

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23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」

岸村 顕広 東京大学	57
「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」	
葛谷 明紀 関西大学	61
「DNA の二次元自己組織化によるインテリジェントソフト界面の創出」	
山本 拓矢 東京工業大学	65
「機能性環状高分子ミセルの開発」	
高木 昌宏 北陸先端科学技術大学院大学	69
「膜エネルギー変化の制御と機能界面デザイン」	
吉川 研一 同志社大学	73
「細胞サイズ小胞が形成するソフト界面：その特異性を活用した新奇物性」	
遊佐 真一 兵庫県立大学	77
「高度に機能化された感温性ソフトインターフェースを持つ架橋ポリマーソームの創成」	
栄長 泰明 慶應義塾大学	81
「ソフト界面構築による強磁性ナノ粒子の機能化」	
藤井 秀司 大阪工業大学	85
「泡の安定性制御を可能とする刺激応答性ヘアリー粒子の創出」	
吉川 佳広 産業技術総合研究所	89
「高分子規則表面のバイオエッチングとソフトマター分子群集積化への応用」	
渡邊 順司 甲南大学	93
「診断デバイスの微細化に対応できる高速親水化ポリマーの創製と高感度診断基材への応用」	

公募研究代表者 A02 ソフト界面の解析「ソフト界面を探る」

藤森 厚裕 埼玉大学	97
「ポリマーナノスフィア積層粒子層状組織体による次元規制型マテリアルレイノベーション」	
長谷川 健 京都大学	101
「負吸着性化学種の気液界面単分子膜での濃縮と膜中拡散機構のオペランド解析」	
青木 裕之 京都大学	105
「単一分子鎖の直接観察によって明らかにする高分子ソフト界面の物性」	
瀧上 隆智 九州大学	109
「ソフト界面における多重膜形成のシナジズム」	
森田 裕史 産業技術総合研究所	113
「高分子—液体間ナノ界面における高分子鎖シミュレーション解析」	

田和 圭子 産業技術総合研究所	117
「ソフト界面で修飾されたプラズモニクチップ上の高感度蛍光バイオセンシング」	
<u>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」</u>	
和田 健彦 東北大学	121
「生体高分子の有するソフトインターフェイスを活用した新奇超分子不斉光化学反応系の構築」	
野々村 美宗 山形大学	125
「小腸壁における濡れダイナミクスのコントロール」	
吉野 知子 東京農工大学	129
「磁性粒子のソフト界面制御に向けた刺激応答性人工タンパク質の分子設計」	
森垣 憲一 神戸大学	133
「パターン化モデル生体膜と微小構造体を接合したナノ界面における分子認識と分子輸送」	
松野 寿生 九州大学	137
「高分子ソフト界面における分子鎖熱運動性を利用する細胞機能制御」	
武田 直也 早稲田大学	141
「基質界面の微細構造による細胞遊走の整流化制御と形質転換因子としての評価」	
青木 寛 産業技術総合研究所	145
「アロステリック電気化学アプタザイムに基づく高感度遺伝子センサ」	
藤田 聡史 産業技術総合研究所	149
「遺伝子導入セルチップの高機能化を実現するソフト界面の構築」	
佐藤 智典 慶應義塾大学	153
「生体膜類似の糖鎖/ペプチドナノクラスターの構築と病原体の検出デバイスの開発」	



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、表面の精密パターンニング、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ンニングを先導してきた界面分子基盤の専門家（A01「ソフト界面分子基盤」）、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「ソフト界面分子計測」）、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「ソフト界面分子認識」）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23年度は、第6回（九州大学筑紫キャンパス（7月28日））、第7回（東京大学本郷キャンパス（1月26日））の計2回の公開シンポジウムを行った。両公開シンポジウムでは、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。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。昨年度に引き続き本年度もワークショップを開催した。「ソフト界面のダイナミクス」をテーマにした二日間の合宿形式の勉強会（富山）を行った。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）も企画運営した。

さらに本年度は、長崎らが中心となって、筑波大学にて国際シンポジウム SIMS2012 を主催した。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。また数多くの著名な国内外の研究者らに講演をしていただくことで交流を深めることができた。

#### 総括班活動記録

##### <運営会議>

第10回：九州大学筑紫キャンパス（福岡県春日市）：2011年7月28日

第11回：東京大学本郷キャンパス（東京都文京区）：2012年1月26日、27日

##### <領域会議>

第6回：九州大学筑紫キャンパス（福岡県春日市）：2011年7月29日

第7回：東京大学本郷キャンパス（東京都文京区）：2012年1月27日

<公開シンポジウム>

第6回：九州大学筑紫キャンパス（福岡県春日市）：2011年7月28日

（内容）

領域代表あいさつ：前田瑞夫

研究報告「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」：三浦佳子

研究報告「カチオン性およびベタイン系水面高分子ブラシのナノ構造と応答性」：松岡秀樹

—ポスターセッション—

研究報告「ソフト界面での細胞ローリング現象を利用した新たな幹細胞分離システム」：山岡哲二

特別講演「硬組織再建材料へのアプローチ」：石川邦夫（九州大学）

第7回：東京大学本郷キャンパス（東京都文京区）：2012年1月26日

（内容）

領域代表あいさつ：前田瑞夫

特別講演「ソフト界面研究から見えてきたこと」：芹澤 武（東京工業大学）

研究報告「半導体/生体分子ナノ界面の構築とバイオトランジスタへの応用」：宮原裕二

—ポスターセッション—

研究報告「高分子超薄膜の原子間力顕微鏡による特性評価」：熊木治郎

研究報告「感温性ソフトインターフェースの調製と生体分子との相互作用」：菊池明彦

特別講演「細胞環境の理解と細胞機能制御を目指したポリマーバイオマテリアル設計」：

石原一彦（東京大学）

<国際会議>

Softinterface International Mini-Symposium on Biointerface –Interface between Bio and Materials-  
(SIMS2012)：2012年3月17-19日

<ワークショップ>

テーマ「ソフト界面のダイナミクス」パレブラン高志会館（富山県富山市）：2011年11月3日、4日

（内容）

開会のあいさつ：北野博巳

「新規蛍光イメージング法の開発と高分子一本の構造とダイナミクス評価への応用」：

青木裕之（京都大学）

「細胞界面に形成したナノ薄膜によるダイナミックな三次元組織化制御」：

松崎典弥（大阪大学）

「水界面における高分子の階層的ダイナミクス」：田中敬二（九州大学）

「柔らかい粒子の界面電気現象」：大島広行（東京理科大学）

「ポリマー1分子の直視：合成高分子鎖一本の運動特性の解明と制御」：

篠原健一（北陸先端科学技術大学院大学）

「振動分光法によるソフト界面分子構造のその場決定」：魚崎浩平（物質・材料研究機構）

「パルスNMRで見るソフト界面間隙水のダイナミクス」：塚原剛彦（東京工業大学）

—ポスターセッション—

「細胞表層上のナノ糖鎖の構造と精密集積化および機能解析」：森 俊明（東京工業大学）

「ソフト界面と幹細胞工学」：山岡 哲二（国立循環器病研究センター研究所）

「リビングラジカル重合によるポリマーブラシ／無機微粒子複合材料の精密設計」：

大野工司（京都大学）

<研修コース>

「表面力・ずり測定法」（東北大学栗原研究室）：2012年1月23日～24日

「X線反射率測定」（京都大学松岡研究室）：2011年12月6日～8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）：2011年10月14日

<ニュースレター発行>

Vol.8：平成23年10月31日、Vol.7：平成23年6月30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”」



## 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）（PNIPAAm）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。PNIPAAm は水中 32°C 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。PNIPAAm 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、PNIPAAm 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 H23 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(NIPAAm-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(NIPAAm-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。さらに、ATRP で合成した P(NIPAAm-co-*t*-ブチルアクリレート(tBA)) との共重合体をアミノ加水分解させ、イミノ二酢酸(IDA)を導入した表面上で、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーの可能性を検討した。

## 2. 研究経過

### (1) P(NIPAAm-co-BMA)表面とステロイドとの相互作用

前年度に引き続き、BMA を 1mol% 含むモノマー溶液の濃度を 1.0M から 3.0M まで変化させ、また重合時間を制御して *m,p*-クロロメチルフェニルエチルトリクロロシランを修飾した中空シリカキャピラリー（内径 100 $\mu$ m）内表面に P(NIPAAm-co-BMA) を導入した。モノマー濃度が 3.0M になると、ステロイドとの相互作用は急激に大きくなった。モノマー濃度が大きくなると、重合速度は比例して大きくなり、鎖延長が起こると考えられる。したがって、鎖

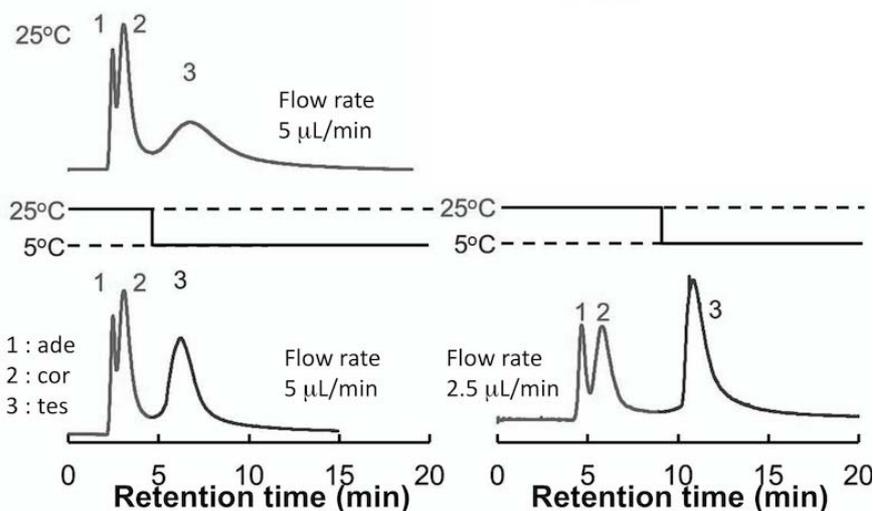


Fig. 1. Chromatograms of steroids on P(NIPAAm-co-BMA)-grafted fused silica capillary with step-temperature gradient at flow rate of 5  $\mu$ L/min and 2.5  $\mu$ L/min.

延長した PNIPAAm 表面とステロイドとの相互作用が大きくなる。一方、仕込みモノマー濃度 3.0M での急激な相互作用上昇は、鎖延長に伴う相互作用の増大だけでは説明がつかず、今後、仕込みモノマー濃度と表面状態の関連を調べるのが重要と考えている。全反射赤外吸収 (ATR-FT-IR) や和周波発光分析等による解析を行っていく予定である。さらに、ATRP はリビング的に重合が進行するため、重合時間を延長すると、鎖延長が起こると考えられる。そこで、仕込みモノマー濃度 2.0M で、重合時間を 12 時間まで延長して作成した P(NIPAAm-co-BMA)表面とステロイドとの相互作用を解析した。テストステロン、コルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン共に、重合時間とともに 40°Cにおける保持係数が大きくなった。すなわち、重合時間の延長とともに、表面グラフト鎖長が延長した結果、ステロイドとの相互作用が大きくなったものと思われる。このとき、疎水性の大きなテストステロンほど保持係数の傾きは大きく、次いで、酢酸ヒドロコルチゾン、コルチゾンの順に傾きは小さくなった。この順番は、ステロイドの水/オクタノールの分配係数の対数值 ( $\log P$  値) の傾向と一致したことから、疎水性の大きな化合物が強く相互作用する表面になったものと思われる。

次に、ステロイドの分離挙動に関する検討を行った。図 1 に複数のステロイドを含む水溶液のクロマトグラムを示す。25 °C、5 $\mu$ L/min の条件では、アデノシン(ade)とコルチゾン(cor)のピーク分離は不十分であり、かつテストステロン(tes)のピークの広がりが無視できない。一方、25°Cで ade、cor が溶出後カラム温度を 5°Cにすると、tes のピークが狭く高くなった。さらに流速を 2.5 $\mu$ L/min に下げると、ade、cor の分離が改善し、25°C、5 $\mu$ L/min における分離係数 0.66 から 0.91 に向上した。さらに、cor と tes の分離は、25°C、5 $\mu$ L/min で分離係数が 0.77 だったのに対し、流速を 2.5 $\mu$ L/min、カラム温度を 25°Cから 5°Cに途中で下げることで分離係数が 2.67 にまで向上した。これらの結果は、温度応答性高分子を導入した表面の特性であり、分離中に温度グラジェントを与えることで、分離特性が向上することが、確認できた。

## (2) 温度応答性固定化金属イオンアフィニティークロマトカラムの調製

遺伝子工学の発展に伴って作出される、タンパク質製剤などは、その分離を行うために、ヒスチジン (His) タグを保持し、固定化金属イオンアフィニティー分離により精製される。一方で、担体に吸着したタンパク質の脱着には、金属イオンのキレート剤、あるいはイミダゾールをカラムに流す。しかし、これらがタンパク質回収液に含まれる問題がある。そこで、キャピラリー内表面に修飾した、PNIPAAm 誘導体上に IDA 基を導入し、タンパク質との相互作用を評価した。

図 2 に結果を示した。PNIPAAm単独、あるいは、Ni<sup>2+</sup>イオンを配位しないP(NIPAAm-co-IDA)では、タンパク質の吸・脱着はほとんど起こらなかった。一方、P(NIPAAm-co-IDA-Ni<sup>2+</sup>)(3h重合)では温度変化にかかわらず吸着量にほとんど差がなかった。これは、表面グラフト鎖長が短いことが影響したものと考えている。さらに、重合時間を 6hまで延長し、Ni<sup>2+</sup>を配位させた表面では、4°Cではほとんどタンパク質は吸着しない一方、37°Cでインジェクトしたタンパク質のほとんどが保持された。さらに、37°Cで吸着したタンパク質は、4°Cにすると 10 分以内に 40%強が回収できたことから、イミダゾールやキレート剤を使わなくても、回収できる可能性が示唆された。今後、IDA部位の導入位置や、鎖長が、温度変化に伴うタンパク質の吸・脱着にどのように影響するか、詳細に検討していく。

以上のように、温度応答性ソフトインターフェースと生体分子との相互作用の特徴が明らかになりつつある。今後、表面の高分子の状態評価を行うとともに、比表面積の増大に向けた検討を行っていく。

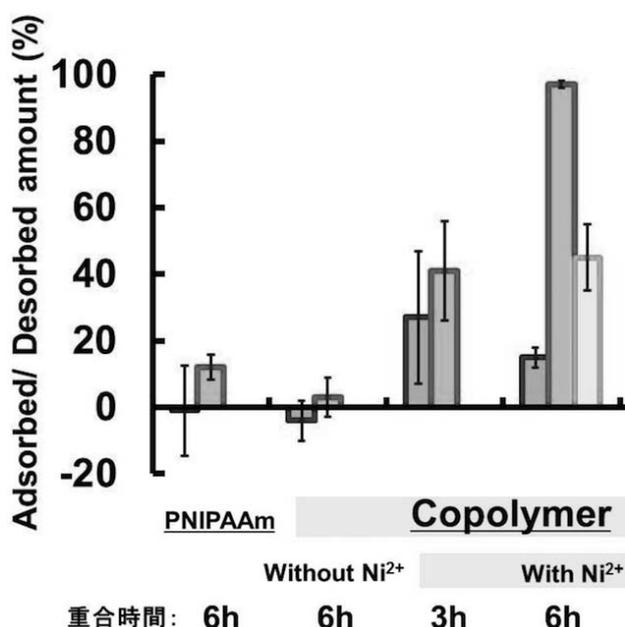


Fig. 2. Percentage of adsorption / desorption of BSA on P(NIPAAm-co-IDA) columns at different polymerization and with or without Ni<sup>2+</sup>. Adsorption at 4°C (left) and 37°C (middle) and desorption at 4°C (right) are shown in each condition.

# 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, Fax 04-7122-1499, E-mail: kikuchia@rs.noda.tus.ac.jp

Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) is well-known thermoresponsive polymer; the PNIPAAm in the aqueous solution showed temperature dependent soluble/insoluble changes around 32 ° C. Introduction of PNIPAAm to the solid surfaces induces aqueous wettability changes. Previously, we introduced PNIPAAm with regulated chain lengths to the solid surfaces by applying surface-initiated atom transfer radical polymerization (SI-ATRP) to prepare thermoresponsive soft interfaces. We have investigated the biomolecular interaction on PNIPAAm derivative brush grafted fused silica capillary as microcolumn matrixes. This year, we investigated the effects of preparation condition of hydrophobized PNIPAAm-grafted soft interfaces and elution profiles of biomolecules were investigated. In addition,

First, 2-(*m, p*-chloromethylphenyl)ethyltrichlorosilane was introduced to fused silica capillary with inner diameter of 100µm. Then, SI-ATRP was carried out in the presence of NIPAAm and butyl methacrylate (BMA) monomers with concentration of 1.0-3.0 M and BMA composition of 1mol%. These modified surfaces were used for measurement of temperature-dependent changes in the interaction with steroids. Adenosine was used as standard hydrophilic reference molecule. We also prepared thermoresponsive immobilized metal ion affinity column grafted with P(NIPAAm-*co*-iminodiacetic acid (IDA)). Nickel ions are chelated on IDA, and then interaction of bovine serum albumin (BSA) was monitored by means of microHPLC.

We investigated surface property alteration for thermoresponsive polymer modified fused silica capillary interfaces by observation of the steroids retention. Both monomer concentration and polymerization time have crucial influence on steroid retention; i.e., the more the monomer concentration or the longer the reaction time, the more pronounced interaction with steroid molecules occurred on the micro-column surfaces. We further investigated the elution profiles of mixture of steroids, testosterone and cortisone, and adenosine. At 25° C and flow rate of 5µL/min, separation of adenosine and cortisone is not sufficient. In addition, peak broadening of testosterone was apparent. Thus flow rate was changed to 2.5µL/min and elution profile was investigated. Separation factor for adenosine and cortisone increased from 0.66 to 0.91. After elution of cortisone, column temperature was reduced to 4° C, so that the testosterone peak profile became narrow and sharp. Thus separation factor of cortisone and testosterone increased for up to 2.67 from 0.71. This is important feature of thermoresponsive surfaces.

In the second part, we introduced thermoresponse on immobilized metal ion affinity column. To obtain this character, P(NIPAAm-*co*-glycidyl methacrylate) onto the inner surface of fused silica capillary by SI-ATRP. Then, iminodiacetic acid (IDA) was introduced to epoxy side chains. By setting polymerization condition, temperature dependent protein adsorption was observed only on Ni<sup>2+</sup> chelated P(NIPAAm-*co*-IDA), but not to PNIPAAm surfaces even at 37° C. Thus specific interaction can be modulated only with temperature modulation. We are now further investigating on the position of chelating groups on the thermoresponsive brushes.

In conclusion, we obtained unique properties of thermoresponsive polymer-modified surfaces. We are trying to elucidate the characteristics of the thermoresponsive polymer brush 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. Nagase, M. Watanabe, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, Thermo-responsive polymer brushes as intelligent biointerfaces: Preparation via ATRP and characterization, *Macromol. Biosci.*, 11, 400-409 (2011).
- 2) K. Nagase, N. Mukae, A. Kikuchi, T. Okano, Thermally modulated retention of lymphocytes on polymer-brush-grafted glass beads, *Macromol. Biosci.*, 12, 333-340 (2012).

### 2. 著書・総説

なし

### 3. 会議発表

- 1) 高山陽亮, 麻生隆彬, 菊池明彦, 温度応答性ブラシ表面を持つキャピラリークロマト担体による種々ステロイドの分離, 高分子学会年次大会, 2011.5.25-27, 大阪国際会議場
- 2) 瀬尾昌幸, 麻生隆彬, 菊池明彦, マイクロカラムを用いた感温性固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーの調製, 高分子学会年次大会, 2011.5.25-27, 大阪国際会議場
- 3) 坂本和美, 瀬尾昌幸, 高山陽亮, 麻生隆彬, 菊池明彦, 温度応答性高分子を修飾したモノリスシリカキャピラリーの調製, 高分子学会年次大会, 2011.5.25-27, 大阪国際会議場
- 4) 岩下直人, 瀬尾昌幸, 麻生隆彬, 菊池明彦, リガンド位置を制御した金属アフィニティリガンドを有する温度応答性高分子修飾表面の調製とタンパク質との相互作用, 高分子学会年次大会, 2011.5.25-27, 大阪国際会議場
- 5) A. Kikuchi, Y. Takayama, H. Moriyama, T. Asoh, Thermoresponsive soft interfaces for modulated biomolecular interactions, 12th IUMRS-ICA 2011, 2011.9.19-22, Nangang Exhibition Center (Taipei, Taiwan)
- 6) 菊池明彦, 麻生隆彬, 感温性ポリマーからなるソフトインターフェースの創製とクロマト担体としての特性, 第 60 回高分子討論会, 2011.9.28-30, 岡山大学津島キャンパス
- 7) 瀬尾昌幸, 麻生隆彬, 菊池明彦, 側鎖にイミノ二酢酸基を有する感温性固定化金属イオンアフィニティ担体の調製, 第 60 回高分子討論会, 2011.9.28-30, 岡山大学津島キャンパス
- 8) 岩下直人, 瀬尾昌幸, 麻生隆彬, 菊池明彦, 温度応答性固定化金属イオンアフィニティブラシの一次構造制御によるタンパク質の相互作用評価, 第 60 回高分子討論会, 2011.9.28-30, 岡山大学津島キャンパス
- 9) 高山陽亮, 麻生隆彬, 菊池明彦, 温度応答性キャピラリー担体におけるステロイド分離に及ぼす鎖長の効果, 第 60 回高分子討論会, 2011.9.28-30, 岡山大学津島キャンパス
- 10) 坂本和美, 瀬尾昌幸, 高山陽亮, 麻生隆彬, 菊池明彦, 温度応答性高分子修飾モノリスシリカキャピラリーカラムの調製と生理活性物質の分離, 第 60 回高分子討論会, 2011.9.28-30, 岡山大学津島キャンパス
- 11) 高山陽亮, 麻生隆彬, 菊池明彦, 高分子鎖長の異なる温度応答性マイクロ流路担体によるステロイド分離, 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会, 2011.11.21-22, 京都・京都テルサ
- 12) 菊池明彦, 麻生隆彬, 温度応答性ソフト界面と生体分子との相互作用, 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会, 2011.11.21-22, 京都・京都テルサ
- 13) A. Kikuchi, Y. Takayama, M. Seo, N. Iwashita, K. Sakamoto, T. Asoh, Thermoresponsive soft interfaces for modulation of biomolecules interaction, Softinterface Minisymposium on Biomaterials Science in Tsukuba 2012, 2012.3.17-19, University of Tsukuba

# 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・檜垣勇次  
九州大学大学院工学府・

矢野貴大、井上満美子、篠原 貴道

## 1. 緒言

高分子材料を中心とするソフトマテリアルは複雑な階層構造を反映して多様な特性、動的応答性を発現することが徐々に明らかになっており、ソフトマテリアルの階層構造制御による新規材料創製に対する期待が高まっている。本研究は、表面微細加工技術と高分子鎖が形成する分子レベルでのナノ階層構造の融合による機能性ソフトインターフェースの精密分子設計を目的としている。表面微細加工技術として電界紡糸法、ナノインプリント法、交互積層膜法を駆使して、ナノファイバー、微細構造転写表面、交互積層超薄膜を調製し、分子鎖が形成する分子レベルでの分子鎖凝集構造を放射光 X 線回折測定や赤外分光測定等により解析し、薬物除放性や撥水性等の機能特性を評価した。

## 2. 研究経過

### 2-1. 電界紡糸法を用いて調製したポリビニルアルコールナノファイバーの高次構造と物性評価

電界紡糸法により得られるナノファイバーは種々のバイオマテリアルやフィルター資材としての応用が期待されており、ポリビニルアルコール(PVA)ファイバーもその一つである。ファイバー調製条件が結晶構造に及ぼす影響や力学的刺激に対するファイバーの高次構造変化の議論はまだ十分に行われていない。本研究では、エレクトロスピンニング法で調製した PVA ファイバーの直径が結晶状態に及ぼす影響を XRD から評価し、また、不織布の伸長過程におけるファイバー及び微結晶の配向状態を放射光小角 X 線散乱 (SAXS)、広角 X 線回折 (WAXD)測定に基づき評価した。

PVA (けん化度 87.0-89.0 mol%, 重合度 1700)を水/DMF (70/30, wt/wt)混合溶媒に溶解させ、7.5-15 wt% 溶液とし、電界紡糸法によりファイバーを紡糸した。得られたファイバーの形態を走査型電子顕微鏡 (SEM)により、結晶性を XRD により評価した。次にファイバー不織布の伸長過程における SAXS、WAXD 測定を SPring-8 BL40B2 にて実施した。サンプルはハッチ内に固定した小型引っ張り試験機にて伸長し、測定を行った。ファイバーの配向は SAXS プロファイルの Ruland の手法に基づく解析により評価した。WAXD プロファイルより配向関数を算出し、微結晶の配向状態を評価した。

ポリマー溶液の濃度の増加に伴い、ファイバー径が増大することをSEM像から確認した。ファイバー径が増大するにつれて、XRDパターンのPVA結晶(101)由来のピーク半値幅の減少を観測した。これはファイバー径の増加に伴い、微結晶のサイズが増大したことを示している。図1に伸長率とSAXSパターンから算出したmisorientation widthの関係を示す。

伸長率とともにファイバーは伸長方向に配向するが、伸長率50%以上ではファイバーの配向は一定に収束することを確認した。図2に伸長率と、WAXDパターンから算出した微結晶の配向関数の相関を示す。伸長率の増加に伴い、分子鎖軸が伸長方向に配向する傾向を確認した。したがって、伸長初期はファイバーと高分子鎖の両方が配向し始め、伸長率50%でファイバーの配向度は一定となるが、その後もファイバー内部の微結晶の配向は伸張率とともに向上し続けることが示唆された。

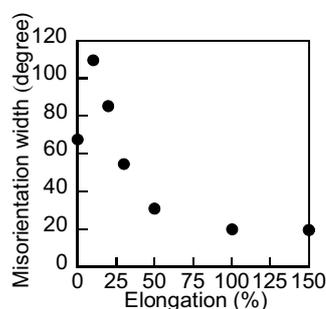


図 1. PVA ナノファイバー不織布の伸長率と misorientation width

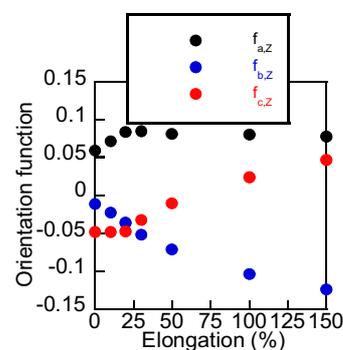


図 2. PVA ナノファイバー不織布の伸長率と配向関数

## 2-2. ポリ乳酸薄膜に形成したナノインプリント構造の超小角X線散乱測定による非破壊精密構造評価

ナノインプリント (NIL) 法は、加工プロセスが簡便で低コスト化が可能な表面微細加工法である。本手法により形成される微細構造は材料表面だけでなくデバイス内部、すなわち‘埋もれた’構造として利用されるが、その非破壊精密評価法は確立されていない。ポリ乳酸 (PLA) フィルムに対し NIL による表面微細構造の形成を行い、その精密評価を走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察および放射光超小角 X 線散乱測定 (SR-USAXS) により行った。

膜厚 200  $\mu\text{m}$  に調製した PLA ( $T_g = 331 \text{ K}$ 、D体分率 12%) フィルムに対し NIL を行った。NIL 条件は押付温度 353 K、押付圧力 20 MPa とした。NIL により形成した表面形状の精密構造評価を SEM 観察および SR-USAXS により行った。SR-USAXS は大型放射光施設 SPring-8 BL03XU にて、検出器 IP、X 線の波長 0.1 nm、カメラ長 7665 m の条件で行った。

図 3 に、線幅約 200 nm の LS パターン (LS200) およびピッチ約 230 nm のピラーパターン (P230) を形成した PLA フィルムの SEM 像と SR-USAXS により得られた二次元回折像を示す。周期的な回折が高次のピークまで明確に観測され、NIL 法により作製した表面周期構造が高い規則性を有することを示している。NIL\_PLA (LS200) に関して、断面形状を方形と仮定し強度プロファイルのフィッティングを行ったところ、ライン幅 173 nm、スペース幅 246 nm と算出された。これは、モールドのサイズとよく対応しており、NIL 法により形成された微細構造が SR-USAXS により精密構造評価可能であることを示している。

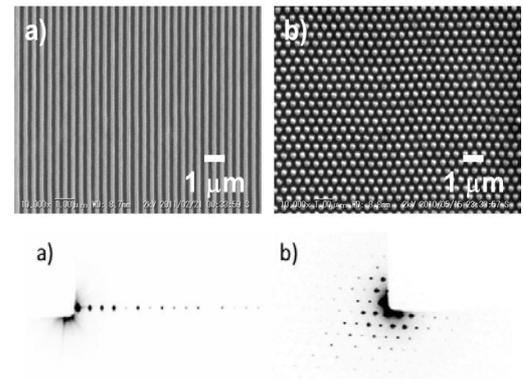


図 3. NIL\_PLA の SEM 像と SR-SAXS 測定による二次元回折像 a) LS 200 nm、b) P 230 nm.

## 2-3. 生体適合型ポリマーを用いたカチオン性ナノ粒子担持交互積層薄膜の調製とナノ粒子の徐放特性

薬剤溶出ステントは薬剤徐放機能をもつステントであり、血管の狭窄に対する治療に用いられる。薬剤溶出量を精密に制御する方法として薬剤含有カチオン性ナノ粒子とポリアニオンの交互積層 (LbL) 膜に着目した。ステントの素材であるステンレス (SUS) 表面に安定な LbL 薄膜を構築するため金属酸化膜と強い相互作用を持つカテコール基を有するポリアニオンでステンレス表面を修飾し、薬剤の代わりにフルオレセイン 4-イソチオシアナート (FITC) を封入したカチオン性ナノ粒子を用いて、薬剤吸着効率と徐放性を評価した。

カテコール基を有するメタクリルアミドモノマー (DMAm) とメタクリル酸 3-スルホプロピルカリウム塩 (SPMK) のラジカル共重合により poly(DMAm-co-SPMK) (組成比 DMAm/SPMK=1/4) を調製した。このポリアニオンの 1 wt% 溶液 (溶媒 DMF/H<sub>2</sub>O=1/1) に SUS 基板を 30 分浸漬した後、100°C で 6 時間減圧乾燥した。調製した基板を FITC 含有カチオン性ポリ乳酸・グリコール酸ナノ粒子 (FITC-NP) 水溶液および、アニオン性のヘパリン (Hep) 水溶液に交互に浸漬した。

poly(DMAm-co-SPMK) 吸着 SUS 基板の XPS スペクトルには明瞭に  $N_{1s}$  と  $S_{1s}$ 、 $Fe_{2p}$  由来のピークが観測され、基板を水でリンスしても  $N_{1s}/Fe_{2p}$  比は変化しなかった。これはカテコール基含有ポリアニオンが SUS 基板表面に安定に固定化されたことを意味している。一方、poly (SPMK) 吸着 SUS 基板は水洗するとポリマーが剥離し、 $S_{2p}$  由来のピーク強度が大幅に減少した。これらの基板表面に FITC-NP を 3 層、Hep を 2 層交互に積層させた薄膜の蛍光顕微鏡観察 (図 4) では、第 1 層目にカテコール基含有ポリアニオンを吸着させた基板から強い蛍光発光が認められ、カチオン性 FITC-NP が効率的に積層されたことが明らかとなった。交互積層膜からの FITC-NP の除放性を評価したところ、積層数、熱処理条件により除放挙動を制御可能であることが確認された。

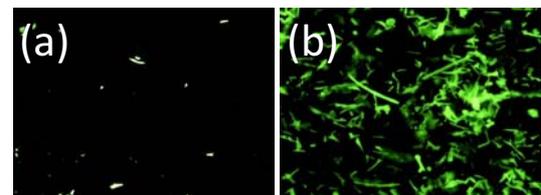


図 4. FITC-NP/Hep 多層膜の蛍光顕微鏡観察像 (a) poly (SPMK) 修飾 SUS 基板 (b) poly (DMAm-co-SPMK) 修飾 SUS 基板

# Precise Design of Soft Interfaces through Surface Fabrication and Polymer Nano-Coating

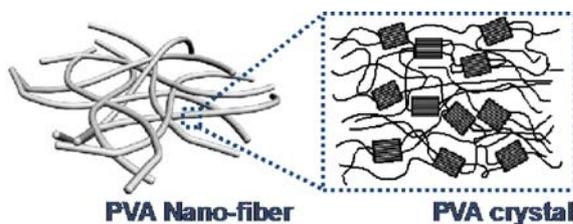
Atsushi Takahara, Yuji Higaki, Takahiro Yano, Mamiko Inoue, Takamichi Shinohara  
Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University  
744 Moto-oka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan  
Tel; 092-802-2517 Fax; 092-802-2518, E-mail; takahara@cstf.kyushu-u.ac.jp

## 【Introduction】

Surface properties of materials were excessively dominated to the profound hierarchical structure through nanometer (molecular level) to micron meter (artificial processing level) scales. An advanced material development with the hierarchical structure control of soft materials has been attracted tremendous interest for the past few years. In this work, nanostructure controlled soft materials were fabricated by precise processing technique and the molecular aggregation structure was characterized through various spectroscopic and scattering measurements. Also, the physical properties and functionalities were evaluated.

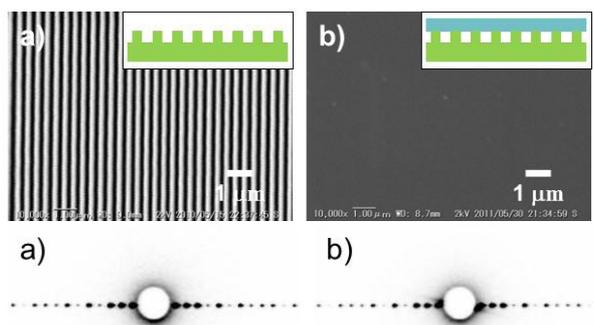
## 【Research Progress】

Poly(vinyl alcohol) (PVA) nanofibers fabricated by the electrospinning method have attracted much attention due to potential applications in various fields including the electrical, environmental, and medical applications. The orientation states of the nanofiber and the crystallite during uniaxial stretching of the non-woven nanofiber mat were analyzed by simultaneous stress-strain/wide-angle X-ray diffraction (WAXD) and stress-strain/small-angle X-ray scattering (SAXS) measurements. Crystal orientation was also measured by the polarized FT-IR measurement, and fiber orientation was observed by scanning electron microscopy observation. On the uniaxial stretching process of PVA non-woven nanofiber mat, both the nanofiber and polymer chain were oriented at the beginning of the strain, and the PVA crystallite oriented to the elongation direction with an increase in the degree of elongation, while the degree of nanofiber orientation was saturated at the elongation of 50% (**Figure 1**).



**Figure 1.** Graphical representation of the PVA nanofiber and the molecular aggregation structure.

Nano-imprint lithography (NIL) is a simple, low cost and high-resolution patterning method. The precise and nondestructive evaluation methods of nano-patterned polymer thin films have been required to scrutinize the thin films without causing damage. The characterization of surface and buried nano-structure fabricated by NIL was carried out by microscopic observation and synchrotron radiation small angle X-ray scattering (SR-SAXS). The anisotropic diffraction spots were clearly observed on the diffraction patterns of the PS covered NIL\_PLA up to the 20th order peaks (**Figure 2**). These spots were not observed from flat PLA films, so these spots can be attributed by nano-structure. The estimated structure size of the PS covered NIL\_PLA was in good agreement with the sizes of the molds. SR-SAXS could precisely and non-destructively characterize not only the surface, but also ‘buried’ structures.



**Figure 2.** SEM observation and two dimensional SR-SAXS diffraction pattern, a) NIL\_PLA, b) PS/NIL\_PLA.

Catechol group has been widely known as an adhesive functional group due to its strong interaction with metal oxide. We synthesized adhesive anionic copolymer containing the catechol groups to modify a stainless steel (SUS) surface in order to adsorb sufficient amount of cationic nanoparticles (NP) on this surface by electrostatic interaction. The model multilayer for controlled drug release on SUS was characterized by various techniques.

## 業績リスト

1. 原著論文 (著者、タイトル、雑誌名、巻号、始めと終わりのページ、年号)
  - 1) T. 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; *J. Mater. Sci. Eng.*, **2011**, *24*, 012004.
  - 2) T. Yano, W.-O. Yah, H. Yamaguchi, Y. Terayama, M. Nishihara, M. Kobayashi, A. Takahara; Precise Control of Surface Physicochemical Properties for Electrospun Fiber Mats by Surface-Initiated Radical Polymerization, *Polymer Journal*, **2011**, *43*, 838-848.
  - 3) H. Xu, J. Nishida, W. Ma, H. Wu, M. Kobayashi, H. Otsuka, A. Takahara. Competition between Oxidation and Coordination in Cross-Linking of Polystyrene Copolymer Containing Catechol Groups, *ACS Macro Lett.*, **2012**, *1*, 457-460.
2. 会議発表 (国際学会発表と招待講演を抜粋)
  - 1) T. Shinohara, T. Shirahase, D. Murakami, T. Hoshino, M. Kikuchi, H. Masunaga, H. Ogawa, J.-I. Koike, M. Horigome, A. Takahara; Precise and Nondestructive Characterization of Surface Nano-structure on Polymer Film by Scattering Technique, The 2nd FAPS Polymer Congress (FAPS-PC2011), 2011年5月11日
  - 2) A. Takahara, Y. Terayama, T. Ishikawa, M. Terada, D. Murakami, M. Kikuchi, M. Kobayashi; Applications of Surface Initiated ATRP to the Preparation of Polyelectrolyte Brushes for Wettability, Adhesion and Friction Control, 242nd ACS National Meeting: 6th symposium on "Controlled/Living Radical Polymerization" (CRP), 2011年8月31日
  - 3) T. Shinohara, T. Shirahase, D. Murakami, T. Hoshino, M. Kikuchi, H. Masunaga, H. Ogawa, J.-I. Koike, M. Horigome, A. Takahara; Non-destructive Characterization of 'Buried' Nano-structure in Polymer Thin Film by Small Angle X-ray Scattering, The 3rd Asian Symposium on Advanced Materials (ASAM-3), 2011年9月19-22日
  - 4) T. Yano, M. Kikuchi, T. Hoshino, N. Ohta, M. Kobayashi, A. Takahara; Characterization of Molecular Aggregation Structure of Poly(vinyl alcohol) Nanofiber Fabricated by Electrospinning, The 3rd Asian Symposium on Advanced Materials (ASAM-3), 2011年9月19-22日
  - 5) H. Xu, M. Kobayashi, J. Nishida, H. Otsuka, A. Takahara; Gelation of Polystyrene Copolymer Containing Catechol Groups in the Presence of Iron (III) Ions, The 3rd Asian Symposium on Advanced Materials (ASAM-3), 2011年9月19-22日
  - 6) A. Takahara; Surface and Interface Characterization of Organic Thin Films by Quantum Beam, 15th International Conference on Thin Films (ICTF-15), 2011年11月10日
  - 7) A. Takahara, M. Kobayashi, M. Terada, H. Yamaguchi, M. Morita, I. Yamamoto; Design of Environmentally Friendly Super Hydrophilic and Super Hydrophobic Polymer Surfaces, The 12th Pacific Polymer Conference, 2011年11月14日
  - 8) M. Inoue, H. Xu, J. Nishida, M. Kobayashi, A. Takahara; Surface Modification of Stainless Steel by Adhesive Anionic Copolymer and Biocompatible Multilayer for Controlled Drug Release, The 12th Pacific Polymer Conference, 2011年11月14日
  - 9) T. Shinohara, T. Shirahase, D. Murakami, T. Hoshino, M. Kikuchi, H. Masunaga, H. Ogawa, J.-I. Koike, M. Horigome, A. Takahara; Precise and Non-destructive Characterization of 'Buried' Nano-structure by Scattering Technique, The 12th Pacific Polymer Conference, 2011年11月14日

# 研究課題名 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

九州大学大学院工学研究院 三浦佳子

連携研究者：

九州大学大学院工学研究院 星野友 瀬戸弘一

富山高等専門学校 福田知博

## 1. 緒言

高分子、生体分子といった有機材料や有機分子組織体は柔らかくしなやかな性質を持つため、その分子の界面での状態、変化によって多様な機能を発揮しうることが知られている。こうした高分子や生体分子の性質を制御することは、優れたソフトマター機能材料の開発につながると期待できる。本研究は特に、生体機能材料としての特性について検討している。

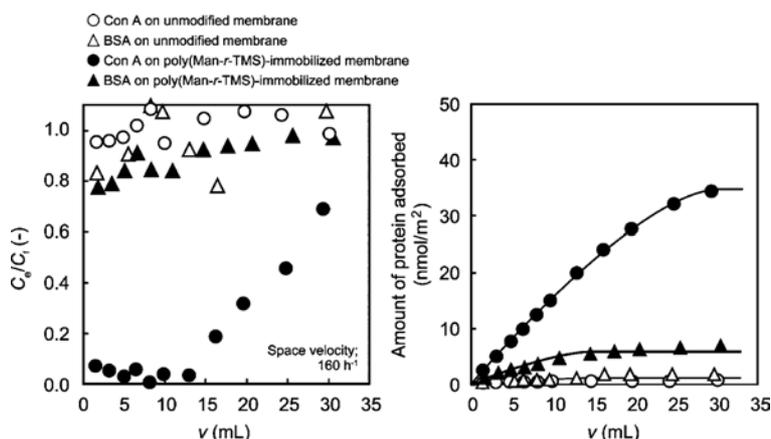
人工的に、ソフトな界面を制御するためには、精密な高分子素材などで界面を構築することが必要である。精密な高分子界面の構築方法としては、表面開始リビングラジカル重合を利用したポリマーブラシの生成や、LB膜の利用などがあげられる。精密な高分子を利用して、界面を作製する手法も考えられる。単一の精密な分子量とサイズを持つ分子として、デンドリマーがあげられる。加えて、デンドリマーは樹状の分子構造をしていることから、デンドリマーは基本的に球状の分子の広がりを持つ。従って、デンドリマーを用いることで、界面上に規則的なナノレベルの凹凸性を持たせることができる。本研究では、樹状高分子を中心として精密な高分子を用い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た。また、分子認識素子として糖鎖を用いて、界面上での機能の発現を検討した。

## 2. 研究経過

### (a) 高分子ブラシ生体分離デバイスの開発

これまでに生体高分子で基材を修飾することによって、基材に生体分子認識能を付与することができ、バイオセンサーの開発や生体機能の解析に役立つことを明らかにしてきた。一方で、こうした機能を利用することで特定のタンパク質やウイルスを分離除去するデバイスが開発可能と考えられる。そこで、生体分子認識素子として、 $\alpha$ マンノースを選択した上で、これをシラス上多孔膜 (SPG膜) に対して固定化することで、糖鎖の認識能を利用した生体分子分離材料の開発を行った。また、糖で修飾したデンドリマーと Grafting to法で固定化した線状の糖鎖高分子の 2つを用いて、特定タンパク質に対する親和性と膜分離の解析を行った。糖鎖高分子のモノマーとして、*p*-acrylamidophenyl- $\alpha$ -D-mannoside (Man) を使い、これをアクリルアミド、3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate (TMS) の 3元共重合で Poly(Man/TMS) を合成し、これを用いて各種 SiO<sub>2</sub> 表面に対して、糖鎖高分子を結合させた。また、第 4 世代ポリアミドアミンデンドリマーの末端に *p*-aminophenyl- $\alpha$ -D-mannoside を結合させた分子について、シランカップリング剤とマレイミドのチオール-エン反応を介して結合させた。

一方で、これらの高分子を多孔性基材に固定化して、タンパク質分離能について検討した。膜の孔径については、タンパク質に対するサイズ排除を起こさず、十分な流量が確保できる領域として 2  $\mu$ m とした。この時、糖鎖高分子類をグラフトした基材について、コンカナバリン A (ConA) と牛血清アルブミン (BSA) の分離について測定した。SPG-マンノース糖鎖高分子修飾薄膜について、シリンジポンプで ConA と BSA をそれぞれ流通させた。タンパク質溶液濃度については 10 mg/L として、流量は、10 mL/h とした。SPG-糖鎖薄膜については、ConA の破過曲線を測定し、タンパク質の吸着量を測定した。破過曲線からの吸着量について算出した。ConA の吸着量は 34 nmol/m<sup>2</sup> となり、非特異的に吸着するタンパク質 (BSA) の吸着量は 4.2 nmol/m<sup>2</sup> であることから、吸着量について 8 倍程度の差があることが明らかになった。一方で、マンノースデンドリマーを固定化した薄膜については、破過曲線を測定したところ、膜へのタンパク質溶液の供給直後からタンパク質の流出が観測され、破過曲線が観測されなかった。膜孔径との関係を考えて、500nm の孔径のもので同様に測定しても、破過が測定されなかった。これらの



ことから、流路デバイスにおける分子認識や分離膜の設計には、柔らかく浸透能の高いブラシ鎖を用いることが重要であることを示唆した。

#### (b) デンドリマーブラシによるタンパク質忌避活性材料の開発

生体機能材料の創製の上では、血液適合性やバイオセンサーの高感度化などが要求されるが、あらゆる応用でタンパク質忌避活性の発現が基礎となる。分子間斥力は、官能基だけでなく、分子密度に対する依存性が大きいことから、デンドリマーの世代による違いが期待できる。

ジスルフィド基を持つ第一世代と第四世代のポリアミドアミンデンドリマー (PAMAM) に対して、トリエチレングリコールユニット、メトキシトリエチレングリコールを結合させた化合物、アミノ基、カルボン酸末端を持つデンドリマーを合成し、金上にデンドリマー自己組織化膜の形成を行った。デンドリマー自己組織化膜は密な薄膜を形成し、デンドリマーは 7nm 程度の直径の薄膜を形成した。

この薄膜に対するタンパク質忌避活性について、タンパク質の電荷と分子量を考慮した上で、リパーゼ、牛血清アルブミン、フィブリノーゲンに対する相互作用を **Biacore** より測定した。アミノ基末端やカルボン酸末端を持つデンドリマー薄膜では、末端官能基の電荷に応じたタンパク質との相互作用を示した。一方で、トリエチレングリコールを結合させたデンドリマーSAM について、トリエチレングリコール直鎖の SAM との比較を行ったところ、タンパク質の忌避活性は 1/20 以下になった。特にメトキシトリエチレングリコールを結合させたデンドリマーSAM では殆どいずれのタンパク質も結合しないことがわかった。また、電荷を持つデンドリマーSAM については、アミノ基とカルボン酸を等量で混ぜて自己組織化膜を形成させると、両性イオン型のデンドリマーになることから、タンパク質の非特異吸着性に大きな差異が乗じ、第四世代デンドリマーでは高いタンパク質忌避活性を示すことがわかった。このように、タンパク質の忌避活性については、ソフト界面の構成分子の形状や分子末端密度に大きく依存し、デンドリマー薄膜については超薄膜の状態で見出しタンパク質忌避活性を示すことがわかった。

#### (c) 糖デンドリマーブラシ上での細菌接着性の解析

細胞表面の糖鎖は種々の生体分子認識作用に関わっている。糖鎖の相互作用は特に密度による多価効果の影響を強く受けることから、糖デンドリマー薄膜上での分子認識では界面での増強作用を発現させるのに有用である。また、デンドリマーはナノレベルの凹凸性を有し、表面エネルギーを変化させ、(b) に示したようなタンパク質忌避活性を発揮する。そのため、糖デンドリマーブラシ上での細菌の接着はこうした糖デンドリマーブラシ上でのタンパク質の特異な分子認識に影響を受けていると考えられる。

Mannose結合糖デンドリマー薄膜に対して、**Biacore**によるタンパク質の結合解析と、mannose認識大腸菌 (*E.coli* ORN 178) 及び、対称的に糖認識性を持たない大腸菌 *E.coli* ORN 208 について、結合解析を行った。また、平滑なマンノースSAMとの違いについても検討した。**Biacore**によってConAとの結合を解析すると、ConAに対して強い結合性を示すことがわかった。結合乗数は、 $2.81 \times 10^7 (M^{-1})$  になり、多価結合で結合していることが示唆され 一方で、大腸菌の接着数について、同様の表面において検討すると、*E.coli* ORN178, 208 とともに、デンドリマー表面に対する結合について、平滑な薄膜状での接着数が劣ることがわかった。このことは、膜表面上に埋め込まれたレクチンではデンドリマー上の曲率の不一致から、多価効果を発揮しえないことや、デンドリマーの高いタンパク質忌避活性が関係していると考えられた。このように、タンパク質や細胞、細菌などの生体分子認識は、その反応場の多価性や曲率などによって大きく影響を受けることが示唆された。

## Design of Soft Interface with Bioconjugate Dendrimers

Yoshiko Miura, Yu Hoshino, Hirokazu Seto

Kyushu University

Department of Chemical Engineering, Kyushu University

744 Motoooka, 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

Tomohiro Fukuda

Toyama national college of technology, 13 Hongo-machi, toyama, 939-8630, Japan

TEL: +81-76-493-5433 FAX +81-76-492-3859, E-mail:t-fukuda@nc-toyama.ac.jp

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. The functional materials fabrication using saccharides are also investigated.

### (a) Protein Separation with glycopolymer immobilized porous materials

The glycopolymer with trimethoxysilane group and glycodendrimer were immobilized on the SiO<sub>2</sub> substrate and silica-porous materials. Both of the glycopolymer and glycodendrimer carrying  $\alpha$ -mannose group, and showed the specific and strong interaction to concanavalin A (ConA) but not to BSA. On the other hand, the efficacy of protein separation was strongly dependent on the kind of grafted polymer. In the case of glycopolymer with a linear shaped acrylamide derivative, the protein separation was successfully performed: ConA and BSA were adsorbed on the silica-porous materials about 34 and 4.2 nmol/m<sup>2</sup>, respectively. However, the selective protein separation was not accomplished with dendrimer interface, in spite of the strong protein binding on the flat substrate. The glycopolymer immobilized interface was utilized protein separation, but the function depended on the kind of polymer.

### (b) Bio-inert surface property of dendrimer interface

Bio-inert surface property is very important in the fabrication of biomaterials and biosensors. The bio-inert surface properties are strongly affected by the functional group and the molecular density on the interface. Dendrimer interface displays the well-defined surface with specific terminal group, and so it is a good model to investigate the design of bio-inert interface.

We prepared polyamidoamide (PAMAM)-dendrimer with various terminal groups of methoxy triethyleneglycol, hydroxyl triethyleneglycol, carboxylic acid and amine group, and the self-assembled monolayers (SAMs) of the dendrimers were prepared. The protein adsorption on the SAMs was investigated by surface plasmon resonance using BSA, lysozyme and fibrinogen. The dendrimers with triethyleneglycol showed the strong bioinert-surface property to all of the proteins. The dendrimers with carboxylic acid inhibited the binding of BSA and fibrinogen due to the electrostatic interaction, but adsorbed lysozyme. The dendrimers with amino terminal inhibited lysozyme adsorption. Interestingly, the mixed dendrimer SAMS with amino- and carboxylic acid group showed the strong inhibition on protein adsorption. The amount of protein bound was much decreased from the SAMs of the functional group without dendrimer template.

### (c) Bacteria recognition of dendrimer interface

Mannose modified dendrimer interface showed strong and specific interaction to protein of ConA. The interaction with mannose recognition protein of *E.coli* ORN 178 was measured. *E.coli* ORN178 adsorbed on the mannose-modified interface, and the surface morphology was affected to the adsorption. *E.coli* ORN 178 adsorbed more to the flat mannose-modified substrate than to the dendrimer interface. The results suggested the bacteria recognized the morphology of the substrate.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

- 1) Y. Maeda, A. Matsumoto, Y. Miura, Y. Miyahara, "Preparation of alpha-mannoside hydrogel and electrical detection of saccharide-protein interactions using the smart gel-modified gate field effect transistor". *Nanoscale Res Lett*, **2012**, *7*, 108.
2. 三浦佳子、坂本祥吾、福田知博、由井信彦、“硫酸化糖鎖高分子によるグリコサミノグリカンモデルポリマーの合成とアミロイド阻害作用” *高分子論文集*, **2012**, *69*, 47.
3. H. Seto, Y. Ogata, M. Tatsuya, Y. Hoshino, Y. Miura, "Selective protein separation using siliceous materials with a trimethoxysilane-containing glycopolymer" *ACS Applied Materials Interfaces*, **2012**, *4*, 411.
4. E. Matsumoto, K. Nishizawa, T. Fukuda, M. Takai, Y. Miura, "Separation capability of proteins using microfluidic system with dendrimer modified surface" *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* **2011**, *36*, 541.
5. T. Fukuda, Y. Inoue, T. Koga, M. Matsuoka, Y. Miura "Encapsulation of polythiophene by glycopolymer for water soluble nano-wire" *Chem. Lett.* **2011**, *40*, 864.
6. J. Ishii, M. Chikae, M. Toyoshima, Y. Ukita, Y. Miura, Y. Takamura, "Electrochemical assay for saccharide-protein interactions using glycopolymer-modified gold nanoparticles" *Electrochemistry Commun.* **2011**, *13*, 830
7. M. Wada, Y. Miyazawa, Y. Miura, "A specific inhibitory effect of multivalent trehalose toward beta (1-40) aggregation", *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1822
8. J. Ishii, M. Toyoshima, M. Chikae, Y. Takamura, Y. Miura, "Preparation of glycopolymer modified gold nanoparticles and a new approach for lateral flow assay" *Bull Chem Soc Jpn*, **2011**, *84*, 466.

### 2. 著書・総説

- 1) Y. Miura, T. Fukuda, Y. Miura, T. Fukuda, InTech Amyloidosis - Mechanisms and Prospects for Therapy, Chapter 5, 85-100, 2011
- 2) 三浦佳子 福田知博, 糖鎖の生体認識能を利用した材料の開発, 未来材料, 2011, 11, 26-31.

### 3. 会議発表

- 1) 三浦佳子、アミロイド表面の構築と評価、第21回日本MRS学術シンポジウム
  - 2) 三浦佳子、糖鎖ブラシ表面の調製とその生体材料としての評価、医用高分子研究会
  - 3) 三浦佳子、ソフト界面を活かした先端化学、日本化学第92回年会
  - 4) Yoshiko Miura, "Glycosaminoglycan model polymers to inhibit the aggregation of Alzheimer amyloid beta peptides" 14<sup>th</sup> Asian Chemical Congress,
  - 5) Yoshiko Miura, Glycopolymer Substituted Biomaterials via RAFT Living Radical Polymerization, The 3rd asian symposium on advanced materials
  - 6) Yu Hoshino, Masahiko Nakamoto, Yoshiko Miura, Influence of polymer density of plastic antibodies on target binding kinetics, 243rd ACS National Meeting & Exposition.
  - 7) 杉本雅志、武井孝行、星野友、三浦佳子、 dendrimer 界面によるタンパク質 大腸菌の吸着制御— 2 —, 日本化学会第92回年会
  - 8) 緒方裕太郎、瀬戸弘一、三浦佳子、糖鎖高分子修飾表面を用いたタンパク質分離材料の開発、化学工学会第77回年会
  - 9) 瀬戸弘一、高良政己、星野友、三浦佳子、RAFT ポリマーを利用したガラス材料の表面修飾、化学工学会第77回年会
- 他 計 27 件

### 4. その他 (例えば特許など)

計画研究代表者 A02

ソフト界面の解析 「ソフト界面を“探る”」



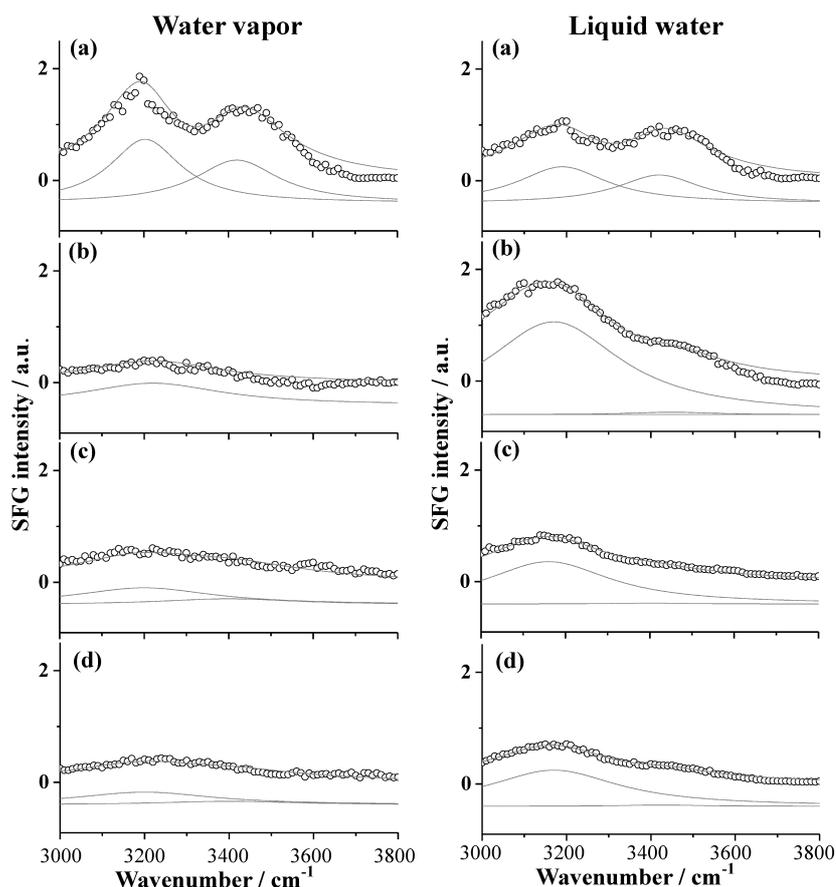
## 1. 緒言

高分子に収着した水が、材料の機能に大きな影響を与えることが知られている。水の構造を調査するには、その場 (*in situ*) 測定が可能な振動分光法が適している。これまでに、赤外分光法や Raman 分光法により、高分子水溶液中や、高分子薄膜中の水の構造を検討してきたが、材料「近傍」の水を選択的に捉えることはできなかった。しかし、界面選択的な測定法である和周波発生法 (Sum Frequency Generation, SFG) を用いることにより、目的の達成が可能となる。そこで、物質・材料研究機構の魚崎教授、野口秀典准教授との共同研究により、双性イオン型高分子ブラシ近傍の水を SFG 法により調査した。また、高分子材料に収着した水の凍結・融解挙動を、近赤外分光法および示差走査熱量分析により検討した。

## 2. 研究経過

### 2-1. 高分子ブラシ近傍の水の SFG スペクトル測定

カルボキシベタイン型の単量体 (CMB) を、表面開始原子移動ラジカル重合 (Surface-initiated Atom Transfer Radical Polymerization, SI-ATRP) により半円筒型の溶融石英プリズムの平坦面にブラシとして導入し、ブラシ近傍の水に由来する SFG スペクトルを測定した。未修飾の溶融石英表面、ATRP 開始剤自己組織化単分子膜 (Self-assembled Monolayer, SAM) 修飾石英表面と比較して、O-H 伸縮振動に由来する  $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$  付近の SFG のシグナル強度の大幅な低下が観測された (Fig. 1)。未修飾の石英表面ではシラノール基と水素結合した水が、また ATRP 開始剤 SAM 修飾石英表面では疎水性水和した水が、いずれも配向して広がっているものと考えられる。一方、双性イオン型高分子ブラシの場合には、その何れよりも配向が抑えられた水が界面に存在すること



**Fig. 1.** SFG spectra in the OH stretching region of (a) bare, (b) BPE SAM, (c) PCMB ( $tDP = 20$ ), (d) PCMB ( $tDP = 50$ ) and (e) PCMB ( $tDP = 100$ ) brush-covered quartz prisms in contact with water vapor-saturated nitrogen (left) and liquid water (right).

を示している。さらに、双性イオン型高分子ブラシの長さを増加させたところ、配向した水に由来するシグナル強度が若干減少することが判明した。メタクリル酸や三級アミンを側鎖に有する高分子ブラシ系では、静電水和した水の層が存在することがこれまでに見いだされている。このことを踏まえ、双性イオン型高分子ブラシを修飾した熔融石英表面では、高分子と水との間の水素結合や静電相互作用、疎水性水和に由来する水分子の配向の程度が小さく、水の構造が大きくは乱されていないことを示唆しており、これまでにRaman散乱法で得られた水溶性高分子溶液系、赤外分光法で得られた高分子薄膜系における測定結果とよい一致を示した。

## 2-2. 高分子に収着した水の凍結融解挙動

前年度までに、水を非溶媒とする固体高分子中に観測される水の再結晶化（昇温過程での結晶水の生成）は、冷却過程で形成される無定型氷を経た結晶水の生成ではなく、単分子的に存在する水分子が凝集し、結晶氷を形成する現象であることを示した。一方で、この再結晶化水は、高分子材料の生体適合性の指標となり得ると提案されており、その代表例として、水を非溶媒とする poly(2-methoxyethylacrylate) (pMEA) 中の再結晶化水が知られている。しかしながら、高い生体適合性を有することが示されている、双性イオン型単量体を含む共重合体中に水を含浸させた系で再結晶化水が存在するとの報告例はない。

そこで本研究では、双性イオン型ビニルモノマーであるカルボキシメチルベタイン (CMB) あるいはスルホプロピルベタイン (SPB) と、水を非溶媒とする  $\alpha$ -ブチルメタクリレート (BMA) との共重合体 (Fig. 2) 中の水の凍結・融解挙動について、示差走査熱量法 (DSC) および温度可変近赤外分光法 (TV-NIR) で調査し、再結晶化水の有無を検証した。

フリーラジカル重合で調製した双性イオンビニルモノマーを $\sim 30$  mol%含む共重合体は、いずれも水に不溶であり、タンパク質吸着、繊維芽細胞接着、さらには血小板粘着を強く抑制することがわかっている。

これらの共重合体を液体水に 37 °C で 24 時間接触後、DSC および TV-NIR 測定を行った。飽和含水率は、p(SP B-BMA) が 22 wt%、p(CMB-BMA) が 47 wt% であった。

DSC 測定は、降・昇温速度  $5.0 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$ 、330–200 K の範囲を、NIR 測定は、近赤外領域の  $8500\text{--}3500 \text{ cm}^{-1}$ 、300–170 K の範囲で、降温速度 1, 3, 5  $\text{K} \cdot \text{min}^{-1}$ 、昇温速度  $1 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$  で行った。共重合体の含水率は、重量法により決定した。Fig. 3 は、p(SP B-BMA) および p(CMB-BMA) の飽和含水膜の昇温過程の DSC 曲線である。

前者では $\sim 254 \text{ K}$ 、後者では $\sim 261 \text{ K}$ に発熱成分、続いて共通に、270 K、274 K、278 K にピークを有する吸熱成分が観測された。TV-NIR 法により評価したところ、DSC 曲線に観られる発熱成分は、氷  $I_h$  の生成であり、低温結晶化水であることが確認された。DSC 曲線から、再結晶化水および測定下限温度 (200 K) でも凍結しなかった水の割合は、それぞれ、p(SP B-BMA) では 5% および 33%、p(CMB-BMA) では 9% および 71% であった。先述したように DSC 測定で観測された p(SP B-BMA) および p(CMB-BMA) 飽和含水膜の昇温過程での発熱ピークは水の再結晶化であることが確認されたが、現在のところ、この再結晶化水が無定型氷を経た結晶化なのか否かは不明であり、今後の詳細な検討が必要である。

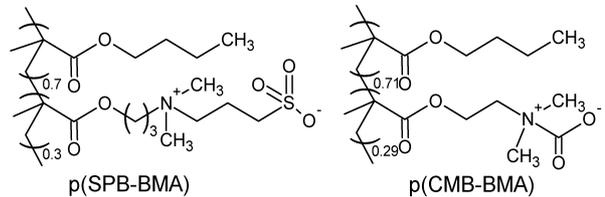


Fig. 2. Chemical structure of copolymers containing zwitterionic moieties.

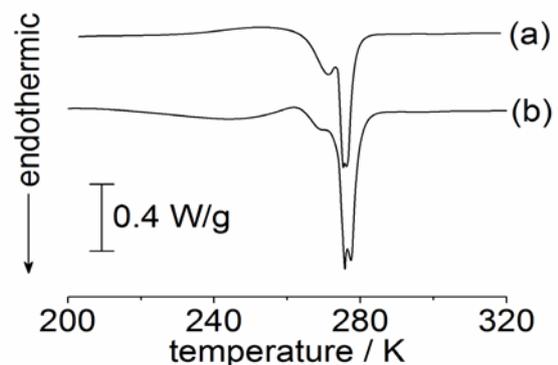


Fig. 3. DSC heating curve of a hydrated p(SP B-BMA) (a) and a hydrated p(CMB-BMA) (b). Cooling and heating rates were  $5 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$ .

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

Hiromi Kitano and Makoto Gemmei-Ide

*Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama  
Gofuku 3190, Toyama 930-8555, Japan*

In 2011, a relationship between anti-biofouling properties of a zwitterionic polymer brush on a quartz prism and a water structure in the vicinity of the polymer brush was examined by sum-frequency generation spectroscopy. In addition, the freezing/melting behavior of water sorbed into copolymers containing the zwitterionic moieties was examined by differential scanning calorimetry and temperature variable near infrared spectroscopy.

## 1. Sum Frequency Generation Spectra of Water in the Vicinity of Polymer Brush

A zwitterionic poly(carboxymethylbetaine) (PCMB) brush was prepared on a fused quartz prism by the surface-initiated atom transfer radical polymerization (SI-ATRP) of CMB monomer. The conformation of PCMB brush and the state of water at the surface of the brush were examined using sum frequency generation (SFG) technique. The C-H stretching band of the brush, indicating the *gauche* defect of the brush, was affected by the contact medium such as dry nitrogen, water vapor-saturated nitrogen and liquid water. The water molecules at the PCMB-water interfaces were not largely oriented in comparison with the interfacial water of both bare and the ATRP-initiator-modified quartz prisms. The similar tendency was previously observed for water in the vicinity of water-soluble zwitterionic polymers and polymer thin films using Raman and attenuated total reflection (ATR) infrared spectroscopies, respectively. The electrical neutralization between neighboring positive and negative charges might diminish the electrostatic adsorption of water molecules to the vicinity of zwitterionic polymer brushes.

## 2. Freezing/Melting Behavior of Water Adsorbed to Polymer Chain

Change in the state of water sorbed into non-water soluble copolymers containing zwitterionic moieties by thermal perturbation was investigated by differential scanning calorimetry (DSC) and temperature variable near infrared spectroscopy (TV-NIR). Copolymers of *n*-butylmethacrylate and carboxybetaine (p(CMB-BMA)) or sulfobetaine vinyl monomers (p(SPB-BMA)) were synthesized by a conventional free radical polymerization. The two copolymers have been revealed to have high biocompatibility. DSC heating curves of the two copolymers with equilibrium water content showed exothermic components at ~245 K for p(SPB-BMA) and at ~261 K for p(CMB-BMA). NIR spectral changes of water sorbed into the two copolymers revealed that the exothermic components observed in the DSC heating curve were attributed to crystallization of water during heating, that is, recrystallization of water. Recrystallization of water in the two polymers was first reported. Based on the DSC analysis, the amounts of non-freezing water and recrystallization water were calculated to be 5 wt% and 33 wt% for p(SPB-BMA), respectively, and be 9 wt% and 71 wt% for p(CMB-BMA), respectively. At this moment, it is unclear whether this recrystallization water is generated from glassy water.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

1) Kondo, T.; Nomura, K.; Murou, M.; Gemmei-Ide, M.; Kitano, H.; Noguchi, H.; Uosaki, K.; Ohno, K.; Saruwatari, Y.

“Structure of water in the vicinity of a zwitterionic polymer brush as examined by sum frequency generation method.”

*Colloids Surfaces B: Biointerfaces* in press (2012).

2) Suzuki, H.; Li, L.; Nakaji, T.; Kitano, H.; Ohno, K.; Saruwatari, Y.; Matsuoka, K.

“Carboxymethylbetaine copolymer layer covalently fixed to a glass substrate.”

*Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 94, 107–113 (2012).

3) Gemmei-Ide, M.; Ohya, A.; Kitano, H.

“Recrystallization of Water in Non-Water-Soluble (Meth)Acrylate Polymers is Not Rare and is Not Devitrification.”

*J. Phys. Chem. B*, 116, 1850–1857 (2012).

4) Kitano, H.; Saito, D.; Kamada, T.; Gemmei-Ide, M.

“Binding of  $\beta$ -amyloid to sulfated sugar residues in a polymer brush.”

*Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 93, 219–225 (2012).

5) Kondo, T.; Gemmei-Ide, T.; Kitano, H.; Ohno, K.; Noguchi, H.; Uosaki, K.

“Sum frequency generation study on the structure of water in the vicinity of an amphoteric polymer brush.”

*Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 91, 215–218 (2012).

6) Kitano, H.; Kondo, T.; Iwanaga, S.; Nakamura, M.; Ohno, K.

“Silica particles coated with zwitterionic polymer brush: Formation of colloidal crystals and anti-biofouling properties in aqueous medium.”

*Colloids Surfaces B: Biointerfacese*, 84, 111–116 (2011).

7) 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) 源明 誠, 北野博巳

「固体高分子中の水の結晶化挙動と生体適合性の相関」

*表面科学* 33, 15–20 (2012).

2) 北野博巳, 源明 誠

「高分子材料近傍の水の構造と機能との相関」

*未来材料* 11, 40–46 (2011).

## 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、融点が3次元固体に比べて50~90℃と大きく低下していることを見出しいる。また、②PMMA/poly(n-nonyl acrylate) (PNA) が相溶性の単分子膜を形成し、両者のT<sub>g</sub>の違いのため、PMMAの極く少量添加組成でPNA単分子膜に可溶化されたPMMAの孤立鎖を観察可能であり、2次元膜中での分子鎖の広がりを実量的に測定することに成功している。本年度は、③PMMA/ポリ乳酸単分子膜系が高分子単分子膜として初めてスピノーダル分解により相分離する系であることを見出し、さらに④高分子の基板上での重合挙動の観察について着手したので報告する。

## 1. 研究経過

### (1) 高分子ブレンド単分子膜のスピノーダル分解による2次元相分離構造制御

高分子 Langmuir-Blodgett(LB)膜は機能性薄膜として精力的に研究されている。LB膜は原理的に水面に垂直方向の構造をコントロールしやすいが、水平方向の構造もコントロールすることができれば高分子 LB膜のより高度な機能化が期待される。本研究では、両成分とも水面で単分子膜を形成するPMMAとPoly(L-lactide)(PLLA)のブレンド単分子膜を検討し、表面圧を加えるとスピノーダル分解により2相に相分離する事を見出したので報告する。本システムは、高分子単分子膜中でスピノーダル分解により2次元相分離する初めての系である。

用いたサンプルは、PMMA ( $M_n=6000$ ,  $M_w/M_n=1.08$ )、PLLA ( $M_n=6000$ ,  $M_w/M_n=1.18$ )である。図1に単分子膜のAFM観察により最終的にまとめた本系の相図を示した。低表面圧では、均一相領域であり、表面圧を加えると直ちに、スピノーダル分解 (●)、もしくは核生成と成長 (○) で相分離する。図2には、ブレンド単分子膜 (50/50wt/w) をスピノーダル分解領域の表面圧2、5mN/mで相分離させたLB膜のAFM像を示した。いずれもスピノーダル分解に典型的な共連続構造をとり、フーリエ変換像は、明確なスピノーダルリングを示している。詳細な検討の結果、Quench depthの小さい2mN/mでは相分離のサイズはあまり変化せず、コ

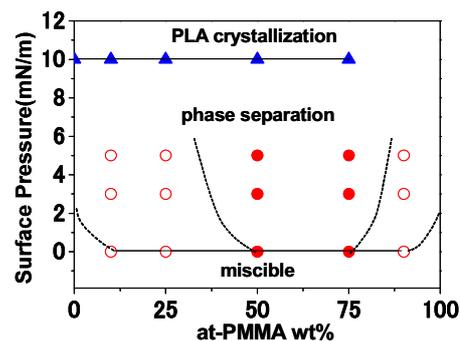


図1 PMMA/PLLAブレンド単分子膜の相図. ○: 核生成及び成長, ●: スピノーダル分解, ▲: PLA結晶化.

