン性としての特性が発現されてきたためと考えられる．また，この効果は，添加塩として，NaCl を用いた場合と KCl を用いた場合で，傾向は同様なものの，シフト量に大きな差異が観察された．これについては，今後，詳細に検討を進めていく予定である．

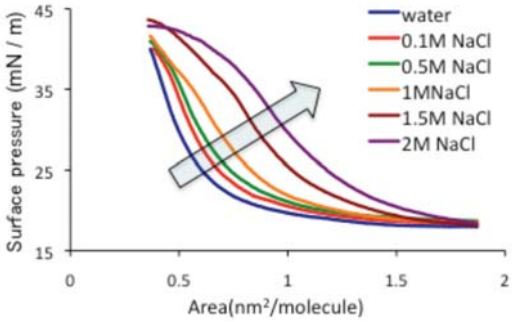


Fig.5 EHA_{45}-*b*-$GLBT_{60}$ 水面単分子膜の π-A 等温線に対する subphase への NaCl 添加効果

Correlation between Nanostructure and Functionality in Polyelectrolyte Brush Soft Interface

Hideki Matsuoka

Department of Polymer Chemistry, Kyoto University

Katsura, Kyoto 615-8510, JAPAN

Tel: +81-75-383-2619, Fax: +81-75-383-2475

Recently, we have investigated the nanostructures of poly(styrene sulfonate) (PSS) brush and poly(acrylic acid) (PAA) brush in the monolayer on the water surface 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 (Fig.1). However, quite different behavior was observed for salt concentration dependence. For PSS brush, the critical salt concentration (csc), where no structural change was observed, was found to be about 0.12 chain/nm^2, 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 lease for weakly and strongly anionic polymer brushes. Also, it was found that csc for PSS brush depends on the species of added ions; the order was $Li^+ < Na^+ < K^+$, which is the same as well-known Hoffmeister series.

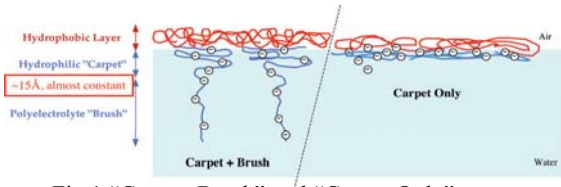


Fig.1 "Carpet+Brush" and "Carpet-Only" structure of polyelectrolyte brush at the air/water interface.

In this study, to investigate the universality and specificity of nanostrucure transition and salt effect on polyelectrolyte brush, we synthesized cationic and zwitter amphiphilic diblock copolymers by RAFT polymerization (Fig.2), and investigated the brush nanostructure in the monolayer on the water surface by π-A isotherm and X-ray reflectivity (XR) techniques.

Examples of π-A isotherm were shown in Fig.3 for GLBT polymers. Both of these polymer monolayers showed wide plateau region, in which small clusters were formed. Hence, this behavior is thought to be characteristics for polymer having acrylic hydrophobic chain. The csc for cationic brush was found to be about 0.01 M, which is very low concentration compared to the csc for PSS brush. This might be very high degree of counterion condensation for quarternized ammonium cation. Zwitter ionic GLBT brush also formed "carpet + brush" structure, but the brush was observed to be expanded by NaCl addition, which is perfectly opposite trend to anionic PSS and cationic brushes. Probably, GLBT brush is formed by steric hindrance and ionic nature was appeared when salt was added.

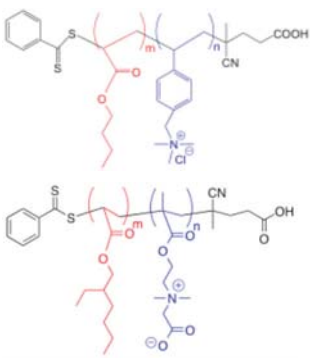


Fig.2 Structures of cationic (top) and zwitter ionic amphiphilic diblock copolymers

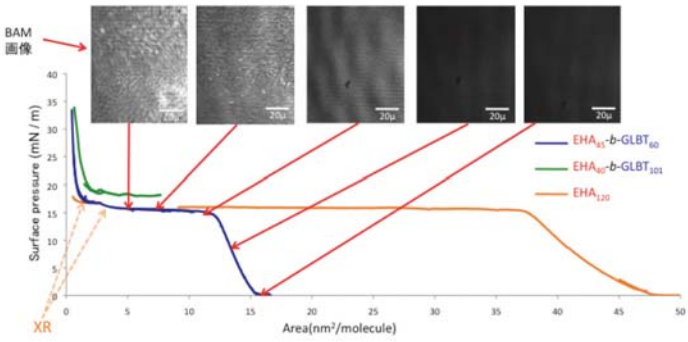


Fig.3 π-*A* isotherms of EHA_{120}, EHA_{45}-*b*-$GLBT_{60}$ and EHA_{40}-*b*-$GLBT_{101}$ on water and BAM images for each stage.

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) Arjun Ghosh, Shin-ichi Yusa, Hideki Matsuoka and Yoshiyuki Saruwatari
"Non-Surface Activity and Micellization Behavior of Cationic Amphiphilic Block Copolymer Synthesized by Reversible Addition - Fragmentation Chain Transfer Process"
Langmuir, in revision.

2) Rati Ranjan Nayak, Tasuku Yamada, Hideki Matsuoka,
"Non-Surface Activity of Cationic Amphiphilic Diblock Copolymers"
IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, in press.

２．著書・総説

1) 松岡　秀樹
イオン性両親媒性高分子の特性・自己組織化とその制御
高分子，2010 年，59 巻，7 月号．477-480.

2) 松岡秀樹　（分担執筆）
『現代界面コロイド科学の事典　シャンプーから宇宙まで』 丸善，2010 年，４月.

3) 松岡　秀樹（共同編集）
『新しい局面を迎えた界面の分子科学———機能デザインと計測技術の展開』
化学同人，2011 年，３月.

4) 松岡　秀樹（分担執筆）
「水面高分子電解質ブラシ」
『新しい局面を迎えた界面の分子科学———機能デザインと計測技術の展開』
Part 2，２章，化学同人，2011 年，３月.

３．会議発表

1) 日本化学会・コロイドおよび界面化学部会　35 周年記念国際会議
International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface Science (NCSS2010)
Keynote Lecture　【招待講演】
"Universality and Control of Non-Surface Activity of Ionic Amphiphilic Diblock Copolymers"
平成 22 年 9 月，幕張メッセ

2) 同　"Synthesis of Temperature Responsive Cationic Amphiphilic Block Copolymer by Reversible Addition - Fragmentation Chain Transfer Process and Their Self -assembly Studies"
Arjun GHOSH, Shin-ichi YUSA, Hideki MATSUOKA, Yoshiyuki SARUWATARI

3) 15th Anniversary HANARO Symposium　【招待講演】
"Critical Nanostructure Transition of Polyelectrolyte Brush at the Air/Water Interface"
2010.11.1-2, HARARO, Daejeon, Korea

4) 2010環太平洋国際化学会議（PacifiChem 2010），2010年12月15日～20日
ハワイコンベンションセンター、ワイキキ周辺ホテル
"Effects of salt, chain length, and pH on the non-surface activity of ionic amphiphilic diblock copolymers"　Hideki Matsuoka,

5) 同　"RAFT Synthesis of cationic amphiphilic diblock copolymer and nanostructure analysis of its monolayer on the water surface"　Shinichi Fujita,　Arjun Ghosh, Hideki Matsuoka

４．その他

【特許】

(1) 松岡秀樹、遊佐真一、猿渡欣幸、松岡和義
「感温性界面活性剤」出願日：2011 年２月２６日、
出願番号：特願 2011-040995　出願中

計画研究代表者　A03

ソフト界面の機能　「ソフト界面を“活かす”」

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

東京大学大学院工学系研究科・高井まどか

１．緒言

再生医療や組織工学の発達において、細胞と材料間の相互作用を解析することは、細胞の材料表面への初期接着挙動が、増殖、伸展、分化およびアポトーシスなどの後の細胞挙動に大きな影響を与えるため重要である。細胞は、材料表面に吸着したタンパク質を介して表面と相互作用する。本研究では、材料表面へのタンパク質の吸着とそれを介した細胞接着を同一のパラメータで評価することで、初期接着挙動を解析するデバイス創製を目的としている。細胞の接着挙動解析に関しては、基板へ吸脱着した物質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)を用いた。QCM-D は、タンパク質吸着と細胞接着という一連の挙動をリアルタイムで測定でき、さらに顕微鏡観察等の定性的評価では実現できない解析が可能であるため有用である。また、表面特性がタンパク質吸着や細胞接着に与える微細な影響を評価するためには、構造が精密に制御された材料表面が要求される。そのため表面開始原子移動ラジカル重合(SI-ATRP)法により作製されるポリマーブラシ構造を用いた。また、細胞接着性に与える因子を明確化するため、ブロック共重合体表面の相分離構造を用いたバイオインターフェースの創製を行った。

２．研究経過

2.1 SI-ATRP 法による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

昨年度は、SI-ATRPにより、モノマーにMPC(生体親和性)、HEMA(親水性)、MEMA(カチオン性)およびMPS(アニオン性)を用いて、QCM-Dの金基板に形成させたSI-ATRPの開始剤の自己組織化単分子(SAM)膜上にポリマーグラフト基板を作製した。細胞播種後24時間での各ポリマーブラシ表面上およびSAM膜上の細胞形態観察から、poly(MPC)ブラシ基板では細胞はほとんど接着せず、poly(HEMA)ブラシ基板では細胞は接着したが形態が丸いままで伸展しておらず、COOH-SAM表面では積極的な接着および伸展が見られた。これらのことから、QCM-Dを利用することにより細胞の接着と伸展プロセスを追跡するシグナルを得ることが可能となった。さらに、タンパク質吸着およびそれを介した細胞接着といった一連の挙動を同一のパラメータで評価することができる事を確認した。そこで今年は、材料の表面特性とタンパク質吸着および細胞の初期接着挙動との関係を明確にすることを目的として、研究を行った。昨年度の４種類のポリマーブラシに加え、疎水性ポリマーブラシを追加して評価した。具体的には側鎖に双性イオンを有するMPC、親水基を有するHEMA、疎水基を有するTFEMA、カチオン性のMEMAおよびアニオン性のMPSである。

Table 1に各基板の表面解析結果を示す。グラフト密度は全てのポリマーにおいて0.10 chains/nm^{2}以上となった。このことから高密度ポリマーブラシ基板が作製されたといえる。静的接触角および表面ゼータ電位は、各ポリマーの側鎖を特徴付ける結果となった。これらの結果から、種々のモノマーを選定することにより、各物理化学的表面特性が制御された構造明確な表面を構築することができた。次ぎにタンパク質吸着量をQCM-Dを用いて評価した。フィブロネクチン(FN)の吸着量はカチオン性表面のPMEMA基板で最も多く、疎水性の高いBUM基板およびPTFEMA基板においては同程度の吸着が見られた。PMPCおよびPHEMA基板ではタンパク質吸着はわずかであった。また、アニオン性のPMPS基板ではFN吸着量は少なかったのに対し、牛血清(FBS)タンパク質は吸着した。これは、FBS中のタンパク質のうち、アニオン性の基板と強く相互作用する種類のタンパク質が吸着したと考えられる。

Table 1 Characteristics of polymer brush surfaces.

	Thickness* (nm)	Density (chains/nm^2)	Contact angle (°)	Surface potential (mV)**
SiO_2	–	–	26	-58
BUM	–	–	74	-27
PMPC	5.5	0.13	12	0
PHEMA	8.1	0.48	45	-9.8
PTFEMA	9.9	0.46	87	-32
PMEMA	5.4	0.36	31	47
PMPS	11	0.27	13	-44

*: Target degree of polymerization: 100, **: In 10mmol/L NaCl solution

次に、あらかじめ上記のタンパク質溶液を接触させたポリマーブラシ基板に、無血清培地中のヒト子宮癌(HeLa)細胞を4.0 x 10^4 cells/cm^2

の密度で播種し、3時間後の形態を観察した。また解析ソフトを用いて接着細胞数および接着細胞面積を求め、「細胞接着率 ＝ 接着細胞数 / 播種細胞数」として播種細胞のうち接着した細胞の割合を算出した。また、細胞の表面被覆率を「被覆率 ＝ 細胞が覆っている面積 / 基板面積」と定義して算出した。QCM-Dを用いて、1時間のタンパク質吸着挙動およびその後3時間の細胞接着挙動を連続解析した。これにより求められたΔFおよびΔDと基板ごとの細胞の物理特性(接着率および被覆率)の関係を解析した。ΔDと細胞接着率、および表面被覆率の関係をFig.2に示す。この図より、各基板の物性を変化させることで、細胞接着率が変化し、それがΔDと強く相間していることがわかる。また同じ被覆率でもΔDの値が大きく異なる結果となった。そこで、タンパク質(FN)の吸着量ΔFと細胞接着率、被覆率との関係を調べた。細胞接着率や被覆率において大差がないポリマーブラシ表面でもΔDが異なる理由は、細胞とポリマーブラシ間に存在するタンパク質の吸着量に差があり、吸着量の多い表面では、細胞は弾性体として振る舞うことが分かった。

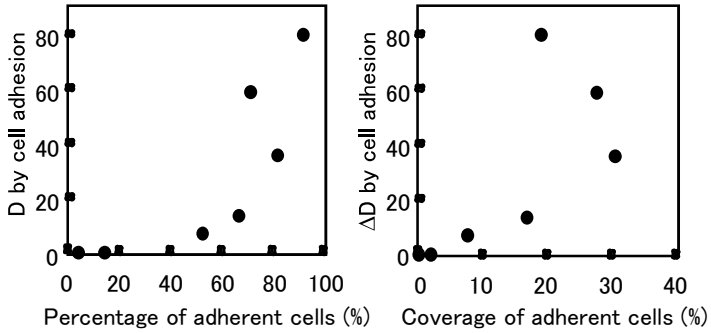


Fig.2. Relation between ΔD and percentage of adherent cell (left), and coverage of adherent cell (right).

2.2 PDMS/PMPC ジブロックポリマーを用いたナノドメイン構造表面における細胞接着挙動の解析

親疎水性のブロック共重合体により形成されたナノサイズの相分離構造が、細胞接着性に大きな影響を与える事が知られている。細胞接着性に影響を及ぼしうる要因として、組成の均一な凹凸構造、化学組成の異なる凹凸構造、凹凸構造のない均一層でのナノサイズの化学組成のゆらぎなどが上げられる。本研究では、化学組成のほぼ等しいブロック共重合体およびランダム共重合体を用いて、ポリマー表面のナノドメイン構造の存在、およびポリマーの化学組成を複合的に評価し、ブロック共重合体における細胞接着において支配的な条件での比較を行った。poly(MPC-*b*-PDMS)[1]とほぼ組成比(-P : -Si-O-)の等しい poly(MPC-*r*-MPTSSi)を合成した。それぞれのポリマーを PET 基板及びガラス基板にコーティングして熱処理を行い、原子間力顕微鏡(AFM)及び透過型電子顕微鏡(TEM)による乾燥状態における表面観察、X 線光電子分光(XPS)法による表面の特性評価を行った。次にそれぞれのポリマーを 24-well 細胞培養用プレート(TCPS)にコーティングし、線維芽細胞(L929 mouse fibroblast cells)を播種した。播種後 1～3 日の初期接着挙動を光学顕微鏡で観察した。これらのポリマーを基板にコーティングし、AFM によって観察した結果、親疎水性ブロック共重合体においてのみドット上の相分離構造が見られた(Fig.3)。また、TEM による観察の結果、AFM と同様にドット状の構造が観察された。XPS 測定の結果、ランダム共重合体、ブロック共重合体ともに MPC の組成が大きくなるに伴い、P/C の値が大きくなる傾向が得られたことから、ポリマー表面に存在するホスホリルコリン基の割合が増加する傾向が確認された。細胞の初期接着観察の結果、ブロック共重合体の表面においては、ほぼ組成比の等しいランダム共重合体の表面よりも高い細胞接着・伸展性が見られた(Fig. 3)。更に、ランダム共重合体においてはどの化学組成に着目しても、全てのブロック共重合体よりも細胞接着・伸展性が低いという結果が得られた。このことから、今回扱ったポリマーに関しては、化学組成の違いよりもナノドメイン構造の有無が、細胞接着性により大きく影響していると考えられる。今後、ドメインサイズや凹凸、さらには粘弾性などのパラメータを入れてさらなる細胞接着性との関連を検討する。[1]J. H. Seo et al, Biomaterials (2009), 30, 5330-40

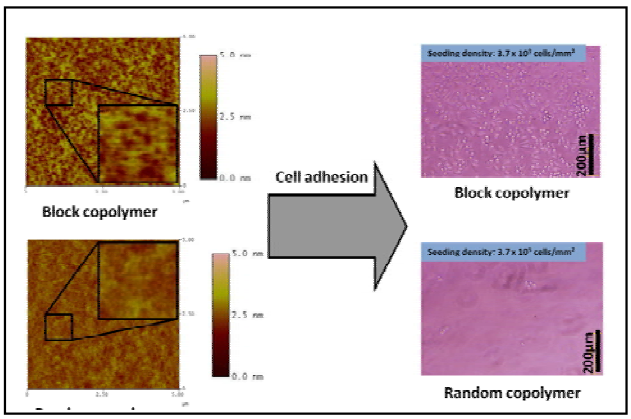


Fig. 3. Atomic force microscope (AFM) images of the block copolymer and random copolymer (left), and optical microscope images of cells (L929 fibroblast) on them after 1 day of cultivation(right).

Nano-fabication of Molecular Recognition Biointerfaces and Application to Cell Analysis Micro-biodevices

Madoka Takai
Department of Bioengineering, The University of Tokyo,

7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656
Tel:03-5841-7125, Fax:03-5841-0621, E-mail:takai@mpc.t.u-tokyo.ac.jp

Control of cell-materials interactions is the most important issue in developing biomedical devices and scaffolds for regenerated medicine. To consider this, we should understand the initial cell adhesion behavior on the materials. The first phase of cell-material interactions is protein adsorption and after that cells start to attach, adhere and spread on the protein adsorption layer. Therefore, analyses of these processes continuously will provide novel knowledge for understanding cell-materials interaction. The aim of this study is the monitoring these processes on various surfaces in real time using quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D). As for surfaces, polymer brush surfaces were prepared by surface-initiated atom transfer radical polymerization (SI-ATRP). The SI-ATRP is an excellent technique for preparing a nanometer-scaled and organized surfaces and control in the thicknesses of the polymer layer.

Another topic in analyzing cell-materials interaction, phase-separated nano-domein structure composed with was prepared by block-copolymer composed with hydrophobic and hydrophilic units and evaluated the cell adhesion behavior on the surfaces.

<u>QCM-D analysis to investigate the materials and cell interaction :</u>

Five kinds of polymer brush layers composed of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (PMPC) having biocompatibility, 2-hydroxyethyl methacrylate (PHEMA) having hydrophilicity, 2,2,2- trifluoroethyl methacrylate (PTFEMA) having hydrohobicity, 2-methacryloyloxyethyl trimethylammonium chloride (PMEMA) having cationic property, and potassium 3-sulfopropyl methacrulate (PMPS) having anionic property were prepared by SI-ATRP on Au substrate of QCM-D. Protein absorption and cell adhesion behaviors on these polymer brush-surface with different character were evaluated by QCM-D chamber kept at 37℃ individually. Fibronectin solution in serum-free D-MEM (10 μg/mL) was injected into the chamber and frequency change (ΔF) and dissipation change (ΔD) was monitored for 1h. After rinse with serum-free D-MEM, HeLa cell suspension (80 mL at 1.0 x 10^4 cells/cm^2) was injected into the chamber and ΔF、ΔD was monitored for 3h. The morphologies of adherent cells were observed and the numbers of adherent cells were counted. Good relation between the percentage of adherent cell and ΔD, also the coverage of adherent cell and ΔD was obtained on the specific polymer brush surfaces. The polymer brush sufaces with different ΔD but the same coverage of adherent cell showed the different protein adsobtion density evalluated by ΔF. The phenomenon indicated that the initial cell adhesion behavior on polymer brush is regulated by the protein adsorption behavior. Next step, we plan to change the kind of protein and control the orientation of protein to affect the cell adhesion.

<u>Analysis of cell adhesion behavior on nano-domain structure prepared by self assembled block copolymer</u>

Previous our research shows that on the nano-domain structures assembled by hydrophilic-hydrophobic nanophase separation, antithrombogenicity and cellular adhesiveness are promising at a time, by systematized adsorption of proteins. Thus the understanding by analysis and control of cell adhesion behaviors on the nanodomain structures of hydrophilic-hydrophobic diblock copolymers are important to the development of novel biomaterials used for cardiovascular regeneration medicine, for instance. In this study, cell adhesion behaviors on the block copolymers: poly(MPC-*b*-PDMS) were analyzed to compare the those on the random copolymers: poly(MPC-*r*-MPTSSi). Block copolymers which have nano-domain structures on the surfaces and random copolymers which have the homogeneous surfaces were synthesized with the same composition (-P/-Si-O). A large number of cells were adhered on the surface of the block copolymers, while very few cells were adsorbed on the random copolymers even though the chemical compositions of those copolymers were almost same. It was concluded that the nanodomain structure was the main factor to cell adhesion on material surface.

業績リスト

1．原著論文

1) N. Tajima, M. Takai, and K. Ishihara, Significance of Antibody Orientation Unraveled: Well-Oriented Antibodies Recorded High Binding Affinity, *Anal. Chem.,* **83**, 1969–1976(2011).
2) J-H. Seo, R. Matsuno, Y. Lee, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara, Effect of hydrophilic polymer conjugation on heat-induced conformationalchanges in a protein, *Acta Biomaterialia*, **7,** 1477-1484(2011).
3) T. Hoshi, T. Sawaguchi, R. Matsuno, T. Konno, M. Takai, and K. Ishihara, Control of surface modification uniformity inside small-diameter polyethylene/poly(vinyl acetate) composite tubing prepared with supercritical carbon dioxide, *J. Materials Chemistry,* **20,** 4897-4904(2010).
4) K. Masuda, R. Matsuno, T. Konno, M. Takai, and K. Ishihara, Novel cytocompatible intracellular pH-imaging fluorescence probe composed of quantum dot and phospholipid polymer, *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn,* **35(1)**, 147-150 (2010).
5) T. Nakanishi, Y. Inoue, R. Matsuno, M. Takai, and K. Ishihara, Effect of Well-Defined polymer Brush Surface on Adsorption Force of Bovine Serum Albumin*, Trans. Mater. Res. Soc.,* 35(1), 135-138, 2010
6) K. Nishizawa, T. Konno, M. Takai and K. Ishihara, Stabilization of phospholipid polymer surface with three-dimensionalnanometer-scaled structure for highly sensitive immunoassay, *Colloid Surf. B: Biointerfaces,* 77, 263-269, 2010
7) E.-H. Yu, Y. Himuro, M. Takai, and K. Ishihara, Feasibility Study of Introducing Redox Property by Modification of PMBN Polymer for Biofuel Cell Applications, *Appl. Biochem. Biotechnol*., **160**, 1094-1101 (2010).

2．著書・総説 等

1) Y. Xu, M. Takai and K. Ishiahra, Phospholipid Polymer Biointerfaces for Lab-on-a-Chip Devices, Annals of Biomedical Engineering, , **38(6)**, 1939-1953 (2010).
2) 血液分析チップ、高井まどか、バイオチップ実用化ハンドブック、監修　金子周一、堀池靖浩、NTS、p.529-536、2010
3) N. Tajima, R. Matsuno, M. Takai and K. Ishihara, Orientation Control of Antibody on Phospholipid Polymer Surface for Highly Sensitive Immunoassay System, Special Proceeding Book of JST-CREST International Symposium, Nanobio-Interfaces in Relation to Molecular Mobility, edited by N. Yui, K. Ishihara, A. Kishida, and T. Yamaoka, JAIST PRESS, 2010
4) T. Kitagawa, Y. Inoue, M.Takai, and K. Ishihara, Cell Adhesion Behavior on Various polymer Brush Surface Analyzed with Quartz Crystal Microbalance, Special Proceeding Book of JST-CREST International Symposium, Nanobio-Interfaces in Relation to Molecular Mobility, edited by N. Yui, K. Ishihara, A. Kishida, and T. Yamaoka, JAIST PRESS, 2010

3．代表的な国際会議等発表

1) Simple and Functional Modification of PDMS Surface for Micro-channel Electrophoresis, T. Shirai, M. Takai and K. Ishihara, *Proc. of micro-TAS 2010,* 1946-1948(2010). Groningen, The Netherlands, 2010, 10.6
2) A novel high-sensitive immunoassay interface with orientation-controlled antibodies, N. Tajima, M. Takai, and K. Ishihara, Abstract Book of Chemistry and Functional Properties of Soft Interface (Pacifichem 2010), 35, 2010, Honolulu Hawaii, 2010.12.16
3) Nano-Structured Titanium Oxide Film by Wet Corrosion Process for Bio-device, M. Takai, S.-Y. Lee, and K. Ishihara, 2010 KISE Fall Meeting & International Symposium, 243 (2010) 11.26, Korea
4) T. Nakanishi, Y. Inoue, R. Matsuno, M. Takai, and *K. Ishihara, Significant Parameters of Polymer Brush Surface Related with Protein Adsorption, 2010 Annual Meeting ＆ Exposition of Society of Biomaterials, Seattle, Washington, USA

4. 受賞

1) 平成 21 年度化学とマイクロ･ナノシステム研究会奨励賞、マイクロチップの界面機能化による高感度バイオ分析に関する研究、化学とマイクロ･ナノシステム研究会、高井まどか、2010 年 6 月 11 日

高度分子認識を目指した生体分子と合成高分子のなす超構造界面密生層の構築

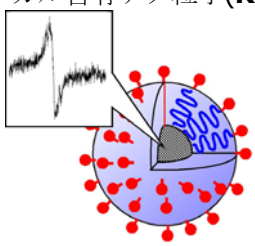
−アクティブに非特異的吸着を抑制する材料表面の設計−

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・原 暁非
研究分担者：東京大学大学院総合文化研究科・吉本敬太郎

１．緒言

近年、ダイアライザーやカテーテル、コンタクトレンズなどの様々な医療機器が広く実用化されるとともに、その社会的役割はますます大きくなりつつある。さらに、薬物や遺伝子送達システム、再生医療などの最先端技術が各界の注目の元に急速かつ着実な進展をみせており、今やその成果の応用・社会還元が強く期待される段階になってきている。このような分野融合的医工学を推進する上で、生体と直接接触する材料、バイオマテリアルの重要性が認識され、様々な材料研究が展開されてきた。しかしながら材料と生体液や組織が接触するインターフェースではタンパク質やカルシウム、細胞等の吸着によりその性能の著しい低下が起こり、材料の安全で長期的な利用を妨げてきた。これに対して親水性や正負電荷等の物理化学的特性を最適化した生体適合性高分子を表面にコーティングすることで生体成分の活性化や吸着を抑制し、これら機材の利用を手助けしている。これらは一定の効果は与えているものの、このような物理化学的性能を最適化するだけでは必ずしも充分ではなく、人工心臓や人工肺などの長期的利用を妨げているだけでなく、人工透析の長期的利用による患者へのダメージもさけられないのが現状である。このように生体と材料との表面の最適化は古くから認識されているものの未だ充分に解決された問題ではなく、将来金属、半導体や無機材料など様々な材料の生体利用が提案されているものの、このような問題点が実用化を妨げる一つの原因となっている。我々はこれまで高分子ブラシを利用した生体適合性表面を物理化学的に最適化し、高度にタンパク非特異吸着能を抑制する表面を作り出してきた。しかしながらバイオデバイスの長期的利用にはこれでも充分ではなく、新たな表面設計が要求されている。本研究では材料と生体成分との接触に起因する活性化シグナルとして生じる活性酸素をアクティブに抑制することにより活性化増幅機能を遮断し、アクティブに生体適合性界面を創出し、これまで行ってきた界面設計と組み合わせた新しいバイオインターフェースを構築しようと言うものである。

ラジカル含有ナノ粒子(**RNP**)



Racial-containing Nanoparticle (RNP)

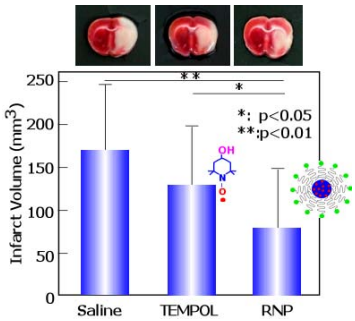


図 1.ラット脳梗塞再灌流障害に対する **RNP** の効果

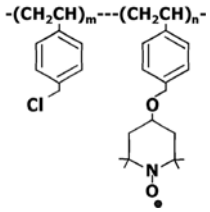


図 2.ニトロキシラジカル含有ポリマー

２．研究経過

申請者らは最近、脳、腎臓や心筋梗塞後の再灌流時やアルツハイマー、潰瘍性大腸炎、癌などで誘起している慢性炎症に対して活性酸素種(ROS)が強く関与していることを想定し、ROS を触媒的に効果的に消去するニトロキシルラジカルをナノ粒子に封入したナノ粒子治療に関する研究を行なってきた。例えばラット脳梗塞再灌流モデルに対する ROS 消去型ナノ粒子が極めて効果的に障害を抑制することを示した(Marushima, et al., Neurosurgery, in press;図 1.)。これらの結果をふまえて、ニトロキシラジカル含有ポリマー(NRP)を新たに設計し(図 2.)、ラット全血と接触させた。図 3.に示すように、NRP コーティング表面ではニトロキシルラジカル量依存的に ROS 産生が低減しており、効率的な ROS 消去が確認された。

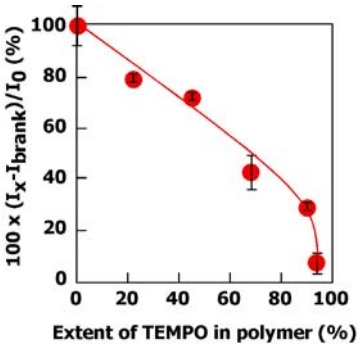
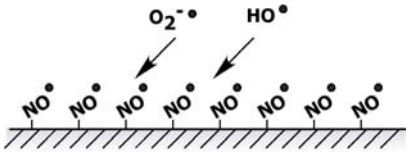


図 3.表面ポリマーのニトロキシルラジカル含有量に対する ROS 産生量



さらに接触後の血液中の血球数を定量したところ、図 4 に示すように、ニトロキシルラジカル含有量が増加するに従って血中の血小板、リンパ球とも減少量が抑制された。すなわちニトロキシルラジカルによる ROS の消去が血球の活性化を抑制し、サイトカイン産生と血球の表面粘着が制御されることを確認した。

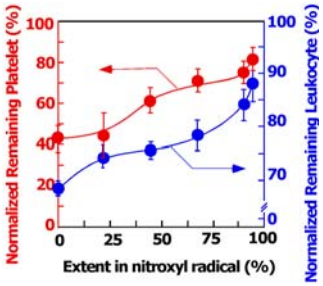
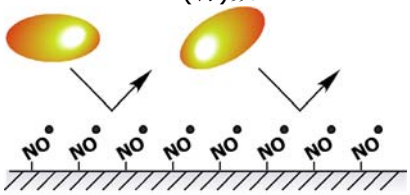


図 4.ニトロキシルラジカル含有ポリマー表面に接触したラット血液中の血小板(赤)、リンパ球(青)数

一方我々はこれまで、ポリエチレングリコール(PEG)の生体適合性に着目し、長鎖 PEG と短鎖 PEG をブラシ状に機材表面に固定することにより、極めて高いタンパク質非特異吸着抑制表面を構築できることを見いだしてきた(図 5.)。これらの結果をふまえ、本研究では混合 PEG ブラシの物理化学的表面最適化による非特異吸着とニトロキシルラジカルの ROS 消去による活性化抑制を組み合わせることにより、高度に生体と親和性の高いバイオインターフェースを構築することを推進する(図 6.)。



本研究は吉冨　徹博士(筑波大)、山口　雄君(筑波大修士)および菊池明彦先生(東京理科大学)との共同研究によって行われたものであり、ここに感謝致します。

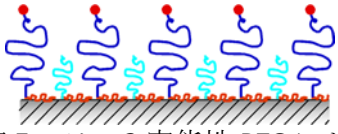


図 5.ヘテロ 2 官能性 PEG による高度なタンパク質非特異吸着抑制のための混合ブラシの構築

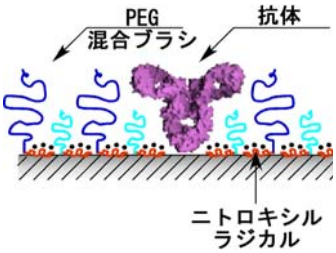


図 6.抗体を固定した高機能ハイブリッドバイオインターフェースの構築

Creation of a Blood-Compatible Surface: A Novel Strategy for Suppressing Blood Activation and Coagulation Using Nitroxide Radical-Containing Polymer with Reactive Oxygen Species Scavenging Activity

Yukio Nagasaki, Xiao Fei Yuan, Keitaro Yoshitomi
Department of Materials Science, Graduate School of Pure and Applied Sciences, Master's School of Medical Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences and Satellite Laboratory, International Center for Materials Nanoarchitectonics (MANA), National Institute for Materials Science (NIMS), University of Tsukuba, Tennoudai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, 305-8573, Japan
Tel and Fax: 029-853-5749, e-mail: nagasaki@nagalabo.jp

Various materials are employed in blood-contacting implantable and extracorporeal medical devices, such as artificial hearts, artificial blood vessels, hemodialyzers and apheresis columns. Since most of those medical devices have poorly biocompatible surfaces, anticoagulants such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), hirudin, heparin, and warfarin are utilized for preventing thrombosis and embolism induced by the contact of blood with these medical devices. Given the side effects of these anticoagulants, such as heparin-induced thrombocytopenia; however, numerous efforts have been made to reduce the activation of blood in response to contact with material surfaces. Suppression of such blood activation can effectively reduce the amount of anticoagulant required. In order to improve the blood compatibility of material surfaces, a number of versatile methods have been applied. One of the most simple and important techniques is polymer coating using biocompatible polymers such as poly(ethylene glycol), zwitterionic polymers, microphase-separated polymers, and poly(2-methoxyethyl acrylate). These approaches can drastically reduce the adsorption of serum proteins. Protein adsorption triggers the activation of blood cells and blood coagulation on material surfaces through a complex series of events, including the activation of platelets, leukocytes, complement, and the fibrinolytic system. Therefore, it has long been thought that the suppression of protein adsorption is highly important in the design of blood-compatible surfaces. Nevertheless, even today, all blood-contacting devices cause thrombosis in long-term usage. In fact, synthetic vascular grafts with inside diameters of less than 6 mm cannot be used because they are prone to early thrombotic occlusion. In the case of cardiac stents, drug-eluting stents have been developed for the inhibition of endothelial cell proliferation and restenosis, but even these stents were found to be thrombogenic.

Recently, it has been revealed that blood–material interactions cause an increase in the levels of reactive oxygen species (ROS) and inflammatory cytokines, which is brought about by the activation of blood cells; this leads to blood coagulation and whole body inflammation (see Figure 1a). The excess ROS continuously amplify inflammation, thereby increasing the risk of potentially life-threatening disorders. Indeed, long-term hemodialysis therapy induces cardiovascular disease and atherosclerotic complications, which result in high morbidity and mortality in chronic renal failure patients. However, there have been few reports with experimental evidence that ROS generation is related to inflammation in blood when in contact with the material surface, and the extent of ROS involvement in inflammation is not yet clear.

We have focused on the effect of ROS-scavenging materials in vivo and have used nitroxide radicals, such as 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl (TEMPO), which catalytically react with ROS and can be used as electron spin resonance (ESR) probes in vivo. Core–shell-type polymeric micelles containing nitroxide radicals have already been developed for the treatment of oxidative stress injuries and in vivo ESR imaging. It has been confirmed that they not only strongly scavenge ROS in vivo but also significantly prevent oxidative stress damage in an ischemia–reperfusion injury model in rats and a neuron cell line used as a model for Alzheimer's disease,å in which excess ROS is generated. In the process, we have hypothesized that ROS-scavenging characteristics play a crucial role in blood activation and coagulation when blood comes in contact with material surfaces. To validate our hypothesis, we have designed and developed a hydrophobic nitroxide radical-containing polymer (NRP) composed of hydrophobic poly(chloromethylstyrene) (PCMS) chains in which TEMPO moieties were conjugated via condensation reaction of the chloromethyl groups in PCMS with the sodium alkolate group of 4-hydroxy-TEMPO (TEMPOL) (see Figure 1b). In this paper, we describe the synthesis of the NRP homopolymer and its characterization in terms of blood compatibility.

Various polymeric materials have been used in medical devices, including blood-contacting artificial organs. Contact between blood and foreign materials causes blood cell activation and adhesion, followed by blood coagulation. Concurrently, the activated blood cells release inflammatory cytokines together with reactive oxygen species (ROS). We have hypothesized that the suppression of ROS generation plays a crucial role in blood activation and coagulation. To confirm this hypothesis, surface-coated polymers containing nitroxide radical compounds (nitroxide radical-containing polymer; NRP) were designed and developed. The NRP was composed of a hydrophobic poly(chloromethylstyrene) (PCMS) chain in which 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl (TEMPO) moieties were conjugated via condensation reaction of the chloromethyl groups in PCMS with the sodium alkolate group of 4-hydroxy-TEMPO. Blood compatibility was investigated by placing NRP-coated beads in contact with rat whole blood. The amount of ROS generated on PCMS-coated beads used as a control increased significantly with time, while NRP-coated beads suppressed ROS generation. It is interesting to note that the suppression of inflammatory cytokine generation by NRP-coated beads was shown to be significantly higher than that of PCMS-coated beads. Both platelet adhesion and leukocyte depletion were suppressed with increasing extent of the TEMPO component in the polymer. From these results, it is confirmed that the suppression of ROS prevents inflammatory cytokine generation, which in turn results in the suppression of blood activation and coagulation.

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) Marushima Aiki, Tsurusima Hideo, Yoshitomi Toru, Toh Kazuko, Hirayama Aki, Nagasaki Yukio, Matumura Akira: Newly Synthesized Radical-containing Nanoparticles (RNP) Enhance Neuroprotection after Cerebral Ischemia-reperfusion Injury, *Neurosurgery*, 68(5), 1218-1226 (2011).
2) Ikeda Yutaka, Suzuki Rie, Yoshitomi Toru, Nagasaki Yukio: Noveloligonucleotide carrier possessing reactive oxygen species scavengingability, *Macromolecular Bioscience*, 11, 344-351 (2011).
3) Nagasaki Yukio: Engineering of poly(ethylene glycol) chain-tethered surfaces to obtain high-performance bionanoparticles, *Science and Technology of Advanced Materials* 11(5), 054505 (2010).
4) Tomita Shunsuke, Ito Len, Yamaguchi Hiroshi, Konishi Gen-ichi, Nagasaki Yukio, Shiraki Kentaro:Enzyme switch by complementary polymer pair system (CPPS), *Soft Matter* (6), 5320-5326 (2010).
5) Ikeda Yutaka, Kubota Daisuke, Nagasaki Yukio: Simple Solid-Phase Synthesis and Biological Properties of Carbohydrate- Oligonucleotide Conjugates Modified at the 3 '-Terminus, *Bioconjugate Chemistry*, 21, 1685-1690 (2010).
6) Kanayama Naoki, Yamaguchi Kazuhiro, Nagasaki Yukio: PEGylated Polymer Micelle-based Nitric Oxide (NO) Photodonor with NO-mediated Antitumor Activity, *Chemistry Letter*, 39(9), 1008-1009 (2010).
7) Tamura Atsushi, Nagasaki Yukio: Smart siRNA Delivery Systems Based on Polymeric Nano-assemblies and Nanoparticles, *Nanomedicine*, 5(7), 1089-1102 (2010).
8) Tamura Atsushi, Oishi Motoi, Nagasaki Yukio: Efficient siRNA Delivery Based on PEGylated and Partially Quaternized Polyamine Nanogels: Enhanced Gene Silencing Activity by the Cooperative Effect of Tertiary and Quaternary Amino Groups in the Core, *Journal of Controlled Release*, 146, 378-387. (2010).
9) Yoshimoto Keitaro, Nishio Motohiko, Sugasawa Hiroaki, Nagasaki Yukio: Direct Observation of Adsorption-Induced Inactivation of Antibody Fragments Surrounded by Mixed-PEG Layer on a Gold Surface, *Journal of the American Chemical Society*, 132(23), 7982-7989 (2010).
10) Ganguli Sumon, Keitaro Yoshimoto, Tomita Shunsuke, Sakuma Hiroshi, Matsuoka Tsuneyoshi, Shiraki Kentaro, Nagasaki Yukio: Improving the Heat Resistance of Ribonuclease A by the Addition of Poly(N,N-diethylamino-ethyl methacrylate)-graft-poly(ethylene glycol) (PEAMA-g-PEG)" *Macromolecular Bioscience*, 10(8), 853-859 (2010).
11) Nakamura Takahito, Tamura Atsushi, Murotani Hiroki, Oishi Motoi, Jinji Yuta, Matsuishi Kiyoto, Nagasaki Yukio: Large Payloads of Gold Nanoparticles into the Polyamine Network Core of Stimuli-Responsive PEGylated Nanogels for Selective and Noninvasive Cancer Photothermal Therapy, *Nanoscale*, 2(5), 739-746 (2010).
12) Oishi Motoi, Nagasaki Yukio: Stimuli-Responsive Smart Nanogels for Cancer Diagnostics and Therapy, *Nanomedicine*, 5(3), 451-468 (2010)
13) Furusho Hitoshi, Oishi Motoi, Kishi Tetsuo, Yasumori Atsuo, Nagasaki Yukio: Preparation and Molecular Recognition of SERS Probe Based on Gold Nanoparticles Constructed from PEG-Oligoamine Copolymer Possessing a Coumarin Group between PEG and Oligoamine, *Chemistry Letters*, 39(1), 52-53 (2010).

２．著書・総説

1) Xiaofei Yuan, Dolça Fabregat, Keitaro Yoshimoto, Yukio Nagasaki: Biomaterials Chapter 13, pp 243–258 ACS Symposium Series, Vol. 1054 (2010)他 3 件

３．会議発表

1) Nagasaki Yukio: Novel Nanoparticles Functionalized for Anti-Oxidative Stress, NanoDDS`10, Omaha, Nebraska USA 2010.10.他、招待・依頼講演 8 件、国際会議 10 件、国内会議等他 61 件

４．その他

1) 特許出願 8 件、
2) 受賞
   ① 山口雄大、金山直樹、長崎幸夫、優秀演題賞 「光応答性高分子ミセルのニトロ化ストレスによる抗ガン効果」、第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会、2010/6/25
   ② 長崎幸夫、高分子学会三菱化学賞 「ポリエチレングリコール密生層界面の構築と機能」、2010/9/16
   ③ Toru Yoshitomi, Aki Hirayama, Hirofumi Matsui, Yukio NagasakiYoung Investigator Award, Design of redox imaging nanoprobe using nitroxyl radical containing nanoparticle, 17th Annual meeting of the society for free radical biology and medicine, Orlando, Florida, 2010/11/17-11/21
   ④ 吉冨 徹、平山　暁、長崎幸夫、関東支部会長賞 「腎臓虚血－再灌流障害に対する新規ナノ治療の開発」、第２５回酸化ストレス学会関東支部学術大会、2010/12/11
   ⑤ 角谷　省吾,大石　基,矢口　達也,室谷　憲紀,堀口　諭吉, 鈴木　実, 小野　公二, 柳衛　宏宣, 長崎　幸夫、優秀演題賞、「コア部の重合によるホウ素含有高分子ミセルの安定化とホウ素中性子捕捉療法への展開」、第 22 回高分子ゲル研究討論会、2011.1.12

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

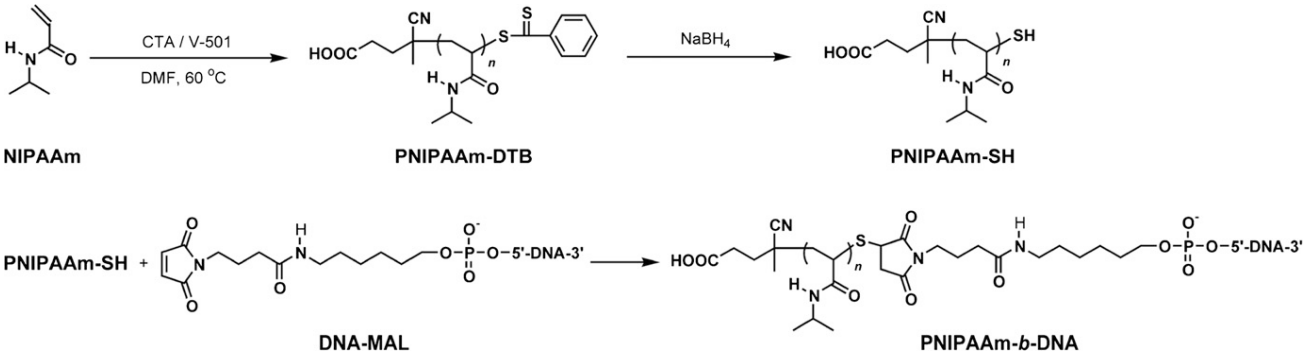
１．緒言

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、粒子は速やかに凝集してしまう。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、（１）構造の明確な DNA コンジュゲート材料の合成法の確立とその特性評価、（２）新規ナノバイオ素子の開発を主に行った。

２．研究経過

（１-１）可逆的付加開裂連鎖移動（RAFT）重合

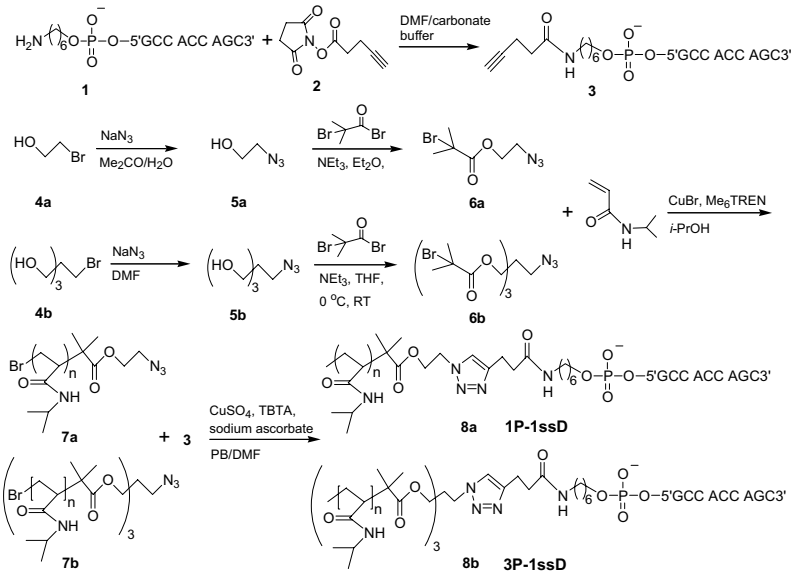
従来からの PNIPAAm と DNA とのグラフト共重合体に加え、合目的な構造と機能有するナノ粒子を自在に構築することを目指し、精密ラジカル重合によるブロック共重合体の合成を試みた。可逆的付加開裂連鎖移動（RAFT）重合による PNIPAAm/DNA ブロック共重合体（PNIAAm-*b*-DNA）の合成法を Scheme 1 に示す。4,4’-azobis(4-cyanopentanoic acid)（V-501）を開始剤とし、連鎖移動剤（CTA）として 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate を用いることで、ジチオベンゾエート基を末端に有する狭い分子量分布（PDI＜1.2）の PNIPAAm（PNIPAAm-DTB）を得ることができる。このポリマー末端を還元することで SH 基に変換し、一方でマレイミド基を 5’末端に持つ DNA と反応させる（Michael 付加反応）ことで、目的の PNIAAm-*b*-DNA を合成することに成功した。下限臨界溶解温度（LCST）以上において、自己組織化により半径が 50 nm 程度の単分散なミセルを形成することがわかった。ミセル表面に存在する DNA 末端の塩基対構造に依存して粒子が分散・非架橋凝集することを確認した。



Scheme 1 RAFT polymerization of PNIPAAm-*b*-DNA.

（1-2）原子移動ラジカル重合（ATRP）

次に分子鎖長のコントロールに加え、種々の分子骨格（マルチアーム型）を有する PNIPAAm-*b*-DNA の精密重合を試みた。本研究では、原子移動ラジカル重合（ATRP）による合成を検討することにした。末端にアジド基を有する PNIPAAm（PDI < 1.2）を合成した。一方で、5'末端にアルキンを有するオリゴ DNA を調製し、クリックケミストリーを利用して結合させることで、線形およびミクトアーム型の共重合体を得ることに成功した（Scheme 2）。示差走査熱量測定（DSC）、動的光散乱（DLS）測定や小角 X 線散乱（SAXS）測定などにより共重合体ならびにミセルの構造・物性評価を行った結果の一例を Table 1 ならびに Figure 1 に示す。ミセル径は PNIPAAm の重合度に依存するが、同程度の重合度であればミクトアーム型の方がコンパクトなミセルを形成する。慣性半径（R_g）と流体力学半径（R_h）との比より、球状ミセルが形成していることがわかる。蛍光強度測定から得られた結果より、LCST 以上において、分子骨格にかかわらず、PNIPAAm が疎水核として会合し、その周りに DNA が密生しているコアシェル型のミセルであることが確認できた。



Scheme 2 Synthetic route of diblock and miktoarm star-shaped PNIPAAm-*b*-DNA copolymers.

Table 1 Molecular weights, thermal and structural parameters of PNIPAAm-*b*-DNA.

code	M_n (kDa)	M_w/M_n	T_p (°C)	R_h (nm)	R_g (nm)	R_g/R_h	N_{ass}
$1P_{280}$-$1ssD_9$	29.2	1.07	38.7	24.3	17.2	0.71	137
$3P_{252}$-$1ssD_9$	26.0	1.02	43.0	15.2	11.1	0.73	67

*Subscript corresponds to the degree of polymerization.
T_p, R_h, R_g, N_{ass} are the LCST, hydrodynamic radius, radius of gyration, and association number.

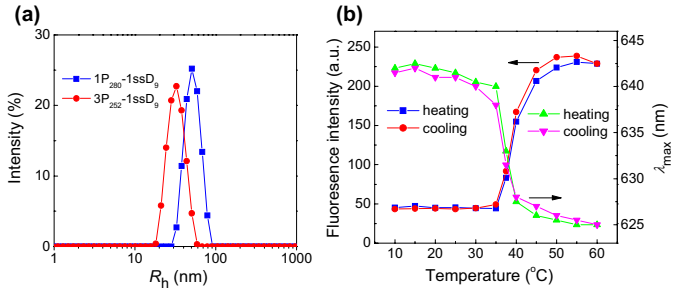


Figure 1 (a) Size distributions of R_h at 60 °C of $1P_{280}$-$1ssD_9$ and $3P_{252}$-$1ssD_9$. (b) Temperature dependences of emission intensity at 625 nm and maximum emission wavelength for N

（2）非架橋型凝集を利用した水銀イオンセンサー

これまでの研究結果から、DNA 担持ナノ粒子の非架橋型凝集は DNA 分子鎖あるいは密生相の運動性に起因する立体反発により特徴づけられていると考えられる。この考えに基づき、新しい水銀イオンセンサーを開発することに成功した（Figure 2）。自由末端側に T-Hg^{2+}-T コンプレックスを形成するよう DNA 配列をデザインした。Hg^{2+}存在下では、コンプレックス形成により DNA 密生相の運動性が制御されると考えられ、期待通り非架橋凝集を生じる。この凝集はきわめて速やかに生じることから、迅速かつ簡便なイオンセンサーとしての活用が期待される。

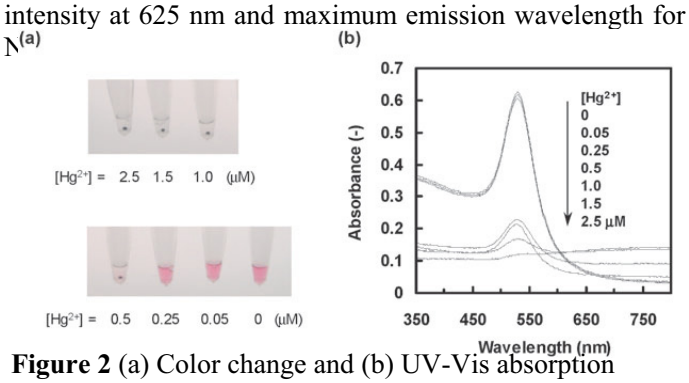


Figure 2 (a) Color change and (b) UV-Vis absorption spectra of dispersion of GNP with $Hg(ClO_4)_2$ in the presence of 1 M $NaNO_3$.

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)–*g*-DNA copolymers. 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, we tried to synthesize the novel DNA/PNIPAAm bioconjugates with various molecular lengths and architectures, *i.e.*, DNA/PNIPAAm diblock and star-shaped copolymers, via living radical polymerization such as reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization and atom transfer radical polymerization (ATRP). Furthermore, we report a new detection method of metal ion based on non-crosslinking aggregation of double-stranded (ds) DNA-carrying nanoparticles.

A diblock copolymer containing a single-stranded (ss) DNA and PNIPAAm (PNIPAAm-*b*-DNA) was synthesized. The PNIPAAm segment was obtained with a low polydispersity by RAFT. PNIPAAm-*b*-DNA was prepared through the Michael addition reaction of thiol-terminated PNIPAAm to 5'-maleimide-modified DNA. PNIPAAm-*b*-DNA self-assembled above the LCST into the formation of a polymer micelle. Both light scattering and transmittance measurements revealed that the colloidal stability of the single-stranded DNA-carrying polymer micelles was enormously decreased when the complementary DNA was added into the micelle's dispersion to form the fully matched DNA duplex on the surface. On the other hand, diblock and miktoarm star-shaped block copolymers composed of ssDNA and PNIPAAm were successfully synthesized with ATRP and click chemistry. Such copolymers also self-assemble into spherical micelles with ssDNA corona in aqueous solution above the LCST. The micellar size can be tuned from the macromolecular architecture. These DNA-encoded micellar particles are able to encapsulate and release hydrophobic guest molecules upon changing temperature.

Furthermore, we developed a novel method for detecting Hg^{2+} by the naked eye without any apparatus based on the non-crosslinking aggregation of dsDNA-nanoparticles. We prepared a novel dsDNA- gold nanoparticles that can undergo the noncrosslinking aggregation triggered by the formation of the T–Hg^{2+}–T complex. When compared to previous methods for detecting Hg^{2+} by the naked eye, the present one possesses three remarkable features are that the most rapid response is obtained within 1 min, no temperature control is needed in the analysis, and no masking reagents are required to achieve high selectivity. These characteristics are particularly suitable for on-site environmental assessment of various aquatic media such as rivers, lakes and ponds contaminated with toxic heavy metal ions.

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) N. Kanayama, T. Takarada, and M. Maeda, “Rapid Naked-eye Detection of Mercury Ion Based on Non-crosslinking Aggregation of Double-stranded DNA-carrying Gold Nanoparticles”, *Chem. Commun.*, **47**, 2077-2079 (2011).

2) K. Isoda, N. Kanayama, D. Miyamoto, T. Takarada, and M. Maeda, “RAFT-generated poly(*N*-isopropylacrylamide)-DNA block copolymers for temperature-responsive formation of polymer micelles”, *Reactive & Functional Polymers*, **71**, 367-371 (2011).

3) P. Pan, M. Fujita, W.Y. Ooi, K. Sudesh, T. Takarada, A. Goto, and M. Maeda, “DNA-Functionalized Thermoresponsive Bioconjugates Synthesized via ATRP and Click Chemistry”, *Polymer*, **52**, 895-900 (2011).

4) T. Ohshiro, T. Zako, R. Wanatabe-Tamaki, T. Tanaka, and M. Maeda, “A Facile Method Towards Cyclic Assembly of Gold Nanoparticles Using DNA Template Alone”, *Chem. Commun.*, **46**, 6132-6134 (2010).

5) T. Ohshiro, and M. Maeda, “Single-molecule Imaging of DNA Duplexes Immobilized on Surfaces with a Scanning Tunneling Microscope”, *Chem. Commun.*, **46**, 2581-2583 (2010).

6) T. Hiraishi, N. Komiya, N. Matsumoto, H. Abe, M. Fujita, and M. Maeda, “Degradation and Adsorption Characteristics of PHB Depolymerase as Revealed by Kinetics for the Mutant Enzymes with Amino Acid Substitution in Substrate-binding Domain”, *Biomacromolecules*, **11**, 113-119 (2010).

２．著書・総説

1) 金山直樹、前田瑞夫, “DNA コンジュゲート材料によるバイオ計測法の開発”, *ファルマシア*, **46**, 317-322 (2010).

2) 前田瑞夫, “ソフトインターフェースの分子科学”, *応用物理*, **79**, 219-224 (2010).

