



「ソフトインターフェースの分子科学」



「ソフトインターフェースの分子科学」

**News Letter Vol. 10**

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）

領域番号：2005

領域略称名：ソフト界面

領域代表者：前田 瑞夫



## < 目 次 >

ワークショップのご案内.....	1
研修コースのご案内.....	63
アウトリーチ活動報告.....	66
関連イベント報告.....	68
関連イベント情報.....	72
新聞・報道等（2012年4月～2012年7月）.....	74



ソフトインターフェースの分子科学ワークショップ  
「ソフト界面と計測・センシング」プログラム

日 時： 8月8日（水）～8月9日（木）  
日 程： 8月8日 12：55～17：45 シンポジウム  
18：15～20：00 交流会  
8月9日 9：30～15：45 シンポジウム

会 場：  
（シンポジウム）東京医科歯科大学 湯島キャンパス 歯学部特別講堂(歯科南棟4F)  
（交流会） ” ファカルティラウンジ（M&Dタワー26F）

8月8日（水）

12:55-13:00	理化学研究所	前田瑞夫（ごあいさつ）
13:00-13:45	産業技術総合研究所	青木 寛
13:45-14:30	大阪大学	谷口正輝
14:30-15:15	産業技術総合研究所	佐藤 縁
15:15-15:30	コーヒーブレイク	
15:30-16:15	理化学研究所	Hsiao-hua (Bruce) Yu
16:15-17:00	東京大学	加藤 大
17:00-17:45	東京医科歯科大学	松元 亮
18:15-20:00	交流会	

8月9日（木）

9:30-10:15	東京医科歯科大学	由井伸彦
10:15-11:00	東京理科大学	大塚英典
11:00-11:45	物質・材料研究機構	有賀克彦
11:45-12:45	ランチ	
12:45-13:30	ポスター発表	
13:30-14:15	横浜国立大学	渡邊正義
14:15-15:00	物質・材料研究機構	魚崎浩平
15:00-15:45	北海道大学	叶 深
	閉 会	

以 上



## ワークショップの御案内





# 簡便・迅速を目指したラベル化不要の高感度遺伝子センサ

青木 寛

独立行政法人産業技術総合研究所 環境管理技術研究部門

## 1. はじめに

遺伝子の機能を核酸レベルで解析する一般的な手法として、蛍光標識に基づく DNA マイクロアレイ法が現在最も普及しているが、いくつかの本質的な問題点も明らかになりつつある。すなわち、(1)ターゲットの蛍光標識やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法等による核酸増幅を行う必要があること、(2)ハイブリッド形成しなかったターゲット核酸の徹底洗浄が必要であること、(3)システムや測定装置が高価で大型である、などである。網羅的な遺伝子解析の必要性が、研究施設内に留まらず臨床や環境計測の現場でも高まりつつあることから、上記問題点の克服は喫緊の課題である。現在このような煩雑なサンプル処理を大幅に省いた安価でコンパクトな新規分析法の開発が望まれているが、開発例はごくわずかであり、臨床や環境の現場における真の意味での実用化はまだまだ先と言えそうだ。

演者はこの点を解決するため、安価で省スペース化が容易な電気化学的手法に基づき、簡便・迅速な遺伝子検出技術の開発に携わってきた。本発表では、ターゲット核酸の標識化およびマーカの添加などの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) 網羅的遺伝子検出法の基盤技術について紹介する。併せて、これら遺伝子検出技術のデバイス化に関する最近の検討についても紹介する。

## 2. 電気化学的手法によるラベル化フリー遺伝子検出

### 2.1 センサ表面電荷の変化による遺伝子検出法(アプローチ1)<sup>1)-5)</sup>

多数の負電荷を有する核酸が、電極表面上に固定されたプローブとハイブリッド形成すると、電極表面の電荷が負に変化することを利用した。また、ミスマッチ排除能の高さから、バックボーンに電荷を持たないペプチド核酸 (peptide nucleic acids, PNA) を使用した。金電極表面上に、システインを導入したプローブ PNA を固定化してセンサとした。がん抑制遺伝子 p53 遺伝子のミスマッチ部位を認識する鎖長 10 塩基のプローブ PNA<sub>10</sub> を合成し、ターゲット DNA をモデル核酸として使用した。ハイブリッド形成に伴い、測定溶液中の電気化学活性マーカ陰イオン ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ) の酸化還元反応が大きく抑制されることを指標に、検出下限  $10^{-6}$  M で検出可能なことを見出した。一方、一塩基変異 (SNPs) を有するターゲット DNA の場合には、100 倍以上濃い濃度でもセンサは応答しなかった。さらに、塩基鎖長・配列とハイブリッド安定性との関係について検討したところ、プローブ鎖長が 15 塩基、20 塩基と長くなるに従い、検出下限が  $10^{-9}$  M、 $10^{-12}$  M と向上することが分かった。