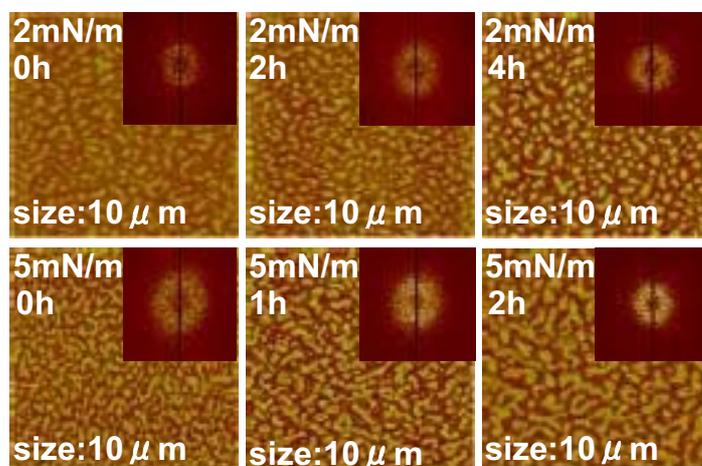


図2 PMMA/PLLA (50/50 wt/wt)単分子膜の相分離構造時間発展(AFM高さ像). 表面圧(上段:2, 下段:5mN/m). 挿入図: フーリエ変換像.

ントラスト（両相の高さの差、この場合は濃度差に相当）のみが増加しているのに対して、Quench depthの大きい5mN/mでは、逆に、コントラストはほぼ一定で、ドメインサイズのみが成長していることがわかる。この挙動は、2および5mN/mの結果が、それぞれ3次元のスピノーダル分解で良く知られているスピノーダル分解の初期過程、後期課程（図3参照）に相当していることを示している。

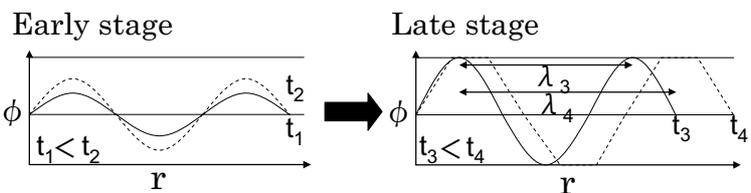


図3 スピノーダル分解の初期、後期課程の濃度プロファイル（模式図）。

以上示したように、PMMA/PLA系はポリマーブレンド単分子膜系で初めてスピノーダル分解により相分離する系であることが明らかになった。高分子超薄膜の相分離構造制御という意味で興味深いとともに、高分子超薄膜を理解する上でも有用な知見であると考えられる。

## (2) 基板上での重合挙動の直接AFM観察

高分子の各種環境下での in situ 観察の一例として、高分子の基板表面での重合挙動をできれば分子レベルで観察したいと考えている。ラジカル開始剤をモノマー蒸気中で加熱すると開始剤表面で重合が起こり、疑似リビング的に重合が進行することが知られている(Vapor Deposition Polymerization, VDP)<sup>1</sup>。ここでは、マイカ基板上に極少量の開始剤2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN)( $1 \times 10^{-7}$ g/mL-benzene)をスピンキャストし、MMA蒸気中で60°C、45分加熱し、生成したポリマーの孤立鎖を観察することを試みた。残念ながらMMAはマイカ上で粒子状に重合し孤立鎖を観察することはできなかったが、マイカ上に生成した粒子を溶媒で溶解させることで、図4(2)のように孤立鎖状に観察することが可能になった。分子量既知のPMMAを用いて、分子長-分子量の検量線を別途作成することで、重合後のPMMAの分子長から分子量を推察することが可能である。図4(3)には、こうして求めた分子量と、マイカ上ではなく、アルミパン中にAIBNを少量入れて重合したサンプル（図4(1)参照）のGPCで求めた分子量の時間変化を併せて示した。アル

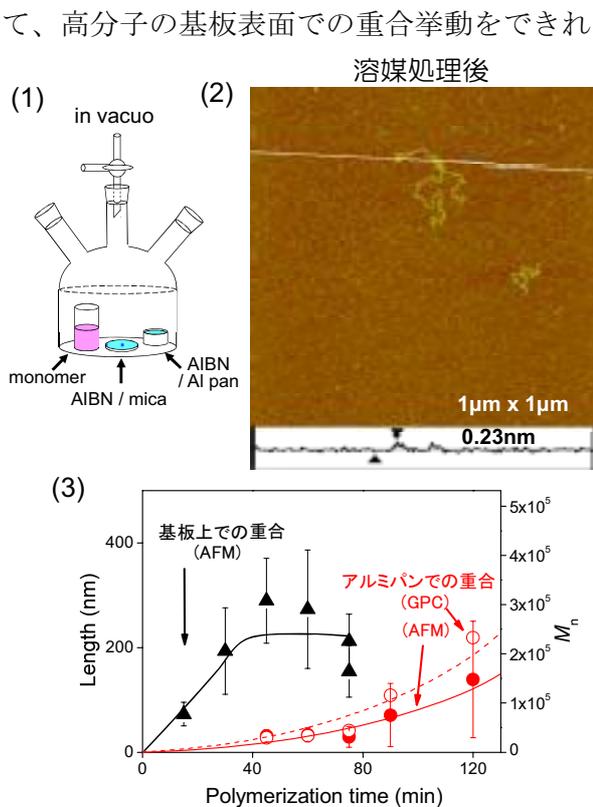


図4. (1)MMAのVDP重合装置. (2)マイカ上で重合後、溶媒処理した後のAFM高さ像.(3)マイカ基板上、アルミパン中でVDP重合したPMMAの分子量.

ミパン中に比べて、マイカ上で重合した場合、重合速度が極めて早く、高分子量体が生成していることがわかる。グラフト重合等で表面に重合したものは、得られる高分子の量が極めて少ないため、その分子量等の評価は、困難な場合が多い。このため、バルク中の重合物と同じ分子量を持つと仮定して解釈することがよく行われるが、表面で重合したものが必ずしもバルクと同じ分子量を持たない可能性があることを示しており、AFMによる直接観察が、表面における挙動を評価する上で有用な手法であることがわかる。今後は、基板に分子が孤立鎖状に重合する条件で重合挙動を in situ でAFM観察することに挑戦したいと考えている。

## 文献

(1) Yasutake, M.; Hiki, S.; Andou, Y.; Nishida, H.; Endo, T. *Macromolecules* **2003**, *36*, 5974-5981.

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 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. A polymer monolayer spread on a water surface is an ideal model of polymer chains in the 2D states, therefore, has been a subject of intense studies. However, our understanding of the polymer monolayers is still limited. 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 be obtained by other methods. In this project, (I) we studied melting behavior of a 2D folded-chain crystal of isotactic poly(methyl methacrylate) (it-PMMA) and found significant melting point depression ranged to 50 – 90 degrees from those of 3D samples. (II) Also, we found that single chain conformation solubilized in a miscible polymer blend monolayer could be observed because of a difference of the glass transition temperatures of the component polymers, and quantitatively evaluated the radius of gyration of the solubilized chains. This year, we have found that (1) a PMMA/poly(lactide) (PLA) monolayer phase separated by the spinodal decomposition mechanism, also (2) we have started observation of polymerization on a substrate by AFM, as mentioned below.

**(1) 2D phase separation of PMMA/PLA blend monolayer by spinodal decomposition mechanism**

Control of the lateral morphology of polymer monolayers is one of the important issues of nanotechnology. We found that a PMMA/PLA blend monolayer on a water surface phase separated with compression via the spinodal decomposition mechanism. Fig.1 shows AFM of the monolayers deposited on mica after phase separated on a water surface. Typical interconnected structures and spinodal rings by the Fourier transform indicated that the phase separation proceeded by the spinodal decomposition mechanism. Detailed analysis indicated that the phase separations at 2 and 5 mN/m corresponded to the early and late stage of spinodal decomposition, respectively. The first 2D phase separation of a monolayer via spinodal decomposition shown here provides a new mythology for control the lateral structure of a monolayer.

**(2) AFM investigation of vapor phase radical polymerization on a substrate**

Thermal cleavage of a radical initiator under a monomer vapor resulted in polymerization of the monomer at the initiator surface under a pseudo living polymerization mechanism (Vapor-phase deposition (VPD) polymerization). We studied VPD polymerization of MMA with an extremely small amount of radical initiator deposited on mica. Unfortunately, MMA did not polymerize as a single chain adsorbed on the substrate, but aggregated to particles. However, after solubilized on the substrate, isolated chains were successfully observed by AFM. We evaluated the molecular weight of the chains and compared with bulk polymerized samples.

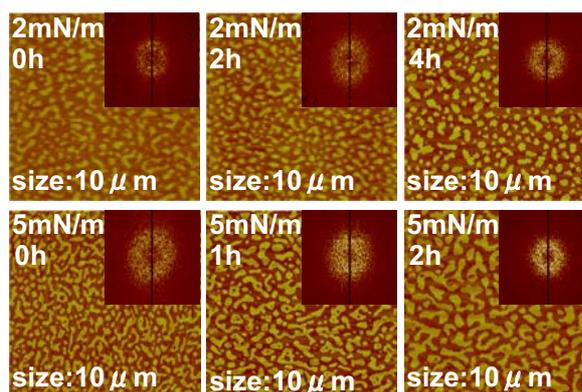


Fig.1 AFM of a PMMA/PLA(50/50 wt/wt) monolayer deposited on mica after phase separated at 2 (upper) and 5 mN/m (lower). Inset: Fourier transform.

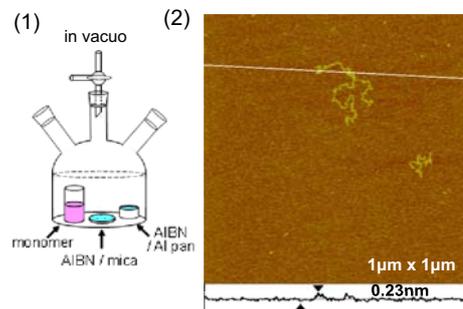


Fig.2 (1)VPD apparatus. (2)MMA VPD polymerized, then solubilized by benzene on the substrate.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

- 1) Kouki Sugihara, Jiro Kumaki\*, “Visualization of Two-Dimensional Single Chain Conformations Solubilized in Miscible Polymer Blend Monolayer by Atomic Force Microscopy”, *J. Phys. Chem. B*, *in press* (DOI: 10.1021 /jp303063c).

### 2. 著書・総説

- 1) 熊木治郎, “合成高分子の高分解能原子間力顕微鏡観察”, ネットワークポリマー, *33*, 42-49 (2012).

### 3. 会議発表

- 1) 高梨ゆま、熊木治郎、イソタクチックPMMA 2次元折りたたみ鎖結晶の高分解能AFMによる融解挙動観察、第60回高分子学会年次大会、大阪(2011. 5. 25-27). [国内学会、口頭]
- 2) 杉原孝樹、熊木治郎、分子相溶系ポリマーブレンド単分子膜に可溶化した分子鎖のAFM観察、第60回高分子学会年次大会、大阪(2011. 5. 25-27). [国内学会、口頭]
- 3) 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、第60回高分子学会年次大会、大阪(2011. 5. 25-27). [国内学会、ポスター]
- 4) 佐藤剛、熊木治郎、ポリマーブレンド単分子膜のスピノーダル分解による相分離、第60回高分子学会年次大会、大阪(2011. 5. 25-27). [国内学会、ポスター]
- 5) 佐藤剛、熊木治郎、PMMA/ポリ乳酸ブレンド単分子膜のスピノーダル分解による2次元相分離、第60回高分子討論会、岡山(2011. 9. 28-30). [国内学会、口頭]
- 6) 渡邊謙次、熊木治郎、単分子膜中でのポリ乳酸の結晶化およびステレオコンプレックス形成のAFM観察、第60回高分子討論会、岡山(2011. 9. 28-30). [国内学会、口頭]
- 7) 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による検討、第60回高分子討論会、岡山(2011. 9. 28-30). [国内学会、口頭]
- 8) 橋本紘志、杉原孝樹、熊木治郎、ポリノニルアクリレート単分子膜に可溶化されたit-PMMA鎖のAFM観察、第60回高分子討論会、岡山(2011. 9. 28-30). [国内学会、ポスター]
- 9) 生熊龍介、杉原孝樹、熊木治郎、各種ポリアクリレート単分子膜に可溶化されたat-PMMA孤立鎖の広がり、第60回高分子討論会、岡山(2011. 9. 28-30). [国内学会、ポスター]
- 10) 杉原孝樹、橋本紘志、生熊龍介、熊木治郎、分子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AFM観察、2011高分子学会東北支部研究発表会、米沢(2011. 11. 17-18). [国内学会、口頭]
- 11) 高梨ゆま、熊木治郎、イソタクチックPMMA 2次元折りたたみ鎖結晶の高分解能AFMによる融解挙動観察、2011高分子学会東北支部研究発表会、米沢(2011. 11. 17-18). [国内学会、口頭]
- 12) 安齋貴寛、熊木治郎、イソタクチックPMMA単分子2次元折りたたみ鎖結晶のAFM観察、2011高分子学会東北支部研究発表会、米沢(2011. 11. 17-18). [国内学会、口頭]
- 13) Yuma Takanashi, Jiro Kumaki, “Strong Melting Point Depression of Two-Dimensional Folded Chain Crystals of Isotactic Poly(methyl methacrylate)s Observed by In-Situ High-Resolution Atomic Force Microscopy”, IACIS2012 (International Association of Colloid and Interface Scientists), Sendai, Japan, May 13-18, 2012. [国際学会、口頭]

# 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、独自の領域を拓いている。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）。

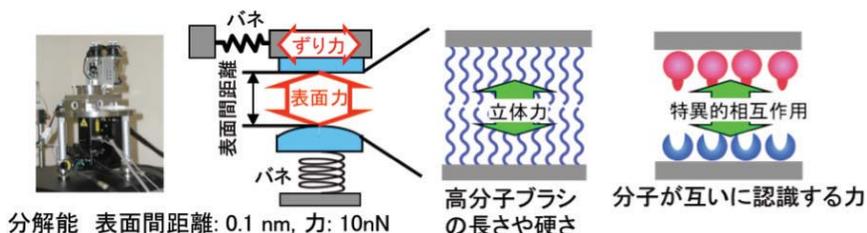


図1 表面力測定と研究対象としている相互作用力の模式図

## 2. 研究経過

### (1) 配向固定化した生体機能分子間の特異的相互作用の直接測定

#### (a) 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

タンパク質のリン酸化反応が重要な生体反応を制御していることはよく知られている。枯草菌が孢子形成時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したKinA (KinA-P) が、リン酸基をSpo0F以下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孢子形成遺伝子群の発現誘導を行うプロセスである(図2)。しかし、その素過程については十分な研究がなされていない。

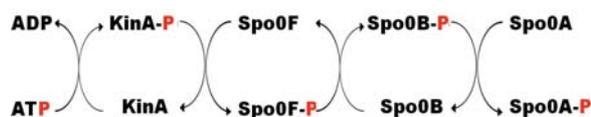


図2 ホスホリレーシグナル伝達系

平成22年度にひきつづき、ホスホリレーシグナル伝達系に関与するタンパク質 (KinAとSpo0F) を表面に配向固定化し、コロイドプローブ原子間力顕微鏡 (AFM) 法を用いて、ホスホリレーシグナル伝達プロセスの第一段階であるKinA-Spo0F表面間の相互作用力の直接測定を行った。さらに、比較としてKinA-KinA表面間、Spo0F-Spo0F表面間の相互作用力の直接測定を行った。それぞれの場合に、ATPあり、ATPなしの条件で接着力(引力)を評価した。

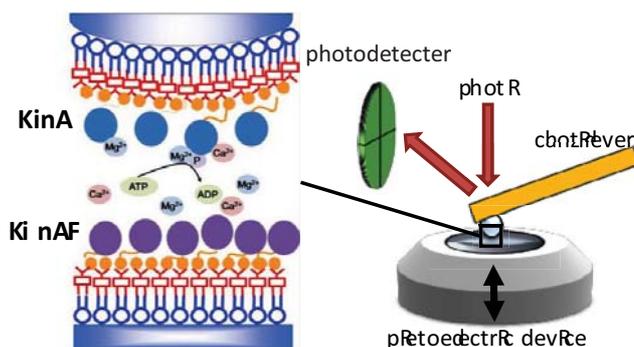


図3 KinA-Spo0F間の相互作用力測定の模式図。

KinA-Spo0F表面間の表面力でのみ、ATPの添加により引力(接着力)の増大が観測された (ATPなし : 0.32 mN/m, ATPあり : 0.45 mN/m)。これはATPによりKinAがリン酸化状態(KinA-P)に変化し、Spo0Fと相互作用したためと考えられる。

### (b) ニワトリ卵白リゾチームと抗体HyHEL10scFv間の相互作用の直接測定

生体内ではタンパク質や DNA といった生体分子同士が相互作用することで生命活動に重要な反応が進行する。そのため、生体分子間相互作用の解明は生命現象を理解する上で必須な課題であるが、これらを簡便にかつ精密に測定するための手法が確立されておらず、基盤となる情報つまり相互作用に関わるアミノ酸についての情報が少ない。従って、生体分子間の相互作用をアミノ酸単位で議論できれば、プロテオーム研究に有用な知見を与えられと考えられる。平成 23 年度は、ニワトリ卵白リゾチーム (wild type, 1 アミノ酸変異体 (K97A, K97M))と、その抗体 HyHEL 10 scFv を表面に配向固定化し、これらの表面間の相互作用のコロイドプローブ原子間力顕微鏡 (AFM) による測定、および 1 アミノ酸変異による相互作用への影響の検討を開始した。

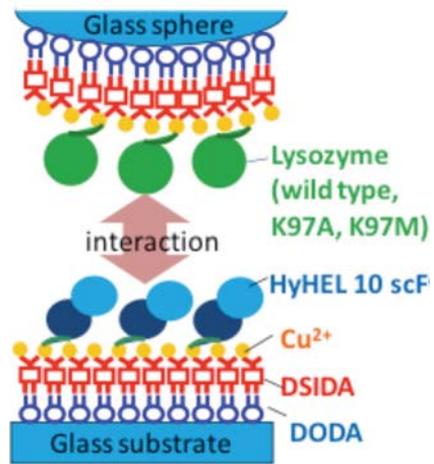


図 4 ニワトリ卵白リゾチーム-HyHEL10scFv 間の相互作用力測定の模式図。

### (2) ツインパス表面力装置による金表面上の PEG ブラシ層の構造・特性評価

PEGによる表面修飾は、タンパク質の吸着抑制に対して有効であることが知られている。しかし、PEGの分子鎖長、コンフォメーション、水和、密度などの影響、吸着抑制機構は十分に理解されていない。本研究では、研究代表者らが開発した反射型光学干渉法により距離を測定するツインパス型表面力装置を用いて、本装置の不透明試料に適用可能であるという特長を生かし、金表面上に調製したポリエチレングリコール(PEG)ブラシ層間の表面力測定を行った。

金表面上に種々の分子量 (750, 5000, 10000, 20000) のチオールPEG鎖のブラシ層を調製し、純水中のPEGブラシ層間の表面力測定を行い、また、QCM-DによるPEGブラシ層の吸着量の測定と膜厚の見積を行い、表面力測定の結果と合わせて比較検討を行った。

PEGブラシ層間にはブラシ層の立体構造による斥力(立体力)が観測され、分子量の増大に伴い、斥力の距離範囲、強度の増大が観測された (図1)。立体力の距離範囲の1/2よりPEG鎖の実際の広がりを求め、分子量から計算した伸びきり鎖長を比較すると、低分子量では両者がほぼ一致し、PEG鎖は伸張した状態であることが分かった。一方、高分子量では、PEG鎖の広がり、伸びきり鎖長より短くなったことから、分子が折りたたまれた構造となることが分かった (図7)。

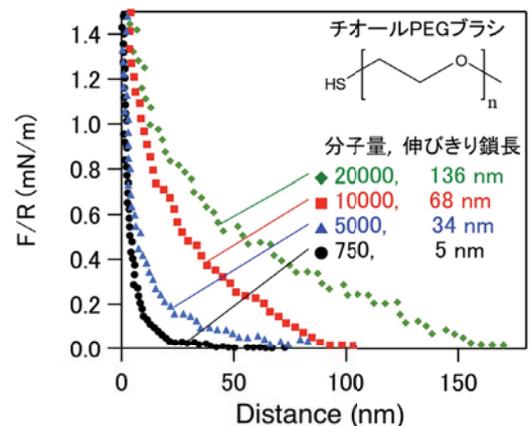


図 6 純水中の PEG ブラシ層間の表面力曲線。

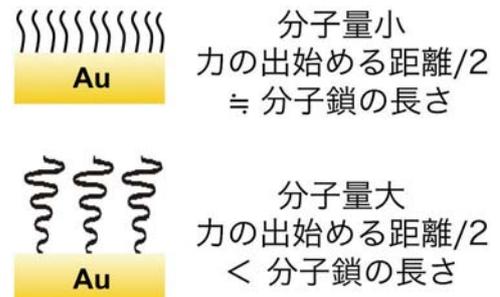


図 7 PEG ブラシ層の広がり の 模式図。

## 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 frame 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 to investigate the interaction between biofunctional molecules. We studied the properties of thiol-terminated poly (ethylene glycol) polymers (PEG) on a gold surface using twin-path surface forces apparatus.

(1) Direct interaction forces measurement on the biofunctional molecules oriented immobilized on surfaces.

(a) Phosphorelay protein interactions studied 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 of KinA is then transferred to a single-domain response regulator Spo0F. We investigated the interactions between KinA and Spo0F using a colloidal probe AFM. The adhesion force between KinA-Spo0F increased by the addition of ATP, while no increase was observed for surfaces between KinA-KinA as well as Spo0F-Spo0F, indicating the interaction between phosphorylated KinA (KinA-P) and Spo0F.

(b) Direct evaluation of the specific interaction between antigen and antibody

Elucidation of interaction between biomolecules is a quite important issue for the understanding of vital phenomena. If the interaction can be elucidated based on the difference in one amino acid level, it should give useful knowledge for the proteome research. This year we started to investigate the changes in the interactions between antigen and antibody upon single amino acid mutation using a colloidal probe atomic force microscopy (AFM). Studied interactions were those between hen egg-white Lysozyme (wild type) and HyHEL 10 scFv that is an antibody of wild type Lysozyme, and those between mutants of the Lysozyme and HyHEL10scFv.

(2) Characterization of thiol-terminated poly(ethylene glycol) (PEG) adsorbed on gold surfaces

We characterized the adsorption layer of thiol-terminated PEG of different molecular weights on a gold surface in pure water using twin-path surface force apparatus, quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D), and surface plasmon resonance. It was revealed that the shorter PEG polymers adsorbed as stretched polymer brushes whereas longer polymers adsorbed in a less stretched structure increasing the polymer surface area. Besides, interestingly, it was found that the PEG brush layer thickness obtained from QCM-D was much smaller than those estimated from surface forces measurement. This should be related to the properties of PEG layers and under further investigation.

## 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) 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).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) D. Fukushi, M. Kasuya, H. Sakuma, K. Kurihara, Fluorescent Dye Probe for Monitoring Local Viscosity of Confined Liquids, *Chem. Lett.* **40**, 776-778 (2011).
- 5) K. Yamamoto, H. Sugihara, R. Amemiya, H. Aikawa, Z. An, M. Yamaguchi, M. Mizukami, K. Kurihara, “Formation of double helix self-assembled monolayers of ethynylhelicene oligomer disulfides on gold surfaces”, *Tetrahedron* **67**, 5972-5978 (2011).

### 2. 著書・総説

- 1) 水上雅史, 栗原和枝, “ナノオロジー・ナノライポロジー”, *CSJ カレントレビュー04 界面の分子科学*, 13章, 化学同人, pp144-150 (2011).
- 2) 栗原和枝, “ツインパス型表面力装置”, *CSJ カレントレビュー04 界面の分子科学*, 6章, 化学同人, pp55-56 (2011).
- 3) 水上雅史, “原子間力顕微鏡(AFM)により相互作用力を測定する”, *化学と工業*, 64巻, 6号, pp464-465 (2011).

### 3. 会議発表

- 1) 栗原和枝, “化学分野から見たマイクロナノエンジニアリングの課題”, 日本学術会議マイクロ・ナノエンジニアリングシンポジウム, 東京 (2011.8.18).
- 3) 栗原和枝, “表面力測定による材料の固液界面評価”, 錯体学会・界面科学シンポジウム, 東京 (2011.11.18).
- 4) 栗原和枝, “固-液界面の液体の自己組織化”, グローバルCOE自己組織化シンポジウム2011, 福岡 (2011.12.10).
- 6) 栗原和枝, “固-液界面の液体の自己組織化”, 分子高次系機能解明のための分子科学-先端計測法の開拓による素過程的理解 第16回シンポジウム, 仙台 (2012.3.10).
- 7) K. Kurihara, “Surface Forces Measurement for Nano-Materials Science”, Seminar in Laboratory of Physical Chemistry and Colloid Science, Wageningen University, Wageningen, Netherland, (2011.5.2).
- 8) K. Kurihara, “Surface Forces Measurement for Nano-Materials Science”, Seminar in Van't Hoff Laboratory, Utrecht University, Utrecht, Netherland (2011.5.4).
- 9) K. Kurihara, “Fluorescence Spectroscopy Based on Twin-Path Surface Force Apparatus”, The 12th Australia-Japan Colloid & Interface Science Symposium, Cairns, Australia (2011.11.21).
- 10) M. Mizukami, “Organization of Liquids Adsorbed at Solid-Liquid Interfaces in Binary Liquid Mixtures”, 4<sup>th</sup> French Research Organizations – Tohoku University Joint Workshop on Frontier Materials (Frontier2011), Sendai, Japan (2011.12.5).
- 11) K. Kurihara, “Surface Forces Measurement for Nano-materials Science”, The 4th Series of WPI Joint Seminar; The 8th Seminar, Sendai, Japan (2011.12.9).
- 12) K. Kurihara, “Surface Forces Measurement for Materials Nano-technology”, International Symposium on Surface Science (ISSS-6), Tokyo, Japan (2011.12.12).
- 13) K. Kurihara, “Surface Forces Measurement for Characterizing Confined Liquids”, UniSA-Univ. Tokyo Work shop, Tokyo, Japan (2011.12.15).

### 4. その他 (例えば特許など)

### 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

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・田中睦生

#### 1. 緒言

電極基板や固体基板表面を機能性有機分子薄膜で修飾し、基板と修飾層を分子認識の場として機能させる人工修飾薄膜に関する研究が活発に行われている。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、1) 認識部位（膜側）- 生体分子（検出側）間の相互作用を強める工夫をする、2) 夾雑物質による非特異的な吸着の排除を試みる、3) 認識基板の構造と材質を検討する、などを詳細に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確認してきた。

昨年度まで、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非常に有効であることを実証し、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・高選択的な検出についても行った。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、実験を進めてきた。

今年度は、再度、認識分子と非特異吸着抑制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、認識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・配置させた時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。具体的には、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(CH)<sub>2</sub>で6程度以上の差を有するときに良い結果が得られることを確認し、また、分子膜横方向に関しては、認識部位である糖鎖が10%程度以下の時に、糖とレクチンの相互作用が強まり、認識反応効率も上がり、結果的に高感度認識につながる事が確認できた。

さらに、非特異吸着抑制分子として機能を有する、短鎖のトリエチレングリコール-アルカンチオール類による単分子膜が、大きな分子の吸着は抑制するが、非常に小さい分子（分子量100以下程度）は膜内を自由に透過できることを確認し、この機能を分子ふるい機能として用い、電気化学免疫測定に応用できた結果も報告する。

#### 2. 研究経過

糖-レクチン（タンパク質）の相互作用は、抗原-抗体の相互作用などと比較すると大変弱い（解離定数KD：糖-レクチン（ $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$ 程度）、抗原-抗体（ $10^{-9}$ 程度））、基板上での検出は難しい場合が多かった。このような弱い相互作用の系でも、基板上で安定に感度よく検出できる系を構築するため、分子認識部位の膜内での効率的な配置に関して詳細な検討を行った。

まず、分子認識部位の基板上での効率的な配置について検討を行った。弱い相互作用である糖-レクチンの高効率な認識系を作製することを念頭におき、認識分子としてマルトシド-デカンチオール分子（Ma1C12SH）、基板へのタンパク質の非特異的な吸着を抑制する分子として、水酸基末端チオールを採用した。金基板上にマルトシド-デカンチオール分子 100%で構築した単分子膜と比較して、水酸基末端チオールを混合し、ハイブリッド膜とした場合、水酸基末端チオール分子の割合が増加するにつれてレクチン（コンカナバリンA；Con A）の認識量（吸着量）が増加していることが確認できた。仕込み比において10%、実測比では29%のマルトシド分子（水酸基末端分子が71%）のとき、Con A分子の吸着量は最高値（約  $1.8 \times 10^8$  分子/cm<sup>2</sup>）を示した。

マルトシドの割合を約10%（仕込み比）で固定し、水酸基末端チオール分子（スペーサー分子）の高さ

を変えた実験を合わせて行ったところ、認識部位（糖鎖）の部分とスペーサ末端（水酸基）部分の差がある程度大きい方がタンパク質（レクチン）の認識に適していることを確認した。結果として(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>が6以上の差になるときに一番効率のよい検出ができる表面が形成されていることがわかった。



図1. 水酸基末端チオール（スペーサー分子）とレクチン認識分子（糖鎖）との混合膜上でのレクチン（Con A）認識のモデル図。

非特異吸着抑制能を有する、トリエチレングリコール(TEG)-アルカンチオール分子膜は、高分子PEG類（分子量、1000～数万等）では抑えきれなかったペプチド等の小さい分子も効率よく抑制できることを既に確認してきたが、我々は、この分子膜が持つ分子ふるい的な特性に注目し、電気化学的手法と組み合わせてレプチンの検出を行った。

TEG-アルカンチオール類（TEGCnSH, Cn=(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>; n=2, 4, 6, 8, 11）は、リジッドな膜を構成するための直鎖アルカンチオール部分と、タンパク質などの分子が基板に吸着するのを防ぐ、柔軟性が高く親水性の高い部分（トリエチレングリコール基）の、相反する性質を併せ持つ分子である。TEGCnSH分子膜は分子量 400 前後の小さいペプチドから十数万のタンパク質まで抑えることができ、一方、分子量 100 程度以下の化合物は透過できる。金基板表面に、レプチン（分子量 16000）を検出するための抗体を固定するためのカルボキシル基末端アルカンチオールと TEGCnSH 類とでナノ構造薄膜を構築した。次いでカルボキシル基部分に抗レプチン抗体を固定しレプチン認識表面を構築した。レプチンの認識は電気化学的に検出した。

レプチンを抗体固定基板表面で認識した後、酵素（アルカリフォスファターゼ）で標識した二次抗体を反応させた。基質 PAPP（p-アミノフェニルリン酸）を加え、酵素反応により PAP（p-アミノフェノール）が生じる。生成物は TEGCnSH 分子膜を透過し、酸化反応を受けることができるので、レプチンの量を電気化学的に追跡可能となる。本手法により、レプチンを pg/ml レベルで検出することに成功した。

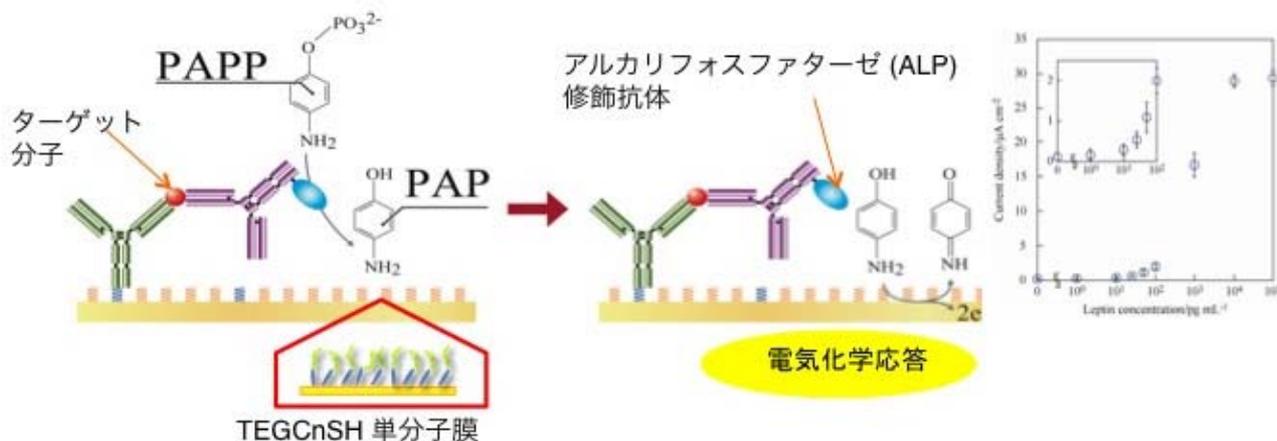


図2. TEGCnSH を用いた電気化学免疫測定チップ表面のモデル構造（左～中央）とレプチンの検出（右）。

## Design of Biomolecular Interface for Detecting Carbohydrate and Lectin Weak Interactions

Yukari Sato, Kyoko Yoshioka, and Mutsuo Tanaka

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

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

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

Carbohydrate-protein interactions are not strong but they are very important in terms of specific recognition in vital functions. When we attempt to employ these specific interactions for constructing an artificial recognition interface to allow us to understand biological events, we encounter certain serious problems. Many naturally occurring carbohydrates and glycoconjugates are multivalent, which results in their greatly increased affinity for lectins. Multivalent effects should be adopted if we are to detect and utilize species with lower affinities. They showed a significant enhancement in binding affinity of  $\sim 10^3$  compared with the corresponding monovalent ligand. Although it is very easy for thick polyvalent layers to interact with target molecules, the thickness, bulkiness, and heterogeneity of the reaction layers pose serious problems in terms of quantitative analysis and realizing rapid reactions. It will be a challenge to form a thin layer with a polyvalent recognition ability.

We investigated the processing of a nanostructured recognition site for sensing lectin, Concanavalin A (Con A), by using self-assembled monolayers (SAMs) consisting of 12-mercaptododecyl  $\beta$ -maltoside ( $\text{MalC}_{12}\text{SH}$ ) and OH terminated filling molecules ( $\text{HOC}_n\text{SH}$ ) formed on a gold substrate. When the height difference between the carbohydrate group and OH terminated filling molecules was increased ( $> (\text{CH}_2)_6$ ), significant Con A adsorption was achieved because appropriate recognition occurred, in which the association rate constant ( $k_a$ ) became larger and the dissociation constant ( $K_D$ ) became much smaller than that when there was a small height difference. We revealed that a multivalent effect could be achieved even in a monomolecular layer by maintaining a significant height difference and dispersing the recognition sites in the recognition monolayer.

The maltoside functionalized mixed SAMs were formed by applying a mixed solution of 12-mercaptododecyl  $\beta$ -D-maltoside ( $\text{MalC}_{12}\text{SH}$ ) and  $\text{HOC}_n\text{SH}$  in 20%(v/v) ethanol/water to the bare gold surface of the sensor chip. A series of Con A concentrations of 0.1, 0.5, 1, 5 and 10  $\mu\text{M}$  (and 20  $\mu\text{M}$ ) were used for the adsorption assay of a mixed SAM consisting of  $\text{MalC}_{12}\text{SH}$  and  $\text{HOC}_n\text{SH}$  ( $n=2, 4, 6, 8, 11$ ). The kinetics parameters [association rate constant ( $k_a$ ) (1/Ms), dissociation rate constant ( $k_d$ ) (1/s) and dissociation constant ( $KD$ ) (M)] were determined by curve fitting an appropriate model to the obtained response data using evaluation software.

The enhancement of the valency at the Con A and recognition interface can be controlled by maintaining a significant height difference ( $> (\text{CH}_2)_6$ ) between the maltoside and the terminal of the filling molecules in the vertical interface direction. For the lateral direction in the monolayer, we observed a clearly distinguished recognition point at a 10%  $\text{MalC}_{12}\text{SH}$  mixed monolayer. Our mixed SAM terminated with maltoside and OH groups represented multivalent binding for Con A when the maltoside terminated molecules were significantly diluted ( $\sim 10\%$ ). From the electrochemical measurement, only one reductive peak was observed even though only 5-10% of maltoside terminated molecules existed in the mixed layer. We can conclude that positioning carbohydrate sparsely in the Con A recognition interface is the best strategy for overcoming the problem of weak binding detection.

## 業績リスト

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

- 1) T. Nishimura, Y. Sato,\* M. Tanaka, R. Kurita, K. Nakamoto and O. Niwa, “Bifunctional tri(ethylene glycol) alkanethiol monolayer modified gold electrode for on chip electrochemical immunoassay of pg level leptin”, *Anal. Sci.*, **27**, 465-469 (**Cover & Hot article**) (2011).
- 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) Y. Sato\*, K. Yoshioka, T. Murakami, S. Yoshimoto, and O. Niwa, “Design of Biomolecular Interface for Detecting Carbohydrate and Lectin Weak Interactions”, *Langmuir*, **28**, 1846-1851 (2012).

### 2. 著書・総説

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

#### [招待講演]

Yukari Sato, “Enhanced Recognition of Proteins and Peptides Based on Densified Hybrid Monolayers”, the 62<sup>nd</sup> Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Niigata, September, 13, 2011.

佐藤 縁、「分子認識ソフト界面の構築と膜構造および機能評価に関する研究 (受賞招待講演)」、電気化学会第 79 会大会、浜松、2012 年 3 月 30 日。

#### [依頼講演]

Yukari Sato, “Effective lectin and galectin recognition on the carbohydrate and short ethylene glycol terminated alkanethiol densified hybrid monolayer”, Singapore-Japan “bioelectronics” workshop, Nara, August, 11<sup>th</sup>, 2011.

#### [一般講演]

佐藤 縁、西村哲矢、栗田僚二、中元浩平、田中睦生、吉岡恭子、丹羽修、「自己組織化単分子膜を利用した生活習慣病マーカー レプチンの電気化学的免疫測定」、日本分析化学会第 60 年会、名古屋、2011 年 9 月 16 日。

その他 7 件

### 4. その他

#### [新聞発表]

佐藤 縁、日刊工業新聞「分子認識に優れたソフト界面」2011 年 9 月 1 日。

#### [受賞]

2012 年 電気化学会 第一回女性躍進賞 受賞

「分子認識ソフト界面の構築と膜構造および機能評価に関する研究」

以上

## 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 ( $\pi$ -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

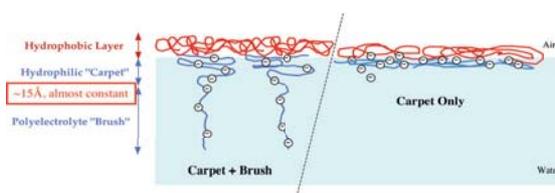


Fig.1 水面高分子電解質ブラシの絨毯層 + ブラシ層構造 (左) と絨毯層 only 構造

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、0.12 chains/nm<sup>2</sup>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、0.3-0.5 chains/nm<sup>2</sup>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、それを越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。

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<sup>+</sup><Na<sup>+</sup><K<sup>+</sup>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。さらには、カチオン性ブラシについても、絨毯層/ブラシ層の2層構造形成を確認し、この構造がイオン性単分子膜内の高分子電解質ブラシに対して普遍的であることを確認した。本研究では、カチオンとアニオンを同一分子内に有する両イオン性のベタインブラシについて、そのナノ構造と転移を表面圧-面積( $\pi$ -A)曲線およびX線反射率(X-ray Reflectivity, XR)により精査した。ベタインブラシは、その生体適合性の高さから、領域内で多くの応用研究が行われている。

## 2. 研究経過

図2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。既報の通り、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。

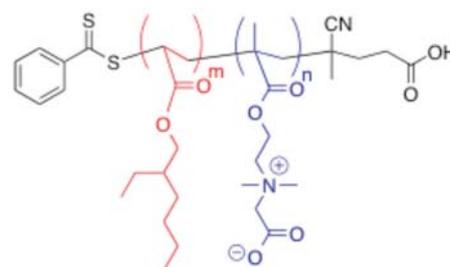


Fig.2 ベタイン含有両性両親媒性ジブロックコポリマー poly(EHA-*b*-GLBT)

昨年度の研究により、このポリマーの単分子膜の $\pi$ -A 曲線が、NaCl の添加により、広面積側へ移動することが見いだされている。これは、アニオン性やカチオン性のブラシとは、全く逆の傾向である。イオン性のブラシでは、ブラシ間の静電斥力が塩イオンにより遮蔽されることで説明でき、両イオン性の本ポリマーの挙動は、逆に塩の添加により、実質的に中性として振る舞っていた GLBT ブラシが塩添加によりイオン性ブラシの挙動を示すことを示唆している。図 3 は、NaCl 添加時の XR 曲線と、そのモデルフィッティングで得られた、水面に垂直方向の電子密度プロファイルである。NaCl 濃度の増加に伴い、ブラシが伸張していることが分かる。これは静電反発で伸張していると考えられ、ベタインブラシが「イオン鎖」として振る舞っていることの直接情報である。

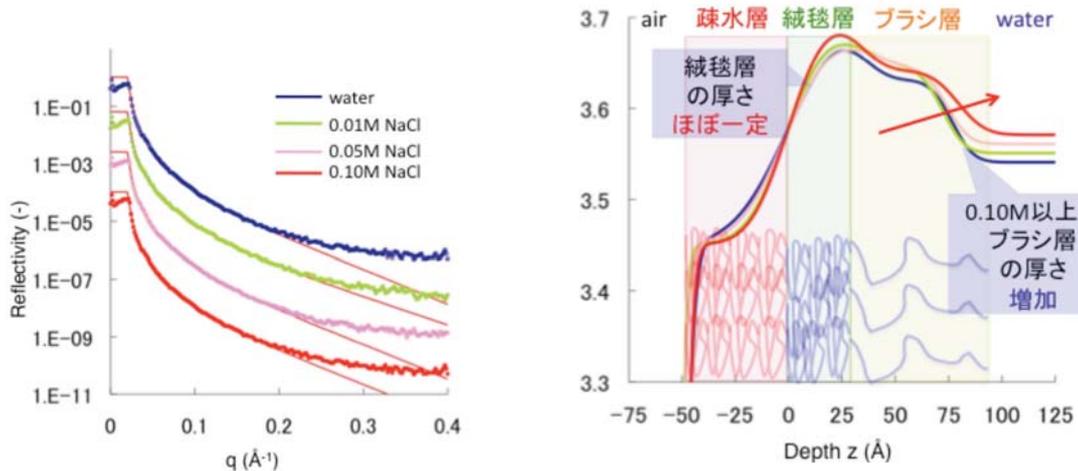


Fig.3 カルボキシベタイン水面単分子膜ブラシからの XR プロファイル (右) とそれより得られた水面に垂直方向の電子密度プロファイル

このメカニズム解明の為、様々な塩を用いて、添加塩のイオン種依存性の調査を行った。図 4 は、塩アニオンを Cl とし、カチオンを、Li, Na, K と変えた場合の $\pi$ -A 等温線の変化である。明らかにカチオンの種類により、影響がことなることがわかり、Li イオンが曲線を広面積側に大きく移動させるのに対し、Na はその効果はやや少なく、K イオンでは、ほとんど移動していないことが分かる。これはそれぞれの塩カチオンが GLBT のカルボキシルイオンと相互作用する度合いが異なることを示唆している。ホフマイスター順列によると、Li イオンは強い構造形成イオン、Na イオンは構造形成イオン、K イオンは、構造破壊イオンとされている。同種イオンは相互作用しやすいとされており、構造形成イオンであるカルボキシルイオンと Li イオンが最も強い相互作用を示すことは、この順列の概念と一致する。一方、カチオンを共通化し、アニオン種を変えたところ、イオン種による依存性は観察されなかった。これは、GLBT の四級化アンモニウムカチオンと塩アニオンの相互作用が、イオン種で余り異なること、おそらくは、カチオンがバルキーなため、強い結合をつくっていないことを意味すると考えられる。以上より、塩カチオンはカルボキシアニオンと強く相互作用し、実質電荷を打ち消し合うのに対し、塩アニオンは四級化カチオンと弱い相互作用しかしておらず、カチオン性が残っている、すなわち GLBT 全体としては、カチオン性として振る舞っているものと考えられる。これが、塩添加により、GLBT ブラシが、中性ブラシからイオン性ブラシへと転移する主因と考えられる。

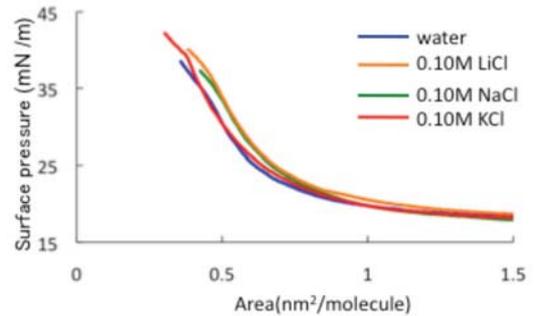


Fig.4 EHA<sub>45</sub>-b-GLBT<sub>60</sub> 水面単分子膜の表面圧-面積曲線 ( $\pi$ -A 曲線) の添加塩種依存性

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<sup>2</sup>, but for PAA brush, the brush thickness increased by salt addition and then decreased. From these observations, the brush formation mechanism has been thought to be different, at least for weakly and strongly anionic polymer brushes. Also, it was found that csc for PSS brush depends on the species of added ions; the order was Li<sup>+</sup><Na<sup>+</sup><K<sup>+</sup>, which is the same as well-known Hoffmeister series. In addition, similar behavior was observed also for cationic brush. In this study, we have performed a systematical investigation on “zwitter ionic” polyelectrolyte brush using amphiphilic diblock copolymer having caryoxybetaine (Fig.2) and  $\pi$ -A and X-ray reflectivity(XR) techniques.

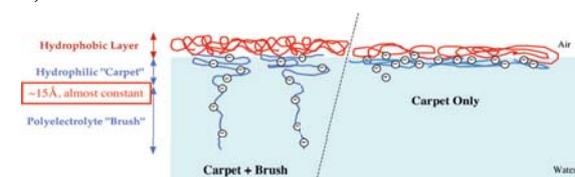


Fig.1 “Carpet+Brush” and “Carpet-Only” structure of polyelectrolyte brush at the air/water interface.

By XR measurements, the transition from carpet-only structure to carpet+ brush transition was also confirmed for this zwitterionic brush. However, quite different behavior was observed for salt concentration dependence; by XR analysis shown in Fig.3, betaine brush was extended with increasing added salt concentration in water subphase. This is quite opposite behavior to anionic and cationic brushes, which were shrunk by salt addition. This observation means that betaine brush is totally neutral in pure water system, but it becomes ionic, probably totally cationic, in salt systems. To confirm this explanation, ion species dependence of added salt was examined by using NaCl, KCl, LiCl, NaBr, NaF etc as an added salt. Anion species of salt was insensitive to  $\pi$ -A isotherm and XR profiles. However, cation species of added salt had large effect on betaine brush nanostructure. Csc was found in the order of Li<sup>+</sup><Na<sup>+</sup><K<sup>+</sup>. In other words, stronger structure maker ion has stronger effect to change the nanostructure of betaine brush. Probably, the correlation between COO<sup>-</sup> in betaine and salt cation is stronger than that between N<sup>+</sup> in betaine and salt anion. This might be the origin that betaine brush behave as nonionic brush in pure water while as cation brush in salt subphase.

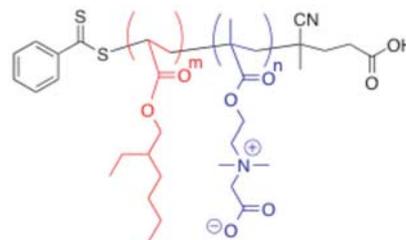


Fig.2 Zwitterionic amphiphilic diblock copolymer, poly(EHA-*b*-GLBT)

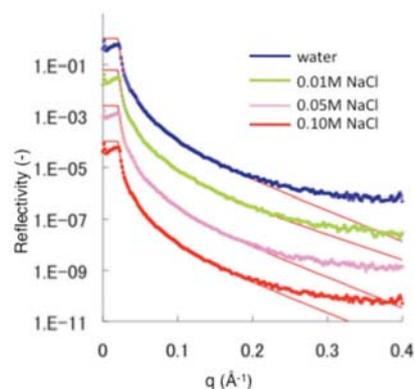


Fig.3 XR profiles for poly(EHA-*b*-GLBT) monolayer on water surface at different salt concentrations.

## 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*, 27, 9237-9244, 2011
- 2) Rati Ranjan Nayak, Tasuku Yamada, Hideki Matsuoka “Non-Surface Activity of Cationic Amphiphilic Diblock Copolymers” *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 24, 012024, 2011

### 2. 著書・総説

- 1) 松岡秀樹 (共同編集・分担執筆) 「新しい局面を迎えた界面分子科学 --- 機能デザインと計測技術の展開」Part2, 2章、化学同人出版、2011年3月発行
- 2) 松岡秀樹 “ソフト界面の分子膜の精密構造解析II X線反射率法 特集「放射光・X線を用いたソフト界面分子膜の構造解析」”, *オレオサイエンス*, 2012年1月号, 17 - 23.

### 3. 会議発表

#### (1) 第60回高分子学会年次大会、2011年5月25日～27日、大阪国際会議場

- 1) 「ベタイン系両親媒性ジブロックコポリマーの水面単分子膜における高分子ブラシ形成挙動およびナノ構造の調査」

○山川雄大、ゴーシュ・アルジュン、遊佐真一 (兵庫県大院工)、猿渡欣幸 (大阪有機化学)、松岡秀樹

#### 2) 「新規カチオン性両親媒性ジブロックコポリマー水面単分子膜の形成挙動及びナノ構造解析」

富士田真市、ゴーシュ・アルジュン、遊佐真一 (兵庫県大院工)、猿渡欣幸 (大阪有機化学)、○松岡秀樹

#### (2) 第57回高分子研究発表会、2011年7月15日、兵庫県民会館

- 1) 「温度応答鎖を有する両親媒性高分子の合成とその単分子膜形成挙動」

○宇田京平、富士田真市、山川雄大、Arjun Ghosh、遊佐真一 (兵庫県大院工)、猿渡欣幸 (大阪有機化学)、松岡秀樹

(3) 新学術領域研究「ソフトインターフェースの分子科学」第6回公開シンポジウム、2011年7月28日、九州大学、「カチオン性およびベタイン系水面高分子ブラシのナノ構造と応答性」○松岡秀樹

#### (4) 新学術領域研究「ソフトインターフェースの分子科学」第6回領域会議、2011年7月29日、九州大学

- 1) 「両イオン性両親媒性ジブロックコポリマー単分子膜の形成挙動およびナノ構造調査」

○山川 雄大、GHOSH Arjun、遊佐 真一(兵庫県大院工)、猿渡 欣幸(大阪有機化学工業)、松岡 秀樹

- 2) 「気水界面における温度応答鎖を含む両親媒性高分子の単分子膜形成挙動とナノ構造解析」

○宇田京平、山川雄大、Arjun Ghosh、遊佐真一 (兵庫県大院工)、猿渡欣幸 (大阪有機化学)、松岡秀樹

#### (5) 第63回コロイドおよび界面化学討論会 2011年9月7日～9日、京都大学吉田キャンパス

- 1) 「両イオン性両親媒性ジブロックコポリマー水面単分子膜のナノ構造と環境応答」

○山川 雄大、GHOSH Arjun、遊佐 真一(兵庫県大院工)、猿渡 欣幸(大阪有機化学工業)、松岡 秀樹

- 2) 「温度応答鎖を有する両親媒性高分子の合成とその水面単分子膜形成挙動」

○宇田 京平、山川 雄大、GHOSH Arjun、遊佐 真一(兵庫県大院工)、猿渡 欣幸(大阪有機化学工業)、松岡 秀樹

#### (6) 第60回高分子討論会、2011年9月28日～30日、岡山大学

- 1) 「ベタイン系両親媒性ジブロックコポリマー水面単分子膜のナノ構造と環境応答」

○山川 雄大、GHOSH Arjun、遊佐 真一(兵庫県大院工)、猿渡 欣幸(大阪有機化学工業)、松岡 秀樹

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”」



## 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、異なるマイクロサイズの細胞接着領域を持つマイクロパターンを用いて、細胞間、細胞-材料間接着の相互作用解析を行うことを目的とした。

## 2. 研究経過

### 2.1 PMPC/Au マイクロパターンの作製による細胞パターン化

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。

そこで、今年度は細胞の全く接着しないPMPCブラシを選択し、QCM-D基板上に細胞接着部位と、細胞非接着部位を作り分けることを第一の目的とした。

パターン化基板の作製においては、開始剤固定化金基板からpoly(MPC)(PMPC)ブラシを表面開始原子移動ラジカル重合(SI-ATRP)法によって重合した。PMPCポリマーブラシ表面を静的接触角(SCA)、高感度反射赤外分光(SI-ATRP)法、分光エリプソメトリーにより解析した。

Figure 1に示す細胞接着部位のサイズは $50\mu\text{m}$ と同じであり、細胞-細胞間距離が、 $50\mu\text{m}$ 、 $100\mu\text{m}$

と異なる2種類のフォトマスクを用いてPMPCブラシが形成された基板に真空紫外線(VUV)を照射しポリマーブラシをエッチングし、細胞接着部位を作製した。その後、 $2.0 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ の密度で細胞を播種し一晩DMEM10%FBS、1%pc/sm中、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ で培養し、リンス後、位相差顕微鏡で様子を観察した。

PMPCブラシの静的接触角の結果は $10^\circ$ 以下であり、親水性が高いことが示された。またFT-IR-RAS測定の結果よりMPC由来のピークが確認できた。これよりPMPCブラシが表面に重合できたことが確認された。また分光エリプソメトリー及び $^1\text{H-NMR}$ の結果よりブラシ密度は $0.27 \text{ chains/nm}^2$ であり、高密

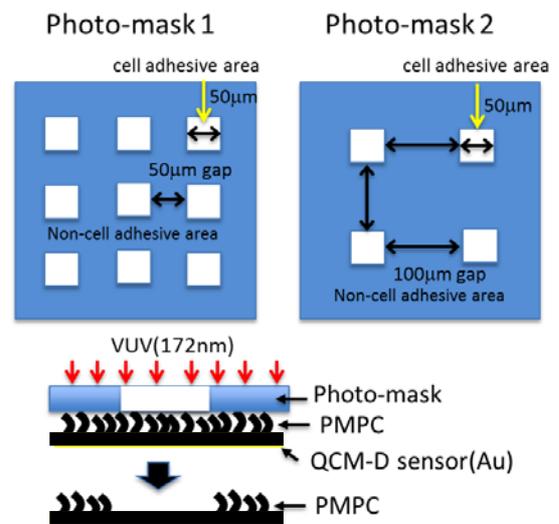


Figure 1. Schematic image of photo-mask for preparing the cell micro-patterning.

度ブラシの作製ができたことがわかった。PMPCブラシへのVUV照射時間ごとに膜厚を測定した結果より、3分間照射するとポリマーブラシは完全に除去されることがわかった。

Figure 2は、細胞接着後の細胞パターンの顕微鏡写真を示した。このように、細胞接着部位のサイズが同じであり、細胞接着数はほぼ同程度の4~5個であることを観察像から確認した。

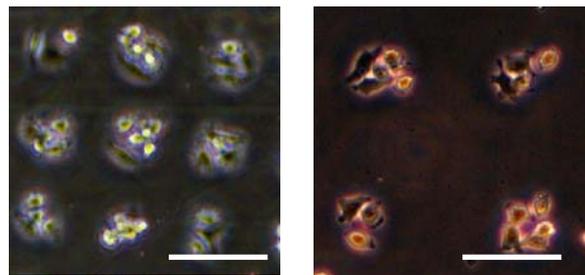


Figure 2 Photographs of mouse fibroblast cell (L929) adhesive micro-pattern after 24 hours cell culturing, seeding density is  $2.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. Scale of white bar is 100  $\mu$ m.

## 2.2 QCM-Dによるパターン化基板上的細胞接着挙動解析

このような細胞接着挙動の解析をQCM-DのD-fプロット、さらに細胞接着挙動の動的同時解析を行った。用いた装置の概略図をFigure 3に示した。このシステムでは、QCM-D装置で、センサー上部がガラス窓で覆われていることから、質量数変化 ( $\Delta F$ ) と、粘弾性変化 ( $\Delta D$ ) をモニターすると同時に、顕微鏡によりその細胞の形態を観察することができる。Figure 1に示した2種類のフォトマスクを使いQCM-Dセンサー上にPMPCブラシ/Auのマイクロパターンを作製した後、たんぱく質を吸着、その後リンスをして余剰のたんぱく質を除去し、無血清培地を用いた細胞接着を行った。それぞれのD-FプロットをFigure 4に示しているが、パターンの異なる挙動が観察された。詳細に観察すると、たんぱく質の吸着挙動はほぼ同じプロットとなっているが、その後の細胞接着挙動に大きな違いが認められる。顕微鏡により細胞形態は、Figure 2に示されるようにほぼ同じである。しかし、細胞がたんぱく質の吸着した材料表面への接着強度が異なることを示している。このように細胞-細胞間の相互作用が、細胞接着強度に影響を与えることを定量的に示すことが可能となった。

今後、様々なパターン化基板を作製し、また材料の種類を変化させて細胞-材料間相互作用を評価していく予定である。

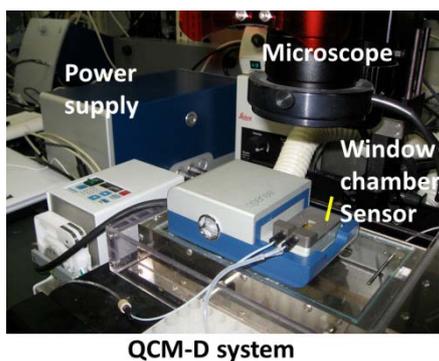


Figure 3. Photograph of QCM-D flow chamber system attached with real-time microscope observation.

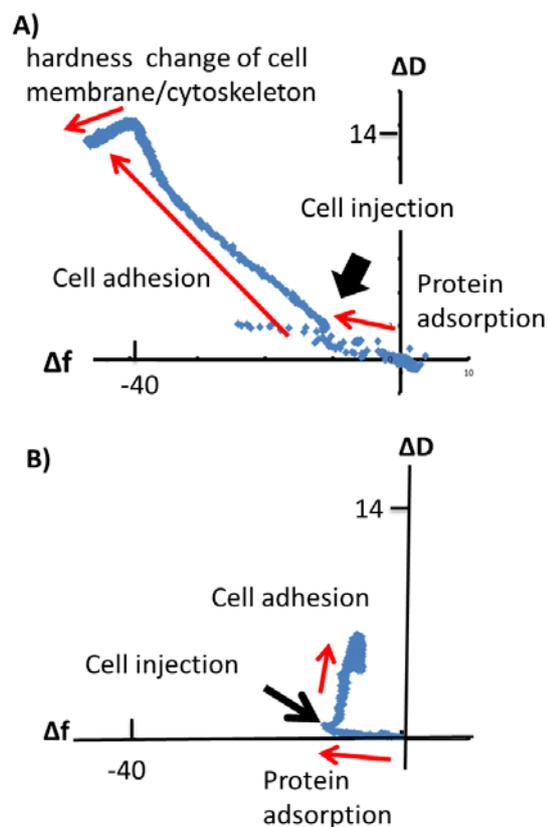


Figure 4. Df plots of protein adsorption (30min) and cell adhesion (3hours). A) Df plots of 50  $\mu$ m narrow gap, B) Df plots of 100  $\mu$ m wide-gap.

# Nano-fabrication 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). QCM-D is one of the analytical tools for evaluating the adhesive strength, which is an index of the interaction between cell and materials and is characterized by real time monitoring .

The purpose of this study is analyzing adhesive strength of cells on the micro-patterned surfaces *via* the QCM-D, the cell-material interaction, measured as adhesive strength, can be analyzed for different conditions where the cell-cell distance is controlled. 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.

Firstly, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer brush (PMPC), which is suppressed protein/cell adhesion [2] is prepared on Au substrate of QCM-D sensor. Then a vacuum ultraviolet ray (VUV) irradiates the PMPC to prepare cell-adhesive micro-patterned area. We design the 2 types of photo-mask. Photo-mask 1 has non-cell adhesive gap of 50 $\mu\text{m}$ , and photo-mask 2 has non-cell adhesive gap of 100 $\mu\text{m}$ . The cell adhesive area of two photo-masks has the same of 50 $\mu\text{m}$ . The cell micro-patterning preparing from the photo-mask 1 denotes as 50  $\mu\text{m}$  narrow-gap, and it preparing from the photo-mask 2 denotes as 100  $\mu\text{m}$  wide-gap, respectively. Finally, the cell-to-material interaction is evaluated by looking at the Df plots (plots of the frequency difference ( $\delta f$ ) vs. dissipation difference ( $\delta D$ )) of QCM-D. The real time monitoring QCM-D system with microscope was developed by our group and the dynamic observation of cell adhesion behavior on the micro-patterned area can be evaluated by use of this system. The Df plots of 50  $\mu\text{m}$  narrow-gap has three different slopes, first slope is protein adsorption, and second slope represents cell adhesion on the Au surface, and negative slope of the third slope supposes the cytoskeletal alteration or hardness change of cell membrane. The  $\delta D$  indicates a material viscoelasticity change on the sensor, so negative slope represents that the cell membrane/cytoskeleton becomes hard. The Df plots of 100  $\mu\text{m}$  wide-gap was completely different to that of 50  $\mu\text{m}$  wide-gap even though the cell adhesion density and morphology are quite similar. It means that the cells are softly adhered on the protein adsorption layer in case where the distance of cell-to-cell is wide.

In conclusion, the cell-material interaction as indicating the cell adhesion strength is strongly affects on the cell-cell distance. In future study, we will evaluate the cell function on different micro-patterning precisely considering the signal transport in gap spacing.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

1. Continuous preparation of a spherical phospholipid polymer hydrogel for cell encapsulation using a flow-focusing microfluidic channel device, Tatsuo Aikawa, Tomohiro Konno, Madoka Takai, Kazuhiko Ishihara, *Langmuir*, 28(4), 2145-2150(2012).
2. Regulation of cell proliferation by multilayered phospholipid polymer hydrogel through controlled release of bioactive agent, Jiyeon Choi, Tomohiro Konno, Madoka Takai and Kazuhiko Ishihara, *Biomaterials*, 33(3), 954-961 (2012).
3. Surface Functionarization of Polydimethylsiloxane by Photo-Induced Polymerization of 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine for Biodevices, Madoka Takai, Takanori Shirai, Kazuhiko Ishihara, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, 24(5), 597-602 (2011)
4. Quick and simple modification of a poly(dimethylsiloxane) surface by optimized molecular design of the anti-biofouling phospholipid copolymer, Ji-Hun Seo, Takashi Shibayama, Madoka Takai and Kazuhiko Ishihara, *Soft Matter*, 7, 2968-2976(2011).
5. Electrical Transport Ability of Nanostructured Potassium-Doped Titanium Oxide Film, So-Yoon Lee, Ryosuke Matsuno, Kazuhiko Ishihara, and Madoka Takai, *Applied Physics Express*, 4, 025803 1-3(2011).

### 2. 著書・総説 等

1. リン脂質ポリマーのナノ構造制御によるバイオデバイス界面の機能化、高井まどか、PHARMTECH JAPAN、27(13)、171-176(2011).
2. タンパク質吸着/非吸着をナノレベルで制御したバイオインターフェースへの細胞接着挙動、高井まどか、柴山崇、徐知勲、石原一彦、高分子、60巻10月号、736-738(2011).
3. 高感度血液分析チップのためのバイオ界面創製、高井まどか、表面科学、32(9)、575-580 (2011).
4. A Bioconjugated Phospholipid Polymer Biointerface with Nanometer-Scaled Structure for Highly Sensitive Immunoassays, K. Nishizawa, M. Takai, K. Ishihara, *Methods Mol Biol*, **751**, 491-502 (2011).

### 3. 代表的な国際会議等発表（招待講演含む）

1. Ultra-fast immunoassay with 3D structured microfiber devices, T. Fukushima, M. Takai, Micro-TAS 2011
2. Bioconjugated Phospholipid Polymer Biointerface with Nanometer-Scaled Structure for Highly Sensitive Immunoassay, M. Takai, 6th Biyani's International Conference-2011 (BICON-11) on Innovations in the Latest Healthcare Issues
3. Surface Functionarization of Polydimethylsiloxane by Photo-Induced Polymerization of 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine for Biodevices, M. Takai, T. Shirai, K. Ishihara, ICPST-28
4. Biocompatible phospholipid polymer interface for micro-bioanalytical systems, M. Takai, K. Ishihara, ICAS 2011
5. The Effect of Nanophase-separated Hydrophobic-Hydrophobic Copolymers to Cell Adhesion Behavior, M. Takai, T. Shibayama, J-H. Seo, K. Ishihara, BMMP-11, 2011.1.26

### 4. その他（学生受賞）

1. 若手研究者奨励賞(ICTF-15)、高須健司、ブロック型リン脂質ポリマーブラシに固定化したタンパク質の変性抑制 2011.11.11

# 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

研究代表者：筑波大学大学院数理物質系物性分子工学域・長崎幸夫

研究分担者：東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻・吉本敬太郎

研究分担者：筑波大学大学院数理物質系物性分子工学域・堀口諭吉

## 1. 緒言

現在のイムノアッセイにおいては、ラテックス粒子診断法、エライザ法（ELIZA法）、放射免疫測定などが多く用いられている。特にELIZA用の化学発光基質などを利用した化学発光法によるものが感度がよい。そのため、イムノアッセイ市場においても割合が高い。こうした手法は感度が良いものの、蛍光ラベル化やアッセイを行うための手順が多くなるなどの問題点があり、より簡便なアッセイ手法の確立が望まれる。ラベルフリーで抗原を認識する手法として、金薄膜の表面プラズモン共鳴（SPR）を利用したセンシングシステムや、水晶振動子（QCM）を利用した手法が研究されている。本研究では金薄膜上に発生させた表面弾性波（SAW）を利用したセンシングシステムを用いている。図1にSAWセンサーで用いるセンサーチップの模式図を示す。センサーチップに内蔵された楕円形の圧電体であるインターデジタル変換器（Interdigital transducer, IDT）に電圧をかける事により、圧電体自体を変形させる逆圧電効果が起こり、表面弾性波が発振される。発生した表面弾性波は金薄膜上を伝わり、検出側の圧電体で再び電気信号に置き換えられる。金薄膜上に物質が吸着する事で発生する波の位相変化やエネルギー損失は、吸着した際の粘度や重量変化と相関がある事が知られており、物質の吸着を確認する事ができる。特にSAWセンサーは粘度変化による位相変化が敏感であるため、位相変化をモニタリングする事で金薄膜上の表面状態をリアルタイムかつラベルフリーに分析することができる。本研究では、抗原を特異的に認識するオリゴ核酸であるアプタマーを用いてSAWセンサー上でのセンシングを検討した。アプタマーは抗体に比べ低分子で人工的に合成することが可能であり安価に作成することができる。さらに、化学修飾が容易であることから、ドラッグデリバリーシステムの分野においてナノ粒子に修飾することでターゲティング能を付与する事が可能である。また、抗体に比べて安定性が高く、長期間にわたって機能を保持したセンサー表面の構築が可能である<sup>1)</sup>。本研究では、血液凝固に関わるタンパク質、トロンビンを選択的に認識するアプタマー（TBA）を使用した。このアプタマーは四重鎖構造（G-カルテット構造）をとることが知られており、G-カルテット構造のアプタマーは、PEGと共存化においてその構造を安定に保ち、高い認識能を示すことが報告されている<sup>2)</sup>。

図1にSAWセンサーで用いるセンサーチップの模式図を示す。センサーチップに内蔵された楕円形の圧電体であるインターデジタル変換器（Interdigital transducer, IDT）に電圧をかける事により、圧電体自体を変形させる逆圧電効果が起こり、表面弾性波が発振される。発生した表面弾性波は金薄膜上を伝わり、検出側の圧電体で再び電気信号に置き換えられる。金薄膜上に物質が吸着する事で発生する波の位相変化やエネルギー損失は、吸着した際の粘度や重量変化と相関がある事が知られており、物質の吸着を確認する事ができる。特にSAWセンサーは粘度変化による位相変化が敏感であるため、位相変化をモニタリングする事で金薄膜上の表面状態をリアルタイムかつラベルフリーに分析することができる。本研究では、抗原を特異的に認識するオリゴ核酸であるアプタマーを用いてSAWセンサー上でのセンシングを検討した。アプタマーは抗体に比べ低分子で人工的に合成することが可能であり安価に作成することができる。さらに、化学修飾が容易であることから、ドラッグデリバリーシステムの分野においてナノ粒子に修飾することでターゲティング能を付与する事が可能である。また、抗体に比べて安定性が高く、長期間にわたって機能を保持したセンサー表面の構築が可能である<sup>1)</sup>。本研究では、血液凝固に関わるタンパク質、トロンビンを選択的に認識するアプタマー（TBA）を使用した。このアプタマーは四重鎖構造（G-カルテット構造）をとることが知られており、G-カルテット構造のアプタマーは、PEGと共存化においてその構造を安定に保ち、高い認識能を示すことが報告されている<sup>2)</sup>。

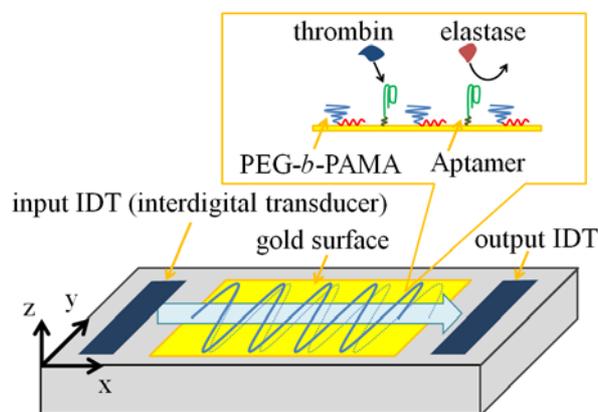


図1 SAWセンサーの模式図

ラベルフリーのセンシングシステムにおいてはセンシング部位への非特異的な吸着がノイズとし発生し、誤認識を引き起こす点が問題となっている。生体親和性の高いポリエチレングリコール（PEG）はこうした非特異吸着な吸着を抑制するブロッキング剤として働く事が知られており、SAWセンシングのシステムにも応用が可能であると考えられる。我々はすでに、PEG-ポリアミンブロック共重合体を金表面に固定することにより、オリゴ核酸の配向と認識能を向上させることを報告しており<sup>3)</sup>、これがアプタマー表面の構築にも適用できれば、高い効果が期待される。本研究では、PEG/ポリアミン共重合体とアプタマーを共固定させた金表面を構築し、高機能にセンシングが可能な表面の構築を目指す。

## 2. 研究経過

<実験>PEG-b-ポリ[メタクリル酸(2-ジメチルアミノエチル)](PEG-b-PAMA)をアニオン重合法にて合成した（PEG部位の分子量5,000、AMAユニット数33）。金センサーチップ上にPBSを30  $\mu$ L滴下後、溶液を表面が乾かない範囲で除去する。その後、PEG-b-PAMA溶液（0.05 mg/mL、30  $\mu$ L in PBS）を滴下し、

PEG-b-PAMA を固定させた。溶液を同様に除去し PBS にて洗浄後、チオール末端 TBA 水溶液 (0.4  $\mu$ M, 30  $\mu$ L in PBS) を滴下してアプタマー固定を行った。こうして PEG-b-PAMA、TBA が共固定した表面を得た。作製した表面にトロンピンを 5, 50, 500, 1000, 2000 nM の濃度で順に 30  $\mu$ L 滴下、洗浄を繰り返し行い、その際の位相変化を測定した。またコントロールのタンパクとして、エラスターゼを使用し、同様に位相変化を測定した。

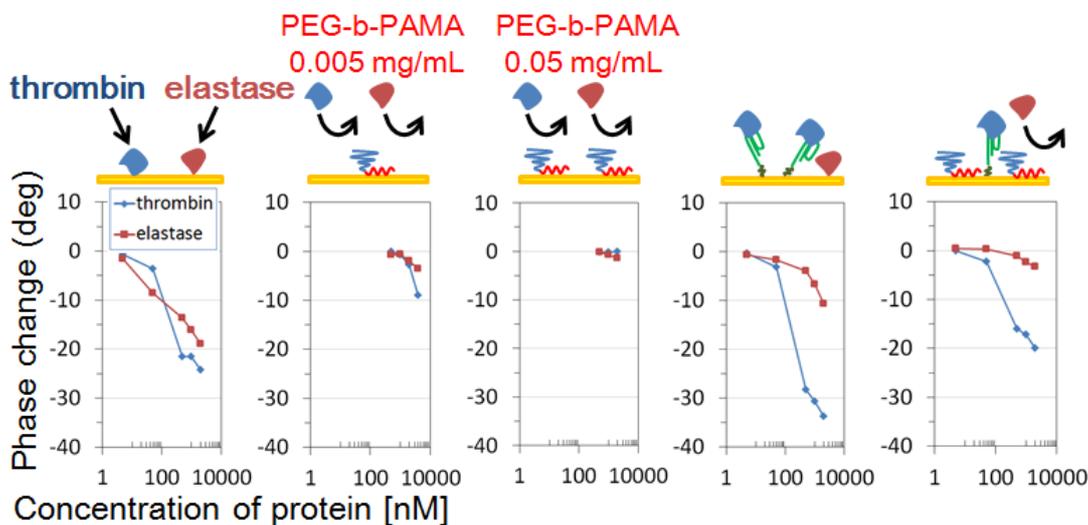


図2 各表面におけるトロンピン、エラスターゼの吸着による SAW の位相変化  
(左から、金表面のみ、PEG-b-PAMA 固定表面 (0.005 mg/mL、0.05 mg/mL 滴下)、TBA 固定のみの表面、TBA/ PEG-b-PAMA 共固定表面)

<結果>図2に TBA 修飾表面にトロンピンおよびアプタマーを滴下した際の位相の変化を示す。金表面だけの場合には、トロンピン、エラスターゼ共に非特異的に吸着し、吸着量に大きな違いはなかった。PEG-b-PAMA 固定表面の場合、PEG-b-PAMA の固定化量が多いほどトロンピンおよびエラスターゼの非特異的な吸着が抑制され、0.05 mg/mL 30  $\mu$ L 滴下した場合には、トロンピン及びエラスターゼの非特異的な吸着はほとんど見られなかった。TBA 固定のみの表面の場合では、トロンピン溶液滴下による大きな位相変化が見られた。これは濃度依存的に大きくなっており、2000 nM で 35° 程度の位相変化が見られた。TBA がアプタマーをと相互作用した結果変化した位相変化であると考えられる。一方でエラスターゼ滴下の場合でも 10.6° の位相変化が見られており、非特異的な吸着が確認された。これに対して、TBA/PEG-b-PAMA 共固定表面の場合では、トロンピン吸着による位相変化量はやや減少したものの、2000 nM におけるエラスターゼの位相変化量が 3.3° と大幅に抑制された。トロンピンとエラスターゼの比 (T/E 比) を評価したところ、2000 nM において、TBA 固定のみの表面では 3.2 であったのに対して TBA/PEG-b-PAMA 共固定の表面では 6.0 と大幅に向上した。こうしたことから、PEG-b-PAMA によるタンパクの非特異的な吸着抑制効果を SAW センサーによって初めて確認することができた。今後は、表面の PEG-b-PAMA の鎖長、TBA のスパーサーの長さを等の検討を行い、TBA がトロンピンを認識できる最適な条件を検討していく予定である。

#### 【参考文献】

- 1) Nimjee, S. M.; Rusconi, C. P.; Sullenger, B. A., *Annu. Rev. Med.* **2005**, 56, 555-583.
- 2) Padmanabhan, K.; Padmanabhan, K. P.; Ferrara, J. D.; Sadler, J. E.; Tulinsky, A., *the Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, 17651-17654.
- 3) Yoshimoto, K.; Matsumoto, S.; Asakawa, R.; Uchida, K.; Ishii, T.; Nagasaki, Y., *Chem. Lett.* **2007**, 36, 1444-1445.