３．会議発表（一部抜粋）

1) M. Fujita and M. Maeda, “Structural study on noncrosslinking aggregation of gold nanoparticles with DNA”, Pacifichem 2010, 平成 22 年 12 月 16 日（Honolulu, U.S.A.）

2) W. Y. Ooi, M. Fujita, K. Sudesh, and M. Maeda, “Structural characterization of PNIPAAm-DNA conjugate by small-angle X-ray scattering”, Pacifichem 2010, 平成 22 年 12 月 18 日（Honolulu, U.S.A.）

3) P. Pan, M. Fujita, and M. Maeda, “DNA-functionalized thermoresponsive amphiphilic copolymers: Preparation and self-assembly”, Pacifichem 2010, 平成 22 年 12 月 18 日（Honolulu, U.S.A.）

4) 前田瑞夫, “ソフトインターフェースの特異な物性と新機能”, 第 10 回東北大学多元物質科学研究所研究発表会, 平成 22 年 12 月 1 日（仙台市）

5) M. Maeda, “Unique colloidal behavior of DNA-carrying nanoparticles”, International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface, 平成 22 年 9 月 22 日（千葉市）

6) 小林奈央，佐藤香枝，伊藤和輝， 宝田徹，藤田雅弘，前田瑞夫, “DNA 担持金ナノ粒子の非架橋型凝集の特性解析”, 第 59 回高分子討論会, 平成 22 年 9 月 15 日（札幌市）

7) W. Y. Ooi, M. Fujita, K. Ito, P. Pan, K. Sudesh, and M. Maeda, “Structural characterization of temperature-induced PNIPAAm-DNA conjugate colloidal particle”, 第 59 回高分子討論会, 平成 22 年 9 月 15 日（札幌市）

8) 潘 鵬挙, 藤田雅弘， 後藤淳， 宝田徹， 前田瑞夫, “DNA-co-poly(*N*-isopropylacrylamide) thermoresponsive bioconjugates: Preparation and self-assembly”, 第59回高分子討論会, 平成22年9月16日（札幌市）

9) 磯田恭佑，金山直樹， 宝田徹， 前田瑞夫, “ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)-DNAブロック共重合体の自己組織化”, 第59回高分子討論会, 平成22年9月16日（札幌市）

10) 前田瑞夫, “遺伝子診断実用化の鍵を握るDNAソフト界面技術の開発”, 第55回高分子夏季大学, 平成22年7月16日（仙台市）

11) 前田瑞夫, “DNA担持ナノ粒子の特異な挙動とその応用”, ナノオプティクス研究グループ第19回研究討論会, 平成22年7月15日（東京都新宿区）

12) 前田瑞夫, “DNAと合成高分子の複合体を用いる遺伝子診断材料”, 平成22年度繊維学会年次大会, 平成22年6月16日（東京都江戸川区）

13) 磯田恭佑，金山直樹， 宝田 徹， 前田瑞夫, “ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)-DNA ブロック共重合体の合成と物性評価”, 第 59 回高分子学会年次大会, 平成 22 年 5 月 28 日（横浜市）

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：東京医科歯科大学・宮原裕二

研究分担者：東京医科歯科大学・松元亮

研究分担者：東京医科歯科大学・前田康弘

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。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。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なこと、レーザーや光学系が不要であるため小型化が容易であること、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などの特徴があり、ハイスループットシステム化において求められる要件を網羅したユニークな検出法である。我々はこれまでに、FET 原理を利用した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。

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、生体分子を高感度かつ定量的に検出するための「信号変換･伝達素子」たる動的ナノ界面の創出に取り組む。

平成 21 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とした。

２．研究経過

上述の検出距離制限を克服した検出を可能とするため、「信号伝達素子」としての動的ナノ界面の創出に取り組んでいる。具体的には、「スマートゲル」と呼ばれる刺激応答性高分子ゲルを FET ゲート上へ製膜して信号変換層とする。そのため、糖‐ボロン酸、糖鎖‐ボロン酸、レクチン‐糖や抗原抗体反応といった生体分子間相互作用を駆動力として体積を変化する高分子ゲルの設計や合成および信号伝達素子としての物性評価を行っている。

＜糖鎖-レクチン認識を FET によって検出するための新規界面材料の設計＞（領域内共同研究：三浦研）

レクチン-糖間の相互作用は、極めて特異的な生体分子認識システムの一つである。また多くのレクチンは生理条件で四量体構造を形成し、４つの糖との複合体を形成する。宮田らはこの性質に着目し、物理架橋点としてのグルコシド-レクチン複合体を有するゲルを合成し、外部添加したグルコースにより膨潤すること、およびそれがこの複合体の分離に由来することを報告している。本研究では、逆に、レクチン（タンパク質）認識に応用すること、そして糖鎖-レクチン間相互作用の電気信号変換に適した界面設計に取り組んでいる。

マンノースモノマー（α-Mannoside；α-Man）含有率の異なるジメチルアクリルアミドを主骨格とするゲルを合成し、コンカナバリン A（Con A、レクチンの一種）に対する膨潤応答性を検討した（図 1）。Con A（10μM）浸漬後、α-Man 含有率が 3mol%と低いゲル（図 1b、c 点線）では重量増加した。一方で、20mol%と高いゲルでは一時的に重量増加するものの、最終的に Con A 不添加での平衡状態程度となり（図 1b 実線）、高密度（4mol/L、図 1c 実線）のものでは収縮がおこった。いずれにもみられた初期段階にお

ける膨潤は、レクチンのゲル内部拡散による浸透圧増加によるものだと考えられる。一方、その後の膨潤収縮挙動に関しては、高分子鎖の熱運動を駆動力とするα-Man 側鎖によるレクチン-糖複合体形成の進行とゲル浸透圧とのバランスに由来するものと考えている。このように、ゲル組成調整による物理架橋点形成制御を通して、ゲルの膨潤収縮の方向を選択できることが明らかとした。次に、マイクロモールディングによりFETゲート表面に厚さ50μm の20mol%ゲルを光重合形成し、Con A 添加前後におけるしきい電圧変化を評価した（図 2)。しきい電圧は、(i) 添加直後急激に上昇し、(ii) 一旦減少したあと、(iii) 再び上昇するという挙動を示した。Con A (pI=6-7) は負電荷を帯びていると考えられ、これらを総合すると、重量測定の結果から予測されたゲルの動的挙動(膨潤収縮）と矛盾しない結果となった。すなわち、(i) レクチン-糖複合体（１対１）形成によるゲルの負帯電、(ii) 浸透圧増大によるゲルの膨潤、そして (iii) 結合比変化（１対２～４）にともなう物理架橋点形成による収縮という、それぞれ３つの動力学を FET によりリアルタイムに可視化する原理証明を得たものと考えられる。これらの結果は、生体分子検出デバイスとしてゲート表面にスマートゲルを固定化したFETセンサの有効性を示しており、加えて、真に、「デバイ長フリー」に（大きな）生体分子を定量的に検出した初めての例として注目される。

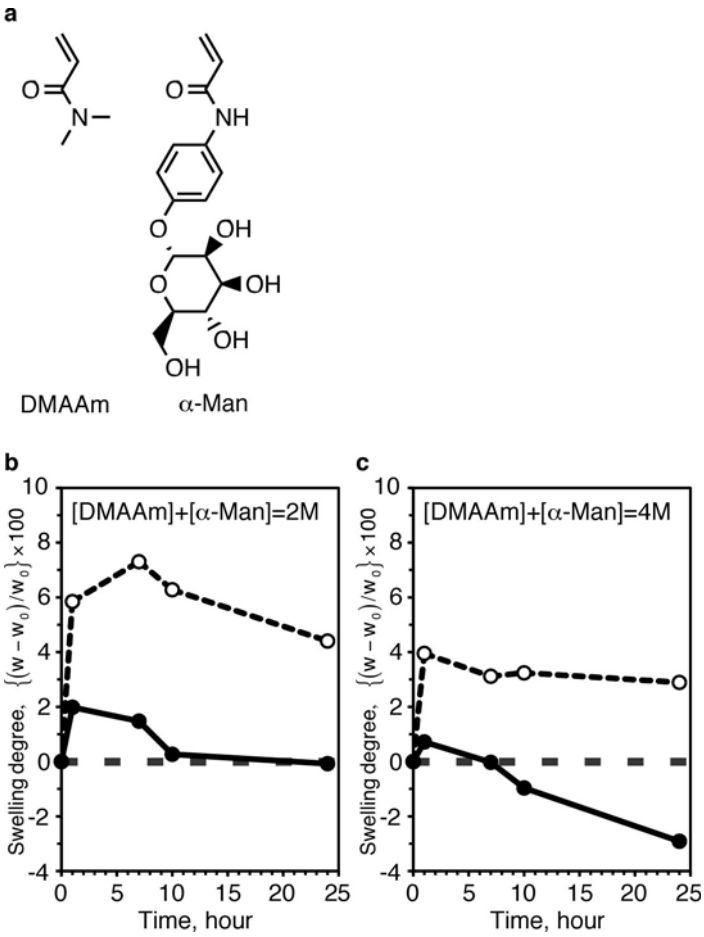


図 1　a α-Man ゲルの構成分子。b 低密度ゲルにおける重量変化（実線：20mol%、点線：3mol%)。c 高密度ゲルにおける重量変化（実線：20mol%、点線：3mol%)。

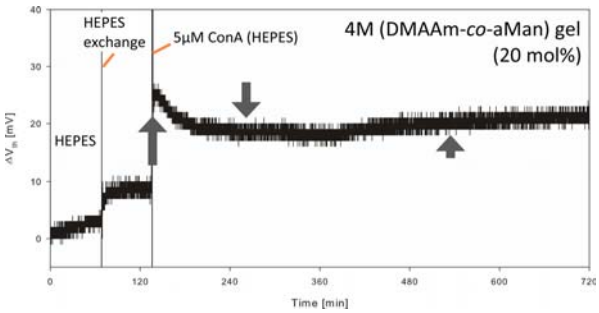


図 2 〈-Man ゲル修飾 FET のコンカナバリン A 応答しきい電圧値変化

＜グルコース応答電界効果トランジスタの開発＞

高分子の体積相変化を誘起する N-isopropylacrylamide、およびグルコースなどの糖に親和性の高いフェニルボロン酸を含む高分子ゲルをゲート表面に形成することで、完全合成系からなり中性分子であるグルコースに応答するFETを開発した。さらに、高分子ゲル／ゲート界面において科学刺激を電気刺激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。

＜ケモメカニカル検出システムの実証＞

FETゲート上にカルシウム応答性ゲル薄膜を導入し、カルシウムに応答してゲルが体積変化する際の各要素反応（カルシウムイオンの拡散、ゲル内への水の流入）の動力学を、それぞれ独立に、FET 単独によって可視化できることを明らかとした。さらには、ゲート上に導入するゲルの幾何学構造を制御することで、高分子ゲルの応答力学に基づき、得られる電気信号のパターンを様々にデザインできることを明らかとした。

＜動作原理の拡張＞

上記動作原理の拡張性および適用範囲を明らかにするため、本年度は、対象をさらに糖鎖、蛋白質、DNA などの大きな分子に広げた。これら検出対象に応じた高分子ゲルの設計を行い、その分子認識能やそれに伴う物性変化の評価を行っている。

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

Yuji Miyahara, Akira Matsumoto, Yasuhiro Maeda

Tokyo Medical and Dental University

2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda, Tokyo 101-0062, JAPAN
Tel & Fax: +81-3-5280-8095, E-mail: miyahara.bsr@tmd.ac.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, causing an upper-limit of the molecular weight for which quantitative charge detection can be feasibly performed.

We pursue 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.

In the course of the study, we found that the FET can also provide a format for visualizing changes in permittivity of a material introduced to the gate surface. Such dual (charge density and permittivity) sensitivity was further utilized as a monolithic platform to visualize kinetics of multiple elemental reactions involved in a calcium-responsive gel based chemo-mechanical system. Noteworthy is that patterns of the electrical response could be actively designed by simply modulating the gel dimension. The technique may offer important insights into more controlled ways of design and analysis of chemo-mechanical systems. Furthermore, oscillatory electrical behavior achievable during chemically- or mechanically-unidirectional phenomenon may imply a new principle of creating electrically-chemically-mechanically interactive signal transduction 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）

２．著書・総説

1）松元亮、宮原裕二「薬物放出ゲル、食品・化粧品・医療分野へのゲルの応用」（シーエムシー出版）、2010.
2）松元亮、宮原裕二「バイオトランジスタの開発」、現代化学、東京化学同人、p.54-58 、2010.

３．会議発表
第六回日瑞バイオナノワークショップ、電気学会センサ・マイクロマシン部門総合研究会、新学術領域研究「ソフトインターフェースの分子科学」第 4 回公開シンポジウム／第 5 回領域会議、Third International NanoBio Conference 2010、The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies、

４．その他　（例えば特許など）

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：国立循環器病研究センター研究所生体医工学部・山岡　哲二

研究分担者：国立循環器病研究センター研究所生体医工学部・馬原　淳

１．緒言

生体内において細胞は周囲の微小環境から様々な刺激を受けて分化や増殖を繰り返す。また、細胞が接する界面の物理的特性は幹細胞の分化を制御している事が近年明らかとされた。例えば、弾性率が10kPa 程度の界面において、組織幹細胞は優先的に軟組織を構築する組織細胞へと分化する。また、弾性率が 100kPa 程度の界面では骨芽細胞への優先的な分化誘導が認められ、これらの弾性率は、幹細胞が分化する組織の微小環境と関連しているものと理解されている。このように細胞表面と接する界面における相互作用は、分化誘導や細胞増殖などの多様な生物的イベントを制御している。つまり、ソフト界面における細胞の動的現象の解明や応用は、生物学的機能の理解や新たな診断デバイスを設計する上で重要な役割を果たす。

我々はこれまでに細胞ローリング現象を応用した新たな細胞分離デバイスを開発している。これは、細胞の表面マーカー分子の発現密度を識別して、リガンド固定化界面上における細胞ローリング速度の違いから目的細胞を分離するものである。これまでに、抗体をリガンドとして種々のソフト界面の設計と評価を進めてきた。シリコン基板上にポリアクリル酸のグラフト鎖を重合した界面や、ガラス界面に対してシランカップリング剤を導入し抗体を固定化したもの、さらには金表面上に固体を直接固定化した界面についても検討した。このようなリガンド界面での細胞ローリング挙動の評価を進める中で細胞とソフト界面との非特異的な相互作用が大きな問題点として見出された。細胞分離デバイスにおけるソフト界面上では、固定化された抗体と細胞表面分子との連続的な吸脱着反応によりローリング速度が変化することで細胞が分離される。しかし、界面における細胞の非特異吸着や固定化抗体密度の低下は、分離精度やカラムからの回収率の低下を引き起こす。つまり、細胞表面と固定化界面との非特異的相互作用の低減は、細胞分離デバイスを設計する上で極めて重要な問題となる。そこで本年度では、細胞の非特異的な吸着を抑える新たな細胞分離界面の構築として、Zwitterionic telomere brush 界面に着目した。本報告書では、Zwitterionic telomere brush により修飾したリガンド固定化ガラスキャピラリーの構築と、この界面上での細胞ローリング挙動のリアルタイム観察、さらには細胞分離挙動について検討を進めてきたので、以下にその成果について記述する。

２．研究経過

２．１ Zwitterionic telomere surface の構築と細胞ローリング挙動のリアルタイム観察

ガラス界面に対する Zwitterionic telomere surface は、富山大学の北野教授によって開発され、原子移動ラジカル重合法(ATRP)による導入法の確立と表面におけるタンパク質の非特異吸着の抑制について報告されている。そこで、図１に示すスキームに従って抗体が固定化された telomer brush 表面を作製した。ガラス界面として、長さ 12cm, 内径 1mm のガラスキャピラリーと 5mmx5mm に切断した厚さ 1mm のガラスチップを用いた。ガラス界面は、UV オゾンで 24 時間洗浄したものを用いた。シランカップリング剤により重合開始剤となる Br をガラス界面へ導入し、Cu(I)Br, bipyridine 存在下で 3-sulfo-N,

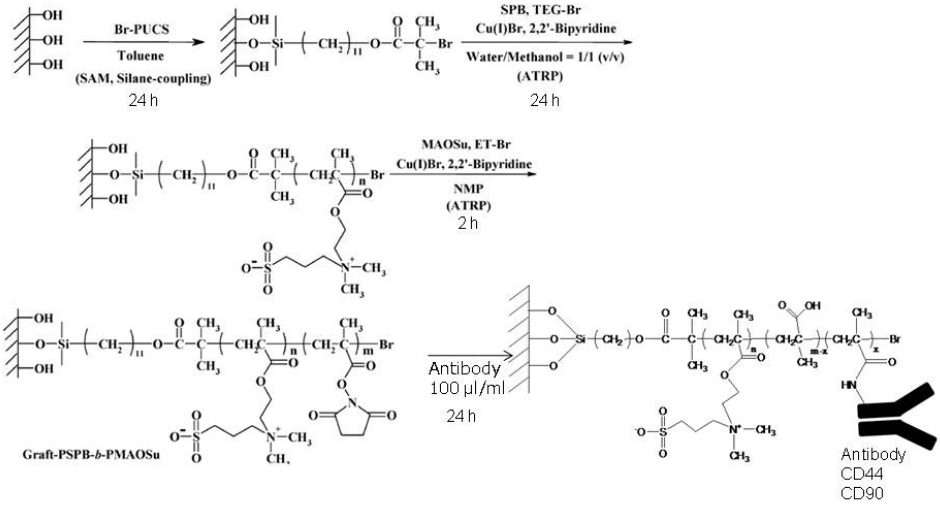


図１　Twitterionic telomere surface の構築

N-dimethyl-N- (2'-methacryloyloxyethyl)propanaminium inner salt (SPB)を ATRP により重合した。抗体をグラフト鎖の末端に固定化するために、同条件において N-methacryloyl-oxysuccinimide (MAOSu) を導入した。その後、構築した界面に対して抗体を反応させることで抗体固定化ガラス界面を作製した。界面における反応をトレースするために、X 線光電子分光法(XPS)ならびに水接触角測定により評価した。その結果を図２に示す。ガラス界面に対して SPB, MAO を修飾することにより、表面における窒素原子ならび硫黄原子の組成比が増加した。一方で Si 原子の組成比が反応の進行に従って、減少した。さらに、水接触角の評価では、シランカップリング剤により Br を導入することで、接触角は、80° まで増加するが、SPB 導入後には、30° まで減少している。これらの結果より、ATRP によりガラス界面において Zwitterionic telomere brush 界面が構築されていることを確認した。また、MAOSu を導入し、抗体(抗 CD90 IgG 抗体)を導入することで、XPS において N 原子の組成が増加し、S 原子が減少した。また、蛍光修飾抗体を修飾後蛍光顕微鏡によりガラス界面を観察した結果、界面において抗体由来の蛍光発光を観察できた事から、本手法においてガラス界面に SPB を介した抗体固定化界面を構築できたものと考えられる。

(A)

	non-mod glass	Mod Silane-cou	Mod SPB	Mod MAO	Mod CD90
N/C	0	0	0.081	0.136	0.306
Si/C	2.17	0.705	0.178	0.136	0.04
S/C	0	0	0.132	0.106	0.066
O/C	18.28	4.262	1.828	1.85	1.119
Br/C	0	0	0	0	0

(B)

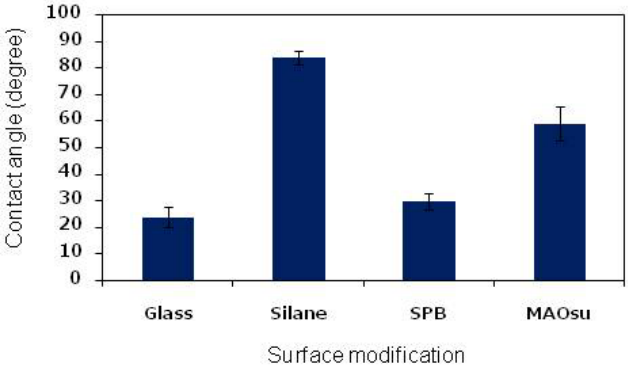


図２　(A) XPS 解析の結果ならびに(B)種々の表面に対する水接触角測定の結果

２．２　抗体固定化 Zwitterionic telomere brush 表面における細胞ローリングの観察と細胞分離

SPB 重合、ならびに抗 CD90 抗体を固定化したガラスキャピラリーに間葉系幹細胞 (MSC) を流して、ローリング挙動を観察した結果、SPB の修飾によりガラス界面の非特異吸着が抑制されており、また抗体固定化界面においてローリングする細胞を観察できた。図３には細胞溶出プロファイルを示す。SPB のみで表面修飾された場合に比べて、抗 CD90 抗体を固定化した界面では溶出の遅延に由来するピークが認められた。この結果は、細胞ローリングによりカラムからの溶出時間が遅延したものと考えられる。しかし、従来までに用いたポリアクリル酸のグラフト界面を有する分離カラムと比較すると遅延する細胞の割合や分離能が低かった。これは界面に固定化される抗体密度が低く、十分な細胞ローリング速度の低下を誘起できなかったことが原因として考えられる。今後は、固定化抗体量や密度を増加させる界面を構築し、細胞分離能への影響について検討を進める。

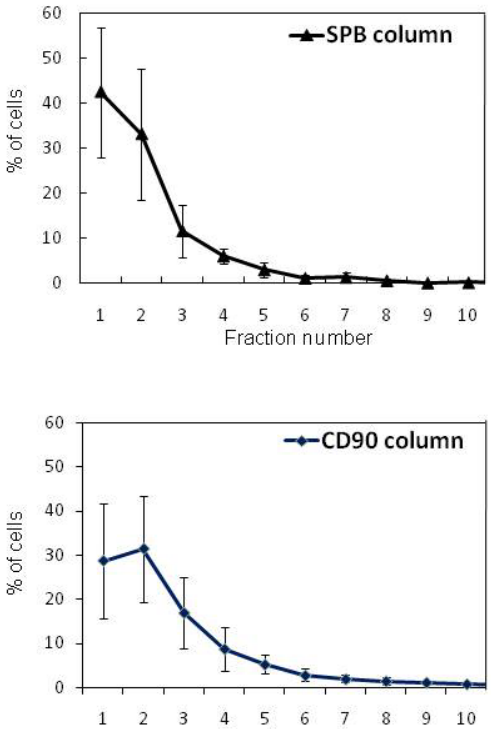


図３　細胞分離プロファイル（流速 25 μl/min, 6.25 μl /fraction）

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

Atsushi Mahara and Tetsuji Yamaoka

Department of Biomedical Engineering

National Cerebral and 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

The cells in our body are stimulated by various microenvironments known as niche, which lead to their differentiation and proliferation. Recently, it was reported that the elastic property of the microenvironments controlled the differentiation of mesenchymal stem cells. On the 10kPa surface, the cells were manly differentiated into the skeletal muscle cell. On the other hand, the cells differentiated into osteoblastic cells on the 100kPa surface. That is, the interaction between the cell surface and the microenvironment controls the biological events such as stem cell differentiation. Therefore, the analyses of such a dynamic interaction on the soft interface between immobilized ligand and cell surface are important and would be applicable for the developing novel devices for stem cell research.

We recently have developed the antibody-immobilized surface for cell separation. Cell rolling phenomenon has been applied for the cell separation system. Cell rolling is known as one of the dynamic interactions between the cells surface and immobilized ligand. Rolling velocity is largely controlled by the interaction strength, and the cells with various kinds of marker density are separated on the column. In the previous study, antibody-immobilized silicon surface modified with poly(acrylic acid) were used for the cell separation column. We have reported that mesenchymal stem cells with different surface marker density could be separated on the surface, and isolated two different subpopulations which have a high potential for the osteoblastic differentiation. On the other hands, we also observed that the cells are easily absorbed on the surface in a nonspecific manner and never elute out of the column. It strongly affects the cell separation profiles and the recovery. In this year, we have introduced the zwitterionic telomere brush surface to this cell rolling column. Professor Kitano It was reported that zwitterionic telomere surface showed a strong resistance against nonspecific absorption of protein. We changed our column design from poly(acrylic acid) graft surface to this brush surface, and the cell rolling process and separation profile were investigated. Surface modification on the glass surface by the zwitterionic telomere brush was accomplished by ATRP reaction. The surface was confirmed by x-ray photoelectron spectroscopy and contact angle analysis. After the modification on the telomere brush surface with anti-CD90 IgG antibody, cell rolling were successfully observed under the microscope equipped with high speed camera. The cells continuously rolled on the antibody-modified glass surface, and nonspecific adherent cells on the glass surface were scarcely observed. Moreover, the elution peak of the cells was shifted to the later by the surface modification with the antibody. These results suggested that nonspecific cell adhesion was completely restricted by the zwitterionic telomere brush surface and then the cells were rolling on the surface with the antibody continuously, which enabled the reliable and high performance stem cell separation on the soft interfaces completely restricted.

業績リスト　[馬原分のみ記載]

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) Mahara A. and Yamaoka T., "Continuous separation of cells of high osteoblastic differentiation potential from mesenchymal stem cells on an antibody-immobilized column" Biomaterials, 14, 4231-7 (2010).

2) Miskon A., Mahara A., Uyama H. and Yamaoka T., "A Suspension Induction for Myocardial Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells on Various Extracellular Matrix Proteins" Tissue Eng Part C Methods. accepted (2010)

3) Mahara A. and Yamaoka T., "Antibody-immobilized column for quick cell separation based on cell rolling" Biotechnol Prog. 26, 411-7. (2010)

4) Miskon A., Ehashi T., Mahara A., Uyama H. and Yamaoka T. "Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19.CL6 cells on different extracellular matrix components" J Artif Organs. 12(2) 111-7 (2009).

２．著書・総説

1) 馬原　淳『細胞分離技術の開発～白血球ローリング現象を模倣した細胞分離カラム』(2010)、バイオマテリアル＜生体材料＞、２８巻、第３号、p201-202

３．会議発表

1) 馬原　淳、カルロス　アグデロ、鈴木　久智、北野　博巳、山岡　哲二：Zwitterionic Telomer Brush で構築されたリガンド固定化界面による細胞分離カラムの作製と応用、第 20 回バイオ高分子シンポジウム、東京大学先端科学技術研究センター4 号館 2 階、(2010)、[国会学会　口頭発表]

2) 馬原　淳、カルロス　アグデロ、鈴木　久智、北野　博巳、山岡　哲二：MSC separation by an antibody-immobilized telomere brush surface、第 32 回日本バイオマテリアル学会大会、グランドプリンスホテル広島、(2010)、[国会学会　口頭発表]

3)馬原　淳・カルロス　アグデロ・北野　博巳・山岡　哲二:リガンド固定化ソフト界面の構築と細胞分離カラムへの応用, 第 59 回高分子討論会、北海道大学、(2010)、[国会学会　口頭発表]

4) T. Yamaoka: Antibody-immobilized cell rolling column for quick stem cell separation, PACIFICHEM 2010 (2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies), Hawaii Convention Center, (2010), [国会学会　口頭発表]

5) 馬原　淳・カルロス　アグデロ・北野　博巳・山岡　哲二: Design of antibody-immobilized surface for cell separation system, 第 20 回日本 MRS 学術シンポジウム、横浜開港記念館、(2010)、[国会学会　口頭発表]

公募研究代表者　A01

ソフト界面の創成　「ソフト界面を“創る”」

脂質流動界面のアレイ化と分子認識

研究代表者：関西大学　化学生命工学部・岩﨑泰彦

連携研究者：神戸大遺伝子実験センター・森垣憲一

１．緒言

リン脂質二分子膜を基本構造とする生体膜は、内在する糖脂質や膜タンパク質が協調しながら選択性の高い分子認識や物質輸送を行っている。すなわち、細胞膜は細胞の機能調節に極めて重要な役割を担っている。この二分子膜構造を人工的に構築することは、細胞膜の物性や機能を調べるために有効である他に、バイオセンシングの反応場としても利用できると考えられる。さらに、リン脂質二分子膜をアレイ化することによりアナライトの網羅的な解析や、新薬、抗体のスクリーニングへの応用が可能になる。そこで、本研究では微細な領域に精度良く安定な脂質二分子膜を形成させ、生体膜と同様な分子認識機能を持つソフト界面を構築することを目的とした。これまで２年間の研究実施期間において、ポリ（２-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン）（PMPC）をマイクロパターン化したシリコン基板にリン脂質リポソームを接触させることにより、自発的に流動性を備えた脂質二分子膜アレイが形成させることを見出し、糖脂質やビオチンを修飾した脂質をリポソーム調製時に添加することにより、脂質二分子膜アレイに分子認識機能を付与することができたので報告する[1)]。

また、「ソフトインターフェースの分子科学」への参画をきっかけに開始した共同研究の成果についても併せて紹介する。

２．研究経過

２-１．脂質膜アレイの調製と分子認識界面の創製

既報に従い、シリコン基板表面に高密度 PMPC ブラシをマイクロパターン化した[2)]。このパターン化基板に、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン（DOPC）を主成分とする直径役 70nm の一枚膜リポソームの懸濁液を接触させ、1 時間放置した。蛍光色素を含むリポソームを接触させるとリン脂質は PMPC ブラシが形成されていない部分に選択的に吸着することがわかった。表面の構造がリン脂質吸着に及ぼす影響は SPR 解析によっても認められた。吸着した脂質膜の特性を光褪色後蛍光回復法(FRAP)で解析したところ、アレイ状に吸着した脂質は流動性を有し、極めて均一な膜が形成されていることがわかった。

DOPC に適量のガングリオシド GM_1 もしくはビオチン修飾 DOPE を混合し調製したリポソームを PMPC ブラシがマイクロパターン化されたシリコン基板に接触させたのち、蛍光修飾されたコレラトキシンB(CTB)もしくはアビジンを接触させたところ、図１の蛍光像が認められた。リン脂質膜上に導入された脂質が特定のタンパク質と選択的に結合することがわかった。さらに、ガングリオシド GM_1-アビジンおよびビオチン修飾 DOPE -CTB の交差反応試験では、基板上に蛍光は全く観

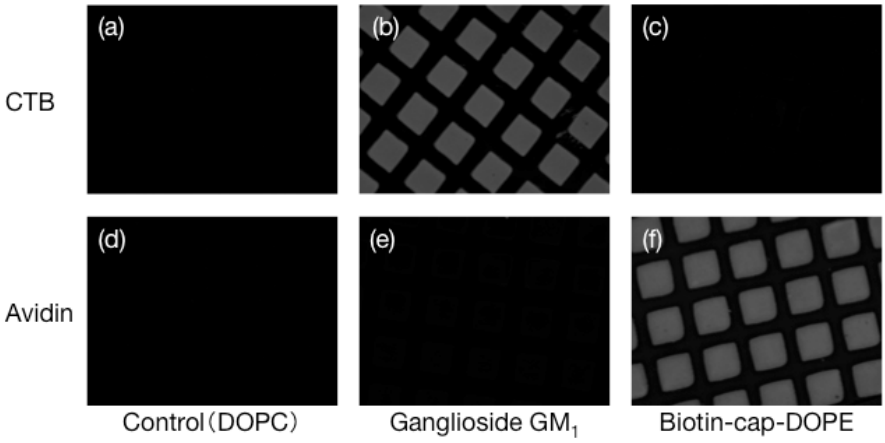


Figure 1 Fluorescence micrographs of PLBMA containing: (a, d) DOPC; (b, e) 2.0 mol% GM_1 in DOPC; (c, f) 2.0 mol% biotin-cap-DOPE in DOPC. The upper stage shows contact with each PLBMA and the green dye-tagged 200 nM CTB (a, b, c); the lower stage with the green dye-tagged 200 nM NeutrAvidin (d, e, f) in PBS.

察されず、非特異的なタンパク質吸着が脂質アレイ上で完全に抑制された。図１は緩衝液中で行った結果であるが、血漿タンパク質が存在する場合でも同様な傾向が認められた。

GM_1を2%含むPLBMAに異なる濃度のCTBを含む血漿を接触させたところ、蛍光強度とCTB濃度の関係は図２のようになった。プロットを Langmuir 吸着等温式とHill-Waudモデル式でフィッティングしたところ、Hill-Waud モデルの回帰係数が１により近くなった。この結果から脂質二分子膜に含まれるGM_1とCTBは多価結合していることが示された。

現在、異なった構成成分からなる脂質膜アレイの調整に着手しており、コンビナトリアルな解析に応用可能なチップの調製を検討している。

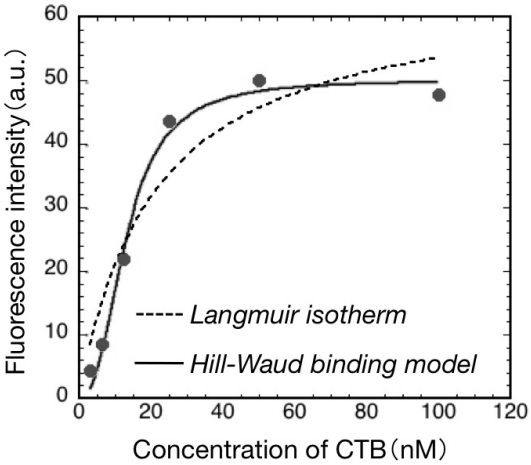


Figure 2 Fluorescence intensity of surface-bound CTB on DOPC PLBMA doped 2.0 mol% GM_1 versus bulk protein concentration in human plasma (●).

２−２．光反応性ブロックポリマーによる金属表面の修飾（兵庫県立大学・遊佐真一先生との共同研究）

金属材料は優れた機械的強度と靭性、成形性を有し、体内埋入型デバイス（インプラント）の７割以上は金属材料が用いられている。インプラントの使用で最も注意しなければならないことは感染の併発であるが、これを防ぐためには材料表面で起こるファウリングを抑制することが必要となる。しかしながら、金属表面のファウリングを抑制するための手段の検討は未だ十分になされていない。

本研究では、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)、 2-メタクリロイルオキシエチルリン酸(MPA)、シンナモイルエチルメタクリレート (CEM) からなるブロックコポリマーを合成し、このポリマーによる金属表面の改質を試みた。

所定量の 4-シアノ吉草酸ジチオベンゾエート、4-4’-アゾビス(4-シアノ吉草酸)、MPC を純水に溶解し、脱気後、加熱することにより末端ジチオエステル基をもつ MPC ホモポリマー(PMPC, Mn=1.49×10^4)を合成した。この PMPC をマクロ連鎖移動剤とし、MPA 単独もしくは MPA と CEM を重合し、MPC と MPA からなるブロック共重合体(PMbP)および、PMbP の MPA セグメントに CEM を有するブロック共重合体(PMbPC)を得た。図３に PMbPC の構造を示す。これらのポリマーを SUS316L 表面にディップコートして試料とした。PMbP を被覆した表面ではタンパク質吸着および細胞の粘着が SUS316L 表面に比べ著しく抑制された。この効果は MPA の重合度に依存し、重合度が 15 程度の時に最も顕著であった。MPA ブロックの重合度が小さいとポリマーがステンレス表面に結合できず、大きすぎると PMPC の表面密度が粗になった。また、PMbP を修飾した基板に長期間細胞に接触させると細胞の密度が徐々に増大した。これは表面に修飾された PMbP が剥離していることに由来すると考えられる。そこで光架橋性を付与し安定性の向上を検討した。PMbPC を被覆した基板に所定時間 UV 光を照射し、この試料を温水に浸け安定性を XPS 解析により評価した。UV 照射を行っていない基板ではポリマーに由来する各元素の割合が初期の６割まで低下したのに対し、UV を 30 秒照射した基板では溶出試験後も９割保持されることがわかった。安定性が認められた基板上では一週間以上細胞を接触させても粘着が抑制されることがわかった。

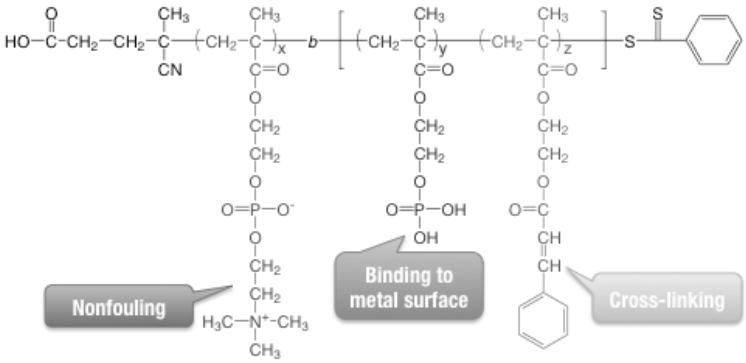


Figure 3 Chemical structure of photo-reactive MPC block copolymer

引用文献

１）K. Nakai and Y. Iwasaki et al., *Soft Matter*, 6, 5937 (2010).

２）R. Iwata and Y. Iwasaki et al. *Biomacromolecules*, 5, 2308 (2004).

Molecular recognition on fluidic lipid bilayer microarray

Yasuhiko Iwasaki

Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University

3-3-35 Yamate-cho; Suita-shi, Osaka 564-8680; Japan
Tel: +81-6-6368-0090, Fax: +81-6-6368-0090, E-mail: yasu.bmt@kansai-u.ac.jp

Cellular membranes consisting of phospholipid bilayers have functions of molecular recognition and transportation through the action of intrinsic glycolipids and membrane proteins. Proteins embedded in the lipid bilayers and carbohydrates attached to the surface facilitate communication and transport across the membrane. Substrate-supported phospholipid bilayers (SPBs) are being studied as models of cellular membranes. One of the important features of SPBs is the possibility of generating micropatterned membranes on the substrate, which enables the creation of designed arrays of biological materials for various applications. The general versatility of microarrays for multivariable, high throughput analysis has also been applied to solve analytical problems in the emerging field of proteomics. One area of chemical and biological analysis that could potentially benefit from the use of microarrays is the study of cellular membranes.

We have developed a new method for creating phospholipid bilayer microarrays (PLBMAs) via site-specific adsorption of phospholipid vesicles on a silicon surface bearing prepatterned, well-defined poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) brushes prepared by surface-initiated atom transfer radical polymerization. The monolayer of 3-(2-bromoisobutyryl) propyl dimethylchlorosilane (BDCS), which acts as an initiator for ATRP, was selectively decomposed with UV light irradiation through a photomask. The formation of PMPC brushes was well controlled on the remaining region of the BDCS on the surface. The adsorption of phospholipid bilayers on the PMPC brushes was completely obstructed, whereas planar bilayers were formed on the bare silicon surface. That is, the PLBMAs were perfectly formed on the prepatterned PMPC brush surface after being in contact with the phospholipid vesicles. The fluidity of the adsorbed lipid bilayer was determined by fluorescence recovery after photobleaching. Furthermore, on both the phospholipid bilayer and the PMPC brush surfaces, nonspecific interaction with proteins was effectively reduced. To demonstrate molecular recognition on the PLBMAs, phospholipid vesicles containing ganglioside GM_1 or biotin-capped lipids were allowed to contact the prepatterned PMPC brush surface. Specific bindings of GM_1/cholera toxin B and biotin/NeutrAvidin were quantitatively observed. PLBMAs are applicable for a variety of microarrays for determining protein/lipid and protein/protein interactions because the different compositions of phospholipid vesicles can be transferred. The PLBMA corralled PMPC brushes will then be useful as matrices for use in diagnostic and pharmaceutical fields.

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) Iwasaki Y, Yamaguchi E. Synthesis of well-defined thermoresponsive polyphosphoester macroinitiators using organocatalysts. *Macromolecules* 2010, 43, 2664-2666 (2010).

2) Nakai K, Morigaki K, Iwasaki Y, Molecular recognition on fluidic lipid bilayer microarray corralled by well-defined polymer brushes. *Soft Matter*, 6, 5937-5943 (2010).

２．著書・総説

1) Iwasaki Y and IshiharaK. Suppression of Inflammatory reactions on phospholipid polymer surfaces. in The Handbook of Intelligent Scaffold for Regenerative Medicine. (Khang G Ed.), 2011, in press.

３．会議発表

1) Matsuno H, Iwasaki Y. Metabolic expression of methacrylate-derivatized sialic acids and surface modification on the living cells, Society for Biomaterials 2010 Annual Meeting and Exposition, April 2010, Seattle, Trans. 34th Annual Meeting;32:789.
2) Iwasaki Y, Nakai K, Morigaki, K. Specific protein binding on fluidic lipid bilayer microarray corralled by well-defined polymer brushes, Society for Biomaterials 2010 Annual Meeting and Exposition, April 2010, Seattle, Trans. 34th Annual Meeting;32:654.
3) Iwasaki Y, Nakai K, Morigaki K. Specific protein binding on phospholipid bilayer array corralled by nonfouling polymer brushes, 240th ACS National Meeting, Boston, August 2010, Polymer Preprints 2010, 51(2), 7.
4) 松本彬，岩﨑泰彦，遊佐真一．　金属表面に結合するMPCブロックコポリマーの精密合成，日本バイオマテリアル学会 第5回 関西若手研究発表会，2010年8月，京都，予稿集:P-3-2.
5) Yamaguchi E, Iwasaki Y. Synthesis of biocompatible block copolymers using well-defined polyphosphoester macroinitiators, 240th ACS National Meeting, Boston, August 2010, Symposium proceeding, PMSE 285.
6) 岩﨑泰彦，中井康介，下村 享嗣，森垣 憲一．リン脂質ポリマーブラシを用いた分子認識ソフト界面の創製．第59回高分子討論会，2010年9月，札幌，予稿集，4377.
7) 松野大志，岩崎泰彦．重合性糖鎖を誘導した細胞の表面改質．第59回高分子討論会，2010年9月，札幌，予稿集，5136.
8) 松野大志，岩﨑泰彦，太田龍弥．細胞膜要素を担時したポリマーの生体認識機能．第32回に本バイオマテリアル学会大会，2010年11月，広島，予稿集，220.

水中での高分子の自発的集合化に基づく動的界面の創製とその機能・メカニズム解析

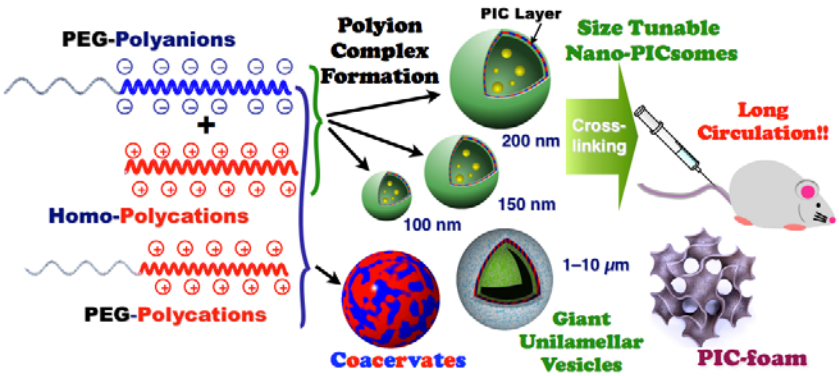
研究代表者：東大院工・岸村顕広

連携研究者：東大院工・小穴英廣

１．緒言

ここ１０年以上にわたって、ナノテクノロジーの発展と連動しての超分子化学の進歩は著しいものがあった。しかしながら、ナノ～マイクロメートルスケールでの分子集合体の分析は、もっぱら電子顕微鏡などによる静的な構造解析が中心であり、その動的挙動の解析は、まだまだ未成熟と言わざるを得ない。本研究では、ナノ・マイクロカプセルを“閉じた浮遊界面（閉鎖界面）”と捉え、特に水を分散媒とし、水溶性分子の自己集合により生じる浮遊界面をターゲットとすることで、その動的性質や外濫に対する応答挙動の解析と物性評価を押し進めている。ナノ・マイクロメートルスケールで作り込まれたこれらの界面を研究対象とすることは、新規バイオマテリアル開発への寄与、及び、生体内コンパートメント（細胞、オルガネラなど）との類似性の視点からも非常に興味深い。

これまで、我々は、生体適合性のポリエチレングリコール(PEG)とポリアミノ酸由来の荷電性セグメントからなるブロックコポリマーを構成単位とし、静電相互作用を駆動力としてできるポリイオンコンプレックス型閉鎖界面 PICsome (polyioncomplex polymersome; Scheme)の開発に成功している。この PICsome は、水溶性コンポーネントの自己組織化を生かした、水溶液を混ぜ合わせるだけという簡便な調製法で特長づけられる。従来の両親媒性分子を用いた界面形成は、疎水性相互作用が中心的役割を担うため有機溶媒を必要とする場合が多く、また、速度論的に凍結した生成物を与える場合も多かった。一方、これらとは異なり、PIC 型の界面は水溶液を支配する種々のパラメタ（pH、温度、イオン強度、etc…）に敏感に応答する点で動的挙動に富んでおり、系全体は複雑であるもののソフトマテリアルの研究対象としては非常に魅力的である。我々はこれまで、μm スケールの PICsome を簡便に調製する手法を確立しており、特徴的な性質として、半透過性や pH 応答性、タンパク質の保護機能などがあることを見出してきた。H21 年度、サブミクロンスケールでの浮遊界面の構造制御法の発見と、μm スケールの PIC 粒子のマニピュレーションと構造変換技術を確立したが、本年度はさらにそれらの成果を発展させることに成功したので、それらを中心に報告する。



Scheme. ポリアニオンとポリカチオンの単純混合により得られる高分子型ベシクル **PICsome** の概念図[1–5]。ポリマーの組成により異なる構造が得られる。

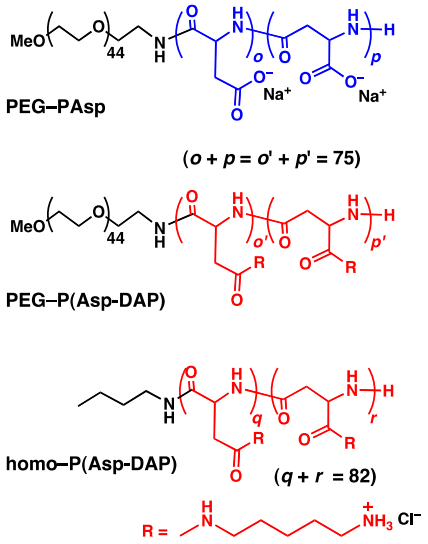


Fig. 1. 代表的なポリイオンの構造式。

２．研究経過

２.１ サブミクロン領域で粒径制御可能な PIC ベシクル Nano-PICsome の開発と生体内での機能評価

前年度見出した手法に基づき、PEG-PAsp (n = 75)と homo-P(Asp-DAP) (n = 82) (Fig. 1)を添加塩を含まないバッファーに溶解し、荷電比が等しくなるよう混合することで、直径 100–400 nm で種々の粒径のユニラメラ型ベシクル Nano-PICsome を得た。生理条件での使用に耐えうるように、EDC によるアミンとカルボン酸側鎖の架橋を行い、PIC 内部の架橋安定化を行った。十分に架橋した種々の粒径の Nano-PICsome を担がんマウスに尾静脈投与したところ、粒径 100-300 nm ではどれも長い血中循環を示し、特に直径 150, 200 nm で極大を示した（平均滞留時間約 70 時間）。さらにサイズに依存した動態を示し、C26 腫瘍には直径 150 nm より小さい PICsome が選択的に集積、脾臓には直径 200 nm 以上の粒子が選択的に集積することを明らかにした[*Chem. Commun.* **2011**, 6054.]。これらの結果から、直径 150 nm の PICsome が、最も臓器特異的な集積を示さず血流循環を達成できることがわかった。このように、ナノ粒子の生体適合性やサイズなどを精密に制御することで、これまで知られていなかったような生体内のサイズの窓を明らかにすることに成功した。

２.２ uPIC を基本単位とする PIC 集合体形成

これまで、我々は、荷電ポリマーどうしの静電相互作用が PIC 形成の本質だと思い込んできた。しかし、詳細な解析から一対の PIC（単位 PIC; unit PIC; uPIC）の果たす役割とそれに関連した PICsome の特異な性質を明らかにすることに成功した。先の 2.1 で作製した PICsome は、荷電密度が高い材料が共存する条件で調整することは困難であり、荷電密度の高い物質の封入はできないとされてきた。そこで我々は、先に PICsome を調製した後に荷電密度が高い材料を加え、その後にボルテックスミキサーによる撹拌を試みた。その結果、PICsome 内へこれら荷電性の物質を封入可能であることを見出した（後入れ法; 特願 2010-117821; Fig. ２）。この現象は、PICsome が撹拌により生ずる剪断応力で一時的に uPIC に分解し、その後 uPIC が基本コンポーネントとなってベシクルが再生することに起因することを見出した。

一方、直径 100 nm の Nano-PICsome は、経時変化に伴って単分散性を保ったまま数日かけて成長する (100→300 nm; Fig. ２)。このメカニズムも uPIC に由来することがわかった。すなわち、uPIC を取り除くとこの成長は止まり、加えると再度成長する。詳細な経時変化をスナップショット解析により行ったところ、uPIC は吸収されるだけで漏れ出さないことが分かった。実際、uPIC 吸収反応は一次の反応速度式に従っていた。つまり、uPIC の吸収過程は、uPIC の『リビング重合』的な吸収の過程であるということを突き止めた。これらの知見から、PIC の設計は単なるポリカチオンとポリアニオンの組み合わせではなく、uPIC の特性を考慮しなければならないということが結論される。

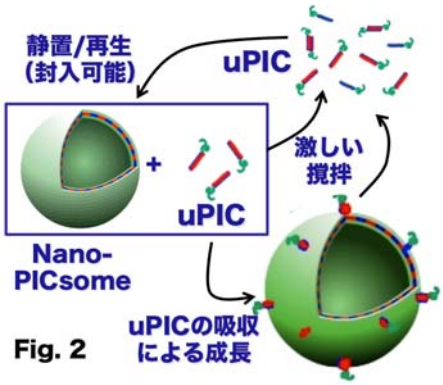


Fig. 2

２.３ ホモポリアニオンとして siRNA を用いた PICsome の調製と機能評価

: Nano-PICsome の知見を基に、PEG-P(Asp-DAP)と siRNA を用いて同様のベシクル状構造体を得ることに成功した(siRNAsome)。また、細胞を用いた評価を通じて、siRNAsome が RNA 干渉の活性を示すことを見出した(特願 2010-117823)。このような構造体はオリゴ核酸の送達システムとして期待できるとともに、分子量分布のない高分子を用いて作製した PIC の例として物理化学的視点からも興味がもたれる。

２.４ ホモポリアニオン/PEG-ポリアニオン混合系の利用に基づく PIC-foam の発見

： ポリアニオンとして PEG-PAsp と homo-PAsp を適宜混合し、PEG-P(Asp-DAP)とコンプレックス化を行うことで所定の PEG 含有量を有する PIC の調製を行った。透過型電子顕微鏡による分析の結果、150 mM NaCl 条件において得られるマイクロ粒子が、均一な細孔を有するポーラス構造体 PIC-foam を形成することを見出した。PIC-foam は、細孔径が 20-30 nm のものと 100-200 nm の物が得られ、かつそれぞれのチャネルが PEG で覆われていることから、バイオマテリアルとしての活用が期待される。

Dynamic Property of Polymeric Self-assemblies in Aqueous Media Based on Polyion Complexes Considering Interfacial Properties

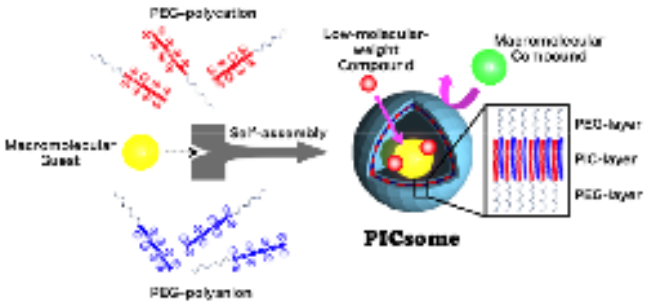
Akihiro Kishimura, Hidehiro Oana

Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

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

Phone: +81-3-5841-7109, FAX: +81-3-5841-7139, E-mail: kishimura@bmw.t.u-tokyo.ac.jp

Recently, there has been an increase in the number of studies devoted to morphological control (e.g. vesicles, fibers, micelles) of self-assembled nano-structures in connection with nano-technologies, as they have a great potential for industrial applications. Above all, vesicles which are prepared in aqueous media have received much attention in terms of both future applications in the medical field and ecological, low-cost and low-energy fabrication processes. We previously reported preparation of stable polymeric vesicles by simple mixing pairs of oppositely charged block copolymers composed of biocompatible poly (ethylene glycol) (PEG) and poly (amino acid)s in an aqueous medium[1-3]. The polymeric vesicles thus obtained consist of a polyion complex (PIC) membrane, and we termed them "PICsomes". Many utilities of PICsomes have been revealed so far (encapsulating macromolecules, permeability, proteinase resistance, pH-sensitivity), which are great advantages compared with conventional amphiphilic lipid and polymer vesicles [1-3]. Nevertheless, precise control of the structure and size of PICs are still a big issue. In this study, we demonstrate several ways of preparation of uni-lamellar PICsomes in the size range over 100 nm–10 μm [4,5] and find novel methods to build new PIC architecture.



Scheme. Illustration of PICsomes produced by mixing a pair of oppositely charged block copolymers.

Selective disposition of nanocarriers into target tissue is an essential issue in drug delivery. In that sense, nanocarriers with well-controlled properties are potentially useful to get deep insights for remaining issues in the medical field. Very recently, we developed nano-sized polyion complex vesicles (Nano-PICsomes) that are characterized by unilamellar structure, tunable size over the range between 100–400 nm, and excellent biocompatibility in mice [4]. In this study, detailed biodistribution of the various sizes of Nano-PICsomes was examined in tumor-bearing mice. From pharmacokinetic analyses, PICsomes with the diameter of 150-200 nm showed much prolonged blood circulation. Critical size of nanocarriers (~150 nm) discriminating the permeability into normal and tumor tissues was determined by the use of long-circulating Nano-PICsome as a ruler [6].

The morphology and microstructures of the particle is highly dependent on the composition of polymers. In the previous report, we noticed the importance of control of PEG weight fraction in PICs to tune PIC architectures. Therefore, we decided to blend block and homo polyanions to modulate PEG weight fraction. Homo-polyanions rich conditions resulted in the formation of micron-sized particles. TEM observation revealed that particles with different compositions show different microstructures within the PICs (Fig.). They are roughly classified into two types, coacervates, dense materials involving micro-phase separation, and porous structures. These results clearly reflect the effect of PEG weight fraction in the whole PIC.

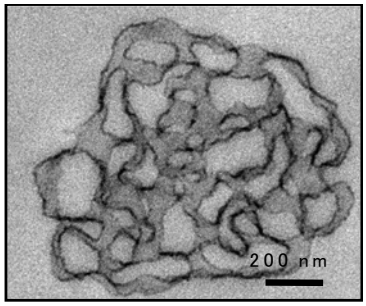


Fig. Representative image of porous PICs.

References.

[1] A. Koide, A. Kishimura, et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5988. [2] A, Kishimura, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6085. [3] A. Kishimura, et al., *Soft Matter* **2009**, *5*, 529. [4] Y. Anraku, A. Kishimura, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 1631. [5] H. Oana, A. Kishimura, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4613. [6] Y. Anraku, A. Kishimura, et al. *Chem. Commun.* **2011**, 6054.

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） Yasutaka Anraku, *Akihiro Kishimura, Atsushi Kobayashi, Makoto Oba, and *Kazunori Kataoka, Size-controlled long-circulating PICsome as ruler to measure critical cut-off disposition size into normal and tumor tissues.
Chem. Commun., **2011**, *47*, 6054–6056.

２．著書・総説

1）岸村　顕広、ブロック共重合体基盤とするポリイオンコンプレックスの精緻な構造・物性制御.
Colloid & Interface Communication, **2010**, *35*, 14-16.

2）岸村　顕広、シンプルな手法によるポリマーナノ・マイクロカプセルの構造制御と生体材料応用.
バイオマテリアル **2010**, *28*, 171-172.

3）岸村　顕広、小穴 英廣、分子コンポーネントの集合挙動制御に基づく巨視的ベシクル形成法の開発.
東京大学ナノバイオ・インテグレーション研究拠点・編、*医薬理工の異分野融合研究から見えたナノバイオの未来*、株式会社エクスナレッジ(東京)、**2010**, 82-83.　ISBN 978-4-7678-1001-0

4）岸村　顕広、生体に学び，生体に迫り，生体で用いる分子集合体科学.
化学と工業　**2010**, *63,* 487.

３．会議発表

［依頼・招待講演］

1）岸村　顕広、生体材料を指向したポリイオンコンプレックス中空ナノカプセルの作製と機能、統合バイオナノシステム研究がもたらすイノベーション基盤の新展開、独立行政法人理化学研究所　大河内記念ホール（埼玉県和光市）、2010 年 8 月 6 日。

2）岸村　顕広、ポリイオンコンプレックスを用いた分子集合体の構造・物性制御、錯体化学若手の会夏の学校２０１０、国民宿舎　関ロッジ、2010 年 8 月 10 日。

3）岸村　顕広、ポリイオンコンプレックスを用いた水中におけるナノ空間の生成とその応用、日本化学会　第４回関東支部大会　シンポジウム S12「ナノ空間材料の科学」、筑波大学、2010 年 8 月 31 日。

4）Akihiro Kishimura, Novel polymeric hollow capsules “PICsomes”: Development of polyion complex vesicles possessing PEG palisade toward therapeutic/diagnostic nanodevices. *NanoDDS’10,* Omaha, Nebraska, USA, October 5th, 2010.

5） Akihiro Kishimura, Development of Polymeric Nanomaterials toward Biomedical Applications. *IBI Cross-Disciplinary Sandwich Seminar*, EPFL, Lausanne, CH, October 25th, 2010.

6）岸村　顕広、ソフト界面制御によるポリイオンコンプレックスナノ・マイクロ粒子の構造制御とその機能、日本化学会第 91 春季年会　特別企画・ソフト界面による材料化学の新潮流 、神奈川大学、横浜、2011 年 3 月 26 日。

［共同研究］

1）　守永睦貴, 小穴英廣, 岸村顕広, ゲル・ムラト, 片岡一則, 鷲津正夫、流体デバイスを用いた高分子ベシクル形成過程のリアルタイム観察、第21回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、東京大学本郷キャンパス、2010年6月10-11日、ポスター発表。

2）守永睦貴, 小穴英廣, 岸村顕広, Murat Gel, 片岡一則, 鷲津正夫、ポリイオンコンプレックスからなる高分子ベシクルの物質保持特性評価、第22回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、名古屋大学医学部附属病院、2010年11月17-18日、ポスター発表。

４．その他　（例えば特許など）

1）核酸を膜内に含有するベシクル
特願 2010-117823 (2010.05.21)
片岡一則、岸村顕広、宮田完二郎、大庭 誠、安楽泰孝、須磨知也、Sayan Chuanoi

2）物質内包ベシクル及びその製造方法
特願 2010-117821 (2010.05.21)
片岡一則、岸村顕広、安楽泰孝、宮田完二郎

バイオリソグラフィー手法の開発と表面加工への展開

研究代表者：産総研光技術研究部門・吉川佳広

１．緒言

微細構造製造・微細加工技術は、自己組織化に代表されるボトムアップ手法と、材料を小さく刻んでいくトップダウン手法に大別される。近年、自己組織化に基づく機能性ナノマテリアルが種々合成されつつあるが、それらを効率的かつ機能的に使用するためには、基板上に合目的に集積化する必要性がでてくる。本研究では、トップダウン手法に分類される手法のバイオリソグラフィー手法の開発とそれによる高分子表面の加工を行うことで、ナノマテリアルを集積化するためのナノパターン構造の構築を目的とした。そのために、生分解性高分子のナノパターンを作製し、微細領域を高分子加水分解酵素で分解することにより、アレイ構造を作製する。そして、ナノマテリアルを自己組織化によって集積化する。本手法では、生分解性高分子の自己組織化と酵素分解、およびナノマテリアルの自己組織的集積化しか用いないため、省資源・省エネルギーな新しいクリーンナノテクノロジー研究の創発に貢献できると考えている。

２．研究経過

２．１　生分解性高分子のパターニングとナノマテリアルの集積化

高分子の代表的なナノパターニング法には、ブロックコポリマーのミクロ相分離構造を用いるものがある。しかし、この場合には多段階の合成ステップを必要とする。そこで、ホモポリマーでもナノパターンを形成することが望まれるが、昨年度の研究において、我々は生分解性高分子の一つであるポリ(ε-カプロラクトン)（PCL）が、高配向グラファイト（HOPG）表面で方向性を持って結晶成長することを見出している(*Polym. Degrad. Stab.*, 95, 1414-1420 (2010))。そこで、本手法を応用して、PCL のナノパターニングを試みた。

PCL（HMW: Mw = 194×10^3）をトルエンに溶解し、劈開して清浄面を露出させた HOPG 上にスピンキャストした。すると、長さが数百 nm の結晶がお互いに 60 度の角度で配列したパターンが形成された。このナノパターンの規則性・連続性を更に延長するため、溶融結晶化を行った。図１(a)に PCL 薄膜を 100℃で溶融した後、50℃で 24 時間以上結晶化した際に形成された表面形態を原子間力顕微鏡（AFM）で観察した結果を示す。それぞれの結晶は 60 度の角度で配向しており、キャスト膜に比べると結晶サイズが増大した。縞構造は 200 nm～1 μm 続いており、規則性を持った縞模様が薄膜全体に形成されていた。配列している結晶の断面プロファイルを調べたところ、縞構造は凹凸形状を持っており、凸部分の間隔は結晶化温度が 50℃の場合には約 20 nm であることがわかった。結晶化温度が低下するにつれて凹凸の間隔は短くなることから、これらの結晶はポリマー鎖が HOPG 表面に対して平行に配列した edge-on ラメラであると考えられた。すなわち、凹凸構造は PCL の結晶部と非晶部が交互に配列したストライプパターンであるといえる。

ストライプパターンの持続長は、PCL の分子量によっても変化することがわかった。すなわち、より低分子量の PCL（LMW: Mw = 33×10^3）で同様の実験を行ったところ、約 3 μm 以上もの長さの縞構造を形成できることがわかった（図１(b)）。これは分子量低下に伴い、核形成が抑制されて分岐が生じにくくなるためであると考えられる。

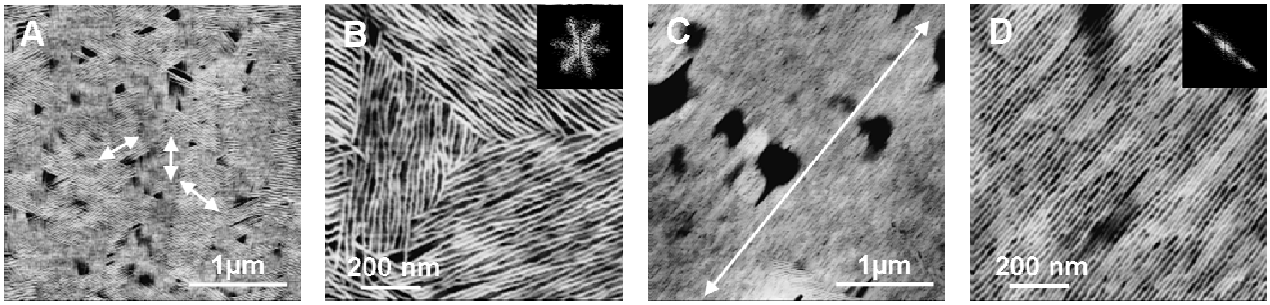


図１　(A, B) PCL-HMW および(C, D) PCL-LMW の溶融結晶化薄膜における AFM 像。B と D 中の挿入図は、FFT を示す。

次いで、凹凸形状の異なるパターンの作製のため、酵素によるバイオリソグラフィー加工を行った。具体的には、PCL を分解できるリパーゼを特定領域に塗布し、分解加工を行った。一般に生分解性高分子の結晶領域は非晶領域よりも酵素の分解を受けにくいことが知られている。PCL のストライプパターンにおいては、結晶部と非晶部が交互に配列しているため、酵素分解加工を行うと非晶部が優先的に分解され、結晶領域が残存していた（図２）。

この残存結晶パターンにナノマテリアルを集積化することを考え、今回は化学修飾した金ナノ微粒子をスピンキャストした。すると驚くことに、酵素分解で形成された凹部にではなく、残存した結晶部の上だけに金ナノ微粒子が配列することがわかった（図２(b)）。このような金ナノ微粒子の配置は、AFM および走査型電子顕微鏡によって確認している。したがって、生分解性高分子である PCL のパターン化、それに続くバイオリソグラフィーで形成したパターン上に金ナノ粒子を集積化することに成功し、省エネルギー手法によるナノマテリアルの集積化技術に向けて大きく前進することができた。

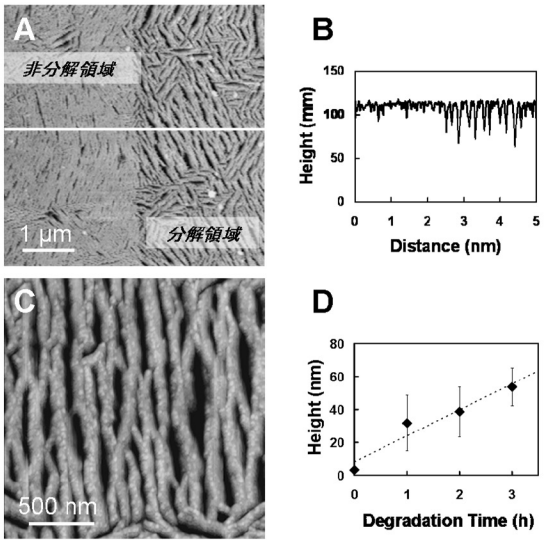


図２　(A)半分だけ分解した PCL 膜の AFM 像、および白線部分の(B)断面プロファイル。(C)分解領域の拡大 AFM 像。(D) 酵素分解時間と凹部分における深さのグラフ。

２．２　自己組織化によるナノパターン形成

生体内では、酵素やタンパク質が外部からの刺激に応じて柔軟に構造と機能を変化させながら、高度な基質認識やイオン濃度の調節を行っている。生体と類似した高機能なソフトインターフェスの構築を目指し、我々は外部刺激（光、熱、錯体形成など）により機能的に配列変換できるシステムの構築に関する研究も推進している。そして、トップダウン手法で形成したパターン内に、機能性二次元膜を集積化することを目指している。そこで、外部刺激によって、自在に分子配列を変化させることのできる機能性二次元膜の創製を試みた。

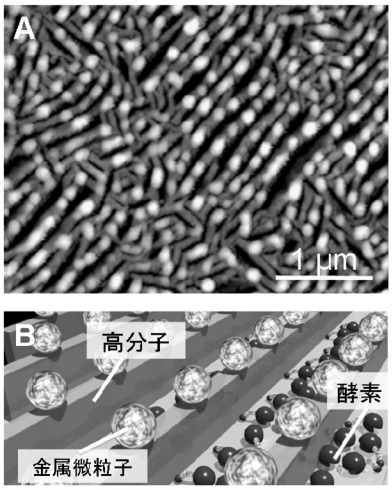


図３　(A) 酵素分解後の PCL-HMW 薄膜に金ナノ微粒子をスピンキャストして観察した AFM 像。白く見えている金ナノ微粒子が PCL 結晶の上に配列している（(B)の模式図参照）。

基板上への分子固定化ユニットとして作用するアルキル鎖を導入した熱応答性のあるイソブテニルエーテル化合物を設計・合成した。そして、本化合物の二次元ナノ構造を、HOPG と溶媒の固液界面において走査型トンネル顕微鏡（STM）で観察した。アルキル鎖中の炭素数を 18～21 まで変化させると、炭素数の偶奇で波型あるいは三脚型の分子配列を作り分けることができた（偶奇効果、図４(a)）。本分子は、160℃で加熱するとタンデムクライゼン転移（TCR）が起こり、エーテル酸素が水酸基に変換される。そこで、基板上の分子を加熱した後に STM 観察を行うと、化学構造の変化に伴って二次元配列中の分子間相互作用が変化し、アルキル鎖長の偶奇に関わらず、転移前とは全く異なる直線型構造に収束化することがわかった（図４(b)）。このように、加熱により二次元構造を変換できる分子の開発およびその配列制御に成功した。

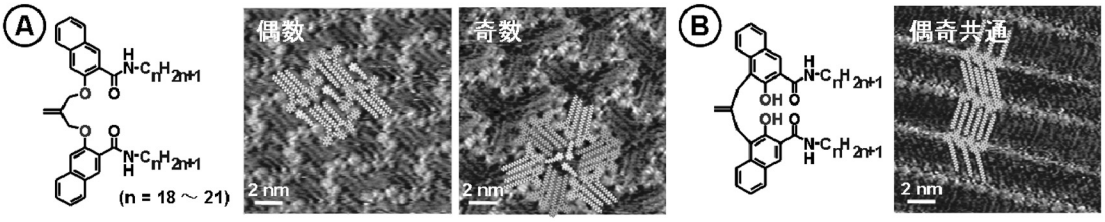


図４　イソブテニルエーテル化合物の化学構造と STM 像。(A)TCR 前、(B)TCR 後。

Development of Biolithography Technique and its Application to Surface Patterning

Yoshihiro Kikkawa

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

Tsukuba Central 4, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8562, Japan
Tel: +81-29-861-2955, Fax: +81-29-861-3029, E-mail: y.kikkawa@aist.go.jp

Nanofabrication is can be achieved by bottom-up and/or top-down approaches. Recently, there are increasing numbers of nanomaterials prepared by self-assembly based on the concept of supramolecular chemistry. For the effective use of their nanofunctions, such nano-materials should be integrated on a substrate appropriately and precisely. In this context, we are trying to develop the biolithography technique to fabricate nano-structues on a polymeric surface, and to assemble the nano-materials on the patterns. Since the biolithography technique is composed of surface nano-patterning by the self-assembly of polymeric material and following enzymatic degradation by enzymes, this technique can be categorized as environmentally friendly and clean nanotechnology.