次に、ハイブリッド形成前後のセンサ表面電荷の変化をさらに強調させることで、検出下

限の向上が可能かどうか検討した。測定溶液中で正電荷を有する単鎖チオールで予め表面を修飾し、これによりハイブリッド形成前後で表面電荷が正から負に変化するようにした。マーカには陽イオンである $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ を使用したところ、 $5.1 \times 10^{-10} \text{ M}$ の検出下限でターゲットが検出可能だった。ハイブリッド形成前後での表面電荷の変化をより強調した結果、検出下限が3桁以上向上した。また、ミスマッチDNAの場合、 $10^{-7} \text{ M}$ 以上でも応答はほとんど観測されなかった。さらに、プローブPNA/ターゲットDNAの塩基鎖長を10塩基から13塩基とし、各種測定条件を最適化したところ、 $10^{-15} \text{ M}$ レベルでの配列選択的な高感度検出も可能だった。このように、ターゲットのラベル化不要な高感度遺伝子検出法の開発に成功した。

## 2.2 外部信号発生団を用いない遺伝子検出法(アプローチ2)<sup>6)</sup>

さらなる簡便化を図るため、外部信号発生団である電気化学活性マーカが不要な検出系の開発を目指した。そのため、プローブに信号発生部位として電気化学活性基を結合させた新たな遺伝子プローブを開発した。遺伝子プローブとして、ターゲット認識部位であるPNAの5'末端にフェロセンおよび3'末端にシステインを導入したコンジュゲート分子を新たに設計した。本センサのターゲットに対する配列選択的な応答を検討するため、内分泌攪乱物質に対し発現が亢進する遺伝子配列を認識する鎖長22塩基のプローブFc-PNA<sub>22</sub>を合成し、金電極表面上に固定化してセンサとした。詳細な電気化学的検討により、プローブがハイブリッド形成の前後で柔軟な1本鎖構造から剛直な2本鎖構造へと変化し、プローブ末端のフェロセンのセンサ表面への接近が阻害され、酸化還元反応が大きく減少することが分かった。

ターゲット濃度に対する応答依存性を矩形波ボルタモグラムにおけるフェロセン酸化還元電流値の減少を指標に観測したところ、 $1.44 \times 10^{-11} \text{ M}$ を検出下限としてピーク電流値が大きく減少した。一方、ミスマッチDNAの場合には、 $\mu\text{M}$ レベルの濃度でも応答は観測されなかった。このように、本センサ原理はラベル化が不要であるのみならず測定溶液中へのマーカの添加をも必要としないことから、センサ単独で遺伝子検出を可能とする”self-report”自己報告型センサとして、簡便・迅速な遺伝子検出法を提供するものと期待される。

## 2.3 シグナルオン型遺伝子検出法(アプローチ3)<sup>7)</sup>

さらに、ハイブリッド形成後に信号増加させることが高感度化へのポイントと考え、アプローチ2で開発した遺伝子プローブを基礎として、新規”signal-on”型遺伝子プローブを開発した。このプローブは、プローブ両末端に電気化学活性基および活性抑制基として、フェロセンおよび $\beta$ -シクロデキストリンを有する。プローブが柔軟な構造を持つ1本鎖時には両者は分子内で包摂するため、フェロセンの電気化学活性は抑制される。一方、プローブが剛直な構造を持つ2本鎖時には包摂は解消し、フェロセンは電気化学活性を取り戻す。結果、ハイブリッド形成に伴って電気化学反応は増大し、“signal-on”の検出が可能となる。

ターゲット核酸が存在しない溶液中と比較して、ターゲット核酸を含む溶液中では、末端

フェロセンの酸化還元電位は $-62\text{ mV}$ のポテンシャルシフトが観測された。同時に、 $+0.3\text{ V}$ での電流値の変化に着目すると、約5倍の電流増加が観測された。これらのことは、ターゲット核酸と遺伝子プローブのハイブリッド形成に伴いフェロセンの電気化学活性が回復し、その結果、“signal-on”型にターゲットの有無が検出可能なことを示している。