## PEG-b-PAMA/Aptamer Co-Immobilized Surface for High Efficacy of Immunoassay System

Yukichi Horiguchi<sup>1</sup>, Keitaro Yoshimoto<sup>2</sup> and Yukio Nagasaki<sup>1,3,4</sup>

1) Department of Materials Science, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, 2) Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, 3) Master's School of Medical Sciences, University of Tsukuba, 4) Satellite Laboratory of International Center for Materials Nanoarchitectonics (WPI-MANA), National Institute of Materials Science (NIMS), University of Tsukuba, Tennoudai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, 305-8573, Japan),  
Tel: +81-29-853-5749, e-mail: yukio@ims.tsukuba.ac.jp

A protein detection system using a label-free immunosensor array is convenient method for an immunoassay. Quartz crystal microbalance (QCM) and surface plasmon resonance (SPR) sensor are well known as label-free immunosensor systems. Surface acoustic wave (SAW) sensor is an attractive analytical system to detect difference of oscillations on gold surfaces. The SAW sensor is based on a wave delay (phase change) of surface acoustic wave on gold sensor chip, which is monitored by the corresponding physical quantity being measured such as adsorbed proteins. Though the SAW sensor is theoretically high sensitivity, the sensor chip surface must be properly designed to obtain anticipated high-performance. We have so far investigated orientation of oligonucleotides coupled with PEG-polyamine block copolymer on gold sensor surface<sup>1</sup>. In this research, we introduce this strategy to SAW sensor using thrombin binding aptamer (TBA), viz., construction of PEG/TBA surface on SAW sensor chip and its evaluation were performed.

Poly(ethylene glycol)-block-poly[(2-N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate] (PEG-b-PAMA), was synthesized by anionic polymerization<sup>2</sup>. The obtained PEG-b-PAMA was used for surface modification. The polyamine segment interacts with a gold surface via multipoint coordination by the tertiary amino groups, which helps attraction and orientation of the TBA on the surface. In the evaluation, thrombin from human plasma (Sigma T6884) and elastase from porcine pancreas (Sigma E0127) were used as target protein and control protein, respectively. Briefly, 0.05 mg/ml PEG-b-PAMA in PBS was applied onto a gold surface, followed by the modification of TBA in PBS via Au-S bond. To evaluate the performance, thrombin or elastase in PBS was applied onto the PEG-b-PAMA/TBA co-immobilized gold surface. The concentration of a series of protein solution were 5, 50, 500, 1000, 2000 nM. Each application of a solution was followed by a PBS rinse. OJ9 (SAW sensor) was used in this experiment.

After construction of PEG/TBA hybrid surface, the performance was evaluated using two different proteins, thrombin and elastase. When 50 nM of thrombin was applied, small but definite signal was observed by the SAW sensor, while elastase was not, indicating the constructed surface worked well. Note that significant non-specific adsorption was observed without PEG-b-PAMA modification. For example, when 2000 nM of elastase was applied to the hybrid SAW sensor surface without PEG (TBA), about 10.6° of change in the phase was observed, while it was 3.3° for the hybrid SAW sensor surface (PEG/TBA). The selectivity ratio of change in the phase between thrombin and elastase (T/E ratio) was improved from 3.2 to 6.0 by modifying PEG-b-PAMA. The SAW sensor is confirmed as biosensing tool by appropriate surface modification using PEG-b-PAMA coupled with TBA.

1 Yoshimoto, et al., Chem. Lett 36, 1444-1445 (2007)

2 Wakebayashi, et al., Biomacromolecules 5, 2128-2136 (2004)

## 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) Toru Yoshitomi, Yu Yamaguchi, Akihiko Kikuchi, Yukio Nagasaki, 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, *Acta Biomaterialia*, 8, 1323-1329(2012)
- 2) 長崎幸夫, 「生体適合性ポリエチレングリコール表面の構築」、*高分子*, 61巻、2月号77-82ページ(2012)
- 3) Xiaofei Yuan, Dolça Fabregat, Keitaro Yoshimoto and Yukio Nagasaki, High PEGylation Efficiency of Pentaethylenehexamine-end Poly(ethylene glycol) (mPEG-N6) for Active-ester Surface, *Colloid and Surface B: Biointerface*, 92, 25-29 (2012)
- 4) Yukio Nagasaki, Nitroxide radicals and nanoparticles: A partnership for nanomedicine radical delivery, *Therapeutic Delivery*, 3(2) 1-15(2012)
- 5) Yukio Nagasaki: Construction of Densely Poly(ethylene glycol) Chain Tethered Surface and its Performance, *Polymer Journal*, 43, 949-958 doi:10.1038/pj.2011.93. (2011).
- 6) KazukoToh, Toru Yoshitomi, Yutaka Ikeda, Yukio Nagasaki, Novel redox nanomedicine improves gene expression of polyion complex vector, *Science and Technology of Advanced Materials*, 12,065001(2011).
- 7) Kodai Ujiie, Naoki Kanayama, Kei Asai, Mikio Kishimoto, Yusuke Ohara, Yoshimasa Akashi, Keiichi Yamada, Shinji Hashimoto, Tatsuya Oda, Nobuhiro Ohkohchi, Hideto Yanagihara, Eiji Kita, Masayuki Yamaguchi, Hirofumi Fujii, Yukio Nagasaki: Preparation of Highly Dispersible and Tumor-Accumulative, Iron Oxide Nanoparticles -Multi-point Anchoring of PEG-b-poly(4-vinylbenzylphosphonate) Improves Performance Significantly, *Colloid and Surface B: Biointerface*, 88, 771-778 (2011).
- 8) Chonpathompikunlert Pennapa, Toru Yoshitomi, Han Junkyu, Hiroko Isoda, Yukio Nagasaki: The Use of Nitroxide Radical-containing Nanoparticles Coupled with Piperine to Protect Neuroblastoma SH-SY5Y cells from A $\beta$ -Induced Oxidative Stress, *Biomaterials*, 32, 8605-8612 (2011).
- 9) Toru Yoshitomi, Aki Hirayama, Yukio Nagasaki: The ROS scavenging and renal protective effects of pH-responsive nitroxide radical-containing nanoparticles, *Biomaterials*, 32, 8021-8028 (2011).
- 10) Masao Kamimura, Naoki Kanayama, Kimikazu Tokuzen, Kohei Soga, Yukio Nagasaki: Near-infrared (1550nm) In Vivo Bioimaging Based on Rare-earth Doped Ceramic Nanophosphors Modified with PEG-b-poly(4-vinylbenzyl phosphonate), *Nanoscale*, 3, 3705-3713 (2011).
- 11) Masato Tamura, Satoshi Ichinohe, Atsushi Tamura, Yutaka Ikeda, Yukio Nagasaki: In Vivo and In Vitro Characteristics of Core-Shell-Type Nanogel Particles: Optimization of Core Cross-Linking Density and Surface PEG Density in PEGylated Nanogels, *Acta Biomaterialia*, 7(9), 3354-3361 (2011).
- 12) Yukichi Horiguchi, Shinpei Kudo, Yukio Nagasaki: Gd@C<sub>82</sub> metallofullerenes for neutron capture therapy - Fullerene solubilization by poly(ethylene glycol)-block-poly(2-(N,N-diethylamino)ethyl methacrylate) and resultant efficacy in vitro, *Science and Technology of Advanced Materials*,12, 044607 (2011).
- 13) Shogo Sumitani, Motoi Oishi, Yukio Nagasaki: Carborane Confined Nanoparticle for Boron Neutron Capture Therapy: -Improved Stability, Blood Circulation Time and Tumor Accumulation-, *Reactive and Functional Polymers*, 71(7), 684-693 (2011).
- 14) Hiroto Hatakeyama, Hidetaka Akita, Erika Itoh, Yasuhiro Hayashi, Motoi Oishi, Yukio Nagasaki, R. Danev, K. Nagayama, N. Kaji, H. Kikuchi, Y. Baba, Harashima H.: Systemic delivery of siRNA to tumors using a lipid nanoparticle containing a tumor-specific cleavable PEG-lipid, *Biomaterials*, 32(18), 4306-4316 (2011).
- 15) Masaki Kubota, Keitaro Yoshimoto, Yuan Xiaofei, Yukio Nagasaki: Improvement of the thermal stability of streptavidin immobilized on magnetic beads by the construction of a mixed poly(ethylene glycol) tethered-chain layer, *Polymer Journal*, 43, 493-496 (2011).
- 16) Chonpathompikunlert Pennapa, Toru Yoshitomi, Han Junkyu, Kazuko Toh, Hiroko Isoda, Yukio Nagasaki: Chemical Nanotherapy-Nitroxyl Radical-containing Nanoparticle (RNP) Protects Neuroblastoma SH-SY5Y cells from A $\beta$ -induced Oxidative Stress, *Therapeutic Delivery*, 2(5), 585-597 (2011).
- 17) Toru Yoshitomi, Yukio Nagasaki: Nitroxyl radical-containing nanoparticles for novel nanomedicine against oxidative stress injury, *Nanomedicine*, April, Vol. 6, No. 3, Pages 509-518 (2011).

### 2. 著書・総説

- 1) 上村真生、長崎幸夫、PEG 修飾希土類含有セラミックスナノ粒子による近赤外光バイオイメージング、未来材料、12巻、2号、24-30(2012)
- 2) 長崎幸夫、電子スピン封入ナノ粒子の設計とナノメディシンとしての展開、電子スピンサイエンス、9巻 (Autumn)、134-149(2011)

### 3. 会議発表

- 1) 2011.11.13 Yukio Nagasaki: 「Self-assembled Redox Polymer Drug -Synthesis, Physicochemical Characteristics and Nanotherapy-」, Advanced ESR Studies for New Frontiers in Biofunctional Spin Science and Technology”(AEBST 2011), Kobe, Japan
- 2) 2011.09.19-24. Yukio Nagasaki: 「 SELF-ASSEMBLING REDOX POLYMER DRUG FOR ANTI-OXIDATIVE STRESS INJURY」, 2nd International School - Nano2011. Nanomaterials and Nanotechnologies in Living Systems. Safety and Nanomedicine., Moscow Region, Russia (2011).

他

# 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) (PNIPAAm-g-DNA) 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) PNIPAAm-g-DNA の構造解析、(2) 構造の明確な PNIPAAm/DNA とのブロック共重合体 (PNIPAAm-b-DNA) の合成とその構造物性、これらの項目に関して得られた成果について主に報告をする。

## 2. 研究経過

### (1) PNIPAAm-graft-DNA の構造解析

以前より研究を進めてきた PNIPAAm-g-DNA に関し、その自己組織化によって形成されるナノ粒子の内部構造の詳細を小角 X 線散乱 (SAXS) 法により解析した。PNIPAAm-g-DNA の合成は従来のラジカル重合法により調製した。異なる 4 つの DNA (9 塩基) 導入率 (0.08—0.34 mol%) を有する共重合体 (分子量は  $2.5\sim 4.1\times 10^5$  g/mol) を合成した (表 1)。従来予期されていたように、下限臨界溶解温度 (LCST) 以上でナノ粒子を形成し、PNIPAAm 成分からなる核の表面に DNA 鎖が密生したようなコア・シェル型の構造を有している。表層の厚みは DNA 鎖の長さに相当するものの、疎水核のサイズは DNA 分率の上昇とともに小さくなった (表 2)。ナノ粒子形成後に相補鎖を添加して粒子表層に二重鎖 DNA を形成させると粒子サイズが減少したが、その際に会合数 ( $N_{\text{agg}}$ ) も減少することが明らかになった。二重鎖形成に伴う DNA 鎖間の立体反発力の増大を回避するために会合数が減少したのではないかと推察している。二重鎖 DNA で覆われたナノ粒子は、塩濃度が上昇すると速やかに粒子凝集 (非架橋凝集) を起こす。井戸型の引力項を持つ剛体球ポテンシャル (Baxter モデル) を仮定して、粒子の凝集構造を解析した。いずれの試料においても、DNA 層が互いにオーバーラップしながら粒子が凝集していることがわかった。さらに、粒子間の引力は DNA のグラフト密度というよりはむしろ粒子のサイズに強く依存していることが示された。非架橋型凝集が DNA 二重鎖間の特異的な誘引力によってもたらされているわけではないと示唆された。

**Table 1** Hydrodynamic radius, radius of gyration, and micelle aggregation number <sup>a</sup>

Code	$R_h$ (nm)	$R_g^b$ (nm)	$R_g/R_h$	$N_{\text{agg}}^b$
ss-0.08	39.1	29.4	0.75	142
ss-0.20	33.0	24.3	0.74	81
ss-0.26	26.0	17.3	0.67	57
ss-0.34	23.1	12.0	0.52	22
ds-0.08	37.2	23.9	0.64	103
ds-0.20	33.1	20.3	0.61	69
ds-0.26	24.3	14.4	0.59	42
ds-0.34	18.9	11.8	0.62	19

<sup>a</sup> The values in 10 mM PB (pH 7.4) containing 0.1 M NaNO<sub>3</sub> at 40 °C.

<sup>b</sup>  $R_g$  and  $N_{\text{agg}}$  are estimated from the best-fit parameters in Guinier analysis

**Table 2** Structural parameters for PNIPAAm-*g*-DNA colloidal particles <sup>a</sup>

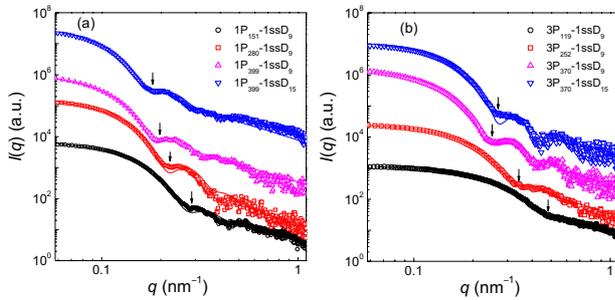
Code	$R_{in}$ (nm)	$L_{shell}$ (nm)	$R_{out}$ (nm)	$\Delta\rho_{shell} / \Delta\rho_{core}$	$\Gamma_{DNA}^b$ (strands/nm <sup>2</sup> )
ss-0.08	27.2	4.0	31.2	0.40	0.043
ss-0.20	21.9	3.9	25.8	0.53	0.072
ss-0.26	13.9	4.8	18.7	0.33	0.17
ss-0.34	12.7	4.8	17.6	0.05	0.077
ds-0.08	22.4	2.5	24.9	0.51	0.046
ds-0.20	19.5	2.3	21.8	0.68	0.069
ds-0.26	13.9	2.8	16.7	0.40	0.12
ds-0.34	11.6	3.5	15.1	0.10	0.16

<sup>a</sup> The values in 10 mM PB (pH 7.4) containing 0.1 M NaNO<sub>3</sub> at 40 °C.

<sup>b</sup>  $\Gamma_{DNA}$  is the number of DNA strand per surface area of core particle ( $4\pi R_{in}^2$ ). Note that the values are calculated on the basis of DNA graft number per copolymer chain,  $N_{agg}$ , and  $R_{in}$ , irrespective of hybridization.

## (2) PNIPAAm-*block*-DNA の精密重合と物性

昨年に引き続き、分子鎖長のコントロールに加え、種々の分子骨格（線型とミクトアーム型）を有する PNIPAAm-*b*-DNA の精密重合を試みている。本年度は特にナノ粒子形成とその構造について、組成や分子骨格の影響などを網羅的に調査した。9 塩基ならびに 15 塩基の二種類のオリゴ DNA を用いた。PNIPAAm-*g*-DNA の場合とは異なり、ブロック共重合体からなるナノ粒子は非常に明確な構造を有していることが分かった。図 1 にそれらブロック共重合体からなるナノ粒子の SAXS プロファイルを示す。粒子はコア・シェル構造である。PNIPAAm セグメント長の増大とともに、会合数と粒子サイズが増大した。ミクトアーム型は、線形の場合と比べると、粒径が小さくかつ高密度の粒子が形成される。これらの粒子に相補鎖を添加すると非架橋型凝集を生じるが、ミクトアーム型からなる粒子の方が速やかに凝集することが判明した。密度との間に相間があると思われるが今後この原因を明らかにしていく予定である。



**Figure 1** SAXS profiles of linear and miktoarm star PNIPAAm-*b*-ssDNA conjugates in 10mM PB (pH 7.4) at 60 °C. The concentration of conjugate was 2.0 g/L. For clarity, the data are shifted vertically with an increment factor. The solid lines indicate the fitting curve. The arrows indicate the positions of the form factor minima.

**Table 3** Structural characteristics of micelles formed from PNIPAAm-*b*-ssDNA conjugates <sup>a</sup>

Code <sup>a</sup>	$R_g$ (nm)	$N_{agg}$	$R_{core}$ (nm)	$L_{shell}$ (nm)	$\rho_{core}$ (g cm <sup>-3</sup> )
1P <sub>151</sub> -1ssD <sub>9</sub>	13.5	101	13.8	4.4	0.26
1P <sub>280</sub> -1ssD <sub>9</sub>	17.2	137	16.8	4.4	0.36
1P <sub>399</sub> -1ssD <sub>9</sub>	20.4	187	20.8	4.3	0.37
1P <sub>399</sub> -1ssD <sub>15</sub>	21.2	76	19.1	6.8	0.19
3P <sub>119</sub> -1ssD <sub>9</sub>	8.6	21	6.7	3.2	0.38
3P <sub>252</sub> -1ssD <sub>9</sub>	11.1	67	10.4	3.7	0.67
3P <sub>370</sub> -1ssD <sub>9</sub>	16.2	126	15.1	3.8	0.61
3P <sub>370</sub> -1ssD <sub>15</sub>	15.7	52	11.0	6.3	0.65

<sup>a</sup> The values in 10 mM PB (pH 7.4) at 60 °C.

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

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

We have designed and constructed colloidal nanoparticles functionalized with DNA through self-assembly of poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)-*graft*-DNA 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 a new nano-biodevice by taking advantage of the peculiar properties. In this year, we examined the micellization of PNIPAAm-*g*-DNA, and its non-crosslinking aggregation by small angle X-ray scattering (SAXS). In addition, we continued to synthesize the novel PNIPAAm/DNA bioconjugates with various molecular lengths and architectures, *i.e.*, PNIPAAm/DNA diblock and star-shaped copolymers, via living radical polymerization such as atom transfer radical polymerization (ATRP), and characterize them.

Using synchrotron radiation SAXS, detailed structural insights of PNIPAAm-*g*-DNA colloidal particles has been provided, leading to a better understanding of the interparticle aggregation mechanism. With increasing DNA fraction, the core size significantly decreased, whereas the shell thickness little changed. The thickness of coronal layer was also found to be close to the theoretical length of DNA, and reduced slightly on hybridization with its complementary DNA. These facts indicated that the coronal layer consists of mainly DNA component, which is a brush-like structure, surrounding the core formed by hydrophobic PNIPAAm segments. The colloidal particles with dsDNA aggregated at a high salt concentration. The SAXS analysis of the aggregated particles suggested that the colloidal particles overlap each other while the coronal layers interpenetrating. The interactive forces between neighboring particles were also quantified. It was found out that the attraction between the particles depends on the particle size without the influence of the graft density of DNA on the particles.

Furthermore, we have systematically investigated the micellization, and internal micelle structure of thermoresponsive PNIPAAm-*b*-DNA conjugates with different compositions and chain architectures generated by ATRP and click chemistry. With the PNIPAAm content in conjugates increased, their LCST decreased and  $\Delta H$  increased. The conjugates formed a well-defined core-shell type micelle with a very narrow distribution in size above LCST. The effects of compositions and chain architectures on the internal structure of PNIPAAm-*b*-DNA micelles were clarified. Both the linear and miktoarm star-shaped conjugates self-assembled into well-defined core-shell type nanoparticles having a core composed of PNIPAAm and a coronal layer of DNA. The structural parameters of core size,  $R_{\text{core}}$ , and aggregation number,  $N_{\text{agg}}$ , for the micelles formed from the linear PNIPAAm-*b*-ssDNA conjugates increased with the length of PNIPAAm block. The micelles formed from the miktoarm star conjugates had smaller size, larger density,  $\rho_{\text{core}}$ , and smaller  $N_{\text{agg}}$ , as compared to their linear analogues with the similar composition. The increase of ssDNA length brought about the increase of particle size, whereas  $N_{\text{agg}}$  decreased. The hybridization of DNA on the nanoparticles with fully-complementary one induced a non-crosslinking aggregation, while the nanoparticles remained disperse upon hybridization with one-base mutant DNA. The nanoparticle composed of miktoarm star copolymer showed a quicker DNA-hybridization response in this non-crosslinking aggregation compared to that of linear analogue.

## 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) W.-Y. Ooi, M. Fujita, P. Pan, H.-Y. Tang, K. Sudesh, K. Ito, N. Kanayama, T. Takarada, and M. Maeda “Structural characterization of nanoparticles from thermoresponsive poly(*N*-isopropylacrylamide)-DNA conjugate”, *J. Colloid Int. Sci.*, **374**, 315-320 (2012).
  - 2) M. Fujita, Y. Katafuchi, K. Ito, N. Kanayama, T. Takarada, and M. Maeda, “Structural study on gold nanoparticle functionalized with DNA and its non-cross-linking aggregation”, *J. Colloid Int. Sci.*, **368**, 629-635 (2012).
2. 著書・総説
  - 1) 前田瑞夫, “生体高分子ソフトインターフェースの科学”, *プラズマ・核融合学会誌*, **87**, 691-695 (2011).
3. 会議発表 (一部抜粋)
  - 1) 前田瑞夫, “(招待講演)ソフトインターフェースの分子科学”, 第21回日本MRS学術シンポジウム, 平成23年12月20日 (横浜市)
  - 2) 小林 奈央, 佐藤 香枝, 引間 孝明, 藤田 雅弘, 前田 瑞夫, “DNA担持金ナノ粒子の非架橋型凝集の構造解析”, 日本バイオマテリアル学会, 平成23年11月22日 (京都市)
  - 3) M. Fujita and M. Maeda, “Structural Study on Thermoresponsive Poly(*N*-isopropylacrylamide)/DNA Bio conjugate”, PPC12, 平成23年11月14日 (Jeju, Korea)
  - 4) W.-Y. Ooi, P. Pan, K. Sudesh, T. Hikima, M. Fujita, and M. Maeda, “Structural characterization of thermoresponsive PNIPAAm/DNA bioconjugate”, 第60回高分子学会, 平成23年9月30日 (岡山市)
  - 5) M. Maeda, “(招待講演) DNA-based soft interface for biosensing”, ASAM-3 2011, 平成23年9月21日 (福岡県春日市)
  - 6) 金山 直樹, 宝田 徹, 前田 瑞夫, “ミスマッチ構造により分散安定化した DNA 二重鎖担持金ナノ粒子の重金属イオン選択的凝集現象”, 第63回コロイドおよび界面化学討論会, 平成23年9月9日 (京都市)
  - 7) M. Maeda, “(招待講演) Chemical-, ion-, and bio-sensors using DNA-modified nanoparticles”, *Polymers in Medicine and Biology 2011*, 平成23年9月4日 (Santa Rosa, CA, USA)
  - 8) M. Fujita and M. Maeda, “Non-crosslinking aggregation of DNA-functionalized nanoparticles”, IUCr2011, 平成23年8月23日 (Madrid, Spain)
  - 9) W.-Y. Ooi, M. Fujita, P. Pan, K. Sudesh, and M. Maeda, “Nano-structural characterization of PNIPAAm-DNA conjugate colloidal particle”, 第60回高分子学会年次大会, 平成23年5月27日 (大阪市)
  - 10) N. Kanayama, T. Takarada, and M. Maeda, “Double-stranded DNA-carrying gold nanoparticles with thymine-thymine mismatch site for facile and rapid detection of mercury ion in water”, ICAS2011, 平成23年5月23日 (京都市)
  - 11) M. Maeda, “(招待講演) Nanoparticle-based Sensors Using DNA-modified Gold Colloids”, ICAS2011, 平成23年5月24日 (京都市)
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

連携研究者：東京医科歯科大学・合田達郎

### 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 23 年度は、レクチン-糖相互作用を利用したタンパク検出ゲル FET システム構築に取り組んだ。 $\alpha$ -マンノシドを側鎖として持つゲルを合成し、コンカナバリン A (Con A) 添加により膨潤収縮することを確認した。またこのゲルで修飾した FET を用いた Con A 検出が可能であることおよび信号強度の濃度依存性も見出した。Con A は中性域での電荷密度が低く従来の電荷検出型 FET 法では検出が困難であり、本信号変換メカニズムの有効性を示す事例となっている。

### 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変換素子としての物性評価を行っている。

<レクチン応答電界効果トランジスタの開発> (領域内共同研究：三浦研)

レクチン-糖 (鎖) 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り、ウイルスや細菌の感染機構やシグナル伝達増幅などへ寄与することが報告されている。そのためレクチン類の中には疾病マーカーとして期待されているものもあり、新種の発見と同時にその糖鎖親和性を評価する手法の開発が期待されている。一方、その小さい電荷密度のためタンパク質の FET 検出は一般的に困難である。この問題を解決するためレクチン応答性ゲルの合成およびそのゲルで修飾した FET によるレクチン検出を試みた。レクチンの一種である Con A 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、グルコシド-Con A 複合体を物理架橋点として有するゲルを合成し、外部添加したグルコースによる複合体解離に伴い膨潤することを報告している。本研究では、逆に、高分子側鎖 (糖) による Con A 補足および物理架橋点化による収縮の可能性に関して検討し、これを FET による ConA 検出用信号変換素子として応用することを試みた。

$\alpha$ -マンノシド ( $\alpha$ Man) 含有率の異なるジメチルアクリルアミドゲルを合成しCon Aに対する応答性を評価した。 $\alpha$ Man含有率の低いゲル (3mol%) はCon A添加に伴いゲル重量は急激に増加した。一方で高 $\alpha$ Man含有ゲル (20mol%) では一時的に重量増加するものの、最終的には収縮に転じることを確認した。FETゲート表面に 20mol%  $\alpha$ Manゲルを光重合形成し、Con A添加前後におけるしきい電圧 ( $V_T$ ) 変化を評価した。 $V_T$ 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は負電荷を帯びていると考えられ ( $pI=6-7$ )、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。またCon A濃度 (1, 2, 4 $\mu$ M) に応じて $V_T$ 値を変化することも分かった。以上の結果は、分子応答性ゲル修飾FETが電荷密度の低いタンパク質検出に有効であるのみならず、定量評価にも応用できる可能性を示唆している。

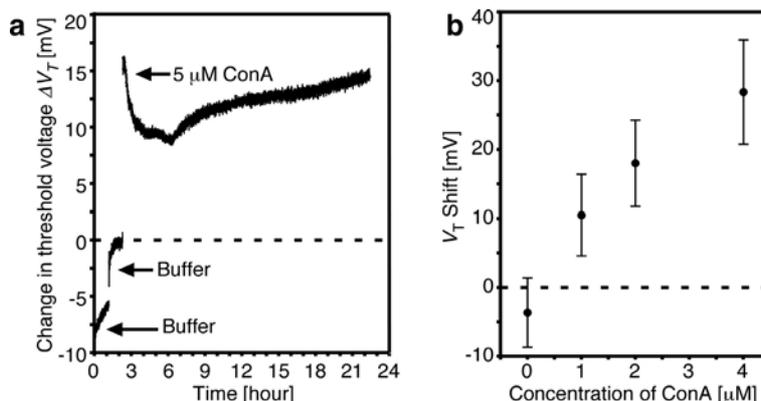


図 1 レクチン応答電界効果トランジスタによる Con A 検出。(a) 5 $\mu$ M Con A 注入時の  $V_T$  時間変化。(b) Con A 濃度に対する  $V_T$  シフト。

#### <抗原応答電界効果トランジスタの開発>

抗原抗体複合体をゲル架橋点として利用し、特定の抗原に反応して膨潤する抗原応答性ゲルが宮田らにより報告されている。本研究ではこのゲルを信号変換素子とする抗原トランジスタの可能性について検討している。抗原と抗体に重合性官能基を導入したのち、それらの抗原抗体複合体を形成させた状態で、アクリルアミド (AAM) との共重合ゲルを合成し、FETゲート表面に固定した。抗原添加前後のしきい値電圧変化を評価したところ、AAMゲルで修飾したFETと同様一旦上昇するものの、その後減少に転じ最終的に負になることが分かった。これは流入した抗原のため複合体が解離し、ゲルが膨潤したことに由来する。これら結果は、抗原応答性ゲルで修飾したFETがゲルの膨潤度変化を利用することで、タンパク質抗原の検出を行うことができたことを示している。

#### <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、カルシウムに反応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。今後は、高分子ゲルにマイクロからナノサイズの口径の穴 (ポア) を規則的に形成する技術を開発し、ターゲット分子の拡散時間を短くして、動的界面のダイナミクス解析により信号生成・変換過程を明らかにする予定である。

#### <核酸検出電界効果トランジスタの開発>

公募研究から本領域に採択された産業技術総合研究所の青木寛博士とペプチド核酸 (PNA) を用いた生体分子センシングで共同研究を行っている。DNAの代わりにPNAをFETゲート表面に固定化し、それを利用したPNA-DNA分子交雑検出を検討している。PNA-DNA分子交雑はDNA-DNAよりも強固な水素結合をすることが報告されており、より大きな信号が得られる可能性があるため、これを実証する。

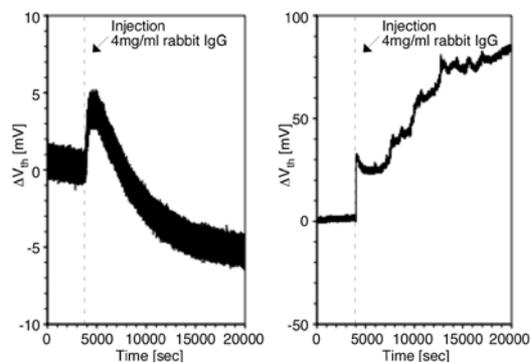


図 2 抗原応答電界効果トランジスタによる抗原検出。4mg/mL 抗原注入時の  $V_T$  時間変化。(a)抗原応答ゲル修飾 FET の場合、(b)AAMゲル修飾 FET の場合。

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

Yuji Miyahara, Akira Matsumoto, Tatsuro Goda

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)

1) Yasuhiro Maeda, Akira Matsumoto, Yoshiko Miura, Yuji Miyahara, "Preparation of alpha-Mannoside hydrogel and electrical detection of saccharide-protein interactions using the smart gel-modified gate field effect transistor," *Nanoscale Research Letters*, **7**, 108, 2012.

### 2. 著書・総説

### 3. 会議発表

半導体・集積回路技術シンポジウム、ソフトインターフェースの分子科学第六回公開シンポジウム/第六回領域会議、The 3rd Asian Symposium on Advanced Materials (ASAM-3)、「スマートバイオプロジェクト」セミナー、The International Conference on Thin Films (ICTF15)、第24回高分子ゲル研究討論会、第7回ソフトインターフェースの分子科学公開シンポジウム

### 4. その他 (例えば特許など)

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

生体内では、細胞表面に提示されるマーカー分子による選択的な輸送や取り込みが行われている。白血球ローリング現象もその1つであり、血管内を循環している白血球は、炎症部位近傍の血管内皮細胞により提示されたリガンドによって遊走する。内皮細胞が発現するリガンド分子は白血球のローリングを誘起し、その発現密度の上昇によって白血球はローリング速度を低下させてターゲット部位へと定着する。このことから細胞ローリングに基づいて細胞の挙動を選択的に制御することが出来れば、細胞分離・診断デバイスの開発につながるものと考えられる。すなわち、人工的に構築されたりガンド固定化相と細胞表面から形成されるソフト界面での動的現象の解明や応用は、細胞分離デバイスの開発において極めて重要である。

我々はこれまでに細胞ローリング現象を応用した幹細胞分離デバイスを開発するために、リガンドを固定化するソフト界面の構築と、その界面における細胞ローリング挙動を評価してきた。細胞表面マーカーに対する抗体を固定化リガンドとして選択し、グラフトポリマー、シランカップリング剤、金蒸着界面に対する抗体固定化法を検討した。グラフト化したポリアクリル酸に抗体を固定化した界面における細胞分離挙動を評価した結果、固定化抗体選択的に細胞がローリングし目的細胞が分離できることを見出した。さらに細胞は表面マーカーの発現量によって分画されることも認めている。一方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分離挙動を低下させる原因であることを見出し、その解決へ向けて検討してきた。その結果、非特異的な吸着を抑え固定化リガンド選択的に細胞を分離する界面として、Zwitterionic telomere brush 界面を構築し細胞ローリング挙動の比較や分離性能を検討している。今年度では、Zwitterionic telomere brush 界面での細胞分離挙動の評価、ならびにこの界面で分離された骨髄幹細胞の分化能について検討した。さらに新たなベタインポリマーとして、脂質イオン基をもつ 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)と疎水鎖を持つメタクリル酸 *n*-ブチル(*n*BMA)、そして *N*-ビニルホルムアミド(NVFA)のランダム共重合体を作製し(図1)、マイクロ流路への新たな抗体固定化法とマイクロチップ内での細胞ローリングについて評価した。本報告書では、新たに作製したランダム共重合体の作製と、ガラス界面への固定化法の検討、マイクロ流路内における細胞ローリング挙動について検討した結果について、以下にその成果を記述する。

## 2. 研究経過

### 2.1 MPC-nBMA-NVF からなるランダム共重合体の合成

MPC、BMA、NVFA の各モノマーをエタノールに溶解し、AIBN をモノマーの総モル比に対して1%添加し 80°Cで4時間反応させた。その後、減圧下で溶媒を除去しヘキサンとジエチルエーテルを用いて再沈殿により精製した。2N 塩酸により NVFA の側鎖を加水分解することでポリマーにアミノ基を生成した。リン酸緩衝液を溶離相としてGPCにより分子量ならびに分子量分布を測定した(表1)。その結果、分子量28000程度の共重合体を合成することができた。

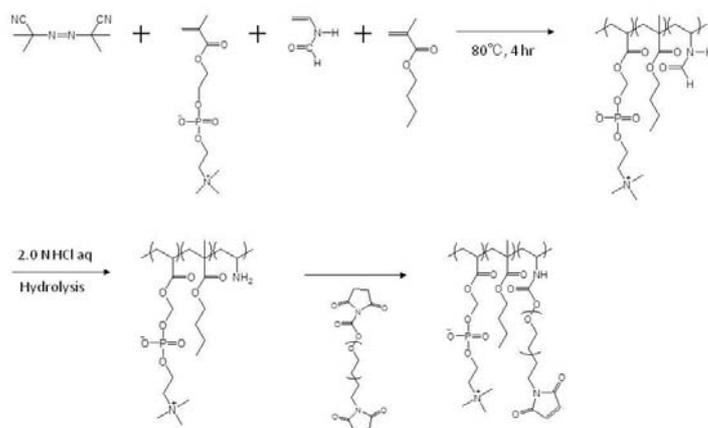


Figure 1 Synthesis of MPC-nBMA-NVFA

## 2. 2 ランダム共重合体によるガラス界面への修飾と非特異吸着の評価

MPC-BNA-NVA のエタノールに溶液 (5mg/ml) にオゾン洗浄処理したガラスを 24 時間浸漬した。30 分乾燥後、再び MPC-BNA-NVA 溶液に浸漬して表面コーティングした。その後、水接触角により表面に対するポリマーの修飾効率を評価した。その結果、未修飾表面と比較して MPC-BNA-NVA で修飾した界面では、接触角が 80~100°C 程度を示した。修飾したガラス基板を水に浸漬して 24 時間処理した場合には、NVA の導入率が 1% 以下の場合でのみ接触角の有意な減少が観察された。さらに、1N NaOH 水溶液で 1 時間ガラス表面を洗浄することにより、接触角は未修飾の場合と同程度まで減少した。以上の結果より、MPC-BMA-NVF ポリマーはガラス表面に対して吸着しているものと考えられる。また、NVF の導入率が 1% 以下のポリマーでは、水中における構造転移により MPC ドメインが界面へ露出することで接触角の減少が示されたものと考えている。

次に、このポリマーで修飾したガラス表面に対して、 $I^{125}$  で標識した抗体を添加し、界面へのタンパクの非特異吸着ならびに活性化したポリマーへの固定化効率を評価した。その結果、未修飾ガラス表面では、7mg/m<sup>2</sup>の密度でタンパクが吸着していることが示された。ファンデルワールス半径より抗体が多層にガラス界面へ吸着しているものと考えられる。一方、MPC-BMA-NVF でコートしたガラス界面では、吸着が大きく減少し、非特異吸着が抑制されている結果が示された。このことから、MPC-BMA-NVF ポリマーで表面修飾することにより、非特異吸着が抑制された界面を構築できることが示された。また、ポリマーのアミノ基を活性化して抗体を添加した結果、ガラス界面に対して 0.84 mg/m<sup>2</sup>の抗体を固定化することができた。

## 2. 3 ランダム共重合体により修飾されたフローチャンバーにおける細胞ローリングの観察

フローチャンバーに合成した 5mg/ml の MPC-BMA-NVF 溶液を加え、室温で 5 分間インキュベートした。その後さらに同様の操作を繰り返しインキュベート後、リン酸緩衝液で 3 洗浄した。このフローチャンバーに対して、ラット脂肪組織由来幹細胞を注入し、細胞の様子を高速度カメラにより観察した。その結果、抗 CD90 抗体を固定化した場合、細胞は界面上をローリングして流れる様子が示された。しかし、抗体未修飾の界面では細胞ローリングの様子は見られず、細胞は界面へ非特異吸着することなく流れる様子が観察された。以上の結果より、合成した MPC-BMA-NVF からなる共重合体をコートした界面では、細胞の非特異吸着を抑制した条件で固定化抗体選択的に細胞をローリングさせることができた。

Table 1 Molecular weight of synthesized polymer determined by GPC

MPC:BMA:NVF (mol ratio)	Mn	Mw	Mw/Mn
30:59:1	28717	29004	1.01
30:59.5:0.5	28729	29016	1.01
30:59.9:0.1	28618	28904	1.01

[monomer] = 1.0 mol/L, [AIBN] = 10 mmol/L, 80°C for 4 hr, solvent: phosphate buffer (0.2M, pH=6.8)

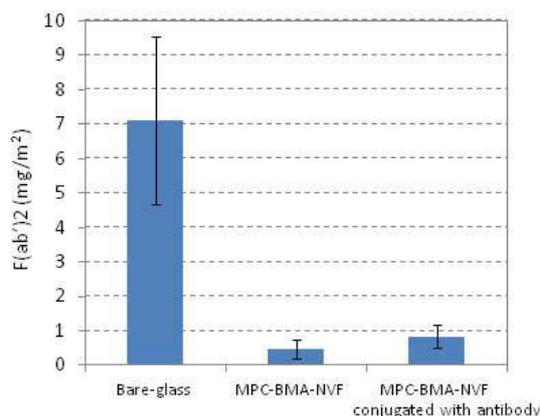


Figure 2 Amount of  $I^{125}$ -labeled antibody against the unmodified and modified glass surface

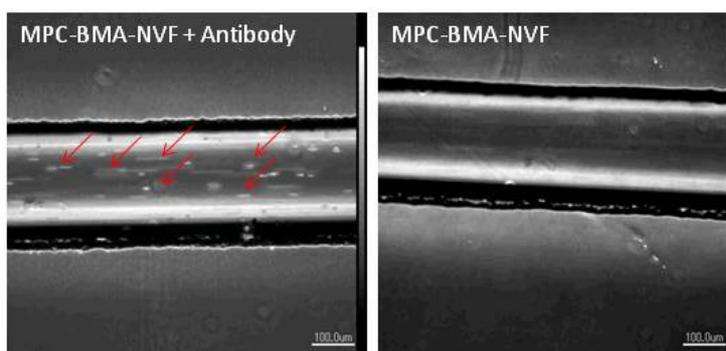


Figure 3 Observation of cell rolling in microfluidic device on the MPC-BMA-NVF modified surface

Evaluation and Application of Dynamic Motion on Soft Interface  
Between Immobilized Ligands 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

Some surface molecules of the cells are found as marker molecules for identifying the specific stem cells and their differentiation stage. Cellular transportation and homing is induced by the interaction between the surface molecules and the ligand. Leukocyte cell homing is famous phenomenon based on the cell rolling. Circulating leukocyte in the blood vessel is trapped on the expressed ligand of endothelial cells, and the cells roll on the surface and accumulate at the inflamed site. We focused on this mechanism for the cell separation.

We have developed the ligand-immobilized surface for stem cell separation. Cell rolling is known as dynamic interaction between the cell surface and the immobilized ligands. Rolling velocity is controlled by the strength of the interaction between them, and the cells which have a various kinds of marker density can be fractionated on the column. Previously, anti CD34 antibody-immobilized surface on poly(acrylic acid) were used for the cell separation. The mesenchymal stem cells isolated from the bone marrow were fractionated on this column, and the cell population which has high ability for the osteoblastic differentiation could be isolated. When we observed the cell rolling on high-speed camera, absorption of cells on the modified surface was frequently observed. This phenomenon would interrupt the continuous cell rolling and lead to a reduction of the separation ability. In the previous study, zwitterionic telomer brush surface have been developed for cell separation. Inner surface of the glass capillary was modified with sulfopropyl betaine by ATRP reaction, and cell behaviors were observed. Cell rolling was observed only in the case of antibody-immobilized glass capillary. Non-specific absorption of cells was scarcely observed. These results suggested that the telomer brush surface has attractive property for cell rolling column. In this year, random copolymers consisting of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC), butyl methacrylate, and N-vinyl formamide were synthesized for the surface modification. Surface modification with the copolymers and protein absorption on the glass were evaluated by x-ray photoelectron spectroscopy, contact angle measurement, and RI-labeled antibody adsorption analysis. Glass was washed with VU/ozone and immersed in a given concentration of the polymer solution. As the results, contact angle was largely changed and protein absorption was effectively suppressed. It was also found that 8 mg/m<sup>2</sup> antibody was immobilized on the glass surface very easily and stably. Cell rolling was evaluated by microscopy equipped with high-speed camera. When the stem cells isolated from bone marrow were injected into the microfluidic channel, the cells rolled on the surface in an antibody specific manner. Moreover, the adherent cells were scarcely observed. By developing this block copolymers, various stem cell separating devised made of various type of matrices can be easily modified with the antibodies.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

1. Yamaoka T., Mahara A., Cell rolling column in purification and differentiation analysis of stem cells, *Reactive & Functional Polymers*, **71**:362-366, 2011
2. Mahara A., Kiick LK, and Yamaoka T., Three-dimensional culture and differentiation of stem cells in elastin-like polypeptide hydrogels, *ICBS2011*:313-314, 2011
3. Tachibana Y, Enmi J, Mahara A, Iida H, Yamaoka T., Design and characterization of a polymeric MRI contrast agent based on PVA for in vivo living-cell tracking., *Contrast Media Mol Imaging*, **5**: 309-317, 2010
4. Kang JH, Tachibana Y, Kamata W, Mahara A, Harada-Shiba M, Yamaoka T., Liver-targeted siRNA delivery by polyethylenimine (PEI)-pullulan carrier., *Bioorg Med Chem*. **18**:3946-50. 2010,
5. Mahara A, Yamaoka T., Continuous separation of cells of high osteoblastic differentiation potential from mesenchymal stem cells on an antibody-immobilized column., *Biomaterials*. 2010, **31**:4231-7, 2010
6. Miskon A, Mahara A, Uyama H, Yamaoka T., A Suspension Induction for Myocardial Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells on Various Extracellular Matrix Proteins., *Tissue Eng Part C Methods*. **16**, 979-87, 2010
7. Mahara A, Yamaoka T., Antibody-immobilized column for quick cell separation based on cell rolling., *Biotechnol Prog.*, **26**:441-7, 2010

### 2. 著書・総説

1. 山岡 哲二・馬原 淳『生体高分子の界面化学 抗体固定化界面での細胞ローリングの再現と幹細胞分離への応用』、高分子、60巻、P743-744、2011
2. 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』、バイオマテリアル<生体材料>、28巻、第3号、p201-202、2010
3. 馬原 淳・山岡哲二『幹細胞分離法とポピュレーション解析』、次世代医療のための高分子材料工学、p168-17, 2008
4. 馬原 淳『幹細胞分離カラムの開発』、バイオマテリアル<生体材料>、26巻、第4号、p276-281, 2008

### 3. 会議発表

1. 馬原 淳、山岡哲二, Novel cell rolling column for stem cell separation, 1st International congress on Advanced Materilas 2011 (中国済南) (2011) [国際学会 口頭発表]
2. 馬原 淳、カルロス アグデロ、北野 博巳、山岡 哲二, 抗体固定化スルホベタイン界面を用いた細胞分離カラムの応用, 第60回 高分子討論会(岡山) (2011) [国内学会 口頭発表]
3. 馬原 淳, アグデロ カルロス, 北野 博巳, 山岡 哲二, 抗体固定化スルホベタイン界面をもつ細胞分離カラムの開発, 第33回日本バイオマテリアル学会大会(京都) (2011), [国内学会、口頭発表]
4. A. Mahara, C. Agudelo, H. Kitano and T. Yamaoka, Development of antibody-immobilized interface for cell-rolling column, 15th International Conference on Thin Films, 2011 (京都) (2011) [国際学会、口頭発表]
5. 馬原 淳、山岡 哲二, 細胞分離技術の現状と新展開, 第28回医用高分子研究会(東京) (2011) [国内学会、口頭発表]
6. A. Mahara, C. Agudelo, H. Kitano, and T. Yamaoka, Sulfopropyl betain surface suppressed the nonspecific cell binding of the cell-rolling column, 第21回日本 MRS 学術シンポジウム(横浜) (2011) [国内学会、口頭発表]
7. C. Agudero, A. Mahara, H. Kitano, and T. Yamaoka, Design of antibody-immobilized zwitterionic telomere brush surface for stem cell separation system, Termis-NA 2011 (米国) (2011) [国際学会、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”」

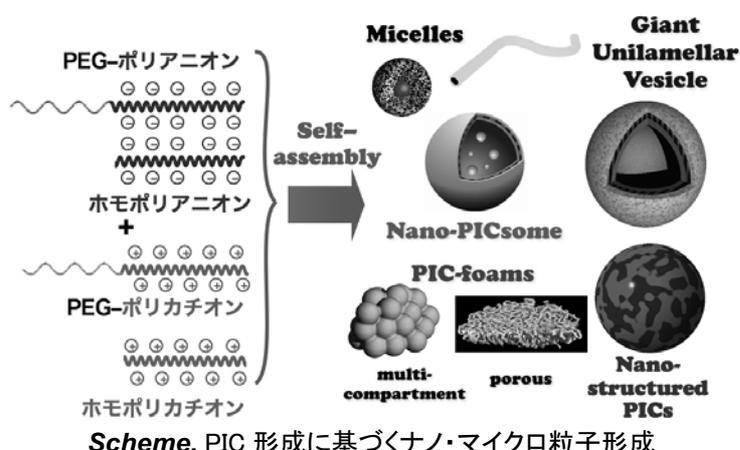


研究代表者：東大院工・岸村顕広

連携研究者：東大院工・小穴英廣

## 1. 緒言

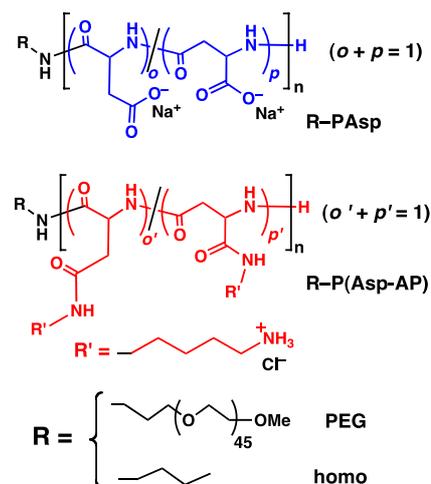
これまで、ブロック共重合体合成技術の進歩に伴い、ブロック共重合体をビルディングブロックとして各セグメントのマイクロ相分離構造に基づく種々の構造形成が確認されてきた。これら微細構造は、バルクの系のほか、濃厚ポリマー溶液相や、エマルション型微粒子でも観察されており、それぞれ材料応用が図られている。しかし、ナノ多孔体やマルチコンパートメントなどの複雑構造を創り出す技術は限られており、特に、メソスケールの空隙 (50-100 nm 領域)に関する報告例は多くない。また、これらの構造体の多くが、ブロック共重合体の中でも両親媒性のポリマーを用いたものであった。本研究では、メソスケールの微細構造を有するナノ・マイクロ粒子を調製する手法をソフト界面制御技術を洗練させることで確立し、その機能化を行うことを目的としている。特に、水中で簡便にこれらを作製し、バイオマテリアルにとどまらず材料として機能化することを目指す。具体的には PEG とポリアミノ酸由来の荷電セグメントからなるブロック共重合体を用い、水中でアニオンポリマー溶液とカチオンポリマー溶液を混合するという簡便な手法で種々のナノ・マイクロ構造を有するポリイオンコンプレックス (PIC) の作製手法を確立し、構造の特徴を活かした機能化を狙う (Scheme)。



## 2. 研究経過

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用い、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ベシクル PICsome の開発に成功してきた。PICsome は、水溶性コンポーネントの自己組織化の下、水溶液を混ぜ合わせるだけという簡便な方法で得られることが特徴であり、また、PIC の化学修飾により長期血中循環などが付与できるなど、バイオマテリアルとしても有利な特徴を持つ。一方、我々はこれまで明らかにしてきた PEG 含有率の効果だけでなく、分子集合体の水溶液を支配する複数の因子 (pH、温度、イオン強度、etc...) が PIC 形成に大きく寄与することも見出してきた。応用の観点からは、生理食塩条件に近い条件での調製や使用が求められる場合が多いため、本年度では、添加塩存在下での PEG 含有率とポリマー濃度の相関を明らかにすることを中心に取り組んだ。

Fig. 1 に示すポリマーをアミノ酸 NCA の重合とその後の側鎖変換反応に基づき合成し、それぞれを所定の濃度のリン酸バッファ、あるいは HEPES バッファに溶解した。カチオンとアニオンの比が 1:1 になるようにポリマー溶液を混合し、2 分間 vortex 混合して PIC を得た。得られた PIC は、動的光散乱(DLS)、透過型電子顕微鏡(TEM)、走査型電子顕微鏡 (SEM)、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)、暗視野顕微鏡(DFM)、位相差顕微鏡(PCM)などを用いて評価した。



**Fig. 1** PIC 形成用荷電性ポリマーの構造式(n は約 70~80)。

①化学的パラメタのチューニングによる PIC 構造の制御:

PEG 含有率を制御することを目的で PEG-PAsp と homo-PAsp を混合して用い、PEG-P(Asp-AP)との PIC を 150 mM NaCl 存在下で得た。DLS 測定と DFM 観察の結果、PEG 含有率の低い領域で直径数  $\mu\text{m}$  程度の PIC 粒子が得られた。種々のポリマー濃度において PIC を調製したところ、DFM 像や PCM 像に顕著な差が認められる場合があり、得られた粒子の内部構造に差があることが示唆された。そこで、粒子形成後にグルタルアルデヒドにより固定化したサンプルを樹脂包埋し、超薄切片を作製して TEM 観察を試みた。その結果、複数種類のスポンジ状構造の形成が確認された(Fig. 2)。3次元トモグラフを用いた詳細解析により、このスポンジ構造はいわゆる共連続構造であり、ポア(チャンネル)サイズは調製条件に応じて数十 nm の場合(porous I)と 100–150 nm 程度(porous II)の 2 パターンあることが確認された。また、低ポリマー濃度領域ではジャイアントユニラメラベシクル(GUV)が生成する場合もあった。また、Porous I については、1 mg/mL 付近では、一つの粒子内に Porous I とベシクル用中空構造が共存するマルチコンパートメント型構造の Combined Structure になることが見出された。一方、PEG 含有率の高い領域では、基本的に球状ミセルが生じるが、境界領域では棒状のミセルやサブミクロンサイズのベシクル、及び Porous I 構造が得られる場合があることも TEM 観察より確認した (Fig. 2)。さらに、光学顕微鏡を用いたリアルタイム観察から、ベシクル構造からナノ多孔体や Combined Structure へとダイナミックな構造変換が起こる現象を新たに発見した。次年度以降、この詳細についても検討を進める予定である。

一方で、荷電連鎖の鎖長、荷電側鎖の構造を変えた一連のポリマーを合成し、添加塩として NaCl を含まないバッファーを用いて PIC 形成を行い、サブミクロンサイズの PICsome 形成のためにポリマーが満たすべき要件を探る実験を行った。特にポリカチオン側鎖をこれまでのペンチルアミン側鎖からメチレン数が 2-6 で異なる場合について検討を行った。その結果、概ね PEG 含有率が支配的因子であるものの、ポリカチオンの側鎖のメチレン鎖の長さの長いポリカチオンがベシクル形成に有利であることが分かった。さらに、これらの組み合わせに対して、添加塩として NaCl を加え、得られる PIC の構造と機能の相関についての情報の取得を開始した。

②物理的パラメタのチューニングによる PIC 構造の制御: 図 3 に示すマイクロ流体デバイスのポケット部に塊状の PIC マイクロ粒子をトラップした。後に主流路に純水を流し、急激な塩濃度の低下を誘起したところ、GUV が形成された。予め蛍光デキストランを封入した PIC に対して同様の操作を行ったところ、CLSM 観察から GUV 内部に蛍光デキストランの存在が確認され、内部に物質が保持できることが明らかとなった。今後は、これらの知見を受けて、高効率な物質封入、及び粒径制御に向けた検討を行っていく予定である。

③ナノポーラス構造の機能化: ①の結果を受け、ナノポーラス構造の

作製法には十分な進捗が見られたので、PIC 層及び PEG 表面の修飾法の開発を実施した。まず、PIC 内の未反応官能基を足がかりとした修飾を行ない、機能化を試みた。残存アミノ基の低分子による修飾を試み、期待通り反応が進行することを確認し、機能化が可能であることを明らかにした。また、PEG の開始末端にアセタール基やアジド基を導入し、PIC ナノ構造体上にこれらを配置し、PEG 末端が化学修飾可能であることも確認した。今後は、これらの手法を足がかりとした多孔体構造の機能化に取り組む予定である。

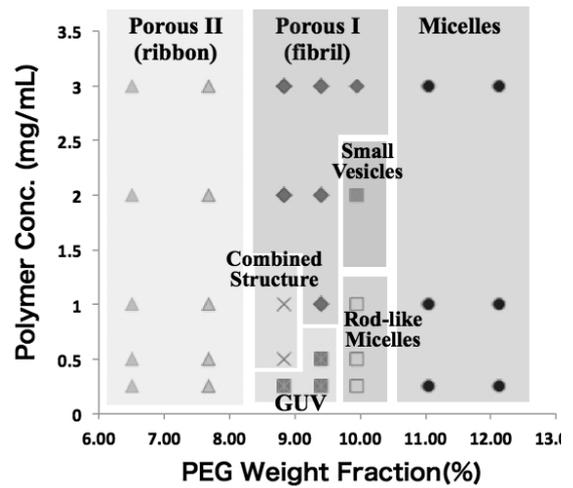


Fig. 2 PEG 含有率/ポリマー濃度と生成する TEM による PIC の形態分類の相関図

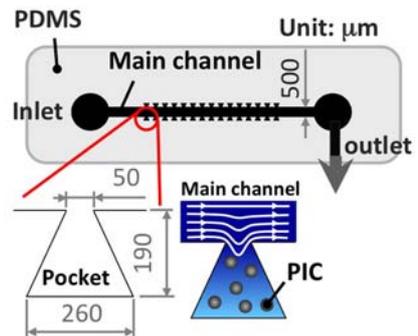


Fig. 3 PIC 形態変化観察用マイクロ流体デバイス。

# Development of dynamic interfaces obtained through the spontaneous formation of polymer self-assemblies in aqueous media

Akihiro KISHIMURA

Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8656, Japan.

Tel: +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 the rational design of nanostructured materials in aqueous media particularly due to their potential utility for biomedical applications. Above all, block copolymers are one of powerful tools to produce biomedical nanomaterials using bottom-up techniques, because their structures and properties can be tuned and modified easily. However, more improvements have been required in terms of easy, low-cost, and non-toxic fabrication process. To overcome these issues, we have so far developed novel polyion complex (PIC) nano-architectures prepared by simple mixing of aqueous solutions of oppositely charged water-soluble polymers, mainly, block copolymers consisting of biocompatible poly(ethylene glycol) (PEG) and poly(amino acid)s. Recently, we established the preparation method of monodispersed unilamellar vesicles, Nano-PICsomes, which are characterized by facile tuning of vesicle diameters over the range between 100–400 nm. This year, we found that different nano-architectures of PICs including micelles, rod-like micelles, vesicles, porous structures can be selectively prepared in aqueous medium containing 150 mM NaCl by simple mixing of a set of oppositely charged block copolymers and homo polymers. Careful tuning of PIC compositions reveals that decrease in PEG weight fraction ( $f_{\text{PEG}}$ ) leads to the formation of more complex structures like bicontinuous porous structures, while micelles and vesicles forms in higher  $f_{\text{PEG}}$  region. Variation in polymer concentration did not affect the morphology of PICs at high and low  $f_{\text{PEG}}$ . However, in the case of the middle  $f_{\text{PEG}}$  region, 8.83%-9.95%, resulted PICs are sensitive to polymer concentration. The facile synthesis of nano-porous architectures covered by PEG palisade is potentially useful for biomaterials or non-fouling materials.

Only one example of Nano-PICsomes has been so far reported, which prepared from a specific set of homo polycationomers and anionic block copolymers bearing PEG as a non-charged segment. To expand the design scope of chemical structures for vesicle formation and figure out the basic principle of PIC vesicle formation, effects of chemical structures and chain length of ionic segments on morphologies of resulted PICs were carefully examined. Homocationomer weight fraction ( $f_{\text{cat}}$ ) and  $f_{\text{PEG}}$  were carefully controlled by chemical structure of side chains and length of ionic segments. Transmission electron microscope and dynamic light scattering analysis revealed that polymer combinations having higher  $f_{\text{cat}}$  with relatively lower  $f_{\text{PEG}}$  resulted in the formation of Nano-PICsomes. In contrast, polymer combinations having higher  $f_{\text{PEG}}$  with relatively lower  $f_{\text{cat}}$  gave monodispersed spherical micelles. In other cases, formation of mixture of rod-like and spherical micelles was found. These insights can broaden the spectrum of Nano-PICsomes design, as well as other types of PICs design, for diverse applications.

In collaboration with Dr. Oana from U. Tokyo, a novel approach for preparation of giant unilamellar PICsomes were developed utilizing the unique response of coacervate-like PICs to the change of additive salt concentration. The microfluidic device consisting of a main channel bearing some side-pockets were designed for facilitating the preparation process in aqueous medium and real-time observation of morphological transformation of PIC micro-particles. Furthermore, detailed properties of PIC vesicle were investigated with the microfluidic chamber regarding salt-response property, loading guest molecules, and permeability of vesicle walls. Thus, helpful information toward mass-production of PIC vesicles/micro-structures and fabrication of guest-loaded PIC vesicles is obtained. Such a microfluidic chambers that can control solution conditions with keeping targeted objects under the view field of the optical microscope is useful and powerful for micro-scale experiments.

## 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、ポリイオンコンプレックスを用いたナノカプセルの創製と生体材料応用。  
*超分子研究会アニュアルレビュー*, **2012**, *32*, 2-3. (2012年3月31日)

2) 岸村 顕広、超分子集合体を持った生体材料設計とナノDDS, ナノ生理学への応用、*化学と教育*, **2011**, *59* (11), 550-553. (2011年11月20日)

### 3. 会議発表 (抜粋)

#### 【招待/依頼講演】

1) 岸村 顕広、水中での高分子自己組織化ナノ構造体の精密制御に基づく DDS 材料創製—PICsome を中心に—、ワークショップ3・インテリジェント DDS 素材、第27回日本 DDS 学会、東京大学本郷キャンパス、東京、2011年6月9日。

2) 岸村 顕広、生体材料応用を指向した高分子ナノ構造体の設計と機能、九州地区高分子若手研究会・夏の講演会、小倉リーセントホテル (福岡県北九州市)、2011年7月8日。

3) Akihiro Kishimura, Development of Polymeric Hollow Nano-capsules “PICsomes” as a Functional Drug Carrier. 14th, Asian Chemical Congress 2011, S21. Medical Applications of Biopolymers, Bangkok, Thailand, September 8th, 2011.

4) 岸村 顕広、ポリイオンコンプレックスによるナノ構造形成と生体材料応用、第4回 ChemBio ハイブリッドレクチャー、東京大学本郷キャンパス、2011年11月5日。

5) A. Kishimura, Y. Anraku, A. Wibowo, S. Chuanoi, K. Kataoka, Development of polyion complex nano-architectures based on block copolymers of PEG-b-poly(amino acids). 第21回日本MRS学術シンポジウム セッションK、2011年12月20日、横浜。

6) Akihiro Kishimura, Development of polymeric hollow nano-capsules “PICsomes” towards biomedical applications. Softinterface International Minisymposium on Biomaterials Science (SIMS2012), March 18th, 2012, University of Tsukuba, Tsukuba.

#### 【国際会議】

1) Hidehiro Oana, Morinaga Mutsuki, Akihiro Kishimura, Murat Gel, Kazunori Kataoka, and Masao Washizu, “FORMATION OF POLYMER VESICLES FROM MICRODROPLETS OF POLYION COMPLEX AND EXAMINATION OF THEIR PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES IN MICROFLUIDIC CHAMBER”, The 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2011), Oct. 5th, 2011, Washington State Convention Center, Seattle, Washington, USA. Poster Presentation.

2) A. Wibowo, H. Matsuda, Y. Anraku, A. Kishimura, K. Osada, K. Kataoka, Nano- and meso-structured polyion complexes prepared by simple mixing of oppositely charged block copolymers in the physiological condition, Particles 2011 Stimuli-Responsive Particles and Particle Assemblies, Jul. 11th, 2011, Berlin, Germany, Poster Presentation.

### 4. その他 (例えば特許など)

#### 特許

1) 微細相分離構造体及びその製造方法

特願 2011-196335 (2011.09.08)

発明者：片岡 一則、岸村 顕広、安楽 泰孝、権利者：科学技術振興機構

研究代表者：関西大学化学生命工学部・葛谷明紀

連携研究者：東北大学大学院工学系研究科・村田智

## 1. 緒言

本研究は、DNA の自己組織化により形成されるミクロンサイズの巨大二次元 DNA シートを足場として、酵素などのタンパク分子や、金ナノ粒子などの無機ナノ材料を、好きな位置に好きな数だけ、一分子/一粒子ずつ配列化し、その反応を制御できるようなインテリジェントソフト界面を構築することを目的とする。

このようなインテリジェントソフト界面を構成する要素技術として、

1. 100 nm 角程度のナノ平面内で 6 nm 程度の解像度で精密に分子操作が可能な DNA Origami 技術
2. ミリメートル単位のマイカ表面を完全に覆い尽くす、格子状の規則的な繰り返し構造を持った巨大二次元 DNA シートの基板上成長技術

の二つを活用する。

DNA Origami の形状を保ったまま巨大二次元 DNA シート内に埋め込むことに成功している。これに加えて応募者が確立してきた DNA Origami 上における酵素反応単分子解析法を活用し、インテリジェントソフト界面上で酵素反応を二次元ナノ解析することを目標とする。

## 2. 研究経過

本年度は、インテリジェントソフト界面中に埋め込む DNA Origami 構造体への酵素の固定化法をさらに検討した。我々はすでに、DNA ナノ構造体にゲストとちょうど同じ大きさの切り込み構造を作っておき、そこに Biotin 修飾 DNA を段階的に導入することで、ストレプトアビジン (SA) の段階的導入に成功している。この手法と SA-酵素コンジュゲート体を用いれば、複数の酵素を DNA ナノ構造体上に導入することができるはずだが、SA の段階的導入では精製による DNA ナノ構造体のロスなどの問題点がある。そこで DNA ナノ構造体への固定用タンパク質として SA と抗 Fluorescein 抗体 (IgG) の 2 つのタンパク質を用いて複数の酵素をワンステップで導入し、異種タンパク質のより簡便な DNA ナノ構造体への導入法の構築を目指した。

### 2.1. DNA ナノ構造体の設計

DNA origami 法により、9 つのウェルが格子状に並んだ新しいデザインの DNA ナノ構造体 (DNA waffle) を設計した (Figure 1)。この DNA waffle の最大の特徴は、Scaffold strand の代わりに Fill strand (indicated as pink or blue strands in Figure 1) を加えることでウェルのサイズが可変であることであり、タンパク質に合わせて最適な大きさにすることができる。小分子をウェル周囲に 2 つ修飾することで、2 価結合でタンパク質を捉えることができ、さらにウェルの窪みにタンパク質が固定化されるため、安定にタンパク質を固定することができる。

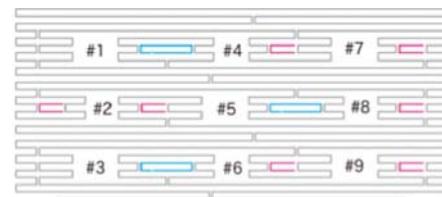
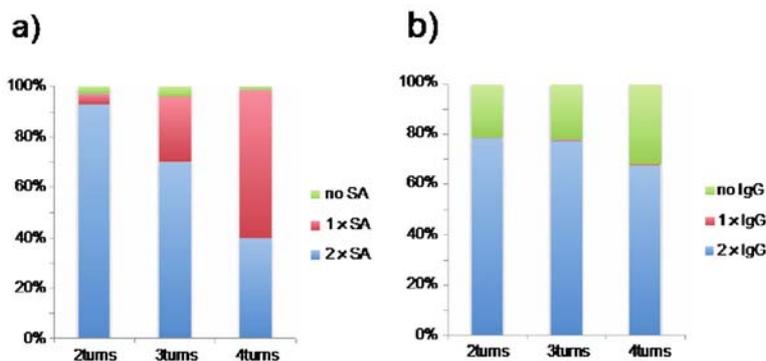


Figure 1. Folding pathway of the scaffold in the waffle-like DNA origami.