Surface patterning was performed by using a biodegradable poly(ε-caprolactone) (PCL) via self-assembly. The toluene solution of PCL was spin-cast on a freshly cleaved highly oriented pyrolytic graphite (HOPG). The thin film was melt-crystallized at 50 °C, and the surface morphologies were visualized by atomic force microscopy (AFM). AFM observation revealed that stripe patterns of lamellar crystals were formed due to the epitaxial crystallization of PCL on the HOPG support, and the orientation of the stripes were at an angle of 60 °, which is corresponding to the HOPG lattice direction. The intervals of stripe patterns consist of valleys and ridges decreased with a decrease in the crystallization temperature. This result suggests that the PCL crystals are edge-on lamellae, in which the polymer chains align parallel to the HOPG plane surface. The persistence length of the stripe patterns was dependent on the molecular weight of PCL. High molecular weight PCL (PCL-HMW: $Mw = 194\times10^3$) formed fringed morphology of 200 nm - 1 μm in length, whereas the stripes of PCL-LMW ($Mw = 33\times10^3$) persisted over 3 μm.

Enzymatic degradation by lipase was performed to prepare the oriented PCL thin film with different depth profiles. A droplet of the enzyme solution in a buffer was placed on the oriented PCL thin films, and incubated for desired time. Then, the thin film after the enzymatic degradation treatment was washed with ethanol aqueous solution to remove the enzyme, and the surface morphology was again observed by AFM. As the degradation proceeds, the height difference between the valleys and ridges increased. This result indicates that the valleys and ridges are composed of crystalline and amorphous regions, respectively, because the enzymes preferentially attack amorphous regions compared with crystalline ones.

Finally, gold nano-particles functionalized with organic compounds were spread on the nano-patterns formed after the enzymatic degradation. To our surprise, AFM and scanning electron microscopy observations revealed that the gold nano-particles are not accumulated within the valleys, but on the ridges, namely, gold nano-particles could be assembled only on the remained crystalline region. Thus, the biolithography technique composed of nano-patterning and following enzymatic degradation could be successfully applied for the integration of nano-materials.

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) *Kikkawa,Y., Fukuda,M., Kashiwada,A., Matsuda, K., Kanesato, M., Wada, M., Imanaka, T., *Tanaka, T.: "Binding Ability of Chitinase onto Cellulose: An Atomic Force Microscopy Study, *Polym. J.*, in press.
2) *Kikkawa, Y., *Koyama, E, Aoyagi, M., Schneider, S., Takahashi, M., Fujiwara, K., Kanesato, M.:"Metallation of Bipyridine Derivatives Substituted at Meta Position by Alkyl Chains: Effects on the Two-Dimensional Structures", *Supramol. Chem.*, 23, 9-12 (2011).
3) *Kikkawa,Y., Takahashi, M., Aoyagi, M., Suga, H., Kanesato, M., Abe, H.:"Surface Patterning of Poly(ε-caprolactone): Epitaxial Crystallization and Enzymatic Degradation", *Macromol. Chem. Phys.* 211, 2480-2483 (2010).
4) *Kikkawa Y., Kihara, H., Takahashi, M., Kanesato, M., Balaban, T. -S., Lehn, J. -M.: "Two-Dimensional Structures of Anthracene Derivatives:"*In Situ* Photodimerization and Host-Guest Chemistry",*J. Phys. Chem. B.* 114, 16718-16722 (2010).
5) Omori, K., *Kikkawa, Y., Kanesato, M., *Hiratani, K.:"Fabrication and Transformation of Novel Two-Dimensional Tripod Structures: Structural Modulation by Alkyl Chain Length and Tandem Claisen Rearrangement", *Chem. Commun.*, 46, 8008-8010 (2010).
6) Omori, K., *Kikkawa, Y., Kanesato, M., *Hiratani, K.: Noncyclic Isobutenyl Compounds with Esters: "Effect of Hydrogen Bonds and Tandem Claisen Rearrangement on Two-Dimensional Structures", *Chem. Lett.*, 39, 1039-1041 (2010).

２．著書・総説
1) *吉川佳広、田中丈士：分子間相互作用解析：キチン／キチナーゼ系への展開；*キチン・キトサン研究*, 17, 14-23 (2011).
2) 平石知裕、吉川佳広、岩田忠久：バイオポリマーの酵素分解：分解酵素とポリマーの相互作用；*バイオプラジャーナル,* 37, 18-23 (2010).
3) *Iwata T., Abe H. Kikkawa Y.: "Enzymatic Degradation of Poly(lactide)", *In Poly(lactic acid)-Synthesis, Structure, Properties, Processing and Applications*; Rafael A. Auras, Loong-Tak Lim, Susan E. M. Selke, and Hideto Tsuji. Eds., Wiley, p. 383-399 (2010).

３．会議発表

1) 吉川佳広：「分子間相互作用解析：キチン-キチナーゼ系への展開」、第 24 回キチン・キトサンシンポジウム、東京大学、東京（2010）.［国内学会　口頭（招待講演）］
2) 吉川佳広、黒川賢志、木村亮太、高橋 真佑子、金里 雅敏、阿部英喜：「ポリ(L-乳酸-b-ε-カプロラクトン)薄膜の表面形態－AFMによる解析」、第49回高分子討論会，北海道大学（2010).［国内学会　ポスター］
3) Kikkawa, Y., Koyama, E., Tsuzuki, S., Fujiwara, K., Kanesato, M.: "Odd-even effect on the molecular arrangements at solid/liquid interface", The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM2010), Honolulu, Hawaii (2010).［国際学会　口頭］
4) Kikkawa, Y.:"Scanning Probe Microscopic Study on Molecular Self-Assembly and Intermolecular Interaction", International Focused Group Symposium on Biobased Polymer, Penang, Malaysia (2011).［国際学会　口頭（招待講演）］
5) Kikkawa, Y.: "Epitaxial Crystallization and Enzymatic Degradation of Poly(ε-caprolactone) for Surface Patterning", International Workshop on Bio-based Materials, Taipei, Taiwan (2011).［国際学会　口頭（招待講演）］

４．その他　（例えば特許など）

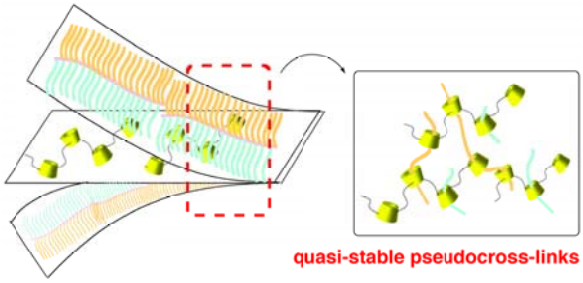
1) 吉川佳広、青柳将、高橋真佑子、菅洋志、金里雅敏：生分解性高分子材料のパターニング方法、特願 2010-149550
2) 吉川佳広、平成 22 年度　高分子学会研究奨励賞、大阪（2011）

インターロック構造を基盤とするソフト界面の新接着法

研究代表者：東京工業大学大学院理工学研究科・小山靖人
連携研究者：東京工業大学大学院理工学研究科・中薗和子
連携研究者：東京工業大学大学院理工学研究科・高坂泰弘
連携研究者：東京工業大学大学院理工学研究科・高田十志和

１．緒言

生体組織は様々な細胞が高度に連結し、協同的に機能している。生体に習い、機能性のソフトマターを接着・連結すれば、多彩な機能を持つ組織が合成できると期待される。しかしながら現在の科学では、ソフトマターを接着すること自体が大きな壁である。その理由は、①ソフト界面の性質を破壊しない「化学的な接着」が必須であることと、②接着の性質が“化学結合の性質”に起因するためである。共有結合のような強い結合はソフト界面を強力に接着できるものの、界面本来の性質を損なってしまう。水素結合のような、いわゆる“弱い相互作用”を多数用いる接着は確かにこの問題を解決できるが、接着力や接合位置のコントロールは極めて困難である。可逆的な接着という観点からは理想的に見える“弱い相互作用に基づく接着”の弱点である。こうした問題点を克服すべく、非共有結合でありながら、強さを自在にコントロールできる結合であるインターロック結合を利用した“**インターロック接着系**”の創製を目標とした。右図に概念図を示す。この接着系では接着点はインターロック結合からなっており、コンポーネント間の相互作用によって貫通構造（ロタキサン構造）を形成することで、擬似的に架橋し、両界面を接合する。ここでは輪成分にシクロデキストリンを用いた１例を示したが、貫通する分子の化学構造の許容範囲が広く、コンポーネント間の相互作用によって接着力が変化すると期待した。この接着が期待通り機能すれば、ソフト界面の化学構造や性質を全く修飾、破壊することのない、新しい接着法を提供でき、当該領域の推進に大きく貢献できる。これにより可逆的な接着・剥離が可能になるばかりでなく、空孔と貫通分子のサイズ・化学構造・相互作用の変化によって接着力の自在なコントロールが可能となり、生物応用、工業応用が可能となる。本研究において「空孔を含む幹ポリマー」の合成が必須であるが、実際には構造明確且つ多様な分岐構造を持つオリゴシクロデキストリンやポリクラウンエーテルを用いる。シクロデキストリンは様々な貫通分子に適用できると期待される一方、ポリクラウンエーテルの利用は刺激応答性の接着・剥離システムの創製が期待できる。研究推進に必要な多彩な幹ポリマーは、ニトリルオキシドを基盤とする分子構築法により、構造明確に調製できると期待されるため、インターロック接着に最適な幾何構造の探索についても本研究の目標とする。



２．研究経過

トポロジー変化に駆動される可逆架橋システムの開発

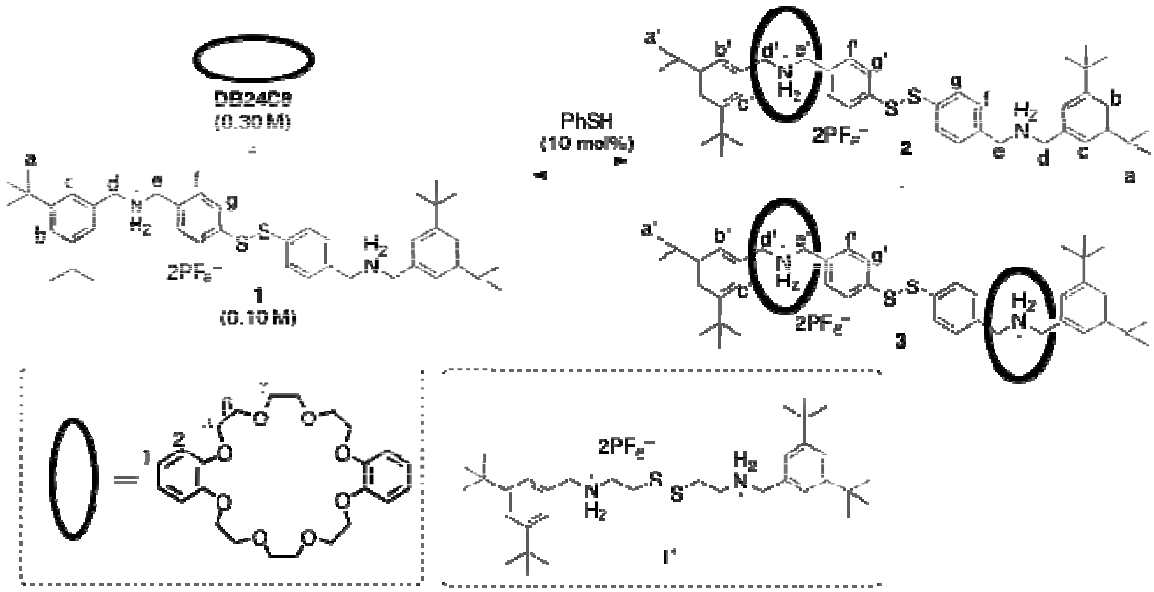
架橋点に非共有結合を導入した超分子ネットワークでは、架橋鎖の選択的な切断による主鎖高分子の回収・再生が可能である。しかし、通常弱い相互作用を利用しているために架橋構造が流動的であり、温度や力学的負荷に対して不安定であるという側面を持つ。本研究ではリサイクル性と安定性を併せ持つ超分子ネットワークの構築を目的とし、架橋鎖と主鎖の間に共有結合が存在しない架橋システムである、動的共有結合を利用したポリロタキサンネットワークの構築に向け研究を行った。

今回、芳香族ジスルフィドの結合エネルギーは非常に弱く、外部刺激によって迅速に開裂する性質に着目し、芳香族ジスルフィド化合物の動的な共有結合を利用したインターロック分子の形成反応系を精査した。そこでまず外部刺激としてチオール–ジスルフィド交換反応を利用し、架橋構造のモデルであるクラウンエーテル型[3]ロタキサンの形成・分解反応について検討を行った。

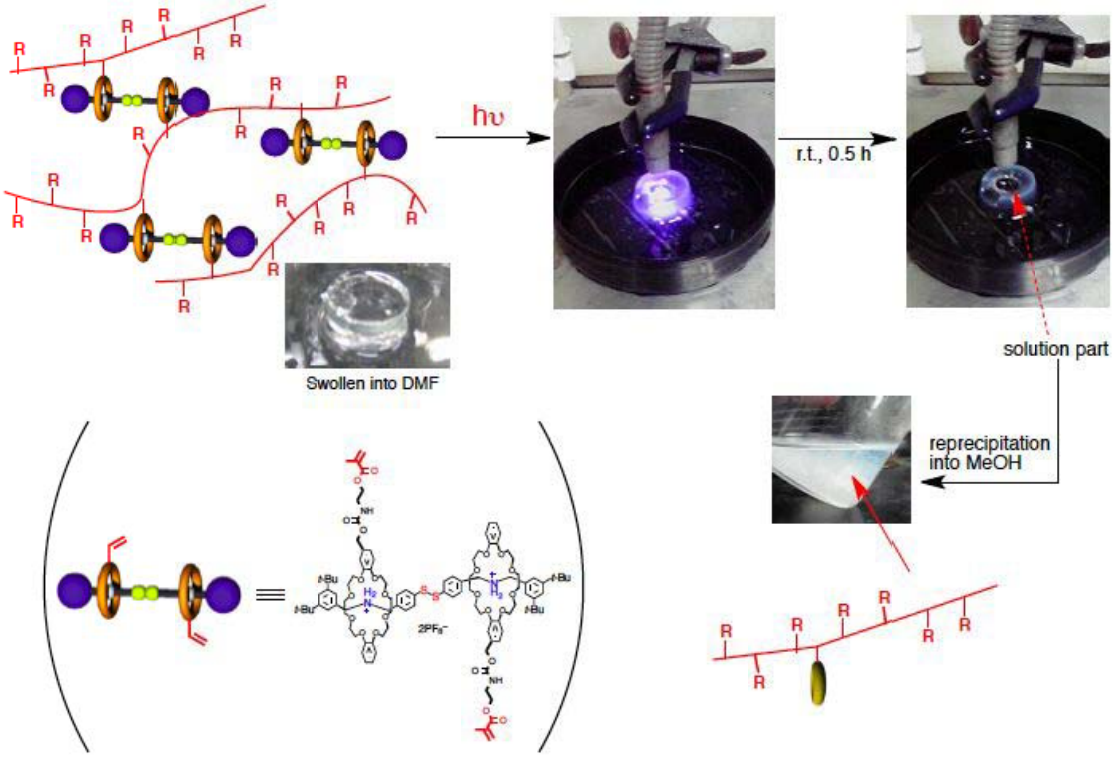
両末端に嵩高い置換基を有する２級アンモニウム塩 **1** と輪成分であるジベンゾ-24-クラウン-8-エーテル（DB24C8）をジクロロメタン–アセトニトリル混合溶媒に溶解後、10 mol%のベンゼンチオールを添

加し、室温で 12 時間混合した（Scheme 1）。熱力学的平衡に達した時点で[2]ロタキサン **2** が 2%、[3]ロタキサン **3** が 87%の収率で得られることが明らかとなった。

そこで次にこの反応系を架橋高分子に組み込むことを検討した。輪成分に重合活性なビニル基を有する[3]ロタキサンを新たに超分子架橋剤として合成し、MMA のラジカル重合系に添加すると対応するゲルが得られた。このゲルは安定であり、DMF などの各種溶媒に非常に良く膨潤した。DMF に膨潤したゲルに対し、UV を照射すると、架橋点のジスルフィドの開裂とデスリッピング反応が連続して起こり、直ちに解架橋が進行することが分かった（Scheme 2）。解架橋した溶液をメタノールに再沈殿させると、白色の沈殿が生じたため、それを沪取すると無傷の幹ポリマーが定量的に回収できることが明らかとなった。以上のことからロタキサン構造を架橋点として利用することで、従来までに前例の無い、十分な安定性と光分解性を示す共有結合性ゲルの創成に成功した。



Scheme 1.



Scheme 2.

Adhesion of Soft Interfaces Exploiting Interlocked Structure

Yasuhito Koyama, Kasuko Nakazono, Yasuhiro Kohsaka, and Toshikazu Takata
Department of Organic and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology

2-12-1 (H-126), Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8552, Japan
Tel: +81-3-5734-3260, Fax: +81-3-5734-2888, E-mail: ykoyama@polymer.titech.ac.jp

Highly sophisticated biological materials work cooperatively on the basis of the highly ordered assemblies of various cells. Therefore, if the elaborated assembly between soft materials with various functions were successfully achieved, bio-mimetic architectures with versatile functions would be provided. However, the assembly and/or adhesion of soft materials themselves is difficult, because (i) the ideal assembly needs chemical adhesion without sacrificing the inherent properties of soft materials and (ii) the characteristic property of chemical bonds in the interface is more or less attributable to the properties of resulting material. The strong bond between soft interfaces such as a covalent bond enables the strong connection although the inherent property of soft materials would be considerably lost. On the other hand, the multipoint interactions based on weak interactions such as hydrogen bonds could overcome such problems, although the control of adhesion position and mechanical property would be difficult. Recognizing such issues, we became intrigued by the potential usefulness of interlocked bonds as a new adhesion method between soft interfaces, enabling a mild connection of soft interfaces without a lack of the chemical structure and property of the starting materials, which would provide promising architectures with versatile functions such as a stimuli-responsive system.

Polyrotaxane networks (PRNs) having the rotaxane structure on the cross-linking points are the most interesting class of cross-linked polymers, which are characterized in terms of both the unique structure and specific properties based on their movable cross-links. The movable cross-linking points in network polymer allow an equalization of tension for external stimuli or stress to afford highly swelling ability for several solvents, high elasticity, and high stress-releasing ability, although there have remained several problems on polymer versatility to lead to some limitations to applications. For the development of simple preparative method of PRN, we planned the utilization of macrocyclic cavities of an oligocyclodextrin or poly(crown ether) as the cross-linking points. The use of macrocyclic cavities as the cross-linking points could enable the efficient hybridization of special properties of PRNs toward various polymers.

Along this line, we designed a novel UV-degradable network polymer exploiting a supramolecular cross-linker consisting of [3]rotaxane with an aromatic disulfide linkage. Prior to the investigation of network polymer, we examined the model reaction using dumbbell-shaped bis(ammonium salt) possessing an aromatic disulfide linkage **1** and dibenzo-24-crown-8-ether (DB24C8) (Scheme 1). Ditopic *sec*-ammonium salt **1** and DB24C8 were mixed in $CHCl_3$–CH_3CN (7/3). The addition of a catalyst (benzenethiol, 10 mol%) to the mixture after 31 h afforded the corresponding [2]rotaxane (2%) and [3]rotaxane (87%). The result suggests that the insertion of the disulfide linkage through the crown ether wheel occurs with the unsymmetrical disulfide and the half-dumbbell-type thiol as intermediates, each of which has a small terminal capable of threading DB24C8.

On the basis of these results, we synthesized a [3]rotaxane cross-linker with polymerizable vinyl groups on the each wheel component of the model [3]rotaxane. Treatment of methylmethacrylate (MMA) with AIBN in the presence of the [3]rotaxane cross-linker in DMF at 60 °C afforded a gel containing rotaxane structures at the cross-linking points. The obtained gel kept in shape even under high dilution condition with several organic solvents such as DMF, MeOH, and so on, strongly indicating that the polyrotaxane network is more stable rather than conventional supramolecular gels with non-covalent bonds at the cross-linking points.

On the other hand, the irradiation of UV to the swollen polyrotaxane network into DMF allowed a smooth decross-linking reaction via homolysis of the disulfide linkage and subsequent deslipping reaction based on a dynamic covalent chemistry of aromatic disulfide linkage and rotaxane chemistry, which also allowed an efficient recycle of the trunk polymer without any destruction or injury to the polymer. The broad applications exploiting the unprecedented sufficiently stable and UV-degradable network polymer would be our important future work.

業績リスト

１．原著論文

1) Kohsaka, Y., Nakazono, K., Koyama, Y., Takata, T. “Size-complementary Rotaxane Cross-link for Stabilization and Degradation of Supramolecular Network” Angewandte. Chemie International Edition, **2011**, in press.
2) Koyama, Y., Suzuki, Y., Asakawa, T., Kihara, N., Nakazono, K., Takata, T. “Polymer Architectures Assisted by Dynamic Covalent Bonds: Synthesis and Properties of Boronate-Functionalized Polyrotaxane and Graft Polyrotaxane” Polymer Journal, **2011**, in press.
3) Koyama, Y., Seo, A., Takata, T. “安定ニトリルオキシドを用いた高分子修飾法の開発” 日本ゴム協会誌, **84**, 111–116 (2011).
4) Koyama, Y., Takata, T. “ニトリルオキシドを用いる高分子合成” Yasuhito Koyama, Toshikazu Takata, 高分子論文集, **2011**, in press.
5) “C–C Bond-Forming Click Synthesis of Rotaxanes Exploiting Nitrile *N*-Oxide” Tohru Matsumura, Fumitaka Ishiwari, Yasuhito Koyama,* Toshikazu Takata*, Organic Letters, **12**, 3828-3831 (2010).
6) Yoshii, T., Kohsaka, Y., Moriyama, T., Suzuki, T., Koyama, Y., Takata, T. “An Efficient Synthetic Entry to Rotaxanes Utilizing Reversible Cleavage of Aromatic Disulfide Bonds”, Supramolecular Chemistry, **22**, 1029-0478 (2010).

２．特許出願

1) 12/659, 128（基本特許 JP2009-200716）（出願日 2010/2/25）、ニトリルオキシドで変性した変性高分子材料及びその製造方法、瀬尾明繁、今井英幸、岩瀬直生、高田十志和、小山　靖人

2) 特願 2010-051664（出願日 2010/3/9）、架橋剤、架橋高分子材料及びこの架橋高分子材料の製造方法、瀬尾明繁、今井英幸、岩瀬直生、高田十志和、小山　靖人、米川盛生

3) 特願 2010-183979（出願日 2010/8/19） 架橋可能な高分子材料及び架橋高分子材料並びにこれらの製造方法、瀬尾明繁、今井英幸、岩瀬直生、上遠野雄介、高田十志和、小山　靖人、三浦香織

4) 特願 2011-052472（出願日 2011/3/10） 高分子架橋前駆体、刺激応答性高分子架橋体およびそれらの製造方法、荒井隆行、小澤裕樹、所司悟、高田十志和、小山　靖人、張琴姫

5) 特願 2011-052473（出願日 2011/3/10） 高分子架橋体および高分子架橋体の製造方法、荒井隆行、小澤裕樹、所司悟、高田十志和、小山　靖人、張琴姫

6) 特願 2011-052474（出願日 2011/3/10）調光パネル、荒井隆行、小澤裕樹、所司悟、高田十志和、小山　靖人、張琴姫

３．会議発表

1) Stable Nitrile N-Oxide Chemistry: A Powerful Tool for Modification of Polymer with Unsaturated Bonds, Yasuhito Koyama, 日本化学会第 91 春季年会(2011), 2011/3/28, 神奈川大学.
2) Synthesis of Main Chain-Type Polyrotaxane by New Click Polymerization Using Homoditopic Nitrile N-Oxides via Rotaxanation–Polymerization Protocol, Yasuhito Koyama, Young-Gi Lee, Morio Yonekawa, Toshikazu Takata, Pacifichem2010, 2010/12/17, ホノルル, ハワイ.
3) Modificaiton and Cross-linking Reaction of Polymer with Unsaturated Linkages Exploiting Stable Nitrile *N*-Oxides, Yasuhito Koyama, Morio Yonekawa, Young-Gi Lee, Toshikazu Takata, Macro2010 43rd IUPAC World Polymer Congress, 2010/7/13, グラスゴー, UK.

４．受賞

1) 第 1 回田中ゴム化学技術賞（2011）

2) 第 2 回ブリヂストンソフトマテリアルフロンティア賞（奨励賞）（2011）

高分子ブロック共重合体薄膜における２重らせんシリンダー構造の配向制御

研究代表者：京都工芸繊維大学・陣内浩司

１．緒言

ブロック共重合体は、異種の高分子（“ブロック鎖”）が共有結合で連結された高分子であり、ブロック鎖間の斥力により高分子同士が凝集し、数～数十 nm の規則的な３次元構造（“ミクロ相分離構造”）を形成することが知られている。例えば、ブロック共重合体のうちで最も簡単な２成分直鎖状ブロック共重合体では、ブロック鎖の組成に応じて、球・シリンダー・共連続・ラメラなどの様々な周期的ナノ構造が形成される。

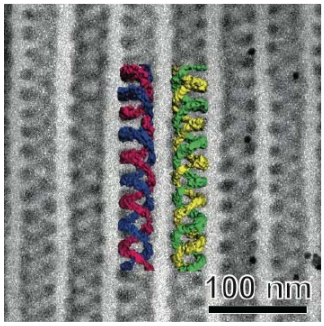


図１：２重らせん構造の透過型電子顕微鏡写真（背景）と電子線トモグラフィー法による３次元像。左巻きらせん（中央左）と右巻きらせん（中央右）が等量含まれている。この写真は薄膜中ではなくバルク中での３次元構造。

近年、精密重合技術の飛躍的な発展により、（星形、櫛形、リング型などの）極めて複雑な一次分子構造を持つ多成分ブロック共重合体の合成が可能となってきた。このような背景の下、申請者らは３成分直鎖状ブロック共重合体において非常に規則正しい“２重らせんシリンダー構造”（以下、単に２重らせん構造）が出現することを見いだした（**図１&２**）[1]。２重らせん構造とは、ある３成分 ABC 型直鎖状トリブロック共重合体の自己秩序化過程で形成されるナノ構造であり、図２に模式的に示すように、C 成分よりなるマトリクスに A 成分からなるシリンダーが六方格子状に存在し、ミドル成分である B 成分が A シリンダーの周りに２重らせんドメインとなり存在するという興味深い３次元ナノ構造である。

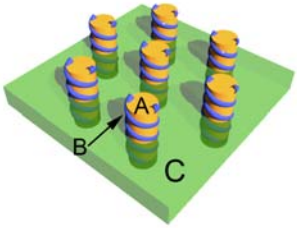


図２：２重らせんシリンダー構造の模式図。

近年、このような精緻なミクロ相分離構造は、その形成メカニズムの解明といった学術的な興味だけでなく、ナノテクノロジーへの応用の観点からも盛んに研究されている。例えば、薄膜中で垂直配向した六方格子状シリンダードメインをひな形とした超高密度記憶媒体の作製などはブロック共重合体の実用的応用の代表例と言えよう。このようなミクロ相分離構造の実デバイスへの応用では、ミクロ相分離構造の配向を精密に制御することが非常に重要であり、そのため、基板の表面エネルギー・表面粗さ・化学的または物理的パターニングなどによる基板表面の改質、薄膜作製時における電場（や磁場）の印加、ブロック鎖の液晶高分子化、などの様々な方法が試みられている。

本研究では、主として成膜時の溶媒蒸発過程の精密制御に注目して、図２のような２重らせん構造の完全垂直配向の実現を目指すことにした。

２．研究経過

本研究では、上記の興味あるブロック共重合体の自己秩序化構造の薄膜中における配向の制御法について平成２１年度から２２年度の２年間に渡り検討することとした。具体的な検討項目を列記すると次のようになる。

(i)SBM 薄膜作製時の溶媒蒸発速度制御用装置の作製
(ii)SBM 薄膜中での溶媒蒸発速度制御による２重らせん構造の基板に対する垂直配向の実現
(iii)SBM 薄膜中での基板表面の化学改質による２重らせん構造の基板に対する垂直配向の実現

平成２１年度は、研究の基礎となる(i)および(ii)に注力し、まず、(i)については、溶媒の蒸発速度を制御できる装置を組み上げた。Poly(styrene-*block*- butadiene-*block*-methylmethacrylate) (SBM)をシリコン基板上にスピンキャストし、厚みの均一な膜を作った。その後、このスピンキャスト膜に対して溶媒アニールを行った後、窒素の流量を制御しながらクロロホルム蒸発させた。このようにして得た薄

膜フィルムを基板からはがし、断面方向からミクロトームを用いて超薄切片化し、透過型電子顕微鏡（Transmission Electron Microscopy, TEM）および電子線トモグラフィー法（Transmission Electron Microtomography, TEMT）により２重らせんシリンダー構造の膜内での配向を検討した。その結果、SBMの２重らせんシリンダー構造のシリコン基板に対する配向が膜厚により強く影響を受けることが分かった。膜厚を固定し、窒素のフロー速度を変化させても、**図４**の結果と同様、２重らせんシリンダー構造の膜内配向を制御できる。すなわち、膜厚と窒素のフロー速度の２つが、２重らせんシリンダー構造の配向制御において非常に重要な制御パラメータであることが分かった。上記のような 2 重らせんシリンダーの配向制御は、膜厚４μｍ程度の非常に“厚い”試料においても、その垂直配向を実現できることを確認した。

平成２２年度は、これら平成２１年度の結果を踏まえ、膜厚および窒素のフロー速度を系統的に変化させ、配向制御の全体像を掴むことに注力した。その結果、膜厚と窒素のフロー速度の関数として、**図３**に示すような２重らせんシリンダー構造の配向に関する全体像を得ることができた。この結果はシリコンを基盤とした時のものであるが、表面自由エネルギーのことなる他の表面（例えばマイカ）でも同様の検討を行ったところ、細部の違いは観察されたものの、全体的には同じ傾向を示すことが分かり、この系においては、溶媒蒸発速度が支配的な因子であることが判明した。[2]

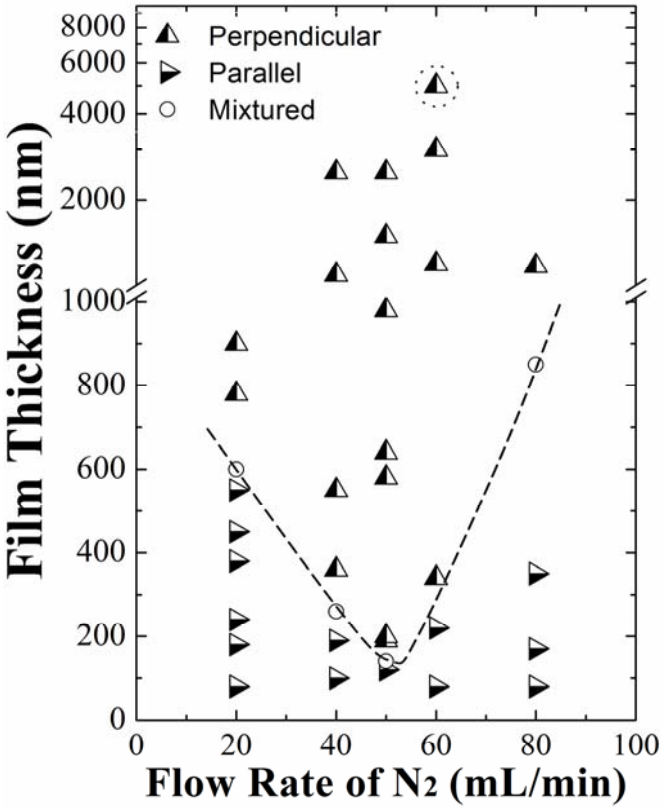


図３：２重らせんシリンダー構造における配向制御の全体像。

参考文献

[1] H. Jinnai *et al.*, *Soft Matter*, **5**, 2042 (2009).

[2] H. Song *et al.*, manuscript in preparation (2010).

Perpendicular Orientation of the Double Helical Morphologies in an ABC Triblock Terpolymer Thick Films by Controlled Solvent Evaporation

Hiroshi Jinnai

Department of Macromolecular Science and Engineering, Graduate School of Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology

Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, JAPAN
Tel: +81-75-724-7846, Fax: +81-75-724-7770, E-mail: hjinnai@kit.ac.jp

Block copolymers are fascinating materials from both scientific and technological viewpoints, because they exhibit delicate structures in a few tens of nanometers due to microphase separation. Not only the size of the microdomains is uniform, but also they order regularly in space, forming nano-array or lattice.

The microdomain structures have been attracted interests to produce nano-templates for lithography, as well as introducing a pathway to a promising practical applications of self-assembling ability of block copolymers. For example, due to the superior self-assembling capability of highly periodic nanostructures, the cylinder nanostructures of block copolymer are potentially useful as template morphologies for fabricating metal dot arrays on Si substrates that are essential for the semiconductor industry. In such cases, perpendicular orientation of the cylindrical microdomains with respect to the substrate is essential. Moreover, the vertical orientation may be particularly useful, if the cylindrical morphology extends over μm thick specimens.

In recent years, several distinct external fields were applied on structured diblock copolymers to control the orientation of the structure in the copolymer film, which include the force fields, surface fields, electric fields and magnetic fields. However, most of these external fields cannot get a perpendicular orientation in the copolymer thick films over micron level. Some studies also found that the controlled solvent evaporation is also a good mean to achieve a perpendicular orientation in the copolymer thin films less than micron.

We have previously reported a double helical morphology, falling into the same category of cylindrical morphology, in a polystyrene-*block*-polybutadiene-*block*-poly(methyl methacrylate) triblock terpolymer (SBM) [1]. In this study, we used the controlled evaporation of the solvent, chloroform, in order to realize vertical orientation of the double helical morphology. We found that the specimen thickness as well as the solvent evaporation rate is the critical factor for the precise control of the microdomain orientation over μm thick samples (Figure 1).

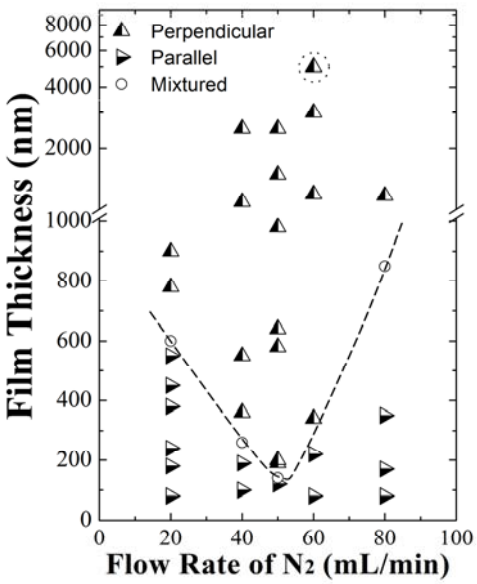


Figure 1: Orientation diagram of SBM thin films as a function of the film thickness and the flow rate of N_2 (h-R diagram). The dash line indicates a transform between parallel and perpendicular orientation.

References

[1] H. Jinnai *et al.*, *Soft Matter*, **5**, 2042 (2009).

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) J. Jung et al., “Effect of Film Thickness on the Phase Behaviors of Diblock Copolymer Thin Film”, ACS Nano, **4**, 3109-3116 (2010).

2) L. Li et al., “Solvent-Driven Evolution of Block Copolymer Morphology under 3D Confinement”, Macromolecules, **43**, 7807-7812 (2010).

3) Higuchi et al., “Phase transition and phase transformation in block copolymer nanoparticles”, Macromol. Rapid Comm., **31**, 1773-1778 (2010).

２．著書・総説

特になし

３．会議発表

1) **（招待講演）** “Self-assembling nano-structure of a bolck copolymer studied by transmission electron tomography”, by Hiroshi Jinnai, American Chemical Society Meeting (August 23, 2010, Boston, USA)

４．その他　（例えば特許など）

特になし

pH 応答性インターフェースを持つ架橋ポリマーソームの創成

研究代表者：兵庫県立大学大学院工学研究科・遊佐　真一

１．緒言

外部刺激で解離可能なコア-シェル型高分子ミセル [1)]を鋳型に用いて、そのシェルと相互作用する別のジブロック共重合体をミセル周囲に吸着させてからシェルの光架橋反応を行った後、鋳型を形成していた高分子ミセルを解離させて取り除くことで、架橋ポリマーソームを合成できる。この合成方法は、使用するブロック共重合体を精密に制御して合成すれば、2 種類のポリマー水溶液の混合と、光照射、透析といった簡単な操作だけでサイズ（数十～数百 nm）や分布の揃った架橋中空粒子を合成可能である。このような架橋中空粒子は、通常の高分子ミセルと比較すると空孔内に比較的サイズの大きなゲスト分子を取り込むことができる。さらにシェルが架橋されているため、臨界ミセル濃度が無いので、低濃度でも中空構造を安定に維持できる。したがって新規薬剤送達システム（DDS）などへの応用が期待される。

２．研究経過

２．１．架橋ポリマーソームの合成

架橋ポリマーソームを合成するために、まず鋳型となる pH に応答して高分子ミセルの形成と解離を制御可能なアニオン性のジブロック共重合体（Figure 1）を可逆的付加‐開裂連鎖移動（RAFT）型の制御ラジカル重合法により合成した。この側鎖にスルホネート基とカルボキシレート基を含むブロックから成るアニオン性ジブロック共重合体（PAMPS-*b*-PAaH）は、酸性でカルボキシレート基が選択的にプロトン化されるため、高分子ミセルを形成する。一方、アルカリ性ではカルボキシレート基が脱プロトン化するため、高分子ミセルは解離してユニマー状態で水に溶解する [2)]。また電荷を持たない水溶性のポリエチレングリコール（PEG）を含む高分子型連鎖移動剤を用いて、カチオン性の第 4 級アミノ基を側鎖結合したモノマー（APTAC）と光架橋性のシンナモイル基を側鎖結合したモノマー（CEA）をランダムに RAFT 重合することで、APTAC と CEA のランダム共重合体ブロックと PEG ブロックからなるジブロック共重合体（PEG-*b*-P(APTAC-*co*-CEA)）を合成した（Figure 1）。このような pH 応答性高分子ミセルを鋳型に用いることで、水溶性の架橋ポリマーソームを合成できる。

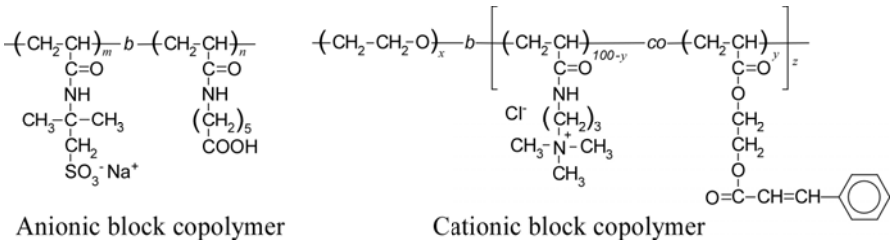


Figure 1. Chemical structures of template pH-responsive anionic diblock copolymer (PAMPA-*b*-PAaH) and cationic diblock copolymer composed of PEG block and random copolymer block bearing quaternary ammonium and photo-cross-linkable cinnamoyl groups.

具体的には、このポリマーを、鋳型となるアニオン性高分子ミセルのシェルの電荷を中和するように水中で混合すると、鋳型の高分子ミセルのシェル中のスルホネート基とカチオン性ジブロック共重合体の静電相互作用により、シェル層でポリイオンコンプレックス（PIC）を形成する（Figure 2）。この会合体は鋳型のアニオン性高分子ミセルが形成する疎水性のコア周囲を、光架橋基を含む PIC のシェル層が覆い、最外層を PEG コロナ鎖が覆う形のコア-シェル-コロナ型の会合体となる。最外層が水溶性 PEG 鎖で覆われているため、高濃度でもコア-シェル-コロナ型会合体間の凝集は抑制される。この会合体に紫外光を照射することで、シェル層に含まれるシンナモイル基の光二量化反応により架橋を行った [3)]。その後、

水溶液をアルカリ性にすることで鋳型を形成していた高分子ミセルのコアを解離した。さらに高濃度の食塩水に対して透析を行うことで、シェル層のアニオンとカチオンの静電相互作用を遮蔽して PIC を壊し、鋳型を形成していたポリアニオンを取り除いた。その後、純水で透析を行い凍結乾燥でシェルを架橋した中空粒子を粉末として回収した。各段階で動的光散乱測定により反応の進行を確認した。

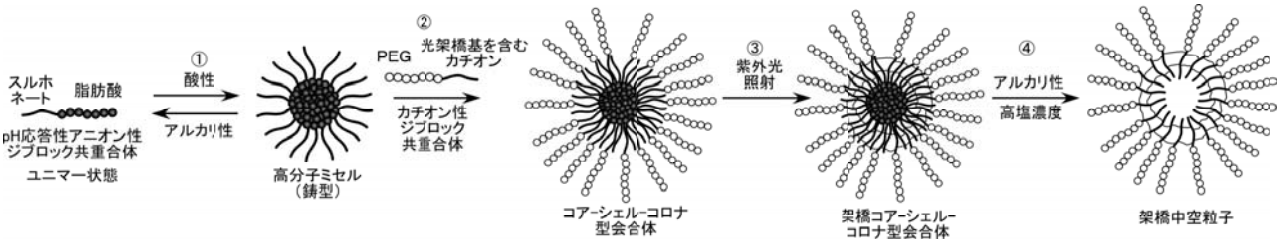


Figure 2. Synthetic route of cross-linked hollow nanoparticles: ① Template micelle composed of pH-responsive anionic diblock copolymers; ② Core-shell-corona micelle-like aggregate prepared by adsorption of cationic diblock copolymers containing photo-cross- linkable pendent group to the template pH-responsive anionic polymer micelle due to the electrostatic interaction between anionic template micelle and cationic diblock copolymers; ③ Photo-cross-linking of the shell of the core-shell-corona micelles with UV-irradiation; ④ The template micelle was dissociated by NaOH, and the electrostatic interaction was reduced by adding NaCl, and then the template anionic diblock copolymers were removed by dialysis. Shell cross-linked hollow nanoparticles were able to be obtained.

２．２．pH 応答性架橋ポリマーソームの合成

架橋ポリマーソームの空孔内部と水相の間での物質の透過を制御するために、シェル層に pH に応答した膨潤と収縮の機能を付与することを検討した。鋳型となるジブロック共重合体としてポリメチルメタクリレートブロックと側鎖にスルホネート基を含むブロックから成る両親媒性高分子（PMMA-*b*-PAMPS）を可逆的付加‐開裂連鎖移動（RAFT）型制御ラジカル重合法により合成した（Figure 3）。また 3 級アミンを側鎖結合したモノマー（DEAEMA）および光架橋性のシンナモイル基を側鎖結合したモノマー（CEA）のランダム共重合体ブロックとポリエチレングリコールブロックからなるジブロック共重合体（PEG-*b*-P(DEAEMA/CEA)）を RAFT 重合により合成した。3 級アミンは酸性でプロトン化して水和するので膨潤し、アルカリ性で脱プロトン化して疎水性に変化する。したがって PEG-*b*-P(DEA-*co*-CEA)を用いて架橋中空粒子を作製すると、pH に応答した内包物質の制御放出が可能になると期待される。

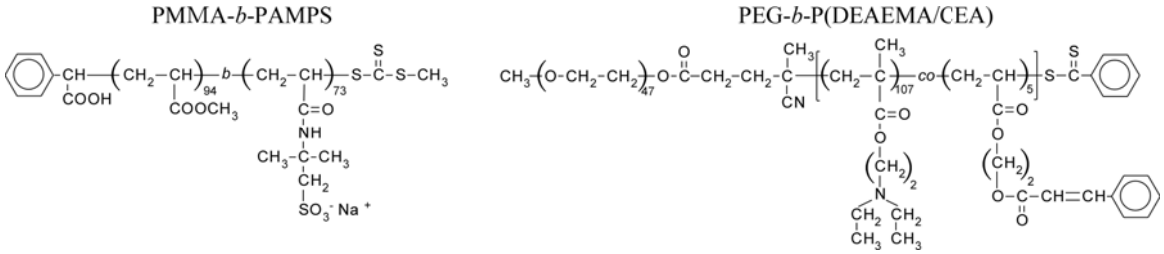


Figure 3. Chemical structures of block copolymers to prepare pH-responsive polymersome.

３．参考文献

1) S. Yusa, S. Yamago, M. Sugahara, S. Morikawa, T. Yamamoto, Y. Morishima, *Macromolecules*, 40 (2007), 5907-5915.

2) S. Yusa, Y. Shimada, Y. Mitsukami, T. Yamamoto, Y. Morishima, *Macromolecules*, 36 (2003), 4208–4215.

3) S. Yusa, M. Sugahara, T. Endo, Y. Morishima, *Langmuir*, 25 (2009), 5258-5265.

Preparation of Cross-Linked Polymersome with pH-Responsive Interface

Shin-ichi Yusa
Department of Materials Science and Chemistry, University of Hyogo

2167 Shosha, Himeji, Hyogo, 671-2210, Japan
Tel: +81-79-267-4954, Fax: +81-79-267-8868, E-mail: yusa@eng.u-hyogo.ac.jp

For the preparation of the shell cross-linked polymersome, we used a pH-responsive anionic diblock copolymer as a template. The template micelle can be dissociated at basic pH. A diblock copolymer composed of a PEG block and cationic block containing a small amount of photo-cross-linkable pendent groups was absorbed to the surface of the pH-responsive template micelle to form a core-shell-corona onion-like micelle. The shell of the onion-like micelle is composed of polyion complex, which can be cross-linked by UV-irradiation. After the cross-linking, the solution pH was changed to basic to dissociate the template. The solution was then dialyzed against high ionic strength aqueous solution to eliminate electrostatic interaction, and subsequently against pure water to remove the dissociated anionic diblock copolymer.

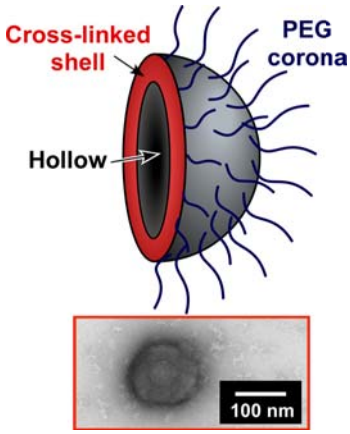


Figure 1. Schematic illustration of the shell cross-linked polymersome and TEM image.

It is known that the anionic diblock copolymer (PAMPS-*b*-PAaH) has pendent sulfonate and carboxylate groups, which show pH-responsive association behavior to form a micelle at acidic conditions. This comprises of a hydrophobic core with a pendent carboxylic acid group and hydrophilic shell with a pendent sulfonate groups. The objective of this study is to prepare a of shell cross-linked hollow polymer particle i.e., polymersome using a pH-responsive polymer micelle as a template. The polymersome can be used as a new class of drug carrier. The diblock copolymer is composed of nonionic polyethyleneglycol (PEG) and a cationic block with a small amount of a photo-cross-linkable pendent group (PEG-*b*-P(APTAC-*co*-CEA)). This was absorbed to the surface of the PAMPS-*b*-PAaH micelle to prepare core-shell-corona, three layered, onion-like polymer micelle. The shell of the onion-like micelle is composed of polyion complex with the polyanion block (PAMPS) of the PAMPS-*b*-PAaH micelle and the polycation (P(APTAC-*co*-CEA)) of PEG-*b*-P(APTAC-*co*-CEA), which can be cross-linked by photodimerization of the CEA group with UV-irradiation. The onion-like micelle has nonionic PEG corona chains to prevent the association of each micelle due to steric hindrance. After the cross-linking, to dissociate the template the solution pH of the onion-like micelle was changed to basic by adding NaOH aqueous solution. Furthermore, the solution was dialyzed against high ionic strength aqueous solution to eliminate electrostatic interaction, and subsequently against pure water to remove dissociated PAMPS-*b*-PAaH. A cross-linked polymersome possessing nonionic PEG corona chains with a hollow structure is now obtained.

To confirm the preparation of the cross-linked polymersome, we measured dynamic light scattering (DLS) in an aqueous solution. The scattering intensity (I_s) and hydrodynamic radius (R_h) for the anionic polymer micelle under the acidic condition are 156 kHz and 14.8 nm, respectively, suggesting formation of polymer micelles. The I_s and R_h values for the onion-like micelle for the adsorption of PEG-*b*-P(APTAC-*co*-CEA) to the anionic pH-responsive polymer micelle are 2537 kHz and 30.3 nm, respectively. These values for the onion-like micelle are larger than that of the pH-responsive anionic micelle as a template. The I_s value of the cross-linked polymersome is less than that of the onion-like micelle, suggesting that the density of the polymersome is less than that of onion-like micelle. The R_h value of shell cross-linked polymersome is 43.2 nm, which is slightly larger than that of the onion-like micelle. This observation indicates that the shell of polymersome has expanded due to the electrostatic repulsion of the cationic MAPTAC units in the cross-linked shell.

Cross-linked polymersome with a pH-responsive shell will be prepared by the above preparation method using an anionic template in the future. By controlling the solution pH, the pH-responsive polymersome is expected to have an impact on the release and incorporation of various guest molecules.

業績リスト

１．原著論文

1） T. Muangnapoh, N. Sano, S. Yusa, N. Viriya-empikul, T. Charinpanitkul, “Facile strategy for stability control of gold nanoparticles synthesized by aqueous reduction method”, *Current Applied Physics*, 10, 708-714 (2010).

2） Y. Iwasaki, T. Kawasaki, S. Yusa, “Thermoresponsive Polyphosphoesters Bearing Enzyme-claevable Side Chains”, *Chem. Lett.*, 38, 1054-1055 (2010).

3） J. Liu, A. Yoneda, D. Liu, Y. Yokoyama, S. Yusa, K. Nakashima, “Mixed Micelles of Poly(styrene-*b*-3-(methacryloylamino)propyltrimethylammonium chloride-*b*-ethylene oxide) and Anionic Amphiphiles in Aqueous Solutions”, *Canadian Journal of Chemistry,* 88, 208-216 (2010).

4） B. P. Bastakoti, S. Guragain, A. Yoneda, Y. Yokoyama, S. Yusa, K. Nakashima, “Micelle Formation of Poly(ethylene oxide-*b*-sodium 2-(acrylamido)-2-methyl-1-propane sulfonate-*b*-styrene) and Its Interaction with Dodecyl Trimethyl Ammonium Chloride and Dibucaine”, *Polym. Chem.,* 1, 347-353 (2010).

5） J. Liu, D. Liu, S. Manickam, Y. Yokoyama, S. Yusa, K. Nakashima, “Synthesis of Hollow Silica Nanospheres Templated by Micelle of Poly(styrene-*b*-[3-(methacryloylamino)propyl] trimethylammonium chloride-*b*-ethylene oxide)”, *Chem. Lett.,* 39, 584-585 (2010).

6） B. P. Bastakoti, S. Guragain, Y. Yokoyama, S. Yusa, K. Nakashima, “Hybrid micelle formation from poly(ethylene oxide-*b*-sodium2-acrylamido-1-propanesulfonate-*b*-styrene) and Fe^{3+} ion in aqueous solution”, *Colloid and Polymer Science,* 288, 991-996 (2010).

7） Sudhina Guragain, Bishnu P. Bastakoti, Shin-ichi Yusa, Kenichi Nakashima, “Stimuli-induced core-corona inversion of micelles of water-soluble poly(sodium 2-(acrylamido)-2-methyl propanesulfonate-*b*-*N*-isopropylacrylamide)”, *Polymer,* 51, 3181-3186 (2010).

8） B. Bastakoti, S. Guragain, Y. Yokoyama, S. Yusa, K. Nakashima, “Synthesis of Hollow $CaCO_3$ Nanospheres Templated by Micelles of Poly(styrene-*b*-acrylic acid-*b*-ethylene glycol) in Aqueous Solutions”, *Langmuir,* 27, 379-384 (2010).

9） 土肥美里、遊佐真一、島田善彦、上坂昌大、「pH に応答して多段階に会合挙動の変化する ABC トリブロック共重合体の合成」，*高分子論文集,* 67, 341-349 (2010).

２．著書・総説

10) 遊佐真一、「RAFT によるリビングラジカル重合」，*新改訂版ラジカル重合ハンドブック,* 第 2 編、第 5 節, 197-206 (2010), エヌ・ティー・エス

11) 佐藤尚弘、田中紘平、遊佐真一、「感温性ブロック共重合体の水溶液中におけるミセル形成の分子機構」，*機能材料*, 30, 14-19 (2010).

12) 遊佐真一、「精密ラジカル重合による水溶性高分子の合成」，*化学と工業,* 63-9, 724-725 (2010).

３．会議発表

13) S. Yusa, Y. Yokoyama, Y. Morishima, “Polyion Complex Micelles with Two Oppositely Charged Diblock Copolymers Containing Poly(ethylene glycol)”（招待講演）, Pacifichem2010, Hawai, 2010, December, 15-20, oral.

14) B. P. Bastakoti, S. Guragain, Y. Yokoyama, S. Yusa, K. Nakashima, “Synthesis of $CaCO_3$ and $BaCO_3$ Hollow Nanospheres Templated by Micelles of Poly(ethylene glycol-*b*-acrylic acid-*b*-styrene)”, 240th ACS National Meeting, Boston, MA, 2010, August, 22-26, oral.

15) S. Yusa, I. Masamichi, M. Doi, Y. Kamihashi, Y. Morishima, “Cationic amphiphilic random copolymers with potential ability of fixation of organic pollutant in soil”, 240th ACS National Meeting, Boston, MA, 2010, August, 22-26, oral.