### 3. 微量高精度アレイスポッティング技術による遺伝子センサのデバイス化およびマルチ化<sup>8)-10)</sup>

開発した遺伝子センサをマルチ化し1つのデバイス上に配置することで、環境診断が可能かどうかの検討のため、マイクロ電極アレイチップを作製し、各マイクロ電極表面に上記開発した遺伝子プローブを固定化することで遺伝子センサアレイチップの開発を目指した。

一般に、化学物質の生体影響評価には、数十～数百種程度の遺伝子発現の同時観察が必要とされている。そこで、光リソグラフィ技術により、 $8\times 12$ マトリックスを形成する96 ch 電極アレイチップ（直径： $280\text{ }\mu\text{m}$ ，間隔： $1\text{ mm}$ ）を作製した。高集積アレイチップ作製用に開発した新規スポッタにより、96ch アレイチップ上のマイクロ電極上に2種類の遺伝子プローブ PNA\_20 および PNA\_22 を固定化し、遺伝子センサアレイチップを作製した。アプローチ1の遺伝子検出法に基づき、PNA\_22 と相補鎖の DNA 溶液に浸漬して測定したところ、PNA\_22 を固定した遺伝子センサのみが、選択的にかつ再現性良く応答することが分かった。同様に、より多極の遺伝子センサアレイチップについても検討を行い、エストロゲン応答遺伝子などの検出へ応用した。遺伝子のモデルとして15～22 mer の DNA をターゲットとして使用し、プローブ PNA とのハイブリッド形成前後におけるセンサ応答の変化を解析したところ、ミスマッチ DNA に対して、相補・非相補を完全に判別することに成功した。

### 4. 結言

本研究における遺伝子検出手法は、ラベル化フリーでターゲットの検出が可能であるため、簡便・迅速な遺伝子検出を可能にする。特に、電気化学活性団を取り付けた遺伝子プローブの場合、ラベル化が不要であるのみならず測定溶液中へのマーカの添加をも必要としない。簡便・迅速な一次スクリーニングとしての遺伝子解析の重要性は今後ますます大きくなるものと予想されるが、本研究で開発した遺伝子プローブに基づく遺伝子診断技術は、医療分野・材料分野でも大きなインパクトを与える可能性を秘めていると考えている。

### 参考文献

- 1) Umezawa, Y. et al., *Anal. Chem.*, **76**, 320A-326A (2004)、
- 2) Aoki, H. et al., *Electroanalysis*, **12**, 1272-1276 (2000)、
- 3) Aoki, H. et al., *Electroanalysis*, **14**, 1405-1410 (2002)、
- 4) Aoki, H. et al., *Analyst*, **128**, 681-686 (2003)、
- 5) Aoki, H. et al., *Analyst*, **130**, 1478-1482 (2005)、
- 6) Aoki, H. et al., *Analyst*, **132**, 784-790 (2007)、
- 7) Aoki, H. et al., *Supramol. Chem.*, **22**, 455-460 (2010)、
- 8) Aoki, H. et al., *Anal. Sci.*, **24**, 929-935 (2008)、
- 9) Aoki, H. et al., *Anal. Sci.*, **26**, 367-370 (2010)、
- 10) Aoki, H. et al., *Anal. Sci.*, **24**, 817-825 (2008)。

# ナノポアデバイスの1分子科学

大阪大学 産業科学研究所

谷口 正輝

## はじめに

細胞膜には、直径数 nm 以下の細孔(ナノポア)が、無数に開いている。ナノポアは、細胞膜を貫通するチャネルタンパク質により作られ、ナノポアを通るイオンや1分子を識別する。この1分子識別機能を固体デバイス上で実現することを目指してはじまったナノポアの研究は、今や、パーティクルカウンターや次々世代DNAシーケンサーへと応用展開されている。

現在、世界中で熾烈な研究開発競争が繰り広げられているナノポアには、1分子をイオン電流変化で識別するタイプと、1分子をトンネル電流で識別するタイプの2種類がある。イオン電流タイプは、分子によって妨げられるイオン電流の減少量で1分子を識別する。トンネル電流タイプは、分子を介してナノ電極間を流れるトンネル電流の増加量で1分子識別を行う。ともに、SiO<sub>2</sub>からなるナノポアデバイスであるとする、SiO<sub>2</sub>-溶液界面と溶液-分子界面(ソフト界面)が、ナノポア内の1分子ダイナミクスを支配する。ナノポア内を流れるイオン電流・トンネル電流と1分子ダイナミクスは、強く相関すると予測されるが、電磁気学・流体力学・量子力学が複雑に入り混じったナノポアシステムの研究は始まったばかりである。