### 2.2. ウェルサイズによるタンパク質の取り込み効率の確認

まず最初に、タンパク質結合性小分子として Biotin と Fluorescein を使い、SA と IgG の 2 つのタンパク質をそれぞれアレイ化することを試みた。この 2 つのタンパク質を固定化するのに最適なウェルのサイズを決定するため、DNA らせん 2, 3, 4 ターン分の異なるサイズのウェルを Stripe パターンで DNA waffle 内に作成し、各ウェルへのタンパク質の結合性を調べた (Figure 2)。SA の 1 分子トラップ (Figure 2a, c) には 2 ターンが最適で、3 ターン、4 ターンとウェルのサイズが大きくなるに連れて、ウェルの中

に 2 分子トラップされる率が増えてくる  
ことがわかる。ウェルに導入した Biotin  
間の距離が長くなるにつれて、SA を 2 価  
結合で捉えることができなくなったため  
だと考えられる。IgG の配列化 (Figure  
4b, d) については、2 ターンウェルおよび 3  
ターンウェルで 8 割、4 ターンウェルで 7  
割の取り込み効率であった。IgG の抗原結  
合部位間の距離は 4nm-12nm 程度までフレ  
キシブルに動くため、Fluorescein 間の距  
離が長くなっても、1つのウェルに 2分子  
がトラップされることはなく、結合力が低  
下しただけに終わったことが原因である  
と考えられる。



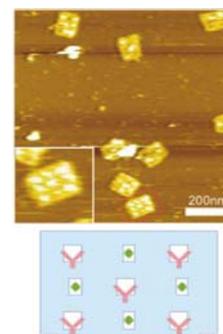
**Figure 2.** a) The yields of SA incorporation onto size-tunable wells. The sections from the top indicate the percentage of the well with no protein, one protein and two proteins, respectively. b) The yields of IgG incorporation.

### 2.3. DNA waffle 上でのタンパク質ヘテロアレイの作成

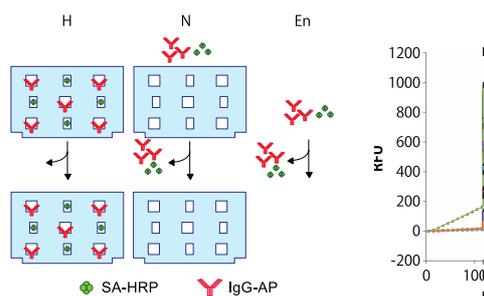
2 ターンウェルと 3 ターンウェルが混在した DNA waffle を調製して、X  
パターンでの SA と IgG のヘテロアレイを作成し、AFM によってヘテロアレイ  
化を確認した (Figure 3)。

### 2.4. 酵素ヘテロアレイの作成および酵素活性評価

Horseradish peroxidase (HRP) と Alkaline phosphatase (AP) の 2 つの  
酵素を同時にアレイ化した。酵素と SA および IgG のコンジュゲート体、  
SA-HRP および IgG-AP を用いる。DNA waffle に酵素を加え、ゲル濾過によっ  
て遊離の酵素と DNA waffle を分離し、酵素活性を測定した (Figure 4)。そ  
の際、以下の 4 つのサンプルを用意し、酵素活性を比較した。酵素のヘテロ  
アレイ (H)、タンパク質結合性小分子を導入していない DNA waffle と酵素  
の混合溶液 (N)、酵素のみの溶液 (En) と Blank 溶液である。どちらの酵素の  
活性についても、H が最も高い活性を示し、N, En, Blank はほぼ変わらない  
活性となり、DNA waffle 上にそれぞれ設計通りの相互作用を介して酵素が  
固定されていることが確認できた。



**Figure 3.** Protein nanoarray on X patterned origami motif. SA and IgG heteroarray on origami with biotin modification at the #2, #4, #6, #8 wells and fluorescein modification at the #1, #3, #5, #7, #9 wells.



**Figure 4.** Assembly of enzyme heteroarray on waffle-like DNA scaffolds and their enzymatic activity. a) Schematic illustration of the gel filtration purification. Assembly of the HRP and AP enzymes on the DNA waffle (abbreviated as H) or mixture of HRP, AP and non-modified DNA waffle (abbreviated as N). b) Time-dependent fluorescence changes of AmplexUltraRed by HRP activity. c) Time-dependent absorbance changes of pNPP by AP activity.

## 3. 結論

SA および IgG との酵素コンジュゲート体を用いることで複数の酵素をワンステップで、簡便に導入する手法を確立することに成功した。今後は基板上成長により得られた巨大二次元シート側にも酵素の固定化を試みる。

# Construction of Intelligent Soft Interface by Utilizing

## Programmed 2D Self-Assembly of DNA Strands

Akinori Kuzuya

Dept. of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University

3-3-35 Yamate, Suita, Osaka 564-8680, JAPAN

Tel.:06-6368-0829, Fax:06-6368-0829, E-mail: kuzuya@kansai-u.ac.jp

A new waffle-like DNA origami assembly with nine nanometer-scale wells in 3x3 matrix pattern has been successfully constructed and used as a scaffold for the patterning of nanomaterial. The size of the wells can be independently tuned according to the guest nanoparticle such as a protein molecule. We demonstrated that two distinct proteins, streptavidin (SA) tetramer ( $d = 5$  nm) and anti-fluorescein antibody (IgG) (inter-paratope distance; ca. 14.0 nm), were selectively captured on the size-variable wells,  $6.8 \times 12 \times 2.0$  nm well for SA and  $6.8 \times 12 \times 2.0$  nm or  $10.2 \times 12 \times 2.0$  nm well for IgG respectively, through the attachment of two biotins or two fluorescein molecules at the two edges of each well. This allowed formation of heterogeneous protein nanoarray of individual molecules. The position of SA or IgG capture can be fully controlled by placement of biotins or fluorescein in the nanoarray well. Moreover, construction of two kinds of enzyme hetero-nanoarray of horseradish peroxidase-labeled streptavidin (HRP-SA) and alkaline phosphatase-labeled anti-FITC antibody (AP-IgG) through selective attachment of biotin or fluorescein in any desired wells of such punched origami motifs is also successfully achieved. Construction of two-enzyme heteroarray was confirmed by the enzymatic activity analyses after purification of enzyme/DNA origami mixture.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

1) Akinori Kuzuya, Takahiro Yamazaki, Kohei Yasuda, Yusuke Sakai, Yusei Yamanaka, Yan Xu, Yuichiro Aiba, Yuichi Ohya, Makoto Komiyama, “Nanomechanical DNA Origami Devices as Versatile Molecular Sensors”, IEEE NEMS 2012, 405-408 (2012).

### 2. 著書・総説

1) Akinori Kuzuya, Yuichi Ohya, “DNA nanostructures as scaffolds for metal nanoparticles” Polymer J., doi: 10.1038/pj.2012.38 (2012).

### 3. 会議発表

1) 葛谷明紀、酒井雄介、山崎貴裕、徐岩、小宮山眞

“単分子ビーコンとして機能するナノメカニカル DNA オリガミデバイス”  
第 21 回バイオ・高分子シンポジウム、関西大学 (2011 年 7 月 26 日)

2) 山崎貴裕、葛谷明紀、小宮山眞

“異種のタンパク質-リガンド相互作用による DNA オリガミ上でのヘテロタンパク質ナノアレイの構築”  
第 21 回バイオ・高分子シンポジウム、関西大学 (2011 年 7 月 25 日)

3) 葛谷明紀、酒井雄介、山崎貴裕、古志直弘、山中優誠、大矢裕一、小宮山眞

“ナノメカニカル DNA オリガミデバイスのアロステリック構造制御による高感度単分子検出”  
第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、つくば国際会議場 (2011 年 9 月 12 日)

4) Akinori Kuzuya, Sakai Yusuke, Takahiro Yamazaki and Makoto Komiyama

“Nanomechanical DNA Origami Devices as Single-Molecular Visual Detectors for Various Chemical/Biochemical Targets”  
17th International Conference on DNA Computing and Molecular Programming (DNA17)、カリフォルニア工科大学 (2011 年 9 月 22 日)

5) Akinori Kuzuya, Yusuke Sakai, Takahiro Yamazaki, Yusei Yamanaka, Yan Xu, Yuichi Ohya, and Makoto Komiyama

“Nanomechanical DNA Origami Devices for Visual Detection of Biomolecules”  
「細胞を創る」研究会 4.0、大阪千里ライフサイエンスセンター (2011 年 10 月 28 日)、口頭発表

6) Akinori Kuzuya, Yusuke Sakai, Takahiro Yamazaki,  
Yusei Yamanaka, Yan Xu, Yuichi Ohya, Makoto Komiyama

“Nanomechanical DNA Origami Devices as ‘Single-Molecule Beacons’ ”  
The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2011)、北海道大学 (2011 年 11 月 9 日)

7) 北脇悠介、浜野栄美、葛谷明紀、大矢裕一

“DNA ナノ構造体で機能する新規ケミカルライゲーション法の開発”  
日本化学会第 92 春季年会、慶応大学 (2012 年 3 月 27 日)

8) 南田信哉、橋爪未来、葛谷明紀、大矢裕一

“4 つの駆動点を有する新規な可動式 DNA origami 構造体の構築”  
日本化学会第 92 春季年会、慶応大学 (2012 年 3 月 28 日)

9) 山中優誠、玉置拓也、酒井雄介、山崎貴裕、徐岩、葛谷明紀、大矢裕一、小宮山眞

“可動式 DNA origami 構造体の pH センサーへの応用”  
日本化学会第 92 春季年会、慶応大学 (2012 年 3 月 28 日)

# 機能性環状高分子ミセルの開発

研究代表者：東工大院理工・山本拓矢

連携研究者：東工大院理工・手塚育志

## 1. 緒言

環状高分子は、対応する直鎖状高分子とは『かたち』の違いから物性が異なることが知られており、学術的関心から近年様々な研究が行われている[Kricheldorf, H. R. J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. 2010, 48, 251-284]。しかし、実際のところ、『かたち』の違いによる多少の物性差（例えば、流体力学的半径比はおよそ 0.9）は現れるものの、この程度の僅かな物性差異を材料分野の応用として展開するのは難しいと考えられていた。ところが一方、自然界に目をやると『環状』の高分子構造に基づく様々な機能が進化の過程で培われ、プラスミド DNA をはじめ、環状タンパク質、環状アミロースなどが、その『かたち』に基づく特異的な効果を発現することが知られている。これは、生体物質が単一分子で機能するのではなく組織を形成していることに由来する。

我々は、好熱菌と呼ばれる一部の単細胞性の古細菌がその細胞膜に環状の脂質分子を有することで海底火山や温泉など熱水環境で生息できること[山岸明彦 宇宙生物科学, 2000, 14, 332-340]に着想を得、両親媒性の直鎖状ブロック共重合体を環状化し、直鎖・環それぞれの自己組織化体の特性を比較検討した。すると驚くべきことに、環状高分子ミセルは、直鎖のものとは比べて構造崩壊温度（曇点）が飛躍的に上昇（24 °C → 74 °C）することを見出した[Honda, S.; \*Yamamoto, T.; \*Tezuka, Y. Topology-Directed Control on Thermal Stability: Micelles Formed from Linear and Cyclized Amphiphilic Block Copolymers, J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 10251-10253.]。つまり、直鎖から環へのトポロジー変換によって、高分子の組成・化学構造や分子量およびミセルの形状やサイズに一切影響を与えることなく熱安定性が大幅に向上した。それまでの報告によれば曇点の上昇は 5 °C 程度が限界であったが[Nuopponen, M.; Kalliomäki, K.; Aseyev, V.; Tenhu, H. Macromolecules 2008, 41, 4881-4886]、前述の研究において 50 °C もの熱安定性の改善という非常に顕著な『トポロジー効果』を初めて発表した。さらに、直鎖状・環状高分子の混合比調整により、その広い範囲でのミセルの崩壊温度制御にも成功した。この現象は多岐の分野から強い興味を持たれ、化学的には同じ物質を使用しているにもかかわらず広範囲での崩壊温度制御機能は、温度応答性ドラッグデリバリーシステム（DDS）をはじめとする様々な機能材料開発につながる新技術として産業界からも注目された。

本研究課題は、上述の研究成果を発展させ高分子の『かたち』（高分子トポロジー科学）と自己組織化（超分子化学）の融合による新規複合分野の開拓を目指し、この着想に基づく分子システムの応用を探究するものである。

## 2. 研究経過

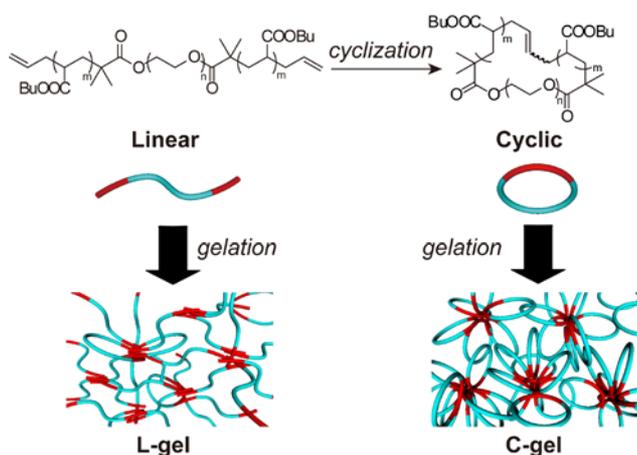
まず、種々のセグメントによる耐熱性効果を調査するため直鎖状 polystyrene-*b*-poly(ethylene oxide)-*b*-polystyrene (PS-PEO-PS) および環状 polystyrene-*b*-poly(ethylene oxide) (PS-PEO) を合成した。両末端に臭化アルキル基をもつ分子量 2000 の PEO マクロイニシエーター(1) を開始剤としたスチレンの ATRP により、両親媒性直鎖状 ABA 型 PS<sub>5</sub>-PEO<sub>46</sub>-PS<sub>5</sub> ブロック共重合体(2) を合成した (Scheme 1)。次に、得られた 2 の臭素ベンジル基末端を四塩化チタン存在下においてアリルトリメチルシランを作用させ、両末端アリル化ブロック共重合体 3 を得た。さらに、希釈条件において分子内メタセシス環化を行うことにより両親媒性環状 AB 型 PS<sub>10</sub>-PEO<sub>46</sub> ブロック共重合体(4) を合成した。次いで、ブロック共重合体 3 および 4 (10 mg) をそれぞれ THF (2 mL) に溶解し、純水 10 mL をゆっくりと滴下した後、減圧留去により THF を除去し、液量を 10 mL とすることで 1.0 mg/mL のミセル溶液を調製した。3 および 4 はいずれもおおよそ 20 nm 程度の球状のミセル構造を形成することが原子間力顕微鏡 (AFM) 観察および、動的分散 (DLS) 測定により示された。さらに、これらのミセル溶液の曇点を紫外-可視分光光度計を用いた濁度測定により求めたところ、直鎖状ブロック共重合体 3 は 33 °C、環状ブロック共重合体 4 では 72 °C となった (Figure

1)。この結果、今回の両親媒性環状PS-PEOブロック共重合体から成るミセルでも、環状構造に起因するトポロジー効果によって 40 °C に及ぶ耐熱性の向上が示された。

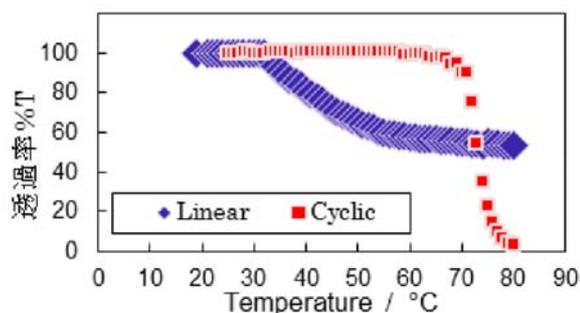
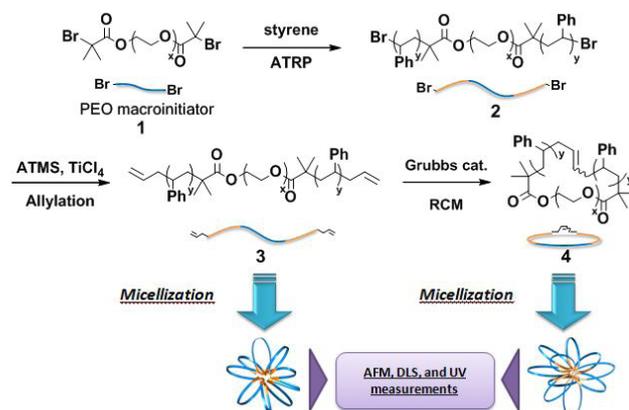
次に、耐塩性に対するトポロジー効果を評価するために、電解質を用いて塩析挙動を評価した。塩化ナトリウムをミセル溶液に添加し、UV により塩析濃度を評価したところ、直鎖状 poly(butyl acrylate)-*b*-poly(ethylene oxide)-*b*-poly(butyl acrylate) (Linear) から成る L-micelle は 110 mg/mL、一方で環状 poly(butyl acrylate)-*b*-poly(ethylene oxide) (Cyclic) からなる C-micelle では 240 mg/mL であり (Scheme 2)、それぞれ塩析に伴う透過率の減少が認められた。すなわち、『トポロジー効果』により耐塩性が二倍以上に向上することが示された。DLS 測定からも塩濃度の上昇に伴いミセルの流体力学的直径の増加が確認され、UV 測定と一致する結果が得られた。また、Linear 及び Cyclic の混合による耐塩性の制御を検討した。

続いて、Linear (10 mg) および Cyclic (10 mg) に対して水溶性蛍光分子である fluorescein sodium salt 水溶液 (FSS, 1.0 mg/mL, 30  $\mu$ L) を加え、80 °C に加熱して均一に混合することにより、FSS の包摂されたヒドロゲル (L-gel, C-gel, 25wt%) を作製した (Scheme 2)。得られたヒドロゲルの水中 (30 °C) における FSS 放出挙動を UV により評価したところ、興味深いことに L-gel では FSS 由来の 490 nm における吸収が時間の経過に伴い増加したのに対し、C-gel では吸収の増加はほとんど見られなかった (Figure 2)。すなわち、高分子トポロジーの差異に起因して、ヒドロゲル中に担持されたゲスト分子の放出が強く抑制されるという効果が見出された。また、温度依存性を調査したところ 50 °C においてそれぞれ放出速度の増加が観測された一方で、実験温度範囲において常に C-gel は FSS の放出を強く抑制していた。

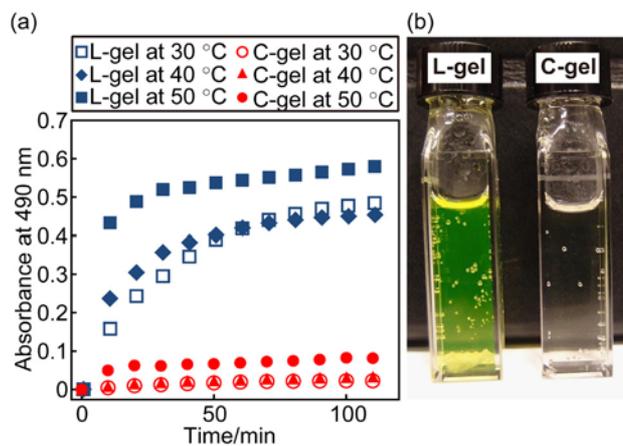
**Scheme 2.** Chemical Structures of Cyclic and Linear Amphiphilic Block Copolymers (Top) and the Schematic Representation of Hydrogels formed Therefrom (Bottom)



**Scheme 1.** Synthesis and Self-assembly of Amphiphilic Linear and Cyclic PS-PEO Block Copolymers



**Figure 1.** Turbidity measurements using a UV-vis spectrophotometer.



**Figure 2.** (a) Time-dependent release profiles of FSS recorded on UV (490 nm). (b) Photographs of FSS-loaded L-gel and C-gel in water after 180 min at 40 °C.

# Development of Functional Micelles Formed from Cyclic Amphiphilic Block Copolymers

Takuya Yamamoto

Department of Organic and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology

O-okayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8552, JAPAN

Tel: +81-3-5734-2438, Fax: +81-3-5734-2876, E-mail: yamamoto.t.ay@m.titech.ac.jp

Cyclic polymers are gaining growing interests because they are distinctive from linear and branched counterparts by the absence of chain ends, and their unique properties often rely on the particular topologies. Furthermore, cyclic block copolymers constructed by the combination of incompatible segments provide novel properties and functions by self-assembly causing the "amplification" of topology effects.

We have developed an effective homo-unimolecular cyclization process by the ring-closing metathesis (RCM) of a symmetric telechelics having olefinic groups, which can be conveniently obtainable through the end-capping reaction of a variety of living polymers. By conjunction with ATRP, the quantitative conversion of the bromo end groups into allyl functionalities on poly(acrylate)s was achieved by a reaction with allyltributylstannane (Keck allylation). The allyl-telechelics were then subjected to RCM under dilution to produce an amphiphilic cyclic diblock copolymer, poly(butyl acrylate)-b-poly(ethylene oxide), effectively. Surprisingly, a micelle formed from the obtained cyclic amphiphile exhibits a significantly enhanced thermal stability in comparison with one from the linear counterpart. This finding is regarded as the first example of an amplified topology effect of a synthetic cyclic polymer upon self-assembly. In order to promote further studies on the subject, the ATRP-RCM polymer cyclization process was to be modified to provide a variety of cyclic block copolymers having the programmed combination of segment components with narrow PDIs. In particular, amphiphilic block copolymers comprised of polystyrene components are important because self-assembled structures by linear PS-b-PEO copolymers have been extensively studied to show the formation of micelles, vesicles, and further complex aggregates. Therefore, relevant cyclic PS-b-PEO counterparts should provide unique opportunities to reveal novel topology effects upon self-assembly. However, our preliminary attempts by Keck allylation for the quantitative conversion of the bromobenzyl end groups of ATRP-based polystyrene into allyl groups were unsuccessful contrary to the case with bromoester end groups. Thus, we showed an alternative allylation process for the ATRP-based polystyrene precursor and the subsequent effective synthesis of cyclic PS-b-PEO copolymers.

A novel amphiphilic block copolymer, cyclic polystyrene-b-poly(ethylene oxide) (cyclic PS-b-PEO), was synthesized via ATRP followed by RCM. Thus, bromobenzyl-terminated PS-b-PEO-b-PS was first prepared by ATRP of styrene using a PEO macroinitiator having 2-bromoisobutyryl groups. The subsequent end-group conversion into allyl functionalities was quantitatively performed with allyltrimethylsilane (ATMS) in the presence of  $\text{TiCl}_4$ . The obtained allyl-telechelic triblock copolymer PS-b-PEO-b-PS was subjected to cyclization by intramolecular metathesis with a Grubbs catalyst 2nd generation to produce amphiphilic cyclic PS-b-PEO.

Furthermore, linear amphiphilic poly(butyl acrylate)-b-poly(ethylene oxide)-b-poly(butyl acrylate) and corresponding cyclic poly(butyl acrylate)-b-poly(ethylene oxide) were synthesized, and hydrogels (L-gel, C-gel) were formed in the presence of a fluorescein sodium salt (FSS). The release of FSS from C-gel was remarkably suppressed in comparison with that of L-gel.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

- 1) Baba, E.; Honda, S.; Yamamoto, T.; Tezuka, Y. ATRP-RCM Polymer Cyclization: Synthesis of Amphiphilic Cyclic Polystyrene-*b*-Poly(Ethylene Oxide) Copolymers, *Polym. Chem.*, 3, in press, 2012.
- 2) Sugai, N.; Heguri, H.; Yamamoto, T.; Tezuka, Y. A Programmed Polymer Folding: Click and Clip Construction of Doubly Fused Tricyclic and Triply Fused Tetracyclic Polymer Topologies, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 19694-19697, 2011.

### 2. 著書・総説

- 1) 山本拓矢、高分子の『かたち』に基づく機能発現、高分子論文集、68、550-561、2011.
- 2) 山本拓矢、手塚育志、高分子トポロジー化学：環状高分子の新規合成プロセスおよびトポロジー効果に基づく機能創出、高分子論文集、68、782-794、2011.
- 3) Yamamoto, T.; Tezuka, Y. Topological Polymer Chemistry: A Cyclic Approach Toward Novel Polymer Properties and Functions, *Polym. Chem.*, 2, 1930-1941, 2011.

### 3. 会議発表

- 1) T. Yamamoto, Micelle from a Cyclic Block Copolymer: Stabilization via the "Topology Effect", IPCG Polymer Colloid Conference 2011 (invited lecture), Jun. 30, 2011, Durham (USA).
- 2) 山本拓矢、自己組織化によるナノ構造体の構築と機能発現、分子ロボティクス研究会 2月定例研究会 (招待講演)、平成 24 年 2 月 23 日、東京
- 3) T. Yamamoto, N. Sugai, H. Heguri, K. Ishikawa and Y. Tezuka, Synthesis of Cyclic Polymers by Click Chemistry and Olefin Metathesis, 12th Pacific Polymer Conference, Nov. 16, 2011, Jeju (Korea).
- 4) S. Honda, T. Yamamoto and Y. Tezuka, Construction of an Archaeal-cell Membrane-Mimetic Micelle with a Cyclic Block Copolymer, 12th Pacific Polymer Conference, Nov. 15, 2011, Jeju (Korea).
- 5) 本多智、山本拓矢、手塚育志、環状両親媒性ブロック共重合体の構造特性を活用した外部刺激応答型ミセルの設計、第 60 回高分子討論会、平成 23 年 9 月 30 日、岡山
- 6) 馬場英輔、本多智、山本拓矢、手塚育志、両親媒性環状 PEO-PS 共重合体の合成と自己組織化、第 60 回高分子討論会、平成 23 年 9 月 28 日、岡山
- 7) 畠山史也、山本拓矢、手塚育志、親水性および疎水性環状ユニットから成る 8 の字型高分子の合成と自己組織化、第 60 回高分子討論会、平成 23 年 9 月 28 日、岡山
- 8) E. Baba, T. Yamamoto and Y. Tezuka, Synthesis and Aggregation Behavior of PEO-PS Cyclic Block Copolymers, 2011 Taiwan-Japan Bilateral Polymer Symposium, Sept. 14, 2011, Shinchu (Taiwan)
- 9) 山本拓矢、本多智、手塚育志、両親媒性ブロック共重合体の環状化による高分子ミセルの耐熱性および耐塩性の向上、第 63 回コロイドおよび界面化学討論会、平成 23 年 9 月 8 日、京都

### 4. その他

- 1) 山本拓矢、東京工業大学 平成 23 年度東工大挑戦的研究賞学長特別賞

## 研究課題名：膜エネルギー変化の制御と機能界面デザイン

研究代表者：北陸先端科学技術大学院大学・高木 昌宏

連携研究者：北陸先端科学技術大学院大学・濱田 勉

### 1. 緒言

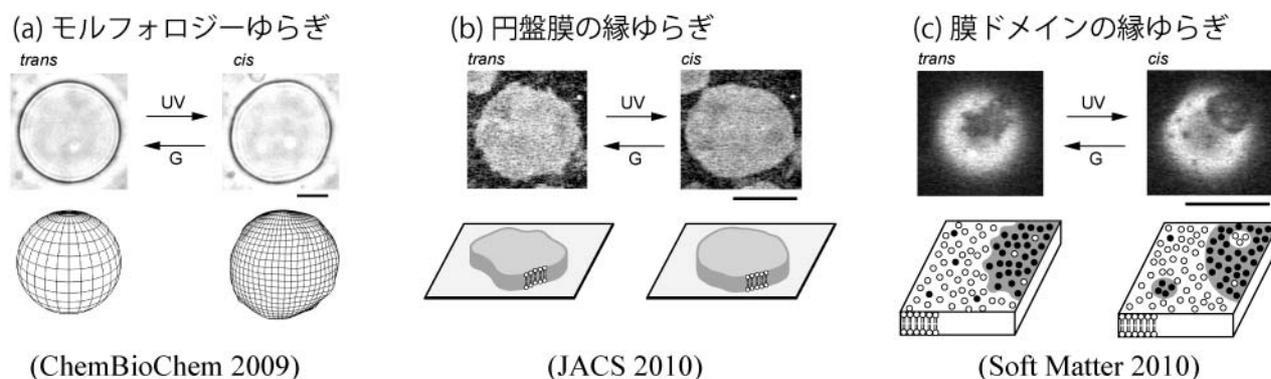
生体膜は膜分子が拡散するやわらかい界面（ソフト界面）である。疎水性相互作用により自己集合した脂質界面の特徴的なエネルギーは、熱エネルギーと同程度であるため、界面構造のゆらぎが観察される。申請者は、3つの異なるソフト界面構造（モルフォロジーゆらぎ、円盤縁ゆらぎ、ドメイン縁ゆらぎ）に着目し、膜内の分子相互作用変化が、これら膜ゆらぎを変化させることを見出している。

本研究では、3つの界面構造の解析による膜物性（弾性率、線張力、界面張力）導出法を確立し、細胞信号伝達とも密接に関わる膜ダイナミクスについて、細胞サイズリポソームを用いて解析すると同時に、新たな機能性ソフト界面の創製へと展開する。2年の研究期間内に【1】膜ダイナミクスの解析手法の確立、【2】膜ダイナミクスの非接触制御、【3】物質との相互作用と膜ダイナミクス解析に関する研究を行い、膜分子構造変化や物質との相互作用における膜エネルギー状態変化を解明し、制御可能な機能性界面のデザインへと繋げる事を目的とした。ここでは、特に【1】膜ダイナミクスの解析手法の確立、【2】膜ダイナミクスの非接触制御 に関する研究経過について報告する。

### 2. 研究経過

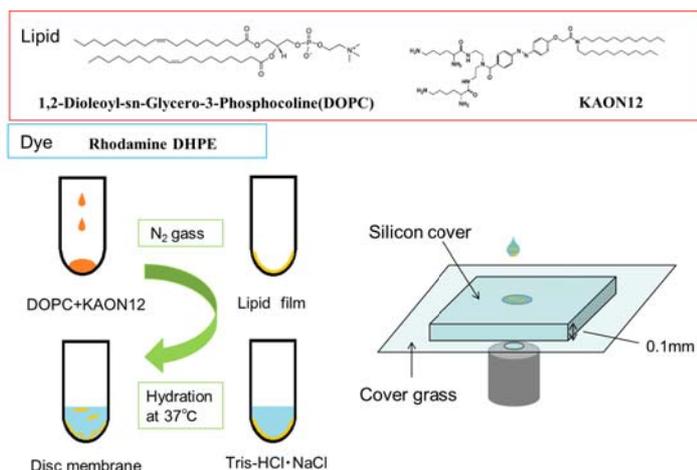
【今年度の目的】細胞膜は、細胞の内外を隔てているだけでなく、エンドサイトーシスや小胞形成など、多様でダイナミックな膜構造形成を伴って、増殖、分化、死滅など、重要な細胞信号伝達に関わっている。細胞と同程度の  $10\mu\text{m}$  スケールの人工細胞模倣膜であるリポソームは、ソフト界面であることから環境に応じた変形、融合、分裂などの膜変形を起こすことが知られており、我々は、膜構造形成やダイナミクスの解析を行っている。さらに我々は、光応答性アゾベンゼン脂質をリポソームに導入し、Disc膜を作製することでダイナミクスの光制御系の開発を行ってきた。今年度は、これらの膜ダイナミクス構造安定性の詳細を、曲率、膜ゆらぎ、電荷、サイズといった膜物性解析について議論する。

分子間力（疎水性相互作用）により自己集合した脂質界面の特徴的なエネルギーは、熱エネルギーと同程度であるため、構造のゆらぎが観察される。我々は、3つの異なる界面構造ゆらぎ（モルフォロジーゆらぎ、円盤膜の縁ゆらぎ、膜ドメインの縁ゆらぎ）に着目し（下図）、膜内の分子間相互作用変化がこれら膜ゆらぎを変化させることを見出している (Hamada et al. Soft Matter 2010)。これら3つの膜ゆらぎには、それぞれ対応する膜界面エネルギーが存在する。すなわち、ゆらぎ挙動はそのエネルギー状態（膜物性）を反映している。過去に申請者は、界面ゆらぎの一つである「円盤膜の縁ゆらぎ」解析から、対応する膜物性「線張力」を実験的に導くことに成功している (Hamada et al. JACS 2010)。この膜ゆらぎ解析技術を確立すれば、膜を場とする様々な生体分子過程の膜物性変化を求めることが可能となる（下図）。



図：脂質膜界面ゆらぎの顕微鏡像。(a)球形リポソームの形状ゆらぎ。(b)基盤表面に展開した平らな円盤膜の縁ゆらぎ。(c)脂質多成分リポソーム表面の膜ドメインの縁ゆらぎ。

## 【実験方法】



Disc 膜 は 1,2Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocoline (DOPC) とKAON12 から作製し、蛍光プローブとしてRhodamine Red™X-DHPE を用いた (DOPC 終濃度 0.2mM, 終濃度 0.001mM) (左図)。

細胞サイズリポソームは、静置水和法を用いて作製した (左図)。

倒立型顕微鏡 (IX71, Olympus)、共焦点スキャナユニット (CSU10, 横河電気)、対物レンズ (PlanApoN 60×/1.42)、カメラ (IMPACTRON CCD CAMERA, MODELADT-33B FLOVEL)、レコーダー (RD-E-300, TOSHIBA)、観察用にカバーガラスとシリコンカバーを組み合わせたシステムにより観察を行った (左上図)。

## 【結果・考察】

### ① 脂質の検討

親水基、疎水基の異なる脂質、電荷を持った脂質、それぞれに KAON12 を加え Disc 膜を作製した。結果、電荷を持たず、疎水基の炭素鎖数が 18 個の不飽和脂質である DOPC が、Disc 膜形成には、最適であることが分かったので、3 次元的な構造変化 (Disc-Sphere) 実験には、DOPC(60%)と KAON12(40%)の組み合わせを基本として用いることにした。

### ② 膜曲率ダイナミクス

Disc 膜から Sphere 膜になり再び Disc 膜に戻る過程の膜曲率ダイナミクスを測定した。同じ trans 膜においても、膜サイズが異なることでダイナミクスの速度が異なることが分かった。

### ③ 膜ゆらぎ解析

膜ゆらぎ解析より、光異性化の線張力値を求めた。trans の線張力は ( $\gamma = 9.6 \times 10^{-4}$  [pN]) cis は ( $\gamma = 1.8 \times 10^{-2}$  [pN]) となり光異性化が膜の界面線張力のスイッチングを引き起こしたことが示唆された (下図)。

### ④ 電荷の遮蔽

KAON12, 40% のとき、Disc 膜は NaCl の濃度とともに形成率が上がり、Sphere 膜が減少する結果となった。Sphere 膜だったものが Disc 膜になったことが示唆された。Disc 膜の増加は、NaCl の濃度上昇とともに顕著に表れた。KAON12 がもつ自発曲率と電荷を考慮すると、KAON12 がもつ電荷の遮蔽される割合が増え、電荷の反発がなくなる。すると脂質は自己集合をし、また、KAON12 が inverse cone の形をしていることから淵に集まりやすく、Disc 膜が形成されたと示唆される。

### ⑤ 膜サイズ依存性

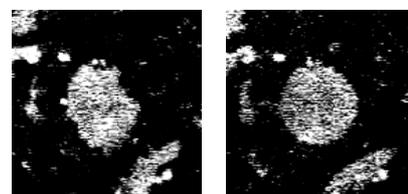
KAON12, 40%、KAON12, 30% 時の NaCl 10mM、20mM に対する膜サイズ依存性を調べた。曲げエネルギーと線張力の比より、膜サイズ依存性が存在することを明らかにした。一例を挙げると、KAON12, 30%、NaCl 10mM において、7  $\mu$ m 以上の Disc 膜は形成されなかった。

Sphere 膜も直径 10  $\mu$ m 以上は観察されず、全体として膜が小さい傾向であった。また、7  $\mu$ m 以下の Disc 膜はサイズとともに線形的な増加にならなかった。

KAON12, 30%、NaCl, 20mM も同様に Disc 膜は 6  $\mu$ m 以上 Sphere 膜は 8  $\mu$ m 以上の大きさを観察することはできなかった。

以上①～⑤の結果より、Disc 膜におけるナノ空間での膜分子反応が、光異性化や電荷の遮蔽により膜物性を変換し、細胞サイズ空間における特徴的な膜構造転移を引き起こすメカニズムを明らかにした。

今後は構造制御システムの構築に向けて、構造変化の速度論的解析を行いたいと考える。



図：基盤上での膜ゆらぎ解析

## Title: Control of membrane line tension and design of functional surface

School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology,  
1-1 Asahidai Nomi Ishikawa 923-1292 JAPAN  
+81-761-51-1650

Masahiro TAKAGI and Tsutomu HAMADA

**(Introduction)** It is important to understand the physical mechanisms that govern the dynamic motions and properties of cell plasma membranes. Liposome or phospholipid vesicles, are self-assembled colloidal particles and also a kind of soft surface. Liposomes resemble actual cell membranes in their structure and composition. Generally, liposomes with about 100nm in diameter have been used. However in that case, only indirect methods can be used for their characterization. Therefore, studies about membrane transformation can not be performed. On the other hand, giant vesicles with a diameter about 10  $\mu\text{m}$  are large enough to allow direct and real-time microscopic observations. Thus, recently, many studies using giant vesicles have been conducted to analyze the stable membrane structure and/or its changes upon exposure to external stimuli. We succeeded in controlling the membrane to give sphere, cup, bowl, and disc shapes, by the photo-switching of membrane line tension using KAON12. Light is an efficient tool for manipulating soft matter. We investigated the mechanism behind these interesting and dynamic membrane morphological changes.

**(Materials and Methods)** Photo-responsive membranes were prepared by the natural swelling method from dry lipid films. Lipid mixtures of KAON12 (reversible cis to trans photosensitive lipid) and DOPC dissolved in methanol/chloroform along with rho-PE in a glass test tube were dried under vacuum for 3 h to form thin lipid films. The films were then hydrated overnight with 10mM Tris-HCl (pH 7.4) at 37  $^{\circ}\text{C}$ . The final concentration was 0.4 mM of lipids (KAON12/DOPC) and 1mol% rho-PE. We observed changes in membrane morphology with a fluorescent microscope. Radii were measured to analyze membrane fluctuation.

**(Results and Discussion)** The fluctuation of an edge line is related to the line energy of the membrane, because the line energy is proportional to the length of the exposed edge. We analyzed fluctuation of membrane from trans membrane and cis membrane on the cover glass. The disc membrane showed a marked difference in membrane edge fluctuation between isomers. Fluctuation of the trans-membrane edge was greater than that of cis-membrane edge, indicating that photo-isomerization caused switching of the interfacial line tension of membranes. The calculated line tension of trans membranes ( $\gamma = 9.6 \times 10^{-4} [\text{pN}]$ ) was smaller than that of cis membranes ( $\gamma = 1.8 \times 10^{-2} [\text{pN}]$ ).

We also examined size dependency of membrane shape transition. Through comparison between the bending energy and line energy of membranes with different sizes, we concluded that small membranes tend to show a disc structure, whereas large membranes have a spherical shape. We investigated controllable membrane structures, such as closing and opening of vesicles. Analysis about membrane fluctuation revealed that photo-isomerization caused switching of the interfacial line tension of membranes. We found that electrostatic interaction plays an important role in the formation of a disc structure. The dependency on membrane sizes can be explained in terms of free energy of the membranes.

These results should lead to a better understanding of the mechanism of mesoscopic structures of self-assembled membranes, and may contribute wider application, such as drug-delivery systems.

Design of molecules for self-assembled mesoscopic structures with specific functions is an important and interesting challenge that spans across disciplines such as nanosciences. A closed lipid membrane is a good example of a self-assembled mesostructure. In this study, we developed controllable membrane formation by making a subtle change at the molecular level.

## 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) Masamune Morita, Tsutomu Hamada, Yuiko Tendo, Takahiro Hata, Mun'delanji C. Vestergaard, and Masahiro Takagi.  
Selective localization of Alzheimer's amyloid beta in membrane lateral compartments.  
Soft Matter, 8, 2816-2819 (2012).
- 2) Tsutomu Hamada, Hideyuki Hagihara, Masamune Morita, Mun'delanji C. Vestergaard, Yoshio Tsujino, and Masahiro Takagi.  
Physicochemical profiling of surfactant-induced membrane dynamics in a cell-sized liposome.  
J. Phys. Chem. Lett., 3, 430-435 (2012).
- 3) Tsutomu Hamada, Yuko Kishimoto, Takeshi Nagasaki, and Masahiro Takagi  
Lateral phase separation in tense membranes.  
Soft Matter, 7, 9061-9068 (2011).
- 4) Tsutomu Hamada, Ryoko Sugimoto, Takeshi Nagasaki, and Masahiro Takagi  
Photochemical control of membrane raft organization.  
Soft Matter, 7, 220-224 (2011).
- 5) Mun'delanji C. Vestergaard, Tsuyoshi Yoda, Tsutomu Hamada, Yoko Akazawa-Ogawa, Yasukazu Yoshida, and Masahiro Takagi  
The Effect of oxysterols on thermo-sensitivity of lipid vesicles.  
Biochim. Biophys. Acta, Biomembr., 1808, 2245-2251 (2011). doi
- 6) Takahiro Muraoka, Tatsuya Shima, Tsutomu Hamada, Masamune Morita, Masahiro Takagi, and Kazushi Kinbara  
Mimicking multipass transmembrane proteins: Synthesis, assembly and folding of alternating amphiphilic multiblock molecules in liposomal membranes.  
Chem. Comm., 47, 194-196 (2011).

### 2. 著書・総説

- 高木昌宏, 濱田勉, 萩原秀幸, 辻野義雄  
シーエムシー出版  
ナノ融合による先進バイオデバイス  
第2章 ナノバイオテクノロジー/第2節 巨大リポソームの界面活性剤誘起ダイナミクス  
(2011)

### 3. 会議発表 (合計 30 件: うち代表的なもの)

- (1) 濱田 勉 モデル細胞膜の構築と膜局在・膜挙動解析  
第 10 回バイオテクノロジー国際会議・バイオアカデミックフォーラム  
2011 年 6 月 29 日 東京ビックサイト
- (2) 濱田勉・宮川真紀代・レティミンフック・森田雅宗・高木昌宏  
相分離膜面におけるナノコロイド挙動 2011 年 9 月 22 日 富山大学
- (3) 辻村有香、濱田勉、高木昌宏  
光応答性リポソームの構造制御と膜ゆらぎ解析 日本物理学会・2011 年秋季大会  
2011 年 9 月 24 日 富山大学
- (4) 姫野泰輝、濱田勉、高木昌宏  
Charge-induced transition in membrane mesoscopic structures  
Phase Transition Dynamics in Soft Matter 2012 年 2 月 20 日 京都大学
- (5) 藤本理恵、濱田勉、高木昌宏  
細胞サイズ小胞内における DNA の局在と挙動  
日本化学会 第 9 2 回春季大会 2012 年 3 月 27 日 慶応義塾大学 日吉キャンパス

### 4. その他 (例えば特許など)

- 特許  
高木昌宏、濱田勉、萩原秀幸  
刺激性評価方法 (北陸先端科学技術大学院大学)  
特願 2011-110294 出願日: 2011 年 5 月 17 日

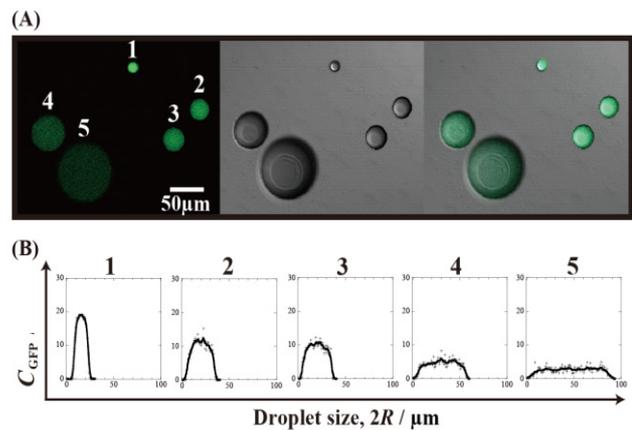
# ソフトインターフェースの分子科学

## 細胞サイズ小胞が形成するソフト界面：その特異性を活用した新奇物性

研究代表者：同志社大学生命医科学部・吉川研一

### 1. 緒言

細胞サイズ空間では、表面積/体積の比が大きくなり、界面の効果が顕著に表れる。本研究では、細胞サイズの液滴や小胞を取り上げ、 $\mu\text{m}$  スケールでのソフト界面の物理化学的特質を明らかにするとともに、微小空間での蛋白質や DNA の機能制御手法を発展させることを目的とする。我々はこれまで、脂質単分子膜で覆われた油中水滴 (Water in Oil; W/O) 系と脂質 2 分子膜小胞 (リポソーム) 系を用いて、両者を比較対比させながら、微小空間でのソフト界面の特異性に迫ってきた。地球上の生命体の基本単位は細胞であるが、その細胞は数 $\mu\text{m}$  から数十 $\mu\text{m}$  のオーダーのマイクロ空間上に、リン脂質二分子膜を主体とする閉じた膜構造をもって、外界に対して、内なる生命現象を発現している。脂質二分子膜そのものは、水中での一つの熱力学的に安定な状態であり、これまでに多くの物理化学的な研究が行われてきている。しかし、任意の濃度の生体高分子を内包した細胞サイズ小胞を作成する実験手法は最近まで知られていなかった。我々はこれを実現させる新規手法の確立をめざして研究を推進し、当初の予想を上回る成果が得られている。今回の報告では、1) 細胞サイズ液滴中のタンパク質発現反応の顕著な加速効果の発見と、2) 膜蛋白の配向方向制御実験、の二つの成果を中心に説明をしたい。



### 2. 研究経過

1) 細胞サイズ液滴内でのタンパク質合成 (DNA 発現) の顕著な加速効果 [1]

図 1 には、リン脂質 DOPG 単分子層で覆われたマイクロ水滴の内部での遺伝子発現 (GFP) を定量的に計測した結果を示した。ウサギ網状赤血球ライセートを使い、GFP の遺伝子を組み込んだプラスミドを用い、転写・翻訳により、GFP を発現させた。反応は、30 $^{\circ}\text{C}$ でおこない、共焦点顕微鏡により焦点を絞ることにより、空間上の各部位の GFP 濃度を定量的に評価した。50 時間にわたって、GFP の濃度変化を連続的に測定したところ、濃度が時間に比例して増大することがわかった。これは、反応の次数が 0 次であることを意味しており、反応基質が大過剰の実験条件を反映してい

図 1 細胞サイズ液滴内での遺伝子発現 (3 時間後)。(A)左、GFP の蛍光像、中、明視野像、右、画像の重ね合わせ。(b)液滴のサイズが小さいほど、遺伝子発現の反応が加速している。

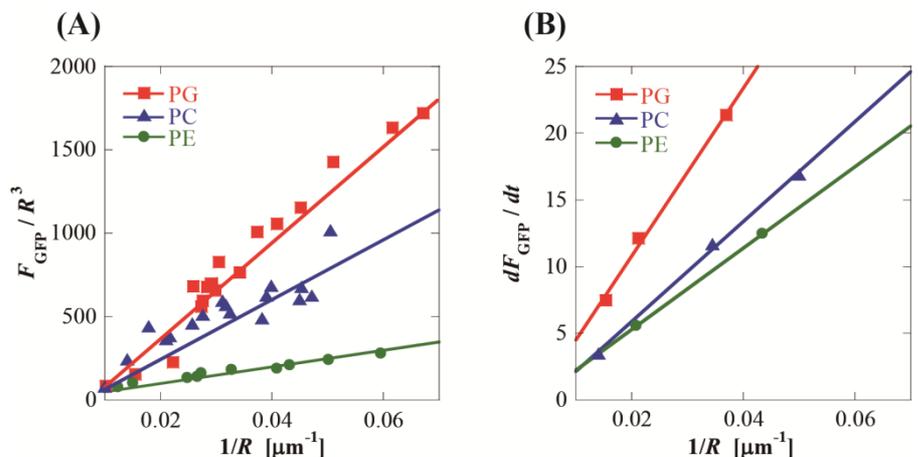


図 2 液滴の半径  $R$  に対する、(A)GFP 濃度、および、(B)発現反応速度の関係

る。このようにして求めた、反応速度定数を、液滴のサイズ（半径  $R$ ）に対してプロットしたのが図2である。 $R$  の逆数に反応速度定数が比例していることがわかる。反応物の体積に対して、液滴の表面積は、 $1/R$  に比例して変化することを考慮すると、転写・翻訳の一連の反応が膜表面上で高速度で進行していることを表している。細胞サイズ空間では、膜表面が関与して、タンパク質発現が高効率で進行しているとの今回の発見は、細胞機能の本質を理解するうえで重要であると思われる。

## 2) 細胞サイズ小胞での膜蛋白質の選択的配向：新規な実験手法 [2]

細胞サイズリン脂質小胞への膜蛋白質の再構築は、数多くの研究が行われてきているにも拘わらず、膜蛋白質の配向性を選択的に制御し得るような実験手法は未確立となっている。

我々は、図3に示すように油中水滴法を用いて細胞サイズ小胞を作成し、膜内外から膜蛋白質を直接膜挿入することで、配向方向を制御することに成功したので報告する。油中水滴法では、脂質単分子膜で囲われた液滴を、単分子層が形成された油水界面を通過して水相に移動し小胞を作成する。それゆえ、膜内外の水溶液、2分子膜内外の脂質を自由に制御できる利点を持つ。さらに、半径が $\sim 500\text{nm}$ 以下の小さなベシクルと膜蛋白質を融合させることで再構築する従来法と異なり、大きさが $5\mu\text{m}$ 以上の小胞へ挿入するため、従来法で最も支配的となる曲率効果に代わり、この新規手法では蛋白質が膜挿入される経路が重要となる。我々は、大きな親水基を持つ  $\text{K}^+$ チャネル：KcsA を小胞内外から膜挿入すると、親水基が疎水性の膜を貫通できないため、方向性挿入できることを、KcsA の活性測定から示した。実際に、親水基をカットした KcsA を膜挿入すると、ランダム配向となることから、このことを確認できた [2]。

以上のような、液滴からの細胞サイズ小胞の構築手法を応用することにより、KcsA 以外の膜蛋白質であっても、例えば親水性物質を付与することによって膜への挿入経路を制御し、配向性を制御できるようになるものと期待される。また、それぞれの膜蛋白質が好む脂質を含んだ多成分小胞を作成し、相分離によってドメインを形成させた後に方向性挿入すれば、膜蛋白質を特定の部位に集積させることができ、より実際の細胞に近い細胞モデルとして、高次の機能を発現させるようにすることも可能となるであろう。

## 文献

- [1] A. Kato, M. Yanagisawa, Y. Sato, K. Fujiwara and K. Yoshikawa, *Scientific Reports*, **2**, 283/1–5 (2012)
- [2] M. Yanagisawa, M. Iwamoto, A. Kato, K. Yoshikawa, and S. Oiki. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**(30), 11774–11779 (2011).

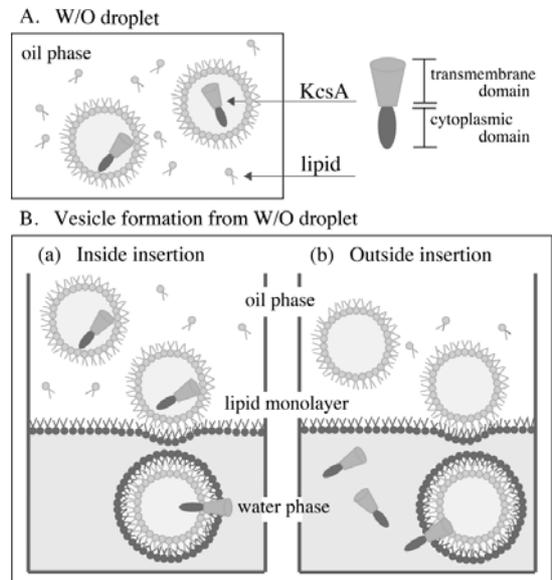


図2. 油中水滴法を用いることによる、リン脂質小胞への KcsA の挿入と配向性の特異的制御を示す模式図

- A) 脂質層で覆われた液滴内への閉じ込め。  
B) a)内側、b)外側から小胞への方向性挿入。

# Physico-Chemical and Biological Specificity of Soft-Interface in a Cell-Sized Confinement

Kenichi Yoshikawa

Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University

Kyotanabe, 610-0394, Japan

Tel, 0774-65-6243; Fax, 0774-65-6019; E-mail, keyoshik@mail.doshisha.ac.jp

## 1. Introduction

All of the living cells maintain their lives by using closed membranes with phospholipids, ranging in size from 1 to 100  $\mu\text{m}$ . To gain insight into the effect of cell-sized confinement, many studies have been performed to abstract the essential feature of living cells. However, it has been rather difficult to evaluate the confinement effect in a quantitative manner, due to the technical difficulties of encapsulating desired amounts of proteins, DNA and substrates within a size-sized space. In the present paper, we will describe recent advancement toward the understanding of physical and biological necessarily on the cell-sized space for the lives on the earth.

## 2. Specific localization of genomic DNA accompanied by its structural transition

Fig. 1 exemplifies the segregation between DNA and actin in a crowded environment on the scale of living cells. We observe these proteins in an aqueous sphere covered by phospholipid membrane. It is found that DNA molecules are depressed onto the membrane surface by keeping elongated conformation. It has also become clear that, by the change of the environmental factor such as concentration of magnesium ion, genomic DNA exhibits discrete conformational transition from compact state onto an elongated conformation accompanied by its localization at the membrane interface. Interestingly, all-or-none switching of the transcriptional activity is generated through the above mentioned transition of the conformation and the localization.

## 3. Acceleration of protein synthesis in smaller environment<sup>1</sup>

We have examined the effect of confinement on the efficiency of gene expression, by adapting aqueous droplets with the diameter of 100–10 $\mu\text{m}$  coated by phospholipid in an oil phase. We monitored the GFP concentration produced through gene expression inside the droplets. It is found that the concentration of synthesized GFP is larger in smaller droplets. From systematic studies, we have confirmed that the rate of the GFP synthesis is inversely proportional to the diameter of the droplets.

## 4. Real-world modeling of living cell

We will discuss the future extension on the studies of cell-sized microspheres, i.e., micro-droplets and giant liposomes. It will be stressed that these micro-spheres serve as good model to understand the intrinsic features of living cells.

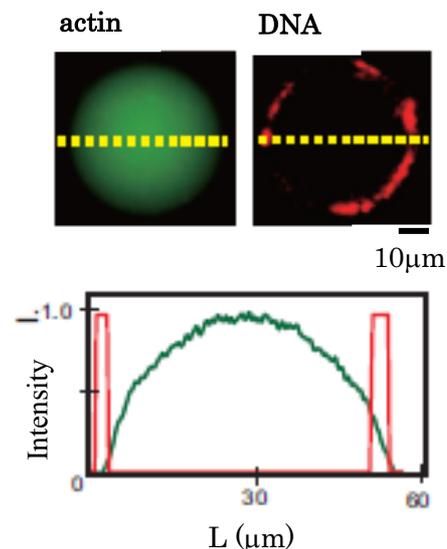


Fig. 1 Segregation between actin and DNA in a cell-sized sphere covered by phospholipid, as observed by fluorescence microscopy.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

- 1) Y. Sumino, K. H. Nagai, Y. Shitaka, D. Tanaka, K. Yoshikawa, H. Chaté, K. Oiwa, Large-scale vortex lattice emerging from collectively moving microtubules, *Nature* 483, 448–452, 2012
- 2) T. Tsuruyama, W. Liu, K. Yoshikawa, In Vitro Murine Leukemia Retroviral Integration and Structure Fluctuation of Target DNA, *PLoS ONE*, 7, e31533, 2012
- 3) A. Kato, M. Yanagisawa, Y. T. Sato, K. Fujiwara, K. Yoshikawa, Cell-Sized confinement in microspheres accelerates the reaction of gene expression, *Scientific Reports*, 2, 283, 2012
- 4) M. Yanagisawa, N. Shimokawa, M. Ichikawa, K. Yoshikawa, Micro-segregation induced by bulky-head lipids: formation of characteristic, *Soft Matter*, 8, 488-495, 2012
- 5) K. Hirano, M. Ichikawa, T. Ishido, M. Ishikawa, Y. Baba, K. Yoshikawa, How Environmental Solution Conditions Determine the Compaction Velocity of Single DNA, *Nucleic Acids Research*, 40, 284-289, 2012
- 6) Y. Suzuki, Y. Yoshikawa, S. H. Yoshimura, K. Yoshikawa, K. Takeyasu, Unraveling DNA dynamics using atomic force microscopy, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 3, 574-588, 2011
- 7) M. Yanagisawa, M. Iwamoto, A. Kato, K. Yoshikawa and S. Oiki, "Oriented reconstitution of a membrane protein in a giant unilamellar vesicle: Experimental verification with the potassium channel KcsA", *J. Amer. Chem. Soc.*, 133(30), 11774–11779 (2011)

### 2. 著書・総説

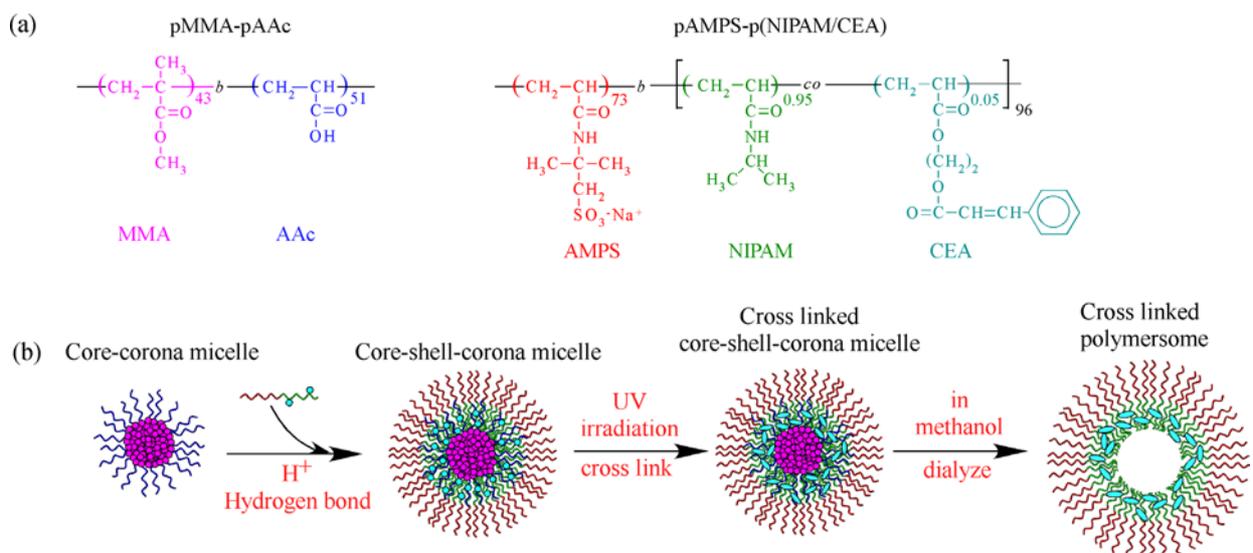
吉川 研一, 岩城 貴史 著, “細胞の自己組織化”に物理の視点から迫る”, *パリティ*, 26(5), 13-21 (2011).

### 3. 会議発表

- 1) K. Yoshikawa, “Real-World Modeling on Hierarchical Dynamics of Living Matter”, International Conference on Hierarchical Structures in Complex Fluids. 平成 23 年 7 月 5 日 (北京、中国)
- 2) K. Yoshikawa, “Non-Turing Scenario on Spatio-Temporal Structure Formation”, 7<sup>th</sup> International Conference on Biological Physics”, 平成 23 年 6 月 22 日 (San Diego, USA)
- 3) K. Yoshikawa, “Cross-Talk between Life science and Physics: Real-World Modeling of Cell”, Cycle de Conférences, JSPS Strasbourg, 平成 23 年 9 月 12 日 (Strasbourg, France)
- 4) K. Yoshikawa, “Interface between Living Cell and Droplet: Specificity on Cell-Sized Confinement”, 1<sup>st</sup> Softinterface International Minisymposium, 平成 24 年 3 月 19 日 (Tsukuba, Japan).
- 5) K. Yoshikawa, “Phase Transition of Genomic Giant DNA”, Phase transition Dynamics in Soft Matter: Bridging Microscale and Mesoscale, 平成 24 年 2 月 20 日 (Kyoto, Japan)
- 6) K. Yoshikawa, “Spontaneous Mode Selection of Self-Motile Object under Chemical Nonequilibrium”, Symposium of 50 year on Chaos, International Union of Theoretical and Applied Mechanics(IUTAM), 平成 23 年 12 月 2 日

## 1. 緒言

ポリマーソームとは内部に空孔を有する中空のポリマー微粒子であり、中空構造なので散乱特性、断熱性、分散性、隠蔽性、内部空孔への化学物質の取り込みなどの機能を持たせることが可能である。したがってポリマーソームは有機顔料、樹脂改質（軽量化）、断熱材、半導体、マイクロリアクター、ドラッグデリバリーシステムなど様々な分野への応用展開が期待される<sup>1)</sup>。ポリマーソームの合成方法は鑄型粒子を用いる交互積層法<sup>2)</sup>、両親媒性高分子の自己組織化による方法<sup>3)</sup>、乳化重合を利用する方法<sup>4)</sup>などさまざまな方法が用いられる。本研究ではポリマーソームを合成する方法として、鑄型に高分子ミセルを用い、水素結合により鑄型の表面にポリマーを吸着して合成する方法を試みた<sup>5,6)</sup>。またポリマーソームのシェルに下限臨界溶液温度 (LCST) を示すことで知られているポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) (pNIPAM) を用いることで、ポリマーソームへの温度応答性の付与を検討した<sup>7)</sup>。シェルの架橋にはシナモイルの光二量化反応を用いることを試みた<sup>8)</sup>。



**Figure 1.** (a) Chemical structures of diblock copolymers and (b) synthesis method of polymersome.

まず疎水性のポリメタクリル酸メチル (pMMA) ブロックと親水性のポリアクリル酸 (pAAc) ブロックから成る両親媒性のジブロック共重合体 (pMMA-pAAc) と親水性で側鎖にスルホネート基を持つポリ (2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホネート) (pAMPS) ブロックと温度応答性の *N*-イソプロピルアクリルアミド (NIPAM) と光架橋性のシナモイル基を側鎖結合したアクリレート型モノマー (CEA) をランダムに含むブロック (p(NIPAM/CEA)) からなるジブロック共重合体 (pAMPS-(NIPAM/CEA)) を可逆的付加-開裂連鎖移動 (RAFT) 型の制御ラジカル重合法で合成した (Figure 1a)。これらのポリマーを用いたポリマーソームの合成手順を Figure 1 に示す。まず pH 3 の水中で pMMA-pAAc の高分子ミセルを形成し、この溶液に pAMPS-p(NIPAM/CEA) を添加する。高分子ミセル表面の pAAc のカルボキシル基と pAMPS-p(NIPAM/CEA) の pNIPAM のアミド基が水素結合を形成するために、コア-シェル-コロナ型ミセルを形成する。この状態で UV 照射によりシェルに含まれるシナモイル基を光二量化させること

でシェルを架橋する。さらに架橋後の溶液をメタノールに対して透析することで、鑄型の高分子ミセルを除去して、感温性のシェルを持つポリマーソームの合成を試みた。

## 2. 研究経過

まず各ポリマーの合成を行った。ジチオベンゾエト型の連鎖移動剤、メタクリル酸メチル、AIBN をジオキサン中、アルゴン雰囲気下 60°C で 18 時間重合を行い、再沈殿で pMMA 高分子型連鎖移動剤を回収した ( $M_n$  (NMR) =  $4.58 \times 10^3$ ,  $M_w/M_n = 1.02$ , 重合度 (DP) = 43)。次にこの連鎖移動剤を用いてアクリル酸を重合することで、鑄型を形成する両親媒性ジブロック共重合体 (pMMA-pAAc) を合成した ( $M_n$  (NMR) =  $8.26 \times 10^3$ ,  $M_w/M_n = 1.09$ , DP = 51)。

次にトリチオカルボネート型連鎖移動剤、AMPS、水溶性ラジカル重合開始剤 (V-501) を水に溶解し、アルゴン雰囲気下 70°C で重合を行った。重合反応終了後、透析を行い pAMPS 高分子型連鎖移動剤を回収した ( $M_n$  (NMR) =  $1.71 \times 10^4$ ,  $M_w/M_n = 1.27$ , DP = 73)。次に pAMPS 高分子型連鎖移動剤、NIPAM、2-ヒドロキシエチルアクリレート (HEA)、V-501 をエタノールと水の混合溶媒に溶解して、アルゴン雰囲気下 70°C で重合を行った。重合反応終了後に、透析を行い pAMPS-p(NIPAM/HEA) を回収した ( $M_n$  (NMR) =  $2.79 \times 10^4$ ,  $M_w/M_n = 1.42$ , DP(NIPAM) = 91, DP(HEA) = 5)。得られたポリマーを脱水 DMSO 中で塩化シンナモイルと反応することで、HEA 側鎖のヒドロキシル基にシンナモイル基を導入して pAMPS-p(NIPAM/CEA) を合成した ( $M_n$  (NMR) =  $2.86 \times 10^4$ ,  $M_w/M_n = 1.39$ )。反応後のポリマーは透析により精製を行った。可視-紫外吸収 (Figure 2) および NMR スペクトルからシンナモイル基は定量的に導入されたことを確認した。

pMMA-pAAc を pH 3 の 0.1 M 食塩を含む水に溶解して動的分散 (DLS) 測定を行い、流体力学的半径 ( $R_h$ ) を求めると 19 nm だった。これは疎水性ブロックの pMMA がコアを形成し、その周囲を親水性の pAAc シェル鎖が覆った形のコア-シェル型の高分子ミセルを形成していることを示唆する。また、pAMPS-p(NIPAM/CEA) の水中での  $R_h$  は 6 nm と小さな値が観測されたので、ポリマー間での会合は起こらないことがわかった。これら pMMA-pAAc および pAMPS-p(NIPAM/CEA) の水溶液を混合すると、 $R_h$  は 30 nm 程度まで増加した。これは、鑄型となる pMMA-pAAc の高分子ミセルのシェル鎖の pAAc のカルボン酸に pAMPS-p(NIPAM/CEA) 中の pNIPAM 鎖のアミド基が水素結合により吸着したために、 $R_h$  が増加したと考えられる。今後、光照射によりシェルを架橋して透析で鑄型ミセルを除去することで、感温性ポリマーソームを合成する予定である。

## 3. 参考文献

- 1) Wei, H.; Wu, D.; Chang, C.; Zhou, J.; Zhang, X.; Zhou, R. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 15329-15334.
- 2) Qui, W.; Yan, X.; Duan, L.; Cui, Y.; Yang, Y.; Li, J. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1212-1216.
- 3) Wittemann, A.; Azzam, T.; Eisenberg, A. *Langmuir* **2007**, *23*, 2224-2230.
- 4) Kamio, E.; Yonemura, S.; Ono, T.; Yoshizawa, H. *Langmuir* **2008**, *24*, 13287-13298.
- 5) Bian, F.; Liu, M. *Euro. Polym. J.* **2003**, *39*, 1867-1874.
- 6) Yusa, S.; Shimada, Y.; Mistukami, Y.; Yamamoto, T.; Morishima, Y. *Macromolecules* **2003**, *36*, 4208-4215.
- 7) Heskins, M.; Guillet, J. E. *J. Macromol. Sci. Chem.* **1968**, *A2*, 1441-1455.
- 8) Guo, A.; Liu, G. J.; Tao, J. *Macromolecules* **1996**, *29*, 2487-2493.

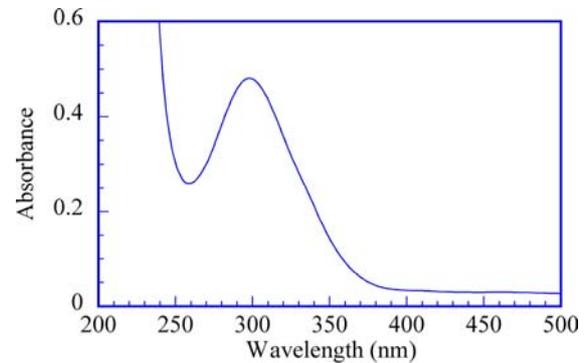


Figure 2. UV-vis spectrum for pAMPS-p(NIPAM/CEA).

# Preparation of Cross-linked Polymersome Having Highly Functional Thermo-responsive Soft 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

Polymersomes are polymer particles having hollow core structure. It can be incorporated various kinds of guest molecules into the hollow core. Polymersomes can be prepared using various methods such as self-organization of amphiphilic polymers, emulsion polymerization, layer-by-layer methods. In this study, we tried to prepare hollow particles using template polymer micelles. Furthermore, thermo-responsive properties were introduced in the shell of the polymersome. It is known that poly(*N*-isopropylacrylamide) (pNIPAM) indicates the lower critical solution temperature (LCST) in water. Therefore, the cross-linked pNIPAM was used as a shell of the polymersome.

Firstly, the diblock copolymers were prepared via reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) controlled radical polymerization technique. Dithiobenzoate type chain transfer agent (CTA), methyl methacrylate, AIBN were dissolved in dioxane. The solution was degassed by purging with argon gas, and heated at 60 degrees for 18 h. The polymer was purified by reprecipitations to obtain poly(methyl methacrylate) (pMMA) macro-CTA. The number-average molecular weight ( $M_n$ ) and molecular weight distribution ( $M_w/M_n$ ) were summarized in Table 1. Acrylic acid was polymerized using pMMA macro-CTA to obtain amphiphilic diblock copolymer (pMMA-pAAc) via RAFT radical polymerization.

**Table 1. Number-Average Molecular Weight and Molecular Weight Distribution of the Polymers**

Sample	$M_n \times 10^{-4}$		$M_w/M_n$
	GPC	NMR	
pMMA <sub>43</sub>	0.58	0.48	1.02
pMMA <sub>43</sub> -pAAc <sub>51</sub>	0.79	0.83	1.09
pAMPS <sub>73</sub>	2.13	1.71	1.27
pAMPS <sub>73</sub> -p(NIPAM/HEA) <sub>96</sub>	2.35	2.79	1.42
pAMPS <sub>73</sub> -p(NIPAM/CEA) <sub>96</sub>	2.23	2.86	1.39

Trithiocarbonate type CTA, 2-acrylamido-2-methylpropane sulfonate (AMPS), radical initiator (V-501) were dissolved in pH 7 aqueous solution, which was degassed by purging with argon gas and polymerized at 70 degrees to obtain pAMPS macro-CTA. NIPAM, 2-hydroxyethyl acrylate (HEA), V-501 were dissolved in mixed solvent of ethanol and water. The solution was degassed by purging with argon gas, and heated at 70 degrees. The polymer was purified by dialysis against pure water to obtain pAMPS-p(NIPAM/HEA). pAMPS-p(NIPAM/HEA) and cinnamoyl chloride were dissolved in DMSO, and the cinnamoyl groups were introduced into the pendant hydroxyl groups in the diblock copolymer to obtain pAMPS-p(NIPAM/CEA). The reaction was completely proceeded confirmed by UV-vis absorption and <sup>1</sup>H NMR spectra.