16) 遊佐真一, 「pH 応答性ポリマーミセルを鋳型に用いた中空粒子の合成」（招待講演）, 第 59 回高分子討論会、北海道大学（札幌市）、平成 22 年 9 月 15-17 日（2010）、口頭

４．その他

17) 財団法人　宇部興産学術振興財団　平成 21 年度学術奨励賞、「光で内包薬物の制御放出可能な金コロイド架橋生体適合ナノキャリアの創製」、遊佐真一、平成 22 年 6 月 3 日

高速親水化ソフト界面が構築できるポリマーの創製と分子インプリンティング法への応用

研究代表者：甲南大理工・渡邉順司

１．緒言

高分子はバルクのみならず表面・界面として、また溶液として機能発現する材料である。高分子量であるため、機能発現のための構造変化にある程度の時間を必要としており、この高分子特有の緩和現象の改善が求められている。特に分子運動性に基づく特性変換が迅速に誘起されれば、多様な応用に向けた展開が可能になる。本研究では、水との接触を一つの外部刺激として捉え、高分子薄膜の高速親水化とこれに同期して特定の分子を溶液中から捕捉する基盤技術の検討を行った。ポリマー材料が湿潤あるいは乾燥環境に曝されることによって、その表面の親水－疎水性が変化する基材の構築を目的としている。このような表面特性の変換は、表面に濃縮させたい親水基を高分子鎖にすることにより、湿潤環境下での相分離の大きな駆動力が得られ、高速親水化が達成できる。検討を続けていく中で、親水鎖が湿潤環境下において水和し、親水鎖の分子運動性が高くなって膜の最表面に濃縮されると考察してきた。

具体的には、ポリエチレングリコールモノメチルエーテル(mPEG)の末端水酸基からトリメチレンカーボネート(TMC)を開環重合により高分子量化して親水－疎水ブロック共重合体を得た。このとき、TMC の重合度が同程度であって、mPEG の分子量がそれぞれ 5,000 あるいは 350 の２つの共重合体による膜の表面特性を解析した。親水鎖である mPEG の鎖長が長い共重合体から得られる膜表面では、乾燥－湿潤環境の変化に応答する速度が速く、最高で数秒以内に親水鎖の表面濃縮に基づく表面ぬれ性の向上が認められた。一方、mPEG の鎖長が短い場合では、親水化が完了するのに数時間程度を要していた。このような親水鎖が濃縮した界面を用いることにより、有機色素の取り込みの促進と選択性の発現が認められたことから、一般的に知られている分子インプリンティング法を実現するための基材として展開することが期待される。

特に本年度は、高い分子運動性が期待される非晶性の疎水性高分子鎖を基盤とし、これに疎水基あるいは両親媒性分子を導入した高分子を創製した。分子の取り込みを強化するための表面化学修飾について、モデルタンパク質を用いて検討した。さらに、比較のために結晶性のポリ乳酸を疎水性高分子鎖とするポリマーを合成し、表面特性解析を行った。

２．研究経過

２．１　疎水基あるいは両親媒性分子を導入したポリマーの創製

疎水基としてコレステロール(CH)、両親媒性分子としてリトコール酸(LA)およびコール酸(CA)を選択した（図１）。それぞれの分子が有する水酸基から、環状モノマーであるトリメチレンカーボネートを重合し、数平均分子量が 15,000 程度の種々のポリマー(PTMC)を得た（表１）。同様に、L-ラクチドを疎水基や両親媒性分子の水酸基から開環重合させて、数平均分子量が 26,000 から 42,000 程度のポリマー(PLA)を得た。得られた高分子を石英基板上にコーティングして超薄膜を作製し、

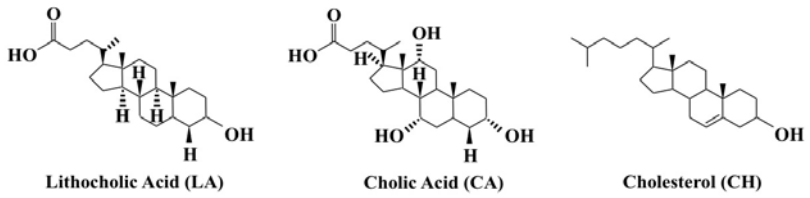


Figure 1 Chemical structures of a series of cholesterol derivatives poly(ethylene glycol) monomethyl ether.

Table 1 Synthetic results of polymers incorporating a series of cholesterol derivatives[a].

Code	[M]/[I] in feed	DP[b]	*Mn*[c]	*Mw*	*Mw*/*Mn*	Yield (%)
CH–PTMC400	400	381	15,500	20,200	1.3	74.3
LA–PTMC400	400	322	15,700	21,300	1.4	71.1
CA–PTMC1200	1,200	249	15,300	21,200	1.4	63.7
CH–PLA400	400	427	36,300	60,500	1.7	95.7
LA–PLA400	400	426	26,800	49,500	1.8	94.6
CA–PLA1200	1,200	189	42,200	77,900	1.8	93.4

[a] A number of the repeating unit of trimethylene carbonate or lactic acid in feed was 400 relative to the hydroxyl group on the cholesterol derivatives.

[b] Determined by ^{1}H–NMR.

[c] Determined by size exclusion chromatography (polystyrene standard).

種々の表面解析に用いた。

はじめに、静的接触角測定による表面のぬれ性について解析した。図２に基板を水に浸漬し、所定時間ごとに取り出して接触角を測定した結果を示す。結晶性の低い PTMC の場合において、コール酸やリトコール酸を末端に有するポリマーの場合、初期の接触角はそれぞれ 62 度および 70 度となった。水に浸漬することにより、接触角は 76 度および 84 度にそれぞれ増大した。コレステロール誘導体はステロイド環を有しており、PTMC 鎖と比較して疎水性が強い。このため製膜直後の乾燥状態においては、表面自由エネルギーを低くするために最表面に濃縮配向していたと推察される。このときコレステロール誘導体に結合しているカルボキシル基が極性基であるため、水に対する接触角が上記に示した値をとったと考えられる。この基板を水に浸漬することによって、疎水性のステロイド環が膜内部にマイグレートし、これに伴ってカルボキシル基も膜内部に侵入する。このときの接触角は表面に極性基が存在しないために、水に浸漬する前と比較して高い値を示したと考えられる。このことは、水と接触させることにより疎水化する表面特性であり、通常予想される水との接触による親水化と逆の性質を発現する。実際にカルボキシル基の表面における存在量について酸や塩基を用いた接触角測定から見積もり、高分子の末端基の運動性が表面特性を規定していると推察された。一方で、カルボキシル基をもたず疎水性が強いコレステロールの場合においては、初期の接触角が 92 度であり、水に浸漬後は 84 度に低下し最終的には 75 度程度に落ち着いている。この接触角は PTMC ホモポリマーに近い値であり、最表面にはコレステロール分子がほとんど存在していないことを示唆している。

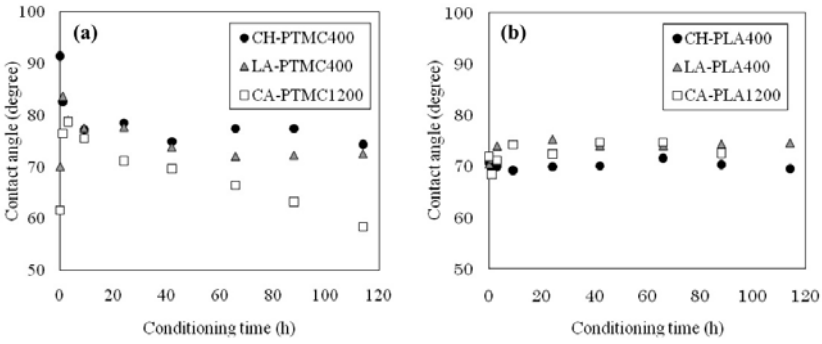


Figure 2 Static contact angles of (a) PTMC and (b) PLA.

結晶性のポリ乳酸(PLA)を用いた場合、PTMC の時に見られたような接触角の変化は認められなかった。いずれのコレステロール誘導体が末端に存在していても、初期接触角は 70 度付近であり、水に浸漬後においても 70 度から 75 度付近に収まっている。このことは末端基が乾燥－湿潤環境変化によらず運動性が抑制されていることを示していた。非晶性の PTMC と比較して PLA は結晶性を示すことから、バルクを形成しているポリマーの結晶性が表面特性の規定に関与していると推察される。

２．２　ポリマー膜へのタンパク質の取り込み挙動

蛍光標識タンパク質である FITC-アルブミンを用いて、ポリマー膜へのタンパク質の固定化および取り込み挙動を検討した。コレステロール誘導体であるコール酸、リトコール酸はカルボキシル基を有しており、タンパク質のアミノ基との縮合反応により固定化できる。また、膜内部へのタンパク質の取り込みについても見積もった。タンパク質の固定化に必要となるカルボキシル基を持たないコレステロールを末端に有するポリマーの場合では、ドライプロセスにおいて 2.8 μg/cm^2 の固定化量であった。これは、化学的に固定化されたのではなく、物理吸着によるものと考えられる。アルブミンの単層飽和吸着量が約 0.9 μg/cm^2 であるとの報告と比較すると膜内部にもアルブミンが潜り込んでいると示唆された。さらにコレステロールの場合、ウエットプロセスによって固定化量は増大した。コレステロール部が膜内部に潜り込んだため、表面近傍は非晶性の PTMC が濃縮しており、アルブミンの拡散経路が増大し、物理吸着が膜内部に広がったと考えられる。固定化の前に水に浸漬する処理を施すことにより、コレステロール誘導体が膜内部に潜り込む。この膜の膨潤の過程で、タンパク質溶液の透過経路が確保され、膜内部まで固定化が進行したと考えられる。以上のように、膜の最表面にタンパク質を化学結合により固定化できるとともに、タンパク質の膜への取り込みが表面のみに限定された単層吸着よりもはるかに高いレベルで達成できることが明らかとなった。

以上、親水性および疎水性分子を末端に有する高分子エラストマーを創製し、外部環境の変化における表面特性解析を行い、表面での分子濃縮について検討してきた。その結果、親水鎖や疎水性分子の表面濃縮に規定された表面特性の変換が実現した。濃縮対象の分子を多様化させることにより、多様な環境変化に応答した表面特性を誘導できると期待される。

Reflexive Surface Enrichment of Hydrophilic Segment for Molecular Imprinting Approach

Junji Watanabe
Faculty of Science and Engineering, Konan University

8-9-1 Okamoto, Higashinada, Kobe 658-8501, Japan
Tel and Fax: +81-78-435-2507, E-mail: junjiknd@konan-u.ac.jp

Poly(trimethylene carbonate) (PTMC) and poly(L-lactic acid)(PLA) are of great interest for various biomedical materials. For evaluating surface properties, measurements of static contact angle and immobilization of proteins on various surfaces were performed. From the results of measurement of contact angle, PTMC surface indicated surface enrichment of hydrophobic segment by changing outside condition. On the other hand, PLA surface indicated constant surface condition by changing in outside condition. By protein immobilization, application as biointerface was studied. In the present study, regulation of surface enrichment of cholesterol derivatives on PTMC or PLA was studied.

This study focused on surface properties composed of PTMC and PLA for biomaterials. Synthetic process was based on ring-opening polymerization of cyclic monomer of trimethylene carbonate (TMC) and L-lactide. The reaction started from initiator of cholesterol derivatives that has hydroxyl groups activated by organic catalyst. The resulting product included initiator segment in the end terminal of the polymer chain. Polymerization degree was targeted at 400. GPC measurement showed that the resulting products were composed by a certain level of molecular weight. The resulting polymer formed high molecular weight (targeted 400 of polymerization degree) as expected. PTMC and PLA targeted 400 of polymerization degree were used further experiments.

PTMC and PLA were coated onto the substrates and were measured by using the static contact angle apparatus; then it was dipped in the water in order to transform the wettability. The conditioning time indicated the time interval for which the samples were dipped in water. Obtained surface properties of PTMC including cholesterol derivatives conformed to literature. Cholesterol-terminated PTMC was exhibited a higher contact angle than that of others. Dipping in water, relaxed decreasing of contact angle was indicated. Cholesterol derivatives exhibited low contact angle relative to cholesterol. Dipping in water for short period, increasing of contact angles were indicated. In addition, dipping in the water for long period, decreasing of contact angles were indicated because carboxyl groups including in the cholesterol derivatives were involved in surface property. PLA would form crystal structure and degraded by dipping in water. Dipping in water for long period, cholesterol derivatives and cholesterol were maintained constant contact angles. By forming crystal structure of PLA, constant surface condition was formed because properties of cholesterol derivatives on PLA were inhibited.

Protein immobilization onto surface was performed by condensation reaction. By measuring of UV-vis spectrum, amount of protein on surface was revealed. After condensation reaction, UV-vis spectrum indicated amount of adsorbed protein and immobilized protein. After washed with sodium dodecyl sulfate solution, UV-vis spectrum indicated amount of immobilized protein. By including cholesterol derivatives, condensation reaction was promoted protein immobilization and indicated major amount of protein. Condensation reaction was performed for 20 hours, therefore the surface was contacted with water environment for 20 hours. Thus, surface indicating enrichment of cholesterol derivatives was promoted protein immobilization.

Our next concern focused on the regulation of the surface properties by alteration of polymer composition and the outer environment. Moreover, the surfaces will be applied as fine substrate for biointerface.

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) Kazuhisa Terao, Junpei Miyake, Junji Watanabe, and Yoshiyuki Ikeda, Surface Properties of Ultra-Thin Membrane Composed of Polycarbonate and Polylactide, *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn*, revised.

2) Yuta Tosaki, Junpei Miyake, Junji Watanabe, and Yoshiyuki Ikeda, Design of Poly(trimethylene carbonate) with Hydrophilic Polymer Chain and its Aggregation Property, *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn*, revised.

3) Hiroki Tsunematsu, Junpei Miyake, Junji Watanabe, and Yoshiyuki Ikeda, Synthesis of a Macro-initiator Based on Poly(trimethylene carbonate) and Living Radical Polymerization as a Biomaterial, *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn*, revised.

4) Kazuhisa Terao, Junpei Miyake, Junji Watanabe, and Yoshiyuki Ikeda, Surface Control of Poly(trimethylene carbonate), Polylactide, and Their Derivatives to Realize Protein Immobilization, *Mater. Sci. Eng. C*, submitted.

5) Junji Watanabe, Noriko Sakamoto, and Yoshiyuki Ikeda, Processing of Interface by Surface Enrichment Approach using Poly(trimethylene carbonate) Incorporated with Cholesterol Derivatives, 投稿準備中.

２．著書・総説
なし

３．会議発表

1) 寺尾和久，渡邉順司，池田能幸，“タンパク質を固定化したポリトリメチレンカーボネート表面の創製とその表面解析”，第 59 回高分子年次大会，パシフィコ横浜，横浜（2010）.［国内学会　ポスター］

2) 常松宏紀，渡邉順司，池田能幸，“開環重合とリビングラジカル重合のハイブリッドにより創製された蛍光分子導入ブロックポリマー”，第 59 回高分子年次大会，パシフィコ横浜，横浜（2010）.［国内学会　ポスター］

3) 戸崎雄太，渡邉順司，池田能幸，“ポリ(トリメチレンカーボネート)誘導体の創製と会合体の安定性”，第 56 回高分子研究発表会[神戸]，兵庫県民会館，神戸（2010）.［国内学会　ポスター］

4) 渡邉順司，寺尾和久，池田能幸，“機能分子の表面濃縮による界面のプロセッシング”，第 59 回高分子討論会，北海道大学，札幌（2010）.［国内学会　口頭］

5) 寺尾和久，三宅純平，渡邉順司，池田能幸，“多数の反応性官能基を有するポリカーボネート膜の創製と表面へのタンパク質の固定化”，第 59 回高分子討論会，北海道大学，札幌（2010）.［国内学会　ポスター］

6) 常松宏紀，三宅純平，渡邉順司，池田能幸，“ポリ(トリメチレンカーボネート)を基盤としたマクロイニシエータの合成とバイオ材料へ向けた共重合化の検討”，第 59 回高分子討論会，北海道大学，札幌（2010）.［国内学会　ポスター］

7) 戸崎雄太，三宅純平，渡邉順司，池田能幸，“親水性高分子鎖を有するポリ(トリメチレンカーボネート)の創製と会合体の安定性”，第 59 回高分子討論会，北海道大学，札幌（2010）.［国内学会　ポスター］

４．その他　（例えば特許など）
なし

公募研究代表者　A02

ソフト界面の解析　「ソフト界面を“探る”」

単一分子検出による界面/薄膜における高分子鎖の物性解析

研究代表者：京大先端医工・青木裕之
研究協力者：京大院工・辨天宏明

1　緒言

高分子化合物は長い鎖状巨大分子であるために、大きな内部自由度を有している。高分子材料の表面/界面においては、その空間的制約からバルクとは異なった自由度を持つと考えられ、そのためにユニークな物性を発現すると考えられる。このような場における高分子鎖の構造や運動性を制御することが可能となれば、新たな機能を有するソフト界面を構築することができるものと期待される。そのためには界面における高分子鎖の構造とダイナミクスについて基礎的な情報を得ることが重要となる。しかし高分子化合物は非常に大きな内部自由度のために複雑な形態をとり、またその運動の時間スケールもピコ・ナノ秒から分・時間にわたる広い時間スケールにわたっているため、その本質をとらえるのは容易ではない。そこで、高分子鎖一本一本のすがたを直接観察し、その動態までを追跡することが可能となれば、ソフトマテリアルの界面物性を理解する上で強力な情報となるものと考えられる。本研究は単一高分子鎖を直接観察可能な手段を開発することで、界面・薄膜における高分子鎖一本一本の構造とダイナミクスを評価を可能にすることを目的としている。

高分子の単一分子観察を行うには蛍光ラベル法が有効である。観察対象となる一本の高分子鎖に微量の蛍光色素分子を結合し、その蛍光を検出することでバルク内部や界面に局在する鎖など任意の場所において一本の鎖を観察することができる。しかしながら従来の蛍光顕微鏡においては、その空間分解能は回折限界によって制限されており、分子一個を観察しても光の波長の半分程度（およそ 200 nm）に広がった円形の輝点にしか観察されず、分子の位置のみしか知ることができない。そこで本研究では従来の蛍光顕微鏡の制限を超える光学観察手法を開発し、高分子界面の単一分子レベルでの評価を可能にすることを目的としている。昨年度はデフォーカスイメージング法による単一主鎖セグメントの配向評価を実現した。本年度においては超解像法を開発することで高分子鎖のコンホメーション評価を行うことできた。

2　研究経過

2.1　超解像光学顕微鏡の構築

蛍光顕微鏡画像において分子一個は回折限界によって 200 nm 程度のサイズに観察されるが、視野内にただ一つの分子が存在する条件では、その位置を数 nm の精度で決定することが可能である（Fluorescence Imaging in One-Nanometer Accuracy: FIONA）。超解像光学顕微鏡は系中に導入された色素分子の位置を FIONA によって解析し、その位置座標を元に顕微鏡画像を構築する手法である。しかしながら FIONA は顕微鏡の視野内に色素分子がただ一個のみ観察されている状態でなくてはならない。そのため、超解像計測においては非蛍光性／蛍光性をスイッチング可能な色素分子を用いる。始めに全て非蛍光状態にした色素によって試料を蛍光ラベルし、図 1 に示すようにその分子を一つずつ蛍光状態に変換することで、

系中の全ての分子の位置を逐次決定してゆく。このようにして得られた全ての色素分子の位置を一枚の画面内にプロットすることで再構築画像（図 1L）を得ることができる。このような観測を行うことのできる色素としては種々のフォトクロミック性の色素が用いられ、非蛍光体 ↔ 蛍光体の変換は特定の波長の光照射によって制御される。このような原理に基づく超解像顕微鏡法は Photo-Activated Localization Microscopy (PALM) と呼ばれ、近年大きな注目を集めている。本研究においては図 2 に示したローダミンスピロアミドを用いた。これは波長 375 nm の光を吸収することで非蛍光性の閉環型の異性体（図 2a）から蛍光性の開環体（同図 b）へと変化する。PALM の空間分解能は、蛍光画像内の単一色素分子の位置決定精度と一致し、同色素分子を用いた際には 15 nm の分解能を達成することができた。

2.2　単一高分子鎖のコンホメーション観察

ローダミンスピロアミドでラベルされたポリブチルメタクリレート（PBMA）を合成し、単一高分子鎖の超解像観察を行った。蛍光ラベルされた PBMA 鎖を、ラベルしていない PBMA マトリックス中に低濃度で分散することで、バルク内で孤立した PBMA 鎖の観察を行った。図 3 に分子量 260 万の PBMA 鎖の PALM 画像を示す。個々の鎖のコンホメーションが明瞭に観察されていることが分かる。その拡がりを評価したところ、PBMA 鎖はガウス分布をとっていることが示された。

以上のように超解像顕微鏡法は、これまでの手法では困難であったナノメートルスケールの分解能での単一高分子鎖の直接観察を可能にするものであり、本手法は高分子の界面物性を研究する上で重要な手段となるものと期待される。

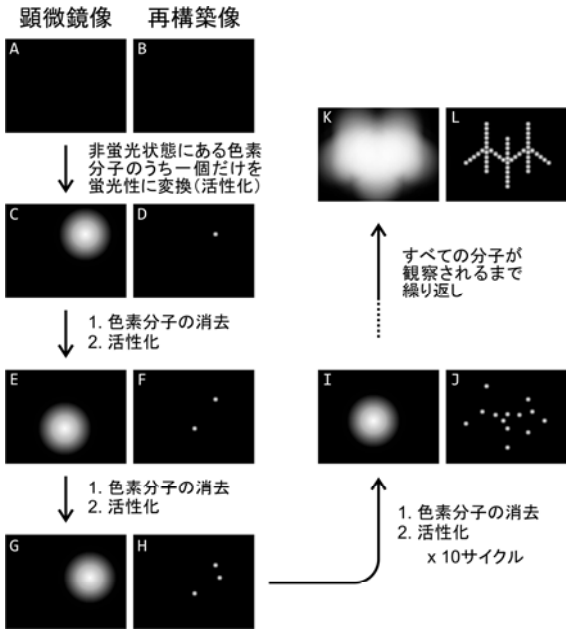


Figure 1: Schematic procedure of PALM observation.

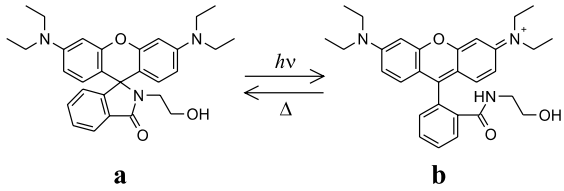


Figure 2: Chemical structure of photo-chromic rhodamine spiroamide dye.

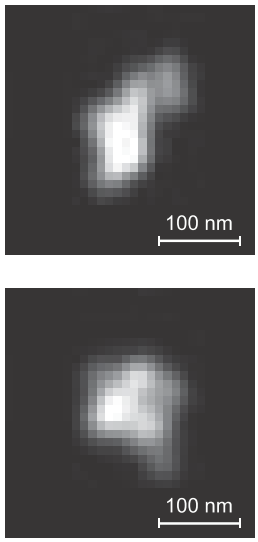


Figure 3: PALM images of individual PBMA chains. The image size is 320 × 320 nm^2.

Properties of Polymer Chain at Interface and Thin FilmStudied by Single Molecule Detection Technique

Hiroyuki Aoki[1] and Hiroaki Benten[2]

[1]Advanced Biomedical Engineering Research Unit and
[2]Department of Polymer Chemistry, Kyoto University

Kyoto-Daigaku-Katsura, Nishikyo, Kyoto 615-8510, Japan

Phone: +81-75-383-2613, Fax: +81-75-383-2617, E-mail: aoki@photo.polym.kyoto-u.ac.jp

Introduction

Polymer materials show unique properties at surface/interface because of the restricted degree of freedom. The direct observation of the structure and dynamics of individual polymer chains would provides much information to discuss the properties of the soft interface of polymeric materials. The fluorescence label method is the most effective to observe single chains. However, with conventional optical techniques, it has been difficult to directly obtain the information at the single chain level due to the diffraction limit of light. In the current study, novel optical microscopy techniques beyond the diffraction limit are developed and the interface properties of polymer materials at the interface is discussed in terms of the direct information from the single chain. Previously we developed the defocus imaging technique to observe a single segment of a polymer main chain. In this year, the super-resolution microscopy was developed and the direct observation of a single polymer chain was demonstrated.

1 Development of super-resolution optical microscopy

In the conventional fluorescence imaging, a single dye molecule is observed as a blurred spot with a diameter of $\sim \lambda/2$; therefore, the structure less than 200 nm cannot be resolved in a fluorescence image. However, when only a single dye molecule is observed in a fluorescence image, its position can be determined at the spatial resolution of a few nanometers. We developed a super-resolution microscopy method to reconstruct an optical image with a nanometric resolution by determining the positions of the dye molecules tagged to the sample. This technique is called photo-activated localization microscopy (PALM). In this technique, the sample should be labeled by a photochromic dye. We showed that a rhodamine spiroamide (RSA) derivative is suitable for the PALM imaging of polymers (the structure is shown in Fig. 2 in the previous Japanese page). The developed apparatus achieved the spatial resolution of 15 nm.

2 Conformation of a single polymer chain

Poly(butyl methacrylate) (PBMA) was labeled with the photocromic RSA dye. The labeled chain was dispersed in the unlabeled PBMA film. In the PALM image (Fig. 3 in the previous page), the conformation of the individual PBMA chain was clearly observed. The moment analysis of the single chains showed that the PBMA chain took a Gaussian conformation.

業績リスト

1．原著論文

1) Hiroyuki Aoki, Toshiaki Takahashi, Shinzaburo Ito, “Segmental Orientation of Single Polymer Chain in Langmuir-Blodgett Film Studied by Defocus Fluorescence Imaging”, Polym. J., 43, 218-221 (2011).

2) Toru Ube, Hiroyuki Aoki, Shinzaburo Ito, Jun-ichi Horinaka, Toshikazu Takigawa, Toshiro Masuda, “Relaxation of Single Polymer Chain in Poly(methyl methacrylate) Films under Uniaxial Extension Observed by Scanning Near-field Optical Microscopy”, Macromolecules, in press.

2．著書・総説

1) 青木裕之, “単一分子計測による高分子鎖の構造評価”, 高分子, 60, 66-69 (2011).

2) 青木裕之, “近接場光学顕微鏡による高分子材料の構造評価”, 近接場光のセンシング・イメージング技術への応用 ―最新のバイオ・化学・デバイス分野への展開―, 民谷栄一, 朝日剛 監修, 第 10 章, pp.113-123, シーエムシー出版, 2010.

3．会議発表

1) 青木裕之, 森一樹, 伊藤紳三郎, ”超解像光学顕微鏡による単一高分子鎖の構造観察”, 第 14 回高分子表面研究討論会, 京都大学宇治キャンパス, 2011/1/28.

2) 森一樹, 青木裕之, 伊藤紳三郎, ”単一分子の超解像観察による高分子鎖の構造解析”, 第 59 回高分子討論会, 北海道大学, 2010/9/17.

3) 青木裕之, 森一樹, ”超解像光学顕微鏡による高分子材料の構造評価”, 2010 年光化学討論会, 千葉大学, 2010/9/8.

4) Toru Ube, Hiroyuki Aoki, Shinzaburo Ito, Jun-ichi Horinaka, ”Conformation of Single Polymer Chain under the Uniaxial Extension Studied by Scanning Near-Field Optical Microscopy”, 5th Pacific Rim Conference on Rheology (PRCR-5), Sapporo, 2010/8/3.

5) Hiroyuki Aoki, Toshiaki Takahashi, Shinzaburo Ito, ”Dynamics of Single Polymer Chain Studied by Defocus Fluorescence Imaging Technique”, 5th Pacific Rim Conference on Rheology (PRCR-5), Sapporo, 2010/8/5.

6) Toru Ube, Hiroyuki Aoki, Shinzaburo Ito, Jun-ichi Horinaka, ”Conformation of Single Polymer Chain during the Extension and Relaxation Processes Studied by Scanning Near-Field Optical Microscopy”, Macro2010: 43rd IUPAC World Polymer Congress, Glasgow, UK, 2010/7/16.

研究課題名：時間分解振動分光法によるソフトマター界面構造の速度・分子論的追跡

研究代表者：（独）物質・材料研究機構
国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・魚崎浩平
連携研究者：（独）物質・材料研究機構
国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・野口秀典

１．緒言

生体内でのタンパク質をはじめ、ソフトマターの構造・機能発現において周囲の水が大きな役割を果たしている事は良く知られており、界面の水の構造を明らかにすることの重要性は十分認識されている。しかし、ソフトマターが実際に存在する水環境下でソフトマター自身とその表面近傍の水（界面の水）の構造を直接 c 的に決定・議論することはこれまでほとんど行われていない。本研究はソフトマターの機能材料としての表面に関する基礎情報はもちろん、生命活動における水の役割という生物学的に重要な問題に対する新たな知見を得ることを目的とし、界面選択的な振動分光法である和周波発生（Sum Frequency Generation: SFG）分光法および全反射赤外（ATR-IR）分光法を「ソフトマター界面」（高分子電解質ポリマーブラシ、生体適合高分子、タンパクおよびペプチド）へ適応することで、ソフトマター自身と界面の水の構造を明らかにし、分子間相互作用（水素結合等）に関する情報を得ること、また時間分解 SFG 分光法を「ソフトマター界面」に適応することで、従来の測定法では不可能な高い時間分解能で分子自身あるいは周辺の溶媒の構造および分子間相互作用（水素結合、ファン・デル・ワールス力等）のダイナミクスに関する情報を得ることを目指している。

２．研究経過

【SFG 分光法による高分子電解質のブラシの表面分子配向と界面水の構造評価】

高分子電解質のブラシは、電荷を有する部分の強い静電反発作用によって非常に興味深い特性を示すため、生物学や材料化学の分野での応用が期待されている。しかし、これまでの研究はブラシ全体の構造に関するものであり、ポリマーブラシの表面構造については現在ほとんど解明されていない。高分子薄膜の化学特性・物理特性は最表面の分子構造によって支配されることが知られているため、ブラシ最表面の構造を明らかにすることは、構造と特性の関係を理解する上で極めて重要である。そこで本研究では表面選択性の高い SFG によりポリマーブラシの表面分子配向を評価することを試みた。アルキル化ポリビニルピリジン (CnPVP, n=0, 2, 6, 12) を四級化反応により石英基板上に固定したポリマーブラシ（図 1）を試料とした。SFG 測定には、ピコ秒の Nd :YAG レーザを使用し、可視パルス光 (532 nm) と OPG/OPA/DFG システムで生成した波長可変の赤外パルス光 (2.3 ~ 8.5 μm) を試料表面に集光させ、発生

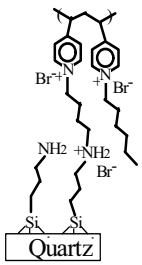


図 1　アルキル化ポリビニルピリジンブラシ(C=6)の構造

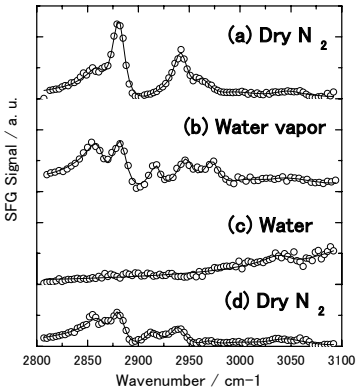


図 2　C6PVP/Quartz 界面の CH 伸縮領域の SFG スペクトル。(a)乾燥窒素中、(b)飽和水蒸気中、(c)水中、(d)乾燥窒素中。

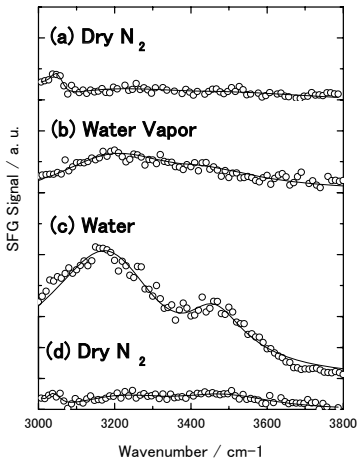


図 3　C6PVP/Quartz 界面の OH 伸縮領域の SFG スペクトル。(a)乾燥窒素中、(b)飽和水蒸気中、(c)水中、(d)乾燥窒素中。

した SFG 光を光電子増倍管 (PMT) により検出した。図 2-(a)は C6PVP/乾燥窒素界面の SFG スペクトルである。2879 cm^{-1} と 2940 cm^{-1} のピークは各々側鎖末端のメチル基の対称伸縮及びフェルミ共鳴、3030-3070 cm^{-1} のブロードなピークはピリジン環の芳香族 CH 伸縮に帰属される。2859 cm^{-1} と 2913 cm^{-1} 付近のショルダーは主鎖あるいは側鎖のメチレン基の対称及び非対称伸縮に帰属される。この試料を飽和水蒸気に接触させると図 2-(b)に示す様にメチル基由来のピーク強度の減少とメチレン基由来のピーク強度の増加が見られ、側鎖の配向性が低下した事がわかる。なお 2968 cm^{-1} のピークはメチル基の非対称伸縮である。3100 cm^{-1} にかけてのブロードなピークは水のピークであり、表面に水が存在する事を示している。さらに試料を水に接触させると図 2-(c)に示す様に劇的に変化し、CH 領域のピークが完全に消滅し水に起因するピークのみが見られた。表面の水を取り除き乾燥窒素と接触させると図 2-(d)のように再び CH に由来するピークが観測され、側鎖の配向が元に戻った事を示している。

【SFG 分光法による温度応答性ペプチド／固体界面水の構造評価】

エラスチンは大動脈をはじめ、項靭帯、黄色靭帯、肺、皮膚、子宮、弾性軟骨などの多くの組織、臓器に分布している弾性タンパク質である。エラスチンのモデルタンパク質である Elastin-like-peptide(ELP)は生体温度付近（37℃）でコアセルベーションという現象を起こし、低温では伸展構造、高温では凝集構造をとる温度応答性タンパク質として知られている。ELP はそのユニークな特性から食品や化粧品の開発、ドラッグデリバリーシステムや人工血管、人工皮膚などの新規機能性材料への応用が期待されている。ELP の機能発現には、周囲の水が大きな役割を果たしていることが知られており、ELP の構造・機能の評価には、水中での「その場」計測が重要となる。そこで本研究では、固体基板上に固定化した ELP 単分子膜を作成し、ELP 周囲の水分子の温度に対する構造変化を和周波発生(SFG)分光法により追跡し、温度変化に伴う ELP 周囲の水の構造変化を分子レベルで評価した。図 4 に 20 ℃と 40 ℃での ELP/水界面の水の SFG スペクトルを示す。3200 cm^{-1} に ice-like な水に由来するピークと 3400 cm^{-1} 付近に liquid-like な水に由来するピークがそれぞれ観測された。20℃では、ice-like のピークが支配的なスペクトル形状をしており、ELP 周囲の水分子は高度に秩序だった構造をとっていると考えられる。一方、40 ℃では liquid-like が ice-like に比べ支配的なスペクトル形状に変化し、ELP 周囲の水分子は乱れた構造に変化したことが示唆された。SFG スペクトルの形状が温度変化に対して可逆的に変化していることから、ELP 周囲の水分子は温度変化に対して、可逆的に構造変化することが分かった。ELP は、相転移温度（37℃）以上で周囲の水分子が脱水和し、分子内相互作用により凝集構造をとると言われている。今回観測された水のスペクトル変化は ELP の構造変化に伴ない、ELP 周囲の水分子の脱水和を反映したものであると考えられる。

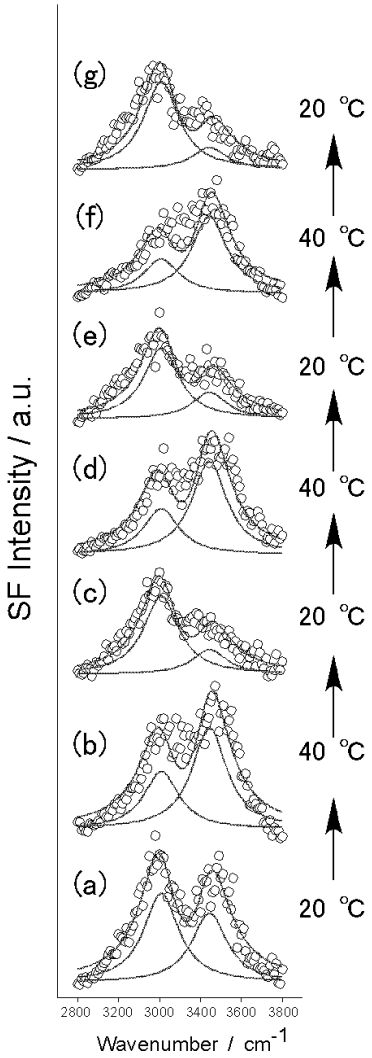


図４　ELP/水界面の OH 伸縮振動領域の SFG スペクトル

【参考文献】

(1) K.Uosaki, H.Noguchi, R. Yamamoto, S. Nihonyanagi, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 17271 (2010).

Kinetics and Molecular Structure of Soft-material Interfaces Studied by Time Resolved Vibrational Spectroscopy

Kohei Uosaki
International Center for Materials Nanoarchitectonics (MANA), National Institute for Materials Science (NIMS)

Namiki 1-1, Tsukuba, 305-0044, JAPAN
Tel:+81-29-860-4301, Fax:+81-29-851-3362, E-mail:UOSAKI.Kohei@nims.go.jp

Molecular level characterization of the structure of proteins and many other biomaterials, especially in wet conditions, are quit important to understand how they function. We applied sum frequency generation (SFG) spectroscopy, which are one of the useful methods to investigate the structure of (1)interfacial molecular structure of polyelectrolyte brush and (2)interfacial water structure of polyvinyl alcohol (PVA) gel/quartz interface.

1. SFG study on interfacial molecular structures of polyelectrolyte brush

Interfacial structures of alkylated polyvinylpyridine (Cn-PVP) brushes with various side chain lengths (n = 2, 6, 12) in dry nitrogen, water vapor, liquid water, and aqueous electrolyte solution were investigated by sum frequency generation (SFG) spectroscopy. The SFG spectra of the polymer brushes in the CH stretching region in dry nitrogen revealed that the conformational order of the side chain depended on the chain length. The conformational order of the polymer brush with hexyl, C6, side chain, was very high and the side chain was almost in *all-trans* conformation with the tilt angle of methyl group being ca. 34 degree with respect to the surface normal. Significant contribution from CH stretching of methylene group was observed in the SFG spectra of the polymer brush with the shorter, ethyl, C2, or longer, decyl, C12, side chains. Relative intensity of CH stretching of methylene group to that of methyl group, i.e., degrees of *gauche* defects, increased significantly upon in contact with water vapor at all the brushes and essentially no CH stretching peaks were observed when the brushes were in contact with liquid water, showing almost completely disordered conformational structure. These conformation changes were very fast, suggesting that the changes were related to the orientation change of the side chains. SFG spectra of the brush/water interface in the OH stretching region were dominated by OH stretching vibration of ice-like water. The higher the electrolyte concentration, the lower the OH intensity, reflecting the reduction of the double layer thickness in solution of higher electrolyte concentration.

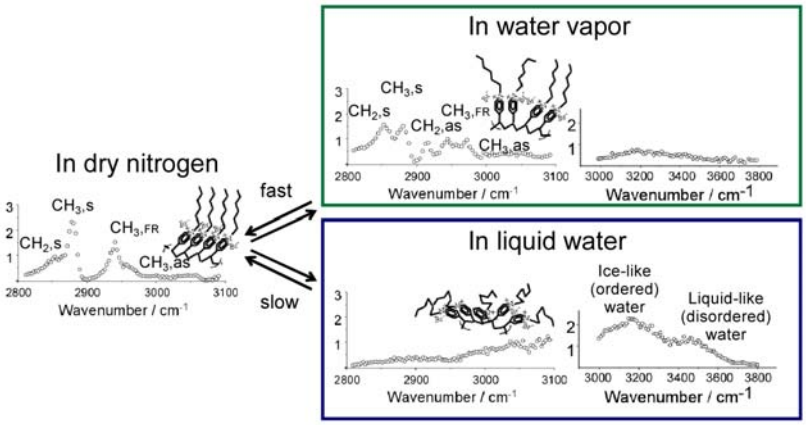


Fig. 1 Structure change of Cn-PVP0 induced by water vapor and liquid water.

2. Characterization of water structure at thermo-responsive peptide /water interface

We applied SFG spectroscopy to investigate the structure and function of interfacial water at thermo-responsive Elastin-like-peptide (ELP: Val-Pro-Gly-Val-Gly) protein modified on solid surface. They have a well defined lower critical solution temperature (LCST) around 37˚C. Bellow LCST, ELP chains are strongly hydrated with water molecules. Above the LCST, they dehydrate and collapse to a globular form. Such structural transition induced by temperature may have a number of interesting possible applications. However, the detail molecular information especially about the water molecules around ELP chains are still controversial. Below LCST, SFG intensity of “ice-like” component was dominant in SFG spectrum, which suggests that the water molecules around ELP are well ordered. When the temperature was increased from 20 to 40˚C, “liquid-like water” component became stronger and when the temperature was reversed to 20˚C, SFG spectrum returned to the initial shape. These results suggest that the water structure around ELP surface is reversibly change induced by the temperature induced structure change of ELP and the surface changed from "hydrophobic" to "hydrophilic" as the temperature change from 20 to 40˚C.

業績リスト

１．原著論文

1) K. Uosaki, H. Noguchi, R. Yamamoto, S. Nihonyanagi, “Interfacial Molecular Structures of Polyelectrolyte Brush in Contact with Dry Nitrogen, Water Vapor, Liquid Water, and Aqueous Electrolyte Solution Studied by Sum Frequency Generation Spectroscopy” J. Am. Chem. Soc. 132 (48) 17271-17276, 2010.
2) H. Fukumitsu, T. Masuda, D. Qu, Y. Waki, H. Noguchi, K. Shimazu, K. Uosaki, “Novel Method for Construction of a Metal-Organic Monolayer-Si Structure Utilizing Thiol-terminated Monolayer Covalently Bonded to the Surface through Si-C Bonds” Chem. Lett, 39 (7) 768-770, 2010.
3) H. Noguchi, K. Taneda, H. Minowa, H. Naohara, K. Uosaki, “Humidity-Dependent Structure of Surface Water on Perfluorosulfonated Ionomer Thin Film Studied by Sum Frequency Generation Spectroscopy” J. Phys. Chem. C, 144 (9) 3958-3961, 2010.
4) M. Ito, H. Noguchi, K. Ikeda, K. Uosaki, “Substrate dependent structure of adsorbed aryl isocyanides studied by sum frequency generation (SFG) spectroscopy” Phys. Chem. Chem. Phys. 12 (3) 3156-3163, 2010.
5) D. Y. Qu, M. Ito, H. Noguchi, K. Uosaki, “Layer by Layer Construction of Metal-Organic Molecule Bilayer on a Au(111) Surface” Chem. Lett., 39 (2) 110-111, 2010.
6) Y. Tateishi, N. Kai, H. Noguchi, K. Uosaki, T. Nagamura, and K. Tanaka, ″Local Conformation of Poly(Methyl Methacrylate) at Nitrogen and Water Interfaces″ Polym. Chem. 1 (3), 303-311, 2010.

２．著書・総説

1) 野口秀典、魚崎浩平『非線形分光法による固液界面計測と界面水の構造評価』、トライボロジスト、55 (4), 267-273, 2010.

３．会議発表

1) 魚崎浩平、「固液界面におけるナノ構造のその場決定と機能性物質相の構築」(受賞講演)、日本化学会第 90 春季年会、東大阪、2010 年 3 月 26－29 日
2) 野口秀典、安達龍彦、坂口和靖、魚崎浩平、「赤外分光法によるペプチド固相合成過程におけるペプチド構造のその場追跡」、日本化学会第 90 春季年会、東大阪、2010 年 3 月 26－29 日
3) 野口秀典、安達龍彦、坂口和靖、魚崎浩平、「赤外分光法によるペプチド固相合成過程におけるペプチド構造のその場追跡」、日本化学会第 4 回関東支部大会、つくば、2010 年 8 月 30－31 日
4) 野口秀典、魚崎浩平（依頼講演)、「和周波数発生分光法による電極／溶液界面構造のその場追跡」、2010 年電気化学秋季大会 、厚木、2010 年 9 月 2－3 日
5) 野口秀典、及川昴、魚崎浩平、「和周波発生分光法による二酸化チタン光触媒表面反応の追跡」、2010 年光化学討論会 、西千葉、2010 年 9 月 8－10 日
6) 野口秀典、 脇悠介、坂口和靖、魚崎浩平、「和周波発生分光法による温度応答性高分子表面の水の構造評価」、第 4 回分子科学討論会 2010 大阪、豊中、2010 年 9 月 14－17 日
7) 魚崎 浩平、野口秀典、「和周波発生分光法によるソフトナノ界面の分子構造評価」（依頼講演）、第 59 回高分子化学討論会、札幌、2010 年 9 月 15－17 日
8) 野口秀典、安達龍彦、坂口和靖、魚崎浩平、「赤外分光法によるペプチド固相合成過程におけるペプチド構造のその場追跡」、第 30 回表面科学学術講演会 、大阪、2010 年 11 月 4－6 日
9) H. Noguchi, Y. Waki, K. Sakaguchi and K. Uosaki, “Characterization of interfacial water structure at thermo-responsive material surfaces studied by SFG spectroscopy”, Pacifichem 2010, Honolulu, U.S.A., Dec. 15-20, 2010

４．その他（受賞）

1) 魚崎浩平、「固液界面におけるナノ構造のその場決定と機能性物質相の構築」、日本化学会賞、日本化学会、2010 年３月
2) K. Uosaki, “Construction of Organic Monolayers on Solid Surfaces and Their Photo Functions”, Lectureship Award 2010, The Japanese Photochemistry Association, September, 2010

チップ増強ラマン散乱法による高分子超薄膜の相分離機構の研究

研究代表者：関西学院大学理工・尾崎幸洋

連携研究者：関西学院大学理工・高橋功

連携研究者：関西学院大学理工・佐藤春実

１．緒言

本研究の目的は、数十nm程度の高い空間分解能を有し、かつ数十nm程度の超薄膜での測定が可能なチップ増強ラマン散乱(Tip-Enhanced Raman Scattering: TERS)法とAFM測定を組み合わせて、カーボンナノチューブを含むポリマーナノコンポジットの界面における分子間相互作用、分子構造、およびモルフォロジーを同時に観測することである。

ソフトマテリアルの界面･表面で起こる吸着現象、表面移動、反応性の解明や分子間相互作用、会合―解離過程、拡散過程に関する研究は、ナノスケールでの分子の凝集構造により発現される特異な挙動を理解する上で非常に重要である。また、高分子材料が形成するナノ構造と機能性発現は密接に関係していると考えられるため、これらの知見を得ることは極めて重要な課題であると言える。しかしながら、ソフトマテリアルの分子間相互作用や構造変化を非常に微視的領域でとらえ議論している例はほとんどない。そこで本研究では、測定感度と空間分解能が極めて高いことが期待されるTERS法を用いることにより、カーボンナノチューブを含むポリマーナノコンポジットにおいて、ソフトマテリアルとカーボンナノチューブとの界面で生じる分子間相互作用を官能基レベルで調べ、同時にAFM測定によりモルフォロジーを観察することで、結晶性を含めた構造の場所依存性や構造と機能性発現との関連性を明らかにする。

２．研究経過

TERS は近接場光を利用したラマン散乱法で、金属針に光を照射して、その先端に近接場光を生じさせ、この近接場光を試料に近づけ二次元的に走査することで、回折限界を超えた空間分解能の画像が得られる。このとき金属自由電子の振動であるプラズモンと照射光の結合による増強電場が生じて、ラマンスペクトルも測定できるほどに信号を増幅することができる。

(1) 実験

本研究で用いた試料はスチレンブタジエンゴム（SBR）と多層カーボンナノチューブ（multiwall carbon naotubes；MWCNTs)およびそれらのナノコンポジット SBR/MWCNTs（100：1（1phr），100：3（3phr），100：5（5phr），100：10（5phr））である。ラマンスペクトル測定は当研究室で開発中の TERS 測定装置（NRS-2100 Raman spectrophotometer）（λ＝514.5nm および 488nm）および HoloSpec f/1.8i spectrograph (Kaiser 社製)ザー社製のラマン分光器（λ＝785 nm）である。赤外スペクトルは Thermo Nicolet 社製の NEXUS 870 ATR-IR spectrometer を用いて行った。

(2) カーボンナノチューブを含むポリマーナノコンポジットのラマンスペクトル測定

図 1 に多層カーボンナノチューブのラマンスペクトルを示す。針を接近時および離脱時（200nm 程度、針を離し

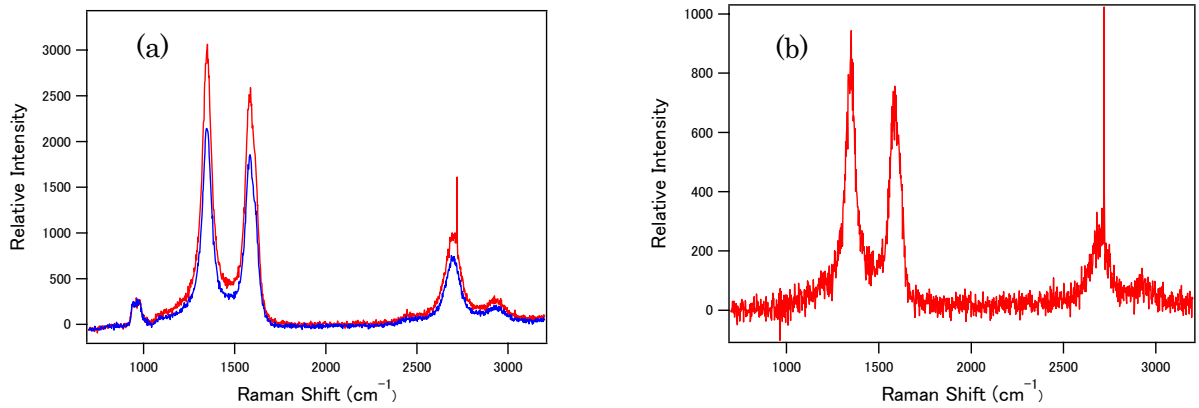


図1.　(a)針接近時および離脱時のカーボンナノチューブのラマンスペクトルと(b)その差スペクトル.

た状態）におけるスペクトルで、カーボンナノチューブ由来のDバンドとGバンドおよびG‘バンド（2700cm^{-1}付近）の強度に違いがみられた。ラマン分光法ではカーボンナノチューブの結晶性や完全性などの評価が可能であり、今回用いた多層カーボンナノチューブでは1350cm^{-1}付近のDバンド強度比が大きく、屈曲構造などに由来する結晶欠陥が多数存在する。1350cm^{-1}付近に現れるこの D バンドは、欠陥に起因するラマンピークで、ナノチューブやグラファイトに点欠陥や結晶端の欠陥が多い場合には、強い強度で現れることが知られている。また、1590cm^{-1}付近に現れるGバンドは、グラファイトの物質に共通のラマンピークで、グラファイト面内の振動モードに対応している。2700 cm^{-1} 付近 にみられるG’バンドはDバンドの倍音でCNTs/polymer 界面に敏感で、結晶性などには関係がなく、常にGバンドと同程度の強い強度であらわれる。1610 cm^{-1} 付近に現れるD’ bandはカーボンナノチューブのdisorderに関係したバンドである。図1にみられる二つのスペクトルの差は、通常のラマンスペクトル（far field)と、針の接近による近接場光（near field) を含む場合の強度の差と考えられるため、これらのスペクトルの差をとることで、近接場光によるラマンスペクトルを評価した。

図2にSBR/多層カーボンナノチューブのラマンスペクトルを示す。こちらも図1と同様、針を接近時および離脱時（200nm程度、針を離した状態）におけるスペクトルで、カーボンナノチューブ由来のDバンドとGバンドの強度に違いがみられた。カーボンナノチューブだけのときと比べると、増強された強度は弱いものの、今回、ポリマーナノコンポジットの系で初めてTERSスペクトル測定に成功した。

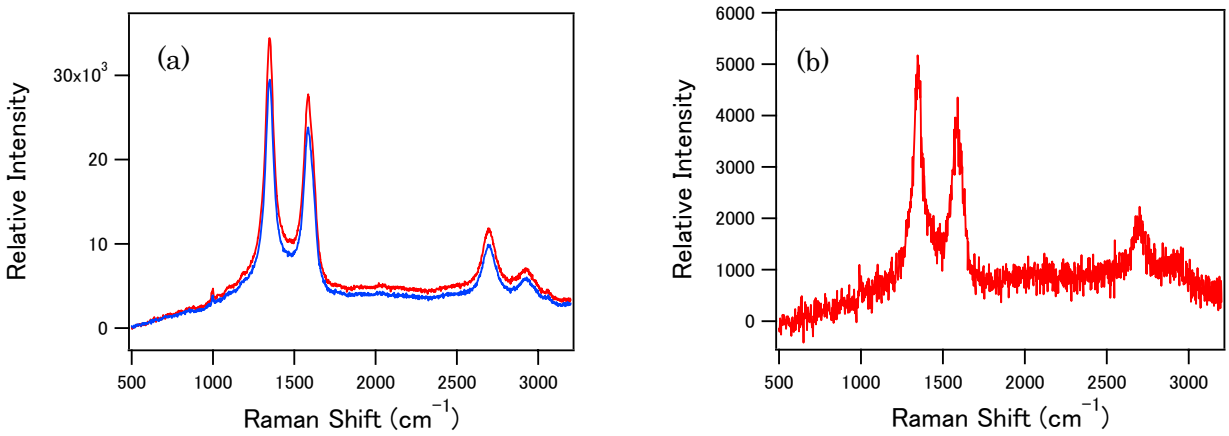


図2.　(a)針接近時および離脱時のSBR/カーボンナノチューブ ナノコンポジットのラマンスペクトルと(b)その差スペクトル.

また、TERS スペクトルが測定されているかどうかを確認するために、測定点を変えてシグナルを取ったところ、増強シグナルの強度の変化が観測された（図 3)。つまり、ナノコンポジット中のカーボンナノチューブの分散度合いに対応して、測定した各点でのTERSスペクトル強度が異なっているものと考えられ、これらのスペクトルは、確かにTERSスペクトルであることがいえる。

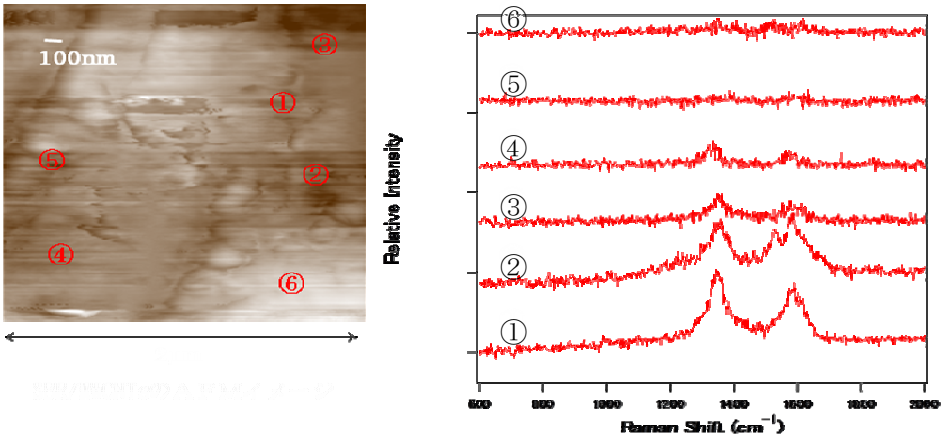


図3.　SBR/カーボンナノチューブナノコンポジットの(a)AFM像および(b)各点でのTERSスペクトル.

Phase Separation Mechanism of Polymer Thin Films Studies by Tip- Enhanced Raman Scattering

Yukihiro OZAKI, Isao TAKAHASHI , Harumi SATO

School of Science and Technology, and Research Center for Environment Friendly Polymers, Kwansei-Gakuin University

Gakuen2-1, Sanda, Hyogo 669-1337, Japan
Tel : 079-565-8349, Fax : 079-565-9077, E-mail : ozaki@kwansei.ac.jp

The purpose of the present study is to explore the intermolecular interaction, molecular structure, and morphology at the interface of polymer and multiwall carbon nanotubes (MWCNTs) by using Tip-Enhanced Raman Scattering (TERS). This method has following advantages: (1) possess sufficient spacial resolution about several dozen nm; (2) can measure a thin film with about several dozen nm; (3) simultaneous measurement of morphology and molecular structure. It is expected that the character of polymer nanocomposites is greatly affected to the interaction between polymer and nanofiller. TERS is very useful tool to measure directly these interaction and local structure of nanocomposites

Figure 1 shows the Raman spectra of needle approach condition and separate condition. The subtraction of needle separate spectrum from needle approach spectrum means TERS signal. As you can see in Figure 1, we succeeded to measure the TERS spectra measurement of styrene-butadiene rubber (SBR)/MWCNTs (SBR/MWCNTs).

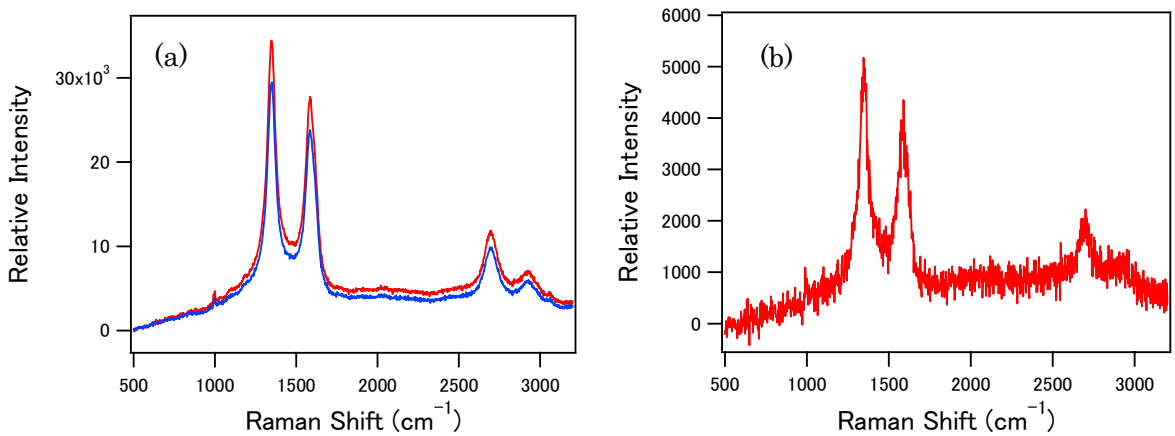


Fig. 1 (a) Raman spectra of needle approach condition and separate condition and (b) Subtraction of these spectra.

To confirm the TERS spectra, we measured position-dependent of Raman spectra of SBR/MWCNTs. The Raman spectra of SBR/MWCNT nanocomposites at several point without needle approaching were very similar each other. However, those of the TERS spectra (with needle approaching) were different at the each point of the sample. That means we succeed the measurement of the TERS spectra of SBR/MWCNT. Some of TERS spectra show that the CNT signal changed. On the other hand, some of them shows that the polymer signal (aromatic CH band) changed in the TERS spectra. By using TERS spectroscopy, Decentralization of CNT in nanocomposites surface is observed directly. It seems that the difference of TERS signal that assigned to polymer signal reflect the difference of local structure or distribution of nanocomposites surface. This result suggested that TERS is very powerful tool to measure polymer surface structure.

業績リスト

１．原著論文

1) Harumi Sato, Yuriko Ando, Hiroshi Mitomo, Yukihiro Ozaki, “Infrared Spectroscopy and X-ray Diffraction Studies of Thermal Behavior and Lamella Structures of Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) (P(HB-*co*-HV)) with PHB Type Crystal Structure and PHV Type Crystal Structure” *Macromolecules*, 44, 2829-2837 (2011).
2) Longhai Guo, Harumi Sato, Takeji Hashimoto, Yukihiro Ozaki, “Thermally Induced Exchanges of Hydrogen Bonding Interactions and Their Effects on Phase Structures of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(4-vinylphenol) Blends” Macromolecules, 44, 2229-2239 (2011).
3) H. Chang, J. Zhang, L. Li, Z. Wang, C. Yang, I. Takahashi, Y. Ozaki, and Shouke Yan: A Study on the Epitaxial Ordering Process of the Polycaprolactone on the Highly Oriented Polyethylene Substrate, *Macromolecules,* **43,** 362-366 (2010).
4) K. Yoshida, T. Itoh, H. Tamaru, V. Biju, M. Ishikawa, and Y. Ozaki, Quantitative Evaluation of Electromagnetic Enhancement in Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering from Plasmonic Properties and Morphologies of Individual Ag Nanostructures, *Physical Review B,* **81,** 115406-1-9 (2010).
5) H. Hoshina, Y. Morisawa, H. Sato, A. Kamiya, I. Noda, Y. Ozaki, and C. Otani: Higher Order Conformationof Poly(3-hydroxyalkanoates) Studied by Terahertz Time-Domain Spectroscopy, *Applied Physics Letters,* **96,** 101904-1-3 (2010).
6) J. Zhang, Y. Duan, A. J. Domb, and Y. Ozaki, PLLA Mesophase and Its Phase Transition Behavior in the PLLA-PEG-PLLA Copolymer As Revealed by Infrared Spectroscopy, *Macromolecules,* **43,** 4240-4246 (2010).
7) L. Guo, H. Sato, T. Hashimoto, and Y. Ozaki: FTIR Study on Hydrogen-Bonding Interactions in Biodegradable Polymer Blends of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(4-vinylphenol), *Macromolecules,* **43,** 3897-3902 (2010).
8) Y. Duan, J. Zhang, H. Chang, S. Yan, C. Yang, I. Takahashi, and Y. Ozaki: Melting Behavior of Epitaxially Crystallized Polycarprolactone on a Highly Oriented Polyethylene Thin Film Investigated by in Situ Synchrotron SAXS and Polarized Infrared Spectroscopy, *Macromolecules,* **43,** 5315-5322 (2010).