The hydrodynamic radius ( $R_h$ ) of amphiphilic diblock copolymer, pMMA-pAAc in 0.1 M NaCl aqueous solution at pH 3 was 19 nm, which indicates that the diblock copolymer formed core-shell type polymer micelles composed of hydrophobic pMMA core and hydrophilic pAAc shells. The  $R_h$  value of pAMPS-p(NIPAM/CEA) was 6 nm, which indicates that the diblock copolymer dissolved in water as a unimer state. When the aqueous solutions of pMMA-pAAc and pAMPS-p(NIPAM/CEA) were mixed, the  $R_h$  value increased to be ca. 30 nm. This observation indicated that pAMPS-p(NIPAM/CEA) was attached to the surface of the template pMMA-pAAc polymer micelles to form core-shell-corona micelles, because of hydrogen bonding interactions between pNIPAM and pAAc. We have already confirmed that pNIPAM and pAAc homopolymers in acidic water forms multi-polymer aggregates, because the pendant amide groups in pNIPAM and the pendant carboxylic acid groups in pAAc were interacted with hydrogen bonding. We plan to cross-link the shell of the core-shell-corona micelle by UV-irradiation because of photodimerization of cinnamoyl groups in the shell layer. The template micelles can be removed by dialysis against organic solvent to prepare polymersome having thermo-responsive shell.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

- 1) S. Fujii, K. Aono, M. Suzaki, S. Hamasaki, S. Yusa, Y. Nakamura, "pH-Responsive hairy particles synthesized by dispersion polymerization with a macroinitiator as an inistab and their use as a gas-sensitive liquid marble stabilizer", *Macromolecules*, **45**, 2863-2873 (2012).
- 2) M. Sasidharan, N. Gunawardhana, N. Gunawardhana, H. N. Luitel, T. Yokoi, M. Inoue, S. Yusa, T. Watari, M. Yoshio, T. Tatsumi, K. Nakashima, "Novel LaBO<sub>3</sub> hollow nanospheres of size 34 ± 2 nm templated by polymeric micelles", *Journal of Colloid and Interface Science*, **370**, 51-57 (2012).
- 3) J. Liu, M. Sasidharan, D. Liu, Y. Yokoyama, S. Yusa, K. Nakashima, "Novel MoO<sub>3</sub> and WO<sub>3</sub> hollow nanospheres assembled with polymeric micelles", *Materials Letters*, **66**, 25-28 (2012).
- 4) M. Sasidharan, H. N. Luitel, N. Gunawardhana, M. Inoue, S. Yusa, T. Watari, K. Nakashima, "Synthesis of magnetic α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> hollow nanospheres for sustained release of ibuprofen", *Materials Letters*, **73**, 4-7 (2012).
- 5) B. P. Bastakoti, S. Guragain, Y. Yokoyama, S. Yusa, K. Nakashima, "Synthesis of hollow BaSO<sub>4</sub> nanospheres templated by core-shell-corona type polymeric micelles", *New Journal of Chemistry*, **36**, 125-129 (2012).
- 6) S. Yusa, "Self-assembly of cholesterol-containing water-soluble polymers", *International Journal of Polymer Science*, **36**, Article ID 609767 (2012).
- 7) M. Sasidharan, K. Nakashima, N. Gunawardhana, T. Yokoi, M. Ito, M. Inoue, S. Yusa, M. Yoshio, T. Tatsumi, "Periodic organosilica hollow nanospheres as anode materials for lithium ion rechargeable batteries", *Nanoscale*, **3**, 4768-4773 (2011).
- 8) T. Patel, G. Ghosh, S. Yusa, P. Bahadur, "Solution behaviour of poly(*N*-isopropylacrylamide) in water: effect of additives", *Journal of Dispersion Science Technology*, **32**, 1111-1118 (2011).
- 9) H. Liu, D. Chaudhary, S. Yusa, M. O. Tadé, "Preparation and characterization of sorbitol modified nanoclay with high amylose bionanocomposites", *Carbohydrate Polymers*, **85**, 97-104 (2011).
- 10) M. Umeki, Y. Daiko, S. Yusa, A. Mineshige, M. Kobune, T. Yazawa, "Surface-modified tubular glass electrolyte for portable direct methanol fuel cell", *Chemistry Letters*, **40**, 603-605 (2011).
- 11) M. Sasidharan, K. Nakashima, N. Gunawardhana, T. Yokoi, M. Inoue, S. Yusa, M. Yoshio, T. Tatsumi, "Novel titania hollow nanospheres of size 28 ± 1 nm using soft-templates and their application for lithium-ion rechargeable batteries", *Chemical Communications*, **47**, 6921-6923 (2011).
- 12) S. Yusa, Y. Shimada, T. Imae, Y. Morishima, "Self-association behavior in water of an amphiphilic diblock copolymer comprised of anionic and dendritic blocks", *Polymer Chemistry*, **2**, 1815-1821 (2011).
- 13) F. Goto, K. Ishihara, Y. Iwasaki, K. Katayama, R. Enomoto, S. Yusa, "Thermo-responsive behavior of hybrid core cross-linked polymer micelles with biocompatible shells", *Polymer*, **52**, 2810-2818 (2011).
- 14) S. Yusa, S. Awa, M. Ito, T. Kawase, T. Takada, K. Nakashima, D. Liu, S. Yamago, Y. Morishima, "Solubilization of C<sub>60</sub> by micellization with a thermoresponsive block copolymer in water: Characterization, singlet oxygen generation, and DNA photocleavage", *J. Polym. Sci.: Polym. Chem.*, **49**, 2761-2770 (2011).
- 15) M. Inoue, S. Fujii, Y. Nakamura, Y. Iwasaki, S. Yusa, "pH-responsive disruption of "liquid marbles" prepared from water and poly(6-(acrylamido)hexanoic acid)-grafted silica particles", *Polym. J.*, **43**, 778-784 (2011).
- 16) A. Ghosh, S. Yusa, H. Matsuoka, Y. Saruwatari, "Non-surface activity and micellization behavior of cationic amphiphilic block copolymer synthesized by reversible addition - fragmentation chain transfer process", *Langmuir*, **27**, 9237-9244 (2011).
- 17) S. Kousaka, M. Ito, S. Yusa, "Photo-induced association behavior of poly(sodium acrylate) bearing a small amount of malachite green", *J. Polym. Sci.: Polym. Chem.*, **49**, 4586-4593 (2011).
- 18) S. Fujii, M. Suzaki, Y. Kakigi, K. Aono, S. Yusa, Y. Nakamura, "Dispersion polymerization using hydroxy-functional macroazoinitiators as an inistab", *J. Polym. Sci.: Polym. Chem.*, **49**, 1633-1643 (2011).
- 19) M. Ito, R. Enomoto, K. Osawa, Y. Daiko, T. Yazawa, S. Fujii, Y. Yokoyama, Y. Miyanari, Y. Nakamura, A. Nakao, Y. Iwasaki, S. Yusa, "pH-responsive flocculation and dispersion behavior of Janus particles in water", *Polym. J.*, **66**, 181-188 (2011).

### 2. 著書・総説

- 1) 遊佐真一, 「循環する化学の面白さ」, *化学と工業*, **64**, 896 (2011).
- 2) 遊佐真一, 「水溶性ブロックコポリマーの会合体形成と制御」, *機能材料 (CMC 出版)*, **30**, 54-61 (2011).

### 3. 会議発表

- 1) S. Yusa, "Synthesis of well-defined amphiphilic diblock copolymers having biocompatible phospholipid polymer sequences (招待講演), the 102nd AOCS Annual Meeting, Ohio (アメリカ), 2011年5月1-4日.

研究代表者：慶應義塾大学理工学部・栄長泰明

## 1. 緒言

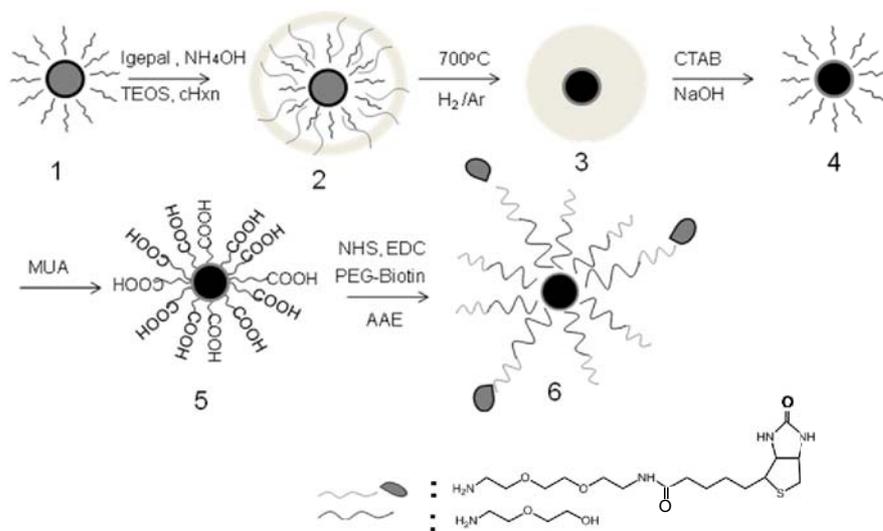
磁性や超伝導を示すナノ粒子は、次世代の記録材料をはじめとして多くの応用の可能性を秘めており、盛んに研究開発が行われている。そのような中、これらの物理特性に加えて、新たな付加価値をもつ高機能性のナノ粒子を創製することは、新たな応用の可能性を広げる点で意義深いといえる。これまで我々は、「光機能化」という観点で、磁性微粒子の直接の界面化学修飾[1]や、逆ミセルの反応場を利用した機能性ナノ粒子の作製[2]に成功してきた。

そこで本研究では、これらの考え方を「ソフト界面構築」という観点で捉えることにより、これまでに報告例のない「室温強磁性ナノ粒子の界面機能化によるバイオ応用できる新規な磁性微粒子」の創製や、新しい「光機能をもつ超伝導体の創製」を目指した新しいシステムを創製することを目的とした。

## 2. 研究経過

### バイオ応用可能な室温強磁性ナノ微粒子

「磁性微粒子」は、高密度磁気記録媒体としてのみならず、MRI造影剤、磁気温熱療法をはじめとするバイオ分野への応用も期待される。なかでも、例えば特異的な分子との反応を実現するための微粒子表面への化学修飾や、微粒子を水分散させるための水溶性化などの「磁性微粒子の高機能化」は、次世代の機能材料として有益である。しかしながら、界面機能を効率的に付与するために磁性粒子をナノサイズ化する必要があるが、例えばバルク状態では強磁性を示す材料をナノサイズ化することにより超常磁性を示すことで磁性そのものを有効に活用できない場合などが問題となっている。そこで本研究では、室温にて強磁性を示すナノサイズの磁性体界面に「ソフト界面を構築すること」で強磁性ナノ粒子の高機能化を目指した。具体的には、室温強磁性を示すFePtナノ粒子のMRI造影剤や磁気温熱療法応用へ向けた機能化を目指し、水分散可能な室温強磁性FePtナノ粒子を経て、図のスキームにより、ビオチンを修飾した室温強磁性FePtナノ粒子を作製した。はじめにfcc構造をもつFePtナノ粒子をシリカによりコーティングし、焼成することで室温にて高保磁力をもつL<sub>1</sub>0構造のFePtナノ粒子を合成した。さらに、塩基によりシリカを溶解する際に設計した分子



さらに、塩基によりシリカを溶解する際に設計した分子

図 ビオチン修飾FePtナノ粒子とその磁気特性(室温)

を表面修飾することで最終的にビオチンを修飾した微粒子を作製した。その結果、平均粒径 5.2 nm、300 Kにおける保磁力 16 kOe をもつ微粒子を作製することに成功し (図)、さらに、HABA/avidin結合アッセイ法により、ビオチンの分子認識能を確認するとともに、ビオチンの修飾量を 154.2  $\mu\text{mol/g}$  と見積もることができた[3]。

### 光機能をもつ超伝導体の創製

微粒子の高機能化の一つとして、超伝導特性を可逆に光制御できるナノ粒子の創製を試みた。これまで、超伝導体に光照射を行って超伝導特性を消失させた例はあるが、可逆に光制御できる「光超伝導体」は我々の報告の一例[4] しかない。

そこで本研究では、超伝導を示す微粒子を作製し、界面フォトクロミック分子で修飾することによる光機能化を目指した (図)。

その準備として、はじめに、高温超伝導を示す  $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-\delta}$  (YBCO) の微粒子化を行った。キトサンをテンプレートとして用いることで、高温超伝導をもつ YBCO ナノ粒子を合成することに成功した (図)。バルクの YBCO と比べて超伝導転移温度が低下し

(それぞれ 92K, 88K)、YBCO のナノ粒子化を確認した。さらに、キトサンテンプレートを溶解させ、アゾベンゼン誘導体を表面修飾させたところ、超伝導転移温度はさらに低下し (83K)、表面修飾による効果であると考えられる。今後、この粒子の光応答性を調べるとともに、表面修飾の効果が構造的なものか、電子状態の変化によるものかなどについて詳細に検討する。

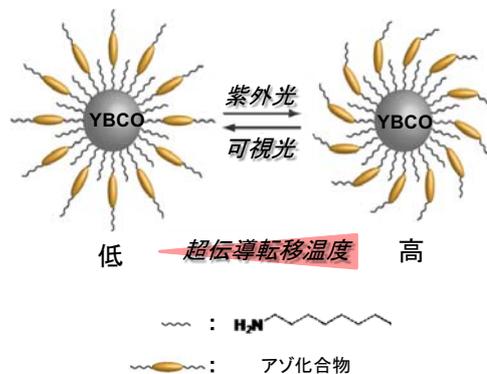
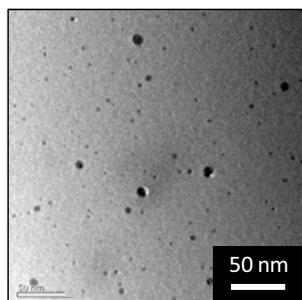


図 超伝導特性を示す YBCO ナノ粒子をアゾ化合物で修飾

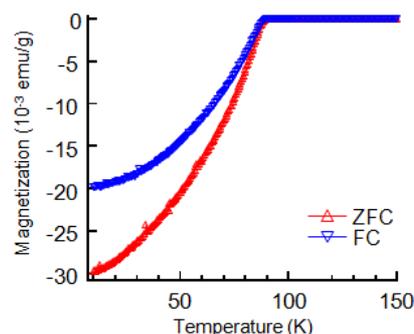


図  $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-\delta}$  (YBCO) ナノ粒子とその磁化

### 参考文献

- (a) M. Suda, M. Nakagawa, T. Iyoda, Y. Einaga, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5538 (2007).  
 (b) M. Suda, N. Kameyama, M. Suzuki, N. Kawamura, Y. Einaga, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 160 (2008).  
 (c) M. Suda, N. Kameyama, A. Ikegami, Y. Einaga, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 865 (2009).  
 (d) M. Suda, Y. Einaga, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 1754 (2009).
- (a) M. Taguchi, I. Yagi, M. Nakagawa, T. Iyoda, Y. Einaga, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 10978 (2006).  
 (b) M. Taguchi, K. Yamada, K. Suzuki, O. Sato, Y. Einaga, *Chem. Mater.*, **17**, 4554 (2005).
- A. W. Indriarningsih, M. Suda, Y. Heta, K. Suzuki, Y. Einaga, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **84**, 873 (2011).
- A. Ikegami, M. Suda, T. Watanabe, Y. Einaga, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 372 (2010).



## 業績リスト

### 1. 原著論文

- 1) A. W. Indrianingsih, M. Suda, Y. Heta, K. Suzuki, Y. Einaga, "Surface Modification of Ferromagnetic L10 FePt Nanoparticles Using Biotin-Avidin as Biomolecular Recognition Probes", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **84**, 873-877 (2011).
- 2) Y. Sakamoto, Y. Oba, H. Maki, M. Suda, Y. Einaga, T. Sato, M. Mizumaki, N. Kawamura, M. Suzuki, "Ferromagnetism of Pt nanoparticles induced by surface chemisorption", *Phys. Rev. B.*, **83**, 104420-1-13 (2011).

### 2. 著書・総説

なし

### 3. 会議発表

- 1) Yasuaki Einaga, "Photochromic Magnetic Nanomaterials.", Russian-French Symposium on Organic Photochromism, Chernogolovka, Russia, Oct. 6-8, 2011. (招待講演)
- 2) Yasuaki Einaga, "Photochromic Magnetic and Superconducting Nanomaterials.", 2nd Bilateral Workshop between Xi'an Jiaotong University and Keio University, Yokohama, Nov. 17, 2011. (招待講演)
- 3) 栄長泰明「室温にて光制御できる磁性材料」日本MRS学術シンポジウム 2011年12月20日 横浜(招待講演)
- 4) Yasuaki Einaga, "Photo-controllable magnetic and superconducting materials", PITTCON 2012, Orlando, USA, March 13, 2012. (招待講演)
- 5) 栄長泰明「ソフト界面構築による強磁性ナノ粒子の機能化」日本化学会第92春季年会 2012年3月28日 横浜(依頼講演)

### 4. その他

栄長泰明 花王研究奨励賞「界面の化学制御を利用した光制御可能な磁性材料の開発」 2011年5月

## 泡の安定性制御を可能とする刺激応答性ヘアリー粒子の創出

研究代表者：大阪工大工・藤井秀司

連携研究者：甲南大理工・村上 良

連携研究者：大阪工大工・中村吉伸

### 1. 緒言

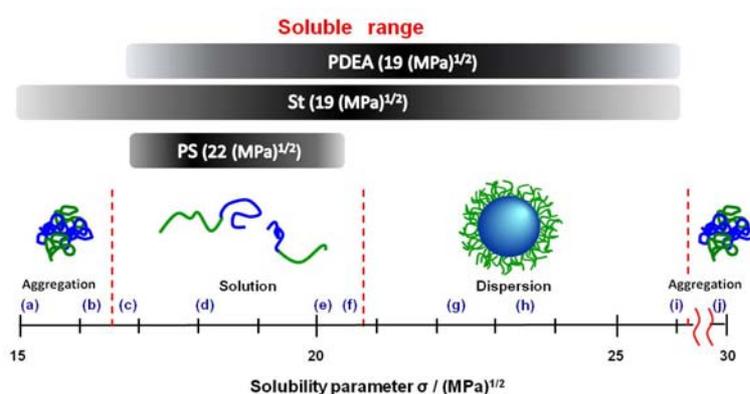
気液界面に粒子が吸着することにより安定化された泡（微粒子安定化泡）は、分子レベルの泡安定化剤では実現できない異型の泡の作製が可能であること、長期保存安定性が得られることから、学術、工業両分野で注目されている。微粒子安定化泡の歴史は古く、一世紀以上も前に Ramsden によって鉄粒子が水媒体中で泡を安定化することが報告され、その後、微粒子で安定化された泡を利用し有用鉱物粒子を回収する浮遊選鉱技術の開発へと繋がり、1950-1960年代に理論が体系化されている。しかしながら、浮遊選鉱で研究対象となる鉱物粒子は、形状、大きさ、表面化学が不均一で、厳密な泡の評価が困難、再現性が低いといった問題を抱えており、学術研究を行う対象としては限界があった。また、これまでのところ、研究対象となる粒子はハード表面を有する無機粒子が主であり、ソフト表面を有する高分子微粒子を用いた研究例は殆ど報告されていない。

本研究においては、外部刺激により親疎水性が変化するヘアーを有する刺激応答性高分子微粒子を重合法により合成し、次いで粒子表面と気液界面との相互作用に関する基礎的知見を蓄積することで、安定性制御可能な高分子微粒子安定化泡系についての基礎概念の構築を行う。1年間の研究実施期間において、(1) pH 刺激によって表面の親水性、疎水性のコントロールが可能な刺激応答性ヘアリー高分子微粒子の創出および評価、(2) ヘアリー粒子を安定化剤として使用した泡の安定化、および外部刺激による安定性制御について検討したので、その成果について報告する。

### 2. 研究経過

#### 2-1. 刺激応答性ヘアーを有する高分子微粒子の創出

pH 応答性高分子である poly[2-(diethylamino)ethyl methacrylate] (PDEA) が粒子表面にヘアーとして生えたポリスチレン粒子(PDEA-PS粒子)を、PDEAベースの高分子アゾ開始剤 (PDEA-MAI)を用いたスチレンのフリーラジカル重合により合成した。PDEAは弱塩基であり、pH 7以下の水媒体にはポリマー中のアミノ基がプロトン化することで溶解するが、pH 8以上の塩基性媒体中では、PDEAはほぼ電荷を失い疎水性が高くなり、析出し沈殿を形成する。重合媒体の溶解度パラメーター(SP)値が重合生成物の形態に与える影響について検討した結果 (Fig. 1)、PDEAとスチレンが溶解し、PSが溶解しないSP値を  $22.3 (\text{MPa})^{1/2}$  から  $26.0 (\text{MPa})^{1/2}$  に有する媒体では、数平均粒子径が約 100 nm サイズの比較的単分散な粒子が生成した。重合前はPDEAとスチレンが溶解した均一系であり、重合の進行とともにPDEA-PSブロックポリマーが生成する。溶媒に不溶のPSブロックが自己組織化のドライビングフォースとなり、生成物は粒子形態をとったと考えられる。PDEA成分



**Fig. 1** Relationship between SP values and morphologies of PDEA<sub>60</sub>-PS products. SP values for solvents: (a) heptane ( $15.1 (\text{MPa})^{1/2}$ ), (b) *n*-dodecane ( $16.2 (\text{MPa})^{1/2}$ ), (c) cyclohexane ( $16.8 (\text{MPa})^{1/2}$ ), (d) toluene ( $18.2 (\text{MPa})^{1/2}$ ), (e) cyclohexanone ( $20.3 (\text{MPa})^{1/2}$ ), (f) 1,4-dioxane ( $20.5 (\text{MPa})^{1/2}$ ), (g) *n*-amylalcohol ( $22.3 (\text{MPa})^{1/2}$ ), (h) IPA ( $23.5 (\text{MPa})^{1/2}$ ), (i) ethanol ( $26.0 (\text{MPa})^{1/2}$ ) and (j) ethylene glycol ( $29.9 (\text{MPa})^{1/2}$ ).

は媒体に可溶なため分散安定剤として機能し、PS粒子に分散安定性を付与していると期待できる。一方、PDEA、スチレンモノマー、PSポリマーのすべてが溶解するSP値が 16.8 から 20.5 (MPa)<sup>12</sup>の媒体では生成物は溶液状態で得られ、また、すべて溶解しないethylene glycol媒体では凝集体が得られた。さらに、PDEA-MAIと低分子アゾ開始剤である 2,2'-azobis[2-methyl-N-(2-hydroxyethyl)propionamide]を併用することで、数平均粒子径が 88 nmから 463 nmの範囲で粒子径の制御に成功した。

赤外分光測定により、生成粒子は PS と PDEA から成ることを確認し、X 線光電子分光測定、および元素分析の結果から、生成粒子表面に PDEA が局在化していることを明らかにした。さらに、ゼータ電位測定、および原子間力顕微鏡測定から、粒子表面に存在する PDEA は、酸性媒体中では水和し、ヘアーとして媒体中に溶解しているが、塩基性媒体中では媒体中に溶解していないことを確認した。

## 2-2. 刺激応答性ヘアリー微粒子を安定化剤として用いた泡の安定性制御

PDEA-PS粒子水分散体のpHを 3~10 に調整し、起泡性および泡の安定性の評価を行った (Fig. 2)。PDEAのpK<sub>a</sub> 7.3 より高いpHでは、起泡性が高く、1か月以上安定な泡が生成した。これは、アルカリ水溶液中において、PDEA鎖のアミノ基はプロトネーションしておらず粒子表面が疎水的になり、空気と親和性を示す粒子が気液界面に吸着したためだと考えられる。また、pK<sub>a</sub>付近のpH 7 およびpH 6 では、24時間は安定であるが1週間後には崩壊する泡が生成した。アルカリ条件下で作製した泡と比べ安定性が低いのは、PDEA鎖のアミノ基が 77~97 %プロトネーションすることにより粒子表面の親水性が比較的高くなり、気液界面における吸着エネルギーが低下したためだと考えられる。一方、pK<sub>a</sub>よりも低いpH 5 以下では、DEAユニットのプロトネーションする割合が 99.7 %以上になり、粒子表面の親水性が非常に高くなるため粒子は水中に分散するのみで、泡は生成しなかった。続いて、pH 6 およびpH 9 において生成した泡をSEM観察し、泡の構造評価を行った (Fig. 2)。pH 6 で作製した泡の断面図から、PDEA-PS粒子がバイレイヤーを形成していることが確認された (Fig. 3 (a))。pH 6 において、水中に単粒子状態で分散している粒子が気液界面に単層吸着し、その単層同士が乾燥した際に隣接したため、バイレイヤーになったと考えられる。また、pH 9 で作製した泡の断面図から、PDEA-PS粒子がマルチレイヤーを形成していることが確認された (Fig. 3 (b))。pK<sub>a</sub>より高いpH 9 では、PDEA鎖のアミノ基はプロトネーションしておらず、粒子表面が疎水的になり粒子は凝集している。この凝集体が気液界面に吸着し泡を安定化するため、泡同士隣接した部分がマルチレイヤーを形成したと考えられる。また、粒子水分散体のpHを塩基性 (pH 9)から酸性 (pH 4)、再び塩基性に戻すpHサイクルを行うことで、泡のpH応答性を評価した結果、消泡と起泡の繰り返しが少なくとも5回は可能であった。以上の結果より、pH刺激により安定性を制御可能な高分子微粒子安定化泡の創出に成功したと言える。

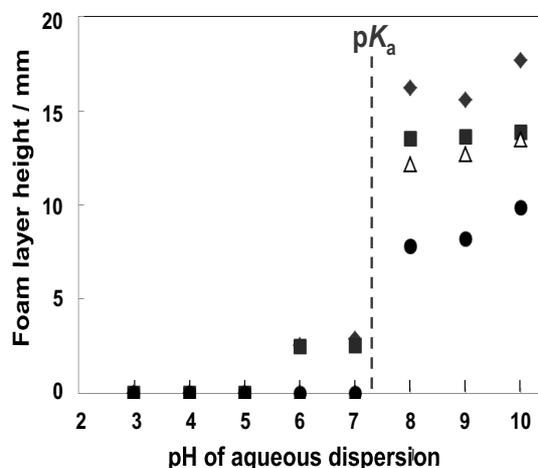


Fig. 2 pH-Dependent behavior of foams prepared using PDEA<sub>60</sub>-PS particles (5.0 wt%, 0.1 M NaCl). Height of the foam layer versus pH of the aqueous dispersion recorded at different times: immediately after preparation (◆), after 24 hours (■), after 1 week (△) and after 1 month (●).

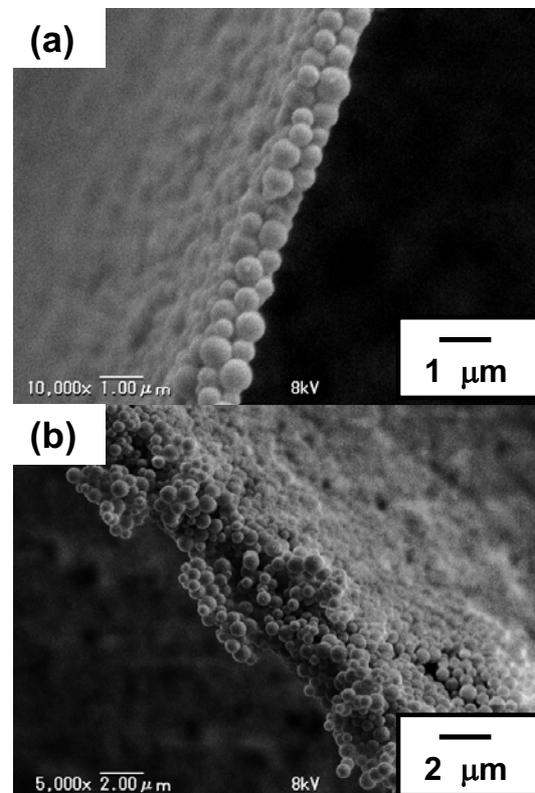


Fig.3 SEM images of cross section of foams stabilized with the PDEA<sub>60</sub>-PS latex particles (5.0 wt%, 0.1 M NaCl) at (a) pH 6.0 and (b) pH 9.0.

## pH-Responsive Aqueous Foams Stabilized by Hairy Latex Particles

Syuji Fujii<sup>1</sup>, Ryo Murakami<sup>2</sup>, Yoshinobu Nakamura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology

<sup>2</sup>Department of Chemistry of Functional Molecules, Konan University

5-16-1 Ohmiya, Asahi-ku, Osaka 535-8585, Japan

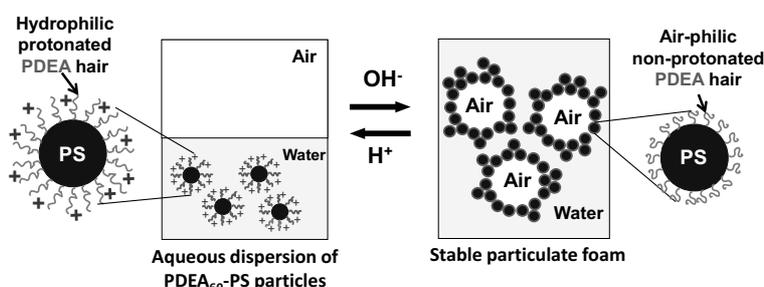
Tel: +81-6-6954-4274, Fax: +81-6-6957-2135, E-mail: s.fujii@chem.oit.ac.jp

It has been known that finely divided particles can stabilize liquid foams by adsorbing to gas-liquid interfaces. The adsorption of particles at an air-water interface is critically dependent on the hydrophobicity of the particle, which can be quantified by the contact angle,  $\theta$  (measured through aqueous phase). The angle  $\theta$  increases with an increase of the hydrophobicity of the particle. The energy  $\Delta G$ , required to remove a spherical particle from an air-water interface is at a maximum when  $\theta = 90^\circ$ . For the

submicrometer-diameter particles used in the present study,  $\Delta G$  is several orders of magnitude greater than the thermal energy. Therefore, the particles are in effect irreversibly bound, in marked contrast to surfactant molecules that adsorb and desorb reversibly, and foams stabilized by particles of appropriate wettability at the air-water interface exhibit excellent long-term stability. On the other hand, the adsorption energy of particles at air-water interface with a contact angle near  $0^\circ$  is so low that the particles cannot form stable foams and aqueous particle dispersions are obtained.

Based on the findings shown above, we aimed to construct particulate foam systems, whose stability can be controlled by external stimuli, such as pH and temperature. In order to accomplish such foam systems, latex particles carrying soft stimuli-responsive hair on their surfaces were utilized as foam stabilizer. Here, hydrophobicity of the particle surface can be controlled by external stimuli. The contact angle of the particles and consequently the energy required to remove particles from the air-water interface is modified in this way, leading to desorption. Thus, external stimuli led to the complete defoaming of air-in-water foams when using stimuli-responsive particulate foam stabilizers.

In the first year of this project, we synthesized polystyrene (PS) latex particles carrying pH-responsive poly[2-(diethylamino)ethyl methacrylate] (PDEA) hair with narrow molecular distribution ( $M_w/M_n < 1.2$ ) (PDEA-PS particles) as a model particulate foam stabilizer, and evaluate their ability as a pH-responsive particulate foam stabilizer and acid-induced defoaming agent (Scheme 1). Submicrometer-sized PDEA-PS particles were successfully synthesized by dispersion polymerization and it was confirmed that the number-average particle diameter and coefficient of variation were 413 nm and 14.1%, respectively. Elemental microanalysis indicated that the percentage mass of PDEA loading in the PDEA-PS particles was 2.78%. The aqueous electrophoresis and wet atomic force microscopy studies indicated that PDEA hair on the latex surface showed pH-responsive characters. The characterizations of the PDEA-PS particles were conducted with the aid of Prof. S. Yusa (Hyogo U.). The performance of PDEA-PS latex particles as a pH-dependent and pH-responsive particulate foam stabilizer was evaluated. The PDEA-PS particles can stabilize aqueous foams for at least 1 month, at and above pH 8.0, whereas no foam was formed at and below pH 5.1 where the particles are colloidally stable and positively charged. At pH 6.1 and 7.1, relatively stable foams can be prepared that survive for at least 24 h. The critical minimum pH required for stable particle-stabilized foams correlates closely with the  $pK_a$  value of 7.6 for PDEA chains. The particle-stabilized foams were stable and retained their three-dimensional structure even after drying. SEM examination of the dried foams suggested that flocculated PDEA-PS particles were adsorbed at the air-water interface for the foam prepared at pH 9.0. For the foam prepared at pH 6.1, well-defined particle bilayers were observed, which indicates the bubbles were stabilized with PDEA-PS particle monolayers adsorbed at the air-water interface. Defoaming can be simply achieved by decreasing the pH of the system after foamation.



**Scheme 1** Application of PS particles carrying PDEA hair as a pH-responsive particulate foam stabilizer.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

- 1) H. Hamasaki, N. Fukui, S. Fujii, S. Yusa, Y. Nakamura “Sterically stabilized polypyrrole-palladium nanocomposite particles synthesized by aqueous chemical oxidative dispersion polymerization” *Colloid and Polymer Science* (2012) DOI: 10.1007/s00396-012-2646-6
- 2) S. Fujii, K. Aono, M. Suzaki, S. Hamasaki, S. Yusa, Y. Nakamura “pH-Responsive hairy particles synthesized by dispersion polymerization with a macroinitiator as an inistab and their use as a gas-sensitive liquid marble stabilizer” *Macromolecules* 45 (6), 2863–2873 (2012)
- 3) S. Fujii, M. Mochizuki, K. Aono, S. Hamasaki, R. Murakami, Y. Nakamura “pH-Responsive aqueous foams stabilized by hairy latex particles” *Langmuir* 27(21), 12902-12909 (2011)
- 4) S. Fujii, M. Suzaki, S. P. Armes, D. Dupin, S. Hamasaki, K. Aono, Y. Nakamura “Liquid marbles prepared from pH-responsive sterically-stabilized latex particles” *Langmuir* 27(13), 8067-8074 (2011)
- 5) S. Fujii, M. Suzaki, Y. Kakigi, K. Aono, S. Yusa, Y. Nakamura, “Dispersion polymerization using hydroxy-functional macroazoinitiators as an inistab” *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 49(7), 1633-1643 (2011)
- 6) M. Ito, R. Enomoto, K. Osawa, Y. Daiko, T. Yazawa, S. Fujii, Y. Yokoyama, Y. Miyanari, Y. Nakamura, A. Nakao, Y. Iwasaki, S. Yusa "pH-Responsive flocculation and dispersion behavior of Janus particles in water" *Polymer Journal* 44, 181-188 (2012)

### 2. 著書・総説

- 1) 藤井秀司 第3章“微粒子安定化泡”  
微粒子安定化エマルジョン・フォーム ～その生成メカニズム、物理・化学的特性と応用～  
(野々村美宗 監修) 情報機構社 (分担) 印刷中
- 2) 藤井 秀司 “気液界面吸着粒子の材料化学への展開”  
日本接着学会誌 47(2), 67-76 (2011)
- 3) 藤井 秀司 “機能性高分子微粒子で安定化された分散系：泡、水滴”  
粉体工学会誌 48(2), 90-94 (2011)

### 3. 会議発表

- 1) 「粒子と空気と水しか使用しない泡、リキッドマーブルは環境に優しい」  
環境エネルギー研究センター講演会 (招待講演) 2012/1/19 (兵庫県立大学)、口頭
- 2) 「機能性高分子微粒子の合成、評価、応用」  
新化学技術推進協会 先端化学・材料技術部会 新素材分科会 (招待講演) 2011/11/30、口頭
- 3) 「機能性高分子微粒子の創出」  
大阪大学グローバル COE プログラム 次世代電子デバイス教育研究開発拠点  
(招待講演) 2011/9/2 (大阪大学)、口頭
- 4) 「Aqueous Foams Stabilized by pH-responsive Hairy Latex Particles」  
12th International Symposium on Biomimetic Materials Processing (招待講演) 2012/1/25  
(Nagoya U.), oral
- 5) 「ソフト界面への微粒子吸着現象を利用した気-液分散系の安定化」  
日本化学会第 92 春季年会「特別企画」48-ソフト界面を活かした先端化学 (特別企画講演)  
2012/3/25～2012/3/28 (慶應義塾大学)、口頭
- 6) 「機能性高分子微粒子の界面吸着現象を利用した分散系の安定化」  
第 138 回東海高分子研究会講演会 主題＝ 高分子がつくる機能性ソフトマテリアル (招待講演)  
2011/12/10 (三重大学)、口頭
- 7) 「気液界面に吸着した機能性高分子微粒子が拓く材料化学：泡・水滴」  
第 60 回高分子学会年次大会 (若手招待講演)  
2011/5/25 ～ 2011/5/27 (大阪)、口頭

### 4. その他

#### 解説文

藤井 秀司 “機能性高分子微粒子で安定化されたリキッドマーブル”  
*高分子* 60 巻 5 月号 311-312 (2011)

## 1. 緒言

種々合成されている自己組織化ナノ材料を既存の機器と接続して利用するためには、それらを基板上に合目的に集積化する必要がある。特に、生体等のソフトな材料との接触界面で機能するようなデバイスを作製する上では、マイルドな条件かつ自己組織化ナノ材料を傷つけないようなエッチング手法が望まれる。本研究では、生分解性高分子の自己組織的配列制御と高分子加水分解酵素による分解を融合したバイオエッチング手法を開発し、ソフトマテリアル表面をナノスケールでパターン化する。そして、加工によって形成されたナノアレイ構造内に酵素等の機能性マテリアルを集積化することを目指している。特に、バイオエッチングで作製した表面に機能性分子を集積化する手法として、我々は酵素がもつ基質結合能を利用することを考えている。そこで本年度は、多糖類分解酵素のもつ基質結合部位が基質に結合する際の力を評価することで、酵素の結合能を見極めることを目的に、原子間力顕微鏡 (AFM) のフォースカーブ測定によってキチナーゼの基質結合力を解析した。

## 2. 研究経過

平衡系で成立する酵素の基質結合であれば、水晶振動子マイクロバランス (QCM) や表面プラズモン共鳴 (SPR) で分子間相互作用を解析することが可能である。しかし本研究で対象とした超好熱菌由来のキチナーゼは、ほぼ不可逆的に基質結合し、QCM や SPR で基質結合を解析することは困難である。そこで本研究では、AFM の探針に *Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来の耐熱性キチナーゼの基質結合部位を固定化し、キチンに対する基質結合力を AFM フォースカーブ測定により求めた。また、セルロースに対する結合力も評価することで、本キチナーゼの分子認識に関する知見を得ることを試みた (図 1)。本酵素は、2つの触媒部位 (CatDA、CatDB)、および3つの基質吸着部位 (ChBD1、ChBD2、ChBD3) の合計5つのドメインから構成されている。したがって、3つの ChBD を介してキチン表面に結合し、2つの CatD でキチン分解反応を触媒すると理解されている。しかし、それぞれの ChBD がどの程度の力で結合するのか、また加水分解反応時にどのような役割を果たしているのかの詳細は不明である。そこで、AFM 探針にそれぞれ ChBD1 と ChBD2 を固定化し、AFM で基質結合力を評価した。

ヒスチジンタグを N 末端側に付加した組換え ChBD を大腸菌内に生産させた。まず、非特異的吸着を抑制するため、ヘキサエチレングリコールを含有する分子で AFM 探針を修飾した。その後、ニトリロ三酢酸およびニッケルを介して、ヒスチジンタグのついた ChBD を AFM 探針に固定化した。以上の反応の進行は、二次元金基板を同一の方法で表面修飾し、高感度反射赤外分光光度計 (FT-IRRAS) で確認した。キチンあるいはセルロースをシリコン基板上に固定化し、0.1M Tris-HCl (pH=7.5) 緩衝溶液を満たした溶液セル中で AFM フォースカーブ測定を行った。

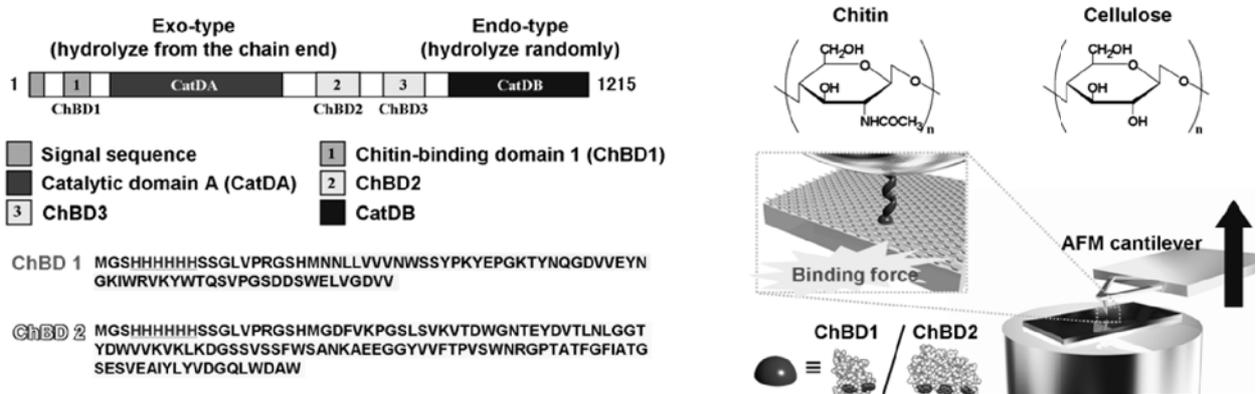


図1 (左) *T. kodakarensis* KOD1 由来キチナーゼのアミノ酸配列、(右) キチンおよびセルロースの化学構造と AFM フォースカーブ測定の模式図。

まず、キチンに対する基質結合力を調べた。コントロールとして化学修飾のみを施し、酵素の付いていない AFM 探針でも測定を行った。その結果、酵素が固定化されていない AFM 探針を用いた場合には非特異的相互作用が抑制され、相互作用に由来するピークがほとんど検出されなかった。一方で、ChBD1 あるいは ChBD2 を固定化した AFM 探針では、フォースカーブ中に複数の相互作用に起因するピークが検出された。数 100 回以上の測定を行い、ヒストグラム解析から単一の基質結合力を求めた。負荷速度が 2nN/s のとき、ChBD1 は約 60 pN、ChBD2 は約 90 pN でキチンとの結合が破断することがわかった。すなわち、ChBD2 は ChBD1 に比べて約 1.5 倍の力で結合していることが明らかとなった。したがって、ChBD1 と ChBD2 はキチン分解に際して異なる役割を果たしていることが示唆された。

次いで、キチンとは側鎖構造が異なるセルロースに対する ChBD2 の基質結合力を評価した。再度、負荷速度を 2nN/s とし、フォースカーブ測定を数百回繰り返した。上述のキチンに対するフォースカーブ測定と同様に、リガンドのみでは相互作用力が検知されず、ChBD2 を固定化した際に相互作用力に由来する極小ピークが認められた (図 2)。ヒストグラム解析を行うことで、ChBD2 とセルロース間に働く相互作用力は約 90 pN であることが明らかとなった (図 3)。したがって、負荷速度が同一であれば、キチンあるいはセルロースのいずれに対しても ChBD2 は、ほぼ同一の力 (約 90 pN) で結合することがわかった。本結果から、キチンとセルロースの側鎖よりは、ピラノース環と ChBD2 の表面に露出した芳香族アミノ酸との疎水性相互作用が主な相互作用の要因であると考えられた。

最後に ChBD2 に関して、負荷速度を様々に変えてキチンあるいはセルロースに対する基質結合力を評価した。上述のフォースカーブ測定、およびヒストグラム解析を繰り返すことで、各負荷速度に対する基質結合力を求めたところ、基質結合力は負荷速度に依存して変化することがわかった。そこで、Bell-Evance のモデルにしたがって、解離速度定数 ( $k_{off}$ ) および有効結合長 ( $x_{\beta}$ ) を算出した。その結果、キチンあるいはセルロースのいずれに対しても、ほぼ同一の  $k_{off}$  および  $x_{\beta}$  を ChBD2 は与えることがわかった。したがって、ChBD2 はほぼ同一の結合様式で両基質に結合していることが示唆された。

本年度に得られた酵素と基質間の相互作用に関する情報を元に、基板上への機能性分子群集積化に向けた研究を展開していく予定である。

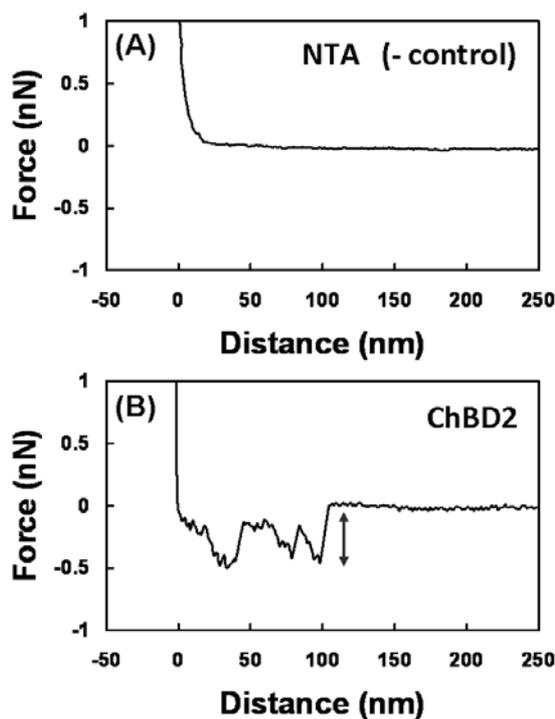


図 2 (A) リガンドのみ、あるいは (B) ChBD2 を固定化した探針でセルロースに対して測定した代表的なフォースカーブ。

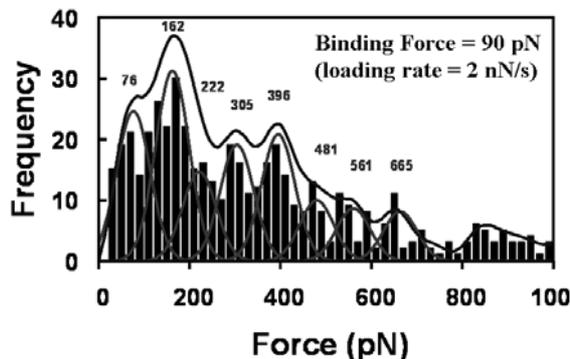


図 3 負荷速度 2nN/s のときの ChBD2 のセルロースに対する基質結合力を集めたヒストグラム。周期的に現れている局所ピークの差が、単一の基質結合力に相当する。

Yoshihiro Kikkawa

Electronics and 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

Controlled integrations and arrangements of functional molecular assemblies on a surface would provide the effective use of their nanofunctions. In this context, we are trying to develop the bioetching technique to fabricate nano-alloy structures on a biodegradable polymeric surface, and to integrate functional nano-materials in a desired way. As for the accumulation of nanomaterials, substrate specificity and binding ability of enzyme is attractive. Therefore, analysis of binding force of enzyme is crucial for the realization of such assemblies on a polymeric surface through specific binding interaction. In this study, we focused on the chitinase binding onto the polysaccharide surface, and studied on the different types of chitin-binding domains (ChBD1 and ChBD2) of the multidomain chitinase from a hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1. The interaction forces of individual ChBDs onto chitin surface were measured by using atomic force microscopy (AFM) in a buffer solution. In addition, the binding force of ChBD2 onto chitin ( $\beta$ -1,4 linked *N*-acetylglucosamine) was compared to that onto cellulose ( $\beta$ -1,4 linked glucose) to further investigate the binding ability of ChBD2.

His-tagged ChBDs immobilized on a AFM tip through chemical modification using the ligand containing hexa(ethylene glycol) and nitrilotriacetic acid groups, and the binding forces of ChBDs onto chitin surface were determined by AFM force curve measurements in a buffer solution. As for the negative control experiment, force curve measurement with AFM tip terminated with NTA groups were performed, and no significant signal was observed. In contrast, AFM tip functionalized with His-tagged ChBD1 or ChBD2 showed the multiple rupture events, and histogram analysis from  $< 300$  binding forces revealed that the binding forces of ChBD1 and ChBD2 were ca. 60 pN and 90 pN at the loading rate of 2 nN/s, respectively. This result suggests that ChBD1 and ChBD2 play different roles in binding onto chitin surface.

Subsequently, cellulose was selected as a binding substrate to further study the binding ability of ChBD2. AFM force curve measurement revealed that the binding force onto cellulose was almost identical to that onto chitin (ca. 90 pN) at the same loading rate of 2 nN/s. This result indicates that the side chain groups of chitin and cellulose have less effect on the binding event of ChBD2, and that the hydrophobic interaction between the aligned aromatic residues in the enzyme and pyranose rings of polysaccharide is possibly the main interaction of ChBD2 binding onto cellulose/chitin surface.

Finally, the loading rate dependency on the binding force of ChBD2 was studied to explore the dynamics of the ChBD2 binding by calculating the dissociate rate constant ( $k_{off}$ ) and effective bond length ( $x_b$ ) on the basis of the Bell-Evans model. The  $k_{off}$  and  $x_b$  values for ChBD2 onto chitin were almost identical to those onto cellulose. This analysis suggests that the ChBD2 can bind onto chitin/cellulose in the similar manner.

## 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) Vivien Rauch, Jennifer A. Wytko, Mayuko Takahashi, Yoshihiro Kikkawa, \*Masatoshi Kanetsato, Jean Weiss\*: “Dynamic Assembly of Porphyrin Wires Trapped on a Highly Oriented Pyrolytic Graphite Surface”, *Organic Letters*, 14, 1988–2001 (2012).
  - 2) Yoshihiro Kikkawa, \* Masato Fukuda, Ayumi Kashiwada, Kiyomi Matsuda, Masatoshi Kanetsato, Masahisa Wada, Tadayuki Imanaka, and Takeshi Tanaka\*: “Binding Ability of Chitinase onto Cellulose: An Atomic Force Microscopic Study”, *Polymer Journal*, 43, 742–744 (2011).
2. 会議発表
  - 1) Yoshihiro Kikkawa, Masato Fukuda, Ayumi Kashiwada, Kiyomi Matsuda, Masatoshi Kanetsato, Masahisa Wada, Tadayuki Imanaka, Takeshi Tanaka: “Chitinase Binding onto Polysaccharide Surfaces: An Atomic Force Microscopic Study”, Softinterface International Mini-Symposium on Biointerface, 筑波大学、2012/03/18 [国際会議 ポスター]
  - 2) 吉川 佳広、高橋 真佑子、青柳 将、菅 洋志、金里 雅敏、阿部英喜: “高分子規則表面のバイオエッチングとナノマテリアル集積化への応用”, 平成23年度産業技術連携推進会議 研究発表会, (独) 産業技術総合研究所、2012/02/02 [国内学会 ポスター]
  - 3) 吉川 佳広: “バイオエッチングと分子間相互作用測定: 走査型プローブ顕微鏡による解析”, エコマテリアル研究会, 東京大学 生産技術研究所、2011/10/14 [国内学会 口頭 (依頼講演)]
  - 4) Yoshihiro Kikkawa, Hideyuki Kihara, Mayuko Takahashi, Masatoshi Kanetsato, Teodor-Silviu Balaban, Jean-Marie Lehn: “Fabrication and Transformation of Self-Assembled Nanopatterns: Scanning Tunneling Microscopic Study”, The 12th Pacific Polymer Conference (PPC12), Jeju, Korea, 2011/11/17 [国際会議 口頭]
  - 5) 吉川 佳広、金里 雅敏: “自己組織化による二次元膜形成と外部刺激による構造変換”, 第60回高分子討論会, 岡山大学、2011/09/29 [国内学会 口頭 (依頼講演)]
  - 6) 吉川 佳広、小山 恵美子、都築 誠二、藤原 享子、金里 雅敏: “金属錯体形成による二次元構造変換: 走査型トンネル顕微鏡による解析”, 第5回バイオ関連化学シンポジウム, つくば国際会議場、2011/09/12 [国内学会 ポスター]
  - 7) Yoshihiro Kikkawa: “Scanning Tunneling Microscopic Study of 2D Structural Transformation by External Stimuli”, Minisymposium on Advanced Microscopies of Nanostructures, Marceille, France, 2011/07/28 [国際会議 口頭 (依頼講演)]
  - 8) Yoshihiro Kikkawa: “Transformation of Two-Dimensional Structures by External Stimuli: Scanning Tunneling Microscopy Reveals” ICMUB-Conference, Dijon, France, 2011/07/22 [国際会議 口頭 (招待講演)]
  - 9) 吉川 佳広、木原 秀元、高橋 真佑子、金里 雅敏、Teodor-Silviu Balaban、Jean-Marie Lehn: “アントラセン誘導体の二次元構造: ホストゲスト化学と光二量化”, 第7回ホストゲスト化学シンポジウム, 広島大学、2011/05/28 [国内学会 口頭]
  - 10) 吉川 佳広、木原 秀元、高橋 真佑子、金里 雅敏、Teodor-Silviu Balaban、Jean-Marie Lehn: “アントラセン誘導体の二次元構造”, 第60回高分子学会年次大会, 大阪国際会議場、2011/05/25 [国内学会 ポスター]
3. その他
  - 1) 吉川 佳広、市川 暢広、金里 雅敏: “生分解性高分子の分解速度制御法”、特願 2011-279554

## 1. 緒言

医療現場では、少ない検査試料から迅速に検査結果を取得する技術革新が進んでいる。検査機器が自動化されたことやコンピュータによる情報処理が飛躍的に高性能になったことが大きく貢献している。一方で、検査に使用される材料側の革新も重要である。特に、微量の検査試料が効率よく反応し、定量されるような基材界面の創製が重要である。例えば、マイクロチップなどの微細な流路において、乱流を発生させずスムーズに液体試料が流れることによって、シグナルのバックグラウンドが安定化し、結果としてシグナルとノイズの比である S/N 比の向上につながる。これまでに、リン脂質極性基を有するポリマーが高い親水性を示すことから微細な流路の内壁の被覆に有効であるとされ、かつ界面に被覆された高分子と相互作用している水の構造は自由水含量が高いために、タンパク質の吸着と変性を抑制する効果に優れていることが報告されている [K. Ishihara *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **39**, 323 (1998).]. このようなポリマー材料による界面創製により、高感度診断技術が飛躍的に向上すると期待される。

本新学術領域研究では、表面の親水性-疎水性の変換が達成できるとともに、かつその所要時間を短縮できる材料創製を目的として研究を推進している。具体的には、親水性高分子と疎水性高分子をつなげたブロックポリマーを設計した。特に、疎水性高分子として非晶性のポリ(トリメチレンカーボネート)(PTMC)を用いることにより、高速親水化が達成できることについて検討してきた。本報告では、親水性高分子鎖の鎖長により表面特性が親水性を示すのに必要な時間が規定されることについて紹介する。

## 2. 研究経過

### 2. 1 親水-疎水ブロックポリマーの創製

片末端に水酸基を有するポリエチレングリコールモノメチルエーテル(mPEG)に環状モノマーであるトリメチレンカーボネート(TMC)を作用させて親水鎖である mPEG に疎水鎖である PTMC がつながったブロックポリマー(mPEG-PTMC)を設計した(図 1)。

本研究では、市販の試薬として入手

可能な数平均分子量が 350 (重合度 8, mPEG350) および 5000 (重合度 114, mPEG5000) の mPEG を選択した。mPEG の末端水酸基に対して 400 当量の TMC モノマーを仕込み、塩化メチレンを重合溶媒として塩基性の有機触媒である 1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン(DBU)存在下にて開環重合を行い、目的とする高分子を得た(表 1)。安息香酸を添加して DBU と生長末端の水酸基間の水素結合を阻害することにより反応を停止させて、再沈殿によりポリマーを析出させた。mPEG350 を用いた高分子合成において、触媒濃度は mPEG の末端水酸基に対して 1.2 当量の場合では、NMR から見積もられた TMC の重合度は 100 程度にとどまった。触媒濃度を 2.4 および 3.2 当量まで増大させることにより、重合度は 130 および 170 にそれぞれ増大した。一方、mPEG5000 を用いた場合でも同様に、触媒量を水酸基の 1.2 および 2.4 当量に増大することにより TMC の重合度は 310 および 380 にそれぞれ増大した。表面特性に関する以降の実験には、重合度が 170 である mPEG350-PTMC および重合度が 310 である mPEG5000-PTMC を用いて行った。

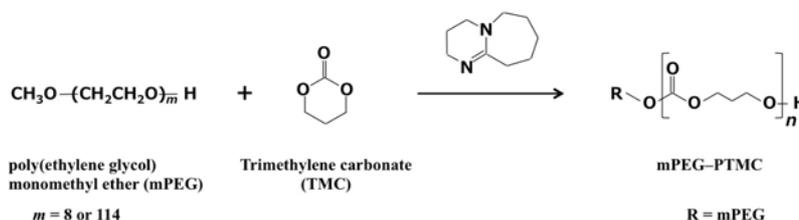


Figure 1 Hydrophilic-hydrophobic block polymer based on PTMC.

Table 1 Synthetic results of hydrophilic-hydrophobic PTMC polymer.

Sample code	[catalyst]/[I] <sup>a)</sup>	Poor solvent	Yield (%)	Degree of polymerization <sup>b)</sup>
mPEG350-PTMC	3.2	2-Propanol/Hexane=1/1	85	170
mPEG5000-PTMC	1.2	2-Propanol/Hexane=1/1	79	308

<sup>a)</sup> [catalyst] and [I] indicate DBU and hydroxyl group on mPEG, respectively.

<sup>b)</sup> Determined by <sup>1</sup>H-NMR.

## 2. 2 親水性高分子鎖を導入したポリ（トリメチレンカーボネート）による高速親水化

ポリマー (mPEG5000-PTMC) を塩化メチレンに溶解し、ポリエチレンテレフタレート (PET) からなる基板にディップコーティング法により薄膜を作製した。薄膜の水に対する濡れ性を調べるために、静的接触角測定を行った (図 2)。製膜直後の基板では、接触角測定後わずか 6 秒間で接触角が 16 度低下 (64 度→48 度) することが明らかとなった。測定に用いる水は 10  $\mu\text{L}$  程度であり、本ブロックポリマーで基材を被覆することで、水との接触後直ちに表面の濡れ性が向上できることが明らかとなった。この基板を 3 時間水に浸漬した後に接触角測定を行ったところ、表面は水との接触後直ちに接触角が 14 度低下 (62 度→48 度) することが明らかとなった。5 時間および 24 時間水に浸漬した場合においても、11 度および 5 度の接触角の低下が認められた。基板を水に浸漬する時間が増大するに従い、接触角の低下は緩慢となった。特に測定初期の接触角が顕著に低下していた。これは、長時間基板を水と接触させたことによって、本ポリマー鎖が水和するとともに水を吸収したためであると考えられ、これにより初期の接触角が低くなったと考えられる。本ポリマーで調製された薄膜は、乾燥状態から湿潤状態への環境変化に伴い、数秒間で表面特性が親水性に変化可能であった。また、長期間水と接触していても、親水性に変化する表面特性は維持されていた。

一方、mPEG350-PTMC を基板にコーティングした薄膜の結果を図 3 に示す。親水鎖の鎖長が短いポリマーの場合には、接触角測定時の数分間では明確な接触角の変化は認められなかった。薄膜調製時の接触角は 74 度であり、3 時間水中に浸漬することによって、70 度の接触角を示した。また、5 時間以上水中に浸漬しても接触角は 66 度付近を示すにすぎず、さらなる親水化は認められなかった。mPEG5000-PTMC の薄膜と異なり、初期の接触角自体が高く観察されるとともに表面特性が変化するのに長時間を要し、かつ表面接触角は高いままであった。このような特性の違いが認められた理由として、mPEG 鎖の鎖長が大きく関わっていると考えられる。mPEG 鎖が短いと、mPEG 鎖が膜の表面に偏析するのに要する時間が mPEG 鎖の長いものと比べると長時間必要になる。これは、表面偏析において高分子鎖が自発的に再配向するための駆動力が鎖長に依存して変化するためであると考えられる。mPEG 鎖が短いため、表面に偏析した後の親水鎖による表面親水化の効果も低くなったと考えられる。

以上のように親水鎖と疎水鎖からなるブロックポリマーにより達成される表面の高速親水化は、親水鎖の鎖長依存的に生起していると考えられる。特に数平均分子量が 5,000 の mPEG 鎖の場合、わずか数秒間で表面特性が親水化した。本研究で用いた疎水鎖は PTMC であり、結晶性の低いアモルファス高分子である。これまでに対照実験として、ラクチドを開環重合させて mPEG とポリ乳酸 (PLA) をつないだ高分子を合成し、同様の評価を行ってきた。その結果、ポリ乳酸のように結晶性の高い高分子を用いた場合では、親水鎖の表面偏析が極めて遅くなることを見出した。ポリ乳酸が形成している結晶領域が親水鎖の自発的な相分離を駆動力とした再配向を大きく抑制したためと考えられる。このことから、本研究で目的とした高速親水化ポリマーは、アモルファス高分子のように分子間力が弱く明確な結晶構造をとらないことが表面偏析の高速化に不可欠であると考えられる。さらに、このような表面偏析は、両末端に水酸基を有するポリエチレングリコールを親水鎖として用い、この両末端に存在する水酸基から TMC を開環重合によりつなげた ABA 型のトリブロックポリマーにおいても高速親水化は認められないことも見出してきた。親水鎖の片末端が自由に運動できる AB 型のブロックポリマーが高速親水化を示すために、重要な分子設計であるといえる。

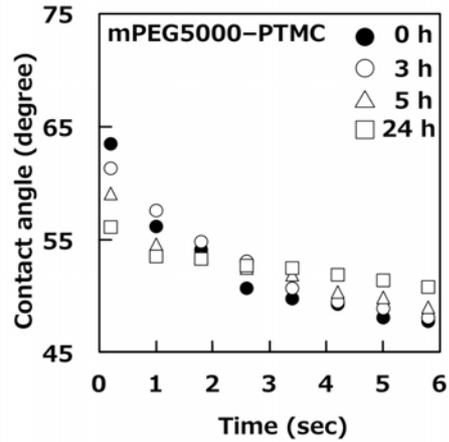


Figure 2 Static contact angle of water on mPEG5000-PTMC.

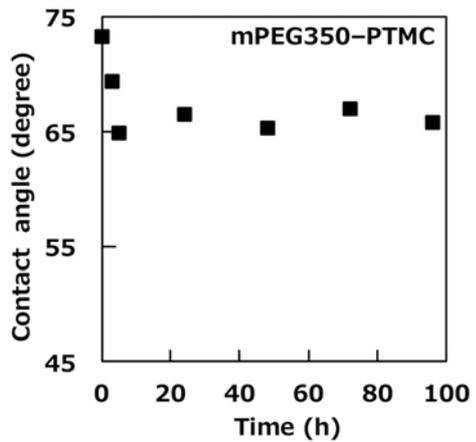


Figure 3 Static contact angle of water on mPEG350-PTMC.

Fast Moisture Responsive Polymer Achieves High-Performance Diagnosis  
for Miniature Diagnostic Devices

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

Surface properties on polymer materials are fundamentally essential point to apply versatile biomedical fields. In particular, polymer materials are capable of incorporation of surface property by chemical modification technique in comparison with metal and ceramics. Therefore, large number of surface modifications was reported. The easiest way to modify surface property on the polymer materials is polymer coating technique. Excellent bio- and blood-compatibility was reported by using a series of bioinspired polymers composed of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine and *n*-butyl methacrylate [K. Ishihara *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **39**, 323 (1998).]. The polymer could improve surface property to reduce non-specific protein adsorption and cell adhesion. However, the polymer coating is not universal technique. The time to reach complete surface hydrophilicity is not so fast, it sometimes takes roughly 24 hours. Therefore, preconditioning is required to alter the surface wettability, the polymer-coated devices require the soaking in the buffer solution or ultrapure water to enhance the alteration of surface wettability. For improvement of hydrophilization, design of MPC monomer was examined; for example, flexible segment was incorporated into the phosphorylcholine side chain. And the surface wettability was much faster than that of original polymer using MPC monomer. If the surface hydrophilization is achieved spontaneously and much faster than that of conventional polymer coating technique, it would be fundamental approach to regulate surface property. In particular, surface property would be regulated by the surrounding condition, showing stimuli-responsive function.

We have reported amorphous poly(trimethylene carbonate) (PTMC) with hydrophilic poly(ethylene glycol) monomethyl ether (mPEG). The resulting mPEG-PTMC provided hydrophilic surface after the soaking in ultrapure water. The time to reach complete hydrophilic surface was much faster than that of the conventional polymer coating technique, and the surface enrichment of the hydrophilic mPEG segment was well correlated with average molecular weight of the mPEG segment. In the case of high molecular weight of mPEG segment ( $M_n = 5,000$ ), the surface altered much faster in comparison with that of low molecular weight ( $M_n = 350$ ). Additionally, the mPEG segment-enriched surface allowed to be selectively loading organic dye molecule from the mixture. Therefore, the surface enrichment is of great important technique to form fine biointerface. In this project, reflexive surface enrichment is reported in terms of static contact angle measurement. The hydrophilic segment was firstly embedded to reduce surface free energy, when the polymer membrane was formed by dip coating technique. After the contacting water such as water droplet by static contact angle measurement, the surface enrichment of the hydrophilic segment was achieved. The time to reach complete surface enrichment depended on the molecular weight of the hydrophilic segment. The dominant factor of the rearrangement was considered to be hydration effect of the hydrophilic segment. After the hydration, the hydrophilic mPEG segment could be free to move in the membrane to rearrange the segment, and the driving force would be excluded volume effect. The surface enrichment of hydrophilic segment was achieved by using higher molecular weight of the mPEG chain. The dominant factor is considered to be hydration effect of the polymer chain. The strategy of the enrichment is quite new approach, and it would be capable of spontaneously forming surface modification by moisture sensitive manner. The surfaces will be applied as fine substrate for high-performance diagnosis toward miniature diagnostic devices.

## 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, Regulation of Protein Loading on Poly(trimethylene carbonate), Poly(L-lactic acid), and Their Copolymer: Effect of Surface Enrichment by Polymer Crystallinity, *Mater. Sci. Eng. C*, **32** (4), 988-993 (2012).

2) Yuta Tosaki, Junpei Miyake, Junji Watanabe, and Yoshiyuki Ikeda, Higher Stability Aggregation Obtained Using Hydrophilic-Hydrophobic Block Copolymer Based on Poly(trimethylene carbonate), *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn*, in press.

### 2. 著書・総説

1) 渡邊順司, 創傷被覆材への応用にむけたポリ(トリメチレンカーボネート)を基盤とした環境応答型ポリマー, *高分子論文集 (特集: メディカルポリマー)*, 69 (3), 89-101 (2012).

### 3. 会議発表

1) 戸崎雄太, 三宅純平, 渡邊順司, 池田能幸, “非イオン性親水鎖を有するアモルファスポリマーが創り出すコロイド粒子と安定性”, 第60回高分子討論会, 岡山大学, 岡山 (2011). [国内学会 ポスター]

2) 新田恭平, 三宅純平, 渡邊順司, 池田能幸, “酵素分解型のオリゴ疎水鎖を有する両親媒性共重合体による会合体の創製”, 第60回高分子討論会, 岡山大学, 岡山 (2011). [国内学会 ポスター]

3) 戸崎雄太, 三宅純平, 渡邊順司, 池田能幸, “ポリ(トリメチレンカーボネート)を基盤とした親水-疎水ブロック共重合体による会合体の高い安定性”, 第21回日本MRS学術シンポジウム, 横浜市開港記念会館, 横浜 (2011). [国内学会 口頭]

4) 新田恭平, 三宅純平, 渡邊順司, 池田能幸, “ポリカーボネートのオリゴ鎖を導入した共重合体の合成とそのゲル形成”, 第21回日本MRS学術シンポジウム, 横浜市開港記念会館, 横浜 (2011). [国内学会 口頭]

5) 新田恭平, 三宅純平, 渡邊順司, 池田能幸, “ポリ(トリメチレンカーボネート)を側鎖にもつ両親媒性共重合体の合成とその物性評価”, 日本化学会第92春季年会, 慶応大学, 横浜 (2012). [国内学会 ポスター]

### 4. その他

特になし

公募研究代表者 A02

ソフト界面の解析 「ソフト界面を“探る”」



# ポリマーナノスフィア積層粒子層状組織体による次元規制型マテリアルイノベーション

研究代表者：埼玉大学大学院理工学研究科・藤森厚裕

## 1. 緒言

現在、高分子微粒子は、触媒、塗料、電子機器等の材料として広く実用利用がなされている。このようなナノ微粒子を二次元的に集積させた粒子膜は、パターンング材料、センサー等への応用も期待され、現在、精力的な研究が展開されている[1]。そのような中、我々は新たなナノ微粒子作製の手法として、疎水性の高い直鎖状高分子を気/水界面へ展開することで、極めて高さの揃った単粒子膜形成が可能となり、更にボトムアップ法によってこれを積層することで、多粒子層膜を構築出来ることを見出してきた[2, 3]。この"ポリマーナノスフィア積層粒子層状組織体"は、疎水性側鎖のアルキル鎖長によっては、表面圧に依存した単分子膜-単粒子膜転移に伴って得られ、その一次構造の差異によって粒子形状が異なり、それに基づき発現する物性にも影響が生じる。加えて我々はLangmuir-Blodgett(LB)法により、カルバゾール環を有する三元楕形共重合体の新規のポリマーナノシートを提唱してきた [4, 5]。共重合組成において、疎水性の高いカルバゾールユニットの比率を増加させることで、前述した粒子膜の形成が期待され、この組織化膜はシートとスフィア二つの形態をとると考えられる。そこで本研究では、ポリマーナノスフィア積層粒子層状組織体の創製と同一化合物による新規ポリマーナノシート-ポリマーナノスフィア積層粒子層状組織体の形成制御について検討を行った。

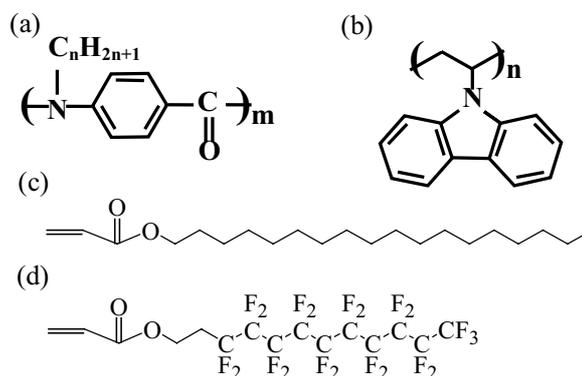


Figure 1 Chemical structure of (a) aromatic polyamides, (b) poly n-vinyl carbazole, (c) octadecylacrylate and (d) 2-(perfluorodecyl)ethylacrylate.