２．著書・総説

1) S. Šašić and Y. Ozaki, eds: *Raman, Infrared and Near-Infrared Chemical Imaging*, John Wiley & Sons (2010).

３．会議発表

1) ラマン分光法を用いた SBR/カーボンナノチューブナノコンポジットにおける界面の構造と物性, 佐藤春実, Yan Xinlei, 鈴木利明, 北濱康孝, 尾崎 幸洋, Liliane Bokobza, 第 60 回高分子学会年次大会, 大阪国際会議場, 大阪, (2011). [国内学会　ポスター]
2) Tip Enhanced Raman Scattering (TERS) Study of Styrene-Butadiene Rubber/Multiwall Carbon Nanotubes Nanocomposites, Toshiaki Suzuki, Harumi Sato, Yasutaka Kitahama, Xinlei Yan, Tamitake Itoh, Xiaoxia Han, Liliane Bokobza, Yukihiro Ozaki, International Congress on Analytical Sciences (ICAS) 2011, 京都国際会議場, 京都, (2011). [国際学会　口頭]
3) チップ増強ラマン散乱を用いた、スチレンブタジエンゴム／多層カーボンナノチューブポリマーナノコンポジットの表面測定, 鈴木利明, 佐藤春実, 北濱康孝, 新蕾閣, 伊藤民武, 暁霞韓, リリアン ボコブザ, 尾崎幸洋, 日本化学会第91春季年会, 神奈川大学(横浜キャンパス), (2011). [国内学会　口頭]
4) カーボンナノチューブを含むポリマーナノコンポジットのラマンスペクトル, 佐藤春実, Yan Xinlei, 鈴木 利明, 北濱 康孝, Liliane Bokobza, 尾崎 幸洋, 文科省科研費補助金・新学術領域・「ソフトインターフェースの分子科学」第5回公開シンポジウム, 東京理科大学森戸記念館, (2011). [国内学会　口頭]
5) Specific crystal structure of poly(3-hydroxybutyrate) thin films studied by infrared reflection-absorption spectroscopy, Harumi Sato, Yukihiro Ozaki, Isao Takahashi, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2010), Honolulu, Hawaii, USA, (2010). [国際学会　口頭]
6) Tip-enhanced Raman scattering studies on polymer thin films, Yukihiro Ozaki, Harumi Sato, Yasutaka Kitahama, Toshiaki Suzuki, Isao Takahashi, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2010), Honolulu, Hawaii, USA, (2010). [国際学会　ポスター]
7) 表面増強ラマン散乱・赤外分光法によるカーボンナノチューブを含むポリマーコンポジットの表面研究, 佐藤 春実 ・Yan Xinlei ・鈴木 利明・北濱 康孝・Liliane Bokobza・尾崎 幸洋, 第59回高分子討論会　北海道大学, (2010). [国内学会　口頭]

ダイナミックな細胞内外輸送現象の１細胞定量解析法

研究代表者：東北大学大学院環境科学研究科・珠玖仁

１．緒言

本研究では、ソフト界面を介する細胞内外輸送現象を 1 細胞レベルで定量的に解析する手法を開発し、それらを組合せ、遺伝子導入やドラッグデリバリーのメカニズム解明と効高率化に貢献することを目標とする。電気化学は、「液/液界面の輸送現象」を例に挙げられるとおり、ソフト界面を介する物質移動や界面電荷に関る情報を容易に取得可能である。さらに、細胞の外から内部への輸送過程では、薬剤・タンパク質・核酸などいずれの場合においても、これら標的分子が細胞膜を横切る際に脂質２分子膜小胞に取込まれ、細胞内でありながらトポロジー的には細胞外環境を反映する状態を経る。この細胞内取込み現象は、ドラッグデリバリーや遺伝子導入過程の理解と高効率化実現のために、極めて実用的かつ学術的難問である。我々はこれまで、この細胞輸送現象の最も典型的な例としてエンドサイトーシスに着目してきた。平成２２年度は、イオン電流をプローブ - サンプル間距離制御に用いる SICM(scanning ion-conductance microscopy)により、単一細胞の形状 - 電気化学同時イメージングに成功した。電気化学イメージングを可能とする複数タイプのナノプローブを試作し、白金電極に加えて炭素電極タイププローブの開発に成功した。マクロファージに着目し、マクロファージ活性化因子の添加に伴う、形態変化・膜容量変化・活性酸素産生能の同時評価を実施した。

２．研究経過

２．１　電気化学イメージングシステム：申請者は、電気化学イメージング法を応用し、細胞表面反応と細胞内反応を識別する手法を見出した。すなわち、膜タンパク質を酵素標識して電気化学応答が得られる初期状態から、エンドサイトーシス誘起により、膜タンパク質が細胞内部に取込まれる過程で電気化学応答が消失してく様子を観測することに成功した(図１)。金ナノ粒子をプローブとして EGFR を免疫標識し、光散乱に基づき細胞の内外を識別可能かどうか基礎的検討を実施した。生細胞電気化学イメージングから、メナジオンや酸素の細胞内反応・細胞膜透過現象を評価した。我々が独自に開発した電気化学多点計測デバイスのスループットを大幅に改善・改良できた。多点計測デバイスでは、電極交点で誘起されるレドックスサイクルに基づく電流増幅により世界最高レベルの感度を実現している（Z. Lin et al, Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 2044-2046.）従来のデバイスは、２枚の独立型マイクロバンド電極アレイをサンドイッチした構造を有した。今回、各電極交点に交互櫛形電極を 1024 個配置する新構造を検討した。

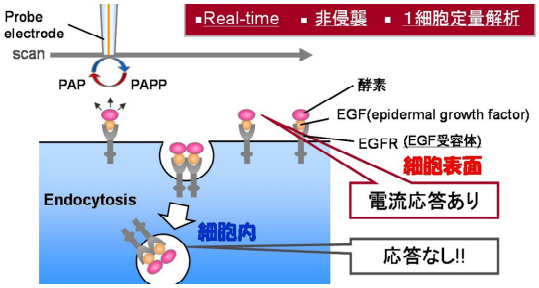


図１エンドサイトーシスの追跡

内径 10-250 nm のガラスキャピラリーの外壁に Pt をスパッタリング積層し、さらに電着塗料により絶縁膜を作製した。収束イオンビームにより先端を切り出すことにより内径/外径　= 330/550nm 程度のリング電極型探針を作製した（図２）。キャピラリーの内側には電解液を充填するとともに Ag/AgCl 電極を挿入した。イオン電流値が沖合いに対して 1-10%減少する地点をセットポイントと定義し、探針-サンプル間距離を 100 nm 以下に保つことがでた。形状-電気化学同時イメージングに成功し、イオン・コンダクタンスに基づく探針-サンプル間距離制御が非接触で行われており、導電体サンプルに対して適用可能であることを示した。SICM/SECM 融合システムにより酵素膜や生細胞の形状-電気化学同時イメージングに成功した。ダブルバレル型ガラスキャピラリーを細尖化し、片方のキャピラリーにブタンガスを流し、炭素を析出することにより、シータ（θ）型 SICM/SECM 探針を作製した。

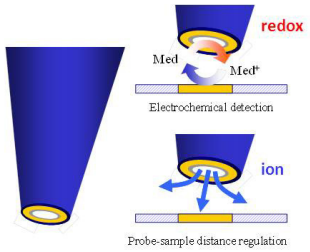


図２　SECM-SICM 複合探針

２．２　マクロファージの機能評価：

電気生理学的・電気化学的手法を組み合わせて細胞の形態&機能の変化を伴うマクロファージの活性化過程を複合的に評価した。電位依存性K^+チャンネル Kv1.3 を発現するマウス・マクロファージとして RAW264.7 を用いた。マクロファージ活性化処理として 150 ng/mL 抗 CD3 抗体、100 ng/mL LPS(リポ多糖)、100 mg/mL TNFα(腫瘍壊死因子)を添加した。静止電位―80mV から電圧を印加し（+40 mV, 300 ms)、膜容量と抵抗成分を計測した。Kv1.3 チャンネルの阻害剤（4-アミノピリジン）添加前後のイオン電流の変化から１細胞に発現する Kv1.3 チャンネル数を見積もった。

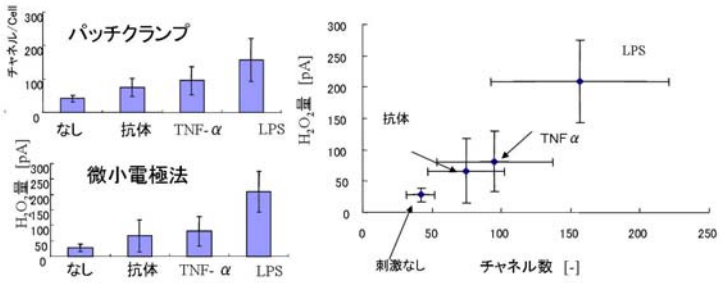


図３　Kv1.3 チャンネル発現量、過酸化水素産生能、両者の相関

PMA（ホルボール-12-ミリステート-13-アセテート)を加えた直後の過酸化水素発生能を Pt 電極（半径 10μm,+0.9V vs Ag/AgCl）により検出した。走査型イオンコンダクタンス顕微鏡（ＳＩＣＭ）によりマクイロファージの形状イメージングを取得し生細胞の表面積を算出し、パッチクランプ法より求まる膜容量から得られる表面積と比較した。図３はマクロファージ R264.3 の活性化処理条件ごとの、Kv1.3 チャンネル発現量および過酸化水素産生量を示す。マクロファージの活性化に伴い、Kv1.3 チャンネル発現量および過酸化水素産生量がともに増加してるいことが確認できた。各々の活性化処理条件ごとにＳＩＣＭにより形状イメージングを行った後にホールセル・パッチを実施し、２つの手法で得られた表面積を比較した（図 4)。その結果、２つの方法で得られた表面積は良好に一致することが確認できた。

以上のとおり、マクロファージの活性化過程をモデルとして、電気化学的手法・電気生理学的手法を組み合わせた細胞の機能評価法の有用性を示すことができた。

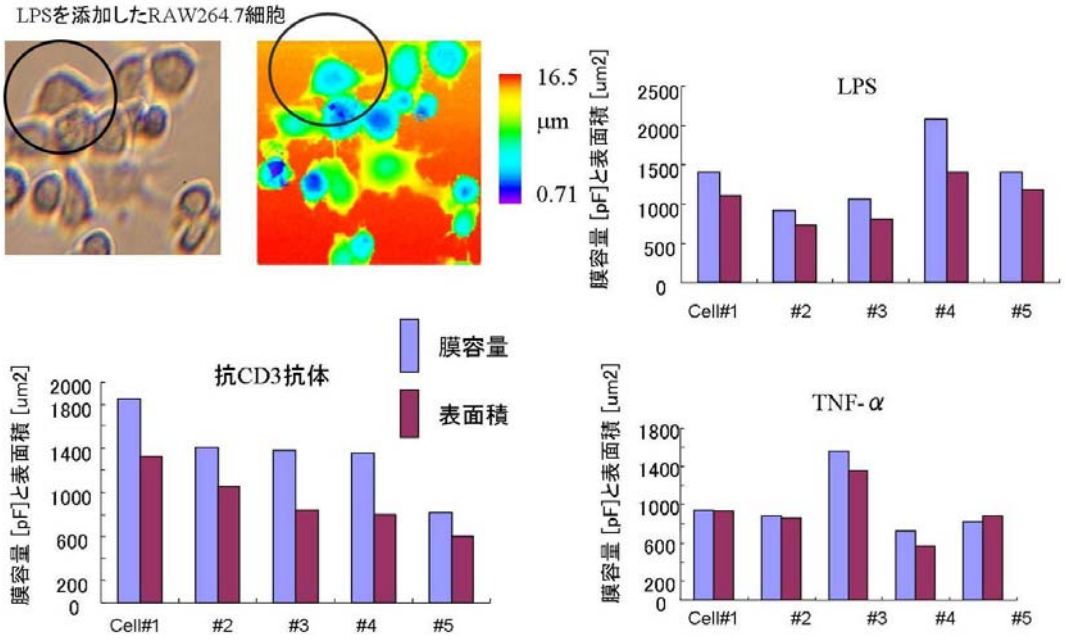


図４　マクロファージの SICM 像。SICM およびパッチクランプ法で求めた表面積の比較

Single-cell analysis method of dynamic transport process across cell membrane

Hitoshi Shiku

Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University

Aramaki, Aoba 6-6-11, Sendai 980-8579, Japan
+81-22-795-6167, +81-22-795-6167, shiku@bioinfo.che.tohoku.ac.jp

Electrochemical technique allows evaluating charge transfer and mass transfer across biological materials including cellular membrane and liquid-liquid interface. We introduce here two techniques, scanning probe microscope and addressable electrode array device to visualize local electrochemical activities of the biological samples. With a scannng probe microscopy system, mapping of EGFR (epidermal growth factor receptor), characterization of electron transfer rate via menadione and enzymatic activities were carried out at single-cell level. Murine macrophage RAW264.7 was selected to simultaneously characterize with various types of instruments. Data obtained by patch-clamp and scanning ion conductance microscopy (SICM) were integrated and compared with the electrochemical imaging data.

We have already shown EGFR quantification at cell membrane is possible with scanning electrochemical microscopy (SECM). Endocytosis was induced by addition of EGF, ligand protein to activate EGFER. Electrochemical response was observed only the case the EGFR existing at the cell surface but not from EGFR incorporated inside cell. Therefore we succeeded to distinguish the surface reaction and intracellular reaction. It is noteworthy here that fluorescence signal might be obtained from both EGFR existing surface and inside of the targeted cell. As a same manner, we have evaluated the light-scattering microscope observation to distinguish the localization of gold nanoparticle tagged EGFR. The last research is ongoing.SECM was also applied to characterize oxygen consumption, oxygen permeability and enzymatic activity of NAD(P)H oxidizing enzymes.

Electrochemical imaging was also performed with addressable electrode array devices we have invented (Z. Lin et al, Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 2044-2046). The throughput of the electrochemical imaging device has been improved from 10 x 10 to 32 x 32 channels. Interdigitated array (IDA) electrode was used as detector, which allowed signal amplification due to redox cycling, ease of use, a relatively definitive fabrication process to extend the electrochemistry-based bioassay application.

Pt-ring electrode probe (330 nm i.d./350 nm o.d) was microfabricated with focused-ion beam (FIB). The inside of the probe was filled with electrolyte and placed a Ag/AgCl electrode to monitor ionic current. The probe-sample distance was maintained at 100 nm by feedback regulation of the ionic current to obtain topography of the sample with sub-micrometer spatial resolution. Simultaneously, electrochemical imaging of immobilized enzyme spot and living cells were obtained. We have invented another type of probe with theta-shaped glass capillary. Carbon electrode was deposited at one channel of the capillary to detect Faradaic current and the other channel was used to monitor ionic current. Catechol amines from single nerve-like cell during exocytosis event has been detected.

Voltage-gated K+ channel Kv1.3 of mouse macrophage RAW264.7 was evaluated with whole-cell patch-clump method. 4-Aminopyridine, inhibitor for Kv1.3 was used to estimate the specificity of the targeted ion channel from the ionic current response. LPS (lipopolysaccharide), TNF (tumor necrosis factor)-α, anti-CD3 antibody were used for activation stimuli to increase the surface concentration of Kv1.3 channel. ROS (reactive oxygen species) production was electrochemically evaluated with a Pt-microelectrode to detect hydrogen peroxide at 0.9 V vs Ag/AgCl after the addition of PMA (phorbol 12-myristate-13-acetate). The surface area of the individual RAW264.7 cell was estimated by the topography from SICM (scanning ion conductance microscopy) and the capacity component from the whole-cell patch recording. All the parameters taken at certain conditions were comprehensively characterized.

業績リスト

１．原著論文

1) Y. Takahashi, A. I. Shevchuk, P. Novak, Y. Murakami, H. Shiku, Y. E. Korchev, T. Matsue, Simultaneous non-contact topography and electrochemical imaging by SECM/SICM featuring ion current feedback regulation. *J. Am. Chem. Soc.,* 132(29), 10118-10126 (2010).

2) Y. Takahashi, Y. Murakami, K. Nagamine, H. Shiku, S. Aoyagi, T. Yasukawa, M. Kanzaki, T. Matsue, Topographic Imaging of Convoluted Surface of Live Cells by Scanning Ion Conductance Microscopy in a Standing Approach Mode, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12, 10012-10017 (2010).

3) H. J. Lee, S. H. Lee, T. Yasukawa, J. Ramón-Azcón, F. Mizutani, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Rapid and simple immunosensing system for simultaneous detection of tumor markers based on negative-dielectrophoretic manipulation of microparticles. *Talanta* 81, 657-663 (2010). (査読有)

4) H. Shiku, D. Okazaki, J. Suzuki, Y. Takahashi, T. Murata, H. Akita, H. Harashima, K. Ino, T. Matsue, Quantitative characterization of reporter gene expression at single-cell level with real-time RT-PCR, chemluminescence, fluorescence, and electrochemical imaging. *FEBS Lett.* 584, 4000-4008 (2010).

5) K. Ino, W. Saito, M. Kokide, T. Umemura, H. Shiku, T. Matsue, Addressable electrode array device with IDA electrodes for high-throughput detection, *Lab Chip,* 11, 385-388 (2011).

6) K. Nagamine, Y. Takahashi, K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, Influence of tip size on single yeast cell imaging with scanning electrochemical microscopy, *Electroanalysis,* 23, 1168-1174 (2011).

7) M. Koide, T. Yasukawa, K. Nagamine, H. Shiku, T. Itayama, T. Matsue, An electrochemical device with microwells for determining the photosynthetic activity of a single cyanobacterium, *Sens. Actuat. B,* 153, 474-478 (2011).

8) K. Ino, A. Ishida, K. Y. Inoue, M. Suzuki, M. Koide, T. Yasukawa, H. Shiku, T. Matsue, Electrorotation chip consisting of three-dimensional interdigitated array electrodes. *Sens. Actuat. B,* 153, 468-473 (2011).

２．著書・総説

1) 珠玖　仁、末永智一、表面・界面の分析・評価　プローブ顕微鏡(8.2節)、*表面技術*, 61, 187-188 (2010).

2) 珠玖　仁、伊野浩介、末永智一、単一細胞由来 mRNA の定量解析 *Electrochemistry* 78(10), 832-836 (2010).

3) 珠玖　仁、「流路培養による微小環境の再現」、*生物工学*, 88, 533-533 (2010).

4) 横尾正樹、伊藤-佐々木隆広、珠玖　仁、末永智一、阿部宏之、呼吸活性を指標とした胚の品質評価—マウス胚移植試験の成績と産子の正常性について、*産婦人科の実際*, 59(9) 1375-1379 (2010).

３．　会議発表

1) H. Shiku, Y. Hasegawa, S. Takano, Y. Zhou, K. Ino, T. Matsue, Electrochemical characterization of alkaline phosphatase and respiration activities from mouse embryo bodies. 6th International Symposium on Organic Molecular Electronics (ISOME2010), Chiba University, Chiba, Japan, June 10-11, 2010.

2) 珠玖　仁「多機能ナノ電気化学顕微鏡によるソフト界面へのアプローチ」 第59回高分子討論会、北海道大学. 2010. 09. 16.

3) H. Shiku, Electrochemical imaging techniques with scanning probe and addressable microelectrode array. Pacifichem 2010, Convention Center, Honolulu, Hawaii Dec. 15, 2010.

4) H. Siku, Single-Cell Analysis by Multi-Functional Scanning Probes, MRS-J(第20回日本MRS学術シンポジウム), Yokohama, Dec. 22, 2010.

5) 珠玖　仁ダイナミックな細胞内外輸送現象の１細胞定量解析法.文部科学省科学研究費補助金・新学術領域研究「ソフトインターフェースの分子科学」(略称・ソフト界面) 第五回公開シンポジウム、東京理科大学　森戸記念館 2011. 02. 03-04.

ソフト界面における自発的多重膜形成

研究代表者：九大院理・瀧上隆智

１．緒言

異なる２つのバルク相が接する境界、すなわち界面は、バルク相とは異なる構造や性質を示す厚さが数 nm のナノ空間である。ベシクル、エマルション、生体膜などのより複雑で柔らかい分子組織体の多くは気／液や液／液界面などの柔らかく変形可能な界面（ソフト界面）における吸着膜（ギブズ膜）を基本構造としている。従って、ソフトマテリアルの創製やその構造と機能の相関、性質の正しい理解にはソフト界面ギブズ膜の構造解明が不可欠である。

フルオロカーボン（FC）を疎水鎖として有する界面活性物質が油／水界面での形成するギブズ膜の研究は、①FC 鎖とハイドロカーボン（HC）鎖との相互作用が弱い、②FC 鎖は剛直で曲がりにくい、③フッ素の高い電気陰性度に起因した高い分極効果、などの性質のため、界面における分子間相互作用や分子配向の観点から非常に興味深い。

昨年度は、FC 鎖の両端に OH 基を有する FC ジオール（FC10diol ; **OH**$CH_2(CF_2)_8CH_2$**OH**）のヘキサン／水界面ギブズ膜において自発的に形成された多重膜の性質や構造を、界面張力の圧力依存性から求まるギブズ膜中での FC10diol の部分モル体積を基に巨視的観点から考察し、さらに SPring-8 におけるＸ線反射率測定より決定されるギブズ膜の構造パラメーターを基に微視的観点から詳細に検討した。その結果、FC10diol 分子は下層では固体に近い状態で密充填するものの、積層に伴い溶媒であるヘキサン分子の貫入などによりパッキングが緩やかになり、これは部分モル体積の結果とも矛盾しないことなどが判明している。

さらに、FC アルコール（FC12OH ; $CF_3(CF_2)_9(CH_2)_2$**OH**）と FC 鎖の末端フッ素を水素置換した 1H-ペルフルオロデカン（HFC10 ; **H**$CF_2(CF_2)_8CF_3$）との混合系ギブズ膜に関する研究では、FC12OH は単独系で凝縮単分子膜を形成し、HFC10 単独では負吸着するが、これらの混合系では、一旦、凝縮単分子膜を形成した後、相転移的に多重膜を形成することを見出している。この系で見られた多重膜は、異種分子の混合により初めて誘起されるもので、その形成メカニズムの解明が急がれる。

２．研究経過

今年度は、FC10diol 単成分系の多重膜、FC12OH – HFC10 および FC10diol – C16diol 混合系の多重膜を研究対象とし、FC10diol 単成分系に対しては界面張力、X 線反射率（XR）・回折（GIXD）の時間分解測定を駆使して、形成メカニズムを巨視・微視両観点から解明することを目的とした。一方、混合系の多重膜に関しては、それが凝縮単分子膜を経て形成されることから、凝縮単分子膜における分子の混和性と多重膜形成の相関に着目して界面張力法により研究を展開した。現在までに、以下の結果を得ている。

２．１　ヘキサン／水界面における FC10diol の多重膜形成

FC10diol の FC 鎖長を短くした FC8diol（**OH**$CH_2(CF_2)_6CH_2$**OH**）は、水溶性の性質を示す。本年度は FC8diol の水溶液／空気表面における多重膜形成を、界面張力および X 線反射率測定により調べ、ヘキサン／水界面における FC10diol の多重膜構造と比較を行った。その結果、ヘキサン／水界面において形成される多重膜は、その厚みがバルク溶液の濃度と共に急激に増大するのに対して、空気／水表面では、ほぼ一定の厚みを示すことが見出された。この両者の振舞いの違いは、多重膜を挟んで上下の境界面の間に働く表面間力が、空気／水表面では引力であるが、ヘキサン／水界面では斥力であることに起因していることを、Hamaker 定数の見積もりから明らかにできた。

さらに、ペルフルオロヘキサン（FC6）／水界面での FC10diol の吸着挙動を調べたところ、ヘキサン／水界面の場合と異なり、多重膜形成に至らないことも判明した。このとこより、ヘキサン／水界面での多重膜形成の駆動力としては、FC10diol の FC 鎖とヘキサンとの弱い分散力相互作用が、結果として界面に水平配向した FC10diol 分子間の疎水鎖間の分散力相互作用を強め、分子の積層を駆動したものとして解釈された。

２．２　ヘキサン／水界面における HFC10 － FC12OH 混合系の多重膜形成

この系の多重膜形成は凝縮単分子膜の形成を経て起るため、凝縮単分子膜における分子の混和性やその構造が分子の積層構造に大きな影響を与えていると予想される。ここでは、凝縮単分子膜における分子の混和性と多重膜形成との相関を、疎水基間に働く分散力相互作用の観点から明らかにすることを目的とし、FC 鎖と相互作用が弱い HC 鎖を有する 1-イコサノール（$CH_3(CH_2)_{19}OH$；C20OH）と HFC10 との混合系ギブズ膜を対象に、界面張力法による研究を展開した。

HFC10（第１成分）と C20OH（第２成分）の混合物ヘキサン溶液／水界面張力γ を、25℃、大気圧下で、溶液全濃度 m (= $m_1 + m_2$) および混合物中の C20OH の組成 X_2 (= m_2/m) の関数として測定した。C20OH 単成分系の界面張力は、濃度の増加と共に減少し、γ vs. m 曲線にはギブズ膜の膨張膜－凝縮膜間相転移に相当する折れ曲がりが観測された。しかしながら、混合系のγvs. m 曲線には、HFC10 - FC12OH 混合系で見出されたような多重膜形成に由来する折れ曲がりは観測されなかった。

この違いを凝縮膜中における分子の混和性の観点から検討するために、一定界面張力における全濃度 m vs. 溶液組成 X_2 曲線の傾きより界面過剰量で定義されるギブズ膜組成 X_2^{H}（$= \Gamma_2^{\mathrm{H}}/\Gamma^{\mathrm{H}}$；$\Gamma^{\mathrm{H}} = \Gamma_1^{\mathrm{H}} + \Gamma_2^{\mathrm{H}}$）を求め、結果を２次元相図として描き、２つの系で比較した（**Fig.1**）。HFC10 - C20OH 系ではギブズ膜組成が明らかに負であることから、HC – FC 鎖間の弱い相互作用のため HFC10 分子が界面領域からほとんど排斥され、凝縮単分子膜には混和していないことがわかった（**Fig.1b**）。

一方、HFC10 – FC12OH 系のギブズ膜組成は小さいながらも正の値であり（**Fig.1a**）、このことは凝縮膜中で明らかに HFC10 が FC12OH と混和していることを示している。従って、HFC10 – FC12OH 系で見られた多重膜形成には、凝縮単分子膜中で HFC10 分子が混和し、その配向が固定されることがトリガーになっており、これにより HFC10 分子の有する双極子間相互作用や FC 鎖間の分散力相互作用が有効に働き、分子の積層を促進していると考えられる。

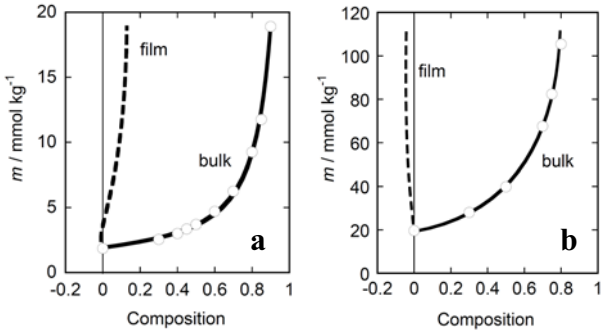


Fig.1

２．３　ヘキサン／水界面における C16diol － FC10diol 混合系の多重膜形成と混和性

界面における分子配向の違いは、分子間相互作用の変化を通して分子の混和性に大きな影響を与える。以前に行われた、ヘキサン／水界面において垂直配向する FC アルコールおよび HC アルコール混合系のギブズ膜の研究において、膨張膜（２次元液体）状態では両アルコールは正の共沸混合物型の吸着の相図を与え、凝縮膜（２次元固体）では共融混合物型となり互いに全く混ざらず、これらの結果が FC – HC 鎖間の弱い相互作用に起因していることを報告している。

ここでは、界面における分子配向が混和性に与える効果を検討することを目的に、ヘキサン／水界面において水平配向することが期待される HC ジオール（ヘキサデカン-1, 16-ジオール；FC16diol）と FC10diol との混合系ギブズ膜を対象に、界面張力測定および吸着の相図作成を行った。

界面圧πvs. 分子占有面積 A 曲線より、この混合系ギブズ膜では、水平配向膨張膜、水平配向凝縮膜、および多重膜が出現することが判明した。膨張膜状態での吸着の相図は正の共沸混合物型となり、両ジオール分子が混ざりにくい傾向にあることがわかる。一方、多重膜の基盤構造である凝縮膜での相図は負の共沸混合物型となり、FC – HC 鎖間の弱い相互作用にもかかわらず互いに混ざりやすくなるという、従来の垂直配向の場合に得られた結果とは全く異なる傾向が見られた。

吸着膜の剰余ギブズエネルギーは、膨張膜では垂直配向する FC – HC アルコール混合系に比べ水平配向する FC – HC ジオール系では小さく、水平配向による最近接分子数の減少が分散力相互作用の効果を弱めていることが予想された。また、凝縮膜ではこの効果に加え、異種分子のヒドロキシル基間の水素結合を強めるような分子パッキングの可能性が示唆されている。さらに、多重膜状態は FC10diol に大きく富んでおり、分子積層に伴い疎水鎖同士の接触が増えると FC – HC 鎖間の弱い相互作用の効果が混和性に影響を与えることが分かった。今後、SPring-8 における X 線反射・回折測定を行い、膜厚、電子密度、２次元格子構造の決定を基に、ここで予想した混和性の描像を確認する予定である。

Spontaneous Multilayer Formation at Soft Interfaces

Takanori Takiue
Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Kyushu University

Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan
Tel: +81-92-642-2578, Fax: +81-92-642-2607, E-mail: t.takiue@chem.kyushu-univ.jp

The study on the structure and property of soft interfaces such as liquid/liquid interfaces is valuable, for example, in order to understand the structure-function relation of more complicated molecular organized systems including emulsion, vesicle, and biological membranes. Characteristics of surface-active substances with fluorocarbon (FC) chain are (i) a large polarization effect induced by a strong electronegative nature of fluorine atom, (ii) very weak mutual interaction with HC chain, and (iii) the rigidity of hydrophobic chain. Therefore, the study on the adsorption of FC compounds at HC oil/water interface is of great interest from the viewpoint of basic science as well as industrial aspects.

In this study, the interfacial tensiometry and X-ray reflection were applied to the single component system of 1H,1H,10H,10H-perfluorodecane-1,10-diol (FC10diol) and the mixed component systems of 1H,1H,2H,2H-perfluorododecanol (FC12OH) – 1H-perfluorodecane (HFC10) and FC10diol – hexadecane-1,16-diol (C16diol) at the hexane/water interface in order to clarify the state and structure of multilayer from the viewpoint of molecular interaction at the interface.

The spontaneous multilayer formation of FC10diol at the hexane/water interface was compared to that of FC8diol (1H,1H,8H,8H-perfluorooctane-1,8-diol) at the air/water interface. The thickness of the former increases rapidly with a small increase in bulk concentration, while that of the latter almost constant against bulk concentration. It was concluded that this difference is primarily due to repulsive surface force between the top and bottom of multilayer at the hexane/water interface and attractive one at the air/water interface. Furthermore, it was found that FC10diol molecules do not form multilayer at the perfluorohexane/water interface. Therefore, it is plausible that the interaction between FC chains enhanced by weak interaction of FC chain with hexane is a driving force to induce molecular piling at the hexane/water interface.

In the case of mixed system of 1H,1H,2H,2H-perfluorododecanol (FC12OH) and 1H-perfluorodecane (HFC10) at the hexane/water interface, a multilayer state was appeared via the condensed monolayer formation, even though the individual components do not form that by themselves. By comparing the phase diagram of adsorption (PDA) in the condensed monolayer with that of 1-icosanol (C20OH) – HFC10 system, the mixing of HFC10 molecules in the condensed monolayer should be a trigger to induce multilayer formation. An expected scenario is that the HFC_{10} molecule in the condensed monolayer can interact with other HFC_{10} mainly by dipole – dipole interaction, and other molecules assemble around the piled HFC_{10} molecules by dispersion interaction between hydrophobic chains. The structural analysis of multilayer as well as condensed monolayer by X-Ray reflectivity measurement is now proceeding in SPring-8.

Furthermore, the multilayer formation of FC10diol – C16diol mixture at the hexane/water interface was examined by constructing the interfacial pressure – area per molecule curves and PDA. The PDA in the expanded monolayer represents a positive azeotropy because of the weak mutual interaction between HC and FC chains. In contrast, the PDA in the condensed monolayer shows a negative azeotropy, indicating a stronger mutual interaction between C_{16}diol and FC_{10}diol than between the same ones, in spite of weak interaction between HC and FC chains. These are reasonably explained by the following two factors resulting from the parallel molecular orientation at the interface. (1) The effect of weak HC – FC interaction is not so effective compared to normal orientation because of less contact of HC and FC chains in the parallel orientation than in the normal one. (2) C16diol and FC10diol molecules can be arranged for hydroxyl groups to effectively form hydrogen bonding between adjacent molecules along and across the molecular axis of diols.

業績リスト

１．原著論文

1) Imai Y., Shimamoto K., **Takiue T.**, Matsubara H., and Aratono M., “Study on surface adsorption from cationic surfactant – electrolyte mixed aqueous solution including $BF4^-$ ion” *Colloid & Polymer Science,* Vol.288, No.9, 1005-1011 (**2010**).

2) Murakami D., Fukuda T., Matsubara H., Aratono M., and **Takiue T.**, “Molecular Orientation and Miscibility of Fluorinated-α,ω-diol and Alcohol at the Hexane/Water Interface” *Colloids & Surfaces A*, Vol.354, No.1-3, 205-209 (**2010**).

3) **Takiue T.**, Nakamura F., Sakamoto H., Matsubara H., and Aratono M., “Miscibility and Multilayer Formation of Fluoeoalkane-α,ω-diol Mixture at the Air/Water Interface” *J. Phys. Chem. B*, Vol.115, No.3, 471-477 (**2011**).

２．著書・総説

1) 瀧上隆智，荒殿　誠，CSJ カレントビュー第４号，「界面の分子科学－界面デザインと界面計測」，８章　界面のＸ線回折・反射スペクトル，化学同人

３．会議発表

1) 鳥取拓也，辰田和穂，松原弘樹，荒殿　誠，瀧上隆智
1-イコサノール－1H-ペルフルオロデカン混合系のヘキサン／水界面吸着膜に関する研究
第 47 回化学関連支部合同九州大会，北九州，（**2010**）．[国内学会　ポスター]

2) 廣木鉄郎，中村文弥，島崎真由子，松原弘樹，荒殿　誠，瀧上隆智
ハイドロカーボンジオールとフルオロカーボンジオールのヘキサン／水界面吸着膜における混和性
第 47 回化学関連支部合同九州大会，北九州，（**2010**）．[国内学会　ポスター]

3) Takiue T., Fukuda T., Matsubara H., Aratono M.: Pressure Effect on Molecular Orientation and Multilayer Formation of Perfluorodecane-α,ω-diol at the Hexane/Water Interface, 21th International Conference on Chemical Thermodynamics, August 1-6, Tsukuba, Japan (**2010**). [国際学会　口頭]

4) 瀧上隆智：流体／水界面におけるプルフルオロアルカン-α,ω-ジオールの分子配向と多重膜形成
ワークショップ「ソフト界面と水」，福岡，(**2010**)．[国内セミナー　依頼講演]

5) Takiue T., Nakamura F., Matsubara H., Aratono M.: International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface Science, September 19-22, Chiba, Japan (**2010**). [国際学会　口頭]

6) 瀧上隆智：油／水界面における自発的多重膜形成，第 51 回高圧討論会，シンポジウム「高圧生物科学：ミクロからマクロへ」，10 月 20－22 日，仙台，(**2010**)．[国内学会　依頼講演]

7) 瀧上隆智：シンクロトロンＸ線反射率測定によるソフト界面膜の構造解析，2010 年日本化学会・西日本大会，11 月 6－7 日，熊本，(**2010**)．[国内学会　依頼講演]

４．その他

1) The 3rd International Kyushu Colloid Colloquium (Post symposium of NCSS-2010), Fukuoka, September 23-24 (**2010**), organizing committee.

2) SPring-8　利用者懇談会，「ソフト界面科学研究会」，副代表

研究課題名 ソフト界面における動的構造解析法の確立と界面拡散現象解明への展開

研究代表者：九州大学・田中敬二

１．緒言

高分子薄膜は、固体型燃料電池や分離膜、バイオチップ基材など多様な分野において幅広く利用されている。その多くの場合において、高分子薄膜は、非溶媒と界面を形成した状態で使用されることから、非溶媒と接触した高分子鎖の凝集状態および熱運動特性の理解は、材料の高機能化を図る上で極めて重要である。しかしながら、これらを in-situ で評価する手法が限定されているため、現状ではほとんど検討されておらず理解も進んでいない。研究代表者は、前年度までに、中性子反射率(NR)測定に基づき、非溶媒中におけるポリメタクリル酸メチル(PMMA)薄膜の凝集構造について検討してきた。その結果、界面近傍の PMMA 鎖はメタノールや水などの非溶媒中においてさえも、膨潤・溶解することを明らかにしている。NR 測定は薄膜の深さ方向における組成分布を精密に評価することができるが、現状では、測定に数時間から数十時間を必要とする。一方、可視光を用いた表面プラズモン共鳴(SPR)および光導波路(GWM)反射率測定の場合、精度は NR に劣るが、測定に要する時間は数秒程度であるため、膜の凝集構造変化を in-situ で追跡することが可能である。本年度は、SPR および GWM 測定に基づき、メタノール中における PMMA 膜の厚化挙動を追跡することで、非溶媒中における高分子膜の膨潤挙動を明らかにすることを目的とした。

２．研究経過

試料として数平均分子量 300k、分子量分布 1.05 の単分散 PMMA を用いた。PMMA 薄膜はトルエン溶液から Ag を蒸着したガラス(BK7)基板上にスピンコートすることで調製した。調製した膜は室温で 24 時間真空乾燥した。メタノール中における PMMA 薄膜の構造については SPR、GWM、および光学反射測定に基づき評価した。光源には波長 633 nm の He-Ne レーザーを用いた。調製した膜上には液体導入用のセルをマウントした。メタノールを PMMA 膜と接触させた瞬間を接触時間(t) = 0 s と定義し、各測定時間における反射率曲線から、その時間における膜厚および内部構造について評価した。膜の厚さおよび内部構造は実験で得られた反射率曲線と、transfer-matrix 法に基づく計算結果とを比較することで評価した。

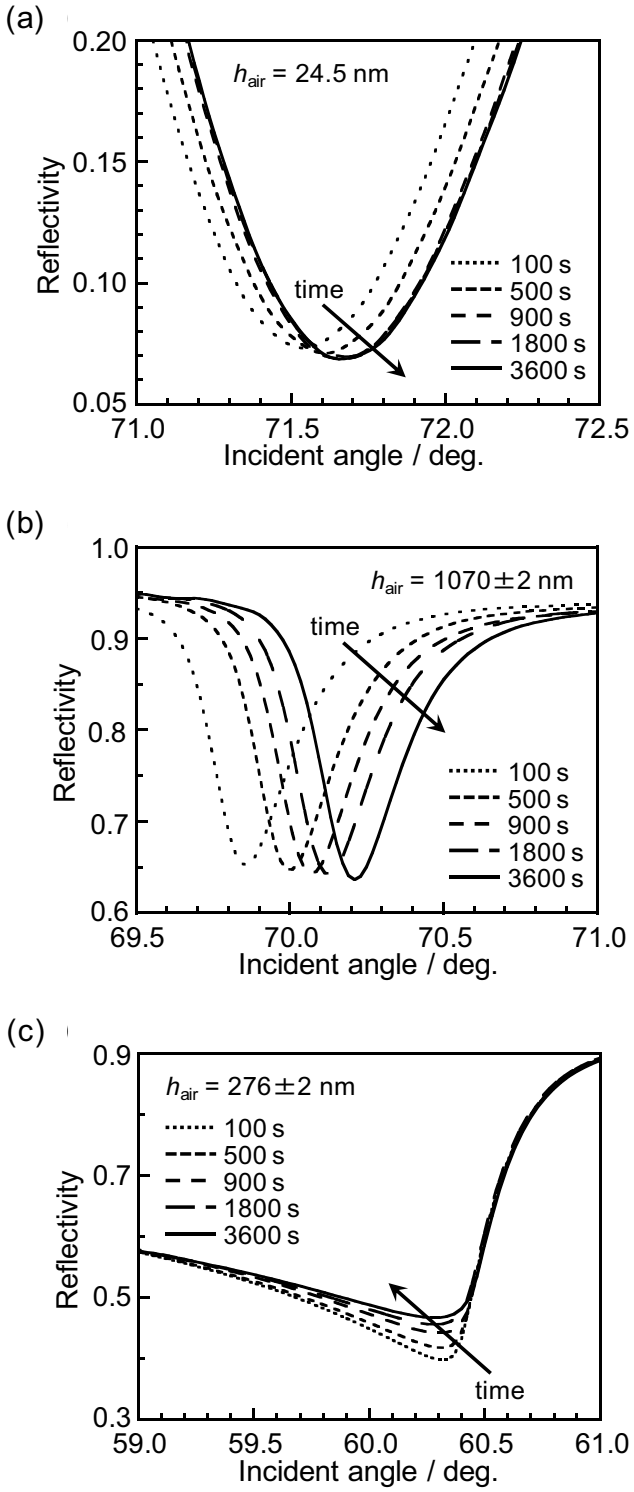


Figure 1 Typical reflectivity curves for PMMA films contacting methanol; (a) 24.5 nm-thick film with SPR excitation, (b) 1070 nm-thick film with GWM excitation, and (c) 276 nm-thick film.

Figure 1 は所定時間メタノールと接触させた PMMA 膜の反射率曲線である。空気中における初期膜厚(h_{air})は、それぞれ 24.5 nm、1070 nm、および 276 nm である。初期膜厚から(a)は SPR 領域、(b)は GWM 領域の反射率曲線である。(a)および(b)いずれのモードにおいても、接触時間の増加とともに共鳴角は高角度側にシフトし、また、共鳴角における反射率は減少した。反射率曲線において、共鳴角の高角度側へのシフトは膜厚および膜屈折率の増加に、反射率の減少は膜厚および膜屈折率の減少に対応している。この結果は、NR 測定により得られた、メタノールの接触により膜厚が増加し、膜密度は低下するという従来の結果と一致した。一方、(c)の初期膜厚は、SPR および GWM 領域のいずれにも入らない光干渉領域である。SPR および GWM 領域における観測結果とは反対に、メタノール接触時間の増加とともに共鳴角は低角度側にシフトし、また、共鳴角における反射率は増加した。しかしながら、反射率曲線のフィッティングにより算出した膜厚は、メタノール接触時間とともに増加しており、この領域においてもメタノールの拡散による PMMA 膜の厚膜化が in-situ 追跡できることが分かった。

Figure 2 はメタノール接触後の PMMA 膜厚の経時変化である。縦軸は時間 t における膜厚を、空気中における h_{air} で規格化した膨潤率を示している。また、図を見やすくするため、h_{air} = 59.3 および 498 nm のデータは縦軸方向に、それぞれ、0.5 および 1.0 ずらしている。いずれの膜も時間経過とともに膨潤、厚化した。膨潤率が一定に到達するまでの時間(t_{eq})は h_{air} とともに長くなり、h_{air} = 24.5、59.3 および 498 nm において、それぞれ、約 1×10^3、4×10^3 および 5×10^3 s であった。h_{air} = 24.5 および 59.3 nm の t_{eq} を比較すると、その値は 4 倍程度増加した。

一方、h_{air} = 498 nm の膜は h_{air} = 59.3 nm の膜より 8 倍程度厚いにもかかわらず、t_{eq} は 1.25 倍しか増加していない。すなわち、PMMA 中におけるメタノールの拡散は膜厚に依存することがわかる。

PMMA 中におけるメタノールの拡散挙動は、Fick 則ではなく Case II モデルで記述できることが知られている。このモデルでは、非溶媒で膨潤した領域とガラス相の境界に拡散フロントと呼ばれる層が形成され、一定の速度でガラス相側へ移動する。Case II 拡散におけるメタノールの拡散係数(D)は、拡散フロントの進行速度(V)、メタノールの体積分率($\phi(z)$)、膨潤層が形成される瞬間におけるメタノールの体積分率(ϕ_c)を用いて次式で与えられる。

$$\phi(z) = \phi_c \exp\left(-\frac{Vz}{D}\right)$$

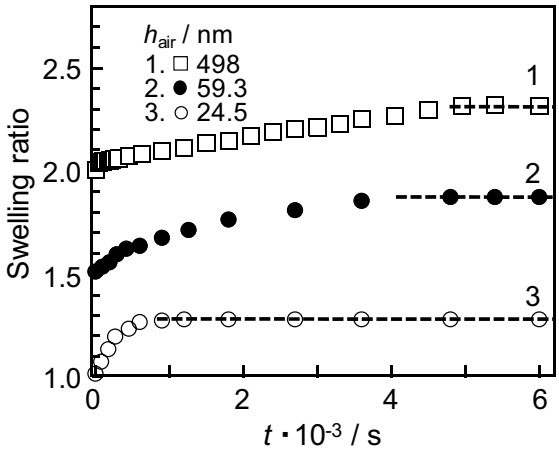


Figure 2 Time dependence of swelling ratio as a function of original thickness for PMMA films in methanol. Broken lines denote equilibrium swelling ratios.

Figure 3 はメタノールの拡散係数と膜厚の関係である。全ての膜厚において 2 成分の V が観測された。D_{fast} および D_{slow} はそれぞれ非溶媒界面および膜内部における拡散係数に対応していると考えられる。厚膜領域において得られた D_{slow} は、文献値(D_{bulk} = 2.0×10^{-12} $cm^2\cdot s^{-1}$)と同程度であったが、初期膜厚が 240 nm 以下の領域では、D_{bulk} より小さかった。D_{fast} においても、厚膜領域では D_{bulk} より大きかったが、初期膜厚が 150 nm 以下の領域で減少し始め、初期膜厚が 70 nm 以下の薄膜領域では、D_{bulk} より著しく小さかった。この結果は、メタノール界面における PMMA 分子鎖の運動性が基板界面からの拘束を受けていると考えることで説明でき、特に薄膜領域では、非溶媒界面近傍まで拘束の影響があることが明らかになった。

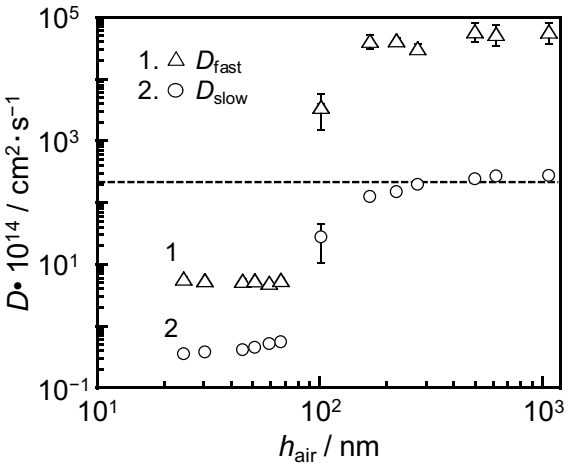


Figure 3 Fast and slow diffusion coefficients of methanol in PMMA films as a function of the original film thickness. The broken line corresponds to the reported bulk value of the methanol diffusion coefficient in PMMA.

Analysis of Dynamic Structure in Soft Interfaces Based on Optical Reflectivity and Its Application to Interfacial Diffusion Phenomena

Keiji Tanaka
Kyushu University

744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan
Tel +81-92-802-2878, Fax +81-92-802-2880, E-mail k-tanaka@cstf.kyushu-u.ac.jp

To study the thickness dependence of methanol diffusion into poly(methyl methacrylate) (PMMA) films, an experimental method based on optical reflectivity was proposed. The method can cover a thickness range from the micrometer down to the nanometer scale using a single set-up. Methanol molecules diffuse into PMMA following a mechanism in which they induce segmental motion of the matrix polymer, so-called Case II diffusion. We observed two diffusion modes, fast and slow, assignable respectively to the outermost layer and the remaining internal region including the substrate interface.

Figure 1 shows the original thickness (h_{air}) dependence of fast and slow diffusion coefficients (D_{fast} and D_{slow}) for methanol into PMMA films. In the case of films thicker than approximately 300 nm, D_{slow} was in good accord with a reported value, shown by a dotted line in Figure 1. When the film thickness went beyond a value, D_{fast} and D_{slow} decreased with decreasing thickness. This is because the methanol penetration into a deeper region near the substrate slows down owing to the depressed segmental mobility. The interfacial effects of the both methanol and substrate sides manifest for thin films because of their large interfacial areas to total volume ratio. They act in the opposite direction. That is, they starts to conflict with each other for thinner films, leading to the depression of the segmental mobility in the outermost region with the methanol phase. The invariance of D_{fast} and D_{slow} in thinner films can be explained in terms of the conflict between the effects of the methanol and substrate interfaces. Figure 2 shows the h_{air} dependence of the thickness, in which mobility is enhanced at the methanol interface, (h^{σ}). Interestingly, the h^{σ} value also decreased with decreasing h_{air}. This can be also interpreted by the effect of substrate interface.

The segmental motion of PMMA on silicon oxide is more depressed than that on a gold substrate due to the attractive interaction between segments and hydrophilic groups. In the case of the 29.0 nm-thick film on the gold substrate, the D_{slow} value was $(7.8\pm0.6)\times10^{-15}$ cm^2·s^{-1}. However, it was $(1.2\pm0.2)\times10^{-15}$ cm^2·s^{-1} for the 25.4 nm-thick film on the silicon oxide layer. These results make it clear that the thickness dependence of diffusion behavior of methanol into thin PMMA films can be explained in terms of the chain mobility both in the surface and interfacial regions.

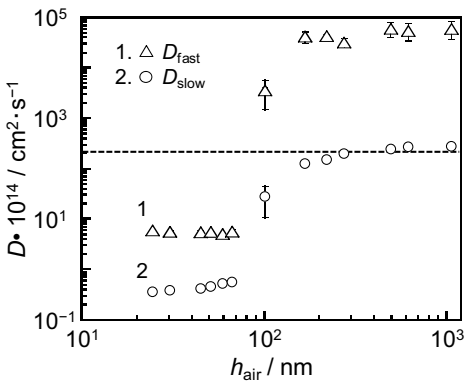


Figure 1. Fast and slow diffusion coefficients of methanol in PMMA films as a function of the original film thickness. The broken line corresponds to the reported bulk value of the methanol diffusion coefficient in PMMA.

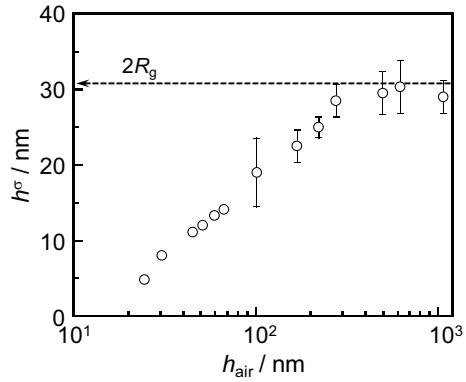


Figure 2. Relation of mobility-enhanced interfacial thickness to original thickness.

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) Yoshihisa Fujii, Toshihiko Nagamura, and Keiji Tanaka, Relaxation Behavior of Poly(Methyl Methacrylate) at a Water Interface, *J. Phys. Chem. B.*, 114(10), 3457-3460, 2010

2) Hironori Atarashi, Hiroshi Morita, Dai Yamazaki, Masahiro Hino, Toshihiko Nagamura, and Keiji Tanaka, Swelling Structure of Thin Poly(methyl methacrylate) Films in Various Alkyl Length Alcohols, *J. Phys. Chem. Lett.*, 1(5), 881-885, 2010

２．著書・総説

該当なし

３．会議発表

1) 田中敬二, 液体界面における高分子セグメントの凝集状態とダイナミクス,熊本大学拠点形成研究「ソフト溶液プロセスをベースとした階層的ナノ組織集積材料の創成」研究会, 2011 年 1 月 12 日, 熊本大学黒髪キャンパス, 熊本, 招待講演

2) Keiji Tanaka, Physical Sorption of Non-solvents in Thin Polymer Films, The 5th Asia-Oceania Forum on Synchrotron Radiation Research, 2010 年 7 月 7 日, Postech, Pohang, Korea, Invited

3) Keiji Tanaka, Swelling of Thin Polymer Films in Non-solvents, International Symposium on Polymer Physics PP'2010, 2010 年 6 月 8 日, Shandong Hotel, Ji'nan, China, Invited

4) Keiji Tanaka, Physical Adsorption of Various Alkyl Length Alcohols in Thin Poly(methyl methacrylate) Films, 2010 Japan-Taiwan Bilateral Polymer Symposium, 2010 年 7 月 2 日, 北海道大学, 札幌市, Invited

5) 田中敬二, 水界面における高分子の凝集構造とダイナミクス,
第 47 回化学関連支部合同九州大会, 2010 年 7 月 10 日, 北九州国際会議場, 北九州市, 依頼講演

6) 田中敬二, 固体基板界面における高分子のガラス転移,
東京大学物性研究所短期研究会‐ガラス物理の諸問題‐実験と理論の接点‐, 2010 年 11 月 29 日, 東京大学物性研究所, 千葉県柏市, 依頼講演

7) 田中敬二, 高分子材料ナノ接合,
第 20 回東海ミニシンポジウム　接着・接合の界面をさぐる, 2010 年 9 月 6 日, ㈱豊田中央研究所, 愛知郡長久手町, 招待講演

Keiji Tanaka, Study on Structure and Dynamics of Polymers at Various Interfaces by Neutrons,
IMSS Symposium '10, 2010 年 12 月 8 日, つくば国際会議場, つくば市, 招待講演

田中敬二, 中性子反射率測定に基づく非溶媒中の高分子薄膜の構造評価,
日本中性子科学会 第 10 回年会, 東北大学 さくらホール, 仙台市, 招待講演

４．その他　（例えば特許など）

発明の名称：「分析方法及び分析装置」
出願番号：特願 2011-096854
出願人：国立大学法人　九州大学
発明者：田中敬二, 堀耕一郎, 久原　哲, 長村利彦

ＮＭＲによるソフト界面間隙の液相分子クラスターの分子構造とダイナミクス解析

研究代表者：東工大原子炉研・塚原剛彦

１．緒言

生体の機能発現には生体膜周囲の数百程の水分子が深く関与すると考えられ、10 ～ 100 nm スケールの生体膜間に存在する水分子クラスター挙動を解明することが重要な課題となっている。我々はこれまで、石英基板上に 10 ～ 100nm スケール空間を作製する手法を確立し、核磁気共鳴（NMR）測定から、この内部の水物性研究を進めてきた。その結果、10 ～ 100nm スケール空間の水は通常のバルク水よりも「低い運動性」,「高いプロトン移動度」といったユニークな特性を発現し、バルク水とも壁面吸着水とも異なるプロトン移動相（壁面から高次に配向した 50 nm 程度の水素結合ネットワーク構造）を形成することを見出してきた。しかし、生体膜間を模倣した 100 nm スケールの実験空間が存在せず、膜界面で発現した機能が、協同的な水素結合ネットワークを介して細胞系全体へどのように伝達するのかについては迫れなかった。一方、100 nm スケール空間の作製手法として、超臨界二酸化炭素($ScCO_2$)を用いた逆ミセル法がある。$ScCO_2$は無極性で、常温・常圧に近い温和な臨界条件を持ち、僅かな温度、圧力の変化で物質の溶解性が劇的に変わる媒体である。そのため、$ScCO_2$中に水およびリン脂質を混ぜれば、脂質膜によって取り囲まれた水滴が$ScCO_2$中に分散する、いわゆる水/脂質/CO_2エマルジョンを形成できると考えられる。そこで本研究では、$ScCO_2$を用いて生体膜間を模倣した 100 nm スケール空間を構築する技術を確立すると共に、内部の水分子構造とダイナミクスを、高圧 NMR 法を駆使して解明することを目的とした。ここでは、水/界面活性剤/CO_2エマルジョン作製手法の確立と NMR による評価について報告する。

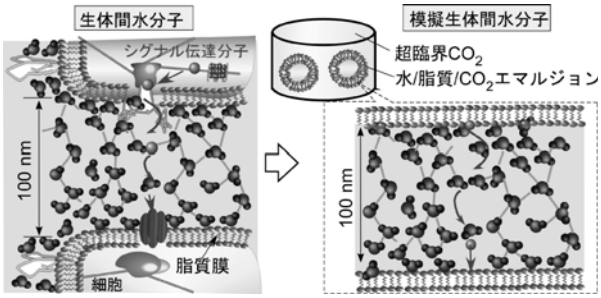


図 1 本研究の概念図

２．研究経過

２－１．Water-in-$ScCO_2$エマルジョン作製と評価

ハステロイ製の高圧分光セル内に、10mM の AOT 界面活性剤(10mM)-ヘキサン溶液と銅イオン水溶液($Cu(NO_3)_2$, $CuSO_4$, $Cu(OAc)_2$等)を導入し、W 値（W = [水]/[AOT]の比率）を調整した後、セル内が既定の圧力になるまで、シリンジポンプにてCO_2ガスを導入した。全体のシステムは図 2 に示す。圧力 8-20MPa、温度 40℃の超臨界条件下にて撹拌しながら、サファイア製の観察窓から内部の様子を観察した。撹拌時間は 60 分とした。その結果、圧力 8.0MPa では、W 値やヘキサンとCO_2の体積比を変化させても液滴の飛散や白濁しか起こらず、透明な溶液、すなわち均一なエマルジョン生成が起こらないことが分かった。一方 W 値を 10、圧力を 10MPa 以上にすると、所定の条件に設定した直後から液滴の飛散や白濁が起こり始め、完全に透明な溶液に変化した。この時のヘキサンと CO_2 の体積比は 10%が最適であった。この溶液の UV スペクトルを超臨界計測用の UV 装置によりその場計測したところ、図 3(a)に示すような UV スペクトルが得られた。図にはその時の観察窓の様子も示してある。これらの UV スペクトルは通常の銅イオン水溶液と同様であったことから、銅イオンを内包した均一なWater-in-$ScCO_2$エマルジョンが作製できて

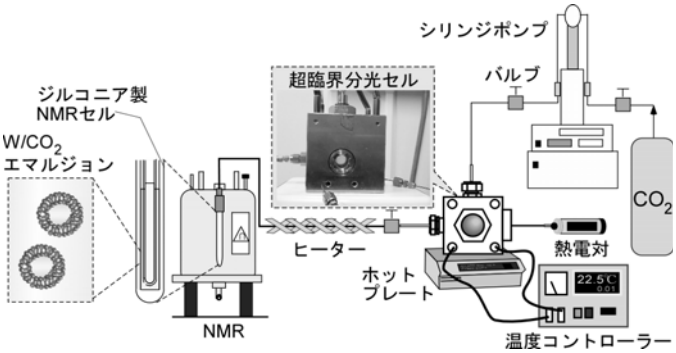


図 2 超臨界システム概念図

いることが確認できた。粒度分布測定により、作製したエマルジョンの平均粒径が 67.1nm 程であることを確認した。本法では、水/CO_2 の量比を変えることで、エマルジョン粒径を 100 ～1500 nm まで変えることも可能である。反面、作製したエマルジョンに僅かでも不均一性がある場合、図 3(b)に示す UV スペクトルにように、明確なピークが見られなくなった。UV スペクトルはエマルジョンの評価法として有用であることが明らかとなった。

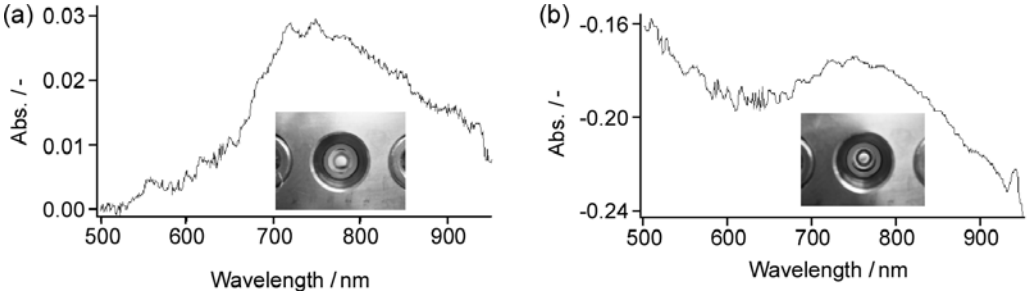


図 3　$CuSO_4$ 内包型 Water-in-$ScCO_2$ エマルジョンの観察像と UV スペクトル

２－２．Water-in-$ScCO_2$ エマルジョンの NMR 解析

上記手法を用い、ハステロイ製の高圧セル内にて Water-in-$ScCO_2$ エマルジョンを形成させた後、バルブを切り替えて、ジルコニア製の高圧 NMR セル内に送液した。NMR セルは超臨界用の NMR システム内に固定されており、送液した試料のその場計測が可能である（図 2)。Water-in-$ScCO_2$ エマルジョン中における水の分子構造を調べるため、^{1}H-NMR ケミカルシフト測定を行った。その結果、複数の水ピークが観測され、密度に依存してピーク位置や強度は変化することが分かった。例えば、圧力 20MPa、温度 40℃の $ScCO_2$ の条件下においた 0.1wt%以下の水は、均一な Water-in-$ScCO_2$ エマルジョンを形成し、このエマルジョン内の水分子ピークは、1.5 ppm, 2.6 ppm, 3.8 ppm 付近に 3 本現れた。4 配位構造を取る液体の水は 4.6ppm 付近に 1 本の鋭いピークとして現れ、水素結合の形成や切断に伴って低磁場あるいは高磁場側へシフトするが、得られたピークはそれぞれ、水素結合が切断されて単一分子化した水(～ 1.4 ppm)，水素結合が僅かに切断された 2 配位程度の水(～ 2.6 pppm)，液体の水より僅かに結合が切断された水に帰属できた。通常の水は水分子交換が速く、ある瞬間 2 つの構造状態を取っても、その中間付近に 1 本のピークとして現れるはずである。しかしエマルジョン内における明確な複数本のピークは、水分子交換が極めて遅く、水素結合の弱い水と強い水が共存していることを示唆している。さらに、様々な粒径の Water-in-$ScCO_2$ エマルジョン中における水のスピン-格子緩和速度($1/T_1$)を測定し、バルク水やナノ空間水の分子運動状態を比較した。その結果、40℃におけるバルク水の $1/T_1$ 値が 0.22 s^{-1} であるのに対し、67.1nm サイズの Water-in-$ScCO_2$ エマルジョン中の水の $1/T_1$ 値は 0.13 s^{-1} となり、エマルジョンサイズの増大に伴って $1/T_1$ はさらに減少し、いずれもバルク水よりも小さい値となった（図 4)。これらの事実は、エマルジョン内の水分子の運動状態がバルク水よりも高い状態にあることを意味しており、通常の水とは全く異なるユニークな状態であることが明らかとなった。

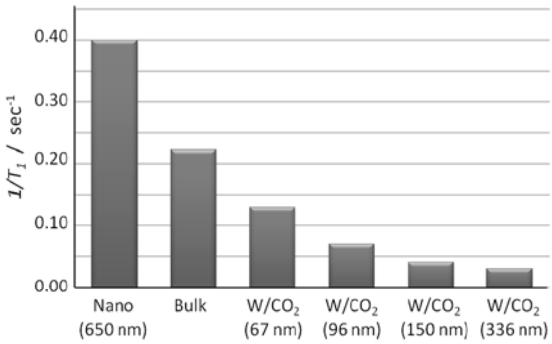


図４　$1/T_1$ 値のサイズ依存性(温度 40℃)

NMR Study on Structures and dynamics of Liquid-Phase Molecular Clusters in Soft interfaces

Takehiko Tsukahara

Research Laboratory for Nuclear Reactors, Tokyo Institute of Technology

2-12-1-N1-32 O-Okayama, Meuro, Tokyo 152-8550, JAPAN
Tel. Fax; +81-3-5734-3067, E-mail; ptsuka@nr.titech.ac.jp

Investigation of water molecules inside biological membranes has become of importance, because changes of water behavior make it possible to affect basic functions and stabilities of living organisms. The nanofluidic space (10 - 100 nm scale spaces), which is comparable to the gap between biological membranes, is adequate to elucidate properties of liquid-phase molecular clusters with a size range from 10 to 100 nm. Recently, we investigated properties of liquids in nanofluidic spaces fabricated on a quartz substrate, and found that hydrogen-bonded liquids such as water and alcohol molecules confined in them appeared unique properties such as higher viscosity, slower motion, and faster proton mobility compared with bulk water. The results suggested that the size-confinement phenomena were induced by electrostatic effects of surface charges, and an intermediate phase, consisting of highly-ordered liquid clusters within about 50 nm from the surfaces, was formed in the nanofluidic spaces. However, the surface modification on the fabricated nanofludiic spaces due to lipid bilayer is quite difficult, and the research tools for studying liquid-phase molecular clusters between biological membranes were not well-established. In order to construct a biomimetic 10 - 100 nm scale space, we have focused on reverse-micelle method using supercritical carbon dioxide ($ScCO_2$). $ScCO_2$ with critical temperature (T_c = 32 ℃) and critical pressure (P_c = 7.2MPa) has numerous desirable features such as nontoxic, inexpensiveness, non-reactivity, and controllability of solvent properties with a slight variation of density. In this study, we aim to employ high-pressure NMR spectroscopic results to clarify molecular structural and dynamical properties of water confined in Water-in-$ScCO_2$ emulsions.