## 2. 研究経過

用いた試料は、側鎖長の異なる含長鎖アルキル芳香族ポリアミド (PABA<sub>n</sub>)(fig. 1 (a))を直接重縮合法により新規に得た。更にモノマー試料としてoctadecyl acrylate (OA, Fig. 1 (c)), 2-(perfluorodecyl)ethyl acrylate (FF<sub>10</sub>EA, Fig. 1 (d)), 更にn-vinyl carbazole(Fig. 1 (b))を様々な比率で溶液共重合を行い、ランダム共重合体を得た。各試料の水面上単分子膜に対しては、表面圧-面積等温曲線を行い、単分子膜挙動・並びに単分子膜-単粒子膜転移を確認した。その後Langmuir-Blodgett(LB)法による累積膜、またはZ型単分子膜を形成させ、測定に使用した。得られた粒子積層体および累積膜には、in-plane X線回折、並びにout-of plane X線回折を行い、ポリマーナノスフィア積層粒子層状組織体中の構造について評価した。また、Z型単分子・単粒子膜両者に対しては、原子間力顕微鏡(AFM)観察を行い、側鎖長および、共重合比の変化に伴う表面形態変化について検討を行った。

芳香族ポリアミド粒子積層体に対する out-of plane XRD より高次反射が確認されたことから高い秩序性をもった層状組織体の形成が示唆された。この結果は、三次元パラクリスタル解析[6]に適用させた場合においても同様であった(g value=0.52)。

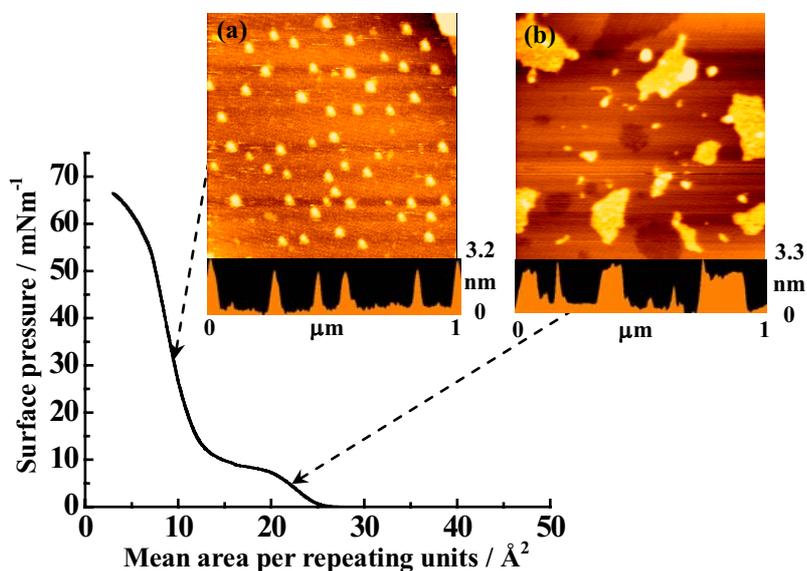


Figure 2.  $\pi$ -A isotherm of monolayer on the water surface and corresponding AFM images transferred at (a) 30 and (b) 5 mNm<sup>-1</sup> of NVCz:OA:FF<sub>10</sub>EA=6:1:1 copolymer.

またカルバズール含有率が高い三元楕型共重合体(NVCz:OA:FF<sub>10</sub>EA = 6:1:1)の表面圧-面積等温曲線においては(Fig.2)、芳香族ポリアミドでも見られた二次元での相転移と思われるプラトー領域が確認された。さらに、AFM観察により低圧域においては単分子膜が確認されたのに対し、高圧域にてtransferしたものでは粒子膜が確認された。このような挙動は、新しいタイプの”ポリマーナノシート”として我々がかつて提案した、NVCz:OA:FF<sub>10</sub>EA = 2:1:1の系[4]では見られなかったことから、カルバズール環の増加により、表面圧に依存した単分子膜-単粒子膜転移を示すに至ったと思われる。加えて、LB法を用いてこの単分子膜および単粒子膜を累積した累積膜に対するout-of plane XRDの結果からも層状周期の変化が見られたことから共重合比によって、新規ポリマーナノシート-ポリマーナノスフィア積層体の形成制御が可能であると考えられる。一方、in-plane X線回折の結果、ナノスフィア中では、側鎖がsub-cell形成による六方充填を形成していることも新たに分かった。

ところで、こうした共重合比率の変化については、簡易の共重合反応によって得られるNVCz:OA:FF<sub>10</sub>EA = 3:1:1、4:1:1 共重合体とも容易に比較可能である(Fig.4)。2:1:1 共重合体では確認されなかった単分子膜-単粒子膜転移がisotherm上に確認され、それぞれ低圧では単分子膜、高圧では単粒子膜形態を形成していることが、基板転写後のAFM測定によってクリアに確認された。

## References

- [1] Pernites RB.; Felipe MJL.; Foster EL., *ACS Appl. Mater. Interf.*, **2011**, 3, 817.
- [2] Fujimori, A.; Sato, N.; Chiba, S.; Abe, Y.; Shibasaki, Y., *J. Phys. Chem. B*, **2010**, 114, 1822.
- [3] Shibasaki, Y.; Abe, Y.; Sato, Y.; Fujimori, A.; Oishi, A., *Polym. J.*, **2010**, 42, 72-80.
- [4] (a) Fujimori, A.; Hoshizawa, H.; Kobayashi, S.; Sato, N.; Kanai, K.; Ouchi, Y., *J. Phys. Chem. B*, **2010**, 114, 2100, (b) Fujimori, A., *Kobunshi Ronbunshu*, **2011**, 66, 579.
- [5] Fujimori, A.; Kusaka, J.; Nomura, R., *Polym. Eng. Sci.*, **2011**, 51, 1099.
- [6] Harada, T.; Matsumoto, H.; Yamamoto, H., *Langmuir*, **1999**, 15, 573.

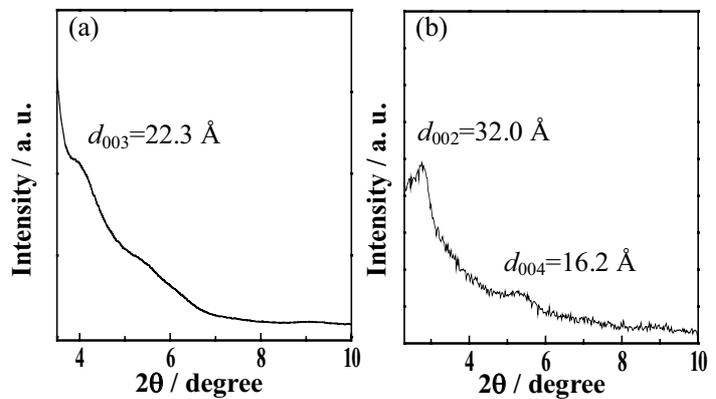


Figure 3. Out-of plane XRD profile of multi-layers transferred at (a) 30 and (b) 5 mNm<sup>-1</sup> of NVCz:OA:FF<sub>10</sub>EA = 6:1:1 copolymer.

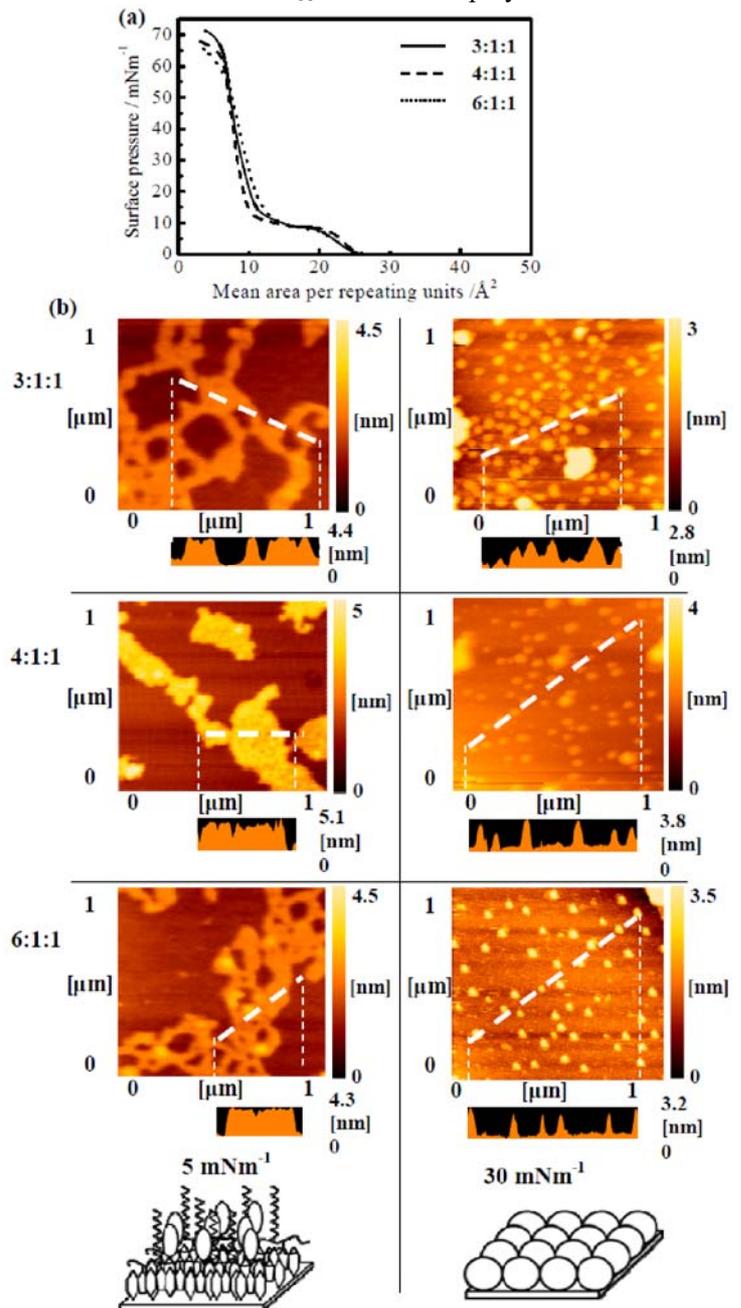


Figure 4. (a) Surface pressure–area isotherm and (b) AFM images of Z-type monolayers and single particle layers of NVCz : OA: FF<sub>10</sub>EA=3:1:1, 4:1:1, and 6:1:1 copolymers. The cross section is shown in the white dashed line.

# Fabrication and Structural Estimation of "Polymer Nanosphere Multilayered Organization"

Atsuhiko FUJIMORI

Graduate School of Science and Engineering, Saitama University,  
255 Shimo-okubo, Sakura-ku, Saitama, 338-8570, Japan

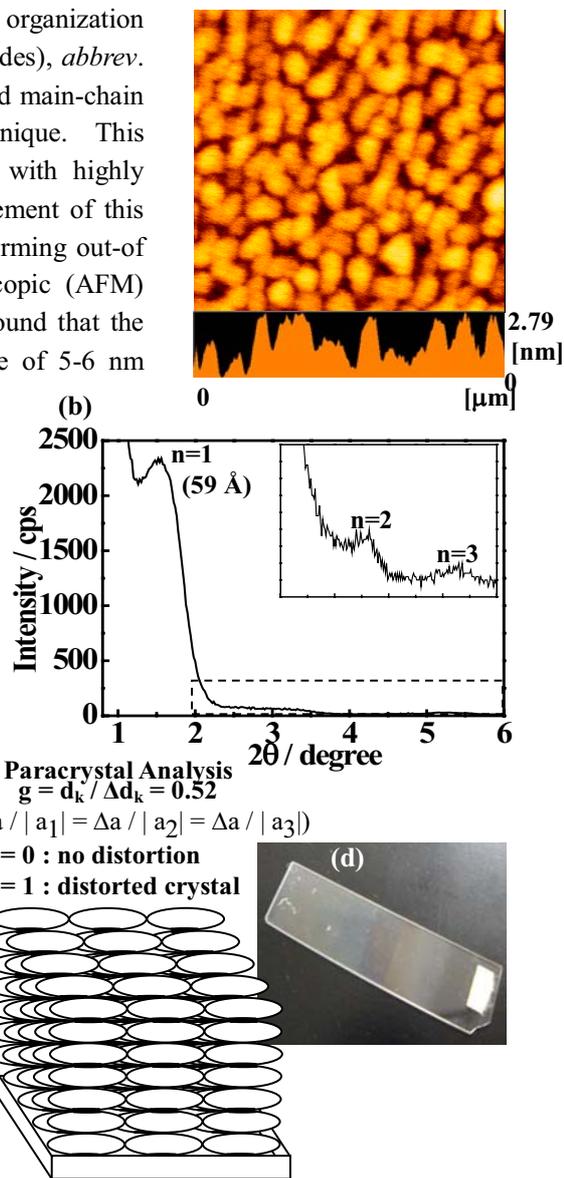
fujimori@fms.saitama-u.ac.jp  
Tel and Fax: +81-48-26-3503

We have newly constructed "multi-particle layered organization (Fig.1)" of aromatic polyamides (poly-(*N*-alkylated benzamides), *abbrev.* PABA<sub>n</sub> n : carbon number of side-chains) having both a rigid main-chain and a flexible side-chains by a Langmuir-Blodgett (LB) technique. This organization is composed of the build-up particle layers with highly regular arrangement along the *c*-axis. The particle arrangement of this organization of polymer nanosphere was estimated by performing out-of plane X-ray diffraction (XRD), and atomic force microscopic (AFM) observation. From the result of out-of plane XRD, it is found that the multi-particle layers of PABA<sub>5</sub> form the periodic structure of 5-6 nm along the *c*-axis. In addition, formation of a single particle layer having uniform height of 2.5-3.0 nm is confirmed by AFM. Namely, almost twice value of particle height corresponds to the long spacing estimated by XRD. It is supposed that double particle layered structure (Y-type) is formed by LB technique to the amphiphilic particles at air/water interface. In addition, it is proposed that ternary comb copolymers with carbazole units and both hydrogenated and fluorinated side-chains are candidates of newly typed "polymer nanosheet" material in the previous report. These copolymers with high hydrophobic carbazole contents also formed single particle layer at air/water interface and "multi-particle layered organization" by a LB technique. In this case, single particle layered structure without a distinction between the top and bottom of particles in the view of electron density was constructed in LB multi-particle layers. Therefore, it is possible to attain the control of formation of single and double particle layered structure from these techniques.

Further, it is found that "multi-particle layered organization of polymer nanosphere" and "polymer nanosheet" are simultaneously formed by same component material.

## References

- [1] A. Fujimori, *Kobunshi Ronbunshu*, 68, 579, 2011.
- [2] A. Fujimori, J. Kusaka, R. Nomura, *Polym. Eng. Sci.*, 51, 1099, 2011.
- [3] A. Fujimori, *Colloid Interf. Commu.*, 36, 41, 2011.



**Figure 1.** (a) AFM images of single particle layer of PABA<sub>5</sub>. (b) Out-of-plane XRD profile of LB multi-particle layers of PABA<sub>5</sub>. (c) Paracrystal Analysis to the LB multi-particle layers of PABA<sub>5</sub> and their illustration. (d) Appearance of structural color of step-wise multi-particle layers of PABA<sub>5</sub>.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

- 1) A. Fujimori\*, J. Kusaka, R. Nomura, “Formation and Structure of Organized Molecular Films for Organo-modified Montmorillonite and Mixed Monolayer Behavior With Poly(L-lactide).”, *Polym. Eng. Sci.*, **51**(6), 1099-1107, **2011**.
- 2) R. Itagaki, Y. Tatewaki, A. Fujimori\*, “Two-dimensional Polymorphisms of Organized Molecular Films for Charge-transfer Complexes Containing Metal(dmit)<sub>2</sub> Unit.”, *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, **36**(2), **2011**, 141-144.
- 3) 乳井 樹, 伊澤 理, 藤森 厚裕\*, “全フッ素化共重合体の結晶化挙動に対する造核剤添加効果(Nucleator Effect to the Crystallization Behavior of Perfluorinated Copolymers)”, *熱測定(Netsu Sokutei)*, **38**(3), 77-82, **2011**.
- 4) A. Fujimori\*, “Structural Chemistry of Ultra-Thin Organized Molecular Films of Polymers -From Langmuir-Blodgett Film to Layered Organization of Polymer Nano-Sphere-”, *Kobunshi Ronbunshu*, **68**(8), 579-593, **2011**.
- 5) A. Fujimori\*, “Mixed Monolayer of Biodegradable Polymers and Organo-modified Montmorillonite.” *SPE Plastic Res. Online*, No7, 1-3, **2011**. (DOI: 10.1002/spepro.003663)
- 6) T. Miyazawa, K. Matsuda, A. Fujimori, Y. Nonomura\*, “One-pot Synthesis of Manganese Oxide Nanoparticles from Microemulsion Systems.” *Chem. Lett.*, **40**(11), **2011**, 1262-1263.
- 7) S. Arai, J. Kusaka, M. Kubota, K. Kurosaka, A. Fujimori\*, “Nanostructural Control of Biological Molecules Arranged by Using Langmuir-Blodgett Films of Organo-modified Aluminosilicate as a Template.” *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, **37**(2), **2012**, in press.

他11報.

### 2. 著書・総説

- 1) A. Fujimori\*, J. Kusaka, M. Kubota, K. Kurosaka, “Mixed monolayer behavior of biodegradable polymers and an organo-modified montmorillonite.”, *RFP International*, **6**(4), 216-218, **2011**.
- 2) 藤森厚裕, “『機能性原子団を含む楕型共重合体組織化膜の分子配列制御』”, *Colloid Interf. Commu.*, **36**(4), 41-44, **2011**.
- 3) A. Fujimori\*, J. Kusaka, M. Kubota, K. Kurosaka, “可生物降解乗合物与有机改性蒙脱土的混合单分子膜行為”, *RFP for China*, **2011**, **4**, 37-40. 3. 会議発表
- 4) 日本化学会編, 『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 (CSJ カレントレビュー04)』 pp.49, “単分子膜中でも, 官能基レベルの配向がわかる! ~LB膜の偏光NEXAFS測定システム(藤森厚裕著)”, 化学同人, **2011**.
- 5) Moh. Yasin, Sulaiman W. Harun and Hamzah Arrof eds., “Selected Topics Optical Fibers Technology”, chapter 15: “Crystalline” Plastic Optical Fiber with Excellent Heat-resistant Property” (by Atsuhiko Fujimori), InTech open access publisher, **2012**, pp.425-446, ISBN 978-953-51-0091-1.

他1件.

### 3. 会議発表

1. 「ソフト界面が形成誘起する超薄分子組織体の構造化学 -ポリマーナノフィルムからポリマーナノスフィアまで-」  
藤森 厚裕  
日本化学会第 92 春季年会 特別企画・ソフト界面を活かした先端化学(招待講演), 慶應義塾大学日吉キャンパス, 2012 年 3 月
3. 「超薄分子組織膜の構造化学-高分子 LB 膜からポリマーナノスフィア層状組織体まで-」  
藤森 厚裕  
平成 23 年度コロイドおよび界面化学討論会(受賞講演), 京都大学, 2011 年 9 月
4. 「超薄高分子組織膜の構造化学-LB 膜から積層粒子層状組織体まで-」  
藤森 厚裕  
平成 23 年度繊維学会年次大会(招待講演), タワーホール船堀, 2011 年 6 月
5. 「超薄高分子組織膜の構造化学-LB 膜から粒子積層構造体まで-」  
藤森 厚裕

他, 25 件.

### 4. その他 (例えば特許など)

#### 特許出願

1. 発明の名称: タンパク質-疎水性有機化剤吸着粘土複合体及びその製造方法  
発明者・出願人: 黒坂恵一, 窪田宗弘, 藤森厚裕 (出願中・整理番号PT2011017) 出願日 2011.11.29

# 負吸着性化学種の気液界面単分子膜での濃縮と膜中拡散機構のオペランド解析

研究代表者：京大化研・長谷川 健

## 1. 緒言

水面上に作製した展開単分子膜（Langmuir 膜；L 膜）の分子集合構造は、疎水基間の結晶化力や親水基部位の水和・金属塩形成などの力のバランスによって決まることは、広く認識されている。しかし、これらのパラメーターの相互作用の機構は十分にわかっていない。すなわち、L 膜を構成する有機分子から金属イオンまでを横断的に解析する試みが少なく、互いの関連の理解には至っていない。

本研究では、新たなパラメーターとして L 膜の作製方法を加えた。L 膜の作製には、通常よく用いられる圧縮バリアを用いた Langmuir 法（圧縮法）以外に、分子断面積を考慮した量のモノマー溶液を、膜面積を固定した水面上に展開する方式（非圧縮法）がある。これまで、経験的に非圧縮法よりも圧縮法の方がより偏りが少なく、かつ熱力学的に安定した構造に到達できると考えられてきた。

以前の研究[1]で、ステアリン酸亜鉛の L 膜を非圧縮法で調整し、全反射 XAFS スペクトルを測定すると XANES 領域に明瞭な経時変化が現れることが報告されているが、その理由はわかっていなかった。そこで今回、圧縮法との比較を加え、さらに有機薄膜部位を偏光変調赤外分光法 (PM-IRRAS) [2]で解析することで、経時的な L 膜のダイナミクスを、有機薄膜部位とイオン部位の両面から議論した[3]。また、イオンの配位構造解析には、偏光 XAFS 測定を用いた。

## 2. 研究経過

### 【実験】

濃度  $1.0 \times 10^{-3}$  M の臭化亜鉛水溶液 (pH~6.0) 上に、極限断面積が  $0.2 \text{ nm}^2 \text{ molecule}^{-1}$  となるように調整したステアリン酸のクロロホルム溶液を展開し、非圧縮型の L 膜を得た。圧縮型の L 膜は、圧縮バリアを用いて面積を縮め、 $15 \text{ mN m}^{-1}$  の表面圧まで圧縮して面積を固定して得た。L 膜の IR スペクトルに C=O 伸縮振動は現れず、亜鉛塩の形成を確認した。

L 膜の PM-IRRAS スペクトル測定は、変調周波数 20 kHz の干渉計に 50 kHz の偏光変調を重ねて行い、空気／薄膜／水の 3 層系での外部反射光学系を考慮して計算した表面選択律[2]によってスペクトルを議論した。

偏光 XAFS 測定は、全反射蛍光 XAFS 法により、水面から測った入射角 1.2 mrad により測定した。この測定により、水面からおおよそ 10 nm 以内の領域にある  $\text{Zn}^{2+}$  イオンの X 線吸収スペクトルを得た。解析には XANES 領域を用い、吸収端にある white line と呼ばれる強い吸

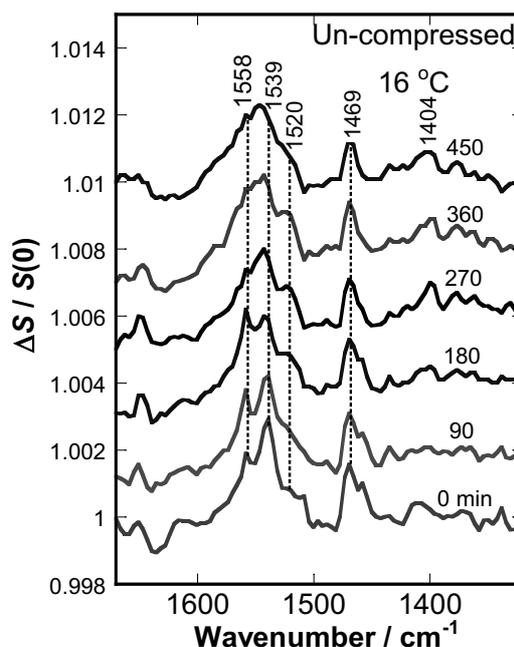


図1 非圧縮ステアリン酸亜鉛 L 膜の PM-IRRAS スペクトルの経時変化

収ピークの高さを利用して配位数の変化を考察した。

### 【結果と考察】

非圧縮L膜のPM-IRRASスペクトルの低波数領域を図1に示す。展開直後(0 min)はC=O伸縮振動バンドが1539 および 1558  $\text{cm}^{-1}$ に分裂して現れている。バルクのスチアリン酸亜鉛のスペクトルが1539  $\text{cm}^{-1}$ に単独のピークを与えることから、1539  $\text{cm}^{-1}$ の波数位置は化学量論的に結合した(スチアリン酸:亜鉛イオン=2:1)場合の波数と帰属した(Type I)。一方、1558  $\text{cm}^{-1}$ のバンドは、時間とともに消失することから、構造的に不均一なスチアリン酸に一時的に結合したスチアリン酸:亜鉛イオン=1:1の非化学量論的な結合に由来するものと考えた(Type II)。

さらに時間が経つと、Type IIも減少し、代わりに1520  $\text{cm}^{-1}$ に新たなバンドが出現した。これは、波数が非常に低いことからカルボキシル基が水の存在下で分子軸まわりに回転し、亜鉛イオンに対称的な配位構造をもつType IIIに変わったと考えた。

一方、偏光 XAFS スペクトルを測定したところ、s 偏光測定に顕著な経時変化が見られた。white line の高さを解析した結果、配位数が4から5配位に変化していることがわかった。亜鉛の配位構造は、6配位型と4配位型が知られており、これまでこれらの混合物と、一体化した構造の区別がつかなかった。本研究で、PM-IRRASの結果からType IIIの構造が示唆されたことにより、亜鉛の配位構造は、膜側が4配位構造、下層液側が6配位構造をとるものと結論できた。

また、圧縮型のL膜は赤外・X線スペクトルのいずれも経時変化を示さず、予想通り構造が平衡状態に達していることがわかった。しかし、Type Iが残ったままでType IIIが現れなかったことから、非圧縮型よりも亜鉛の配位構造という点から見ると不安定な構造であることが示唆された。

### 3. 参考文献

1. I. Watanabe, H. Tanida, S. Kawauchi, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 12018-12019 (1997).
2. M. Muro, Y. Itoh and T. Hasegawa *J. Phys. Chem. B*, **114**, 11496-11501 (2010).
3. M. Muro, M. Harada, T. Okada and T. Hasegawa *J. Phys. Chem. B*, **116**, 11496-11501 (2012).

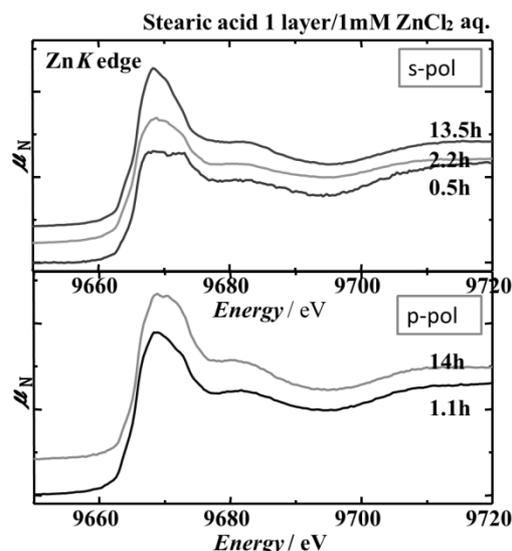


図2 非圧縮スチアリン酸亜鉛 L 膜の偏光 XAFS スペクトル

Operando Analysis of Condensation and Diffusion of Negatively-Adsorbing Chemical  
Species in a Monolayer at the Air-Water Interface

Takeshi HASEGAWA

ICR, Kyoto University

Gokasho, Uji, Kyoto-fu 611-0011, Japan

Tel: +81 774 38 3070, Fax: +81 774 38 3070, E-mail: htakeshi@scl.kyoto-u.ac.jp

The full cross-section image of a Langmuir (L) film (spread monolayer on water) across the air/water interface is difficult to illustrate based on experimental data. The molecular arrangement and orientation in the L film are determined by a balance of at least following factors: crystallization of the hydrophobic part, hydration about the hydrophilic part, and ionic interaction between the film compound and the ion involved in the subphase aqueous solution. The monolayer structure, however, cannot be determined by only the chemical constituents, but by physical parameters such as temperature and the surface pressure of the film. Another influential parameter that should be emphasized in this paper is the preparation technique of the L film. After the pioneering works by Pockels and Rayleigh, L films are usually prepared by using a compression bar (moving barrier) placed on the brim of the trough across the surface of the subphase solution, and the compressing (shrinking) the surface area of the film controls the molecular density and the surface pressure. During this compression process, molecules adsorbed at the water surface are rapidly arranged to be of two-dimensional crystallites keeping the monolayer thickness.

The molecular rearrangement after the Langmuir adsorption has, thus far, never been spectroscopically discussed in a cross-section picture. No significant difference is empirically expected between the compressed and un-compressed L films. If a very long period of time would be spent, the two films would attain a common thermodynamically stable structure. To investigate the role of the coordination and hydration structures about a cation cooperated with the hydrocarbon chain interaction, however, a total analysis across the cross section of the L film is necessary.

In the present study, molecular dynamic rearrangement in a Langmuir (L) film of zinc stearate in a cross section image has been analyzed by employing polarization modulation infrared reflection spectrometry (PM-IRRAS) and X-ray absorption fine structure (XAFS). The number of coordination on a zinc cation is evaluated by XAFS, and the coordination structure of the carboxylic group is revealed by the IR analysis. An L film prepared at a fixed area without using film-compression bar exhibits time-dependent change of the coordination structure about a zinc cation, and it attains a highly ordered structure in the carboxylic group region. On the other hand, an L film prepared by the Langmuir technique using a compression bar exhibited ignorable spectral changes in both IR and X-ray analyses. The hydrocarbon chains in the compressed L film are better ordered than the un-compressed film, but the disordered molecular arrangement of the carboxylic group is restricted to be rearranged, and it does not attain a stable structure in terms of coordination on the zinc cation.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

- 1) Maiko Muro, Makoto Harada, Tetsuo Okada, and Takeshi Hasegawa “Molecular Rearrangement in a Zinc Stearate Langmuir Film Dependent on a Film Preparation Method Studied Using Polarization-Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy and X-ray Absorption Fine Structure” *J. Phys. Chem. B* **116**, 3148-3154 (2012).
- 2) Akiyoshi Kasuya, Yuki Itoh, Tetsuo Okada, Masatoshi Osawa, Yukina Takahashi, Emiko Kazuma, Tetsu Tatsuma and Takeshi Hasegawa “Anisotropic Light Absorption by Localized Surface Plasmon Resonance in a Thin Film of Gold Nanoparticles Studied by Visible Multiple-Angle Incidence Resolution Spectrometry” *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 9691-9696 (2011).

### 2. 著書・総説

- 1) 長谷川 健 “ケモメトリックスを利用した赤外分光法による接着界面および薄膜の構造解析” 日本接着学会誌 (日本接着学会) 47(11), 470-477 (2011).

### 3. 会議発表

- 1) Takeshi Hasegawa “Multiple-Angle Incidence Resolution Spectrometry: A Novel Analytical Platform for Spectroscopic Analysis of Thin Film” IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011, May 24, 2011, Kyoto. (Invited Talk)
- 2) Takeshi Hasegawa, Maiko Muro and Tetsuo Okada “A Conformation and Orientation Model of the Carboxylic Group of Fatty Acids Dependent on Chain Length in a Langmuir Monolayer Film Studied by Polarization-Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy” The 6th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, June 13, 2011, Sonoma, CA. (Invited Talk)
- 3) Takeshi Hasegawa “Multiple-Angle Incidence Resolution Spectrometry: Principle and Application to Analysis of Thin Films” The 15th International Conference on Thin Films, November 8, 2011, Kyoto. (Invited Talk)
- 4) Takeshi Hasegawa, Maiko Muro, Makoto Harada and Tetsuo Okada “Molecular Rearrangement in a Zinc Stearate Langmuir Film Dependent on a Film Preparation Method Studied by Using Polarization-Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy and X-ray Absorption Fine Structure” 2011 Eastern Analytical Symposium and Exposition, November 15, 2011, Somerset, NJ.
- 5) Takeshi Hasegawa “Cross-section analysis of a Langmuir monolayer film of zinc stearate studied by PM-IRRAS and XAFS techniques” Friday Seminar at University of Miami, November 18, 2011, Miami, FL. (Invited Talk)
- 6) 長谷川 健 “分光光学と分析化学：研究と教育” 日本分析化学会近畿支部講演会, 2011年12月9日, 大阪. (招待講演)
- 7) 長谷川 健 “分子水が引き起こす分子集合系薄膜の構造転移：赤外分光法による研究” 2011年第2回高分子表面研究会, 2012年1月30日, 東京. (招待講演)

### 4. その他 (例えば特許など)

- 1) Takeshi Hasegawa “Spectrometric Analyzing Device and Spectrometric Analyzing Method”, PCT/JP2007/001453, 2012年1月10日取得 (米国特許)

# 単一分子鎖の直接観察によって明らかにする高分子ソフト界面の物性

研究代表者：京大先端医工・青木裕之

## 1 緒言

高分子化合物は巨大な鎖状分子であるために大きな内部自由度を有しているため、形態・ダイナミクスは外的要因によって影響を受け、その結果発現するマクロな物性も変化する。その効果は特に界面・表面で顕著であり、動的に性質を変化させる“ソフト”界面を形成する。高分子特有の物性の起源は自由度の大きな個々の鎖の振る舞いに帰着され、このような高分子材料の界面・表面物性を理解し、延いてはこれを制御するためには、高分子鎖一本一本がどのような形態をとり、またそれがどのように運動するのかを理解することが最も重要な課題であると考えられる。その際、単一の鎖の形態を直接可視化することが可能となれば高分子のソフト界面を理解する上で強力な情報となるものと考えられる。本研究は新規な単一分子観察手法を開発し、これを利用した界面・薄膜における高分子鎖一本一本を直接観察を通して高分子界面の物性を分子レベルで評価することを目的としている。

本研究では個々の高分子鎖の形態を直接観察する手段として、 $< 20 \text{ nm}$  の空間分解能での蛍光イメージングを実現する超解像光学顕微鏡 PALM (Photo-Activated Localization Microscopy) の開発を行ってきたが、本年度は高さ方向の超解像検出を実現することで、高分解能で高分子鎖のコンホメーションを三次元計測することを試みた。

## 2 研究経過

PALMでは、図1に模式的に示すように試料に導入された多数の蛍光色素分子を一個ずつ逐次蛍光画像する。得られた各分子の画像を二次元ガウス関数でフィッティングすることで分子の位置座標を $< 20 \text{ nm}$ の精度で決定することができる。全ての分子の座標を一枚の平面上にプロットすることで高分解能の画像を再構築することができる。通常のPALMでは二次元平面内の $(x, y)$ 座標は高精度で決定できるものの、高さ $(z)$ 軸方向に関しては光学顕微鏡の焦点深度すなわち数 $100 \text{ nm}$ 程度に制限されている。そこで本年度では、シリンドリカルレンズを顕微鏡光学系に挿入することで生じる非点収差を利用することで $z$ 軸分解能を向上することを試みた。

倒立型蛍光顕微鏡の蛍光フィルターブロック直下に焦点距離 $10 \text{ m}$ のシリンドリカルレンズを挿入した。これによって得られた単一ローダミンB分子の蛍光顕微鏡画像を図2に示す。図の中央に示すように顕微鏡の焦点を調整することでローダミン分子は円形の輝点として観察されるが、光学系に非点収差

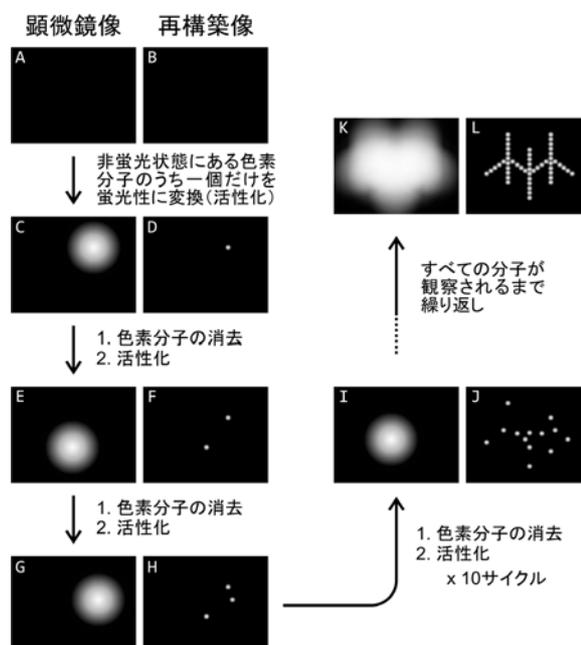


Figure 1: Principle of PALM observation.

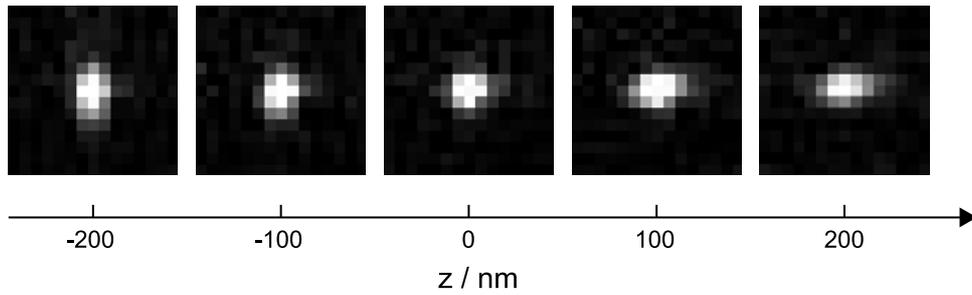


Figure 2: Astigmatic imaging of a single rhodamine B molecule.

が存在する場合、焦点がずれる際に画像に歪みが生じる。ピエゾ素子によって分子の位置を焦点位置からシフトさせると、図 2 に示すようにローダミン分子は楕円形に観察され、わずか 100 nm 程度のシフトでも形状が変化することが分かる。焦点位置から下方にシフトすると縦長に、上方にシフトすると横長の楕円形に観察されるため、楕円の方向から焦点位置からの上下どちらに分子が存在しているのかを決定することが可能である。ここで観察された分子の x 軸と y 軸方向の広がりそれぞれ  $\sigma_x$  および  $\sigma_y$  として、観察された分子の形状パラメーター  $A = (\sigma_x - \sigma_y) / (\sigma_x + \sigma_y)$  を定義する。図 3 は形状パラメーター  $A$  と分子の焦点位置からの z 座標のシフト量の関係を示しており、非点収差を利用することで分子の z 座標を 40 nm の精度で決定できることが分かった。

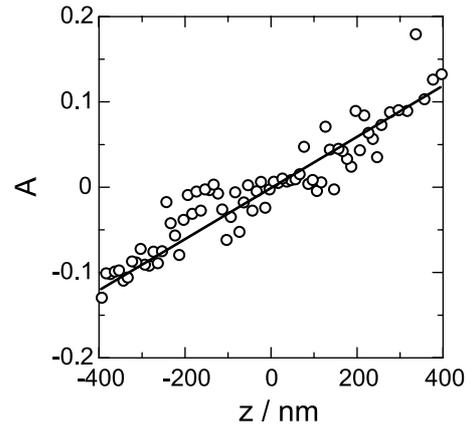


Figure 3: Relationship between the shape parameter and z-coordinate of a rhodamine B molecule.

高さ方向の超解像計測を実現することによって、 $20 \times 20 \times 40$  nm の空間分解能で三次元構造の観察が可能となった。この超解像顕微鏡を用いることで単一高分子鎖の観察を行った。図 4 は厚さ 210 nm の薄膜中に分散したポリブチルメタクリレート (PBMA) 鎖の超解像顕微鏡画像であり、xy-, yz-, および zx-平面への投影図を示している。この結果から、個々の高分子鎖のコンホメーションが三次元空間で明瞭に観察されていることが分かる。この計測から、図中 A および B の鎖は膜の表面近傍に、また鎖 C と D は膜の下方の界面近傍に存在していることが分かる。

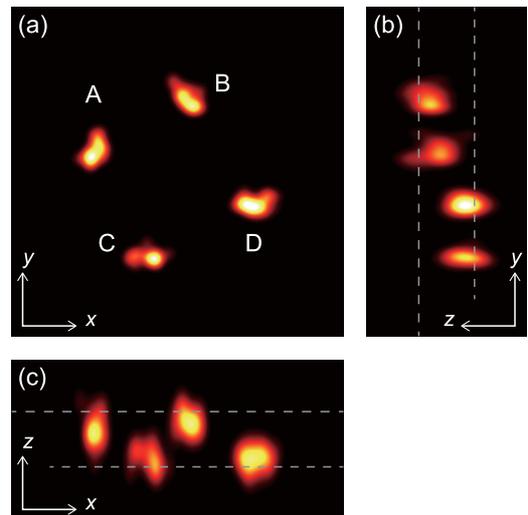


Figure 4: Three-dimensional image of single PBMA chains. The dashed lines indicate the interfaces of the sample film.

超解像顕微鏡の三次元化によって高分子鎖一本のコンホメーションを立体観察することが可能となった。この顕微鏡技術は界面からバルク内部まで高分解能の実空間観察を実現するため、界面での分子レベルの物性を研究する上で有力な手段となることが期待される。

# Properties of Polymer Chain at Interface and Thin Film Studied by Single Molecule Detection Technique

Hiroyuki Aoki

Advanced Biomedical Engineering Research Unit, 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

It is known that the properties of polymer materials at surface/interface are different from those in a bulk state. This is due to the reduced degree of freedom of the polymer chain in the spatial restriction by the surface and interface. The direct observation of the structure and dynamics of individual polymer chains would provide much information to discuss the properties of the soft interface of polymeric materials. The objective of the current work is to develop a novel optical microscopy technique for the direct observation of single polymer chains and to clarify the mechanism of the unique surface properties of polymer materials at the single molecule level. In the previous study, we developed a super-resolution optical microscopy technique, PALM (Photo-Activated Localization Microscopy), which provides an optical image with a spatial resolution less than 20 nm. In this year, we achieved the super-resolution detection of a dye molecule in the height direction for the three-dimensional observation of single chains.

## Results and Discussion

In the PALM imaging, the dye molecules labeled at a specimen are individually observed and the high-resolution image is reconstructed by the molecular position data analyzed from the fluorescence image with the accuracy of  $< 20$  nm. The previous position analysis system detects the xy-coordinate with a nanometric resolution; however, the determination accuracy of the z-coordinate is limited by the focal depth of the microscope, resulting in the resolution several hundred nanometers. In the current study, the localization accuracy of a single molecule in the z-direction was enhanced by an astigmatic effect. A cylindrical lens with a focal length of 10 m was inserted in the optical path of the microscope. The astigmatism by the cylindrical lens distorts the fluorescence image of single molecules, resulting in an ellipsoidal shape. The direction and length of the long axis are dependent on the distance between the focal plane and the molecule. By calibrating the relationship between the observed shape and the distance from the focal plane, the z-coordinate of each dye molecule was determined with an accuracy of 40 nm. By this mechanism, we enabled the direct observation of the conformation of single poly(butyl methacrylate) chains in three dimensions with the resolution of  $20 \times 20 \times 40$  nm.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

- 1) 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*, 44, 4445-4451 (2011).
- 2) Hiroyuki Aoki, Jun-ichi Kakuta, Tomoyuki Yamaguchi, Satoshi Nitahara, Shinzaburo Ito, “Near-infrared Fluorescent Nano-particle of Low-bandgap  $\pi$ -conjugated Polymer for in vivo Molecular Imaging”, *Polym. J.*, 43, 937–940 (2011).
- 3) Li-Ting Lee, Toru Ube, Hiroyuki Aoki, Shinzaburo Ito, “Characterization of Surface Compositions of Phase-Separated Structures in Conjugated Poly(phenylene vinylene) Blends by Scanning Near-Field Optical Microscopy”, *Polymer*, 52, 5897-5903 (2011).
- 4) Michihiro Ogawa, Hiromasa Kataoka, Satoshi Nitahara, Hiroyuki Fujimoto, Hiroyuki Aoki, Shinzaburo Ito, Michiko Narazaki, Tetsuya Matsuda, “Water-soluble Fluorinated Polymer Nano-particle as  $^{19}\text{F}$ -MRI Contrast Agent Prepared by Living Random Copolymerization from Dendrimer Initiator”, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 85, 79-86 (2012).
- 5) Hiroyuki Aoki, Kazuki Mori, Shinzaburo Ito, “Conformational Analysis of Single Polymer Chains in Three Dimensions by Super-resolution Fluorescence Microscopy”, *Soft Matter*, 8, 4390-4395 (2012).

### 2. 著書・総説

- 1) 青木裕之, “単一分子計測による高分子薄膜の物性評価”, *表面科学*, 33, 9-14 (2012).

### 3. 会議発表

- 1) 青木裕之, “単一高分子鎖のコンホメーション評価を実現する超解像光学顕微鏡の開発”, 第1回ソフトマター研究会, キャンパスプラザ京都, 2011/8/3.
- 2) 青木裕之, 森一樹, 伊藤紳三郎, “超解像光学三次元イメージングによる単一高分子鎖の形態評価”, 第60回高分子討論会, 岡山大学, 2011/9/28.
- 3) 青木裕之, “単一高分子鎖の形態と運動性:最新の光学顕微鏡技術による直接観察”, 第12回リングチューブ超分子研究会, 大阪大, 2011/11/2.
- 4) 青木裕之, “ナノ光学イメージングによる高分子材料の構造評価”, ナノ分光部会シンポジウム, 和光, 2011/12/16.

## 1. 緒言

気/液、液/液界面などの変形可能な柔らかい界面（ソフト界面）に形成される吸着膜（ギブズ膜）は、生体膜などの複雑で柔らかいソフトマターの基本骨格であるため、ソフト界面膜の性質や構造に関する研究は、ソフトマターの高度な機能と構造の相関解明に不可欠である。界面における吸着分子間、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 hidrocarbon（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、界面での分子間相互作用や分子配向の観点から非常に興味深い。

FCアルコール（FC12OH； $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_9(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ ）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； $\text{HCF}_2(\text{CF}_2)_8\text{CF}_3$ ）との混合系ギブズ膜に関する界面張力法による研究では、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示唆するデータが得られている。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、FC12OH – HFC10 および FC10diol – C16diol 混合系の多重膜を研究対象とし、界面張力および X 線反射率（XR）測定を駆使して、ギブズ膜の状態および構造の評価を行った。また、これら多重膜は凝縮単分子膜からの相転移により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も着目して研究を展開した。現在までに、以下の知見を得ている。

### 2. 1 FC12OH–HFC10 混合系の多重膜形成

FC12OH – HFC10 および比較として採用した HCアルコール（C20OH； $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{19}\text{OH}$ ） – HFC10 混合系ともに、HFC10 単成分系（ $X_2 = 1$ ）以外の全ての組成で、界面張力 $\gamma$ は濃度 $m$ の増加に伴い減少し、 $\gamma$  vs.  $m$  曲線には FC12OH – HFC10 系では気体膜 – 凝縮単分子膜、C20OH – HFC10 系では膨張膜 – 凝縮単分子膜相転移に対応する折れ曲がりが見られた。更に FC12OH – HFC10 系の限られた組成範囲（ $0.45 \leq X_2 \leq 0.9$ ）では、 $\gamma$  vs.  $m$  曲線の高濃度領域に、単成分系では見られない新たな折れ曲がり確認された。この折れ曲がりの前後で全吸着量  $\Gamma^H$  が約  $6 \mu\text{mol m}^{-2}$ （FC12OH の凝縮単分子膜における吸着量とほぼ同じ）から  $7 \sim 11 \mu\text{mol m}^{-2}$  に不連続に変化したことから自発的な多重膜形成が示唆された。この領域での X 線反射率  $R/R_F$  vs. 散乱ベクトル  $Q_z$  プロットの解析により得られた電子密度プロファイルは、バルクヘキサン相に近い低い電子密度をもつ層が凝縮単分子膜とほぼ同じ高い電子密度を有する単分子膜の上に積層した構造を示しており、多重膜上層では分子のパッキングが緩くなっていることも分かった（Fig.1）。

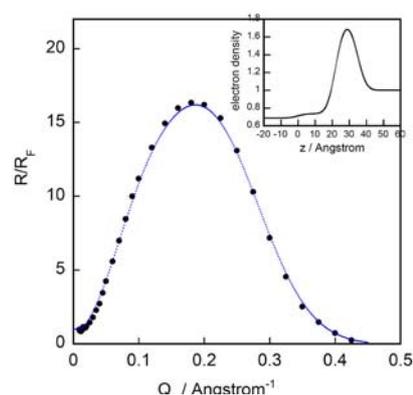


Fig.1 FC12OH-HFC10 系多重膜の反射率および電子密度プロファイル

FC12OH – HFC10 系での多重膜は凝縮単分子膜への分子の自発的積層により形成されるため、その形成メカニズムには凝縮単分子膜の構造が深く関わっている。そこで凝縮単分子膜での分子混和性を比較するために吸着の相図を作成した。C20OH – HFC10 系の場合、HFC10 の吸着膜中での組成  $X_2^H$  は負であり、

HFC10 が界面領域から排斥されていることがわかる。一方、FC12OH – HFC10 系では、多重膜形成が見られた  $0.45 \leq X_2 \leq 0.9$  の範囲で  $X_2^H$  は正であり、HFC10 が明らかに凝縮単分子膜中に混和していることを示している。これらの結果からFC12OH – HFC10 系で見られた多重膜形成について、①FC鎖間の相互作用によりFC<sub>12</sub>OHの凝縮単分子膜中にHFC10 が混和する、②HFC10 が持つ双極子間相互作用やFC鎖間相互作用等が有効にはたらくことでFC分子の積層が誘起される、というシナリオが予想された。

## 2. 2 ヘキサン/水界面における C16diol-FC10diol 混合系の多重膜形成

以前のC20OH – FC10OH (CF<sub>3</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>7</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH) 混合系のヘキサン/水界面吸着膜に関する研究から、界面に垂直配向する2成分が、HC – FC鎖間の弱い相互作用に起因して凝縮膜中で互いに非混合であることを見出した。ここでは、界面における分子の配向が混和性に与える影響を調べることを目的とし、疎水鎖の両末端に親水基を持ち界面に対し水平配向することが期待されるC16diol – FC10diol混合系を採用し、界面張力およびX線反射率測定を行った。

$X_2 > 0.5$  の高組成では、 $\gamma$ - $m$ 曲線上に吸着膜の相転移による明確な折れ曲がりが見られた。一方低組成では、溶液が過飽和の状態では $\gamma$ - $m$ 曲線の傾きが大きくなる傾向が見られた。界面圧 $\pi$ -分子占有面積 $A$ 曲線を描いたところ、膨張膜から凝縮膜の形成を経て分子が自発的に積層した多重膜の形成が示唆された。吸着膜における分子の混和性を議論するために描いた吸着の相図は、膨張膜( $\gamma = 45 \text{ mN m}^{-1}$ )では両分子が互いに混ざりにくいものの、凝縮膜( $\gamma = 35.6 \text{ mN m}^{-1}$ )では相図が負の共沸混合物型となり、HCとFC間の弱い相互作用にもかかわらず互いに混ざりやすいという結果を示した。

また、C16diol – FC10diol系（水平配向系）の膨張膜における剰余ギブズエネルギー $g^{H,E}$ 値はC20OH – FC10OH系（垂直配向系）よりも小さく、凝縮膜では負の値となった。この違いは、①水平配向では垂直配向に比べて1分子に隣接する分子の数が少ないため、HCとFC間の弱い相互作用の寄与が小さく、②異なる分子のOH基間に働く水素結合が単成分系の場合に比べ有効に作用している、ことに起因すると考えられる。また、多重膜ではFC10diolの優先的な積層により、再び互いに混ざりにくくなり積層状態では隣接分子数の増加により①の効果が大きくなるためと考えられる。

C16diol – FC10diol混合系の凝縮膜における反射率 $R/R_F - Q_z$ プロットは、各々の単成分系のプロットとは強度、振幅共に大きく異なり、解析により決定された電子密度の値から見積もられる膜組成は界面張力法から求められたものとほぼ等しくなったことから、2成分が膜中で混和していることを直接的に示すことができた (Fig.2)。さらに多重膜では反射率の値が時間と共に変動し続けたことから、凝縮単分子膜上への分子の積層は均一ではなく、高さ方向に不均一な構造の形成が示唆された。今後はこの多重膜の構造変化について時間分解反射率法を駆使して追跡を試みる予定である。

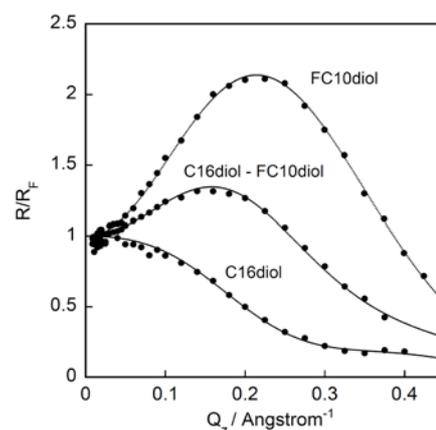


Fig.2 C16diol-FC10diol 系凝縮膜の反射率

# Synergetic effect on multilayer formation of fluorocarbon compounds

at the hexane/water interface

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

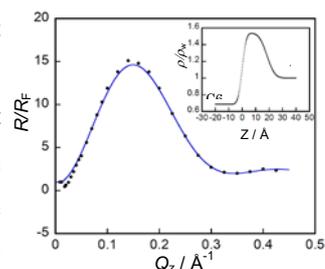
The study on structure and property of soft interfaces including gas/liquid and liquid/liquid interfaces is inevitable to understand structure-function relation of more complicated molecular organizing systems such as biological membrane. Among our systematic studies on adsorbed films by interfacial tensiometry and X-ray reflection (XR), in this study, we aim at discussing the spontaneous multilayer formation of FC compounds at oil/water interface, which is very novel phenomenon at soft interfaces.

1H,1H,10H,10H-perfluorodecane-1,10-diol (FC10diol), 1H,1H,2H,2H-Perfluorododecanol (FC12OH), 1H-perfluorodecane (HFC10), and hexadecane-1,16-diol (C16diol) were employed as materials in this study. The interfacial tension  $\gamma$  of the hexane solution of single and mixed component against water was measured as a function of temperature  $T$ , pressure  $p$ , concentration  $m$ , and composition of the mixture  $X_2$  by the pendant drop method. XR was performed at BL37XU in SPring-8 as a function of scattering vector  $Q_z$ .

**Pure FC10diol system;** The  $\gamma$  vs.  $m$  curve of pure FC10diol system has break point due to phase transition in adsorbed film. The interfacial density  $\Gamma^H$  below the transition was expected for the condensed monolayer with parallel orientation, and that above the transition increased very steeply with a small increase in  $m$ . The film thickness determined by XR above the transition was larger than the molecular length with all-trans conformation. These confirm that the molecules pile spontaneously to form multilayer at the interface. Furthermore, it was suggested that the repulsive surface force between the upper and bottom boundaries of multilayer induces the growth of the multilayer.

**Mixed FC10diol – C16diol system;** Mixing of FC10diol and C16diol in the condensed monolayer with parallel orientation was accompanied by negative excess Gibbsenergy in spite of weak FC – HC interaction. This is striking contrast to the immiscible nature of fluorodecanol (FC10OH) and icosanol (C20OH) with normal orientation. The fitting of X-ray reflectivity  $R/R_F$  vs.  $Q_z$  plot showed that the condensed monolayer consists of the lower part with electron density close to condensed FC10diol monolayer and the upper part with low one, suggesting that hydrogen bonding could be formed between hydroxyl groups of different species due to flexible HC chain. The multilayer formed by preferential piling of FC10diol was supposed to be inhomogeneous in thickness because of time dependent fluctuation of  $R/R_F$  value.

**Mixed FC12OH – HFC10 system;** Multilayer formation was found in a limited  $X_2$  range of the mixed FC12OH – HFC10 system, even though FC12OH forms condensed monolayer at high  $m$  and HFC10 shows negative adsorption at the interface. The two-dimensional phase diagram indicated that the mixing of HFC10 in the condensed FC12OH monolayer induces molecular piling. This is a synergism of FC compounds on multilayer formation. The electron density profile showed that the multilayer consists of two layers; one of which has slightly higher electron density than bulk hexane phase and piles on the lower layer with almost same electron density as condensed FC12OH monolayer.



**Figure**  $R/R_F$  vs.  $Q_z$  plot and electron density profile

## 業績リスト

### 1. 原著論文

- 1) **Takiue T.**, Nakamura F., Sakamoto H., Matsubara H., and Aratono M., "Miscibility and Multilayer Formation of Fluoroalkane- $\alpha,\omega$ -diol Mixture at the Air/Water Interface" *J. Phys. Chem. B*, Vol.115, No.3, 471-477 (2011).

### 2. 著書・総説

- 1) 谷田 肇, **瀧上隆智**, 原田 誠, 永谷広久, 「ソフト界面分子膜の精密構造解析 I X線吸収分光法」, オレオサイエンス誌、12 巻、2012 年

### 3. 会議発表

- 1) Takiue T.  
Multilayer formation in Gibbs films at soft interfaces  
Colloid Seminar in National Taiwan University, 台北, (2011). [国際セミナー 招待講演]
- 2) Tottori T., Tatsuta K., Matsubara H., Aratono M., Takiue T.  
Synergism of Fluorocarbon Compounds on Multilayer Formation at Hexane/Water Interface.  
24th conference of the European Colloid and Interface Society, Berlin, (2011). [国際学会 ポスター]
- 3) Hiroki T., Nakamura N., Shimasaki M., Matsubara H., Aratono M., Takiue T.  
Miscibility in the Adsorbed Films of Hexadecane-1,16-diol and Perfluorodecane-1,10-diol Mixture at the Hexane/Water Interface.  
24th conference of the European Colloid and Interface Society, Berlin, (2011). [国際学会 ポスター]
- 4) 瀧上隆智：放射光を利用したソフト界面膜の構造解析  
第 11 回ヘルスケア研究会, 大阪, (2011). [国内セミナー 招待講演]
- 5) 鳥取拓也, 辰田和穂, 松原弘樹, 荒殿 誠, 瀧上隆智  
ヘキサン/水界面におけるフルオロアルコール - 1H-ペルフルオロデカン混合物の混和性と多重膜形成  
第 63 回コロイドおよび界面化学討論会, 京都, (2011). [国内学会 ポスター]
- 6) 廣木鉄郎, 中村文弥, 松原弘樹, 荒殿 誠, 瀧上隆智  
ヘキサデカン-1,16-ジオールとフルオロデカン-1,10-ジオールのヘキサン/水界面における混和性  
第 63 回コロイドおよび界面化学討論会, 京都, (2011). [国内学会 ポスター] **ポスター賞**
- 7) 瀧上隆智：シンクロトロン X 線反射率測定による液/液界面ギブズ膜の構造解析  
2011 年応用物理学会, 神奈川, (2011). [国内学会 依頼講演]
- 8) 瀧上隆智：ソフト界面膜の構造と状態転移  
2011 年日本化学会・西日本大会, 徳島, (2011). [国内学会 依頼講演]

### 4. その他

- 1) SPring-8 利用者懇談会, 「ソフト界面科学研究会」, 副代表

# 高分子—液体間ナノ界面における高分子鎖シミュレーション解析

研究代表者：(独)産業技術総合研究所

ナノシステム研究部門・森田裕史

## 1. 緒言

従来より、高分子材料を液体に接して使われる機会がしばしば存在する。特に、細胞や生体材料を扱う場においては、水が存在する中での使用は必須の条件であり、このような水に接した環境における高分子材料の特性の解析は、非常に興味を持たれてきている。近年、九州大学の田中敬二教授らのグループの実験によって、本来水に溶けないポリメチルメタクリレート (PMMA) 薄膜を水に接した際における PMMA-水界面において、厚さが 10nm を超えるナノ膨潤層が存在することが、報告されている。また、一方で、液体をアルコールに変えた場合は、PMMA 薄膜全体の膨潤がみられ、その構造について精密に解析がなされている。アルコールでは膨潤するのに対して、水ではマクロな視点では解けないが、ナノの視点では、親和性が高く膨潤するというこの状況は、非常に興味深い。このように、液体に接した高分子材料の実験的な研究が進むとともに、様々な現象の解明が進んでいる一方で、その高分子鎖スケールにおけるメカニズムの解明にまでは至っておらず、今後、分子スケールにおける理解が、物性・構造制御の観点、及び分子設計の立場から望まれている。

以上より、本研究では、粗視化シミュレーションを用いて高分子—液体間ナノ界面における界面場中における高分子鎖のコンフォメーションとダイナミクスを明らかにし、1 分子鎖のサイエンスの観点から、高分子—液体間界面がソフト界面となりうるメカニズムを明らかにすることを目的として進めている。具体的に本研究では、平均場近似を用いた上での分子統計を用いた方法、及び、DPD (散逸粒子動力学) 法のような粒子法を用いた方法などを用いて、モデル化を行い、非溶解状態・膨潤状態・溶解状態の 3 つの状態を理論・シミュレーションから改めて記述し、これらの相の境界について、分子鎖がわかるシミュレーションを用いて明らかにする。

## 2. 研究経過

H23 年度に実施した研究内容として、以下の 2 つについて検討した。

1) 液体—高分子薄膜界面のモデル化を行う。

2) 1) で決定したモデルを用い、高分子の各粒子と溶媒との間の相互作用等を変えながら、非溶解状態から膨潤状態、溶解状態への状態の転移をシミュレーションで、記述する。

液体との界面のモデルの手法として、平均場法を用いたモデル、及び散逸粒子動力学 (DPD) 法を用いたモデルの 2 つのプロトタイプモデルを用いて、検討を行った。平均場法の場合、最も簡単な方法として、Flory-Huggins 混合自由エネルギーを用いて解析を行う。ポリマー 1 成分/溶媒 1 成分の混合系の自由エネルギーを、ポリマーの体積分率  $\phi_p$  に対して Flory-Huggins の  $\chi$  パラメーターを変化させながらプロットし、プロットしたカーブに対して共通接線を引くと、2 つの解 (状態: 矢印で示す) が得られる。この 2 つの状態が、ポリマー膨潤相と液相の 2 つの状態と表される。この中で、ポリマー相に含まれる溶媒量によって、膨潤状態も記述できる。また、共通接線を引くことができない場合は 1 相状態となっていることを意味し、溶解状態を表すこととなる。以上より、平均場法を用いると、非溶解状態、膨潤状態、溶解状態が記述できることが示された。

一方、DPD 法を用いたモデル化においては、粗視化されたモデルを用いて各状態を記述する。DPD 法は、粒子系のシミュレーション法であり、溶媒は 1 つの DPD 粒子、ポリマーは複数の DPD 粒子をばねで連結したモデルとして表す。そして、ポリマーが溶媒に溶けるかどうかは、分子量である連結している DPD 粒子数と、溶媒 (S) 粒子—ポリマー (P) 粒子間の非結合間相互作用  $a_{sp}$  によって決まる。非結合間相互作用  $a_{sp}$  を変えることは、実質的に平均場モデルにおける  $\chi$  パラメーターを変えらることと同義となる。 $a_{sp}$  パラメーターは、斥力相互作用パラメーターであることから、 $a_{sp}$  パラメーターを大きくする、つまり斥力を大きくすると、溶けなくなるように変化させることができる。なお、分子量にもよるが、 $a_{sp}$  が 26.0 以

上になると、ほぼ膨潤状態のみになり、溶けるといいう状況にはない結果が得られ、相境界の値も得ることができた。なお、その結果のスナップショットを図2に示す。また、溶媒(S)粒子—ポリマー(P)粒子間相互作用だけでなく、溶媒(S)粒子—溶媒(S)粒子間、及びポリマー(P)粒子—ポリマー(P)粒子間の相互作用もある。ここでは、ポリマー(P)粒子—ポリマー(P)粒子間の相互作用は変えて計算は行っていないが、溶媒(S)粒子—溶媒(S)粒子間相互作用は変えてテスト計算も行った。具体的には、 $a_{SS}$ を小さくすると溶媒間がよりひきつけられるようになり、溶媒の凝集力が強くなり、ポリマーが溶けにくくなるようにコントロールできる。実際に計算結果から、 $a_{SS}$ を小さくすると溶解速度が落ちる結果が得られており、状態を記述するためのコントロールパラメーターとして有効であることも検討済みである。以上より、相互作用パラメーターを変えることで、DPD法においても図2に示す通り非溶解状態、膨潤状態、溶解状態を記述できることが示された。

H23年度に検討したこれらのモデルは、実際に九州大学で行われている実験に見られる非平衡な膨潤状態の記述に用いることができ、この適用研究における1つの段階をクリアすることができた。H24年度は、さらにモデルを発展させ、モデルの適用の可能性について、検討を進める。

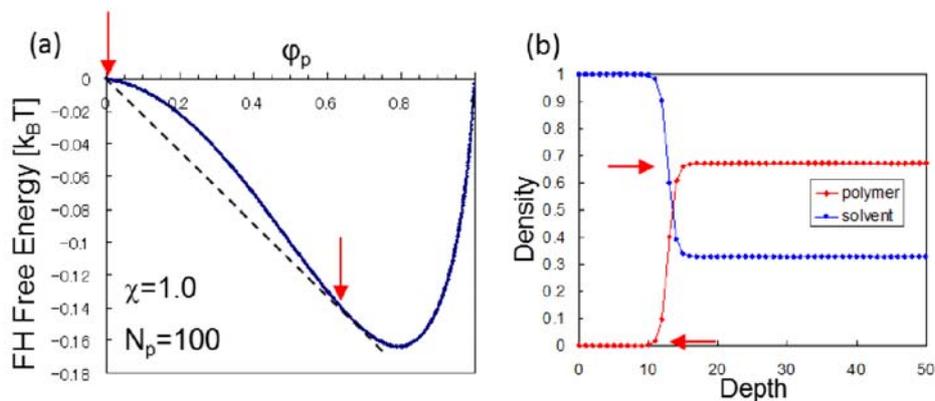


図. 1 (a) Flory-Huggins 自由エネルギーを用いた解析。2つの体積分率状態を共通接線を用いて求める。(b) 体積分率分布としてもとめた際の薄膜の構造。ポリマーの体積分率が0.6~0.7の間にある状態とほぼ0.0の2つの状態が(a)でもとめた2つの状態に対応する。

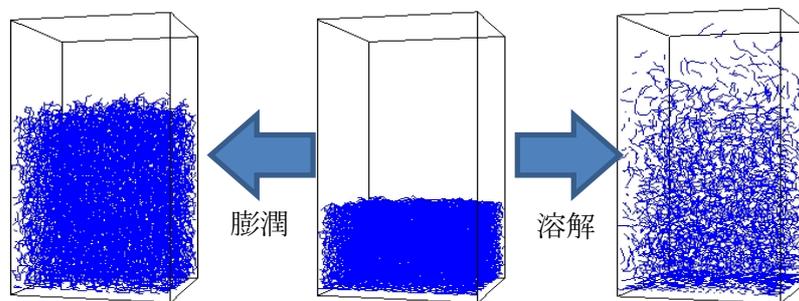


図.2 中央の図を初期構造として DPD シミュレーションで得られた膨潤構造と溶解状態のスナップショット。

さらに、H24年度に連携研究を進めるために、H23年度は本新学術領域において行なわれている様々な実験研究について情報収集を行った。具体的に情報収集したテーマとして、

- ・リングポリマーミセルの構造と物性 (東工大)
- ・末端塩基変異 DNA 担持ナノ粒子間の相互作用 (理研)
- ・高分子電解質ブラシの構造とダイナミクス (各所)
- ・Single stranded DNA と double stranded DNA 鎖の弾性の違い (各所)
- ・生体系にみられる粘着剥離

等が挙げられる。これらの実験研究に対して、理論・シミュレーションからアプローチできる可能性があると考えている。今後、これらのうちのいくつかの実験と、領域内における連携について検討する予定である。

Hiroshi Morita

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

Central2-1, 1-1-1, Umezono, Tsukuba, Ibaraki, Japan  
Tel: +81-29-861-5103, Fax: +81-29-861-5375, E-mail: h.morita@aist.go.jp

Recently, the polymeric materials are sometimes used in the wet conditions such as the medical usage and it becomes important the analysis of the structure and the dynamics of an interface between liquid and polymer surface. Tanaka and co-workers in Kyushu University have studied the structure of the polymer thin film attached with water or alcohol by experiments. They observed very interesting swelling structures; in the case of alcohol, homogeneously swelling film in the direction of film thickness can be obtained, but in the case of water, the swelling nano-interfacial structure can be observed. To study these structures, we make the model of the interface between liquid and polymer and analyze the structure and the dynamics of the polymer chain at the interface.

In this study, we proceeded two items listed below:

- 1) Making the models to represent the interface between liquid and polymer using coarse-grained technique.
- 2) Performing the simulations to realize the separated, swelling and dissolved structures using the previous models with changing the interaction parameters between liquid and polymer.

In this term, we have made two kinds of models for liquid interface. One is the mean field model with using Flory-Huggins free energy and another is the interfacial model using dissipative particle dynamics (DPD) method. In the former method, the liquid-polymer interfacial structure was represented as the interface described by the depth density profiles of polymer and liquid. Using this technique with changing Flory-Huggins interaction parameter, we can represent the separated, swelling and dissolved structures. This indicates that these structures can be represented as the stabilized structure if these are equilibrium structures. On the other hand, we also made the model using DPD method. In the DPD method, all the contents such as solvents and polymers are presented by DPD particles. Solvent molecule was represented as one DPD particle, and single polymer chain was represented as several DPD particles chains connected by spring. The interaction between solvent and polymer was described by the non-bonding interaction between DPD particles like  $a_{xx}$ . Important interactions are solvent-polymer and solvent-solvent interactions. " $a_{xx}$ " interaction parameter is the repulsive parameter and larger  $a_{xx}$  indicates the strong repulsive interaction. Therefore, in the case of smaller  $a_{sp}$  (solvent-polymer interaction), polymer can easily dissolve into the solvent, and in the case of smaller  $a_{ss}$  (solvent-solvent interaction), strong cohesion force occurs in the solvent phase and polymer cannot dissolve into the solvent phase. From our series of simulations, we can represent the separated, swelling and dissolved structures, and we can obtain the phase boundary along the interaction parameters.

We also consider that the collaborative study within the research area of soft interface is much important. In the H23 research term, we started examining the collaborative study with experiments, and selected several candidates for the collaborations between experiment and simulation. In the next term, we will try to make the model fitted to these experiments, and will analyze to clarify the effect of the soft interface.

## 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) Hiroshi Morita, Ichiro Okabe, Saurabh Agarwal, Vivek K. Singh, “Mesoscale simulation of the line-edge structure during positive and negative tone resist development process” , Proc. SPIE, 8325, 83250J, (2012)

### 2. 著書・総説

### 3. 会議発表

1) 森田裕史, “ネガ型レジスト高分子薄膜の溶解プロセスシミュレーション”, 第 60 回高分子学会年次大会, 2011 年 5 月 25 日, 大阪国際会議場(大阪府).

2) Hiroshi Morita, “Dissolution process simulation of the resist film”, International Workshop for Molecular Simulations for Polymers, 2011 年 9 月 9 日, 京都大学化学研究所(京都府).

3) 森田裕史, “水-高分子界面のモデル化と高分子鎖のシミュレーション”, 第 31 回表面科学講演大会 ソフトナノテクノロジー 研究部会, 2011 年 12 月 15 日, タワーホール船堀(東京都).

4) Hiroshi Morita, Ichiro Okabe, Saurabh Agarwal, Vivek K. Singh, “Mesoscale simulation of the line-edge structure during positive and negative tone resist development process” , SPIE advanced lithography, 2012 年 2 月 14 日, San Jose Convention Center(アメリカ合衆国カリフォルニア州).

5) 森田裕史, “液体に接した高分子ソフトナノ界面における高分子鎖シミュレーション”, 第 92 日本化学会春季年会 特別企画講演 ソフト界面を活かした先端化学, 2012 年 3 月 28 日, 慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県).