CO_2 gases and two kinds of solutions such as AOT surfactant-hexane solution and aqueous solution containing copper (II) ions were introduced into a high-pressure cell until Sc conditions, and the solutions were stirred under $ScCO_2$ for 60 min. When the pressures and temperatures were arrived at 10 MPa and 40 ℃, respectively, the solutions in $ScCO_2$ changed from cloud/dark to clear color. UV spectrum of the $ScCO_2$ solution was found to be consistent with that of the normal copper (II) solution. The results showed that copper (II) ions encapsulated in the Water-in-$ScCO_2$ microemulsions could be uniformity formed. Moreover, the Water-in-$ScCO_2$ emulsions were introduced into a high-pressure NMR cell, and ^{1}H-NMR spectra of the emulsions were measured by NMR spectrometer. We found that there were three peaks in Water-in-CO_2 emulsions, and their peaks were determined as about 1.5, 2.6, and 3.8 ppm. The results indicated that water molecules enclosed with AOT surfactant in $ScCO_2$ have non-hydrogen bonded or two-coordinated hydrogen bonded differing from bulk water. Moreover, we examined spin-lattice relaxation rates ($1/T_1$) of Water-in-$ScCO_2$ emulsions. We found that the $1/T_1$ value of bulk water was 0.22 s^{-1} at 40 ℃, while that of Water-in-$ScCO_2$ microemulsions with 67.1 nm sizes was 0.13 s^{-1}. The $1/T_1$ values decreased with increasing emulsion sizes. These facts suggest that the molecular motions of water in emulsions are quite different from bulk water.

業績リスト

１．原著論文

1) Nanofluidic-Based Separation System of Radionuclide Ions by Controlling Electrostatic Forces, T. Tsukahara, *Bull. Res. Nucl. React.*, 34, 51 (2010).

2) Streaming potential/current measurement systems for investigating liquid properties confined in extended-nano space, k. Morikawa, K. Mawatari, M. Kato, T.Tsukahara, and T. Kitamori, *Lab on a Chip*, 10, 871 - 875 (2010).

２．著書・総説

1) Extended-nano Fluidic Systems for Analytical and Chemical Technologies, K. Mawatari, T. Tsukahara, Y. Sugii, and T. Kitamori, Nanoscale, 2, 1588-1595 (2010).

2) Integrated Extended-nano Chemical Systems on a Chip, T. Tsukahara, K. Mawatari, and T. Kitamori, Chem. Soc. Rev., 39, 1000-1013 (2010).

３．会議発表

1) H. Emon, K. Mawatari, T. Tsukahara, T. Kitamori, Investigation of Vesicle Injection into Extended-nano Space for Lipid Bilayer Modification, Inernational Symposium on Microchemistry and Microsystems 2010 (ISMM 2010), Hong Kong, China, 2010/5/28-30.

2) 衛門久樹・馬渡和真・塚原剛彦・北森武彦，液物性解析のための拡張ナノ空間内リン脂質二重膜修飾，第21回化学とマイクロ･ナノシステム研究会，東京大学，2010/6/10-11.

3) 拡張ナノ空間における擬似細胞間構造構築に関する研究，衛門久樹・馬渡和真・塚原剛彦・北森武彦，東京コンファレンス2010，幕張メッセ，2010/9/1-3.

4) 拡張ナノ空間における擬似細胞間構造創成と溶液物性解析，衛門久樹・馬渡和真・塚原剛彦・北森武彦，第22回化学とマイクロ･ナノシステム研究会，名古屋大学，2010/11/17-18.

5) 宮本尚美・塚原剛彦・C. Wai・池田泰久，Cu(II)錯体を内包した水/超臨界二酸化炭素マイクロエマルションの合成と特性評価，　日本化学会 第91年会,神奈川大学，2011/3/26-29.

6) 拡張ナノ空間内擬似細胞間構造創成と水分子運動解析，衛門久樹･馬渡和真･塚原剛彦･北森武彦，日本化学会 第91年会,神奈川大学，2011/3/26-29.

7) 宮本尚美・塚原剛彦・加知良浩・原田雅幸・池田泰久，超臨界二酸化炭素‐ウラニル錯体間相互作用に及ぼすルイス酸性ホウ素化合物の添加効果，日本原子力学会 2011 年春の年会，福井大学，2011/3/28-30.

４．その他　（例えば特許など）

小腸壁における脂質吸収プロセスのモデリング

研究代表者：山形大院理工・野々村美宗

連携研究者：北大電子研・眞山博幸

１．緒言

食物中の脂質は、胆汁酸ミセルに取り込まれ、小腸壁表面の細胞膜と融合・吸収されることは古くから知られている。しかし、脂質を可溶化した胆汁酸ミセル水溶液が小腸壁表面を濡れ広がり、膜融合する過程は、栄養吸収の核心部分であるにもかかわらず、ほとんど明らかにされていない。本研究では、小腸壁で起こる界面現象と脂質吸収プロセスを物理的な観点から理解するために、小腸表面の構造を模倣したモデル小腸壁を構築、その表面を水が濡れ広がるプロセスを高速撮影技術により評価する方法を開発した [1]。また、小腸壁には微絨毛、絨毛、ひだの三つの階層からなる階層構造が存在していることから、表面の凸凹が濡れに及ぼす影響を定量的に理解することが必要である。そこで、凸凹な表面と液滴が接触した時のエネルギー変化を簡単な物理モデルに基づいて見積もった [2]。さらに、油剤や固体粒子の添加が濡れダイナミクスに及ぼす影響を評価し、濡れ速度を制御するコントロール剤の探索に着手した [3,4]。以下にその概要を記す。

２．研究経過

(1) 小腸壁モデルを用いた濡れダイナミクス評価法　[1]

モデル小腸壁はアルキルケテンダイマー(AKD)と呼ばれるワックスの結晶膜の幾何構造を転写して調製した。アルキルケテンダイマーを融液から結晶化させると、大きな凸凹の中に小さな凸凹が存在する階層性のフラクタル構造が自発的に生成する。われわれはこの構造を転写した石膏を鋳型として、4%の寒天を含むゲルを調製した。このゲルを電子顕微鏡で観察し、大きな凸凹の中にさらに小さな凸凹が存在し、表面の形態に階層性が存在することが確認された。断面の形態をボックスカウント法により解析し、フラクタル次元 D は 2.2 であることが確認された。フラクタル次元とは表面の凸凹の度合いを測る尺度で、この値が大きいほどより複雑な表面構造である。アルキルケテンダイマー表面の D は 2.3 であることから、この結晶の表面の形態はほぼ完全に寒天ゲル上に転写されていることが確認された。

次に、平らな寒天ゲルとモデル小腸壁上に水を滴下、接触角の経時変化を測定した (図 1)。平らな寒天ゲル上における水の接触角の減少パターンは両対数プロットで線形であり、べき乗則に従った。プロットの傾きから、接触角 θ が接触時間 t の-0.30 乗に比例する、いわゆる Tanner の法則に一致することが確認された [4]。一方、フラクタル寒天ゲル上では θ は t の-0.39 乗に比例して減少したことから、ゲル表面の凸凹は水の濡れ広がる速度を増大させることが明らかになった。また、モデル小腸壁上では、液滴の周辺部に液体の薄膜が観察された（図１写真)。この薄膜の領域は Wicking　region と呼ばれており、液滴の本体に先行して素早く固体表面上を濡れ広がっていく。平らな寒天ゲル上ではこの薄膜を確認することができなかったことから、モデル小腸壁上の凹部を毛細管力によって液体が吸引されて薄膜が生成したものと考えられる。

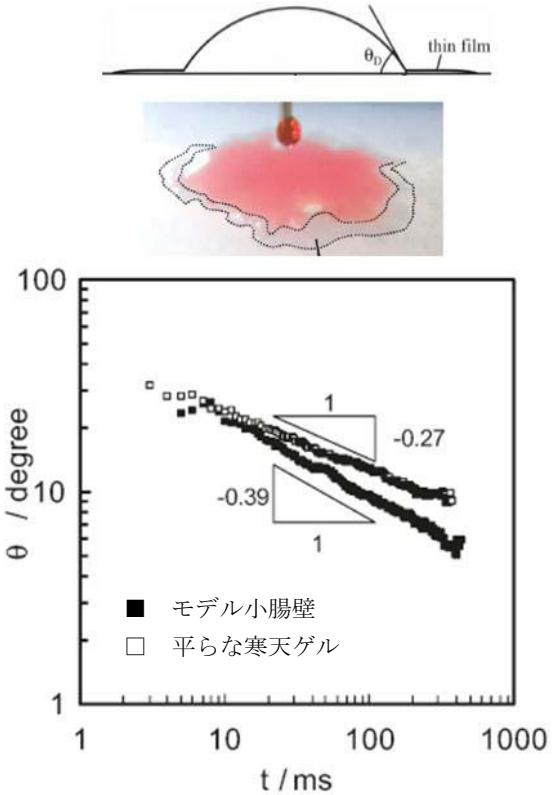


図 1　モデル小腸壁上に水を滴下した時の液滴の様子と接触角の経時変化.

(2)　凸凹表面における濡れ現象の物理モデル [2]

一般的に、濡れ現象の議論には、Young の式で示される平衡状態における接触角θ_Eが用いられる。

$$\cos\theta_E = r_r(\gamma_S - \gamma_{SL})/\gamma_L \tag{1}$$

ここでγ_S、γ_L、γ_{SL}はそれぞれ固体、液体、固液界面の表面張力である。われわれは濡れの現象を自由エネルギーの観点から次のように再考した。濡れの前後の自由エネルギー差ΔGは

$$\Delta G/4\pi r_0^2 = \Delta g = 4^{-1/3}\left\{r_r(\gamma_{SL}-\gamma_S)\sin^2\theta + 2\gamma_L(1-\cos\theta)\right\}(2-3\cos\theta+\cos^3\theta)^{-2/3} - \gamma_L \tag{2}$$

ここでr_0は濡れる前の液滴の半径、r_rは固体表面の表面ラフネス因子で、平滑な表面では 1、凹凸表面なら $r_r > 1$ である。(2)式はθ= 0～180º の範囲で 1 個の極小値を有する対称性を示し、熱力学的平衡条件$\partial(\Delta G)/\partial\theta = 0$ から(1)式が得られた。すなわち、Young の式で定義されるθ_Eは単に接触線での表面張力のバランスから得られるのではなく、自由エネルギー最小の条件そのものであることが確認された。

固体表面上の凸凹は液体の濡れ現象に劇的な影響を与える。なかでも最も重要な現象は固体表面に存在する鋭いエッジにより、液滴の濡れ広がりが食い止められる「ピン止め現象」である。本研究では、これまで定量化が難しかったピン止めの強さを定式化することに初めて成功した。１本の円柱（ピラー）断面上でのピン止めを考えると、ピン止めE_{pin}の強さは(3)式で示される。

$$E_{pin} = \Delta G_{pc}(\theta_E + \alpha) - \Delta G(\theta_E) \tag{3}$$

ここでΔG は(2)式で記述される接触角θ_Eでピン止めされているときの値であり、ΔG_{pc}はピン止めを外すために故意に液滴に変形（θが 接触角θ_E＋側面の傾斜角αに達するような変形）を与えたときの自由エネルギー差である。以下の(4)式で記述される（R：円柱の半径、A：ピン止めが外れる条件に関係する定数、r_4：変形の際に出現する曲率半径）。

$$\Delta G_{pc} = (\gamma_{SL}-\gamma_S)\pi R^2 + \gamma_L\left[\pi R^2 + 4\pi\left(r_4^2\sin\theta_E + \left(Rr_4 - Ar_4^2\right)\theta_E\right)\right] \tag{4}$$

固体表面凹凸でのピン止めが外れた後、どのようなエネルギー状態を経て液滴が濡れ広がるかを理解することも栄養吸収を考える上で重要な問題である。ピン止めが外れた後のピラー側面における濡れを考慮してピラーに濡れ広がる過程での自由エネルギー差の変化を初めて求めた。図２に示す。これによって、液滴の浸入の過程でもピン止め効果に類するエネルギー障壁が存在することを理論的に初めて見出した。

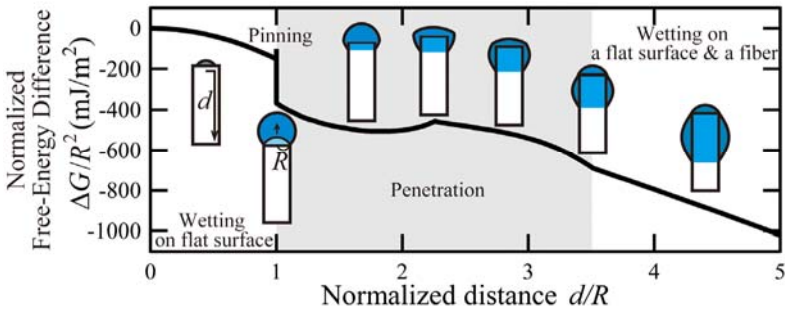


図 2　液滴が円柱状欠陥を濡れ広がる過程における自由エネルギー変化.

(3)　濡れダイナミクス制御技術の探索 [3]

水や油にさまざまな添加剤を加えた時の液滴の接触角の変化から濡れ速度を定量的に評価し、モデル小腸壁における濡れの速度を数十～数百倍速めたり遅くしたりする薬剤の探索に努めている。コロイド分散液や両親媒性分子を添加すると、水滴の周辺部にコロイド粒子が蓄積して局所的に増粘したり、硬い界面膜が生成したりして濡れ広がりが阻害されることが期待される。本研究において我々は、シリカナノ粒子を添加すると、水の濡れ広がる速度が劇的に遅くなることを見出した。また、アルコールの添加は液滴内でマランゴニー対流を引き起こし、濡れを促進することを示唆する結果も得ている。今後は、コロイドの親疎水性・粒径や両親媒性分子の構造の影響を系統的に検討する。

引用文献

1) Y. Nonomura, et al., ***Langmuir*** 26, 16150-16154 (2010). 2) H. Mayama and Y. Nonomura, ***Langmuir*** 27, 3550–3560 (2011). 3) 情野ら，日本化学会第 91 春季年会, 2011, 神奈川, 4F5-20.　4) L. H. Tanner, ***J. Phys. D*** 12, 1473–1484 (1979).

Modeling of lipid absorption process on the small intestine walls

Yoshimune Nonomura,[1] Hiroyuki Mayama[2]
[1]Graduate School of Engineering and Science, Yamagata University, [2]Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University

4-3-16 Jonan, Yonezawa, Yamagata, 992-8510, Japan
Tel: +81-238-26-3164, Fax: +81-238-26-3414, E-mail: nonoy@yz.yamagata-u.ac.jp

Lipid molecules are solubilized in bile acid micelles and absorbed thorough the walls of the small intestine. Researchers have predicted that the hierarchical rough surfaces consisting of circular folds, villuses, and microvilluses improve the efficiency of lipid absorption, and such surfaces are called "fractal surfaces." However, there are few reports on the mass transfer process, especially wetting or spreading phenomena at the walls of the small intestine, because of the difficulty of making direct observations.

1. Evaluation of spreading dynamics on small intestine models [1]

We successfully prepared agar gels with hierarchical rough surfaces by transferring fractal surface structures of alkylketene dimer (AKD). Boxcounting measurements confirmed the surface structures to be fractals. We suppose that they are suitable for a new biosurface model because their dimensions are roughly similar to known fractal dimensions of biosurfaces. A well-established law that describes the spreading of nonvolatile liquids on flat and clean surfaces is $\theta_D \propto t^{-0.3}$, which is called Tanner's law. The rough structure accelerated the spreading of water droplets. For the fractal and flat agar gel surfaces, the contact angle θ of water droplets was proportional to $t^{-0.39}$ and $t^{-0.27}$, respectively. The experimental results of the wetting phenomena of a rough surface were verified theoretically.

2. Wetting theory on rough surfaces [2]

Wetting on a cylindrical pillar defect is discussed in terms of the free-energy difference ΔG. Wetting is divided into wetting on a flat surface and a pinning effect at the apex of the defect. First, we confirmed that ΔG between before and after ideal wetting on a flat surface can be derived as a function of the contact angle θ in which the free-energy minimum is obtained as the equilibrium contact angle described by Young's law. Second, the pinning effect at the apex in the cross section of the pillar defect is discussed in ΔG, where the pinning effect is shown to originate from the energy barrier by an increase in the air-liquid interfacial area of a pinned droplet induced by deformation. Third, the whole process from wetting on the flat cross section of a pillar defect to penetration onto the pillar is argued with respect to ΔG, where an appearance of an energy barrier due to the unbalance between air-liquid and solid-liquid interfacial energies is predicted.

3. Control of wetting dynamics on small intestine models

To acquire a deep understanding of the spreading dynamics, it is crucial to not only observe the spreading but also to find an experimental strategy to control it. We found extremely changes on spreading velocity with the addition of some alcohols or colloidal dispersions. These changes were caused by some interfacial phenomena, i.e. Marangonii flow, pinning effect, and particle assembly.

References

1) Y. Nonomura, et al., ***Langmuir*** 26, 16150-16154 (2010). 2) H. Mayama and Y. Nonomura, ***Langmuir*** 27, 3550–3560 (2011).

業績リスト

１．原著論文

1) Yoshimune Nonomura, Yusuke Morita, Takako Hikima, Eri Seino, Shigeki Chida, Hiroyuki Mayama
Spreading behavior of water droplets on fractal agar gel surfaces
Langmuir 26, 16150-16154 (2010).

2) Hiroyuki Mayama, Yoshimune Nonomura
Theoretical consideration of wetting on a cylindrical pillar defect: pinning energy and penetrating phenomena
Langmuir 27, 3550–3560 (2011).

3) Yoshimune Nonomura, Shigeki Chida, Eri Seino, Hiroyuki Mayama
Anomalous spreading with Marangoni flow on agar gel surfaces
Submitted.

２．著書・総説

眞山博幸
細孔容積と比表面積測定によるフラクタルポーラスシリカの幾何学
C & I Communication 35, 7-10 (2010).

３．会議発表

国際会議

1) Hiroyuki Mayama, Yoshimune Nonomura
Thermodynamics and dynamics of wetting
International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface Science, 2010（Makuhari, Japan）　2PD15.

2) Hiroyuki Mayama, Yoshimune Nonomura
Wetting on a cylindrical defect
International Symposium on Engineering Neo-Biomimetics II, 2011 (Tsukuba, Japan) PP22.

3) Hiroyuki Mayama, Yoshimune Nonomura
Wetting dynamics on a fractal agar gel
International Symposium on Engineering Neo-Biomimetics II, 2011 (Tsukuba, Japan) PP23.

国内学会

1) フラクタル寒天ゲルにおける濡れのダイナミクス,眞山博幸, 情野恵莉, 千田茂希, 野々村美宗, 日本物理学会 2010 年秋季大会, 2010, 大阪, 24aTB-12
2) フラクタルの工学的応用への可能性, 眞山博幸, 日本数学会 2010 年秋季総合分科会, 2010, 名古屋, 招待講演.
3) 眞山博幸, 野々村美宗, 円柱状欠陥の濡れ, 日本物理学会第 66 回年次大会, 2011, 新潟, 27pGV-14.
4) 脂肪酸結晶によって被覆された撥水カプセルの開発、川村祐希、野々村美宗、日本化学会第 91 春季年会、2011、神奈川、4F5- 11.
5) 寒天ゲル表面における濡れダイナミクス, 情野恵莉, 眞山博幸, 野々村美宗, 日本化学会第 91 春季年会, 2011, 神奈川, 4F5-20.

界面の分子スケールでの局所電気二重層効果による酸化還元反応速度の理論解析

研究代表者：甲南大学理工学部機能分子化学科　山本雅博

１．緒言

Au(111)面上に形成した末端に解離基をもつチオール自己組織化単分子(SAM)膜においては，表面金原子と解離基の数の比が３：１であり，解離基がすべて解離すればその表面電荷は，0.74 C m^{-2}となり通常の電極の帯電よりも強く帯電する。強く帯電したSAM表面上には，電気二重層が形成され，溶液中の酸化還元反応速度が局所的な電気二重層効果で何桁も増加することを，酸化還元反応の電気化学測定と分子シミュレーションを用いた理論解析により我々は示してきた。これまでの実験および理論では，溶液中の電解質に過塩素酸ナトリウムのような特異吸着の影響が小さく1:1の価数をもつ支持電解質が用いられてきた。本研究では，1:1電解質を非対称な2:1，1:2支持電解質にした場合，電気二重層がどのように変化し酸化還元速度やキャパシタンスにどのような影響をあたえるのかを，実験的・理論的に検討した。

２．研究経過

非対称の電解質では，たとえば$MgCl_2$のような2:1電解質の場合，電極が正に帯電しても遮蔽する対イオンは１価のアニオンであるために通常の1:1電解質の遮蔽と状況はほぼおなじであると予想されるが，電極が負に帯電した場合，2価のカチオンが対イオンとなり電極の負電荷を遮蔽する。その際，2価のカチオンと電極上の負電荷の静電相互作用が強いためいわゆる遮蔽のovercompensationがおこり，電位が負ではなく２価カチオンがつくる正の電位に反転する電気二重層領域が生成する。このことは，古典的なGouy-Chapman理論からは得られず[1]，モンテカルロ法を用いた分子シミュレーションや液体の統計力学を用いた理論から得られている結果である[2-4]。　我々は，酸化還元電位が負の電位にある溶液中の酸化還元種の反応速度定数を，種々の電極表面上および2:1,3:1等の非対称な支持電解質中で測定することにより，このovercompensationが原因となっているのではないかという現象を見いだした。より強く帯電している末端に解離基をもつチオール自己組織化単分子膜上でMCシミュレーションによりovercompensationがおこるのかどうかを検証した。

理論的には，(I) Grahameによって提唱された非対称電解質による電気二重層の解析解[1]およびその数値解[(II)１次元，(III)３次元数値解]，[IV]モンテカルロシミュレーションによってもとめたイオンの空間分布とポアソン方程式を使って求めた３次元数値解を求めた。(I)については，再定式化を行ったところGrahameの論文に示してある数式に不備があることを見いだした。その検証も含めて(II)の計算を行った結果，我々が求めた解析解と１次元のPoisson-Boltzman方程式の数値解は，完全に一致した。その計算結果の比較をFig.1に示す。1:1電解質の時とは異なり，電極の電荷が反転しても電位分布は同じ電位に反転しない。これは，２価のカチオンと１価のアニオンの遮蔽能の違いに起因するものであり，１価のアニオンの場合は，有効電気二重層厚が増加するため電位も高くなる。

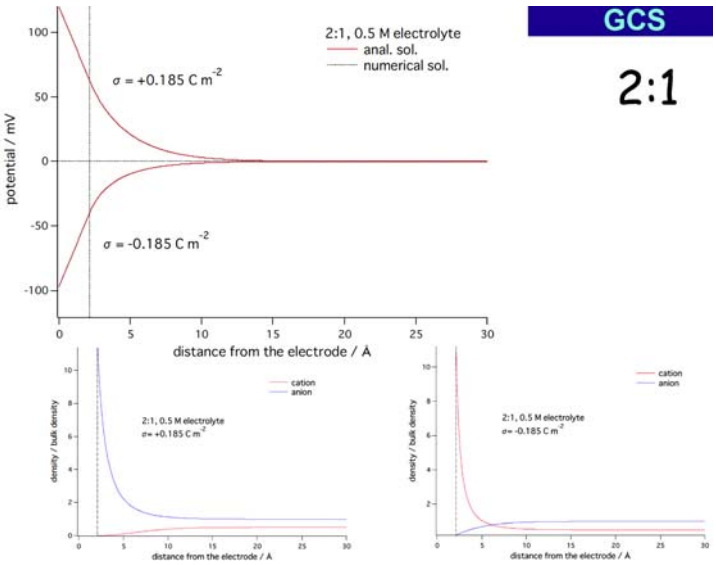


Fig.1　0.5 M 2:1電解質によるGCS電気二重層

(III)については，解離基をもつSAM上の1:1支持電解質が作る電気二重層について計算を以前おこなった。(IV)については，1:1電解質と2:1電解質とのカチオンにより遮蔽を比較検討するため，1:1 電解質と2:1電解質の混合電解質に対する電気二重層のモンテカルロシミュレーションを行った。長距離の静電相互作用を正しく求めるために，Leknerの方法を用いた。

Fig. 2に示すように，電極が負に帯電していてもOHP面（SAMから数Åにあると仮定している。）では，符号が反転した正の電位が観測される領域があらわれる。これは，クーロン相互作用の近似が荒いTorrie-ValleauのMCシミュレーションの結果と一致する[2-3]。このinverted potential regionは，負に帯電した SAM界面で負に帯電した酸化還元種[例えば$Fe(CN)_6^{3-/4-}$]に電気二重層効果を引き起こす。α = 0.5, n = 1, z = -3, ϕ_2 = +0.05 Vでどの程度反応速度がϕ_2 = +0.0 Vに比べて増加するのかを見積もったところ，約900倍程度増加した。電解質を非対称多価電解質に変えることでCVのピークセパレーションが， 200 mVから可逆系に移行した酸化還元系を我々は実験的に見いだした。ピークセパレーションから100倍以上は酸化還元速度が上昇していることが予測されるこれは実験結果と一致する。

2:2 対称電解質の場合の MC シミュレーションの結果を，Fig. 3 に示す。1:2 や 2:2 の電解質イオンの場合と同様に電位の反転領域が現れた。1:2, 2:1 では，1 価のイオンが対イオンになる場合は，このような電位の反転領域は基本的に見られなかったので，多価イオンの過剰スクリーニングがこのような電位反転領域を生成していると考えられる。

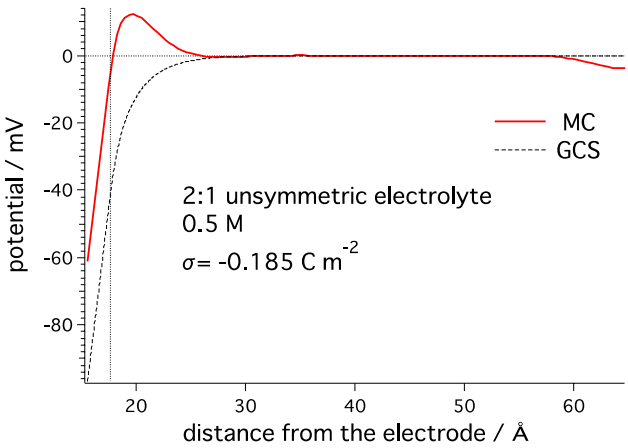


Fig.2　0.5 M 2:1 電解質のつくる電気二重

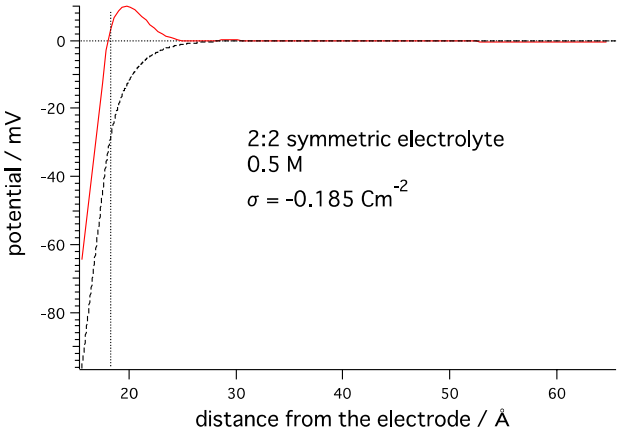


Fig. 3　0.5 M 2:2 電解質のつくる電気二重層

自己組織化単分子膜上の酸化還元種の酸化還元や酵素の直接電子移動の解析に応用することを目的とし，物質移動過程を考慮しなくてよい表面吸着系の電気化学反応過程について種々の側面から再考察した。酸化還元反応の速度定数が大きい可逆系の場合，吸着子間に相互作用がない時は，半値全幅が 90 mV の上下対称な吸着波が得られる。Au(111)面上に形成した末端にフェロセニル基をもつアルカンチオールの表面波の測定では，半値幅が 140 mV に広がりそのピークの形状も理想的なものとはかなり異なる表面吸着波が観測されている。[5,6] この表面吸着波の解析のために，これまで報告されている理論[7,8]では詳しく記述されなかった統計力学モデルの再定式化を行った。最近接間サイト間にのみ相互作用を考慮するモデルであるが，通常の表面吸着の格子ガスモデルと異なるのは，全てのサイトに酸化体か還元体が吸着していることであり，O-O, O-R, R-R 間全ての相互作用に依存することである。Au(111)面上に形成した末端にフェロセニル基をもつアルカンチオールの表面波の場合 O-O のみの相互作用を考慮すると O-O の相互作用エネルギーは 20 meV であるが, R-R の相互作用を仮に 5 meV, O-R の相互作用を O-O, O-R の幾何平均であるとすると，系の相互作用エネルギーは還元体が表面全体をおおう電位において 15 meV も O-O のみの相互作用を考慮した場合よりも過大評価する。さらに，系の相互作用エネルギーを正確に見積もるためにモンテカルロ(MC)シミュレーションを行った。酸化体と還元体の数を固定して行うとすれば，スピン系（Ising model）でのいわゆる川崎の方法すなわち酸化体と還元体を交換する方法とメトロポリスの方法を組み合わせたカノニカル MC シミュレーションとなる。平均場近似での統計力学モデルでは最近接相互作用のみを考慮しているが，MC シミュレーションの場合はそれ以上の長距離の相互作用を容易に取り入れることが可能である。また，川崎の方法では再近接の OR 対について spin-flip（OR 交換）を考慮しているが遠距離の OR 対について交換してもよく，統計力学モデルで計算される結果よりもより現実の系を説明することが期待される。

参考文献　[1] H. Grahame, *J. Chem. Phys.* (1992) **96** 3772-3773. [2] G. M. Torrie and J. P. Valleau, *J. Phys. Chem.* (1982) **86** 3251-3257. [3] G. M. Torrie. *J. Chem. Phys.* (1992) **96** 3772-3773. [4] T. G. Smagala and W. R. Fawcett, *J. Phys. Chem.* B (2007) **111** 13075-13081. [5] C.E.D. Chidsey, C.R. Bertozzi, T.M. Putvinski, A.M. Mujsce, *J. Am. Chem. Soc.* (1990) **112** pp. 4301-4306. [6] K. Uosaki, Y. Sato, H. Kita. *Langmuir* (1991) **7** pp. 1510-1514 [7] T. Kakutani, M. Senda. *BCSJ* (1979) **52** pp. 3236-3241 [8] E. Laviron, *J Electroanal. Chem.* (1979) **100** pp. 263-270

Molecular-level theoretical studies on the rate of the redox reactions enhanced by the local electric double layer effects at the SAM|electrolyte interface

Masahiro Yamamoto

Department of Chemistry of Functional Molecules, Faculty of Science and Engineering, Konan Univerity,

The detail of the potential profile of the electrical double layer at the solid|liquid interface is usually not discussed because the potential difference between the electrode and the bulk solution has great significance for the redox reaction and the charging of the electrode. In the case of the self-assembled monolayer of thiols with dissociative group terminals on Au(111) surface the charge density has a high value such as 0.74 μ C m^{-2}. For this interface we found that the reaction rate of the redox species such as $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ in electrolyte solution is enhanced by the order of more than 10^5 even when the coverage of the dissociated terminals of ammonium group terminal is less than 1/100. By the use of the primitive model and the canonical Monte Carlo simulation the three-dimensional distribution of the potential was evaluated. With the combination of the Butler-Volmer-Frumkin theory and the potential profiles the reaction rate was numerically calculated. The calculated change in the reaction rate was in good agreement with the experimental results. From this theoretical analysis we had the conclusion that the enhancement of the redox reaction rate can be induced by the local electrical double layer effect around the dissociated group terminal.

In addition to the above local double layer effect we have studied the double layer effect on the surface wave system in which the redox species are located at the terminal of thiol SAM on Au(111). In the theoretical prediction based on the Butler-Volmer-Frumkin theory the charged interface shift the redox potentials but does not increase/decrease the reaction rate of the redox reaction. We have investigated some surface wave system such as thiols SAM with ferrocenyl and carboxyl group terminal. To determine the reaction rate we need a careful understanding of the peak shift, shape, width, and separation the surface wave. At present the interaction energy between the redox species are evaluated by the use of the grand canonical Monte Carlo simulation, the peak width of the surface wave in the reversible reaction is discussed and these results are compareed with the experimental results.

The GCS (Gouy-Chapman-Stern) model based on the Grahame's method[1] is reformulated and the results calculated by the analytical model are compared with the numerical calculation by the use of Poisson-Boltzmann(PB) equation. We also show that the GCS model may be not good approximation for the electrical double layer in multivalent electrolytes solution, because our Monte Calro(MC) simulation showed the potential inversion region is appeared[2,3], which can not reproduce by the GCS model.

We also have found that the double layer effect of redox reactions on the glassy carbon electrode in unsymmetric electrolyte solutions and explained by the potential profile calculated by the MC simulation.

References

[1] H. Grahame, *J. Chem. Phys.* (1992) **96** 3772-3773.
[2] G. M. Torrie and J. P. Valleau, *J. Phys. Chem.* (1982) **86** 3251-3257.
[3] G. M. Torrie. *J. Chem. Phys.* (1992) **96** 3772-3773.

業績リスト

２．著書・総説

1) Yamamoto, M; “時評「その実験データの解析,ちょっとどーなん?」” 化学,65, 20-25 (2010).

2) Yamamoto, M; “講座:ポイント解説 Elctric(cal) Double Layer: Tutorial 電気二重層:チュートリアル” ”Review of Polarography”,56, 11-30 (2010).

３．会議発表

1) 2010 年 9 月 2 日（木）電気化学秋季大会
1K24 表面波:revisited (I) （甲南大,京大） ○山本雅博,加納健司

2) 日本分析化学会第 59 年会（東北大学川内北キャンパス）9 月 17 日
Ｄ3007(10:30～10:45)末端に解離基をもつ自己組織化膜上の電気二重層のモンテカルロシミュレーション：対称電解質と非対称電解質（甲南大理工)○山本　雅博

3) 第 56 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会(秋田大学工学資源学部)
2B04 非対称電解質による電気二重層効果　山本雅博

4) 第 56 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会(秋田大学工学資源学部)
1P02 内田信之,山本雅博 Au(111)面上に形成された 11-Feerocenyl-1-undecanethiol と
10-carboxyl-2-decanethiol の２成分自己組織化単分子膜上の表面酸化還元における電気二重層効果

5) 電気化学会第 78 回大会 横浜国立大学（3/11 の震災の為中止）ただし，予稿集発行により発表となる。
3E18 表面波：revisited (II) （甲南大,京大） ○山本雅博,加納健司

公募研究代表者　A03

ソフト界面の機能　「ソフト界面を“活かす”」

固液界面での分子ダイナミクスに基づく電気化学的な自己報告型遺伝子検出デバイス

研究代表者：産業技術総合研究所・青木　寛

１．緒言

近年 DNA チップや遺伝子の蛍光標識技術が急速に発達し、遺伝子の網羅的解析技術の適用分野が研究室レベルから臨床レベルへとますます拡大しつつある。しかし従来の遺伝子検出法は、多大な時間や労力を要し定量性に欠ける問題があり、その根本的な原因はターゲット DNA の蛍光標識化が必要なことである。これらの問題を解決するため我々は、安価で省スペース化が容易な電気化学的手法に基づき、ターゲット核酸の標識化およびマーカーの添加といった煩雑なサンプル処理が不要な（ラベル化フリー、マーカーフリー）網羅的遺伝子解析法の基盤技術を開発してきた。特に近年、固液界面での分子ダイナミクスに基づく電気化学的な遺伝子センシングについて取り組み、分析対象の標識化を必要としない電気化学遺伝子センサの開発を行ってきた。これまでに、特定の DNA をターゲットとして配列選択的に捕捉するプローブが、ターゲット DNA と二重らせんを形成することで柔軟な構造から剛直な構造に変化することに着目し、プローブ末端に取り付けた電気化学活性団の電極表面への電子移動反応が大きく阻害されることに基づき DNA を検出するセンサを開発した。開発したセンサは配列選択的に応答し検出下限は 1.4×10^{-11} M であったが、分子認識に伴い電気化学信号が減少する（“signal-off”型）という当原理の限界を明らかにし、検出下限を改善するには分子認識に伴い電気化学信号が増加する“signal-on”型の原理を確立することが必要であると考えた。

そこで本研究では、分子認識に伴い信号が増加する原理（“signal-on”型）に基づく遺伝子検出法の開発を目指す。ハイブリッド形成により自ら電気化学信号を発生させる（自己報告型）新規遺伝子プローブを設計・合成し、ラベル化およびマーカーが不要という簡便性を満たしつつより高感度な遺伝子検出法へと展開させることを目的とする。本年度は、昨年度開発したバルク溶液中での遺伝子検出を可能とする遺伝子プローブをさらに発展させ、遺伝子センサアレイチップの開発を中心に、センサ表面への固定化部位を有するアンカー標識遺伝子プローブの設計・合成およびセンサアレイチップの開発を行った。

２．研究経過

２．１　アンカー標識遺伝子プローブの設計・合成

本研究にて開発する遺伝子センサの応答機序は、電気化学信号発生団と信号抑制団とを両端に有するプローブにおいて、ターゲット認識前はプローブ構造が柔軟なため両団が弱い内包錯体を形成して信号が抑制されており、認識後は二重らせんが形成されることでプローブ構造が剛直化し両団が解離して信号が回復する仕組みである。信号発生団としてフェロセン（Fc）、信号抑制団としてβ－シクロデキストリン（CD）を両端に有する DNA をプローブとして合成（CD-DNA-Fc、22 mer、図１）し、バルク溶液中でのターゲット DNA（22 mer）とのハイブリッド形成によるフェロセン酸化還元信号の変化を電気化学的に観測した（くし形電極、サイクリックボルタンメトリ（掃引速度：0.01 V s^{-1}）、測定溶液：7.5 mM NaCl + 75 mM リン酸緩衝液（pH 7.0, Na^+））。観測されたボルタモグラムは測定溶液のみの場合との差分を取り解析したところ、CD-DNA-Fc およびターゲット DNA を含む溶液では、CD-DNA-Fc のみの場合と

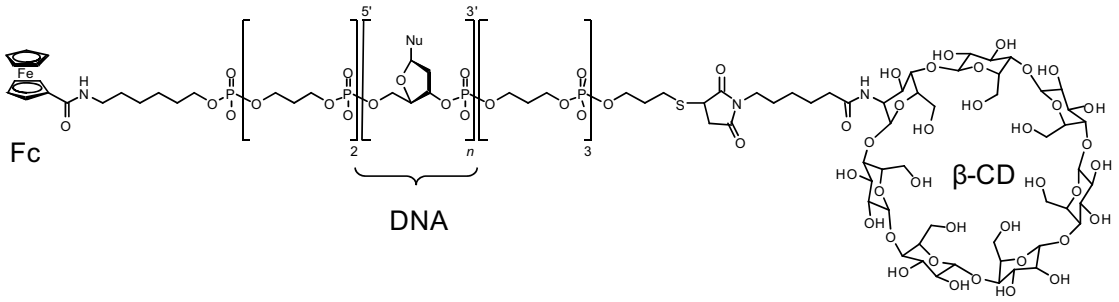
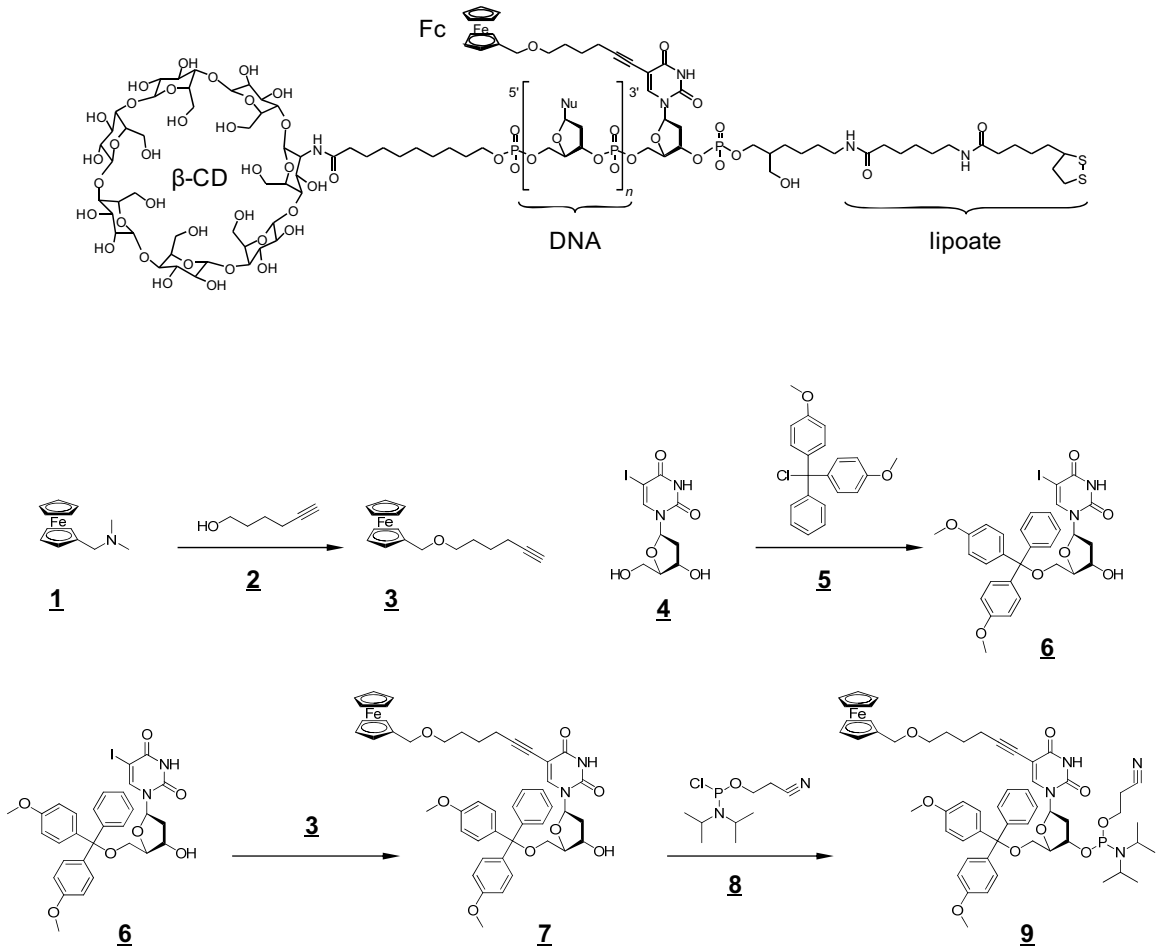


図１　プローブ DNA（CD-DNA-Fc）の構造式

比較して、Fc の酸化還元電位が 62 mV 負にシフトすることが観測された。これは、Fc の酸化還元電位がバルク溶液中での Fc/CD 内包錯体形成のため正にシフトしていたところ、錯体が解離したため錯形成前の電位に戻ったと考えられる。同様に、0.3 V での電流値変化は 1.3 nA→6.9 nA の約 5 倍に増加した。このことから、開発したプローブにより“signal-on”型の自己報告型センシングが可能となったと言える。

さらに、この反応機構に基づくプローブを電極表面上に固定化して遺伝子検出用のデバイスへと発展させるため、CD-DNA-Fc にアンカーを取り付けたプローブ（CD-DNA-T(Fc)-SH、図２）を新たにデザインした。Fc は DNA 合成機にてプローブ内に導入可能なようにするため、保護基を有する Fc 修飾核酸（T(Fc)、図３**9**）を合成した（図２）。T(Fc)を有するプローブの成果は近々に発表の予定である。



２．２　遺伝子センサアレイの開発

センシングの場としての基板材料の検討も行った。蒸着した金薄膜をエッチングして作製したガラス基板および配線パターンを同時焼成して作製したセラミックス基板に関して、遺伝子センサアレイに向けた微小電極アレイチップ化を検討した。ガラス基板においてセンサアレイチップを作製し、配列選択的な遺伝子検出が可能であることを明らかにした。一方で、ガラス基板と比較して、セラミックス基板は耐熱性・耐薬品性に優れており、また集積化にも適していることが分かった。作製したセラミックス基板における微小電極アレイの金電極表面上に、20 nL の遺伝子プローブ溶液を塗布してプローブの固定化を行った。この際の塗布は、本研究を通じて開発したピッチ可変型アレイスポッタを用いて行った。セラミックス基板は従来電極表面に分子を固定化するのに向いておらず、従ってセンサ用電極として利用されて来なかったため、電極表面のセンサ用電極としての最適化に技術的課題があった。本研究を通じてこれを克服し、その結果、複数の異なる微小遺伝子センサを高集積アレイ状に有する遺伝子センサアレイの構築に成功した。また、特定の遺伝子に対する電気化学的応答の観測にも成功した。この成果を踏まえることで、複数遺伝子の迅速・簡便な同時検出が可能となると期待される。以上、“signal-on”型の遺伝子検出システムの構築と、セラミックスデバイスに基づく簡便・迅速な一次スクリーニング技術としての遺伝子センサアレイチップの開発を推進することができた。

Electrochemical "Self-Reporting" Gene Detecting Devices Based on Molecular Dynamics at Solid-Liquid Interfaces

Hiroshi Aoki
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

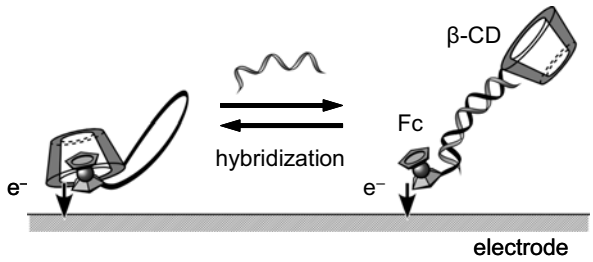
16-1 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8569, Japan
Tel: +81-29-861-8050, Fax: +81-29-861-8308, E-mail: aoki-h@aist.go.jp

Spectroscopic DNA detection is a commonly-employed technique based on fluorescence labeling of target DNAs. It is currently a standard technique for DNA detection, but requires time-consuming labeling of the target DNAs. In the search for simpler techniques, a number of electrochemical detection methods without labeling treatments have been developed. These include types based on electroactive diffusion species, intercalating or groove-binding species, ligation of nucleobases labeled with electroactive species, and methods based on more than one mediator (intercalators, groove binders, or nucleobases) and diffusion markers.

The authors, in a previous report, achieved detection of target DNAs using a gold electrode modified with a probe peptide nucleic acid (PNA) possessing a ferrocene moiety as the signal part at one end and cysteine as an anchor part at the other (Fc-PNA). Sequence-specific hybridization induced an increase in the rigidity of the probe structure, that inhibited access of the terminal ferrocene moiety to the electrode surface and thus decreased the redox current of the ferrocene moiety. A decrease in the redox current specifically indicated the presence of the target DNA. This method was reported as a simplified detection method that dispensed with the need to label the target DNAs or to add external electroactive species, with a detection limit of 1.4×10^{-11} M. The detection limit was better than those in contemporary reports on similar detection mechanisms using DNA as probes, probably due to the advantages of the PNA's structural flexibility and hybrid stability. Although having a rather lower detection limit, this sensing method utilizes the decrease in the redox reaction of the terminal ferrocene moiety when the distance between the moiety and the sensor surface is increased: namely, the detection mechanism is a function of the "signal-off" architecture.

With the aim of achieving more sensitive detection, we studied "signal-on" type probes emitting electrochemical signals that rise upon hybridization to enhance hybridization-amenable changes in probe flexibility. The probe is designed to terminate with an electrochemical signal-generating and signal-suppressing part at opposite ends. In single-stranded form, the probe is so flexible that the terminal moieties form an intramolecular inclusion complex with each other, suppressing the redox reaction of the signal-generating part. Upon hybridization, however, the probe structure becomes more rigid and the complex is pulled apart, restoring the original activity of the signal-generating part ("signal-on") (Scheme 1). Although several "signal-on" detection methods have been reported, their requirements for the use of stem structures or extra oligonucleotides to maintain complicated probe steric structures cause low generality in probe sequences. In contrast, in the studied approach, arbitrary sequences are available without any constraints on the design of probe sequences. The probe design thus has an advantage over the previous probe designs, in that it allows simple structures to be employed.

In this year, we investigated the development of gene probes with an anchoring part for immobilization to sensor surfaces, as an improvement of the probe developed in the last year for the detection in bulk solutions, and the development of sensor array chips based on microelectrodes formed on ceramic substrates. Although ceramics having advantages of thermal and chemical resistance rather than glasses, electrodes formed on ceramics were open for optimization of surface condition for sensors, which were mainly used for terminals or contacts. In this study, optimization of the surface treatment resulted in good preparation of gene sensor array chips with high reproducibility and selectivity. This indicates that the prepared gene chips are expected to contribute to rapid, simple, and simultaneous detection of numbers of genes. Consequently, we were able to develop "signal-on" gene detection system and gene sensor array chips as a primary screening technique with simplicity and rapidity based on ceramic devices.



Scheme 1 Working principle of the synthesized probe, CD-DNA-Fc, detecting the target oligonucleotide based on the intramolecular complex formation/disassociation between the Fc moiety and the β-CD moiety sensitive to hybridization with the target oligonucleotide complementary to the probe.

業績リスト

１．原著論文

1) *H Aoki, A. Kitajima, and H. Tao “Electrochemical Sensor Array Chips for Multiple Gene Detection” Sensors & Materials, 22, 327-336 (2010).

２．著書・総説

1) *青木　寛: 新規遺伝子検出法の開発と迅速遺伝子診断技術の開発、分析化学、in preparation.

３．会議発表

1) *H. Aoki, A. Kitajima, and H. Tao: Label-Free and Reagent-Free DNA Detection Based on Supramolecular Electrochemistry, Biosensors 2010, Glasgow, UK (2010).［国際学会、ポスター発表］
2) *青木　寛: 固液界面での分子ダイナミクスに基づく電気化学的な自己報告型遺伝子検出デバイス、科研費・新学術領域　第五回領域会議、国立循環器病研究センター、吹田（2010）.［国内学会、口頭発表］
3) *青木　寛、北島明子、鳥村政基、田尾博明: フェロセンおよびシクロデキストリン末端修飾プローブによる非標識 DNA の超分子電気化学検出、日本分析化学会第 59 年会、仙台（2010）.［国内学会、口頭発表］
4) *H. Aoki, A. Kitajima, H. Tao: Label-free and reagent-free DNA detection based on supramolecular electrochemistry, The 61st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Nice, France (2010).［国際学会、口頭発表］
5) *青木　寛、鳥村政基: 高速スクリーニング用二次元ピッチ可変型アレイスポッタ、第 8 回環境エネルギー分野交流会（E&E フォーラム）、つくば（2010）.［**招待講演**、国内学会、口頭発表］
6) *H. Aoki, A. Kitajima, H. Tao: Label-free and reagent-free DNA detection based on supramolecular electrochemistry, Nanojasp2010, Barcelona, Spain (2010).［**招待講演**、国際学会、口頭発表］
7) *H. Aoki, A. Kitajima, H. Tao: Label-free, reagent-free, and “signal-on” DNA detection based on supramolecular electrochemistry, Pacifichem2010, Honolulu, HI, USA (2010).［**受賞**、国際学会、口頭発表］
8) *青木　寛: 電気化学的手法による DNA 検出と DNA エレクトロニクスへの展望、第 8 回バイオナノエレクトロニクス学術講演会、秦野（2011）.［**招待講演**、国内学会、口頭発表］
9) *青木　寛、北島明子、鳥村政基: 簡便・迅速な遺伝子検出法の開発とデバイス化、産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、つくば（2010）.［**受賞**、国内学会、口頭発表］
10) *H. Aoki: Label-free, reagent-free, and “signal-on” DNA detection based on supramolecular electrochemistry, ICBS2010, Tsukuba (2011).［国際学会、口頭発表］

４．その他

【受賞】

1) ハイライト講演、H. Aoki, A. Kitajima, H. Tao, Label-free, reagent-free, and “signal-on” DNA detection based on supramolecular electrochemistry, Pacifichem2010、2010 年.
2) 優秀ポスター賞、青木　寛、北島明子、鳥村政基: 簡便・迅速な遺伝子検出法の開発とデバイス化、産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、2010 年.

【産業財産権の出願】

1) 青木　寛、北島明子、田尾博明、電気化学分子認識プローブ及びそれを用いた分子認識センサ並びにそれらを用いた電気化学的検出方法、特願 2010-193207（2010/08/31）.
2) H. Aoki, A. Kitajima, H. Tao, Electrochemical molecular recognition probes, US Patent Application 12/872735（2010/08/31）.
3) 青木　寛、鳥村政基、田尾博明、池田隆至、可変ピッチアレイスポッタ、特願 2010-267350（2010/11/30）.
4) 青木　寛、鳥村政基、田尾博明、分注装置、特願 2010-292724（2010/12/28）.

【産業財産権の取得】

5) 青木　寛、鳥村政基、田尾博明、池田隆至、可変ピッチアレイスポッタ、特許第 4,686,769 号（2011/02/25）.

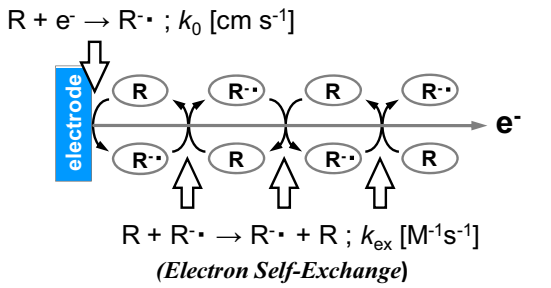
ラジカルポリマーゲルを用いた超高速電荷輸送ソフト界面の構築

研究代表者：早稲田大学理工学術院・小柳津研一

１．緒言

本研究は、レドックス席を高い密度で含有する非共役系ポリマーが形成する電極／ゲル／電解質界面での電荷・物質移動過程を分子レベルで解明し、優れた電荷輸送・分離特性を有するソフト界面を創出することを目的とする。

レドックス席をモノマーユニット当たり置換した高密度レドックスポリマーは、電解質中でレドックス部位がそれ自身の溶解度を超えて濃縮されたゲルを形成するため、高速電荷輸送と可逆的な電荷貯蔵が可能となる。電極反応の速度定数が極めて大きい場合、外圏機構による自己電子交換速度定数も大きく、濃度勾配を駆動力とする電荷輸送がゲル内において高速で生起する。このような化学反応に基づく電気伝導の概念 (Scheme 1) を一般化し、湿式デバイスの電荷輸送層として有用な材料設計の指針を明らかにすることを目指して研究展開した。

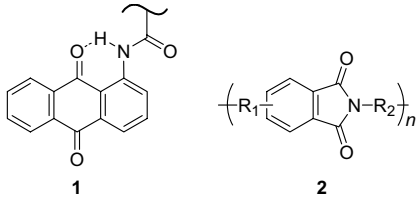


Scheme 1. Charge transport and storage by electron self-exchange mechanism throughout redox polymer layers attached to electrode surfaces.

２．研究経過

２．１　高密度 *n* 型レドックスポリマーの設計

電気化学的に還元ドープ可能な *n* 型ポリマーは、EL 素子や太陽電池などの電子注入・輸送層だけでなく、二次電池の負極活物質として必須である。導電・蓄電に関わる基本現象を追究するため、*p* 型ポリマーに比べ具体例の少ない *n* 型ポリマーについて、有機二次電池の高容量化および高起電力化を指針とする分子設計・合成により幅広く検討した。



Scheme 2. *n*-Type redox polymers for anode-active materials in organic secondary batteries.

卑な電位で電気化学的に可逆性高く酸化還元し、電極活物質として充・放電の両状態で化学的にも安定なポリマーとしてポリアントラキノンおよびポリイミド (Scheme 2) を選択し、既存の *n* 型ポリマーであるポリビオローゲンなどとの比較も含め、サイクリックボルタンメトリやクロノポテンショメトリにより電解質膨潤ポリマー膜の充放電特性を明らかにした。アントラキノンが 2 電子レドックスに基づく高容量ポリマーとして有用であることを明らかにし、ポリ(*N*-オキシ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-4-イルメタクリレート) (PTMA) など有機正極活物質として働く *p* 型ラジカルポリマーと組み合わせた有機二次電池を試作、実際に動作を確認すると共に有機負極に求められる性能要件を整理した。

２．２　ポリマー合成、電極作製および電気化学特性の解明

1 のモノマーとして (*N*-(9,10-ジオキソ-9,10-ジヒドロアントラセン-1-イル)メタクリルアミドを合成し、THF 中 AIBN 等を開始剤とするラジカル重合により分子量 8.0×10^3 程度のポリマーを得た。類似構造の 1-(4-ビニルフェニルアミノ)アントラキノンのラジカル重合も同程度に進行し、酸化力の低いアントラキノンが重合禁止剤とならないことを確認した。ジビニルベンゼンを架橋部位としてモノマー比 10～40% 程度共存させると、アセトニトリル、プロピレンカーボネート、クロロホルム等に膨潤するのみで不溶のゲルを与えた。導電付与剤である炭素繊維と混合し集電体上に塗布することによって、ポリアントラキノン負極を作製し電池試験に供した。ポリイミド (**2**) 電極は、4,4'-オキシフタル酸無水物と 1,4-フェニレンジアミンとの重縮合により得られる前駆体ポリアミド酸 (分子量 2.2×10^4) を炭素繊維と混合し、集電体上に塗布した後、熱イミド化する方法で作製した。

キノン類をペンダント置換基とした非共役系ポリマーは、2 電子反応（$Q + e^- \rightleftharpoons Q^{-}\cdot$, $Q^{-}\cdot + e^- \rightleftharpoons Q^{2-}$）に基づく高容量レドックスポリマーとして働き、–0.7 V vs. Ag/AgCl 以下の卑な電位で電極反応が進行した。電池の繰返し充放電に耐える化学安定度を得るため、キノン部位として H_2O_2 製造 (アントラキノン法)

にも用いられるアントラキノン骨格が有用であり、電解質溶液中で不溶かつ膨潤する架橋ポリマー膜を形成することが分かった。特に、非プロトン性条件下で水素結合が存在すると電極反応が可逆的に進行することに着目し、アントラキノン骨格に対して分子内水素結合するアミド基を有するメタクリルアミドをモノマーとして選択、分子量高く合成した。

アントラキノン部位をモノマーユニット当り高密度に導入した場合、サイクリックボルタンメトリにおいて-0.8 V vs. Ag/AgCl に 100 サイクル以上繰り返し安定な酸化還元波を与えた。ボルタモグラムの積分値および定電流電解 (クロノポテンショメトリ) における遷移時間 τ より得られたレドックス容量は、レドックス等重量に基づく計算容量に近く、ポリマー膜全体でアントラキノン部位が効率高く電極反応に関与していることが分かった。速い電極反応に続きポリマー膜内でホッピングによる電荷伝播が膜全体に亘って連続的に進行していると考えられ (Scheme 1)、レドックスサイトを密集させた結果、自己電子交換反応が効率よく進行していることが明らかになった。

２．３　有機電池の試作と動作試験

1 または **2** の炭素複合電極を負極、PTMA/炭素複合電極を正極とし、過塩素酸テトラブチルアンモニウムのプロピレンカーボネートまたはアセトニトリル溶液 (0.1 M) を電解液とする有機二次電池を作製、二極式サイクリックボルタンメトリおよび定電流充放電試験などから電流・電圧特性、繰返し充放電の安定性、電荷保持力などを評価した。**1** を PTMA 正極と組合わせた二次電池は、酸化還元電位差に相当する両極電位差 1.6 V で発電し、100 サイクル以上の充放電後も容量低下なく安定に動作した。アントラキノン電極に導電付与剤を複合化すると、レドックス容量が顕著に向上することが分かった。

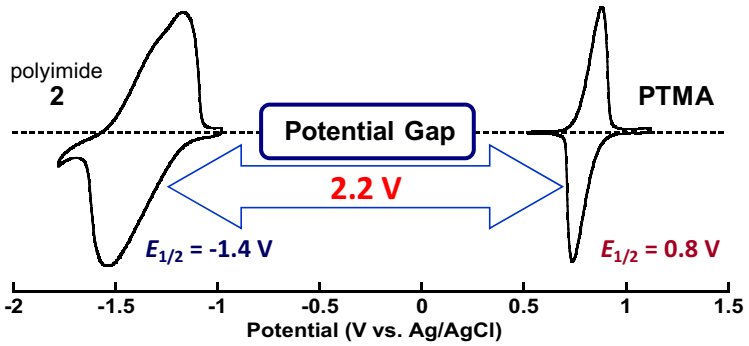


Figure 1. Cyclic voltammograms of the *n*-type (**2**) and *p*-type (PTMA) redox polymers immobilized on electrode surfaces showing the potential gap of more than 2 V.

有機二次電池として更なる高起電力化を達成するため、より卑な電位において一電子還元体 (アニオンラジカル) との間で可逆的な酸化還元を示すことが知られているフタルイミドに注目し、電気化学的に不活性なポリイミドが炭素繊維との複合化によりレドックス容量を発現することを見出した。ポリイミドを機械的に粉砕し炭素繊維と混合したのみでは全く容量が得られず、前駆体ポリアミド酸の段階で複合化することによって初めて-1.4 V vs. Ag/AgCl に可逆的な酸化還元波が現れ、イミド部位がレドックスサイトして働くことが分かった。架橋部位の導入などによって還元状態での溶出を抑制すると繰返し充放電可能となり、PTMA 正極と組合わせた有機電池では、両極電位差に相当する 2.2 V の高電圧で保持力高く二次電池として働くことが分かった (Fig. 1)。

Development of Soft Electronic Interface for Efficient Charge Transport Properties Using Radical Polymer Gels

Kenichi Oyaizu
Department of Applied Chemistry, Waseda University

Okubo 3-4-1, Shinjuku, Tokyo 169-8555, Japan
Tel: 03-3209-3211 Ext 3319, Fax: 03-3209-5522
E-mail: oyaizu@waseda.jp

Development of organic anode-active materials is the key to establish organic polymer batteries. All-organic polymer batteries, free from using heavy metals and metal oxides, are featured by their environmentally benign characteristics, safety, disposability, and capability of fabricating flexibile and even transparent devices. We have already established that suitably designed redox polymers allow rapid charge propagation and high-density charge storage, when the redox sites are so populated that electron self-exchange reaction goes to completion within a finite distance of the polymer layer attached to the electrode surface. The charge-storage density and the electrode potential are the important criteria which is relevant to the design of the organic anode-active materials. We report the synthesis and properties of novel *n*-type redox polymers for reversible charge storage at negative electrode potentials.

The concentration gradient-driven charge propagation is accomplished by the electron self-exchange reaction. The apparent diffusion coefficient, D, of the charge produced at the surface of the electrode is determined by the bimolecular rate constant, k_{ex}, for the self-exchange reaction which is expected to be sufficiently large for diffusion-limited outer-sphere redox reactions. The negative redox potentials of imides and quinines near -1 V and their fast electrode reactions with heterogeneous electron transfer rate constants in the order of 10^{-1} cm/s prompted us to study polyimides and polyquinones as the anode-active materials. The redox properties and the charge-discharge behaviors of test cells using these polymers were determined.

The reversible n-type redox capability of polyimides was significantly enhanced in a polyimide/carbon nanocomposite prepared by cyclodehydration of the corresponding polyamic acid which was solution-processed into a composite layer on an electrode surface with a vapor-grown carbon nanofiber. The stepwise preparation process gave the first polyimide-based electrode-active material, in contrast to the simple grinding of the polyimide and the carbon fiber which gave only redox-inactive mixtures. The polyimide/carbon nanocomposites were characterized by negative redox potentials at -1.4 and -0.74 V vs. Ag/AgCl for poly(4,4'-oxydiphthalimido-1,4-phenylene) and poly(pyromellitimido-1,4-phenylene), respectively, which corresponded to a charging per repeating unit of the neutral polymers to poly(anion radical)s. The polypyromellitimide/carbon nanocomposite underwent further reduction at -1.4 V to produce a dianion per repeating unit, giving rise to a high-density charging with a redox capacity of 185 mAh/g based on the formula weight of the polymer. The typical redox capacity of the electrolyzed nanocomposites amounted to the stoichiometric quantity of electricity calculated from the formula weight-based capacity, which was much larger than those of typical redox polymers with negative potentials such as poly(*N*-4,4'-bipyridinium-*N'*-decamethylene dibromide) (59 mAh/g). Additional advantages originated from the robustness of the polyimide framework, which allowed excellent charging/discharging cyclability.

The polyimide-based electrodes are highly promising as anode-active materials to substitute the Li-based anodes in secondary batteries, owing to their excellent redox properties. Attempts to employ them as electron transport materials in various organic wet-type devices are underway.

業績リスト

１．原著論文

1) K. Oyaizu, A. Hatemata, W. Choi, H. Nishide, “Redox-active Polyimide/carbon Nanocomposite Electrodes for Reversible Charge Storage at Negative Potentials: Expanding the Functional Horizon of Polyimides”, *J. Mater. Chem.*, **20**, 5404-5410 (2010).

2) X. Zhuang, H. Zhang, N. Chikushi, C. Zhao, K. Oyaizu, X. Chen, H. Nishide, “Biodegradable and Electroactive TEMPO-substituted Acrylamide/Lactide Copolymer”, *Macromol. Biosci.*, **10**, 1203-1209 (2010).

3) S. Yoshihara, H. Isozumi, M. Kasai, H. Yonehara, Y. Ando, K. Oyaizu, H. Nishide, “Improving Charge/discharge Properties of Radical Polymer Electrodes Influenced Strongly by Current Collector/carbon Fiber Interface”, *J. Phys. Chem. B*, **114**, 8335-8340 (2010).

4) K. Koshika, N. Chikushi, N. Sano, K. Oyaizu, H. Nishide, “A TEMPO-Substituted Polyacrylamide as a New Cathode Material: an Organic Rechargeable Device Composed of Polymer Electrodes and Aqueous Electrolyte”, *Green. Chem.*, **12**, 1573-1575 (2010).

5) X. Zhuang, C. Xiao, K. Oyaizu, N. Chikushi, X. Chen, H. Nishide, “Synthesis of Amphiphilic Block Copolymers Bearing Stable Nitroxyl Radicals”, *J. Polym. Sci., A*, **48**, 5404-5410 (2010).

6) K. Oyaizu, T. Kawamoto, T. Suga, H. Nishide, “Synthesis and Charge Transport Properties of Redox-Active Nitroxide Polyethers with Large Site Density”, *Macromolecules*, **43**, 10382-10389 (2010).

7) K. Oyaizu, T. Sukegawa, H. Nishide, “Dual Dopable Poly(phenylacetylene) with Nitronyl Nitroxide Pendants for Reversible Ambipolar Charging and Discharging”, *Chem. Lett.* (Editor’s Choice), **40**, 184-185 (2010).

8) T. Suga, S. Sugita, H. Ohshiro, K. Oyaizu, H. Nishide, “P- and N-type Bipolar Redox-active Radical Polymer Toward a Totally Organic Polymer-based Rechargeable Devices with Variable Configuration”, *Adv. Mater.*, **23**, 751-754 (2011).

２．著書・総説

1) K. Nakahara, K. Oyaizu, H. Nishide, “Organic Radical Battery Approaching Practical Use”, *Chem. Lett.* (Highlight Review), **40**, 222-227 (2011).

３．会議発表

1) 小柳津研一,「有機ラジカル電池」, 第 41 回繊維学会夏季セミナー, 2010.8.27, 三島 (招待講演).

2) 小柳津研一,「高密度レドックスポリマーによるエネルギー変換: 有機ラジカル電池と太陽電池」, 静岡大学薄膜基板研究懇話会第 14 回研究発表会, 2011.1.27, 浜松 (招待講演).

3) K. Oyaizu, “Radical Block Copolymers for Application to Electro-active Biomaterials”, The 10th China-Japan-Korea Foresight Joint Symposium on Gene Delivery and International Symposium on Bioaterials, 2011.5.29-6.2, Guilin (China) (招待講演).

高分子結合性ペプチドを用いた機能性ソフト界面の創製

研究代表者：東大先端研・芹澤　武

１．緒言

近年のバイオテクノロジーの飛躍的な発展により、異なるペプチドを網羅的に提示した生物学的なペプチドライブラリーが調製され、任意の分子に特異的に結合するペプチドを選択するファージディスプレイ（PD）法や細胞表層ディスプレイ法が開発された。ペプチドの従来のターゲットは生体分子であったが、最近、無機化合物などの人工材料に結合するペプチドの探索に適用されるようになった。我々は、合成高分子のフィルムあるいは粒子表面に PD 法を適用することにより、それぞれに特異的に結合する短鎖ペプチド（“高分子結合性ペプチド”）の存在を明らかにしている。これにより、ペプチドには合成高分子のわずかな構造の違いを識別する能力があること、またペプチドの取得が生体分子や高分子の新しい利用法の開拓となることを提案している。このような高分子結合性ペプチドを濃密かつ安定に吸着させることができれば、貴金属や酸化物表面の自己組織化単分子膜と同様に、高分子表面の新規修飾剤としての機能が期待できる。

本研究では、疎水性高分子を水中に浸漬した際に形成される高分子ソフト界面の正確な構造の理解とともに、高分子結合性ペプチドを表面修飾剤とした機能性ソフト界面を創製することを目的とした。具体的には、(1) 高分子のソフト界面形成に及ぼすパラメータの整理、(2) 高分子フィルムに対する高分子結合性ペプチドの結合状態の評価、(3) 表面修飾剤としてのペプチドの設計指針の確立、(4) 様々な表面修飾への適用の順に研究を展開した。

本報告書では、代表的なエンジニアリングプラスチックとして知られるポリエーテルイミド（PEI）を中心に、前年度に PD 法により同定した PEI 結合性の 7 残基ペプチド（FB01: TGADLNT）を表面修飾剤として利用した結果についてまとめる。

２．研究経過

２．１　ペプチドを介するタンパク質の固定化

特異的な結合に影響しない、FB01 の C 末端をビオチン化グルタミンで化学修飾した。その結果、FB01 がもつ元の結合定数（5.6 x 10^8 M^{-1}）は、1.6 x 10^5 M^{-1} にまで低下したものの、依然として高い結合定数を維持していることから、このビオチン化ペプチドを表面修飾剤に適用することにした。そこで、これらビオチン化ペプチドを PEI フィルムに固定化し、ストレプトアビジン（SAv）の結合挙動（250 nM, 2 min）を評価した（図 1）。ペプチドの固定化量が 20 pmol cm^{-2} 程度までは、固定化量依存的に SAv の結合量が増加した。非ビオチン化ペプチドでは SAv は結合しなかったことから、ビオチン－SAv の特異的な相互作用により結合していることが分かった。ペプチドの固定化量を増加させると SAv の結合量は低下した。このように、SAv の結合量は山型のペプチド固定化量依存性となった。

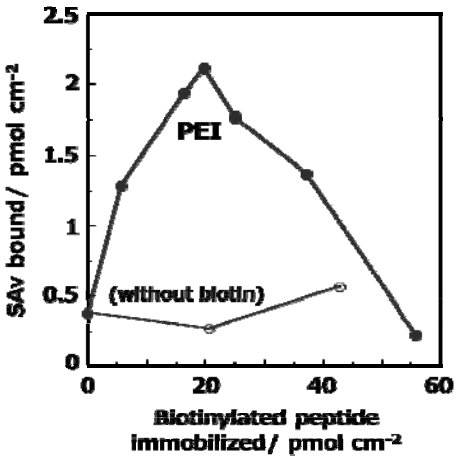


図１　ビオチン化ペプチドを介する PEI フィルムへの SAv の固定化

山型依存性の頂点、つまり SAv の最大結合量における被覆率は 30 %程度であり、固定化したペプチドの 10 %程度し

か結合に寄与していないことが分かった。その理由として、(i) ビオチン化ペプチドが高分子鎖に無配向に固定化されるため、ビオチン基が SAv と結合しにくい方向を向いていること、(ii) ペプチドがクラスター化して固定化されるために、立体障害により SAv が結合しないこと、(iii) ペプチドが PEI フィルム表面の水膨潤層に埋もれてしまうこと、などが考えられる。(i)については、水中における高分子鎖の秩序構造の制御を必要するために、現状では回避することは難しい。(ii)について、ビオチン化ペプチドと非ビオチン化ペプチドを混合して固定化したところ、固定化量が多くても SAv は結合できた。また、ペプチドをビオチン基の間に適当なスペーサーを導入し、ペプチド間の相互作用を緩和させたところ、同様に固定化量が多くても SAv は結合できた。これらの結果は、(ii)の寄与を支持した。(iii)について、本新学術領域研究に参加している田中敬二・九州大学教授と共同研究を行い、PEI フィルム表面の水膨潤層の厚さを中性子散乱により解析した。その厚さは 2 nm 未満であり、7 残基程度のペプチドであればフィルム最表面に十分に存在可能であることが示唆された。ペプチドを固定化すると PEI フィルムの表面が親水化することもまた、最表面にペプチドが存在することを支持した。ちなみに、イソタクチックポリメタクリル酸メチルに結合する c02 ペプチド (ELWRPTR) を用いて同様に実験したところ、ペプチドは水膨潤層に結合するために、SAv は固定化できなかった。このように、(i)と(ii)が複合的に寄与し、SAv の結合に影響していることが明らかになった。

固定化した SAv を原子間力顕微鏡(AFM)により観察したところ、単なる物理吸着では PEI フィルム上で凝集してしまうのに対して、ペプチドを介して固定化した場合には均一に単層固定されていることが分かった (図 2)。さらに SAv の二次構造を赤外吸収スペクトルにより評価したところ、ペプチドを介して固定化することにより、吸着変性が抑制されることが明らかになった。

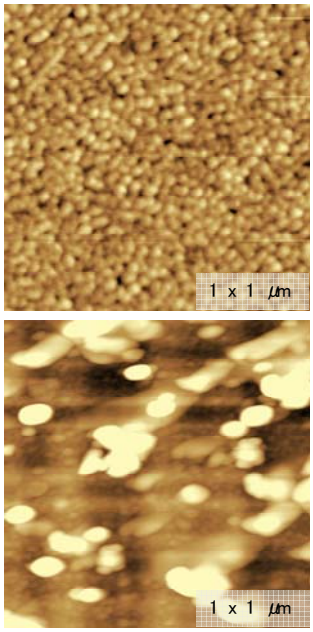
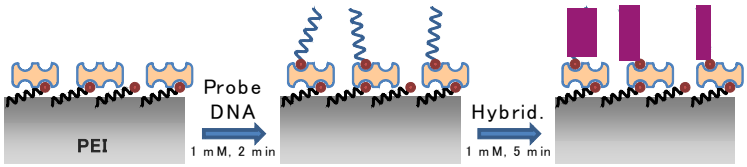


図 2　固定化した SAv の AFM 写真
(上)ペプチドあり
(下)ペプチドなし (物理吸着)

2．2　固定化したタンパク質の機能発現

固体化した SAv の機能発現を目指し、ペプチドとの結合に使用していない残りのビオチン結合部位を利用して、プローブ DNA の固定化とその後のハイブリダイゼーションを観察した (図 3)。その結果、PEI フィルム上にペプチドを介して固定化した SAv は、一本鎖 DNA プローブを良好に固定化することができ、相補鎖 DNA とのハイブリダイゼーションも効率よく観察できた。一方、物理吸着した SAv を用いた場合には、プローブ DNA の固定化と同時に SAv の解離が見られ、定量評価することができなかった。このように、ペプチドを介して SAv を固定化することで、吸着変性を抑制すると同時に機能発現にも有用であることが分かった。



Probe: (biotin) 5'-TAC GCC ACC AGC TCC-3' (Mw 4863)
Target: 3'-ATG CGG TGG TCG AGG-5' (Mw 4689)

Peptide (ng/ pmol cm^{-2} (%)	SAv (ng/ pmol cm^{-2} (%)	Probe/ pmol cm^{-2}	SAv used/ %	Target/ pmol cm^{-2}	Hybri./ %
12 (14)	1.4 (19)	2.1	77	2.0	95
non	2.4 (34)	n.d.	–	n.d.	–

図 3　固定化した SAv の機能発現

Construction of Functional Softinterfaces Using Polymer-Binding Peptides

Takeshi Serizawa
Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo

4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8904, Japan
Tel and Fax: +81-3-5452-5224, E-mail: t-serizawa@bionano.rcast.u-tokyo.ac.jp

The understanding and regulation of events at interfaces between artificial materials and biomolecules are important to create highly functional bio-related materials. The interfaces are normally composed of non-specific adsorption or covalent conjugation of biomolecules onto the material surfaces. In the former case, the interactions are sometimes weak for their potential applications. In the latter case, the design of polymers and/or biomolecules is necessary. Therefore, simple and promising methods to fabricate the interfaces are required.

Biomolecules such as peptides and proteins normally interact with biomolecules. However, recent studies have revealed that certain peptides, which were selected from a peptide library, bind specifically to artificial materials such as metal oxides, semiconductors, metals, and so on. The selection was demonstrated by phage display (PD) or cell-surface display methods. The side chains of component amino acids in the peptides, which have three-dimensionally regular structures, may fit into suitable positions on the target material surfaces, resulting in specific interactions. Furthermore, the peptides can be used as components for the modification of material surfaces. Accordingly, the targets of peptides are not necessarily biomolecules.

This study focuses on the identification of short peptides, which specifically bind to film surfaces composed of synthetic polymers, based on the PD method and the subsequent applications of the peptides to functional modifications of polymer surfaces. In this report, recent progress in the application of the identified FB01 peptide with the Thr-Gly-Ala-Asp-Leu-Asn-Thr sequence, specific for a well-known engineering plastic, polyetherimide (PEI), to modify the PEI films is summarized.

The FB01 peptide was biotinylated and immobilized onto the PEI films to further immobilize streptavidin (SAv). The amount of SAv bound was dependent on the density of immobilized peptide. It gradually increased with an increase in density of immobilized peptide, and achieved a maximum (2.1 pmol cm^{-2}) at a peptide density of 19.8 pmol cm^{-2}. The ratio of peptide used for immobilizing SAv at the maximum value was approximately 11 %, and was partially due to the low accessibility of SAv to the biotin moieties on the PEI films. The amount of SAv bound gradually decreased at higher peptide densities, thereby suggesting that the clustering of the peptides also inhibited the binding of SAv. Furthermore, the peptides on the PEI films promoted the uniform immobilization of SAv with less structural denaturing. The immobilized SAv was able to further immobilize probe DNA to hybridize with its complementary DNA. These results suggest that the density of immobilized peptide has a great impact on the surface modifications using polymer-binding peptides.

業績リスト

１．原著論文

1) Gao Z., Zhi C., Bando Y., Golberg D., Serizawa T., “Isolation of Individual Boron Nitride Nanotubes via Peptide Wrapping”, J. Am. Chem. Soc., 132, 4976-4977 (2010).
2) Serizawa T., Hirai Y., Aizawa M., “Detection of Enzyme Activities Based on the Synthesis of Gold Nanoparticles in HEPES Buffer”, Mol. BioSyst., 6, 1561-1564 (2010).
3) Ejima H., Matsuno H., Serizawa T., “Biological Identification of Peptides that Specifically Bind to Poly(phenylene vinylene) Surfaces: Recognition of the Branched or Linear Structure of the Conjugated Polymer”, Langmuir, 26, 17278-17285 (2010).
4) Ejima H., Kikuchi H., Matsuno H., Hirofumi Yajima, Takeshi Serizawa, “Peptide-Based Switching of Polymer Fluorescence in Aqueous Phase”, Chem. Mater., 22, 6032-6034 (2010).
5) Date T., Sekine J., Matsuno H., Serizawa T., “Polymer-binding Peptides for the Noncovalent Modification of Polymer Surfaces: Effects of Peptide Density on the Subsequent Immobilization of Functional Proteins”, ACS Appl. Mater. & Interfaces, 3, 351-359 (2011).
6) Gao Z., Zhi C., Bando Y., Golberg D., Serizawa T., “Noncovalent Functionalization of Disentangled Boron Nitride Nanotubes with Flavin Mononucleotides for Strong and Stable Visible-Light Emission in Aqueous Solution”, ACS Appl. Mater. & Interfaces, 3, 627-632 (2011).
7) Ejima H., Matsumiya K., Sawada T., Serizawa T., “Conjugated Polymer Nanoparticles Hybridized with the Peptide Aptamer”, Chem. Commun., 2011, in press.

２．著書・総説

1) Serizawa T., Matsuno H., Sawada T., “Specific Interfaces between Synthetic Polymers and Biologically Identified Peptides”, J. Mater. Chem., in press.
2) 芹澤　武, 松野寿生, “ペプチド機能界面”, バイオマテリアルの基礎, 日本医学館, 160-166 (2010).
3) 澤田敏樹, 芹澤　武, “生体分子による特異的界面”, CSJ Current Review 04 新しい局面を迎えた界面の分子科学―機能デザインと計測技術の展開, 化学同人, 87-92 (2011).

３．会議発表

1) Serizawa T., “Functional Modification of Soft Interfaces with Polymer-Binding Peptides”, Pacifichem 2010, 2010 年 12 月 17 日, Honolulu Convention Center. ［国外学会　招待］
2) 伊達 隆明, 吉野里美, 芹澤　武, “PMMA 表面に結合するペプチドの探索と表面修飾剤としての利用”, 第 59 回高分子討論会, 2010 年 9 月 15 日, 北海道大学. ［国内学会　口頭］
3) 伊達隆明, 芹澤　武, “短鎖ペプチドを用いた高分子表面の機能化”, 第 20 回バイオ・高分子シンポジウム, 2010 年 7 月 29 日, 東京大学. ［国内学会　口頭］
4) 吉野里美, 伊達隆明, 芹澤　武, “高分子構造に依存した短鎖ペプチドの界面提示”, 第 39 回医用高分子シンポジウム, 2010 年 7 月 27 日, 東京大学. ［国内学会　口頭］
5) Serizawa T., “Peptides Recognize Synthetic Polymers”, E-MRS 2010 Spring Meeting, 2010 年 6 月 11 日, Strasbourg Congress Center. ［国外学会　口頭］

生体分子複合固定ソフト界面に基づく増幅・濃縮型高感度イムノアッセイデバイスの開発

～等電点電気泳動（IEF）濃縮型高感度イムノアッセイキャピラリーの開発と

マルチ IEF デバイスの試作～

研究代表者：阪府大院工・久本秀明

1．緒言

イムノアッセイではタンパクの高感度検出を達成するために、多段階反応や洗浄などの煩雑な操作を行っている。それらの簡便化を達成するためにイムノクロマトグラフィーなどの簡便な手法が開発・実用化されているが、簡便化を達成するためには検出感度を犠牲にせざるを得ない。一般に、「簡便さ」と「高感度化」は相反する課題である。

本研究は、我々がごく最近開発した化学結合・物理吸着併用型の表面修飾技術を用いてソフト界面形成キャピラリーを作製し、洗浄操作を排除する「簡便性」および「高感度」を両立させたイムノアッセイの実現・デバイス化を目的とする。今回は、「蛍光標識抗体（抗原）・キャリアアンフォライト含有（物理吸着）架橋ポリマー（化学結合）ソフト界面」を形成させたキャピラリーを作製し、簡便な毛細管現象試料溶液導入・電圧印加による分離・濃縮・検出が可能な「洗浄操作なしの高感度イムノアッセイ」について検討した結果を報告する。また、これらのキャピラリーを並列配置してマルチ検出可能なデバイスの試作も行ったため、その進捗状況についても報告する。

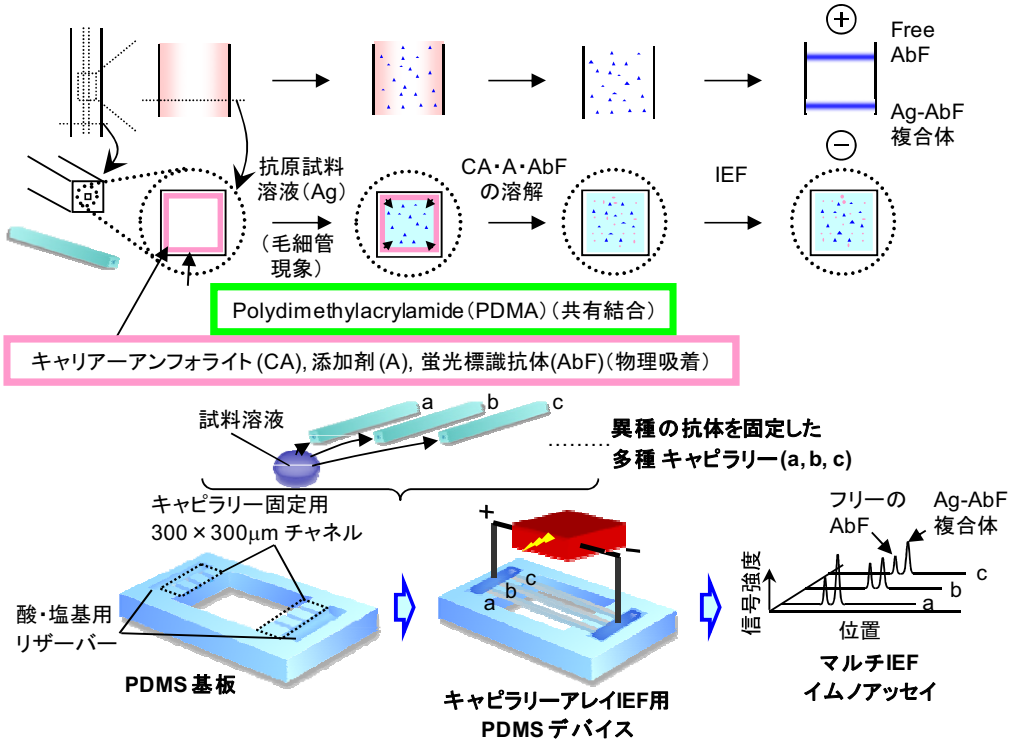


図　等電点電気泳動(IEF)濃縮型高感度イムノアッセイとマルチIEFデバイス開発のコンセプト

2．研究成果

1）ソフト界面形成キャピラリーによる IEF の基礎検討

内形50または100 μm角(外形300 μm角)の角型キャピラリー内にポリジメチルアクリルアミド(PDMA)を共有結合修飾した。このキャピラリーを 4cm 長にカットし、キャピラリー内に市販のキャリアアンフォライト（BioLyte)、添加剤（Tween20、グリセロール)、蛍光標識試薬（抗体・抗原等）を含む溶液を毛細管現象で導入し、2h 減圧乾燥させ、PDMA 層内および表面に物理吸着させた。

実際にイムノアッセイを実施する前に、蛍光標識タンパクを用いて簡便な IEF が実際に可能かどうかの予備実験を行ったところ、試料導入を酸性電解質と接触する端面から行った場合には再現よく濃縮

できるのに対し、逆から導入した場合には濃縮位置・蛍光強度とも、再現を得ることが極めて困難であることがわかった。これは物理吸着固定した試薬分子が試料溶液導入に伴って下流に流されてキャピラリー長さ方向に濃度勾配が生じるため、その後、酸・塩基溶液と接触させて電圧印加した際、酸・塩基反応およびそれに伴う電気泳動の速度が両者の間で異なってくるためと考えた。そこで、pI マーカー分子を用いてキャピラリー内に形成される pH 勾配を評価したところ、再現よく濃縮できた試料導入方向(酸性電解質と接触する端面から導入）の場合、通常の CIEF とほぼ同じ濃縮位置となるのに対し、逆から導入した場合には全体的に酸側にシフトした結果となった。これは固定化したキャリアーアンフォライトおよび pI マーカー分子が中性の純水中では全体的に負電荷を帯びているために、電圧印加時に侵入してくる水素イオンとの酸塩基反応に必要な時間の分だけ電気泳動しはじめるタイミングが遅れ、その間に水酸化物イオンの侵入による pH 勾配の圧縮が起こってしまうためと考えた。以上の結果から、再現性の確保および pH 勾配の圧縮による分離能低下を回避するためには、試料導入を酸性電解質と接触する端面から行えばよいことがわかった。

2）ソフト界面形成キャピラリーによる IEF イムノアッセイ

作製したイムノアッセイ用キャピラリー内に対応した試料水溶液を毛細管現象で導入して 1)と同様の方法で CCD 画像を取得した。

固定化試薬として、Rabbit-IgG-FITC、試料として Anti-Rabbit-IgG-RBITC を用い、イムノアッセイを試みた。その結果、濃縮時間がわずか約 6-7 分程度であるにもかかわらず、汎用の蛍光顕微鏡用 CCD カメラを検出器とする pg/mL レベルの高感度検出が可能であり、簡便・迅速・高感度なイムノアッセイが実現できることがわかった。実際に、癌診断マーカーとして知られる AFP に対する蛍光標識抗体(Anti-AFP-TRITC)を用いて AFP の検出を試みたところ、分析時間 10 分程度で数十 pg/ml オーダーの AFP 検出ができることがわかった。

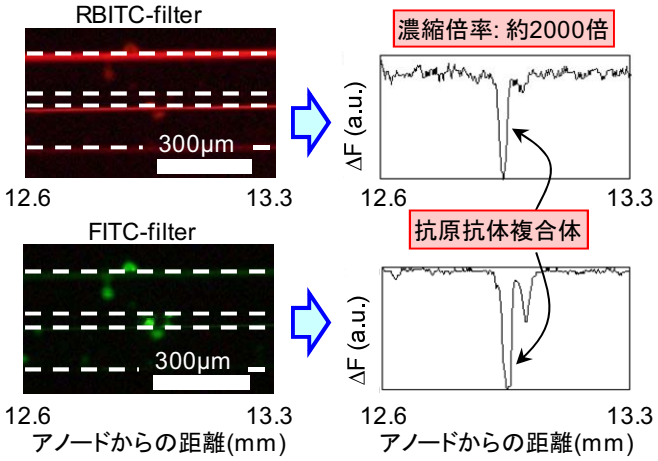


図 2 IEF後の典型的なエレクトロフェログラム

3）マルチ IEF 用 PDMS デバイスの試作とマルチ IEF の予備検討

角型キャピラリー外形と同サイズの流路アレイを作製した PDMS および PDMS 製リザーバーを組み合わせ、マルチ IEF 用 PDMS デバイスを試作した。複数のキャピラリーに試料導入後、デバイスに並列配置し、同時に電圧を印加してマルチ IEF を行った。ここではタンパク検出用ラベル化剤および異なる pI 範囲のキャリアーアンフォライトを固定したキャピラリーを３種類用意し、マルチ IEF を行ったところ、それぞれのキャピラリー単独で IEF を行った場合とほぼ同じ形状・位置の濃縮ピークが得られ、マルチ IEF が実際に可能であることがわかった。

以上の成果から、今後、異なる抗体を固定したキャピラリーのパラレル化により、簡便・高感度かつ、多種同時タンパク検出が可能なマルチイムノアッセイデバイスの開発が期待される。

Development of Amplification- or Preconcentration-type Immunoassay Devices Based on Soft Interface Involving Composite Immobilization of Biomolecules -Development of the Highly-Sensitive Immunoassay Capillary Based on Isoelectric Focusing and Its Application to Multi IEF Devices-

Hideaki Hisamoto

Osaka Prefecture University

1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai-shi, Osaka 599-8531 Japan
Tel: +81-72-254-9976, Fax: +81-72-254-9910, E-mail hisamoto@chem.osakafu-u.ac.jp

Many researches on microfluidic ELISA devices reported to date showed short analysis time and multiplexed analysis by taking advantages of liquid microspace. However, in most cases, since the principle itself is an extension of ELISA, complicated procedure of washing and sequential introduction of reagent solutions are still required to obtain highly-sensitive signal. On the other hand, we developed a reagent-release capillary (RRC) for the simple detection of protease activity and electrolytes. In this case, fluorescent probes were physically adsorbed inside capillary, thus capillary force introduction of sample solution allowed spontaneous release of probe molecules to be reacted with analyte molecules. Here, we applied this technique to IEF-based immunoassay by immobilizing carrier ampholyte and fluorescently-labeled antigen inside the capillary.

RRC was prepared by coating a poly(dimethylacrylamide) by covalent bonding for suppressing EOF and further coated by carrier ampholyte (Biolyte 3/10) and fluorescently-labeled antigen (Rabbit IgG-FITC) by physical adsorption. In order to proof the principle, fluorescently-labeled antibody (Anti-rabbit IgG-RBITC) was used as a sample antibody.

The fluorescence micrographs obtained by using different optical filters, 10 minutes after the electric field application, allowed us discrimination of free antigen and immuno complex. By using these optical filters, two peaks for FITC filter and one peak for RBITC filter were observed at the same view. Since the peak observed by RBITC filter overlapped with one of the two peaks observed by FITC filter, that peak can be assigned to immuno complex. Increasing the antibody concentration decreased the other peak by FITC filter, therefore, the other peak was assigned to the free antigen. Concentration factor of IEF estimated by using peak half width and capillary length (ca. 4cm) was ca.2000.

Based on the calibration curve for sample antibody using peak area obtained by the immuno complex peak in fluorescence image (FITC filter), a linear calibration line was obtained in the range of 11-1100 pg/mL. In addition, highly-sensitive detection of cancer marker protein (alpha fetoprotein (AFP)) was also successfully achieved by using this technique.

In conclusion, we have successfully demonstrated the concept of simple and highly-sensitive immunoassay. Since the detection condition for CCD camera has not been optimized yet, detection of proteins at lower concentration range is expected to be achieved.

業績リスト

１．原著論文

1) Kataoka M., Yokoyama H., Henares TG., Kawamura K., Yao T., and ＊Hisamoto H., ″Reagent-Release Capillary Array-Isoelectric Focusing Device as a Rapid Screening Device for IEF Condition Optimization ″, Lab Chip, 10, 3341-3347 (2010)

2) Kataoka M., Yokoyama H., Henares TG., Kawamura K., Yao T., and ＊Hisamoto H., ″Reagent-Release Capillary Array-Isoelectric Focusing Device For Rapid Screening of Protein Analysis Conditions″, Proceedings of Micro Total Analysis Systems, 1040-1042 (2010)

２．著書・総説

なし

３．会議発表

1) 横山大輝、片岡正輝、八尾俊男、川村邦男、＊久本秀明: 試薬放出キャピラリー等電点電気泳動に基づく高感度バイオ分析デバイスの開発，第 71 回分析化学討論会，島根大学，島根，(2010)．[国内学会ポスター]

2) 横山大輝、片岡正輝、八尾俊男、川村邦男、＊久本秀明: 試薬放出キャピラリー等電点電気泳動に基づく高感度バイオ分析，日本分析化学会近畿支部夏季セミナー2010，大阪府羽衣青少年センター，大阪，(2010)．[国内学会ポスター]

3) 横山大輝、片岡正輝、八尾俊男、川村邦男、＊久本秀明: 試薬放出キャピラリー等電点電気泳動に基づく高感度バイオ分析デバイスの開発～キャピラリー内 pH 勾配形成の基礎検討～，東京コンファレンス 2010，幕張メッセ国際会議場，千葉，(2010)．[国内学会ポスター]

4) 横山大輝、片岡正輝、八尾俊男、川村邦男、＊久本秀明: 試薬放出キャピラリー等電点電気泳動に基づく高感度バイオ分析デバイスの開発～簡便・迅速・高感度イムノアッセイの開発～，第 30 回キャピラリー電気泳動シンポジウム（SCE'10），長良川国際会議場，岐阜，(2010)．[国内学会ポスター]

5) 野川悠人・横山大輝、川村邦男、＊久本秀明: 試薬放出キャピラリー等電点電気泳動に基づく高感度バイオ分析デバイスの開発～超高感度酵素活性検出法の開発～，第 30 回キャピラリー電気泳動シンポジウム（SCE'10），長良川国際会議場，岐阜，(2010)．[国内学会ポスター]

6)＊久本秀明: 簡便な高感度バイオ分析に向けた試薬放出キャピラリーIEF，第 30 回キャピラリー電気泳動シンポジウム（SCE'10），長良川国際会議場，岐阜，(2010)．[国内学会招待講演]

４．その他　（例えば特許など）

なし

細胞界面のナノ構造制御による機能性ハイブリッド組織の創製

研究代表者：阪大院工応用化学専攻・松崎典弥

１．緒言

これまで、再生医療や組織工学を目的として様々な高分子材料や細胞とのハイブリッドマテリアルが活発に研究されてきた。しかし、マテリアル単独もしくはマテリアルに細胞を接着させただけでは十分な治療効果を得ることが困難であった。これは、従来のマテリアル－細胞ハイブリッドが標的部位の生体組織とその構造や組成、機能の面でかけ離れていることが原因と考えられる。生体組織に近い構造と機能を有するマテリアルと細胞のハイブリッドを構築することが可能であれば、再生医療を本格化できると期待される。細胞は、外部との情報交換や機能発現、他の細胞との複合化を細胞膜界面で制御している。生体内において細胞界面のマイクロ環境を制御し、機能発現に重要な役割を果たしているが細胞周辺に存在する細胞外マトリックス（ECM：コラーゲンやフィブロネクチン等のタンパク質や多糖類）である。例えば、細胞接着は細胞膜のインテグリン分子と ECM の相互作用であり、また、フィブロネクチンと細胞膜の相互作用が細胞の生存や増殖、シグナル伝達、分化誘導に強く影響することが明らかにされている。近年、ECM に着目した新たな材料設計が提案されているが、生体内の ECM のように細胞表面と直接複合化して細胞の界面構造と機能を制御する材料の開発には至っていない。

我々は、細胞表面に人工 ECM としてナノ薄膜を直接形成し、細胞界面の構造と細胞機能を制御する細胞積層法を考案した。具体的には、交互積層法によりフィブロネクチン（FN）とゼラチン（G）のナノ薄膜（数 nm から数百 nm）を細胞表面へ形成する手法である。これまでの研究より、このナノ薄膜が細胞膜のインテグリン分子と結合して ECM と同様の機能を発現し、複数種類の細胞の組織化（積層化）が可能であることや生体内と同様の機能を発現することを見出している（図 1）[1-3]。このような現象は通常の細胞培養では見られないため、本手法が論理的に矛盾せず、細胞の界面構造と機能の制御技術として有効であることを証明している。

本研究では、i) 様々なナノ薄膜による細胞の界面構造と機能の制御、ii) 生体組織に近い構造と機能を有するハイブリッドマテリアルの構築を目標とした。細胞のソフト界面をナノレベルで制御することで、マテリアルと細胞が積極的に相互作用した革新的なマテリアル－細胞ハイブリッドの構築が期待される。昨年度までの研究成果により、細胞表面に形成したナノ薄膜の種類や電荷などにより細胞機能が制御できることを見出し[4]、積層化することで炎症発現を抑えて細胞機能が向上することなどを明らかにしてきた[5]。本年度は、本手法により構築したハイブリッド血管モデル組織を用い、血管の収縮や弛緩を調節する一酸化窒素（NO）シグナルの産生や伝達を生体外で評価した。

２．研究経過

ハイブリッド血管組織の構築とシグナル物質の産生と拡散評価

血管は、組織や臓器への栄養供給だけでなく薬剤送達や血圧調節、癌細胞の転移など、様々な生理現象や治療において重要な役割を担っている。一般的に、血管は、血管内皮細胞の単層構造である内膜、複数層の平滑筋（壁）細胞で構成される中膜、線維芽細胞の結合組織からなる外膜、の三成分の層構造で構成される。特に、血管内皮細胞は物理化学的刺激に応答するセンサー表面として働き、血管の機能に重要な役割を果たしている。例えば、血管弛緩性ペプチドホルモンであるブラジキニンを内皮細胞が受け取ることで NO などのシグナル分子が産出され、周囲の平滑筋細胞が NO 分子を受け取ることで弛緩して血管が拡張し、血圧が降下する。従って、血管内における内皮細胞から平滑筋細胞への NO 分子の拡散を定量的かつ空間的に評価することは、高血圧や糖尿病などの創薬研究において大変重要である。これまで主に動物実験により評価されてきたが、低い再現性、動物種差の問題、詳細な定量評価が困難、などの課題があった。ヒト細胞を用いて生体外で三次元的な血管モデル組織を構築し、NO 分子の三次元拡散を定量的に評価できれば、動物実験に代わる新しい手法として有用である。

血管モデル組織内に拡散した NO 分子の濃度を定量的に評価する目的で、NO 分子に応答して蛍光を発するマイクロセンサー粒子を作製した[6]。NO 蛍光プローブである 4,5-ジアミノフルオレセイン（DAF-2）を直径 1.6 μm のメソポーラスシリカ粒子に内包し、生体適合性高分子であるキトサン（CT）とデキストラン硫酸（DS）の交互積層薄膜で粒子をキャップすることで、1 ヶ月以上安定なセンサー粒子が調製で

きた。このセンサー粒子はおよそ 5-500 nM の NO 分子を検出可能であり、血管内皮細胞が産出する数百 nM の NO 分子の検出に適していた。

細胞積層法を用いてヒト大動脈血管内皮細胞（HAEC）とヒト大動脈血管平滑筋細胞（AoSMC）を積層する際に、このセンサー粒子を FN-G 薄膜表面へ吸着させることで、各細胞層間にセンサー粒子を配置した 5 層構造のハイブリッド血管組織を作製した（図 1）。ブラジキニンなどの NO 産生薬剤を添加することで内皮細胞から NO 分子が産出され、下層の平滑筋層へ拡散する。この拡散の際に、平滑筋層に存在するセンサー粒子が NO 分子と反応することで蛍光を発するため、共焦点レーザー顕微鏡によりセンサー粒子の蛍光強度を測定することで、各層の所定の位置の NO 分子濃度を検出できると期待される。

本手法を用いて、ブラジキニン添加後の NO 分子濃度の変化を経時的に解析した結果、内皮細胞上部と比較して下部への NO 産生が多いことや、平滑筋細胞と積層することで内皮細胞の NO 産生量が 2 倍以上向上することが明らかとなった [7]。さらに、共焦点レーザー顕微鏡観察の結果から平滑筋細胞層への NO 拡散距離を算出したところ、およそ 60 μm と見積もられた。これまでの動物実験等により、NO 拡散距離はおよそ 100 μm と見積もられており [8]、また、血管壁内部でおよそ 40%の NO 分子が化学反応により消費されるため [8]、本研究で見積もられた NO 拡散距離は、生体内の血管とほぼ同等であると考えられる。生体外で人工的に構築した血管モデル組織を用い、NO 分子の拡散を定量的かつ空間的に評価することに初めて成功した。

細胞積層法を用いてハイブリッド血管組織を作製し、血管内の各微小領域における NO 濃度を経時的かつ定量的に評価できた。本血管モデル組織が生体血管に近い薬剤応答を示したことから、NO 産生以外の他の薬剤応答評価への応用が可能である。さらに、マイクロセンサー粒子に担持させる蛍光プローブを変えることで pH やカルシウムイオンなど様々なセンサー粒子が調製可能であり、細胞積層法で他の組織モデルも作製できることから、医療・創薬分野における幅広い応用展開が期待される。

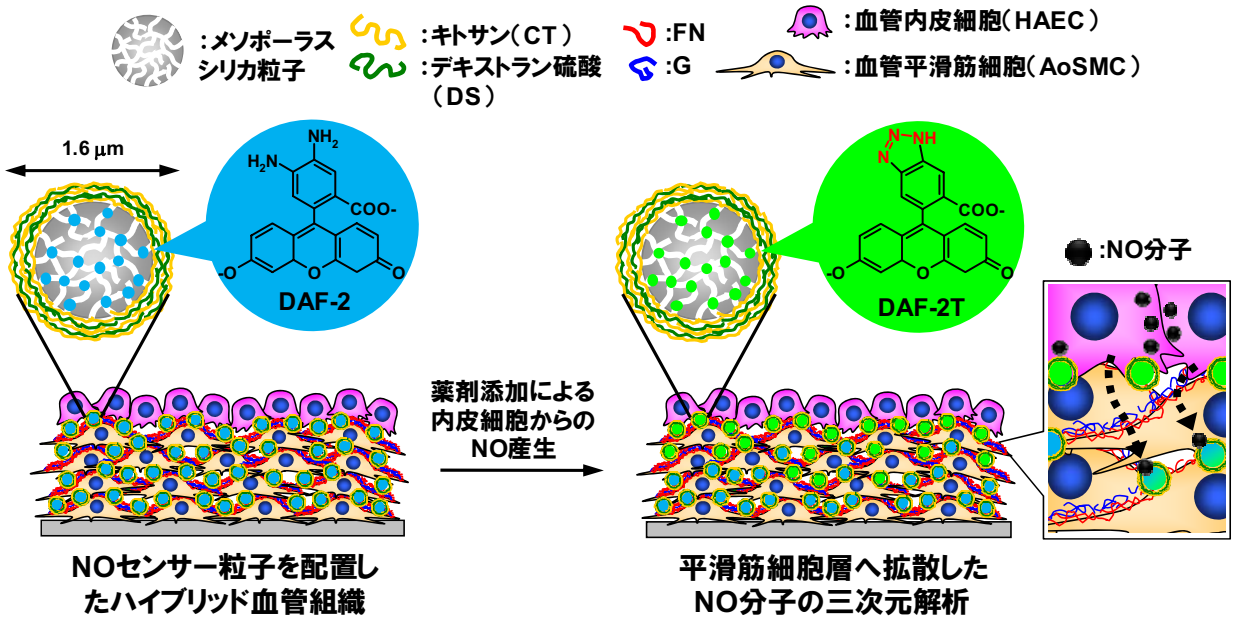


図 1. ハイブリッド血管組織による NO 分子の三次元拡散評価イメージ。

【参考文献】

1) **M. Matsusaki**, K. Kadowaki, Y. Nakahara, and M. Akashi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 4689 (2007).
2) Y. Nakahara, **M. Matsusaki**, and M. Akashi, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **18**, 1565 (2007).
3) **M. Matsusaki**, K. Kadowaki, E. Adachi, T. Sakura, U. Yokoyama, Y. Ishikawa, and M. Akashi, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn. in press*.
4) K. Kadowaki, **M. Matsusaki**, and M. Akashi, *Langmuir* **26**, 5670 (2010).
5) K. Kadowaki, **M. Matsusaki**, and M. Akashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **402**, 153 (2010).
6) S. Amemori, M. **Matsusaki**, and M. Akashi, *Chem. Lett.* **39**, 42 (2010).
7) **M. Matsusaki**, S. Amemori, K. Kadowaki, and M. Akashi, *Angew. Chem. Int. Ed. in press*.
8) J. B. Malinski and Z. Taha, *Nature* **358**, 676 (1992).

Development of Functional Hybrid-Tissues by Control of Cellular Interface

Michiya Matsusaki
Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University
PRESTO-JST

2-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
Tel: +81-6-6879-7357, Fax: +81-6-6879-7359, E-mail: m-matsus@chem.eng.osaka-u.ac.jp

The creation of artificial three- dimensional (3D) tissues possessing a similar structure and functions as natural tissue is a key challenge for implantable tissues in tissue engineering, and for model tissues in pharmaceutical assay. The cells are surrounded by extracellular matrix (ECM) fibers, typically composed of collagen and fibronectin (FN), and the fibrous meshwork of the ECM controls a dynamic cellular interface for cell adhesion, differentiation, morphology, proliferation, and viability. Recently, the topological control of biodegradable porous scaffolds, especially nanofiber scaffolds have attracted attention due to their high porosity and the controlled alignment of the fibers to control cellular function and develop the 3D-engineered tissues. However, the 3D-engineered tissues which precisely controlled cell type, cell alignment, and cell-cell interactions in three-dimensions have not been developed yet. A conventional approach using biodegradable matrices seems to have a limitation to satisfy above requests. A novel bottom-up approach using multiple cell types as pieces of tissues is expected to solve the problem. Recently, we have developed simple and unique bottom-up approach, "hierarchical cell manipulation using nanofilms", which applies the use of nanometer-sized FN-gelatin (G) films as a nano-ECM. The FN-G nanofilms on cell surfaces control the cellular interfaces to provide cell-cell attachment in lengthwise direction. We have discovered that at least approximately 6 nm thick FN-G films are required as a stable adhesive surface for second cell adhesion. We successfully developed hierarchical cellular multilayers composed of various types of cells.

In this project, we aim i) Structural and functional control of cellular interface using varied nanofilms and ii) Development of functional hybrid tissues possessing controlled structures and functions similar to a natural tissues. By controlling cellular interface at nanometer level, an innovative material-cell hybrid will be constructed. The interactive hybrid tissues can be useful for tissue engineering. From the results of the research on last year, we reported i) Elucidation of mechanism on the fibril formation of nanofilms prepared on cell surface. Here, we report ii) Quantitative 3D-analyses of nitric oxide diffusion in a 3D-artery model.

A blood vessel is crucial not only for circulatory diseases and treatments, but also for the biological evaluation of drug diffusion to target tissues, the penetration of cancer cells or pathogens, and the control of blood pressure. A blood vessel is generally composed of three distinct layers: the intima, an inner single layer of endothelial cells (ECs); the media, medium layers of smooth muscle cells (SMCs); and the adventitia, an outer layer of fibroblast cells. The nitric oxide (NO) produced from ECs diffuses into SMCs through their cell membranes, and activates guanylate cyclase to produce intracellular cyclic guanosine monophosphate (cGMP), which induces a signalling pathway mediated by kinase proteins leading to SMC relaxation. Accordingly, quantitative, kinetic, and spatial analyses of the extracellular delivery of NO molecules from the EC layer to the SMC layers upon drug stimulation are crucial for pharmaceutical and biomedical evaluations of hypertension and diabetes. Thus, development of a convenient and versatile method for the *in vitro* quantitative and spatial analyses of NO diffusion inside the artery wall instead of animal experiments is important for biological and pharmaceutical applications.

We recently reported biocompatible and highly sensitive NO sensor particles prepared by LbL assembly. The mesoporous, micrometer-sized silica particles encapsulating the 4,5-diaminofluorescein (DAF-2), NO fluorescent indicator dye, were covered with biocompatible chitosan (CT)-dextran sulfate (DS) LbL films to provide cytocompatibility, and to inhibit leakage of the DAF-2. The NO sensor particles (SPs) showed high NO-sensitivity at 5-500 nM, which is sufficient to detect NO at concentrations of hundreds of nM (EC production level). We combined both the SP technique and hierarchical cell manipulation to develop five layered (5L)-artery models including SPs using human aortic smooth muscle cells (AoSMCs) and human aortic endothelial cells (HAECs). We demonstrated a quantitative 3D-analysis of NO diffusion from the uppermost 1L-HAECs to the underlying 4L-AoSMCs in 5L-artery models using the SPs. The distance of NO diffusion from the top HAEC layer to the underlying AoSMC layers was estimated at approximately 60 μm. Although this value is slightly lower than the reported *in vivo* NO diffusion distance of approximately 100 μm, the obtained value is reasonable because it is known that about 37% of the produced NO is consumed in chemical reactions in the artery walls. These results suggest that this technique will be a useful method for *in vitro* artery assays instead of *in vivo* animal experiments.

業績リスト

１．原著論文（16 報のうち 10 報抜粋）

1) **M. Matsusaki**, S. Amemori, K. Kadowaki, and M. Akashi, Quantitative 3D-Analysis of Nitric Oxide Diffusion in a 3D-Artery Model Using Sensor Particle. ***Angew. Chem. Int. Ed.***, *in press.*
2) A. Nishiguchi, H. Yoshida, **M. Matsusaki**, and M. Akashi, Rapid Construction of Three-dimensional Multilayered Tissues with Endothelial Tube Networks by the Cell-accumulation Technique. ***Adv. Mater.***, *in press.*
3) **M. Matsusaki**, R. Amekawa, M. Matsumoto, Y. Tanaka, A. Kubota, K. Nishida, and M. Akashi, Physical and Specific Crosslinking of Collagen Fibers by Supramolecular Nano-gelators. ***Adv. Mater.***, *in press.*
4) **M. Matsusaki**, K. Kadowaki, E. Adachi, T. Sakura, U. Yokoyama, Y. Ishikawa, and M. Akashi, Morphological and Histological Evaluations of 3D-Layered Blood Vessel Constructs Prepared by Hierarchical Cell Manipulation Technique, ***J. Biomater. Sci.: Polymer Edn.***, *in press*.
5) **M. Matsusaki**, M. Matsumoto, T. Waku and M. Akashi, Self-Assembled Structure of Peptide Nanospheres Induces High Stability against Hydrolysis and Sterilization, ***J. Biomater. Sci.: Polymer Edn.*** **22**, 1035 (2011).
6) K. Kadowaki, **M. Matsusaki** and M. Akashi, Three-dimensional Constructs Induce High Cellular Activity: Structural Stability and the Specific Production of Proteins and Cytokines, ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*** **402**, 153 (2010).
7) H. Yoshida, **M. Matsusaki** and M. Akashi, Development of Thick and Highly Cell-Incorporated Engineered Tissues by Hydrogel Template Approach with Basic Fibroblast Growth Factor or Ascorbic Acid, ***J. Biomater. Sci.: Polymer Edn.*** **21**, 415 (2010).
8) T. Imoto, T. Kida, **M. Matsusaki** and M. Akashi, Preparation and Unique pH-responsive Properties of Novel Biodegradable Nanocapsules Composed of Poly(γ-glutamic acid) and Chitosan as Weak Polyelectrolytes, ***Macromol. Biosci.*** **10**, 271 (2010).
9) A. Nishiguchi, H. Yoshida, **M. Matsusaki** and M. Akashi, Preparation of Reduction-Sensitive Nanogels with a Large Swelling Capacity by a Surfactant-Free Semi-Precipitation Method, ***Chem. Lett.*** **39**, 1184 (2010).
10) T. Waku, M. Matsumoto, **M. Matsusaki** and M. Akashi, Complete Surface Control of Peptide Nanospheres with Detachable and Attachable Polymer Brush Layers, ***Chem. Commun***. **46**, 7025 (2010).

２．著書・総説

1) 松崎典弥，技術融合により達成される組織工学，*バイオマテリアル－生体材料－*，日本バイオマテリアル学会，28(3), 199-200 (2010).
2) H. Ajiro, T. Kida, **M. Matsusaki**, T. Serizawa, M. Akashi, LbL Assemblies Using van der Waals or Affinity Interaction and Their Applications, *G. Decher and J. Schlenoff Eds., Multilayer Thin Films E2* (Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim), *in press*.
3) 和久友則，松本匡広，松崎典弥，明石　満，第 III 編　第 9 章，コアーコロナ型ペプチドナノスフェアの機能，*コアシェル微粒子の設計・合成技術・応用の展開*，シーエムシー出版，226-236 (2010).
4) T. Akagi, **M. Matsusaki**, M. Akashi, Chapter 7, Pharmaceutical and Medical Applications of Poly-Gamma-Glutamic Acid, Amino-Acid Homopolymers Occurring in Nature, *Microbiology Monographs* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg) 15, 119-153 (2010).
5) 松崎典弥, 明石　満, 第 3 編　第 4 章 細胞積層組織チップへの応用, *2010 インクジェット技術大全*, 電子ジャーナル, 54-57 (2010).