### 4. その他 (例えば特許など)

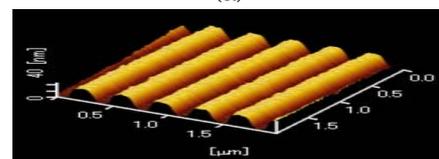
## 1. 緒言

プラズモニックチップ(=金属薄膜でコーティングした波長オーダーの周期構造をもつチップ、Figure 1(a), 1(b))を用いた増強蛍光法によるバイオセンシングでは、表面プラズモン共鳴法(ビアコア)と比べ、5桁ほど高感度な抗原抗体反応の検出が可能であると同時に、非常に小型かつ簡便な装置での計測が期待できる方法である。

本研究では、高 S/N・高感度なマーカー検出を目指し、チップ表面層を酸化亜鉛でコーティングしたプラズモニックチップに、非特異吸着を抑制し、様々な種類の抗体に対して高密度な抗体修飾が可能なソフト界面を形成し、サンドイッチアッセイによる高感度なマーカー計測を目指した。



(a)



(b)

Figure 1. (a) プラズモニックチップの写真、(b)プラズモニックチップのプロープ走査型顕微鏡像

## 2. 研究経過

### 2.1. プラズモニックチップ作製と表面修飾

ピッチ 350nm の周期構造基板は石英モールド (NTT-AT 社製) と光硬化性樹脂 (東洋合成工業 PAK-02A) を用いて光ナノインプリント法により PMMA 基板上に作製した。このレプリカ上に銀薄膜 (膜厚 30~40nm) と ZnO 薄膜 (膜厚 20nm)、銀薄膜との界面には接着層として膜厚 1nm 以下の Cr 薄膜を rf スパッター法により成膜し、プラズモニックチップとした。プラズモニックチップの表面層は ZnO であるが、ZnO はシリカと異なり、UV 照射による洗浄ができなかったため、成膜後そのまま 2 種類のシランカップリング剤 (Figure 2 (I), (II)) を用いて、ビオチンを標識した PEG をリンカーとするソフト界面を作製した。1 ステップでビオチン標識するほうが、2 ステップの化学反応によるビオチン標識よりも、ビオチンの結合密度が大きくなることが期待できた。

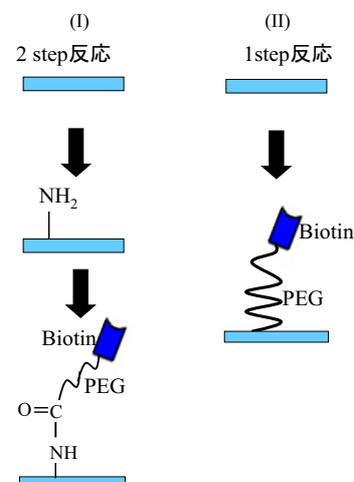


Figure 2. シランカップリング反応によるビオチン標識方法 (I)2step 反応と (II)1step 反応。

### 2.2. 増強蛍光強度の評価

このチップにカバーガラスを両面テープで貼り合わせ、隙間に MilliQ 水を入れ、Figure 3(a)に示す光学系で、チップを試料回転ステージにセットした。試料への入射角  $\theta$  と同期して  $2\theta$  で回転するもう一つのステージ上に Si フォトダイオードを設置し、入射角に対する反射率を計測した。結果は、Figure 4 に示すとおりである。共鳴角が 12 度であることがわかったので、入射角を 12 度に固定し、光学系を Figure 3(b)とした。検出器をフォトダイオードから光電子増倍管に変え、蛍光強度を検出角に対して計

測した。

10nM に調製された Cy5 標識ストレプトアビジン溶液を注入し、5 分のインキュベーション後、リン酸緩衝液で洗浄して、蛍光強度を検出角に対して計測した。その結果、Figure 5 に示すように、23 度に蛍光ピークが見られた。これは蛍光のプラズモンポラリトンとの再結合による（リバースカップリングモードによる）蛍光増強である。

ビオチン標識 (I) と (II) で蛍光ピークの蛍光強度を比較したところ、表 1 に示す通りとなった。非特異吸着の抑制は (I) のチップのほうが大きかったが、特異結合によるシグナルは (II) のほうが 2 倍以上大きく、より高密度にビオチン化できたことがわかった。また (II) における非特異吸着も 6% に留まり、十分に抑制できていることから、アッセイに利用するチップとしては (II) のほうが有効であると考えられた。一方、PEG リンカーを有する界面の非特異吸着抑制効果を調べたところ、酸化亜鉛薄膜への非特異吸着量と比べて 1/7 に抑制していることがわかった。

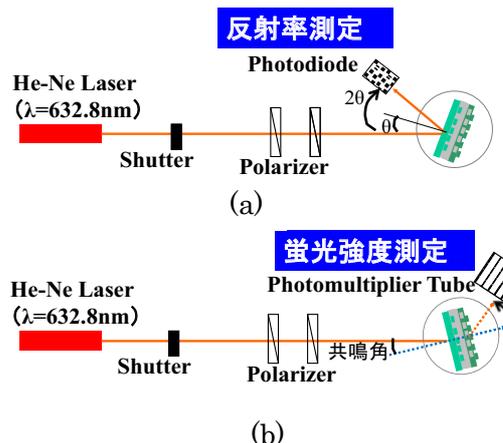


Figure 3. (a) 反射率計測のための光学系。(b) 蛍光強度計測のための光学系。

### 2. 3. サンドイッチアッセイへの応用

プラズモニックチップ上に PEG リンカーでソフト界面を形成し、抗体を修飾してサンドイッチアッセイを構築した。cy5 蛍光標識検出抗体でマーカー濃度を評価することができる。マーカーとして C-reactive protein (CRP) を選び、cy5 標識抗 CRP 抗体の蛍光強度を計測した結果、非特異吸着量が多く、高感度計測はできなかったが、酸化亜鉛-銀コーティングプラズモニックチップでサンドイッチアッセイによる計測ができた。

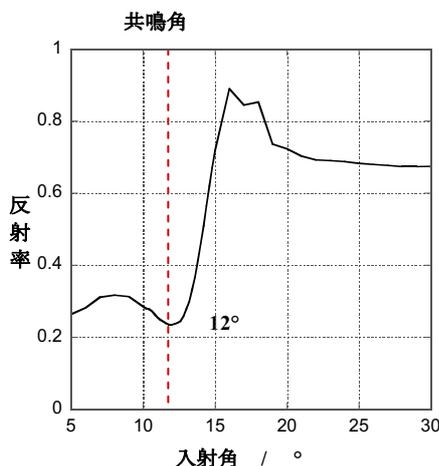


Figure 4 入射角に対する反射角の計測結果。

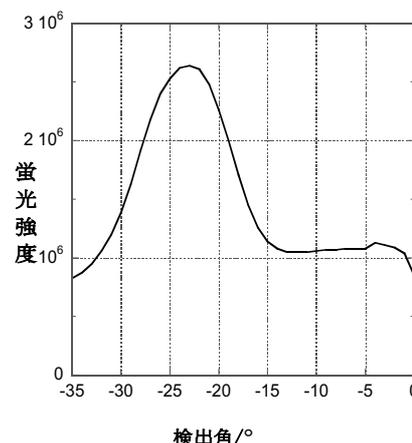


Figure 5 検出角に対する蛍光強度の計測結果。

今後、ブロッキング剤の検討や CRP 以外のマーカーの検出を行って、酸化亜鉛-銀コーティングプラズモニックチップの非特異吸着抑制と、高感度蛍光検出 (= 低濃度マーカー検出) が可能なチップ開発を行っていきたい。

表 1 プラズモニックチップのビオチン標識 (I) ,(II)における蛍光強度の比較 (特異結合と非特異吸着) および、ZnO コーティングガラスの表面修飾の有無における非特異吸着による蛍光強度の比較

チップ	特異結合の蛍光強度/cps	非特異吸着の蛍光強度/cps
<b>プラズモニックチップ</b>		
(I) のビオチン標識	$1.2 \times 10^6$	$1.9 \times 10^4$
(II) のビオチン標識	$2.7 \times 10^6$	$1.7 \times 10^5$
<b>スライドガラス</b>		
ZnO 成膜チップ	-	$6.8 \times 10^4$
ZnO 上に (II) の表面修飾	-	$1.0 \times 10^4$

Highly sensitive biomarker detection with a fluorescence enhanced on a plasmonic chip modified with a soft interface

Keiko TAWA

Health research institute, AIST

Ikeda, Osaka 563-8577, Japan  
+81-72-751-9243, tawa-keiko@aist.go.jp

## 1. Introduction

Plasmonic chip is a metal coating grating with wavelength-scale periodic structure. The incident light irradiated at resonance angle provides the enhanced electric field and it was utilized as a excited field for fluorescent molecules. As a result, the enhanced fluorescence was observed and it can be applied to the biosensors.

In this study, the plasmonic chip surface was modified with soft interface in order to suppress the non-specific adsorption. The plasmonic chip with high sensitive detection and suppressing non-specific adsorption was studied.

## 2. Plasmonic chip fabrication and surface modification

The replica was fabricated by uv-nanoimprint lithography using a mold (NTT-AT, Japan) and a uv-curable resin (PAK-02A, TOYO GOSEI, Japan) and it was coated with 35nm-thick-silver and 17nm-thick-zinc oxide films and 1nm-thick Cr layers (adhesive layers). The pitch and groove depth were 350 nm and 30 nm.

The ZnO surface was modified with two kinds of biotinylation using silan-coupling methods. (I) 2-step reaction: 3-aminopropyltriethoxysilane and NHS-PEG-biotin, (II) 1-step reaction: silane-PEG-Biotin.

## 3. Fluorescence measurement

The cy5-labeled streptavidin and the cy5-labeled BSA were used for a marker specifically binding to biotin immobilized to the plasmonic chip and a protein for non-specific adsorption, respectively. The fluorescence was measured as following way; The light source was He-Ne laser and incident light was irradiated from rear of chip panel. The fluorescence intensity of cy5 was measured against the incident angle with photomultiplier tube set at normal direction to chip surface. As a result, the fluorescence of (II) was two-times larger than that of (I), although the fluorescence intensity of (II) for non-specific adsorption was also larger than that of (I). However, the ratio of non-specific adsorption to the specific binding was around 6 % in (II) system. Therefore, the plasmonic chip modified with (II) was found that it can provide higher sensitive detection and well suppressing non-specific adsorption in biosensing.

## 4. Application to sandwich assay

In the bio-assay system we used, a marker protein was labeled, but in order to realize biosensing application, sandwich assay system is essential. It means that the marker is non-labeled and the anti-marker antibody must be labeled. In this study, c-reactive protein (CRP) was used for a marker and sandwich assay was constructed on the plasmonic chip modified with PEG linker. The CRP marker was detected but the sensitivity was not high, because the non-specific adsorption was well not suppressed. In the next step, the blocking reagent and the kind of marker will be considered for well suppressing non-specific adsorption.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

- 1) Keiko Tawa\*, Yoshiki Yokota, Kenji Kintaka, Junji Nishii, Takahiko Nakaoki, “An application of a plasmonic chip with enhanced fluorescence to a simple biosensor with extended dynamic range”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **157**, 703–709 (2011).
- 2) Keiko Tawa\*, Xiaoqiang Cui, Kenji Kintaka, Junji Nishii, Kenichi Morigaki, “Sensitive bioimaging in microfluidic channels on the plasmonic substrate: Application of an enhanced fluorescence based on the reverse coupling mode”, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **221**, 261–267 (2011).
- 3) Keiko Tawa\*, Takamitsu Hattori, Mitsuo Umetsu, and Izumi Kumagai, “Zinc Oxide-Coated Plasmonic Chip Modified with a Bispecific Antibody for Sensitive Detection of a Fluorescent Labeled-Antigen”, *Analytical Chemistry*, **83**, 5944–5948 (2011).

### 2. 著書・総説

特になし

### 3. 会議発表

- 1) Keiko Tawa, “Rapid and Sensitive Detection of Bio-Markers on the Plasmonic Chip”, IUPAC2011 国際分析科学会議 (ICAS2011) 2011/05/24, 京都(京都国際会館) (招待講演)
- 2) 横田 佳樹、田和 圭子、原 とも子、上垣 浩一、小島 正己、中沖 隆彦、“プラズモニクチップを用いた迅速・高感度うつ病マーカー検出法の研究” 高分子学会年次大会 2011/05/26, 大阪 (ポスター)
- 3) 田和 圭子、“表面プラズモン共鳴励起増強蛍光による バイオセンシング” 高分子サロン (高分子学会関西支部) 2011/10/06, 大阪 (招待講演)
- 4) 田和 圭子、梅津 光央、熊谷 泉 “酸化亜鉛コーティングプラズモニクチップを用いた高感度腫瘍マーカー計測”, ソフトインターフェースの分子科学 2011/11/4, 富山 (ポスター)
- 5) Keiko Tawa, “Bio-Marker Detection with an Enhanced Fluorescence on a Plasmonic Chip”, 15<sup>th</sup> International conference of thin film 2011 (ICTF-15) 2011/11/11, 京都
- 6) Keiko Tawa, “Sensitive Bio-Marker Detection with a Plasmonic Chip”, International symposium on surface science (ISSS-6) 2011/12/13, 東京 (招待講演)
- 7) 田和 圭子、東 洋輔、笹川 知里、中沖 隆彦、梅津 光央、中澤 光、熊谷 泉 “高感度バイオマーカー検出のための酸化亜鉛コーティングプラズモニクチップ表面のバイオチン化” MRS-J 2011/12/19、横浜

### 4. その他

特になし

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”」



# 生体高分子の有するソフトインターフェイスを活用した 新奇超分子不斉光化学反応系の構築

研究代表者: 東北大学多元物質科学研究所・和田 健彦

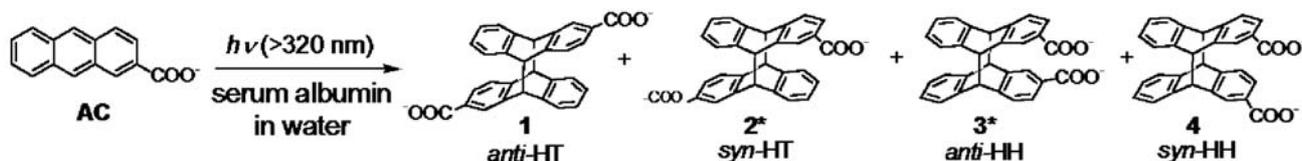
**1. 緒言:** 近年光学活性化合物は、医学・薬学のみならず農薬、化学など多くの分野において必要不可欠な化合物であり、その需要は高まっており、不斉合成化学は現在最も研究が活発に行なわれている分野の一つである。これまでに不斉修飾金属触媒を中心とした熱的な不斉合成反応について様々な方法論が開発され、高いエナンチオ選択性が報告され、実用化も一部達成されている。しかし、熱反応は有機溶媒の大量消費や熱エネルギーの放出など、環境負荷が大きく、必ずしも最適な系であるとは言えない。一方、環境負荷の少ない光を駆動力とする不斉光化学反応は、環境適合型プロセスとして注目されているだけでなく、熱反応とは異なり、反応温度の制約を受けず低温で反応可能であり、熱反応では合成困難、もしくは熱反応で多段階ステップを有する化合物を1段階で合成できるといった利点を持ち、熱的不斉合成と相補的もしくは代替プロセスとして期待される。

このような背景の下、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事が期待される。これまで、超分子不斉環境場として、シクロデキストリン、キラル格子、キラル修飾ゼオライトなどを利用した系が報告され、これらが有効な反応メディアとして機能することが明らかにされている。しかし、キラル超分子の種類、適用基質や反応例は比較的限定されており、一般的な方法論とは未だなり得ていない。

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"=インターフェース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。この"バイオインターフェース"は、多くの場合均一水溶液系とは大きく異なる疎水性マイクロ相分離ドメイン・規制反応空間である。このような環境下では、反応基質、そして反応基質とタンパク質表面は近接して存在する確立が高くなり、局所濃度の増加、さらには分子間距離の接近効果が予想され、均一溶液系では弱い相互作用と考えられている水素結合、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バイオインターフェースと相互作用する光反応基質分子が、バイオインターフェースの作り出す「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、弱い相互作用でもソフトインターフェイスを活用し、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。

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。

本年度はヒト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、そして反応温度の光学収率におよぼす影響について検討した。



Scheme 1. Photocyclodimerization of AC.

**2. 研究経過**：先ず、HSA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。HSA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、1分子のACが非常に強く結合する第1サイト、第2サイトにAC 1分子が、3分子のACが結合する第3ならびに5分子のACが結合する第4サイト、そして10分子以上がカルボキシレートとして結合する第5サイトの少なくとも5つの結合サイトが存在することを明らかとした。すなわち、HSAにはACに対する独立した5つのキラルな結合サイトを有することが明らかとなった。さらにHSAのAC結合サイトの情報を得るため、結合部位・結合挙動が報告されている化合物を拮抗阻害剤とするACの結合阻害実験を行った。HSAに対する4-ヨード安息香酸 (IB)、ワルファリン (War) の結合部位、結合挙動はNMRおよびX線構造解析に基づき明らかにされており、これらを拮抗阻害剤とすることにより、HSAに対するACの結合部位の特定が可能になる。これらの検討の結果、IBがACの第1サイトに選択的に結合していることが明らかとなった。一方、War存在下の滴定実験から、WarはACの第2サイトを選択的に阻害することが明らかとなった。すなわち既に報告されているX線構造解析結果と比較検討することで、HSAに対するACの第1および第2サイトの部位が明らかになり、第1サイトのACの結合定数が  $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  と非常に大きな値であることを明らかとした。

ACのHSAに対する結合挙動、ならびに各結合サイト環境に関する情報が得られたので、これらの情報を基に種々のAC/HSA比におけるACの超分子不斉光反応について検討した。ACが第1、第2サイトに存在するAC/HSA = 1~2の系においては、全く光反応が進行しなかった。これは、AC/HSA = 1では第1サイトに1分子のACが強固に結合しており、反応に関与する分子が存在しないためと考えられる。一方、第2サイトに存在するACは、サイト内で孤立している上、近接するTrpにより効率よく消光されるため、反応しないと考えられる。つまり、第1、第2サイトは非生産的結合サイトである。

一方、AC/HSA = 3以上では環化二量化反応が進行した。HSA存在下での光反応においては、いずれの混合比においても *head-to-tail* (HT) 二量体が優先して生成し、HH/HT比は水中における値から大きく変化せず、HT二量体が優先して生成するBSA存在下の光反応とは大きく異なった。これは各サイト内においてカルボキシレート基を互いに反対方向に位置する形で、HSAに結合していることに基づくと考えられる。

エナンチオマー過剰率(ee)に着目すると、水中で優先的に生成するHT生成物である**2**のeeが、AC/HSA = 25というAC過剰条件下においても50%eeと予想外に高い値となった。水中にACが存在すると、HSAに結合したACより速い速度で二量化してラセミ体を生じるため、eeの劇的な減少が観測されると予想されるが、50%eeとかなり高いee値を維持していることから、25当量のAC添加系においても、フリーACは少ないことが示唆され、ACはHSA表面に緩やかに結合していると考えられる。

一方、3当量のAC添加系において、**2**および**3**のいずれもが79%ee、87%eeと室温での不斉光化学反応としてはこれまでで最高のeeで得られ、HSAの第3サイトが極めて高い不斉識別能を有することが明らかとなった。**2**のeeは、AC/HSA比の減少に伴い、一様に増加していることから、第3~第5サイトまで同じエナンチオマーを与え、第3サイトが高いエナンチオ識別能を有していることが示された。しかし**3**のeeは、3当量添加系において87%eeと極めて高い値を示したのに対し、第4サイトにもACが分布する5当量添加系においては、42%eeまで劇的に減少した。5当量以降、25当量添加系での14%eeまでは緩やかにeeが減少したことから、第4サイトに結合するACは、第3サイトと対掌体のAC二量体を優先して生成することが示唆された。

以上の知見に基づき、3当量存在下での光反応を5℃で検討した結果、**3**のeeは90%eeまで向上し、光反応としては過去最高の値が得られた。これは低温にすることにより、第3サイトの結合定数が増大し、第4サイトに存在するACが低減したことと、eeに対する温度効果に基づくと考えられる。

以上、本年度はHSAに対するACの結合挙動ならびに、HSAを不斉光反応場とするACの超分子不斉光環化二量化反応について検討した。各種分光分析法を用い検討するとともに、多くの薬物や脂質などの結合挙動、結合サイトなどに関する情報が報告されているHSAの特徴を活かし、4-ヨード安息香酸、ワルファリンを拮抗阻害剤とするHSAに対するACのCD滴定実験により、ACの第1ならびに第2サイト部位を特定することに成功した。さらにHSAを不斉反応場とするACの超分子不斉光環化二量化反応において、最高90%eeが得られ、HSAが極めて有効な不斉光反応場として機能することを明らかとした。

# Supramolecular Photochirogenesis with Soft-interface of Biopolymers as Efficient Chiral Reaction Medias

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 ones; 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 therefrom 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 photosubstrate (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. Increasing attention has been directed towards the new methodology of photochirogenesis using various bio- and biorelated supramolecular systems, such as cyclodextrins, DNA, and proteins, and so on. In the confined space of a supramolecular system non-covalent weak interactions can be enhanced or modified to significantly influence the regio- and/or stereoselectivity of the photoreactions occurring in the confined media.

In this paper, we will concentrate on the bio- and biorelated supramolecular asymmetric photochirogenesis (SMAP) in confined media, which employ 1. proteins and 2. double stranded DNA (dsDNA).

**2,3. Results and Discussion.** **1.** The biopolymers, especially proteins, possessing chiral binding pockets for guest, are of particular interest as potential chiral hosts for SMAP, although such an approach has not extensively been investigated. Bovine and Human serum albumin (BSA&HSA) binds exogenous aromatics in its hydrophobic pockets. We have proposed BSA&HSA-mediated supramolecular photochirogenesis, in which stereogenic centers are generated in photoproduct through the supramolecular interactions. 2-Anthracenecarboxylate (AC) was employed as a prochiral substrate. In this first supramolecular photochirogenesis using achiral substrate, we demonstrated: (1) BSA&HSA possesses four discrete AC-binding sites of different affinity, stoichiometry, and chiral environment, (2) BSA&HSA-mediated photodimerization of AC switches the original regioselectivity from head-to-tail (HT) to head-to-head (HH), and (3) affords optically active HT and HH dimers of up to 82% and 90% ee, respectively.

**2.** Recently, with completion of the human genome project, chemistry of DNA has received much attention. Possessing both chromophoric nucleobase and chiral furanose moieties, DNA is expected to function as supramolecular chiral sensitizers, where the helical grooves of dsDNA provide the chiral environment for SMAP. Thus, we employed DNA and nucleosides as chiral (supra)molecular photosensitizer for enantiodifferentiating isomerization of (*Z*)-cyclooctene to chiral (*E*)-isomer. Pyrimidine nucleosides as chiral sensitizers gave (*E*)-isomer of up to 21% ee. Interestingly, photosensitization with calf thymus DNA gave (*E*)-isomer of up to 29% ee. Thus, we have demonstrated for the first time that nucleosides and dsDNA function as chiral photosensitizers.

1) Supramolecular Asymmetric Photoreactions, T. Wada and Y. Inoue, *Organic Molecular Photochemistry*; Ramamurthy, V.; Inoue, Y. Ed.; Marcel Dekker: New York, 341 (2004).

2) Wada, T.; Nishijima, M.; Fujisawa, T.; Sugahara, N.; Mori, T.; Nakamura, A.; Inoue, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7492.

3) Nishijima, M.; Wada, T.; Mori, T.; Pace, C. S. T.; Bohne, C.; Inoue, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3478..

4) Nishijima, M.; Pace, C. S. T.; Nakamura, A.; Mori, T.; Wada, T.; Bohne, C.; Inoue, Y., *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2707.

## 【原著論文】

1. Maeda, Ryo; \*Wada, Takehiko; Mori, Tadashi; Kanomata, Nobuhiro; Inoue, Yoshihisa, "Planar-to-Planar Chirality Transfer in the Excited State. Enantiodifferentiating Photoisomerization of Cyclooctenes Sensitized by Planar-Chiral Paracyclophane," *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 10379-10381 (2011).
2. Maeda, Ryo; \*Wada, Takehiko; Mori, Tadashi; Iwamoto, Masakazu; Inoue, Yoshihisa, "Role of entropy in supramolecular photochirogenesis: enantiodifferentiating photoisomerization of cyclooctenes in chiral sensitizer-immobilized MCM-41 cavities," *Photochem. Photobiol. Sci.* **10**, 1390-1392 (2011).
3. Wada, Takehiko; Araki, Yasuyuki; Inoue, Yoshihisa, "Novel strategy of supramolecular asymmetric photochirogenesis with tailor-made biopolymers as chiral reaction fields," *J. Photopolym. Sci. Tech.*, **24**, 595-596 (2011).
4. Sakamoto, Seiji; Terauchi, Mika; Taki, Shusaku; Kim, I. Tanner; Araki, Yasuyuki; Wada, Takehiko, "Design of a dual-color detection system for caspase activities using a combination of split-fluorescent proteins and split-intein," *Peptide Science*, **48**, 224-225 (2011).
5. Wada, Takehiko, "Supramolecular Asymmetric Photochirogenesis with Biopolymers as a Chiral Reaction Field," *J. Surf. Sci. Soc. Jap.*, **32**, 627-633 (2011).
6. Wada, Takehiko, "External Stimulation Responsive Artificial Nucleic Acids," *Rev. CSJ. Curr. Rev.*, **6**, 71-77 (2011).
7. Wada, Takehiko, "Intracellular environmental condition responsible artificial nucleic acids for cancer cell specific gene therapeutics," *High Tech. Information*, **10**, 169-177 (2011).

## 【解説・総説】

1. 和田健彦, 生体高分子をキラル反応場として活用した超分子不斉光化学系の創製 - 環境調和型不斉合成法の開発を目指して -, *高分子*, **60**, 757-761 (2011).
2. 和田健彦, 刺激応答性人工核酸, *核酸化学のニュートレンド*, 化学同人, 71-77 (2011).
3. 和田健彦, フロンティア生命化学研究会にとっての世界化学年..., *生命化学研究会レター*, **35**, 3-5 (2011).
4. 和田健彦, 耐震補強工事の思わぬ「弱点」 - 東北大学多元研の例から -, *化学*, **66**, 38-39 (2011).
5. 和田健彦, 阪神淡路大震災、そして東日本大震災を経験して..., *生命化学研究会レター*, **36**, 43-48 (2011).

## 【著書】

1. 和田健彦, 「4. 生物に学ぶ機能制御法 - 細胞内環境応答性人工核酸の創製-」, *次世代バイオミメティック研究の最前線 - 生物多様性に学ぶ -*, 下村政嗣監修, CMC 出版, 169-178 (2011).

## 【国内学会発表】

招待講演 (抜粋):

1. 和田健彦, "細胞内環境応答型人工核酸の創製-がん細胞特異的がん治療薬の構築を目指して -, " 第5回バイオ関連シンポジウム, つくば, 9月 (2011).
2. 和田健彦・菅原 唯・宮地亜有実・湊咲絵・坂本清志・木戸誠・宇井美穂子・荒木保幸・西嶋政樹・津本浩平・金原数・井上佳久, "フェージディスプレイ法を活用した新規超分子 不斉光 反応系の構築," 第60回高分子討論会, 岡山, 9月 (2011).
3. 和田健彦・水谷達哉・上松亮平・坂本清志・荒木保幸・山吉麻子・村上章, "ペプチドリボ核酸-DNA キメラ人工核酸の合成 と核酸認識および遺伝情報発現制御への展開-3," 第60回高分子討論会, 岡山, 9月 (2011).
4. 和田健彦, "生体高分子の機能材料への展開と動的機能制御 - 核酸とタンパク質の特性の活用を目指して -, " 京都大学 iCeMS シンポジウム, 京都, 7月 (2011).
5. 和田健彦, "新規高感度・高時間分解能円二色性(CD)検出システムの開発 - 機能性生体分子構造変化の動的挙動解明を目指して", 第13回歯工学連携講演会, 北九州, 11月 (2011). (他3件 (一般講演27件))

## 【国際学会発表】

招待講演 (抜粋):

1. T. Wada "Nobel Strategy for External Stimulus Responsible Artificial Nucleic Acids - Toward the Creation of Cancer Cell Specific Gene Therapeutic Oligonucleotides - " *1<sup>st</sup> France-Japan Work shop on Bio-Inspired Approaches*, 23 April, Bordeaux, France (2011).
2. T. WADA, "Novel Strategy of Supramolecular Asymmetric Photochirogenesis with Tailor-made Biopolymers as Chiral Reaction Fields", *The Conference of Photopolymer Science and Technology (CPST) 2011*, 24 June, Chiba, Japan (2011).
3. Takehiko Wada,<sup>1\*</sup> Tatsuya Mizutani,<sup>1</sup> Akira Nagami,<sup>2</sup> Seiji Sakamoto,<sup>1</sup> Yasuyuki Araki,<sup>1</sup> Shiroh Futaki,<sup>3</sup> Yoshihisa Inoue, "Novel strategy for cancer cell specific oligonucleotide therapeutics with intracellular environmental condition responsible Peptide Ribonucleic Acids," *Controlled Release Society (CRS) Annual Meeting*, 1st August, Washington DC, USA (2011).
4. T. Wada, "Bio and Chemical Biology / Tailor Made Biopolymers: Peptide Ribonucleic Acids (PRNAs): Novel Strategy for Active Control of RNA Recognition by External Factors & Supramolecular Asymmetric Photochirogenesis with Biopolymers," 1st TEKES - IMRAM Joint Work Shop on Advanced Materials and Devices, July 14<sup>th</sup>, Sendai (2011). (他一般講演7件)

# 小腸壁における濡れダイナミクスのコントロール

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。われわれはこれまでに、小腸表面の構造を模倣したモデル小腸壁「フラクタル寒天ゲル」の開発に成功した[1]。このゲルの表面には大きな凸凹の中にさらに小さな凸凹が存在する階層性凸凹が存在しており、微絨毛・絨毛・ひだの三つの階層からなる小腸壁表面の界面物性を本質的に模倣している。また、高速カメラ撮影によってフラクタル表面上を液体が濡れ広がる速度を定量的に評価する技術も確立、超凸凹構造によって水が寒天ゲル表面上を濡れ広がる速度が速まることも確認した。さらに、凸凹表面を液体が濡れ広がる挙動を自由エネルギーの観点から再考した基本モデルを構築した[2]。

生体表面における濡れダイナミクスをコントロールする技術は、小腸壁における薬剤の吸収効率を高めたり、新たなダイエットサプリメントの開発につながることで期待されるため、われわれはより強力な濡れコントロール剤の探索に取り組んできた。その結果、アルコールの添加が濡れ速度に及ぼす影響を評価し、プロパノールを適量添加すると寒天ゲル上を濡れ広がる速度が劇的に高まることを見出した[3]。また、探索したコントロール剤を適当量、小腸に送達する技術の開発も望まれる。これまでも pH 依存型放出制御剤や時間制御型放出制御剤、プロドラッグを利用して腸に特異的に薬剤を送達する方法が開発されているが、今回われわれは、リキッドマーズと呼ばれる疎水性粒子によって覆われた pH 応答性カプセルを開発したので報告する[4]。

## 2. 研究経過

### 2.1. プロパノールの添加による濡れ速度の促進

平らな寒天ゲルに水を滴下した時とプロパノール水溶液を滴下した時では、その濡れ広がる速度が全く異なった。Fig. 1 に高速カメラで観察した液滴の変化の様子を示す。水も 9%プロパノール水溶液も寒天ゲル上を速やかに濡れ広がったが、その速度は 9%プロパノール水溶液の方がはるかに速かった。Fig. 2 に接触角の経時変化を示す。着液 10ms 後および 100ms 後にはどちらの液体の場合も接触角は約 30 度、約 10 度であったが、その後の濡れ広がる速度には劇的な違いが現れ、1000ms 後には水の接触角が 7 度だったのに対し、プロパノール水溶液では 2 度であった。このような劇的な濡れ速度の上昇は、我々が検討した他の直鎖アルコール水溶液では観察されなかっただけでなく、プロパノール濃度が 8%以下の時も現れなかった。また、フラクタル寒天ゲル上でも起こっていない。

プロパノール添加による濡れ促進現象のメカニズムについて考察する。一般に、清浄で平らな表面を液体が濡れ広がる時には、三相接触線における接触角はべき乗則に従って減衰すること、また、この時、接触角は時間  $t$  の  $-1/3$  乗に比例することが知られている[3]。プロパノール水溶液を滴下した時には  $t$  の  $-0.92$  乗に比例する極めて速やかな濡れが観察されたことは、この系に濡れを促進する特異的な物理現象が起こったことを示唆している。われわれは、プロパノール水溶液を寒天ゲル

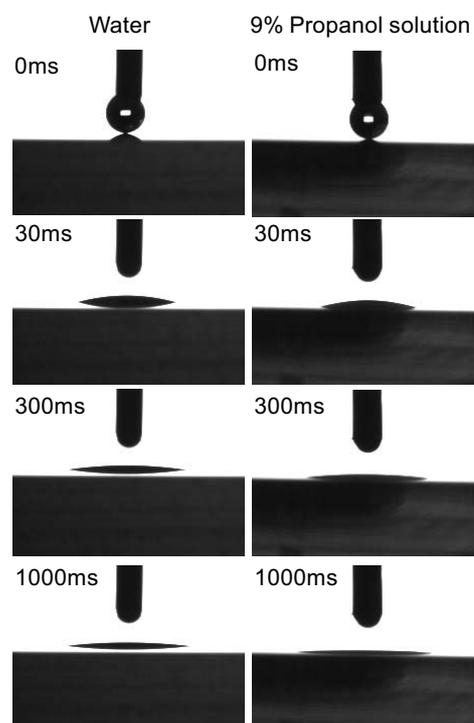


Fig.1 平らな寒天ゲルに水または 9%プロパノール水溶液を滴下した時の高速カメラ写真.

上に滴下した時、数秒間液滴の表面がゆらゆらと揺れ動いたことから、流体表面の表面張力が不均質になることが原因で流体の流れが駆動されるマランゴニ対流により、濡れが促進されたものと考えている。気液界面に吸着したプロパノールは三相接触線に存在する先行膜上で速やかに蒸発し、表面張力の不均質化を引き起こしたものとする。

## 2.2. 脂肪酸によって安定化されたリキッドマールブル

リキッドマールブルとは、固体粒子によって被覆された水滴である。これまでに、疎水性粒子を用いることでリキッドマールブルが調製できることが明らかになり、その性質の評価が行われてきた。しかし、これまでのシステムは、全て疎水化シリカやフッ化樹脂など、多量に摂取することができないものだったため、食品やヘルステクノロジーへの応用は困難だった。

われわれは脂肪酸結晶上で液滴を転がす、という簡単な方法でリキッドマールブルを調製することができた。この方法によってアルキル鎖長が 12~22 の脂肪酸と 12~18 のトリアシルグリセロールを用いてリキッドマールブルを調製できることが確認された。すべてのリキッドマールブルは 8 日以上安定だった。リキッドマールブルを加熱したところ、脂肪酸のシェルに覆われたカプセルを調製することができた。ベヘン酸カプセルの調整は 85°C、30~40 分の加熱時間が適していた。リキッドマールブルには、脂肪酸によって撥水性を示すものと示さないものがあった。ラウリン酸、ミリスチン酸はリキッドマールブルが水滴を吸収したため、接触角は測定不能だった。その他のリキッドマールブル上における接触角は、120~140° だった。リキッドマールブルは約 250 時間沈むことなく水面に浮き続けた。この高い撥水性は、アルキル鎖長 16 以上の場合のみ現れた。ラウリン酸、ミリスチン酸など、アルキル鎖長 14 以下の脂肪酸で被覆されたリキッドマールブルは、水面に置いた直後に崩壊したが、ベヘン酸及びトリストアリンにより被覆されたリキッドマールブルは、10 日以上崩壊せずに浮遊していた。これらの結果から、アルキル鎖が長い脂肪酸ほど撥水性が高く、水上で崩壊するまでの時間が長いことがわかった。さらに、水の pH を系統的に変えたところ、ベヘン酸リキッドマールブルは pH=2 の時は 10 日以上安定だったのに対して pH=12 の時はわずか 16 秒で崩壊した。すなわち、脂肪酸リキッドマールブルは酸性条件下では安定だが、アルカリ性条件下では速やかに崩壊することが確認された。

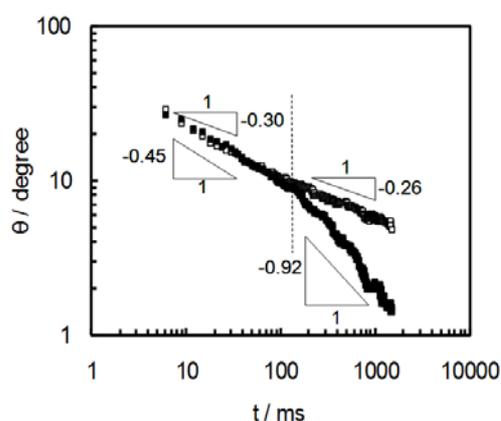


Fig.2 平らな寒天ゲルに水または 9%プロパノール水溶液を滴下した時の接触角；  
□:水、■:9%プロパノール水溶液。

引用文献 (1) Y. Nonomura et al. *Langmuir* **2010**, *26*, 16150-16154. (2) H. Mayama, Y. Nonomura, *Langmuir* **2011**, *27*, 3550-3560. (3) Y. Nonomura et al. *Langmuir* **2012**, *28*, 3799-3806. (4) Y. Kawamura, H. Mayama, Y. Nonomura, *J. Oleo Sci.* in press.

# Control of spreading dynamics on small intestine wall

Yoshimune Nonomura,<sup>1</sup> Hiroyuki Mayama<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering and Science, Yamagata University, <sup>2</sup>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

Wetting dynamics of liquids on gel surfaces is important for understanding mass transfer phenomena at biological interfaces because spreading processes contribute to effective nutritional absorption through the small-intestinal wall or to sensitization of the tongue surface. On the other hand, to acquire a deep understanding of the spreading dynamics, it is crucial to not only observe the spreading but also to find experimental and theoretical strategies to control it. In general, the spreading dynamics of liquids depend on the interfacial tension and the viscosity of the liquid.

We focus herein on Marangoni flow (or the Marangoni effect) as the driving force behind water spreading over a gel surface. Marangoni flow is a well-known mechanism for mass transfer along an interface between two phases from one with lower  $\gamma$  to another with higher  $\gamma$ . We expected aqueous alcohol solutions on gel surfaces to exhibit anomalously fast spreading as a result of surface roughness and Marangoni flow, because both factors play significant roles in spreading.

In the present study, we observed the spreading of some aqueous alcohol solutions on flat gel surfaces by using a high-speed camera to examine the effects of alcohol on the wetting dynamics. We also studied the spreading on fractal agar gel surfaces to investigate the effects of surface roughness. Furthermore, based on a simple model, we discussed the observed spreading dynamics with Marangoni flow on flat and fractal agar gels.

We found an extremely fast spreading flow of 1-propanol aqueous solution on flat agar gel surfaces. On the spreading on the flat surface, the power-law exponent  $x$  of  $\theta_D(t) \propto t^{-x}$  was 0.5–0.9 in the second step ( $t = 300$ – $1500$  ms) for a 1-propanol concentration of 9–100 wt %, which is extremely faster than that of water ( $x \sim 0.3$ ), whereas it was  $\sim 0.3$  for a concentration of 0–8 wt %. This anomalous spreading is caused by Marangoni flow, in which the surface tension gradient is induced by adsorption and evaporation of 1-propanol. However, on fractal gel surfaces, a different spreading was observed with  $x \sim 0.5$ . These experimental results were explained theoretically by analyzing the competition between the Marangoni flow and the pinning effect due to surface roughness.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

- 1) Hiroyuki Mayama, Yoshimune Nonomura  
Theoretical consideration of wetting on a cylindrical pillar defect: pinning energy and penetrating phenomena  
*Langmuir* **2011**, 27 (7), 3550–3560.
- 2) Yoshimune Nonomura, Shigeki Chida, Eri Seino, Hiroyuki Mayama  
Anomalous spreading with Marangoni flow on agar gel surfaces  
*Langmuir* **2012**, 28 (8), 3799–3806.
- 3) Yuki Kawamura, Hiroyuki Mayama, Yoshimune Nonomura  
Edible liquid marbles and capsules covered with lipid crystals  
*Journal of Oleo Science* in press.

### 2. 著書・総説

- 野々村美宗, 眞山博幸  
生体表面における濡れのダイナミクス  
*Colloid & Interface Communication* **2011**, 36 (4), 21–22.

### 3. 会議発表

- 1) Hiroyuki Mayama, Yoshimune Nonomura  
Wetting on a cylindrical defect  
International Symposium on Engineering Neo-Biomimetics II. Soft Nanomaterials and Soft Robotics 2011 (Tsukuba, Japan).
- 2) Hiroyuki Mayama, Yoshimune Nonomura  
Wetting dynamics on a fractal agar gel  
International Symposium on Engineering Neo-Biomimetics II. Soft Nanomaterials and Soft Robotics 2011 (Tsukuba, Japan).
- 3) Hiroyuki Mayama, Shigeki Chida, Eri Seino, Tomoya Tanaka, Yoshimune Nonomura  
Thermodynamics and dynamics of wetting on rough surface  
International Symposium on Nature-Inspired Technology 2012 (Kangwon, Korea).
- 4) Hiroyuki Mayama, Shigeki Chida, Eri Seino, Tomoya Tanaka, Yoshimune Nonomura  
Wetting phenomena on fractal agar gels as model biological surface  
Softinterface International Mini-symposium on Biointerface -Interface Between Bio and Materials-(Tsukuba, Japan).

## 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。磁石により運動制御が可能であることや、磁気検出、磁気加熱などが可能であることから、その応用範囲は多岐に渡る。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。

当研究グループでは 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と磁性粒子上への導入技術の開発に取り組んでいる。特に、磁性細菌とよばれる微生物が合成するナノ磁性粒子に着目し、遺伝子工学的なアプローチによる機能性の高い磁性粒子の開発とその工学的応用を展開している。様々な機能性タンパク質をアンカー分子に遺伝子融合することにより、磁性細菌内で目的タンパク質をディスプレイした磁性粒子の生産が可能である。これまでに、機能性合成ポリマーであるポリエチレングリコールの特性（極性かつ分子全体の電荷が中性）を模倣し、その機能発現を目指した非天然型ポリペプチドの設計と磁性粒子上への導入技術の開発を行った。その結果、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, 100 mer）を磁性粒子上に配することで、細胞への非特異的な吸着を抑制できることを見出した。本手法の最大の利点は、各ポリペプチドが遺伝子でコードされているため、あらゆる機能性タンパク質との遺伝子融合による非天然型人工タンパク質を設計することが可能である。さらに人工タンパク質の機能改変として塩基置換によるタンパク質特性の多様化が可能であり、高分子科学に対する新しい研究ストラテジー構築の提供が期待できる。

本研究では、機能性ポリマーである温度応答性のポリマーの特性を模倣し、温度応答性人工タンパク質を配した磁性粒子を設計できると考え、遺伝子設計とその特性解析に取り掛かる。23 年度は、磁性粒子上における温度応答性ポリペプチドの評価方法の検討とそのモデルポリペプチドを用いた有効性評価を行った。公表可能な範囲でその成果を下記に示す。

## 2. 研究経過

### 【方法及び結果】

本研究のストラテジーを Fig.1 に示す。ナノ磁性粒子を合成する磁性細菌のタンパク質発現システムを用いることで、目的タンパク質をディスプレイした磁性粒子の生産が可能である。本研究では、温度応答性的人工タンパク質を評価するために、磁性粒子上のタンパク質 Mms13 の遺伝子下流に、蛍光タンパク質である CFP、人工タンパク質、及び YFP を遺伝子融合し、

発現ベクターの構築を行った。CFP、及び YFP を融合することで、二つの蛍光タンパク質が近接場（3-7 nm）に存在するときに蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）が起きる。本研究では、エラスチン様ペプチドをモデル人工タンパク質とし、本システムの有効性を評価した。エラスチン様ペプチドは低温ではランダムコイル構造（3.9 nm/13.5 mer）をとり、温度上昇に伴い  $\beta$  スパイラル構造（1 nm/13.5 mer）をとることが知られている。このときの N 及び C 末端間の距離を FRET 現象が起きるために必要な長さ（VPGVG） $n$  :

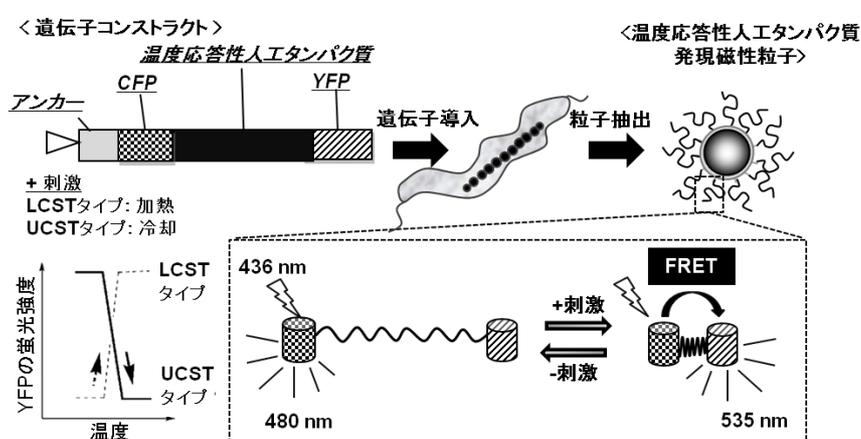


Fig. 1 FRET を利用した磁性粒子上におけるポリペプチドの構造変化の評価

50 mer (n=10) に設計し、磁性細菌のコドン頻度に合わせた人工遺伝子の合成を行った。さらにこの遺伝子を CFP と YFP 遺伝子の間に導入し、この融合遺伝子を Mms13 遺伝子の下流に融合した。Mms13 は磁性粒子上に多量に発現し、磁性粒子のコアであるマグネタイトに強固に結合している。それ故、比較的大きなタンパク質をディスプレイすることが可能なアンカー分子である。得られた融合遺伝子を磁性細菌内に導入し、形質転換体を得た。さらに形質転換体を大量培養し、細胞を回収後、細胞破碎・磁気分離により磁性粒子を精製した。得られた磁性粒子上に目的融合タンパク質が発現しているかを確認するために、SDS 溶液を導入した磁性粒子を加熱し、磁性粒子から目的融合タンパク質を分離した。さらに得られ

たタンパク質画分を SDS-PAGE、及びウェスタンブロットにより評価を行ったところ、融合タンパク質のサイズである 71 kDa 付近にタンパク質バンドが確認され、本研究で構築したベクターから目的の融合タンパク質を生産可能であることが示された。形質転換体から得られた磁性粒子上の蛍光観察により CFP、及び YFP の蛍光を確認することができた。さらに、ELP の構造変化を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用して評価した結果、磁性粒子を加熱した際に FRET による蛍光が確認された。これは YFP と CFP が近傍に存在する時のみ生じる蛍光特性であることから、ELP が加熱により収縮したことが示唆された。

これまでの磁性粒子上へのエラスチン様ペプチド導入に関する研究結果より、(VPGVG)<sub>n</sub> の温度応答が両末端未修飾のエラスチン様ペプチドと比較して、相転移温度が上昇することが示されている。そこで、磁性粒子上での相転移温度の制御に向けて、(-Val-Pro-Gly-X-Gly-)n の X 部位にバリン、アラニン、及びロイシンを導入した発現ベクターを構築し評価を行った。その結果、アミノ酸側鎖の疎水性度の増加により相転移温度が低下することが示された (Fig. 3)。

以上まとめると、本研究では、温度応答性ポリペプチドの探索に向けて、CFP 及び YFP を用いた蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) によるポリペプチド構造変化の評価系を構築した。さらに、ポリペプチドの配列を自由に設計できるため、ランダムミューテーションによる温度応答性ポリペプチドのライブラリー化も可能となる、また磁性粒子表面付近の温度上昇が可能のため、磁性粒子と温度応答性ポリペプチドを用いた様々な応用が期待できる。

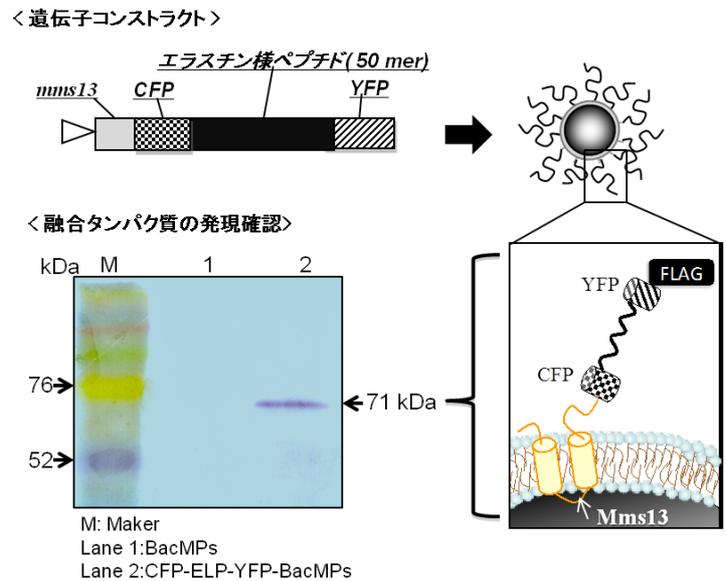


Fig. 2 エラスチン様ペプチドを用いた融合タンパク質の設計と磁性粒子上への発現

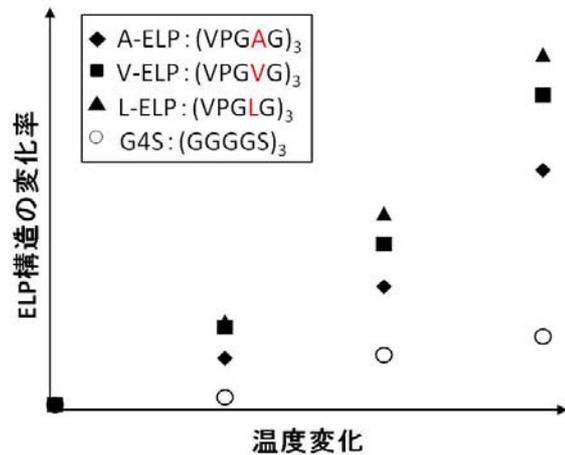


Fig. 3 エラスチン様ペプチド (ELP) のアミノ酸配列の変化に伴う構造変化

Molecular design of stimuli-responsive artificial proteins for control the interface  
of magnetic particle

Tomoko Yoshino

Institute of Engineering Tokyo University of Agriculture and Technology

2-24-16, Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588,  
042-388-7021, 042-385-7713, 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. These particles are coated with polymers or proteins including functional groups or biomolecules for the recognition of targets. We have developed the artificial proteins to control the interactions between the surface of magnetic particles and cells by designing of amino acid sequences of the proteins. Previous reports had shown that the hydrophilicity or neutral charge of the particle surface was important for the reduction of nonspecific interactions between the particle and the cell surface. The polypeptide designed was composed of multiple units consisting of four asparagines (N) and one serine (S) residue and was referred to as the NS polypeptide. Surface modification of a magnetic particle with the NS polypeptide resulted in reduction of non-specific particle-particle and particle-cell interactions. Design of the artificial proteins has been brought about by the novel function onto magnetic particles.

In this study, we aimed at the design of the stimuli-responsive polypeptide that mimics the stimuli-responsive polymer, which was displayed onto the magnetic particles. To develop an analytical system for conformational change of polypeptides for the screening of thermoresponsive polypeptides, the fluorescence resonance energy transfer (FRET) technique was employed on a magnetic particle surface. Elastin like polypeptide (ELP, sequence: (-Val-Pro-Gly-Val-Gly-)<sub>n</sub>) which has the reversible temperature-driven conformational change property, was employed as thermoresponsive polypeptide. *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 was utilized to prepare the magnetic particle displaying proteins. The expression plasmid containing a fusion gene of YFP and CFP gene to the 5' end or 3' end of ELP gene respectively was constructed. To display the fusion proteins of CFP, ELP, and YFP (CFP-ELP-YFP) onto the magnetic particles, CFP-ELP-YFP expression plasmid was transformed into a wild-type strain of AMB-1. Bacterial magnetic particles displaying CFP-ELP-YFP protein (CFP-ELP-YFP-BacMPs) was obtained from transformants harboring expression plasmid. To evaluate the FRET efficiency via conformational change of ELP on the magnetic particle surface, CFP-ELP-YFP-BacMPs were heated, and the fluorescence intensity of CFP and YFP was measured. In the case of heating, FRET efficiency was increased. It was suggested that ELP was assembled by heating. Furthermore, to control the conformational changes of ELP (phase transition temperature), ELP sequence (-Val-Pro-Gly-X-Gly-)<sub>n</sub> was mutated at the position X. Phase transition temperature was decreased by changing of the X residue of ELP to hydrophobic amino acid. In conclusion, it was suggested that the conformational change of stimuli-responsive artificial proteins on the magnetic particles by heating was evaluated by measuring of FRET efficiency. In addition, phase transition temperature could be controlled by introducing a mutation of ELP sequence.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

1) Masahito Hosokawa, Takuma Hayashi, Tetsushi Mori, Tomoko Yoshino, Satoshi Nakasono, Tadashi Matsunaga: “Microfluidic Device with Chemical Gradient for Single-Cell Cytotoxicity Assays” *Anal. Chem.* 83, 3648-3654 (2011)

2) Masahito Hosokawa, Marie Asami, Seita Nakamura, Tomoko Yoshino, Noriyuki Tsujimura, Masayuki Takahashi, Satoshi Nakasono, Tsuyoshi Tanaka and Tadashi Matsunaga: “Leukocyte Counting from a Small Amount of Whole Blood Using a Size-Controlled Microcavity Array” *Biotechnol. Bioeng.* (in press)

### 2. 著書・総説

吉野 知子、Biomedical Engineering - From Theory to Applications (分担執筆)

### 3. 会議発表

1) 吉野 知子: “微生物を利用したナノ磁性粒子の分子設計” 第 10 回バイオテクノロジー国際会議, 2011 年 6 月

2) 吉野 知子 “ナノ磁性粒子界面のタンパク質発現制御とその有効利用” 表面技術協会 ナノテク部会第 41 回研究会、2011 年 7 月

3) 内山 諒、吉野 知子、田中 剛、堀部 卓郎、久原 基樹、松永 是 “発現誘導システムを用いた磁性細菌粒子上への甲状腺刺激ホルモン受容体のディスプレイ” 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011 年 9 月

4) Masahito HOSOKAWA, Taishi HAYATA, Takayuki YOSHIKAWA, Tomoko YOSHINO and Tadashi MATSUNAGA: “Size- and deformability-based isolation of circulating tumor cell using a microcavity array ” 62nd annual meeting of the International Society of Electrochemistry, 2011 年 9 月

5) 吉野 知子 “遺伝子融合技術によるナノ磁性粒子表面の機能創生と応用展開” 第 63 回日本生物工学会大会、2011 年 9 月

6) 鐘築由香、吉野知子、松永 是 “磁性細菌粒子上への効率的な外来タンパク質ディスプレイに向けたプロテアーゼ欠損株の構築” 第 63 回日本生物工学会大会、2011 年 9 月

7) 本多 亨、吉野知子、松永是 “温度応答性 MHC 分子-ナノ磁性粒子複合体を用いた抗原ペプチド探索技術の開発” 日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月

### 4. その他 (例えば特許など)

関連特許出願: 1 件

研究代表者：神戸大学・森垣憲一

連携研究者：関西大学・岩崎泰彦

連携研究者：産業技術総合研究所・永井秀典

## 1. 緒言

生体膜は、細胞において外部環境との境界をなし、情報伝達、エネルギーの変換、防御、などの重要な機能を担うインターフェースである。現在使用されている薬の約半分は、膜結合型タンパク質をターゲットにしていると言われている。生体膜においては、分子が膜内で 2 次元拡散しているため、標的分子が膜に結合する場所と、結合がシグナルとして細胞内に伝えられる場所は必ずしも同一ではなく、標的分子が結合した受容体の膜内拡散や他分子との会合によるシグナルの特異的増幅が可能である。また、流動性脂質二分子膜は、非特異的結合をリン脂質膜表面によって抑制することが出来る。

我々は、生体膜の構造と機能を模した人工生体膜をシリコンやガラスなどの固体チップ表面に作製し、生体膜と環境中の物質、薬物などとの相互作用を精密に再現できるシステムの創製を試みている。そのため、光リソグラフィ技術でパターン化重合したポリマー脂質膜と、生体膜と同等の構造・物性を持つ流動性脂質膜をハイブリッド化したモデル生体膜をこれまで開発してきた。<sup>1,2</sup>

本研究は、MEMS 技術で作製される微小構造体（例：微小流路）とパターン化人工生体膜を有機的に組み合わせることで、これまでにないような分子認識、分子輸送を可能にし、新薬候補物質の評価、疾患の早期診断などに応用可能な人工生体膜システムの技術体系を確立することを目指している。ポリジメチルシロキサン（PDMS）に代表される高分子エラストマーを用いた微小構造体は、微小流路などを用いた分析（Lab-on-a-chip）技術に多用されている。しかし、基板表面に作製された人工生体膜と PDMS 微小構造体とを接合する技術は存在せず、両技術を有機的に融合したチップ作製技術は確立していない。本研究は、パターン化モデル生体膜と PDMS などのエラストマー微小構造体と有機的に組み合わせることにより、生体膜の持つ機能を人工的に再現する技術の開発を目指す。

## 2. 研究経過

ポリマー脂質二分子膜は、コリン基とエタノールアミン基を持つ光重合性リン脂質（DiynePC および DiynePE：図 1）を用いて作製した。モノマー脂質二分子膜をラングミュア・ブロッジェットーラングミュア・シェーファー（LB/LS）法によって基板上に累積し、フォトマスクを膜表面に静置して紫外光でパターン化光重合を行った。化学修飾のモデルとして、両末端にビオチン基とカルボン酸活性エステル（NHS）を持つポリエチレングリコール（PEG）を用い、ポリマー脂質表面に結合した。ビオチン基の修飾効率は、蛍光標識したストレプトアビジンを結合することで評価した。DiynePE 単体では安定な脂質二分子膜を形成しないが、DiynePC と混合することで安定な脂質二分子膜を形成する手法が確立された。DiynePE 混合比は、最大で 40%であった。

蛍光標識ストレプトアビジン（SAF594）をビオチン修飾脂質二分子膜に結合させて蛍光顕微鏡で観察したところ、ポリマー膜上での SAF594 蛍光が観察された。一方、コントロール実験として、DiynePC にビオチンを化学修飾処理したもの（反応性基がないため、ビオチンは導入されない）、および DiynePC-PE（PE 含有 1.5%）（化学修飾なし）においては、ポリマー膜上での SAF594 蛍光が観察されなかった。このことは SAF594 の結合が分子認識による特異的なものであり、ポリマー脂質膜表面は非特異的な吸着を防止出来ることを示唆している。

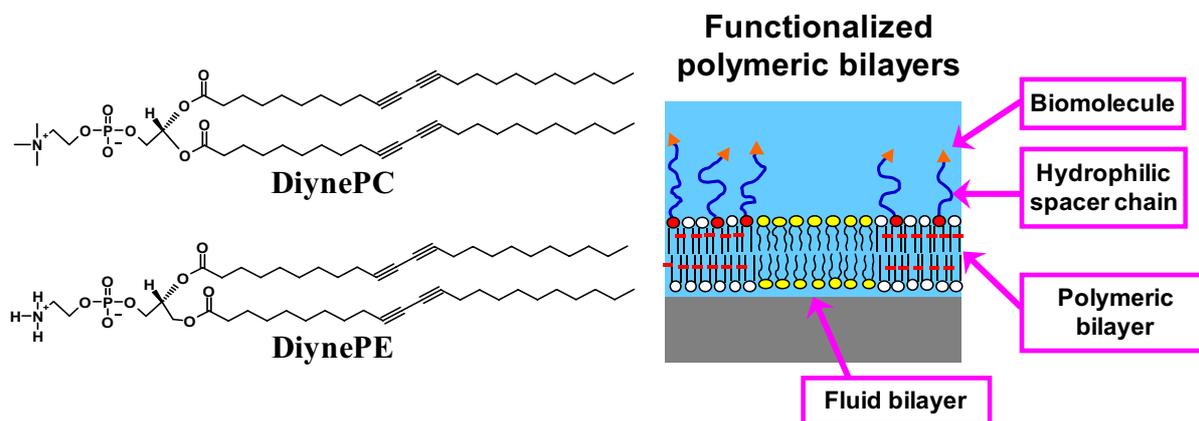


図1 光重合性脂質 (DiynePC, DiynePE) の構造とポリマー脂質二分子膜化学修飾の概念図

また、LB/LS 法を用いて重合性脂質膜 (モノマー) を基板に堆積する際に、基板に面する単分子膜 (下層) と水溶液側に面する単分子膜 (上層) を別々の組成の脂質二分子膜 (DiynePC と DiynePC-PE 混合膜 (PE 組成は 1.5%)) で作製した場合、SAF594 の結合は上層が DiynePC-PE である脂質二分子膜にのみ観察された。下層が DiynePC-PE である脂質二分子膜である場合は、基板と脂質二分子膜との間に 1nm 程度の空間しかないため、SAF594 が結合することができなかったものと考えられる。この結果は、ポリマー脂質二分子膜の表裏の脂質組成を変化させることで、脂質膜表面に化学修飾される生体関連分子の配向を制御できることを示している。

ポリマー脂質膜表面に細胞接着性配列 (アルギニン-グリシン-アスパラギン酸: RGD) を含んだペプチドを化学的に結合することで、ポリマー脂質膜表面への細胞接着を誘導することが可能になった。に特異的に結合することが観察された。以上の結果より、安定なポリマー脂質膜表面に機能性分子を結合することで、基板表面での分子認識が可能になり、バイオアッセイ、細胞培養の足場として利用できることが示された。

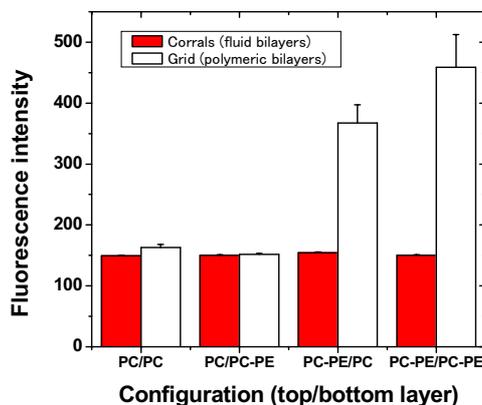
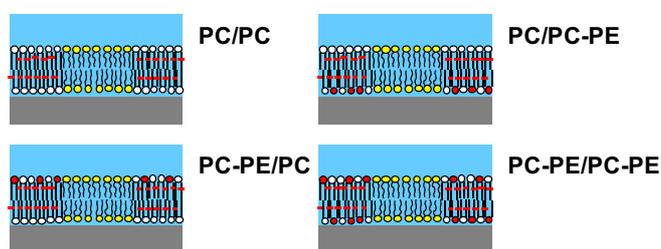


図2 基板側と水相側の脂質組成を変えたポリマー脂質二分子膜における化学修飾:ビオチン基が水相側にある場合のみSAF594が結合した。

本研究では、さらにポリマー脂質膜と微細加工基板 (例: ポリジメチルシロキサン (PDMS)) とを結合することを試みており、両者の組み合わせからマイクロウェルなどの微小空間を創出し酵素反応測定などの生体分子機能計測が可能になるものと期待される。

【参考文献】

- (1) Morigaki, K.; Baumgart, T.; Offenhäusser, A.; Knoll, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 172-174.
- (2) Okazaki, T.; Inaba, T.; Tatsu, Y.; Tero, R.; Urisu, T.; Morigaki, K. *Langmuir* **2009**, *25*, 345-351.

# Bonding model cellular membranes with micro-fabricated 3D objects for creating a new nanometric interface

Kenichi Morigaki<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Research Center for Environmental Genomics, Kobe University, Kobe 657-8501 Japan,

<sup>2</sup> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Ikeda 563-8577, Japan

Fax: +81-78-803-5941, E-mail: morigaki@port.kobe-u.ac.jp

Model biological membranes on solid substrates provide a versatile platform for generating bio-functional surfaces. We have developed micropatterned lipid bilayers composed of polymerized and fluid lipid bilayers. The polymeric bilayer acts as a framework that supports embedded lipid membranes with defined geometries. The embedded lipid membranes retain some important characteristics of the biological membrane such as fluidity, and are used as a model system. The fact that polymeric and fluid bilayers are integrated as a continuous bilayer membrane gives various unique features, such as stabilization of fluid bilayers. In the present study, we developed a methodology for chemically functionalize polymeric bilayers. By incorporating chemically reactive headgroup, we could functionalize the surface of micropatterned polymeric bilayers, which enables coupling of the model membrane with various materials.

Polymeric bilayers were generated from diacetylene-containing phospholipids (DiynePC and DiynePE) by Langmuir-Blodgett/Langmuir-Schafer (LB/LS) method. DiynePE has a chemically reactive ethanol amine headgroup, whereas DiynePC is chemically inert. By mixing DiynePC and DiynePE, we could form stable bilayers on hydrophilic glass surfaces. After the lithographic polymerization of bilayer by UV illumination, DiynePE was modified with functional molecules (e.g. NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin). Fluid bilayers composed of natural lipids were incorporated into the voids between polymeric bilayers by vesicle fusion. We could form stable polymeric bilayers by mixing DiynePE with DiynePC. The maximum content of DiynePE was ca. 40%. By incorporating DiynePE, we could chemically functionalize the surface with biotin. Streptavidin could be attached onto the membrane surface. If we changed the lipid compositions in two monolayers in the LB/LS fabrication process (we constructed bilayers having DiynePE only in one side of the membrane), adsorption of streptavidin onto the functionalized surface was observed only when DiynePE was present in the monolayer facing the aqueous solution. Thus, we could control the orientation of the functionalized membrane. We could immobilize proteins, cells, and 3D objects (e.g. micro-fabricated elastomer) onto the surface of the model membrane by molecular recognition. This technique enables to vertically extend the model membrane system, giving possibilities to integrate model membranes and various analytical platforms.

## 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) Morigaki, K., K. Mizutani, E. Kanemura, Y. Tatsu, N. Yumoto, and H. Imaishi. "Photo-regulation of cytochrome P450 activity by using caged compound." *Anal. Chem.*, *84*, 155-160, 2012.
- 2) Inaba, T., Y. Tatsu, and K. Morigaki. "Fusion of lipid vesicles with planar lipid bilayers induced by a combination of peptides." *Langmuir*, *27*, 12515-12520, 2011.

### 2. 著書・総説

- 1) Morigaki, K. "Micro-patterned model biological membranes on solid surface." *Handbook of Biofunctional Surfaces*, In press, 2012.

### 3. 会議発表

- 1) 森垣憲一、水谷和幸、齋藤慎、今石浩正「ポリマー脂質二分子膜を基盤とした生体膜機能界面の創製」、第60回高分子討論会、2011年9月29日、岡山大学
- 2) Kenichi Morigaki, Kazuyuki Mizutani, Makoto Saito, Takashi Okazaki, Yoshihiro Nakajima, Yoshiro Tatsu, Hiromasa Imaishi "Micropatterned biomimetic membrane composed of polymeric and fluid lipid bilayers", 15th International Conference on Thin Films, 2011年11月9日, 京都テルサ
- 3) Kenichi Morigaki, Makoto Saito, Emi Kanemura, Kazuyuki Mizutani, Takashi Okazaki, Yoshihiro Nakajima, Yoshiro Tatsu, Hiromasa Imaishi "Surface functionalization of polymeric lipid bilayers for coupling with molecules, cells, and 3D objects", 243 Meeting of the American Chemical Society, 2012年3月27日, San Diego Convention Center (招待講演)

研究代表者：九州大学・松野寿生

連携研究者：九州大学・田中敬二、平井智康

## 1. 緒言

接着性細胞はスキャホールドとなる材料表面の構造・物性に応じて、多様な接着挙動および形態変化を示す<sup>1</sup>。一般に、高分子材料表面における物性は、構成成分の分子鎖熱運動性に支配されている。従って、より高機能なスキャホールド材料の設計には、材料表面近傍における分子鎖凝集状態ならびに分子鎖熱運動性とあわせて細胞挙動を理解することが重要である。また、血液適合性材料のような生体不活性材料の設計においても、水界面における材料の分子鎖凝集状態の理解が重要との認識が広がりつつある。しかしながら、(高分子材料/水界面)近傍における構造・物性の分子レベルでの解析は、まだ端緒にすぎたばかりであり、ほとんどの材料についてその詳細は明らかにされていない。本研究では、スキャホールド材料として汎用性高分子であるポリスチレン(PS)に着目し、合成高分子の表面凝集状態および熱運動性が、生体成分との相互作用に与える影響を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究経過

本年度は、高分子試料として、種々の分子量の単分散ポリスチレン(PS)および単分散ポリイソプレン(PI)を用いて作製した膜をスキャホールドとし、スキャホールド上における細胞挙動を評価した。

スキャホールド材料として、PS単層膜をスピニングキャスト法に基づきガラス基板上に製膜した。PS試料として、数平均分子量 $M_n$ が6kから235kの範囲の単分散PSを用いた。膜厚は200nmに制御し、異なる分子量のPSを用いることで、膜最表層における状態がゴム状態またはガラス状態のスキャホールドをそれぞれ作製した。また、PS膜の表面からの深さ依存的な分子鎖熱運動性の違いが、細胞挙動に与える影響を評価するため、ゴム状態のポリイソプレン(PI)膜を下地層とし、ガラス状態のPS膜を上層したPS/PI二層膜を作製した。二層膜の作製には、 $M_n = 394k$ の単分散PIおよび $M_n = 235k$ の単分散PSを用いた。PI膜厚は200nmに制御し、上層のPS膜厚は任意に制御した。細胞接着評価には、マウス線維芽細胞L929を用いた。細胞を無血清RPMI 1640培地に懸濁し、PS単層膜またはPS/PI二層膜を浸漬したウェル中において37°C(310K)、5%CO<sub>2</sub>環境下で培養した。播種数は $5.0 \times 10^4$  cells/wellとし、所定時間後に接着した細胞を位相差および蛍光顕微鏡観察に基づき評価した。また、細胞内部の状態を評価するために、細胞骨格タンパク質アクチンファイバーの形成を蛍光顕微鏡観察に基づき評価した。

Figure 1は、PS膜の表面ガラス転移温度( $T_g$ )の深さ依存性を模式的に示した図である。表面から10nm程度の領域における分子鎖熱運動性は分子量に依存し、室温(R.T.)下において、低分子量体( $M_n = 6k, 21k$ )PSではゴム状態、高分子量体PS( $M_n = 57k,$

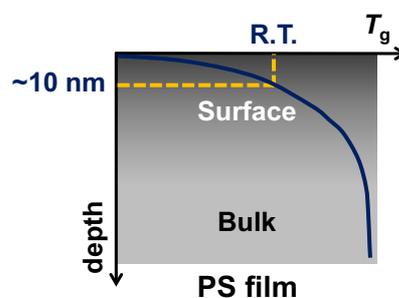


Figure 1. Depth-dependence of surface  $T_g$  of PS film.

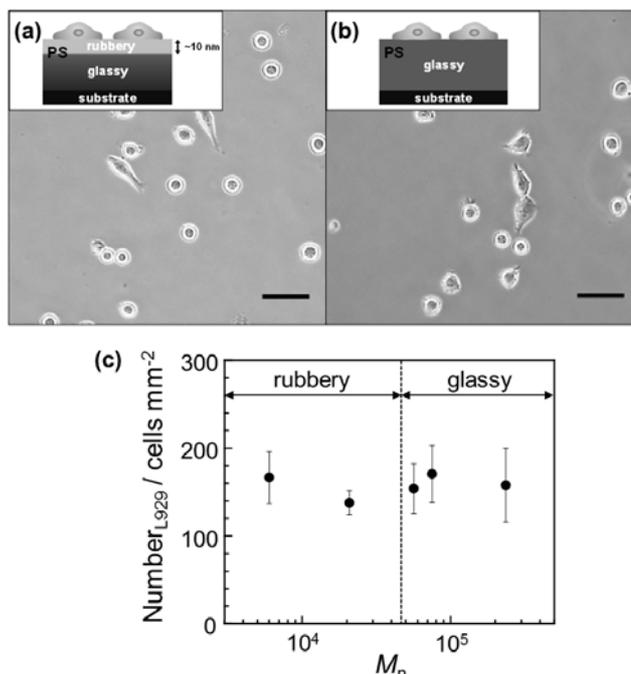


Figure 2. Phase contrast images of L929 fibroblasts adhered on the PS homolayer films with  $M_n$  of (a) 6k and (b) 235k, respectively. Scale bars correspond to 50  $\mu$ m. (c)  $M_n$  dependence of the number of cells adhered on the PS homolayer films.

75 k, 235k) ではガラス状態である<sup>2</sup>。

Figure 2a および 2b は、分子量の異なる PS を用いて作製した PS 単層膜に接着した細胞の位相差顕微鏡像である。細胞接着数は、PS の分子量に依存せずほぼ一定であった (Figure 2c)。すなわち PS 膜最表面における分子鎖熱運動性の差異は、細胞接着挙動に影響を与えないことが分かった。

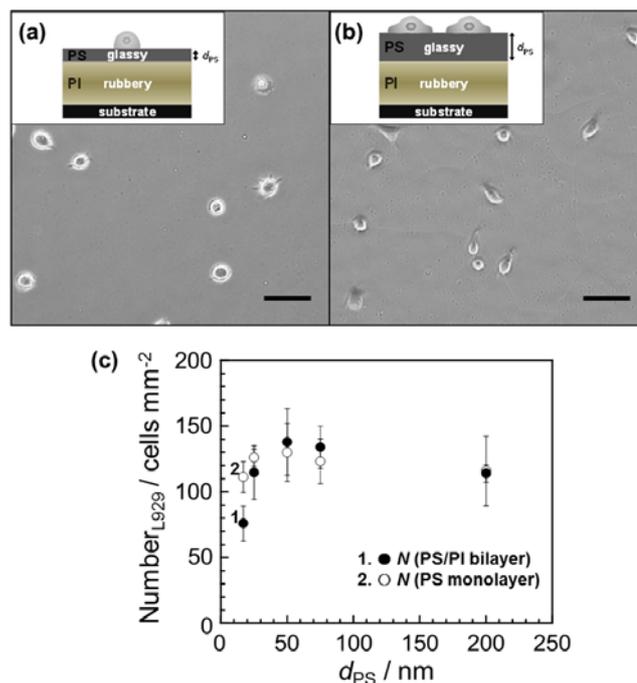
Figure 3a および 3b は、PS 層の膜厚が異なる PS/PI 二層膜に接着した細胞の位相差顕微鏡像である。ここで用いた PS は高分子量体であり全ての膜厚においてガラス状態である。しかしながら、細胞接着数は、上層の PS 層の膜厚に依存した。すなわち、二層膜において PS 膜厚が 25 nm 程度より薄くなると、細胞接着数が低下し、また細胞伸展率も著しく低下した (Figure 3c)。細胞接着数と伸展率の PS 膜厚依存性は、走査粘弾性顕微鏡測定より求めた表面貯蔵弾性率 ( $E'$ ) の膜厚依存性と類似の膜厚依存性を示した<sup>3</sup>。一方、PS 単層膜では、細胞接着数に膜厚依存性は観測されなかった。

PS 単層膜もしくは PS/PI 二層膜に接着した細胞の伸展率を Figure 4 に示す。アスペクト比が大きい細胞はより伸展し、小さい細胞は丸い状態を維持していることを示している。単層膜においては、PS 層の厚さによらず、伸展率は同様な傾向を示したのに対し (Figure 4a)、二層膜では、膜が 25 nm より薄化すると伸展率の低い細胞が顕著に増加した (Figure 4b)。また、細胞骨格タンパク質であるアクチンファイバーを蛍光染色したところ、PS 層の厚さが 25 nm 以下の二層膜では、細胞の骨格形成が抑制され不十分である様子が観察された。以上の結果は、細胞が、高分子表面において GPa オーダーで深さ方向に変化する力学特性を認識できることを示している。

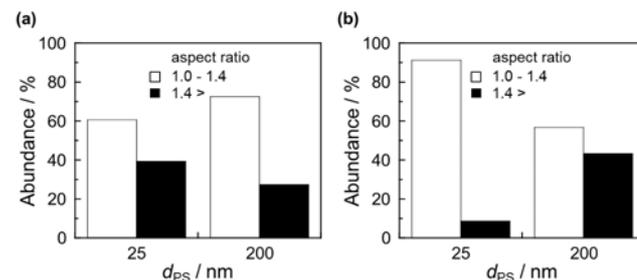
水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法に基づき、PS/PI 二層膜に対するタンパク質吸着量を定量した (Figure 5)。ヒト血清アルブミン (HSA)、免疫グロブリン G (IgG) とともに、二層膜の PS 層の厚さの差異によるタンパク質吸着量の違いは観測されなかった。すなわち、タンパク質吸着は細胞接着とは異なり、二層膜の下層に由来する材料表面の力学的不安定性には影響されないことがわかった。

#### 参考文献

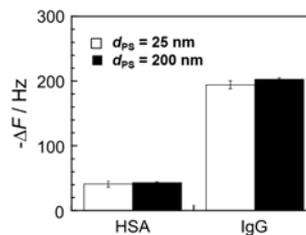
- 1) A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, *Cell*, **126**, 677 (2006).
- 2) K. Tanaka, A. Takahara, and T. Kajiyama, *Macromolecules*, **33**, 7588 (2000).
- 3) N. Satomi, K. Tanaka, A. Takahara, and T. Kajiyama, *Macromolecules*, **34**, 6420 (2001).



**Figure 3.** Phase contrast images of L929 fibroblasts adhered on the PS/PI bilayer films with (a) 25 nm- and (b) 200 nm- $d_{PS}$ , respectively. Scale bars correspond to 50  $\mu\text{m}$ . (c) Closed and open circles show the number of cells ( $N$ ) on the PS/PI bilayer and PS homolayer films, respectively.



**Figure 4.** Abundance of cell aspect ratio of L929 fibroblasts adhered on (a) PS homolayer and (b) PS/PI bilayer films with different  $d_{PS}$ , respectively. When the aspect ratio value was higher than 1.4, cells were regarded as spread, when these values were lower than 1.4, cells remained round.



**Figure 5.** Frequency shifts of the QCM due to protein adsorption on the PS/PI bilayer films with (a) 25 nm- and (b) 200 nm- $d_{PS}$ , respectively. Concentrations of HSA or IgG were 0.1 mg/mL in phosphate buffer solutions.

Regulation of cell functions based on thermal molecular motion  
at the polymer/water interfaces

Hisao Matsuno, Shinichiro Shimomura, Keiji Tanaka

Department of Applied Chemistry, Kyushu University

744 Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan

Tel&Fax +81-(0)92-802-2879, E-mail h-matsuno@cstf.kyushu-u.ac.jp

Cells typically attach to a polymer scaffold, often called an extracellular matrix (ECM) and/or interact with other cells in an animal tissue. The ECM plays an important role in providing support and anchorage for cells, segregating tissues from one another, and regulating intercellular communication. The elastic modulus of a typical ECM widely ranges from 0.1 to 100 kPa, and recent studies have revealed that these differences in the elastic modulus of ECM cause changes in cellular morphology and proliferation during cell growth process. Despite a growing literature on the effect of bulk stiffness of polymer scaffolds on cell-surface interactions, less is known about the effect of mechanical instability in the surface region of polymer materials on cell adhesion. In general, molecular motion at polymer surfaces is much more enhanced than that in the internal bulk region. Such an enhanced mobility is a function of the depth, from the outermost surface down to approximately 10 nm. Thus, it is important to discuss the behavior of cells adhered on polymer scaffolds in association with their surface mechanical properties. In this study, we investigate the effect of mechanical instability for polystyrene (PS) films on cell adhesion behaviors; PS is one of the general-purpose polymers commonly used for artificial culture substrates in biomedical fields.

Firstly, to clarify the effect of surface molecular motion on cell adhesion, the number of adhering cells and their morphology on the various PS scaffolds were evaluated by microscopic observations. The adhesion of fibroblast on PS homolayer films was not affected by the surface mechanical properties of the films, that is, the cell adhesion was insensitive to whether the top surface was in a glassy or rubbery state.

Secondly, glassy PS/rubbery PI bilayer films were used as scaffolds in order to gain access to the depth-dependence of the effects of mechanical instability on cell responses. Fixing the thickness of the underneath PI layer to be 200 nm, the thickness of the upper PS layer ( $d_{PS}$ ) was changed from 200 nm down to 17 nm. The number of cells on these films became smaller in the  $d_{PS}$  range smaller than approximately 25 nm. The surface  $E'$  evaluated by scanning viscoelasticity microscopy for PS/PI bilayer films decreased with a decreasing thickness of the glassy PS layer, indicating that the surface became mechanically unstable with a decreasing PS layer thickness. Interestingly, the  $d_{PS}$  dependence of cell adhesion on PS/PI bilayer films observed here appears to be coincident with that of the surface  $E'$ . Although the modulus of the PS/PI bilayer films were of the order of GPa, being higher than that of native ECM, it seems most likely that cells could sense a mechanical instability originating in the underlying PI layer at depth region of approximately 25 nm, even though cells could not directly contact this region.

F-actin filaments formed sufficiently in the cells that adhered to the mechanically stable surface with a thicker upper PS layer. In contrast, this was not the case for the mechanically unstable surface with a thinner upper PS layer.

The adsorption amounts of serum proteins on the thicker and thinner PS/PI bilayers evaluated by using a quartz-crystal microbalance were almost the same. This means that, unlike the behavior of cells, the interaction between protein molecules and the PS/PI bilayer surfaces did not depend on the mechanical stability of the deeper region of the scaffolds. Generally, cells adhere to a surface via the preadsorption of proteins. However, the protein adsorption observed here was not affected by mechanical instability of the scaffolds. Thus, it is plausible that cells themselves could directly sense mechanical instability.

## 業績リスト

### 1. 会議発表

- 1) Shimomura, S.; Matsuno, H.; Tanaka, K. “The Recognition of Polymer Surface Stiffness by Fibroblast”, IACIS 2012, Sendai, Japan, May 2012.
- 2) 下村信一郎, 松野寿生, 田中敬二, “高分子スキャホールド表面の力学特性と細胞接着性”, 日本レオロジー学会第 39 年会, 東京, 2012 年 5 月.
- 3) 松野寿生, 平田豊章, 下村信一郎, 田中 賢, 田中敬二, “高分子ソフト界面の構造・物性制御に基づく新規バイオ材料の構築”, 日本化学会第 92 春季年会, 横浜, 2012 年 3 月.
- 4) Shimomura, S.; Matsuno, H.; Tanaka, K. “An Effect of Mechanical Instability of Polymer Surface on Fibroblast Adhesion”, SIMS2012, Tsukuba, Japan, March 2012.
- 5) Shimomura, S.; Matsuno, H.; Tanaka, K. “Surface Stiffness Effect of Polymer Scaffold on Fibroblast Adhesion”, BMMP-12, Nagoya, Japan, January 2012.
- 6) 松野寿生, 下村信一郎, 田中敬二, “高分子スキャフォールド表面の分子鎖熱運動性と細胞接着挙動”, 第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム, 横浜, 2011 年 12 月.
- 7) 下村信一郎, 松野寿生, 田中敬二, “ポリスチレン表面の分子鎖熱運動性が細胞接着性に与える影響”, 繊維学会西部支部講演会, 佐賀, 2011 年 12 月.
- 8) Shimomura, S.; Matsuno, H.; Tanaka, K. “An Effect of Surface Molecular Motion of Polystyrene on Cell Adhesion”, PPC 2011, Jeju Island, Korea, November 2011.
- 9) 松野寿生, 下村信一郎, 田中敬二, “高分子スキャフォールド表面の分子鎖熱運動性が細胞接着に及ぼす影響”, 第 47 回九大生体材料・力学研究会, 福岡, 2011 年 10 月.
- 10) Shimomura, S.; Matsuno, H.; Tanaka, K. “An Effect of Polymer Surface Stiffness on Fibroblast Adhesion”, ASAM-3, Fukuoka, Japan, September 2011.
- 11) 松野寿生, 平田豊章, 下村信一郎, 田中 賢, 田中敬二, “合成高分子の表面凝集状態と細胞接着性との関係”, 第 63 回コロイドおよび界面化学討論会, 京都, 2011 年 9 月.
- 12) 下村信一郎, 松野寿生, 田中敬二, “ポリスチレンの表面分子鎖熱運動性と細胞接着性”, 平成 23 年度繊維学会秋季研究発表会, 香川, 2011 年 9 月.
- 13) 下村信一郎, 松野寿生, 田中敬二, “ポリスチレン表面の分子鎖熱運動性が細胞接着性に与える影響”, 第 48 回化学関連支部合同九州大会, 北九州, 2011 年 7 月.

## 1. 緒言

細胞と基質との界面においては、細胞の接着・伸展または移動に伴い細胞骨格タンパク質や接着関連タンパク質群が時空間的に変動し、これらタンパク質の動態や細胞の挙動は基質の物性や形状に大きく影響を受ける。接触する培養基材の硬さや構造などの材料特性に応じて幹細胞の分化や細胞の遊走などに違いが生じることも報告され、これら培養基材の特性を利用して積極的に細胞挙動を操作する試みが新たに広がりつつある。

そこで本研究では、電子線リソグラフィ技術を基盤とした独自の細胞パターンニングシステムを用い、遊走化時の極性化した細胞形態を誘起するように V 字形の非対称マイクロパターンを基質界面に一直線に連続的に設けて、パターンのみによる一定方向への長距離細胞遊走を制御する基質界面システムの開発を行った。ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞 (hbmMSC) を対象に用いて、生物学的な定法である細胞誘引因子の添加やフィブロネクチン等の細胞接着タンパク質のパターンへの塗布などを一切行わずに、パターン形状の最適化のみにより一方向への遊走誘導することを検討した。さらに、遊走による細胞骨格タンパク質や接着タンパク質のダイナミックな変化に伴う機械的なストレスや細胞極性の連続的な変化が細胞の他の活動に影響を及ぼすのではとの仮説の下、hbmMSC の遊走運動が増殖や分化挙動へ及ぼす効果を定量的に評価した。最終的には、基板界面の微細なパターン構造のみで、幹細胞の挙動を操作するシステムの構築を目指す。

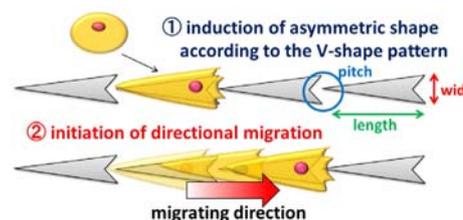


図 1. 連続的に描画した V 字パターンによる細胞の一方向遊走誘導の概念図.

## 2. 研究経過

[1] 間葉系幹細胞の一方向遊走誘導を達成するとともに、翌年度計画のうち、[2] 遊走運動制御による周期的な分子動態変化が細胞増殖および分化に与える影響の評価、を前倒して推進した。

### [1] 電子線リソグラフ加工を用いた細胞パターンニング基板による間葉系幹細胞の一方向遊走制御

半導体加工に汎用されている高分子の電子線レジストを用いたリソグラフィ技術では、ナノオーダーのサイズで精緻なパターンの描画・彫刻が可能である。しかし通常は、微細リソグラフパターンが施されたレジストは、マスク材として用いられた後に除去される。本研究では、高解像度でのパターンが施されたこのレジスト高分子を除去せず、直接に細胞培養基板へと応用する技術を開発した。

カバーガラスを基材としてその上に Poly[1-chloro(methyl acrylate)-*co*-1-methylstyrene] を主体とした電子線感応性高分子レジストを厚さ 100 nm でスピコートし、最大 100 nm の精度でリソグラフ加工を施した。残ったレジスト表面には、親水性高分子鎖をもつブロック共重合体 PluronicF108 を疎水性相互作用で修飾して、細胞やタンパク質の非特異的接着を抑制した。これにより、細胞を描画パターン上にもみ、1ヶ月以上の長期に渡って培養可能な微細パターンニング基板を構築した。

さらに、遊走化時の細胞は、極性化して涙珠状を想起させる非対称の形状を示し、葉状仮足および糸状仮足が発達した幅広部を前にする方向へと伸縮運動を繰り返しながら進んで行く。この遊走時の細胞形態を誘起するように V 字形の非対称マイクロパターンを基質界面に連続的に設けて、パターンのみによる一定方向への長距離細胞遊走を制御する基質界面システムの開発を行った (図 1)。細胞にはヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hbmMSCs) を用いた。非対称な V 字パターンの幅が開いている側を正の遊走方向とし幅が狭まる側を負の遊走方向と定め、細胞が初期に接着した始点から hbmMSCs が伸展した際の

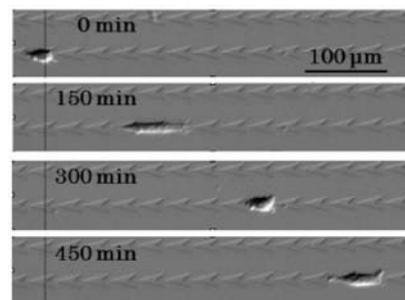


図 2. V20 パターンによる hbmMSC の一方向への遊走誘導.

長軸を上回る 70  $\mu\text{m}$  以上移動した場合を遊走したものと定義し、終点の位置が始点から 70  $\mu\text{m}$  未満の細胞は停止として扱った。正の方向に 70  $\mu\text{m}$  以上移動した場合がパターンデザインのコンセプトに基づいた一方向遊走誘導である。V 字の幅、長さ、ピッチ間隔などのパラメータを変化させて、細胞を一方向に遊走誘導するパターン形状を最適化した。

幅 20  $\mu\text{m}$ 、長さ 34.6  $\mu\text{m}$ 、ピッチ 10  $\mu\text{m}$  の連続 V 字パターン (V20) を用いると、hbmMSC は最も効率よく一方向遊走誘導された (図 2)。24 時間の培養時において正方向遊走、負方向、停止はそれぞれ 52%、0、42%であり、120 時間培養時では 94.3%、5.7%、0 であった。比較対象として、V20 と幅が等しい直線状パターン (Line) では、正方向遊走、負方向、停止はそれぞれ 47.5%、35.0%、17.5%であった。すなわち V20 パターンの一方向遊走誘導能の高さが示された。

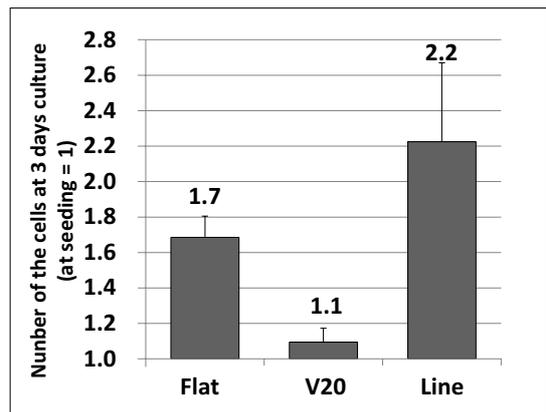


図 3. 各培養(遊走)環境における 3 日間培養時の hbmMSC の増殖挙動(解析細胞数 > 100). 播種時の細胞数を 1 として規格化し、増殖が完全に抑制されている場合は 1 となる。

## [2] 一方向遊走化誘導が間葉系幹細胞の増殖・分化挙動に与える効果

続いて、一方向遊走が hbmMSC の増殖と分化に及ぼす効果について定量的に評価した。一方向遊走を誘導した V20 パターンと、比較対象として Line パターンおよび通常の平面床の培養器材それぞれで hbmMSC 細胞を培養したところ、3 日間培養時において、Line では 2.2 倍、平面床では 1.7 倍の増殖が観察されたのに対し、V20 で遊走誘導された細胞では細胞分裂はほとんど起らず顕著に増殖が抑制された (図 3)。さらに、免疫蛍光染色法と qRT-PCR により分化挙動の定量的評価を行った。qRT-PCR では、house keeping 遺伝子である GAPDH を基準として  $\Delta\Delta C_t$  法により幹細胞マーカーの ALCAM、神経マーカーの Tuj1 および nestin、骨マーカーの osteocalcin (OCN) の各 mRNA の発現量を評価した。V20、Line、平面床の各基板上で 5 日間の培養条件において比較すると、一方向遊走運動した hbmMSC では nestin 遺伝子の顕著な発現が検出された。平面培養との比較では 1.8 倍以上の発現亢進が見られた (図 4)。さらに ALCAM 遺伝子については、平面との比較で V20 では発現抑制が見られた。同様の抑制は Line でも観察された。すなわち、V20 での一方向遊走誘導が幹細胞の増殖・分化挙動に影響を及ぼすことが示され、特に分化誘導挙動については神経細胞への分化の兆候を示唆する結果が得られた。

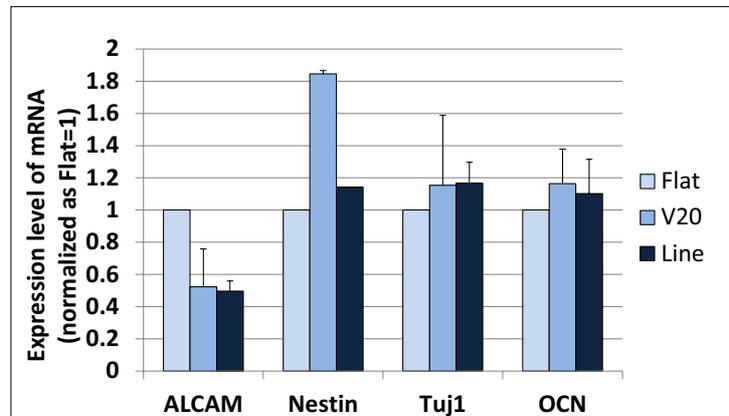


図 4. V20 パターンで一方向遊走制御した hbmMSC の分化挙動の解析 (5 日間培養). 比較として Line パターンと平面培養での解析結果も提示する。

## [3] 今後の研究推進計画

幹細胞マーカーならびに分化マーカーの種類を増やして、一方向遊走運動時のヒト間葉系幹細胞の分化挙動を qRT-PCR および免疫蛍光染色により定量的かつ網羅的に評価する。特に、間葉系幹細胞と同じ中胚葉由来の筋および骨と、外胚葉由来であり胚葉を超えた神経への分化に注目する。また、細胞遊走時の、基質界面近傍における接着斑形成や細胞骨格関連タンパク質の動態を TIRF などのイメージング手法を用いて評価し、分子レベルでの遊走制御のメカニズムの検討と、遊走運動のストレスが幹細胞の増殖・分化挙動に影響を及ぼす機構の解析を行う。これらを統合して、細胞挙動の制御とそれを実現するための基質界面の設計手法の確立を目指す。

# Regulating Directional Migration by the Micro/Nano-Topographic Surface and Its Effect on the Proliferation/Differentiation Behaviors of Mesenchymal Stem Cell

Naoya Takeda

Faculty of Science and Engineering, Waseda University

TWIns Bldg., 2-2 Wakamatsu-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8480

Tel&Fax: +81-3-5369-7323, E-mail: ntakeda@waseda.jp

Cell migration is the dynamic process associating with the biointerface, so, it is largely modulated depending on the surrounded microenvironments including adjacent matrix, neighboring cells, and biosignaling factors in vivo. Moreover, during migration, cells generally take asymmetrical shape and regularly repeat expansion and contraction. These activities load mechanostress to the cell as well as accompanying the dynamic rearrangement of cytoskeleton. In this study, directional migration of the human bone marrow mesenchymal stem cell (hbmMSC) was guided in the individual single level by only using the micro patterned surface. In particular, asymmetrical patterns for aiming to induce cell migration were focused. Other biological factors of neighboring cell and biosignaling factor were excluded. Thus, it was examined how the mechanostress loaded by the directional migration on the limited space of micropatterns affected the cell behaviors, particularly, proliferation and differentiation.

The novel cell patterning system was developed by utilizing the electron beam (EB) lithography and the polymeric positive resists (ZEP520A/ZEP-A = 1/1 (v/v), Zeon, Tokyo, Japan), which were originally used as the mask material for semiconductor processing. Spin-coated on a cover glass in thickness of 100 nm, the positive resists were irradiated with EB to etch micro patterns. In particular, the asymmetrical V-shaped micropatterns of different sizes and shapes were focused, and these patterns were serially aligned at different pitch. Rest of the resist surface was modified with Pluronic F108, a copolymer containing hydrophilic PEG blocks, to prevent non-specific cell adhesion. The hbmMSC was seeded on the micropatterned surfaces without applying any extracellular matrix protein and biosignaling factor to promote cell adhesion on the patterns and migration. Dynamic behaviors of hbmMSC including migration and proliferation were observed with a time-lapse microscope. Differentiation of the hbmMSC into specific species, especially focusing neural cell, were also studied with both qRT-PCR and immunofluorescence staining.

The serially aligned V-shaped micropatterns as designed in Figure 1a most effectively guided the directional migration of hbmMSC. For 24 hours culture, 52% of the cells migrated over 70  $\mu\text{m}$  in the direction in which the V-shape opened (Figure 1b), and rest of 48% did not remarkably move (less than 70  $\mu\text{m}$ ) or halted. None of the cell went backward. Proliferation was notably suppressed and the cell division was scarcely observed. Moreover, in 5 days culture, expression of the neural marker, nestin, was detected by qRT-PCR analysis, even without applying any inducing factor. These results suggested that the guided directional migration on the limited space of micropatterns affected the hbmMSC behaviors of proliferation and differentiation.

Precise investigation on the mechanism of these phenomena would be expected to produce a novel method for regulating behaviors of stem cells by the interface topography.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

- 1) Edagawa Y, Nakanishi J, Yamaguchi K, Takeda N\*, Spatiotemporally Controlled Navigation of Neurite Outgrowth in Sequential Steps on the Dynamically Photo-Patternable Surface, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, in press, (2011 Sep 19. [Epub ahead of print]).

### 2. 著書・総説

- 1) 武田直也, マイクロ・ナノリソグラフ微細培養場での細胞挙動制御, 日経BPコンサルティング, 2011, 4, 36-38.
- 2) 生命科学概論 環境・エネルギーから医療まで, 早稲田大学先進理工学部生命医科学科 編, 朝倉書店, 2012.

### 3. 会議発表

- 1) 武田直也, 電子線リソグラフ加工した基質界面の微細構造による細胞挙動操作, 日本化学会 第 92 春季年会, 神奈川, 2012. 3.
- 2) 田村健一, 原 雄介, 武田直也, 配向化エレクトロスピン・コラーゲンファイバー弦足場での三次元筋管形成誘導, 第 21 回インテリジェント材料/システムシンポジウム&第 6 回バイオ・ナノテクフォーラムシンポジウム, 東京, 2012. 1.
- 3) 田村健一, 吉野修弘, 武田直也, 電子線リソグラフ加工マイクロパターンによる細胞の一方向遊走誘起, 第 33 回 日本バイオマテリアル学会大会, 京都, 2011. 11.
- 4) 田村健一, 青木聡美, 武田直也, 電子線リソグラフ微細パターンでの一方向遊走制御が間葉系幹細胞に与える効果, 第 33 回 日本バイオマテリアル学会大会, 京都, 2011. 11.
- 5) 川岸祥史, 吉野修弘, 武田直也, 電子線リソグラフ微細パターンへの接着・伸展による間葉系幹細胞の分化誘導, 第 33 回 日本バイオマテリアル学会大会, 京都, 2011. 11.
- 6) 田村健一, 青木聡美, 吉野修弘, 武田直也, 電子線リソグラフ加工マイクロパターンによる細胞の一方向遊走誘起, 第 1 回 CSJ 化学フェスター2011 世界化学年記念大会一, 東京, 2011. 11.
- 7) 川岸祥史, 吉野修弘, 武田直也, ナノ微細加工パターン培養での液性因子を用いない間葉系幹細胞の分化の検討, 第 1 回 CSJ 化学フェスター2011 世界化学年記念大会一, 東京, 2011. 11.
- 8) 武田直也, 電子線リソグラフ微細パターンによる細胞の運動制御と分化誘導, 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011. 9. (招待講演)

### 4. その他 (例えば特許など)

- 1) 奨励賞: 田村健一, 原 雄介, 武田直也, 配向化エレクトロスピン・コラーゲンファイバー弦足場での三次元筋管形成誘導, 第 21 回インテリジェント材料/システムシンポジウム&第 6 回バイオ・ナノテクフォーラムシンポジウム, 東京, 2012. 1.
- 2) 優秀ポスター発表賞: 川岸祥史, 吉野修弘, 武田直也, ナノ微細加工パターン培養での液性因子を用いない間葉系幹細胞の分化の検討, 第 1 回 CSJ 化学フェスター2011 世界化学年記念大会一, 東京, 2011. 11.
- 3) 優秀ポスター発表賞: 田村健一, 青木聡美, 吉野修弘, 武田直也, 電子線リソグラフ加工マイクロパターンによる細胞の一方向遊走誘起, 第 1 回 CSJ 化学フェスター2011 世界化学年記念大会一, 東京, 2011. 11.

## 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  $1.4 \times 10^{-11}$  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。

この課題に取り組むため、固液界面での遺伝子認識と電子授受とを併せ持つ高機能ソフトマテリアルとして、新規“signal-on”型の遺伝子検出プローブを開発し、ターゲットとのハイブリッド形成に伴い観測される電流値を約5倍に上昇させることに成功した。具体的には、この遺伝子プローブは、両末端にフェロセンおよびシクロデキストリンを有しており、ターゲット非存在下では両者が包摂錯体を形成しフェロセンの酸化還元反応が抑制されているが、ハイブリッド形成後はプローブの二重らせん形成に伴う構造の剛直化のために、包摂錯体が解離してフェロセンの酸化還元反応が回復するためであると考察した（図1）。しかし、フェロセンの酸化還元反応は1電子反応であるため、観測される電流値は小さく変化の幅も微弱であった（1.3 nA→6.9 nA）。センサの高集積化に伴いセンサ面積は減少し、観測される電気化学信号はより小さくなるため、これらの点は遺伝子センサを実用化する上での足かせとなる可能性があった。

そこで本研究では、電気化学信号発生に酸化還元酵素を用いることで、センサの高感度化を図る（図2）。本年度は、本意電子プローブの酸化還元酵素においては、活性中心となる金属錯化合物とこれに対するアプタマーとで人工的に酵素を構成する（アプタザイム）ことを試みた。末端阻害剤との相互作用により電気化学活性が自己調節されている（アロステリック）アプタザイムがハイブリッド形成に伴い活性を回復し、アプタザイムの酸化還元反応により増幅された信号を検出することで、特定の配列のDNAを検出することができると期待される。

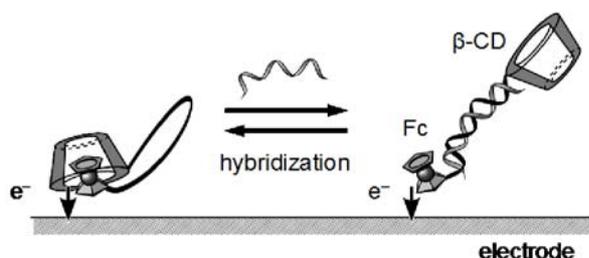


図1：“signal-on”型遺伝子プローブに基づくDNA検出法。二重らせん形成によりFcとβ-CDとの包摂錯体が解離することでFcの酸化還元反応が回復し、電流値が増加し（“signal-on”）、DNAを検出する。

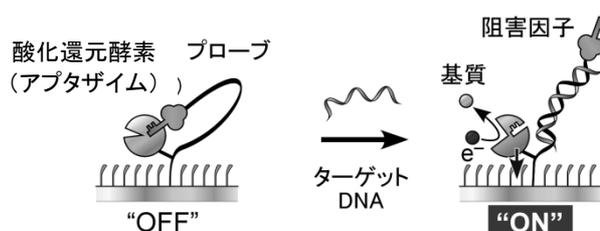


図2：アロステリック電気化学アプタザイムに基づくDNA検出法。二重らせん形成により酸化還元酵素から阻害剤が外れることで基質が酸化され、電流値が増加し（“signal-on”）、DNAを検出する。

## 2. 研究経過

### 2. 1 アプタザイムの作製と分光学的評価

上述の目的のため、鉄ポルフィリンの一種であるヘミンを認識するアプタマー部位を電気化学活性部位として、かつイミダゾール基を阻害因子として、それぞれ両端に取り付けた新規遺伝子プローブを考案した(図3)。遺伝子プローブの合成に先立ち、ヘミンアプタマーとヘミンにより構成された部位の、電気化学活性なアプタザイム(図4)としての可能性を検討した。

まず、ヘミンがアプタマーを形成することを、分光学的に検討した。アプタマー配列 5' GGG TAG GGC GGG TTG GG 3'を含むオリゴDNA溶液を 95°Cから 25°Cに徐冷することでG-quartet構造を形成させ、その後ヘミン溶液と混合した。UV-vis分光光度計にて測定したところ、顕著なピークが 404 nmに確認された(図5)。このピークはポルフィリン環のSoret帯を示している。このピークはヘミン単独で観測されるピークと比較してより長波長側に強くかつ鋭く(濃色効果、hyperchromicity)観測されていたことから、ヘミンのポルフィリン環がG-quartet構造内部に取り込まれることで平面性が増大し、共役系が拡大したためと考えられる(図4)。また、このG-quartet内包ヘミンについて電気化学的な予備検討を行った。G-quartet内包ヘミンを含む溶液に ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid) または/およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加したところ、両方を添加した時にのみ溶液の色が無色から薄青緑色に変化し、418 nmの吸光度が上昇することが確認された。これは、G-quartet内包ヘミンをメディエータとする以下の酸化還元反応が生じたためと考えられる。



これらのことから、ヘミンはヘミンアプタマーのG-quartet構造内部に取り込まれ、ABTSとH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>との間の酸化還元反応を仲介することが分かった。

一方、G-quartet内包ヘミンの酵素活性を阻害する因子として、イミダゾール基を有するヒスタミンを検討した。G-quartet内包ヘミンおよびヒスタミンを含む溶液にABTSおよびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えた場合、ヒスタミンを含まない場合と比較して 418 nmの吸光度は小さかった。これは、ヒスタミンの存在により(1)式の反応が阻害されたためであると考えた。以上の結果を元に、現在、ヘミンアプタマーおよびイミダゾール基を有する遺伝子プローブについて検討を進めている。

### 2. 2 遺伝子センサのデバイス化

遺伝子センサのデバイス化を目的として、フォトリソグラフィにより作製されたマイクロ電極アレイチップを用いて遺伝子センサアレイチップを作製した。簡便な遺伝子検出法として、電極表面に固定したプローブPNAに対するオリゴDNAのハイブリッド形成を、[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup>をマーカーとして測定したCVの電流値変化により評価する方法を採用した。チップ上に構成された4×4マイクロ電極アレイを1ブロックとして、17 mer、20 mer、22 merの3種類のオリゴ核酸に対して、配列選択的な応答が観測された。また、4×4マイクロ電極アレイ内の16電極については、再現性良いセンサ応答を示した。今後、上記開発の遺伝子プローブを本チップに搭載した新規デバイスの開発へと進めて行く予定である。

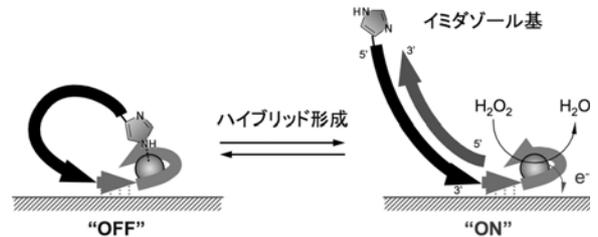


図3: 新規遺伝子プローブの応答機構。プローブ内矢印は各部位ごとの DNA 鎖を表す。イミダゾール基側から、ターゲット認識部位、アンカー部位、およびアプタザイム部位。相対する DNA 鎖はターゲットを示す。

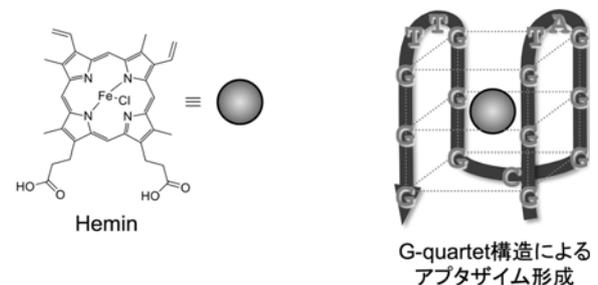


図4: ヘミンとヘミンを取り込んだ G-quartet 構造

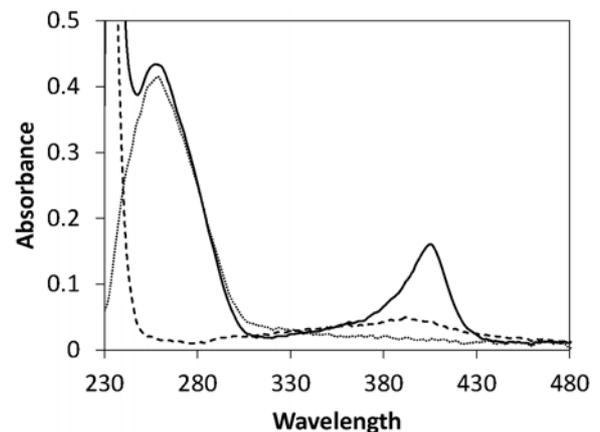


図5: G-quartet オリゴ DNA(点線)、ヘミン(破線)、G-quartet+ヘミン(直線)のスペクトル

# Allosteric Electrochemical Aptazyme Based-Gene Sensors

Hiroshi AOKI

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

16-1 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8569, Japan

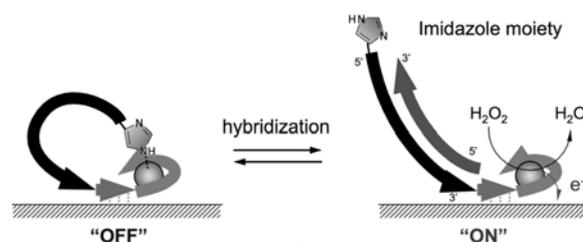
Tel: +81-29-861-8050, Fax: +81-29-861-8308, E-mail: aoki-h@aist.go.jp

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  $1.4 \times 10^{-11}$  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 (ferrocene) and signal-suppressing part ( $\beta$ -cyclodextrin) 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"). However, the redox reaction of ferrocene is one-electron reaction, and the observed redox currents and the change in the current upon hybridization were small (from 1.3 nA to 6.9 nA). The integration of sensors in a small space of one chip causes the size-reduction of sensor areas and the observed currents become concomitantly reduced. There was a possibility that the sensing mechanism based on one-electron reaction will become a bottleneck in fabrication of integrated sensor array chips as a practical use.

In this study, we aimed the development of more sensitive "signal-on" gene sensors based on redox enzyme conducting multi-electron reaction. The working principle of the sensor is depicted in Figure 1. The probe is designed to possess a terminal redox enzyme and its inhibitor. Before hybridization, the redox enzyme is inactivated by the inhibitor bound to the enzyme. After hybridization, the inhibitor removed from the enzyme due to the formation of rigid structure of dsDNA, and the redox activity of the enzyme is restored. This self-regulation of the redox activity upon external signals is called an "allosteric" character. In this probe, the redox enzyme is composed of hemin, a Fe coordinated porphyrin, and a hemin-targeting aptamer. The aptamer forms a stable G-quartet structure and hemin intercalates the G-quartet structure, yielding an enzymatic aptazyme catalyzing reduction of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . In this year, we spectroscopically and electrochemically investigated the formation of the aptazyme as a signal-generating part of the sensitive gene probe. The observed hyperchromicity of the Soret band of hemin at 404 nm showed intercalation of hemin into the G-quartet structure. Moreover, from the experiment based on ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid), the G-quartet/hemin mediated the electrochemistry of  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduction. These results indicate the formation of the aptazyme.



**Figure 1.** Working principle of the sensor based on allosteric electrochemical aptazyme.

## 業績リスト

### 1. 原著論文

- 1) S. Kanata, T. Nishino, and H. Aoki “Effect of Aqueous Environment on Monolayer of Tetraion(III) Single Molecule Magnet”, submitted.

### 2. 著書・総説

- 1) 青木 寛 「新規遺伝子検出法の開発と迅速環境診断技術への展開」、分析化学、accepted.
- 2) 青木 寛 「電気化学的遺伝子検出法の開発と迅速診断技術への展開」、分析化学、accepted.
- 3) 青木 寛 「望みのタンパク質を捕捉・輸送・放出するマイクロマシン」、ぶんせき、accepted.

### 3. 会議発表

- 1) 青木 寛：遺伝子センシング技術に基づく電気化学DNAチップの開発、2011年北見工業大学化学システム工学科夏季セミナー、北見工業大学、北見（2011）。[国内発表、口頭発表（招待講演）]
- 2) 青木 寛：遺伝子センシング技術に基づく電気化学DNAチップの開発、埼玉工業大学応用化学ゼミ、埼玉工業大学、深谷（2011）。[国内発表、口頭発表（招待講演）]
- 3) H. Aoki, M. Torimura, H. Tao: Label-free and reagent-free DNA detection based on supramolecular electrochemistry, International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS2011), 国際会議場、京都（2011）。[国際発表、口頭発表]
- 4) H. Aoki, M. Torimura, and H. Tao: Label-free, reagent-free, and “signal-on” DNA detection based on supramolecular electrochemistry, 13<sup>th</sup> International Symposium on Electroanalytical Chemistry, 中国科学技術院、中国吉林省長春（2011）。[国際発表、ポスター発表、受賞（Excellent Poster Presentations Award）]
- 5) H. Aoki, M. Torimura, and H. Tao: Label-free and “signal-on” DNA detection using ferrocene and cyclodextrin-terminated gene probes, 62<sup>nd</sup> Annual Meeting of International Society of Electrochemistry (ISE), 国際会議場、新潟（2011）[国際発表、口頭発表]
- 6) 青木 寛：アロステリック電気化学アプタザイムに基づく高感度遺伝子検出センサ、科研費・新学術領域 第5回シンポジウム、九州大学（2011）[国内発表、ポスター発表]
- 7) 青木 寛、藤掛 勉、北島明子、鳥村政基：簡便・迅速な遺伝子検出法の開発とそのデバイス化、日本分析化学会第60回年会、名古屋大学（2011）[国内発表、ポスター発表]
- 8) 青木 寛：アロステリック電気化学アプタザイムに基づく高感度遺伝子検出センサ、科研費・新学術領域 第8回領域会議、東京大学（2012）[国内発表、口頭発表]

### 4. 受賞

- 1) Excellent Poster Presentations Award, H. Aoki, M. Torimura, H. Tao, Label-free, reagent-free, and “signal-on” DNA detection based on supramolecular electrochemistry, 13<sup>th</sup> International Symposium on Electroanalytical Chemistry.

# 遺伝子導入セルチップの高機能化を実現するソフト界面の構築

研究代表者：(独) 産業技術総合研究所・藤田聡史

## 1. 緒言

近年の再生医療技術、診断治療技術、創薬開発技術などの医療技術の発展は目覚しく、医療の個別化が近い将来現実になる事をふまえると、簡便・迅速・低コストな細胞機能制御技術・細胞品質管理技術の開発が望まれている。また細胞内の遺伝子、タンパク質などの機能分子のネットワークやパスウェイ、薬剤の細胞内作用機序など、細胞レベルの細胞機能制御や解析を網羅的に行う「セロミクス (Cell-omics)」解析技術の発展及び体系化の学術的重要性がますます高まっている。このような背景の元、これまで「細胞マイクロアレイチップ」の一種である「トランスフェクションマイクロアレイ (TMA) チップ」の開発に取り組んできた。

TMAチップは、核酸 (遺伝子やsiRNAなど) を含むリポソーム複合体をアレイ状に配置したチップで、細胞を播種する事でアレイ状に配置されたそれぞれのスポット上の細胞に異なる遺伝子を基板固相界面より導入 (RTF [Reverse Transfection from solid surface]: 固相リバーストランスフェクション) することが可能である。よって、遺伝子の過剰発現やノックダウンに対する細胞の表現型に基づいて、細胞内ネットワークやパスウェイ経路解析、遺伝子機能解析、細胞機能解析、薬剤作用機序解析を高速、大規模、安価に行うことができる。これまでの研究開発では、最大でスライドガラス一枚当たり 1,500 アレイの集積度を持つTMAの構築に成功し、細胞のアポトーシス細胞運動、神経分化を評価する「専用TMAチップ」を開発し、それぞれの機能制御に関わる新規遺伝子の選択や未知機能化合物の機能評価に成功している<sup>(1)-(4)</sup>。しかし、個別患者の再生医療用細胞の品質管理や適合薬剤の選別解析などが必要となる個別化医療を行う上で、細胞表現型に基づいた数千種以上の薬剤や遺伝子の評価を瞬時に行う技術の開発が必須命題となっており、細胞マイクロアレイの高機能化や高密度化が望まれている。

そこで、本研究課題では RTF のメカニズムを明らかにし、メカニズムに基づいた「高性能ソフト界面」を作製し、固相から様々な細胞株への遺伝子の導入を可能にする高機能化・高密度化セルチップ「トランスフェクションマイクロアレイ (TMA) チップ」を開発する事を目的とし、研究を遂行した。

## 2. 研究経過

平成23年度の研究計画では、固相界面からの遺伝子の拡散メカニズムの解明、リバーストランスフェクションにおける細胞への遺伝子の取込みのメカニズムの解明、細胞外マトリクス (ECM: フィブロネクチンやコラーゲンなど) と遺伝子の取り込み効率の関係の解明を目標とした。その成果として、(1) ポリアミンデンドロンの固相化が遺伝子導入効率の上昇に有効であること、(2) 細胞運動をコントロールする上で、ポリエチレングリコール (PEG) を用いた基板界面の親水性コーティングとフィブロネクチン又はタイプIコラーゲンによるアレイスポットの形成が非常に有効である事、(3) フィブロネクチンやタイプIコラーゲンなどのECMの固相濃度が、遺伝子の徐放性のコントロールに重要であり、細胞への遺伝子導入効率や局所的な遺伝子導入に影響する事、を見出した。その成果は特許化<sup>(5)</sup>し、現在、論文投稿中である<sup>(6)</sup>。なお、今回の報告では、投稿中の論文の詳細な内容については、報告を控える。

### (1) ポリアミンデンドロンの固相化による細胞への遺伝子導入

従来の手法ではポリアミンを固相リバーストランスフェクション (RTF) に用いてきたが、ポリアミンデンドロンを用いて、低毒性、且つ高効率に細

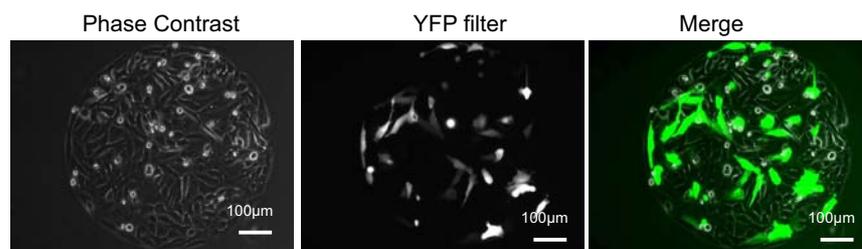


図1: ポリアミンデンドロンを用いた固相 RTF

胞への遺伝子導入が可能であることが分かった (図 1)。ポリアミンデンドロンの強いプロトンスポンジ効果によって、効率的な遺伝子発現が起こっていると考えられる。

### (2) 細胞マイクロアレイ上での細胞の接着と運動のコントロール

細胞外マトリクス (ECM) の一種であるフィブロネクチン及びタイプIコラーゲンを様々な濃度で、ポリエチレングリコール (PEG) をグラフトしたカバーガラス上に、インクジェットプリンターを用いてスポットすることで、ECMのスポットを配列したアレイパターンを作成した。このマイクロアレイパターン上にHeLa (ヒト子宮頸ガン由来) 及びNBT-L2b (ラット膀胱ガン由来) 細胞を播種し、その接着、運動、細胞毒性を評価した。その結果、HeLa、NBT-L2b細胞両者において、細胞接着に最適なECMの種類と濃度条件を決定した。最適な条件では、細胞は、スポット間を移動せずスポット内に運動を封じ込める事ができた<sup>(6)</sup>。

### (3) ECMの固相濃度と細胞への遺伝子の徐放性、導入効率、局所導入の関係の解明

最適な濃度のECMとプラスミドを混合したリバーstransスフェクション混合液を、PEGをグラフトしたカバーガラス上に、インクジェットプリンターを用いてスポットし、TMAを作成した。TMA上にHeLa、NBT-L2b細胞を播種し、スポットからの遺伝子の徐放性、細胞への遺伝子導入効率、局所導入の可否を評価した。

その結果、HeLaはフィブロネクチン、NBT-L2bはタイプIコラーゲン上で遺伝子導入効率が高く、それぞれ最適な濃度が存在した。濃度が低下すると、細胞の基板への接着能が低下し、また遺伝子の徐放性が上がるため、異なるスポットの細胞に遺伝子が導入されるようなクロスコンタミネーションが引き起こされた。最終的に、最適なECM固相条件でアレイを構築することにより、スポット径が100 $\mu\text{m}$ 以下の細胞接着及び遺伝子導入領域を作製し、スポット当たりの細胞数が数個になるような「世界最高密度のTCM基板」を開発に成功した (図 2)。

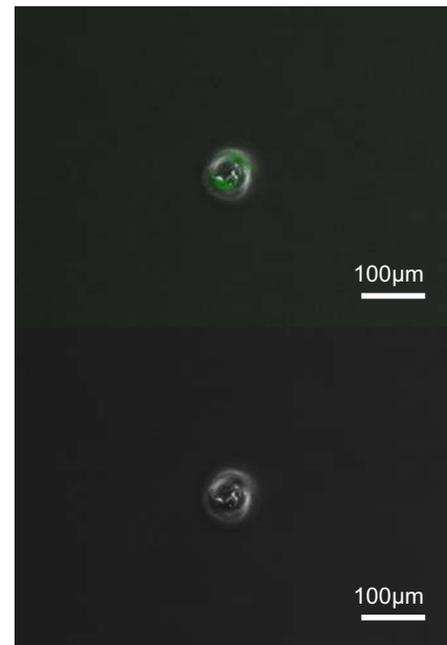


図 2 : 1 細胞遺伝子導入マイクロアレイ : 4 個の細胞中 2 個の細胞に遺伝子が導入され光っている。

#### 参考文献 :

1. Yoshikawa, T., Uchimura, E., Kishi, M., Funeriu, D. P., Miyake, M.\* and Miyake, J. (2004) *J. Control Release* 96, 227-232.
2. Fujita, S., Ota, E., Sasaki, C., Takano, K., Miyake, M.\* and Miyake, J. (2007) *J. Biosci. Bioeng.*, 104, 329-333.
3. Yamada, S., Hakamada, K., Munakata, T., Takano, K., Fujita, S.\* , Miyake, M.\* and Miyake, J. (2009) *Biosens. Bioelectron.*, 24, 1493-1497.
4. Onuki-Nagasaki, R., Nagasaki, A., Hakamada, K., Uyeda, Q., P., T., Fujita, S.\* , Miyake, M. and Miyake, J. (2008) *Lab Chip*, 8, 1502-1506.
5. 特願 2011-055010、細胞接着領域のマイクロパターンを有する細胞固定化基板の製造方法、藤田 聡史、長崎玲子、栗田僚二、福田淳二、榎本詢子
6. Fujita, S.\* , Onuki-Nagasaki, R., Fukuda, J., Enomoto, J., Yamaguchi, S., Miyake, M. (2012) Super-dense transfected-cell microarrays generated by piezoelectric inkjet printing, Submitted.

# Reverse Transfection to Adherent Cells on Cell-Microarray with Functional Soft Interface

Satoshi Fujita  
Biomedical Research Institute,  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Central6, Bldg.13, Room#1207,  
1-1-1 Higashi, Tsukuba Science City, Ibaraki, 305-8566, Japan  
TEL: +81-29-861-2718 or 6746  
FAX: +81-29-861-2338  
E-mail: s-fujita@aist.go.jp

## Introduction:

The development of methods for high-throughput screening for gene identification is important for the elucidation of the mechanisms of basic biological phenomena and disease processes. Cell-microarray, which is one of such methods, is very useful for high throughput assays based on cell phenotypes.

During the past decade, we and several groups have been developed localized reverse transfection method. In the method, plasmid DNA or siRNA with transfection reagents attached to the surface of, for example, a glass slide or a culture dish is reverse-transfected locally into adherent cells by contact. Therefore, it allows the construction of cell-microarray with defined expression of cDNA or comprehensive “knockdown” of genes by siRNAs. The novel type of reverse transfection on cell-microarray, we call transfection microarray (TMA), enabled the realization of (i) a high efficiency of DNA or siRNA transfection in various types of cells, (ii) a low toxicity to cell by transfection, (iii) a long-term stabilization of attached DNA or siRNA, (iv) one-step preparation of the surface for transfection and cell culture, and (v) reduction in cost and saving rare cell strain by miniaturization.

In this report, we introduce our developed reverse transfection to adherent cells on polyethylene glycol (PEG) patterned cell-microarray in order to realize the functional soft interface and the highest densified TMA. It is important to print pattern constructed by two area, that is cell-adherent area by extra-cellular matrix (ECM) and cell-nonadherent area by PEG, because of inhibition of cell migration to another cell-adhesion area. It is very useful for high throughput assays of gene functions and is expected for the application to the field of drug screening and personalized medicine etc.

## Materials and Methods:

In general our method, localized reverse transfection from spots of plasmid or siRNA is mainly useful for exploitation of cell-microarray. In the method, the mixture of 1  $\mu$ l of siRNA (140 pmol) or plasmid (1  $\mu$ g), 2  $\mu$ l of Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) and 15.75  $\mu$ l of DMEM is incubated for 20 min at RT. Five  $\mu$ l of fibronectin (4 mg/ml; Life Lab. Comp.) and 1.25  $\mu$ l of 2% gelatin (Sigma) are added. The mixture, we call RTF-mix, is spotted on glass slides (5-15 nl each).

In this study, we determined the condition for making the pattern by cell-adherent region by ECM and cell-nonadherent region by PEG. Glass-bottom cell culture dishes were coated by PEG after oxygen plasma gas treatment. 0.08% Fibronectin in PBS, 0.01% typeI collagen (Res. Inst. Fuct. Pep.) in PBS or RTF-mix was spotted on slide glasses and/or dishes by inkjet printer (KCS-mini, Kubota-comps) in order to make the area of cell-adhesion.

## Results and Discussion:

We evaluated PEG-coating glass and ECM including type I collagen and fibronectin spotted on glass. HeLa and NBT-L2b cells were cultured on PEG patterned cell-microarray. After 1 and 24h, we evaluated the adhesion of each cell on various volumes of ECM spots. As a result, we optimized the spotting volume of each ECM in order to construct two fields of cell-adhesion by extra-cellular matrix (ECM) and cell-nonadhesion by PEG. In the case of coating by low volume of ECM, such as 15 nl spot of 0.001% of type I collagen (coating volume of unit area is 0.354 ng/mm<sup>2</sup>), cells cannot adhere the region of ECM. Finally, we optimized reverse transfection condition to HeLa and NBT-L2b cells on the pattern.

## 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) **Fujita, S.\***, Onuki-Nagasaki, R., Fukuda, J., Enomoto, J., Yamaguchi, S., Miyake, M. (2012) Super-dense transfected-cell microarrays generated by piezoelectric inkjet printing, Submitted.

### 2. 著書・総説

- 1) 袴田和巳、**藤田聡史**、三宅淳（2012）導入された遺伝子は細胞分裂依存的に発現を開始する、*生物学*、90, 83
- 2) **藤田聡史**、福田淳二、袴田和巳、斉藤真人、大政健史（2011）細胞マイクロチップの新展開 ～細胞評価技術の俯瞰的理解を目指して～、*生物学*、89, 675
- 3) **Fujita, S.\***, Fukuda, J., Enomoto, J., Kurita, R., Onuki-Nagasaki, R. (2011) Reverse Transfection to Adherent Cells on PEG Patterned Cell-Microarray, *Proceeding of International Conference on Biofabrication 2011*, 47.

### 3. 会議発表（招待講演・依頼講演のみ）

- 1) **藤田聡史\***、トランスフェクションマイクロアレイ技術を用いた細胞解析への展開、第63回日本生物工学会大会・ワークショップ（細胞マイクロチップの新展開～細胞評価技術の俯瞰的理解を目指して～）、東京都小金井市 2011.9.26-28
- 2) **藤田聡史\***、福田淳二、榎本詢子、栗田僚二、長崎玲子、トランスフェクションマイクロアレイチップの高機能化、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2011、大阪府吹田市、2011.9.1-2
- 3) **藤田聡史\***、細胞接着領域パターンによる遺伝子導入細胞チップの高機能化、「ソフトインターフェースの分子科学」第6回公開シンポジウム・領域会議、福岡県春日市、2011.7.28-29

### 4. その他（受賞）

- 1) Onset timing of transient gene expression depends on cell division  
2011年、(第19回)「生物学論文賞」受賞（連名）

# 生体膜類似の糖鎖／ペプチドナノクラスターの構築と病原体の検出デバイスの開発

研究代表者：慶應義塾大学理工学部・佐藤 智典

連携研究者：慶應義塾大学理工学部・松原 輝彦

## 1. 緒言

生体膜の主要成分であるシアル酸を有する糖脂質（ガングリオシド）は、シグナル伝達や細胞間コミュニケーションのほか、病原体感染などの各種疾病に関わっている。ガングリオシドは、生体膜において「膜マイクロドメイン」と呼ばれる集合体として存在していると考えられている。生体膜モデルとしての脂質平面膜は、リポソームを形成しない脂質組成で安定な膜が形成され、ガングリオシドの分布状態や糖鎖認識についての解析を行うことが可能である。これまでに、細胞膜より得られた糖脂質の脂質膜中での集合状態を原子間力顕微鏡（AFM）で解析することで、ガングリオシドは脂質膜中で均一に分布しているのではなく、膜マイクロドメインに局在し、70 nm 程度のサイズを有する「糖鎖ナノクラスター」を形成することを見いだした。また、老齢マウスのシナプトゾームから得られた脂質膜ではガングリオシド GM1 のクラスターが形成され、 $\beta$ アミロイドのオリゴマーを選択的に形成できることを見いだした。ガングリオシド GM3 のレクチンやインフルエンザウイルスに対する糖鎖認識は、膜マイクロドメインの構成脂質の共存下で向上することも見いだしている。このような知見は、受容体となる糖鎖ナノクラスターの形成が、生体分子や病原体との相互作用に重要であることを示している。病原体の糖鎖認識性を解析することで、診断のための検出技術の開発へと発展させることが可能となる。そこで本研究では、脂質膜中での糖脂質集合体の形成が受容体機能の発現に関与していることを利用して、糖鎖ナノクラスターおよびペプチドナノクラスターによる生体分子や病原体の高感度な検出デバイスを構築することを目指している。そのために、糖脂質やペプチド脂質を組み込んだ脂質平面膜を用いて、AFM 観察によるナノクラスター形成、およびレクチン、抗体、インフルエンザウイルス（ヘマグルチニン）などに対する相互作用の定量的解析を行う。これにより、脂質組成とナノクラスター形成の相関を解析し、病原体に対する高感度な検出デバイスを開発する。

## 2. 研究経過

### 1) 糖鎖クラスターの人工的な構築と糖鎖認識

脂質ラフト中の脂質組成は、病原体に対する糖鎖受容体の親和性に影響している。ラフト中では複数の糖脂質が共存しているが、糖鎖認識に対する共存脂質の協同的な効果については明らかになっていない。そこで、図1のような方法で脂質ラフトの構成成分を HPTLC や LC-MS で分析して、再構成膜や人工膜を作成して病原体との相互作用を検討した。老齢マウスのシナプトゾームから得られた再構成膜では、非シナプトゾームから得られた脂質膜と比較して、ガングリオシド GM1 のクラスターが形成され、GM1 結合性ペプチドの結合や $\beta$ アミロイドのオリゴマーの形成が誘起されることを見いだした。

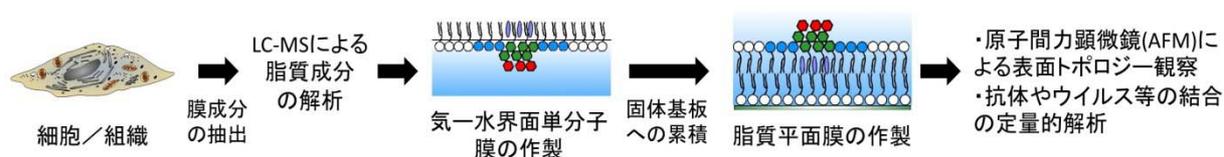


図1 脂質平面膜を用いた実験の概略図。細胞膜由来の脂質の LC-MS 解析を行い、再構成二分子膜や単分子膜を固体基板に累積することで、表面構造解析や糖鎖認識の定量的解析を行う。

シナプトゾームの脂質組成の解析により、グリセロリン脂質：スフィンゴミエリン(SM)：コレステロール(chol)：糖脂質のモル比は93：76：55：2であると推測した。糖脂質としてはGM3とGM1が

主成分であった。このような比率を元にして、人工的なモデル膜を作製して糖鎖認識を検討したところ、有為な認識が検出されなかった。ガングリオシド以外の脂質成分、特に中性の糖脂質の寄与が考えられる。そこで、人工膜として GM3 含有脂質膜の糖鎖認識についての検討を行った。GM3/SM/cho1 の混合膜では、GM3 含有率が 10 mol%以下では、GM3 と小麦胚芽レクチン WGA との相互作用は抑制されていた。このような膜に GM3 とグルコシルセラミド GlcCer を混合させることで、WGA との親和性は向上し、GM3 と GlcCer が等モルで混合された場合に最も高い認識が見られた。糖脂質の高い認識には、脂質ラフト中において均一な混合を誘起する中性脂質の共存が重要であることが示された。

## 2) 糖鎖ライブラリーを用いた糖鎖アレイの作製

脂質平面膜を用いた解析により、糖鎖のクラスター形成が糖鎖認識に大きく関わっていることが示された。そこで、糖脂質に代わり、糖鎖ライブラリーを用いた糖鎖アレイの開発を行なった。糖鎖アレイの開発においては、固定化する糖鎖の入手方法が困難である場合も多い。そこで本研究では、糖鎖ライブラリーは糖鎖プライマー法により独自に作製している。これまでに、ガングリオ系列、グロボ系列、ネオラクト系列あるいは O-グリカン型の糖鎖を合成するための糖鎖プライマーの開発に成功している。本研究では、アジド基を有する糖鎖プライマーを動物細胞に投与してオリゴ糖鎖の作製を行った。

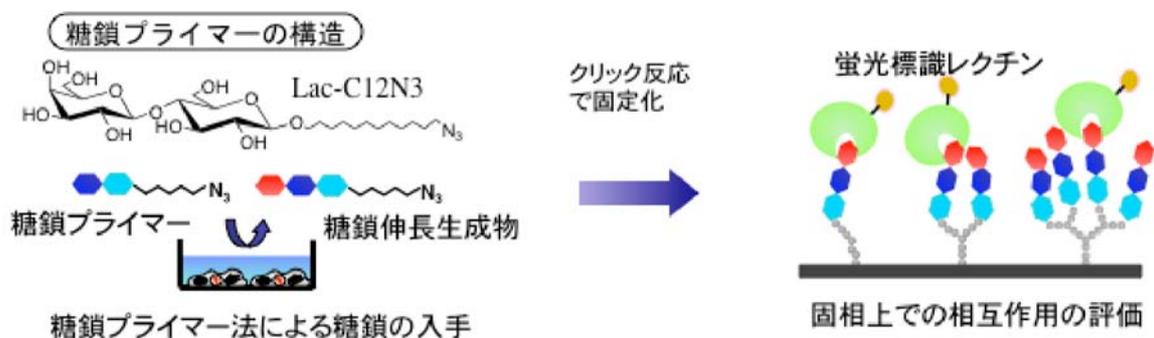


図2 アジド化糖鎖プライマーを用いた糖鎖の合成と、その生成物を用いた糖鎖アレイの作製の概略図

細胞としてはインフルエンザウイルスが感染する MDCK 細胞を用いた。アジド基を末端に有する糖鎖プライマー Lac-C12N3 を MDCK 細胞に投与することで、酸性糖として NeuAc $\alpha$ 2-3Lac-C12N3 および硫酸化 Lac-C12N3 を主成分として、中性糖としては Gal-Lac-C12N3 および 2HexNAc-Gal-Lac-C12N3 を主成分とした生成物が得られた。得られた生成物は固体基板上にクリック反応で固定化した。そのために、まずカルボキシル基提示表面をプロパルギルアミンと反応させた。この反応での縮合剤 EDC/NHS/プロパルギルアミンの比は、その後の糖鎖認識に大きく影響したため、反応条件を最適化した。提示したアルキンとアジド化糖鎖とのクリック反応には CuSO<sub>4</sub>、アスコルビン酸、および TBTA を用いたが、アジド化糖鎖とのモル比は反応効率が最適になるように調整した。次に、固定化した糖鎖に対する、抗 GM3 抗体やインフルエンザウイルスヘマグルチニン (H1N1 型) の結合性を定量的に評価したところ、酸性糖への選択的な結合が見られた。図3には、MDCK細胞から得られた酸性および中性糖鎖に対するインフルエンザウイルスヘマグルチニン (H1型) の結合実験の結果を示した。これにより、糖鎖プライマーにより得られた糖鎖ライブラリーの糖鎖アレイへの活用技術の確立を行った。さらに、リジンデンドリマーにシアリルラクトースを固定化して、レクチンやヘマグルチニンの結合を定量的に解析したところ、4価の場合には1価や2価と比較して高い結合量が見られた。

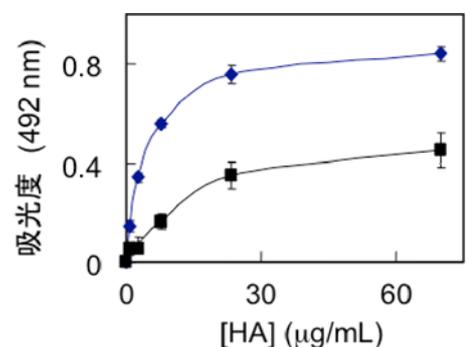


図3 MDCK細胞から得られたオリゴ糖鎖 (酸性糖鎖●、中性糖鎖■) を固定化した表面へのヘマグルチニンの結合の ELISA による評価

糖鎖認識には、糖鎖の提示方法の違いが大きく影響する。よって、糖鎖の入手法に加えて、糖鎖の提示方法を検討することで、高親和性のデバイスの開発が可能となる。

Construction of biomembrane mimetic sugar chain/peptide nanoclusters  
and development of detection devices for pathogens

Toshinori Sato

Department of Biosciences and Informatics, Keio University

Hiyoshi 3-14-1, Kouhoku, Yokohama 223-8522, Japan

Tel: +81-45-566-1771, Fax: +81-45-566-1447, E-mail: sato@bio.keio.ac.jp

### Introduction

Sialylglycosphingolipids such as gangliosides are concerned with signal transduction, cellular communication, infection of pathogens and so on. Gangliosides are considered to exist in lipid microdomain. To investigate the distribution and recognizability of gangliosides in lipid membrane, we employed lipid planar membrane. In our previous study, it was demonstrated that formation of ganglioside cluster was observed in lipid membrane obtained from synaptosome of aged mice, and induced the formation of amyloid- $\beta$  oligomer. These results suggested that formation of gangliosides nanocluster are important for the carbohydrate recognition for biomolecules and pathogens. It is possible to improve the detection technology by analyzing the recognizability of pathogens for glycans. In this study, we carried out the development of detection device for biomolecules and pathogens using sugar/peptide nanoclusters. For example, AFM observation for surface topology and quantitative analyses for the interaction of glycans with lectin, antibody, and influenza virus (hemagglutinin) were carried out using lipid planar membrane and oligosaccharide-immobilized surface.

### Results and Discussion

Lipid composition in lipid raft largely influenced the affinity of glycan as receptor. However, the cooperative effect of plural kinds of lipids in lipid raft has not been clarified. Therefore, lipid composition of synaptosome of aged mice were analyzed by HPTLC and LC-MS, and interaction of the reconstituted and artificial lipid membrane with biomacromolecules were investigated. For the reconstituted lipid membrane, the binding of GM1-binding peptide and formation of amyloid- $\beta$  oligomer were largely enhanced compared to the lipids obtained from non-synaptosome. Based on the analysis of lipid composition, the artificial lipid membrane containing glycerophospholipid, sphingomyelin (SM), cholesterol and ganglioside GM1 was prepared. However, the significant affinity of GM1 for GM1-binding peptide and amyloid- $\beta$  was not observed. Next, carbohydrate recognition of GM3-containing artificial lipid membrane was investigated. When the content of GM3 in GM3/SM/cholesterol mixed lipid membrane was less than 10 mol%, the binding affinity of GM3 with wheat germ agglutinin (WGA) was low compared to the control membrane. However, incorporation of glucosylceramide in the GM3/SM/cholesterol membrane resulted in the increase of binding affinity.

Besides glycosphingolipids, oligosaccharide library was employed to develop sugar array. In our study, oligosaccharide library was synthesized by original saccharide primer method. We have succeeded in developing saccharide primers to synthesize oligosaccharide involving ganglio series, globo series, neolacto series and O-glycan type. In this study, oligosaccharides were synthesized by administering azide saccharide primer Lac-C12N3 to MDCK cells. The neutral products (Gal-Lac-C12N3 and 2HexNAc-Gal-Lac-C12N3) and acid products (NeuAc $\alpha$ 2-3Lac-C12N3 and sulfated Lac-C12N3) were obtained. Those products were immobilized on ELISA plates by click chemistry, and the specific binding of anti-GM3 antibody and influenza virus hemagglutinin to acidic products were quantitatively observed. The selective binding were largely affected by the reaction condition of propargylamine and/or azide products.

## 業績リスト

### 1. 会議発表

- 1) 脂肪酸組成の異なるガングリオシド GM3 に対する海洋細菌 *V. harveyi* の認識機能解析、福田 竜統・松永 尚之・伊東 信・松原 輝彦・佐藤 智典、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011年9月12日
- 2) 糖鎖プライマー法によって得られたオリゴ糖鎖ライブラリーを利用した LC-MS での糖鎖構造解析、平井 美和・佐藤 智典、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011年9月13日
- 3) 糖鎖模倣ペプチドの多価によるウイルス感染への影響、松原 輝彦・千葉 頌子・荒見 俊介・佐藤 智典、第60回高分子討論会、岡山大学（岡山）、2010年9月28日、岡山大学
- 4) 糖鎖プライマー法を用いた糖鎖チップの作製と糖鎖結合性タンパク質との相互作用評価、高橋良尚・柏木一公・佐藤智典、GlycoTOKYO2011 シンポジウム、2011年12月9日、理研（和光）
- 5) 糖鎖プライマー法によって得られた糖鎖ライブラリーを用いた LC/MS でのハイスループット解、
- 6) 平井 美和・佐藤 智典、日本化学会第91春季年会、2012年3月25日、横浜
- 7) 糖鎖プライマー法で得られた糖鎖の固定化とインフルエンザウイルスとの相互作用の解析、
- 8) 久井 智子・高橋 良尚・佐藤 智典、日本化学会第91春季年会、2012年3月25日、横浜
- 9) アミロイドベータの凝集機構の解明のためのGM1含有生体膜モデルの構築、福田 竜統・小島 昂大・松原 輝彦・山本 直樹・柳澤 勝彦・佐藤 智典、日本化学会第91春季年会、2012年3月25日、横浜

2012年 7月 26日発行

---

文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究（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](mailto: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

---