３．会議発表（9 件の招待講演のうち 4 件抜粋）

1) 松崎典弥、門脇功治、明石　満、細胞界面のナノ接着制御による機能性ハイブリッド組織の創製、日本化学会第 91 春季年会特別企画、2011 年 3 月、東京
2) 松崎典弥、門脇功治、明石　満、ナノ構造制御薄膜による細胞界面の制御と三次元組織構築、10-6 ポリマーフロンティア 21、2011 年 3 月、東京
3) 松崎典弥、細胞積層技術による三次元生体組織モデルの構築と創薬研究への応用、第 10 回ヒューマンサイエンス研究資源バンクセミナー、2011 年 1 月、大阪
4) **M. Matsusaki**, Development of 3D-artificial tissues by cell surface control using a layer-by-layer nanofilm, PACCON2011, 2011 年 1 月, Thailand

４．特許出願・その他

1) 明石　満・松崎典弥・佐倉武司，細胞の三次元構造体、及び、これを製造する方法，特願 2011-71939
2) 明石　満・松崎典弥・佐倉武司・橋本公二・白方裕司・平川聡史，人工皮膚モデルの製造方法、及び人工皮膚モデル，特願 2011-72207
3) 明石　満・松崎典弥・佐倉武司，細胞の三次元構造体、及び、これを製造する方法，特願 2010-252514
4) 明石　満・松崎典弥・宮園浩平・狩野光伸・細谷仁美・片岡一則・オラシオ　アマデオ　カブラル　ロレンゾ・伊地知　秀明，腫瘍組織モデルの製造方法，特願 2010-138465

高分子ミセルキャリヤーの免疫原性制御のためのインターフェース設計

研究代表者：東京慈恵会医科大学・横山昌幸

研究分担者：星薬科大学・米谷芳枝

連携研究者：東京慈恵会医科大学・白石貢一

１．緒言

高分子ミセルは薬物のターゲティングキャリヤーとして研究されており、最近は画像診断の造影剤としても研究されている。この構造は図１に示すように、ＡＢ型のブロックコポリマーを会合させて、薬物や造影剤成分を封入した内核と、その周りを覆うポリエチレングリコール（PEG）外殻から構成されている。

ＰＥＧは肝臓や脾臓での取り込みを抑制して、血液中を長時間安定に循環する性質をもたらす結果、EPR 効果(固形がん血管の高分子に対する透過性が高い性質)を利用した固形がんターゲティングを可能とする。一方、ＰＥＧを有するために、ABC 現象の懸念がある。ABC 現象とは、Accelerated Blood Clearance 現象のことであり、図２に示すように複数回投与すると、２回目投与の際に、血液中の濃度が急激に低下する現象である。もし、高分子ミセルがＡＢＣ現象を起こすとすると、表１に示すように、薬物及び造影剤のターゲティングキャリヤーとして高分子ミセルを用いることに障害が生じる。

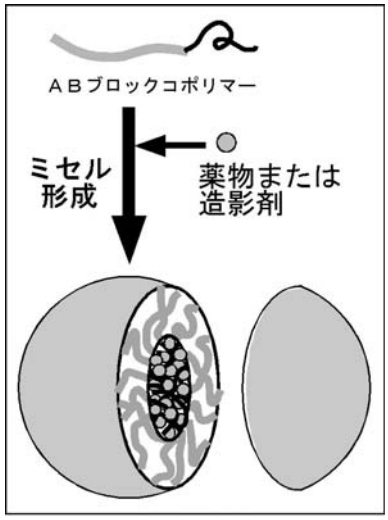


図１　高分子ミセル
キャリヤーシステム

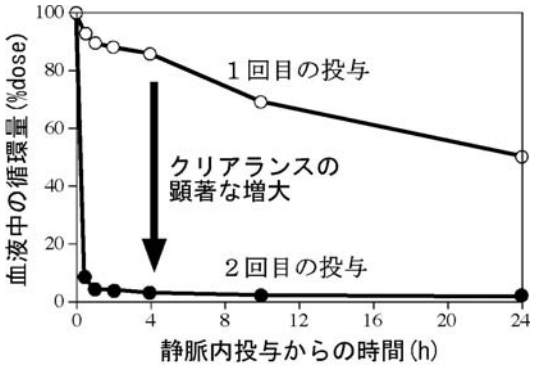


図２　ＡＢＣ現象の例

表1　ABC現象による医療上の問題

1，薬物キャリヤーシステムの場合
- 細胞障害性の強い薬物の場合（大部分の抗がん剤）
  → 問題ない（ABC現象を引き起こす免疫細胞が薬物によって傷害されてABC現象が抑制される）
- 細胞障害性の低い薬物の場合
  → 使用が大いに制限される

2，造影剤の場合
→ 使用することがほとんど不可能

また、このＡＢＣ現象は、免疫作用であることはわかっているが、どの様な界面がこの現象を起こしているかについては不明な点が多い。本研究の目的は、様々な高分子ミセルの内核／外殻界面のＡＢＣ現象との相関を解析し、ＡＢＣ現象の機構解明をするとともに、高分子ミセルの造影剤と薬物キャリヤーシステムにおける ABC 現象の医療応用上の影響を（あるかないかを含めて）明らかにすることである。

２．研究経過

［実験］MRI 造影剤キャリヤーシステムの高分子構造は図３に示すもので、造影剤成分である Gd イオンをキレートしている親水性の内核と、PEG 鎖の外殻から形成される高分子ミセルである。一方、薬物キャリヤーの高分子ミセルは PEG-PBLA(ポリ(β−ベンジル L−アスパルテート)ブロックコポリマーからなるものを用いた。PEG-PBLA は２回目投与で PEG-リポソームで検出すると、ABC 現象を引き起こすことがわかっている。実験は、図 4 に示すように１週間の投与間隔を置いて、２回投与し、２回目投与後６時間後の血中濃度を測定した。血中濃度が下

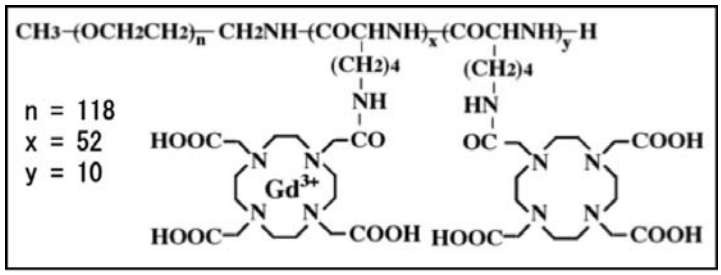


図3　高分子ミセルMRI造影剤の高分子構造

がればABC現象が起きたことになる。濃度の測定は投与サンプルに含まれるGdイオンをICPで定量することによった

［結果と考察］

（１）高分子ミセルMRI造影剤

図５は２回目の投与でGdイオンを含有するPEGリポソームを用いて行ったものである。１回目にPEGリポソーム（Gd不含）やGd含有PEGリポソームを投与したマウスでは、２回目に投与したGd含有PEGリポソームが血液中に見いだせないことから、ABC現象が起きていることが確認された。一方、１回目に高分子ミセルを投与した場合には、血液中にGd含有PEGリポソームが20%dose/g以上存在することから、この高分子ミセルはABC現象を誘起しないことがわかった。また、図６では、1回目のどの投与量においても、2回目に投与した造影剤ミセルのマウスでの血中濃度に変化は観察されなかった。つまり、造影剤ミセルではABC現象を起こさない。また,1回目の投与でPEG-修飾リポソームによってABC現象を引き起こした場合でも,２回目に投与した高分子ミセルMRI造影剤は血中濃度が変わらず、ABC現象によって補足されないことはこの造影剤の医療での高い有用性をしめす。

図4　ABC現象測定実験スキーム

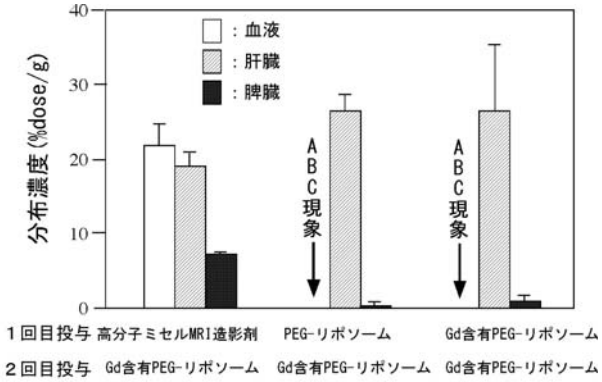


図5　MRI造影剤のABC現象の測定

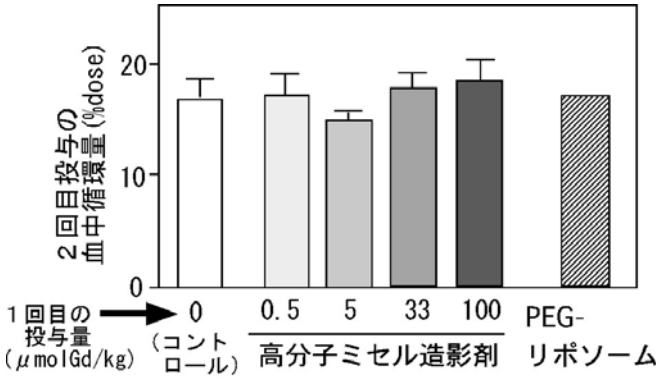


図６　高分子ミセル造影剤のＡＢＣ現象
（２回目の投与は高分子ミセル造影剤で検出）

（２）薬物キャリヤー用高分子ミセルキャリヤー

2度目の投与でPEG-修飾リポソームで検出した結果を示す。3種類の高分子ミセルの中で、PEG-PBLAブロックコポリマーからなるミセルのみがABC現象を示した。次にPEG-PBLAに絞って2回目に投与するものを変えた実験が図８である。PEG-リポソームで検出すると(a)のようにABC現象が観察されるが、FITCラベル下PEG-PBLAミセルで検出すると(b)に示す様にABC現象は観察されない。つまり、PEG-PBLAミセルはABC現象を引き起こすが、ABC現象に認識されない極めて興味深い事実が判明した。

以上の結果から、以下の事柄が成果として得られた。

・内核の性質によりABC現象挙動は異なる。

・親水性内核の高分子ミセル造影剤はABC現象を起こさず、認識もされない。医療での高い有用性が示された。

・薬物キャリヤー用の疎水性内核高分子ミセルは、内核の化学構造の違いにより、ABC現象を引起す場合とそうでない場合がある。また、引起す場合でも、ABC現象では認識されない。

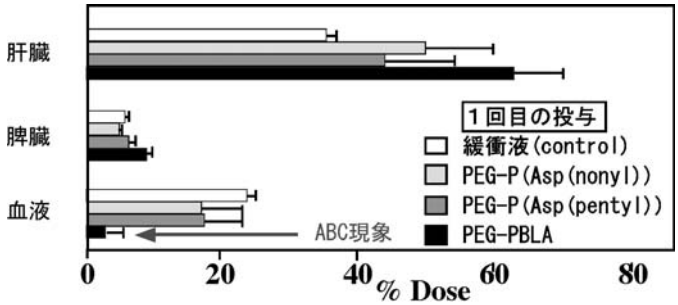


図7　PEGリポソームので検出したABC現象（ 投与２４時間後）

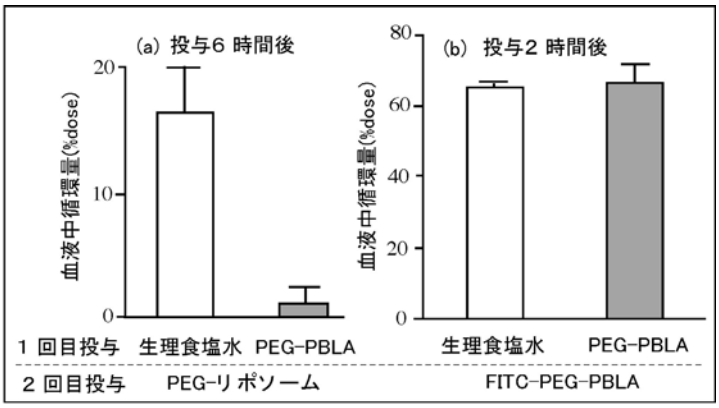


図8 薬物キャリヤー高分子ミセル(PEG-PBLA)のABC現象

Interface molecular design for control of immune reactions of polymeric micelle carrier systems

Masayuki Yokoyama

The Jikei University School of Medicine

3-25-8, Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461 Japan
TEL: +81-3-3433-1111 ext. 2336 FAX: +81-3-3459-6005
E-mail: masajun2093ryo@jikei.ac.jp

Accelerated Blood Clearance (ABC) phenomenon for PEG-modified liposomes. The long-circulating character is lost when the PEG-coated liposomes is intravenously injected at the second time of injection with appropriate dose and interval from the first injection.

As illustrated in Figure 1, blood circulating character is completely changed at the second injection, therefore, targeting abilities are lost in a environment where the ABC phenomenon occurs. We are studying polymeric micelle MRI contrast agents and polymeric micelle drug carrier systems for tumor imaging and tumor targeting, respectively. The polymeric micelle MRI contrast agents possess PEG chain as the micelle outer shell, therefore, the ABC phenomenon may happen for the polymeric micelles. If the ABC phenomenon happens, clinical values of the polymeric micelle systems are largely lowered.

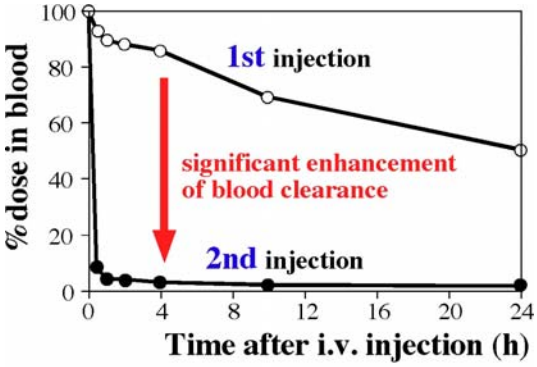


Figure 1 Accelerated Blood Clerance (ABC) phenomenon.

We injected two times of polymeric micelles (MRI contrast agent or carriers for drug incorporation), and measured concentrations in blood. If the concentrations are lowered substantially compared with the control, ABC phenomenon happens. We used PEG-modified liposomes as a positive control of the ABC phenomenon.

Fig. 2 shows results for the PEG-liposome used in the second injection. The polymeric micelle MRI contrast agent was revealed to induce no ABC phenomenon. Fig. 3 shows results for the polymeric micelle MRI contrast agent used in the second injection. No ABC phenomenon was observed in any first injection dose. Very interestingly, no ABC phenomenon was observed even when the positive control (PEG-liposome) was injected at the first injection. This indicates a preferable character of the polymeric micelle MRI contrast agent possibly owing to its hydrophilic inner core. This also indicates high values of this contrast agent in its clinical use.

On the other hand, ABC phenomenon-induction ability was revealed to be dependent on chemical structures of the inner core for drug carrier polymeric micelle systems which possess hydrophobic inner core. (Some micelle induced ABC phenomenon, while the others did not.)This fact indicates significance of the inner core chemical structures for ABC effect.

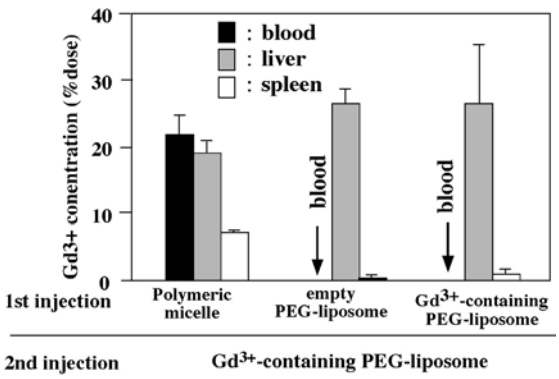


Figure 2. Biodistribution with Gd^{3+}-containing liposome at the second injection.

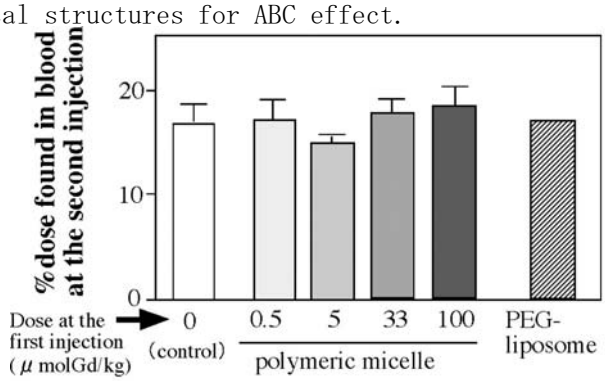


Figure 3. Biodistribution with Gd^{3+}-containing liposome at the second injection.

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) Huili Ma, Kouichi Shiraishi, Masayuki Yokoyama, Yoshie Maitani et al., Accelerated Blood Clearance Was Not Induced for a Gadolinium-Containing PEG-poly(L-lysine)-Based Polymeric Micelle in Mice, Pharmaceutical Research, 27, 296-302 (2010)

2) *Katsuyoshi Hori, Masamichi Nishihara, and Masayuki Yokoyama, Vital microscopic analysis of polymeric micelle extravasation from tumor vessels: macromolecular delivery according to tumor vascular growth stage, Journal of Pharmaceutical Sciences, 99, 549-562 (2010)

3) *Katsuyoshi Hori, Masamichi Nishihara, and Masayuki Yokoyama, The Combretastatin Derivative Cderiv, a Vascular Disrupting Agent, Enables Polymeric Nanomicelles to Accumulate in Microtumors, Journal of Pharmaceutical Sciences, in press

4) Isamu Akiba, Kazuo Sakurai, Taku Sato, Kouichi Shiraishi, Masayoshi, Yokoyama, et al., Encapsulation of a Hydrophobic Drug into a Polymer-Micelle Core Explored with Synchrotron SAXS. Langmuir, 26 (10), 7544-7551 (2010)

5) Kouichi Shiraishi, Yoshie Maitani, Masayuki Yokoyama,et al., Synthesis of Poly(ethylene glycol)-b-Poly(L-lysine) Block Copolymers Having Gd-DOTA as MRI Contrast Agent and Their Polymeric Micelle Formation by Polyion Complexation, Journal of Controlled Release, 148(2):160-7 (2010)

6) Michiko Yokosawa, Yoji Yamashita, Masayuki Yokoyama, Teiji Tominaga, et al., Convection-enhanced delivery of a synthetic retinoid Am80, loaded into polymeric micelles, prolongs the survival of rats bearing intracranial glioblastoma xenografts, Tohoku J. Exp. Med., 221(4), 257-64 (2010)

7) Yoshiko Harada, Yoshie Maitani, Masayuki Yokoyama, eta al., Effects of organic solvents on drug incorporation into polymeric carriers and morphological analyses of drug-incorporated polymeric micelles, International Journal of Pharmaceutics, 404: 271-280 (2011)

２．著書・総説

1) Masayuki Yokoyama, Polymeric micelles as a novel drug carrier system and their required considerations for clinical trials. Expert Opinion on Drug Delivery, 7(2), 145-58 (2010)

2) 横山昌幸、高分子ミセルの薬剤学分野への応用、薬剤学、70(1)、27-31, (2010)

3) 横山昌幸、薬物ターゲティング評価への分子イメージングの利用、佐治英郎編集、遺伝子医学　MOOK18、創薬研究への分子イメージング応用、127-132、メデイカルドゥ (2010)

4) Masayuki Yokoyama, Clinical applications of polymeric micelle carrier systems in chemotherapy and image diagnosis of solid tumors, Journal of Experimental and Clinical Medicine, in press

３．会議発表

1) 白石貢一、馬会利、川野久美、米谷芳枝、横山昌幸、高分子ミセル MRI 造影剤と ABC 現象の検証、第 5 回日本分子イメージング学会学術集会、2010/5/22

2) 白石貢一、馬会利、川野久美、米谷芳枝、横山昌幸、高分子ミセルキャリア内核の影響による ABC 現象の発現と回避、第 26 回日本 DDS 学会学術集会、2010/6/17

3) 白石貢一、馬会利、川野久美、米谷芳枝、横山昌幸、高分子ミセル MRI 造影剤の頻回投与による ABC 現象への影響と診断への有用性、第 26 回日本 DDS 学会学術集会、2010/6/17

4) M. Yokoyama, K. Shiraishi, H. Ma, T. Minowa, K. Kawano, Y. Hattori, and Y. Maitani, Does ABC phenomenon occur for polymeric micelle MRI contrast agents?, 37 th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, 2010/7/14

5)白石貢一、馬会利、川野久美、米谷芳枝、横山昌幸、第 59 回高分子討論会、高分子ミセル、リポソームの親水・疎水性界面の ABC 現象への影響、2010/9/15

6) Masayuki Yokoyama, PACIFICHEM2010, Advances in Nanomedicine 2010 Symposium, Combined diagnosis and chemotherapy of solid tumors using polymeric micelle carriers, 2010.12.16.

7) Kouichi Shiraishi1, Huili Ma, Kumi Kawano, Yoshie Maitani, and Masayuki Yokoyama, PACIFICHEM2010, ABC phenomenon of nanocarrier-based MRI contrast agents and their importance for tumor targeting by the EPR effect, 2010/12/18.

8) 横山昌幸、白石貢一、「ソフトインターフェースの分子科学」第５回公開シンポジウム、高分子ミセルキャリヤーの免疫原性制御のためのインターフェース設計、2011/2/3/

４．その他　（例えば特許など）　なし

NS ポリペプチドの特性解析と細胞磁気ラベリングへの応用

研究代表者：東京農工大学大学院工学研究院・吉野知子

１．緒言

磁性粒子はその特性から細胞等の回収・検出をはじめとし、MRI の造影剤やガンの温熱治療などに幅広く用いられている。磁性粒子表面にポリマーやタンパク質を修飾することにより医療分野で利用可能な機能性磁性粒子を創製でき、これまでに様々な磁性粒子の開発が行われてきた。特に、磁性粒子のような細胞関連アプリケーション用マテリアルを開発する際には、マテリアル表面へのタンパク質や細胞の非特異的吸着を抑制することが重要である。これまでにポリエチレングリコール、フォスファチジルコリン、デキストラン等を用いた表面修飾により、マテリアルの非特異的吸着の抑制が試みられ、生体成分との接触界面の制御が行われている。これらの表面修飾分子の特徴として、親水性であること、また非荷電もしくは分子全体の電荷が中性であることで共通しており、この性質はマテリアルとタンパク質や細胞との非特異的吸着を回避する為の表面修飾分子に必要不可欠な性質と考えられた。我々は 20 種類のアミノ酸を基に、望んだ特性をもつ人工タンパク質の構築に関する研究を推進している。前年度の研究により、ポリエチレングリコール等の機能性分子の特性を模倣し、非荷電かつ極性アミノ酸であるアスパラギン（N）とセリン（S）から構成された非天然型ポリペプチド（ＮＳポリペプチド）を磁性粒子上に配することに成功した。さらにこの粒子が細胞への非特異的な吸着を抑制可能であることを見出している。そこで本年度は、この NS ポリペプチドを導入した磁性粒子を細胞分離用の磁性担体として利用し、NS ポリペプチドの分離効率への影響を評価するとともに、磁性粒子上への NS ポリペプチドの高密度化に向けた固定化方法の検討を実施したので、その成果を下記に示す。

２．研究経過

【NS ポリペプチドの細胞分離効率への影響】

本研究では、菌体内にナノサイズのマグネタイト（バイオナノ磁性粒子、bacterial magnetic particles : BacMPs）を合成する微生物、磁性細菌を利用した。この磁性細菌内において、磁性粒子膜上に元来存在するタンパク質を足場（アンカー）とし、この遺伝子に標的遺伝子を融合することにより、磁性粒子上への標的タンパク質の発現が可能である。抗体との結合性を示す Protein G を磁性粒子膜タンパク質 Mms13 と融合する際に、NS ポリペプチド$\{(N_4S)_{20}\}$を組み込んだ融合遺伝子を設計し、Protein G をディスプレイした磁性粒子（Protein G-NS-BacMPs）を作製した。前年度の成果により、NS ポリペプチドを磁性粒子上に配することで、細胞への非特異的吸着を抑制できることを示している。そこで、本年度は NS ポリペプチドを導入した磁性粒子を細胞分離に利用した。

末梢血から CD19 陽性細胞である B 細胞を回収するために、磁性粒子上の Protein G に抗 CD19 抗体を導入し、非特異的吸着を抑制可能な分子（NS ポリペプチド）及び特異的な細胞を認識可能な分子（抗 CD19 抗体）を集積した磁性粒子を開発した。また、コントロールとして NS ポリペプチドを導入していない Protein G をディスプレイした磁性粒子（Protein G-BacMPs）を用いた。Protein G-BacMPs に対しても上記と同様に抗 CD19 抗体を導入した磁性粒子を作製し、以下の実験に使用した。得られた磁性粒子をそれぞれ末梢血に混合し、CD19 分子を細胞表面に発現してい

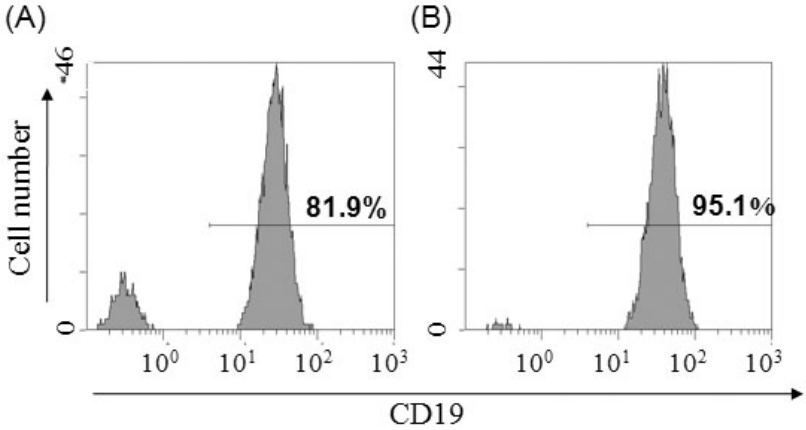


図 1 フローサイトメーターによる末梢血からの細胞分離効率の評価。（A）Protein G-BacMPs、（B）Protein G-NS-BacMPs

る B 細胞に対して磁気ラベリングした後、磁気分離・洗浄操作を行い、磁気ラベリングされていない血球細胞を取り除くことで B 細胞のみを分離した。末梢血中には、赤血球、血小板をはじめ、様々な細胞が存在するため、白血球である B 細胞の存在比はわずか 0.004 %以下である。この末梢血に上記で開発した磁性粒子を導入し分離した後、フローサイトメーターにより解析を行った結果を図 1 に示す。NS ポリペプチドを導入していない Protein G-BacMPs を使用した際には、非特異的に磁気ラベリングされたことにより回収されてきた細胞群が 20 %程度存在することが示された（図 1 A)。一方、NS ポリペプチドを磁性粒子表面にディスプレイすることで末梢血の各種細胞への磁性粒子の非特異的吸着が抑制され、95%以上の高純度で $CD19^{+}$細胞分離に成功した。

以上より、NS ポリペプチド及び Protein G を導入した磁性粒子は、目的細胞に対し高効率に結合する一方で目的外細胞には非特異的に吸着しないバイオナノ磁性粒子であり、細胞磁気ラベリング用の磁性マテリアルとして有用であることが示された。

【磁性粒子上への NS ポリペプチドの高密度化】

NS ポリペプチドを配した磁性粒子は細胞の様な比較的大きな標的に対しては効果的であるのに対し、タンパク質等の小さな標的に対しては、十分な非特異的吸着の抑制効果が現れないことが示されている。本結果は、磁性粒子表面の NS ポリペプチドの被覆密度が低いことに起因していると考えられた。本研究で使用している磁性粒子は、１つの磁性粒子上にディスプレイできる目的タンパク質数が磁性細菌内の発現システムに依存するため、NS ポリペプチドの高密度化の点で課題が残された。そこで、NS ポリペプチドの磁性粒子上への新しい導入方法として、Temporin L と呼ばれる磁性粒子上の脂質膜への挿入が実証されているペプチドを用いた NS ポリペプチド導入方法を検討した。ポリペプチドは、Temporin L（LIRGLFKSFWQVF）の N 末端に（N_4S）$_3$ を融合したものを使用した（NS-テンポリンポリペプチド)。磁性細菌から抽出した磁性粒子と蛍光標識した NS-テンポリンポリペプチドを混合し洗浄後、磁性粒子を観察した結果、粒子上への NS ポリペプチドの集積が確認された（図２)。Temporin L ペプチドを含まない NS ポリペプチドにおいては蛍光が観察されなかったことより、Temporin L ペプチドにより効率的な磁性粒子膜への NS ポリペプチドの導入が示された。さらに、磁性細菌の発現システムにより抗体と結合性をもつ Protein G と NS ポリペプチド（(N_4S）$_{20}$）の融合タンパク質をディスプレイした磁性粒子を調製し、同様に蛍光標識の NS-テンポリンポリペプチドの固定化に成功した。本研究では、抗体を導入するための Protein G、非特異的吸着を抑制できる NS ポリペプチドを高密度に配した磁性粒子を開発し、細胞への非特異的吸着を抑制した蛍光・磁気ラベリング可能なマルチ磁性マテリアルであり、様々な細胞関連のアプリケーションへの利用が期待できる。

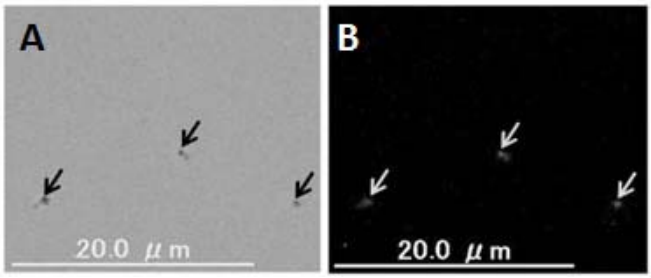


図2　蛍光標識 NS テンポリンポリペプチドを導入した磁性粒子の明視野（A)及び蛍光像（B)
（ テンポリン-NS ポリペプチド:
LIRGLFKSFWQVF-$(N_4S)_3$）

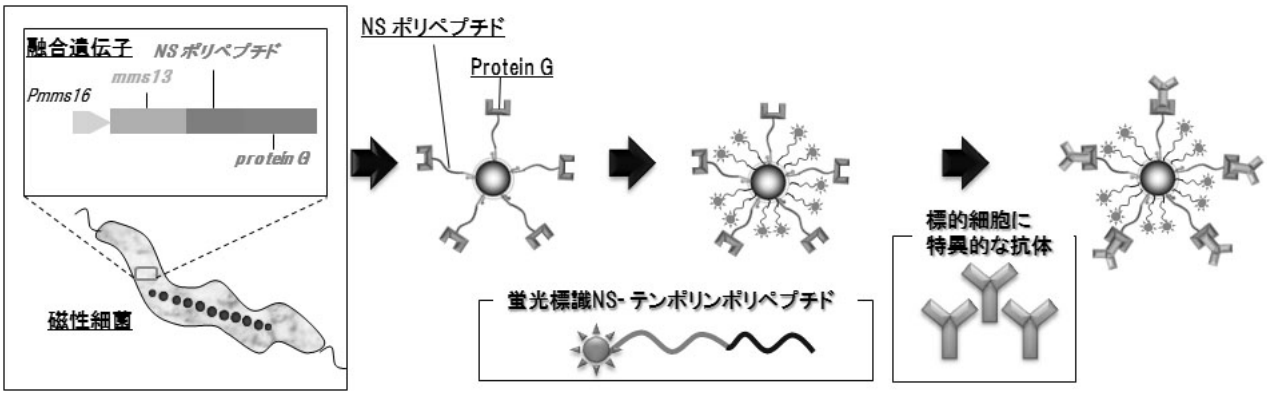


図 3　Protein G 及び NS ポリペプチドを配した磁性粒子上への NS テンポリンポリペプチド及び抗体の導入

Characterization of NS polypeptides and its application to magnetic cell labeling

Tomoko Yoshino
Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology

2-24-16, Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan
Tel: +81-42-388-7021, Fax: +81-423-85-7713, E-mail: y-tomoko@cc.tuat.ac.jp

Magnetic particles are currently one of the most important materials in the industrial sector, where they have been widely used for biotechnological and biomedical applications such as carriers for recovery and for detection of DNA, proteins, viruses, and cells. The major advantage of magnetic particles is that they can be easily manipulated by magnetic force, which enables rapid and easy separation of target molecules bound to the particles from reaction mixtures. Biomolecules such as DNA, biotin, and antibodies have been assembled onto magnetic particles and used as recognition materials for target recovery, separation, or detection.

Bacterial magnetic nanoparticles (BacMPs) are synthesized by the magnetotactic bacterium and enclosed by a stable lipid bilayer. Functional proteins have been expressed on BacMP surfaces through genetic engineering. BacMP membrane proteins were used as anchor proteins; this approach permits functional proteins to be localized efficiently and oriented appropriately on BacMPs. Recently, we have developed to display artificial proteins, NS polypeptide, designed to control interactions with cell surfaces, and demonstrated that the NS polypeptides have effect to reduce non-specific adsorption of BacMPs to the cells. In this study, the specific cell separations using developed BacMPs were performed, and furthermore the methods for introduction of NS polypeptdes were developed to increase the amount of the peptides on BacMPs.

We have designed a novel polypeptide, NS polypeptides, that is polar and uncharged and functions to minimize nonspecific adsorption of materials to cell surfaces. The polypeptide is composed of multiple units consisting of four asparagines (N) and one serine (S) residue. The polypeptides and the IgG-binding proteins, protein G were displayed onto the surface of BacMPs via genetic engineering. Modification of the surface of a magnetic particle with the NS polypeptide resulted in reduction of non-specific particle-particle and particle-cell interactions. NS polypeptides on magnetic nanoparticle surfaces function as a barrier to block particle aggregation and minimize nonspecific adsorption of cells to the nanoparticles; they also add the ability to recognize and bind to target cells by working as a linker to display protein G on the nanoparticles. When the NS polypeptide is used in a single fusion protein as a linker to display protein G on magnetic particles, the particle acquires the capacity to specifically bind target cells and to avoid nonspecific adsorption of non-target cells. $CD19^+$ cells represent 4.1% of leukocytes and in peripheral blood were calculated to be less than 0.004% of the total cells. Analysis of magnetically separated cells using flow cytometry revealed that $CD19^+$ cells were separated directly from peripheral blood with greater than 95% purity using protein G-displaying BacMPs bound to anti-CD19 monoclonal antibodies with the NS polypeptide. Purities were approximately 82% when the NS polypeptide was not present. Display of protein G-NS polypeptide fusion proteins on BacMPs significantly improved recognition of and binding to target cells, and minimized adsorption of non-target cells. These promising results demonstrated that NS polypeptides may be a powerful and valuable tool in various cell associated applications

To construct the high-density of NS polypeptide on BacMPs, new method was developed using Temporin L peptide (LIRGLFKSFWQVF). It was demonstrated that the peptide was assembled in membrane of BacMPs, spontaneously and in this study, fluorescence labeled NS polypeptide-Temporin L were mixed with BacMPs and immobilized on the BacMP membrane. After several washing, the introduction of the polypeptides on BacMP surfaces was observed with fluorescence microscopy while BacMPs with the fluorescence labeled NS polypeptide were no fluorescence. Furthermore, the fluorescence labeled $(N_4S)_3$-Temporin L peptides were introduced onto BacMPs displaying fusion proteins of protein G and NS-polypeptides $\{(N_4S)_{20}\}$, and fluorescence and antibody-introduced magnetic nanoparticles which were designed with surface modification to reduce non-specific adsorption to the cells. These multi-functional particles will be utilized in many cell-associated applications.

業績リスト

１．原著論文

1) Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga: “In vivo biotinylation of bacterial magnetic particles by a truncated form of Escherichia coli biotin ligase and biotin acceptor peptide” *Appl. Environ. Microbiol.,* 76(17), 5785-5790 (2010)
2) Masahito Hosokawa, Taishi Hayata, Yorikane Fukuda, Atsushi Arakaki, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga: “Size-selective microcavity array for rapid and efficient detection of circulating tumor cells ” *Anal. Chem.*, 82(15), 6629-6635 (2010)
3) Tomoko Yoshino, Akiko Shimojo, Yoshiaki Maeda, Tadashi Matsunaga: “Inducible expression of transmembrane proteins on bacterial magnetic particles in Magnetospirillum magneticum AMB-1.” *Appl. Environ. Microbiol.,* 76(4), 1152-1157 (2010)

２．著書・総説
1) Tomoko Yoshino, Yoshiaki Maeda and Tadashi Matsunaga: “Bioengineering of Bacterial Magnetic Particles and their Applications in Biotechnology” *Recent Patents on Biotechnology*, 4(2), 214-225 (2010)
2) Tomoko Yoshino, Yuka Kanetsuki and Tadashi Matsunaga: “The potential of genetically engineered magnetic particles in biomedical applications” *Biomedical Engineering / Book 4*, INTECH (in press)

３．会議発表
1) Tomoko Yoshino, Masayuki Takahashi, Tadashi Matsunaga: “Surface modification of magnetic nanoparticles using a polypeptide designed to control interactions with cell surfaces.” MRS 2010 Spring Meeting, San Francisco, USA, 2010 年 4 月
2) Toru Honda, Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga: "Characterization of NS polypeptides and its interactions with cell surfaces." Pacifichem, Hawaii, USA, 2010 年 12 月
3) Masahito Hosokawa, Atsushi Arakaki, Tomoko Yoshino, Yorikane Fukuda, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga: “Rapid and efficient detection of circulating tumor cells from whole blood using a microfluidic device equipped with a size selective microcavity array." Pacifichem, Hawaii, USA, 2010 年 12 月
4) 吉野知子、内山　諒、米山健太郎、堀部卓郎、久原基樹、松永　是 :「バイオナノ磁性粒子を用いた血清中の自己抗体検出技術の開発」、2010 年電気化学秋季大会、（第 50 回化学センサ研究会）、2010 年 9 月
5) 鐘築 由香, 吉野 知子, 松永 是:「バイオナノ磁性粒子上への外来タンパク質ディスプレイ量増大に向けたホスト細胞の改変」、第 62 回日本生物工学会大会、2010 年 10 月
6) 細川　正人・浅見　麻里恵・吉野　知子・辻村　範行・高橋　正行・中園　聡・松永　是 :「微量血液からの白血球ポピュレーション解析デバイスの開発」、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月
7) 鐘築　由香・吉野　知子・松永　是 :「磁性細菌ホストの改変によるバイオナノ磁性粒子上への外来タンパク質発現量の向上と機能評価」、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月
8) 依頼講演 吉野知子 :「医療応用を目指したバイオナノ磁性粒子の分子設計」、第 7 回農工大・電通大合同シンポジウム、2011 年 12 月
9) 依頼講演　吉野知子・松永　是 :「細胞磁気ラベリングに向けたバイオナノ磁性粒子界面の分子設計」日本化学会第 91 春季年会 特別企画講演、2011 年 3 月

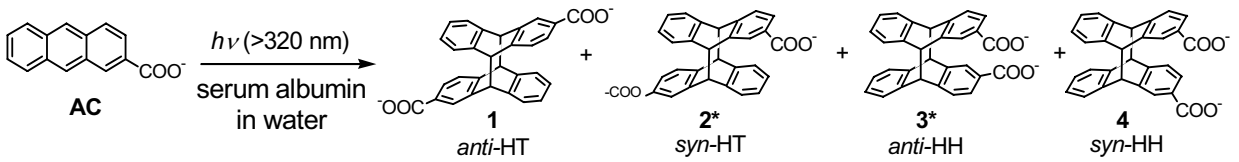
生体高分子を足場とするソフトインターフェースを活用した超分子不斉光反応系の創製

研究代表者：東北大学多元物質科学研究所・和田 健彦

１．緒言：　生命現象において重要な機能を担う生体分子や天然物の多くは光学活性化合物であり、これらを扱う不斉合成化学は化学のみならず、特に医学・薬学の分野における需要の高まりから、現在最も研究が活発に行われている分野の一つである。これまでに触媒あるいは酵素反応による熱的な不斉合成反応について様々な方法論が開発されている。

一方、これら既存の熱反応とは異なり、電子的励起状態を経て反応が進行する光による不斉合成反応は、広い温度範囲で反応機構が変化することなく進行し、熱反応では多段階を要したり合成困難な特異な構造を有する化合物を一段階で合成できるなどの光反応に固有の特長を有することから、熱的不斉反応と相補的な関係となりうる不斉合成法として注目されている。不斉光化学反応の歴史は、19 世紀後半の Le Bel や van't Hoff が提案した円偏光による絶対不斉合成にまで遡るが、物質的不斉源を用いる溶液中での不斉光化学が検討され始めたのは比較的最近であり、1965 年に Hammond と Cole による光学活性増感剤を用いたエナンチオ区別光増感異性化反応において 6.7%のエナンチオマー過剰率が得られるという先駆的な報告された。これ以降、種々の不斉光反応に関する研究が報告されるようになってきたが、中でもキラル超分子の持つ不斉環境場を利用した超分子不斉光反応が、近年新しい不斉合成法として注目されている。光反応は、基質が光照射により励起状態となり、励起寿命内に反応が進行する必要があるが、励起一重項状態の寿命はピコ秒～ナノ秒程度と非常に短く、二分子反応の場合、均一溶液系では励起状態からの失活と拡散が競争することが多く、反応効率は必ずしも高いとは言えない。一方、超分子内空間においては、反応基質は空間的に規制された反応場に存在するため、局所濃度の増大、溶媒などによる振動失活の低減などにより、寿命内に反応が効率よく進行すると考えられる。さらに、ホストーゲスト間に働く水素結合、静電相互作用、疎水相互作用など、弱い相互作用が協同的に作用することにより、基底状態においてキラルな超分子と相互作用する光反応基質分子が、超分子の作り出す「場のキラリティー」を認識し、これを不斉源として後続の励起状態相互作用を通じ、規制空間内における効率よい不斉誘起の実現が期待される。すなわち、超分子不斉光化学反応では、超分子の不斉環境を利用することで、高効率・高選択的不斉光反応系の構築が可能となる。[1)]

一方、生体においては、鍵と鍵穴に例えられるように酵素の基質結合・反応部位等、高度に規制された"反応場"において反応は進行し、高効率な不斉合成が実現されている。さらにこの"反応場"、そして反応場への取り込みにおいては、多くの場合均一水溶液系とは大きく異なる疎水性ミクロ相分離ドメイン・規制反応空間であり、溶液と生体高分子界面に形成されるソフトインターフェースが非常に重要な役割を果たしている。この微視的極性の低下した"ソフトインターフェース"においては、水中では弱い水素結合や双極子相互作用等が効果的に作用する。さらに、分子が接近して存在する空間的に規制された"ソフトインターフェース"では、分子間距離依存性が大きく均一溶液中では弱い相互作用が、有効かつ協同的に機能し、これが高効率反応系実現の大きな駆動力となっている。すなわち、弱い相互作用でもソフトインターフェースを活用し、反応空間・分子配置最適化や微視的極性制御などを実現する生体高分子を足場とする"ソフトインターフェースキラル反応場"を構築出来れば、効率的で有効な不斉光化学反応の構築が期待できる。



Scheme 1. Photocyclodimerization of AC.

このような背景を踏まえ、我々はタンパク質や核酸など生体高分子が構築する高次構造・規制反応空間に注目し、さらに疎水性光反応基質を用いる超分子不斉光化学反応系を創製するため、親疎水バランスに優れた"ソフトインターフェース"を活用・機能化に取り組んでいる。

天然超分子である酵素やタンパク質、核酸などの生体高分子は、*in vitro*での熱的不斉反応へも応用され、その有用性が報告されている。しかし、生体高分子は熱変成など構造不安定性も有しており、本質的に幅広い反応条件下での熱的不斉合成への適用には限界がある。一方、光反応には反応温度に対する制約が少なく、タンパク質のように温度に対する構造安定性が乏しい生体関連化合物を反応場として用いる場合には最適の反応駆動手段であると考えられる。ところが、タンパク質や核酸を超分子不斉光化学反応の不斉反応場とする反応例はほとんど報告されておらず、未開拓の分野であると考えられる。本報告書では、本年度の研究成果である血清アルブミンと光反応基質2-アントラセンカルボン酸(AC)の結合挙動の詳細な検討、ならびに超分子不斉光反応の検討、そしてACの消光剤であるニトロメタン添加により、血清アルブミンアイでのみ不斉光反応の進行を可能とする新規反応系構築に世界に先駆けて成功した結果を紹介する。

２．研究経過：先ず、BSA と AC の非常に複雑な結合挙動を、UV、CD、蛍光スペクトルそしてニトロメタン添加系における蛍光寿命測定法など、各種分光法を駆使することにより検討した。BSA には、様々な基質に対する結合サイトが多数存在し、錯形成挙動は非常に複雑であるが、AC に対する結合サイトに関して、分光学的手法を駆使することにより、明確に AC -BSA 錯体組成比ならびに、結合定数を明らかにすることができた。すなわち、BSA には AC に対する独立した 4 つのキラルな結合サイトを有し、第 1、第 2、第 3、第 4 サイトにそれぞれ 1 分子、3 分子、2 分子、3 分子の AC が、5.3×10^{7} M^{-1}、1.3×10^{5} M^{-1}、1.4×10^{4} M^{-1}、3×10^{3} M^{-1} の錯形成定数で結合することを明らかにした。また、蛍光スペクトルより、BSA の AC 結合サイトはかなり高い疎水性を示し、特に第 1 サイトはペンタンと同程度の極めて高疎水性の空間であることが明らかとなった。

さらに、ニトロメタンによる BSA に結合した AC の消光実験より、各サイトの消光速度定数を求めた結果、第 1 サイトは約 32 倍、第 2 サイトは約 8 倍、水中の AC よりニトロメタンによる消光を受けにくく、第 3、第 4 サイトは水中の AC と同程度の消光を受けることが明らかとなった。以上の結果より、第 1、第 2 サイトは BSA 内部に存在するのに対し、第 3、第 4 サイトは表面近傍に存在することが示唆された。これらの情報により、ニトロメタンがサイト選択的消光剤として利用可能であることを明らかとした。

上記知見を基に、BSA を不斉反応場とする、AC の超分子不斉光環化二量化反応を詳細に検討し、最高で 58%ee と不斉光化学反応としては比較的高い値が得られ、BSA が超分子不斉光化学反応の有効な不斉反応場として機能することを初めて明らかにした。さらに、ニトロメタンを用いたサイト選択的な消光実験により、複雑な高次構造を有し、AC に対し多数の多成分結合サイトを持つ BSA を不斉反応場とする AC の光二量化反応における、各サイトの反応性ならびにエナンチオ選択性を明らかにした。その結果、第 3 サイトに結合した AC は、第 2 サイトに存在する AC に対して約 3 倍の反応性を有することを明らかとした。さらに、第 3 サイトで生成する光環化二量体 **3** に対してはほぼ定量的なエナンチオ選択性を示すことが推定され、第 3 サイトが極めて優れた不斉反応場として機能することが示唆された。

本研究で用いた各種分光分析・蛍光寿命・選択的蛍光消光を用いた反応解析手法は一般性を有し、従来比較的良好な選択性や反応性が得られるにもかかわらず、解析が非常に困難であるため現象論に終始してきた生体高分子を反応場とする光反応解析に対しても適用可能で、今後生体高分子を反応場とする不斉光反応に対する解析法としての幅広い応用が期待される。

参考文献

1) Supramolecular Asymmetric Photoreactions, T. Wada and Y. Inoue, *Organic Molecular Photochemistry*; Ramamurthy, V.; Inoue, Y. Ed.; Marcel Dekker: New York, 341 (2004).

Supramolecular Photochirogenesis with Soft-interface of Biopolymers

Takehiko Wada
Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials (IMRAM), Tohoku University. 2-1-1, Katahira, Aoba-ku, Sendai, 980-8577, Miyagi, JAPAN
TEL: +81-22-217-5608; FAX: +81-22-217-5609
E-mail: hiko@tagen.tohoku.ac.jp

Asymmetric synthesis is currently one of the most vital areas of chemistry with a variety of catalytic and enzymatic methodologies having been developed in the last three decades, although until recently the photochemical branch had not been very extensively or intensively explored. However, the photochemical approach to asymmetric synthesis possesses several unique advantages over the thermal counterpart; as photoprocesses proceed through the electronically excited state, they often yield strained and/or thermally difficult-to-access products of unique structures in a single step. Furthermore, photochemical reactions, being free from the fetter of activation energy, are run over a wide range of temperatures without an accompanying retardation of the reaction rate at lower temperatures, or undesirable side reactions at elevated temperatures.

Photochemistry may also have some drawbacks, such as the excited-state interactions are weak and short-lived and are therefore difficult to control, also the detection/observation of transient species and the subsequent elucidation of reaction mechanism are in general more difficult. Consequently, it has long been believed that the critical and precise control of asymmetric photoreactions is a hard task, and that the optical yields obtained there from are low. To overcome this, two strategies have been developed in the evolution of asymmetric photochemistry, or photochirogenesis: *i.e.*, (1) the introduction of a chiral handle to the photo substrate (diastereodifferentiating photoreaction) and (2) entropic control by environmental factors (enantiodifferentiating photoreaction). More recently, a new strategy has been employed in photochirogenesis, where supramolecular interactions in the ground and/or excited state are employed in order to modify the original photoreactivity, so to trigger a hidden or forbidden photoreaction or enhance the intra/intermolecular contacts in confined media [1]. Additionally, increasing attention has been directed towards the new methodology of photochirogenesis using various bio- and biorelated supramolecular systems, such as cyclodextrins, DNA/RNA, and proteins [1, 2]. In the confined spaces of a supramolecular system, which is provided by biomolecules and/or biopolymers, non-covalent weak interactions can be enhanced or modified to significantly influence the chemo-, regio-, and/or stereoselectivity of the (photo)reactions occurring in the confined media.

Recently, we have proposed a dynamic supramolecular photochirogenesis using biopolymers, in which stereogenic centers are *generated* in the photoproduct through supramolecular interactions in the excited state [2]. We intended to expand the range of supramolecular photochirogenesis with biopolymers to elucidate the factors and mechanisms governing the product ratio and enantiomeric excess (*ee*) in the biopolymer-mediated bimolecular photochirogenesis.

For this purpose, the photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylic acid (AC) was employed, since it is well documented that photoirradiation of AC produces four stereoisomeric [4 + 4] cyclodimers, *i.e. anti*- and *syn-head-to-tail* (HT) dimers and *anti*- and *syn-head-to-head* (HH) dimers. In this paper, we concentrated on the biopolymer based supramolecular asymmetric photochirogenesis (SMAP) in confined media, which employ proteins, such as human and bovine serum albumins (HSA and BSA) as a chiral photoreaction media [2-4].

Experiments, results, and discussion: Firstly, the binding behavior of AC to HSA and BSA was examined by using circular dichroism (CD) spectroscopy. Addition of AC (0-1.2 mM) to a phosphate buffer solution (pH 7.0) of HSA and BSA (0.06 mM) respectively, induced Cotton effect peaks in the AC absorption region (300-450 nm), indicating complexation of AC to HSA or BSA binding sites. The changes in intensity and shape of the CD spectra depend on the AC/HSA ratios, indicating the presence of multiple binding sites. The ellipticities at 330, 390, and 420 nm were plotted against the AC/HSA ratio. The profiles at the three wavelengths differ dramatically, reflecting the nature of the chiral environment and chemical species involved, which enabled us to estimate the number and stoichiometry of the AC binding sites. Four inflection/turning points are readily identified at AC/HSA ratios of 1, 2, 5, and 10, showing that the stoichiometries of sites 1-4 (in the order of decreasing affinity) are 1, 1, 3, and 5. Weak binding occurs at higher AC/HSA ratios (site 5) as indicated by the CD signals at 330 and 420 nm. The striking difference observed upon CD spectral titration with HSA and BSA might rationalize the significantly different photochirogenic behavior described below. Fluorescence spectral titration of **AC** (0.28 □M) with HSA (0-1.42 □M) and the subsequent nonlinear least-squares analysis, assuming the 1:1 stoichiometry, allowed us to determine a binding constant of the first site of 3.0×10^8 M^{-1}, which is appreciably larger than the equivalent value for BSA (5.3×10^7 M^{-1}).

Then, the enantiodifferentiating photodimerization of AC was performed in the presence of varying amounts of HSA. With increasing HSA/AC ratios from zero to unity (keeping [AC] constant), the HT/HH ratio, *i.e.* ([1]+[2]/([3]+[4]), was slightly enhanced from 3.7 to 4.9, which was contrast tendency of BSA presence system (HT/HH=0.23). The ee's of 2 and 3 were also enhanced up to 79% and 88% ee, respectively, at HSA/AC ratio of 3.0.

The supramolecular photochirogenesis using an achiral substrate demonstrates that (1) HSA possesses five independent binding sites for AC of different affinity, stoichiometry and chiral environment for photoreactions, (2) HSA-mediated photodimerization of AC affords optically active products 2 and 3 in up to 79% and 88% ee, respectively. This is highly encouraging in expanding the range of substrates and the scope of supramolecular photochirogenesis with biomolecules.

References

1 Supramolecular Asymmetric Photoreactions, T. Wada and Y. Inoue, *Organic Molecular Photochemistry*; Ramamurthy, V.; Ed.; Marcel Dekker: New York, 341 (2004).
2 T.Wada, M.Nishijima, N.Sugahara, T.Mori, A.Nakamura, Y.Inoue, *J. Am. Chem. Soc.*, **125** (2003) 7492.
3 M.Nishijima, T.Wada, T. Mori, T. Pace, C.Bohne, Y.Inoue, *J. Am. Chem. Soc.,* **129** (2007) 3478.
4 M.Nishijima, T.Pace, A.Nakamura, T. Mori, T.Wada, C.Bohne, Y.Inoue, *J. Org. Chem.,* **72** (2007) 2707.

【原著論文】

1. *Wada, Takehiko; Sawa, Nobuya; Sato, Hirofumi; Kikkawa, Mayuko; Onodera, Keiko; Sakamoto, Seiji; Inoue, Yoshihisa, "Active control by external factors of DNA recognition behavior of □ -peptide ribonucleic acids containing basic amino acid residues," *Chem. Lett.*, **39**, 112-113 (2010). (***Editor's Choice***)
2. Tsutsumi, Ken; Yanagisawa, Yuuki; Furutani, Akinori; Morimoto, Tsumoru; Kakiuchi, Kiyomi; *Wada, Takehiko; Mori, Tadashi; Inoue, Yoshihisa.Diastereodifferentiating the [2+2] Photocycloaddition of Ethylene to Arylmenthyl Cyclohexenonecarboxylates: Stacking-Driven Enhancement of the Product Diastereoselectivity That Is Correlated with the Reactant Ellipticity, *Chemistry-A European Journal*, **16**, 7448-7455 (2010).
3. Sakamoto, Seiji; Terauchi, Mika; Araki, Yasuyuki; *Wada, Takehiko. Design and preparation of split-GFP for sensing of caspase-3 activities, *Peptide Science*, **46**, 343-344 (2010).
4. Sawa, Nobuya; Sakamoto, Seiji; Yang, Cheng; Fukuhara, Gaku; Mori, Tadashi; Inoue, Yoshihisa; *Wada, Takehiko, Synthesis, properties and complexation behavior of positively charged peptide ribonucleic acids with amino linkages in the backbone structure (aza-PRNA), *Peptide Science*, **46**, 321-324 (2010).
5. Bando, Kazuki; Zako, Tamotsu; Sakono, Masafumi; Maeda, Mizuo; *Wada, Takehiko; Nishijima, Masaki; Fukuhara, Gaku; Yang, Cheng; Mori, Tadashi; Pace, Tamara C. S.; Bohne, Cornelia; Inoue, Yoshihisa. Bio-supramolecular photochirogenesis with molecular chaperone: enantiodifferentiating photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylate mediated by prefoldin, *Photochemical & Photobiological Sciences*, **9**, 655-660 (2010).
6. Song, Shi-Hui; Shirasaka, Kazumi; Hirokawa, Yasuhito; Asanuma, Hiroyuki; *Wada, Takehiko; Sumaoka, Jun; Komiyama, Makoto. Molecular imprinting of cyclodextrin to physiologically active oligopeptides in water, *Supramolecular Chemistry*, **22**, 149-155 (2010).
7. Nikawa, Hidefumi; Araki, Yasuyuki; Slanina, Zdenek; Tsuchiya, Takahiro; Akasaka, Takeshi; *Wada, Takehiko; Ito, Osamu; Dinse, Klaus-Peter; Ata, Masafumi; Kato, Tatsuhisa; Nagase, Shigeru.The effect of atomic nitrogen on the C60 cage, *Chemical Communications*, **46**, 631-633 (2010).
8. Sawa, Nobuya; *Wada, Takehiko; Inoue, Yoshihisa. Synthesis and DNA-recognition behavior of a novel peptide ribonucleic acid with a serine backbone (oxa-PRNA), *Tetrahedron*, **66**, 344-349 (2010).

【解説・総説】

１．「生物に学ぶ機能制御法：細胞内環境応答性人工核酸の創成」, *機能材料*, **30**, 15-22, CMC 出版 (2010).
２．化学フロンティア 22「生命現象を理解する分子ツール －イメージングから生体機能解析まで－」浜地 格・二木史朗編, 第 17 章生命現象の機能解明・制御ツールとしての修飾核酸･人工核酸, 135-144, 化学同人 (2010).

【著書】

1.「酵素活用ハンドブック」小宮山 真監修, 第５章 バイオ超分子第 4 編 酵素を創るⅡ —化学的改変と人工酵素 第 5 章 人工酵素 ２ 人工ホストを用いた不斉合成 NTS 出版 (2010).

【国内学会発表】

招待講演（抜粋）:

１．和田健彦, “刺激応答性人工核酸を活用したゲノムケミストリーの新展開”, 第二次先端ウォッチング調査：複合領域の創成; ゲノムケミストリーの医療への展開－ 化学修飾核酸の創製と創薬への展開－, 日本化学会第 90 春季年会, 大阪, 3 月 (2010).
２．和田健彦,"細胞内環境応答型人工核酸の創製－ガン細胞特異的遺伝子治療薬の開発を目指して－"ソフトナノ材料研究ステーション(SNAMS)・高分子学会東北支部ジョイントシンポジウム *-生体分子に学ぶソフトナノ機能材料の創製* -, 仙台, 3 月 (2010).
３．和田健彦, “外部刺激応答性人工核酸の創製－がん細胞特異的遺伝子治療薬の開発－”, 第 6 回高分子学会東北地区若手セミナー, 岩手, 3 月 (2010).
４．和田健彦, “ネオ核酸ミメティックス －次世代人工核酸の新展開－”, 第 1 回バイオミメティクス研究会, 札幌, 8 月 (2010)., ,
５．和田健彦, “生体機能分子の構造変化の高感度・高時間分解能解析を目指した CD 測定装置の開発", 先導研ナノバイオ・JST 先端計測合同シンポジウム”生体分子計測のボトムアップテクノロジー, 福岡, 10 月 (2010).
６．和田健彦, “外部刺激応答性人工核酸の創製－がん細胞特異的遺伝子治療薬の開発を目指して－”, 第 15 回東北大学学際ライフサイエンスシンポジウム, 仙台, 11 月 (2010). 他 4 件

【国際学会発表】

招待講演（抜粋）:

1. T. Wada, *The 1st Asian Chemical Biology Conference (ACBC2010)*, Seoul, Korea, June 25 (2010).
2. T. WADA, *The 22nd ISCD 2010 & Cirality 2010*, Sapporo, Japan, July 12 (2010).
3. T. Wada, *The 5th* ISIMME2010, Changzhou, Chinam, September 20 (2010).
4. T. WADA, *2010 PACIFICHEM 2010*, Honolulu, USA, December 16 (2010).
5. T. Wada, *The 2nd International Forum on Photoenergy Future (IFPF)*, Honolulu, Hawaii, USA, December 2 1 (2010). 他 2 件

2011 年 6 月 30 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