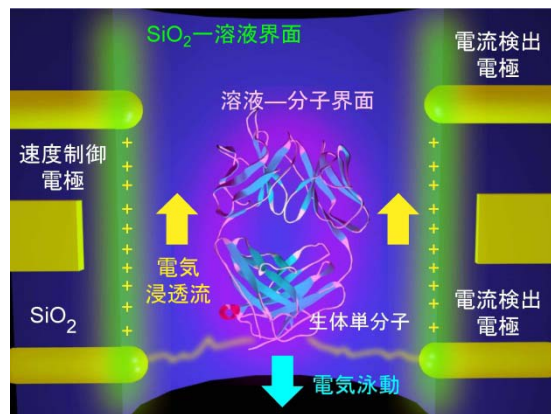


図1. ナノポアデバイスの概念図.

## イオン電流型ナノポアで1分子の構造を調べる

イオン電流型ナノポアでは、ナノポアの上下に配置された電極間の電圧により、帯電した分子が、電気泳動で移動する(図 2a)。ナノポア内に分子がいなければ、大きなイオン電流が流れる(図 2b)。一方、ナノポア内に分子が入ると、イオンの流れが遮られるためイオン電流量が減少する。イオン電流の変化量は、ナノポア内に存在する分子の体積に比例する。ナノポア内を通過する1本のDNAの体積を  $V$  とすると、2つ、3つに折り畳まれた1本のDNAの体積は  $2V$ 、 $3V$  になるので、イオン電流の変化量が2倍、3倍と変化する。「イオン電流変化量 $\propto$ 分子の体積」の関係を利用すると、1本のDNAの折り畳み構造を調べることができる。



図 2(a) のような直径約 50nm のナノポアデバイスを用いて、 $\lambda$ -DNA 水溶液のイオン電流の時間変化を測定した。得られた電流—時間プロファイルを見ると、特徴的なイオン電流の変化が観察された(図 2c)<sup>1</sup>。イオン電流変化量のヒストグラムを作成したところ、20pA の整数倍にピークが得られ、折り畳みの無い 1 本の DNA がナノポアを通過するときのイオン電流変化量が、20pA であることが分かった。

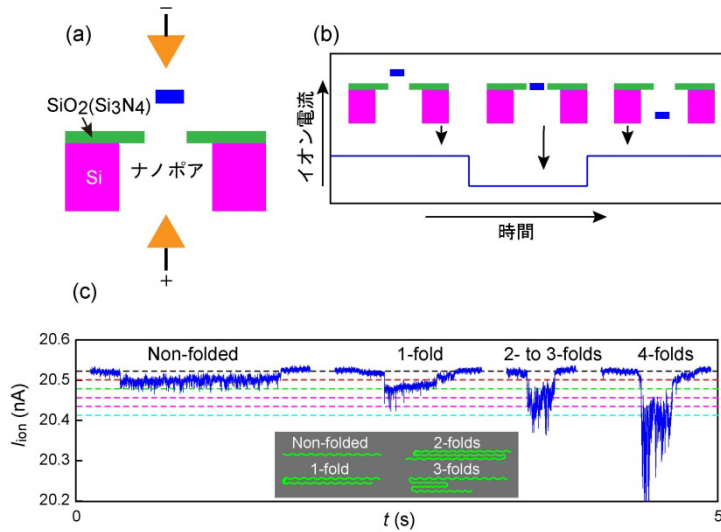


図 2. イオン電流型ナノポアデバイス。(a) デバイス構造、(b) 電流—時間プロファイル、(c)  $\lambda$ -DNA 水溶液の電流—時間プロファイル。

詳細な電流—時間プロファイルの解析から、図 2c のように、 $n$  回の折り畳み構造が、 $20\text{pA} \times (n+1)$  の電流変化に対応していることが分かった。

さて、イオン電流型ナノポアでは、DNA は電気泳動で移動する。SiO<sub>2</sub> の表面は負に帯電しているので、SiO<sub>2</sub>—溶液界面にはカチオンが集まり、負に帯電している DNA の泳動方向とは逆向きの電気浸透流が生じる。つまり、ナノポア内の DNA は、電気泳動と電気浸透流の 2 つの流れの和で移動することになる。一方、DNA の構造をモニターしているイオン電流量の変化には、「イオン電流量変化  $\propto$  イオン量の変化」の関係が成り立つ。元々、体積の小さいナノポア内では、折り畳み数が増えてくると、DNA がナノポア内に引き連れてくるカチオン数も、イオン量の変化に寄与することになる。引き連れてくるカチオン量は、溶液—DNA 界面に依存する量となり、カチオン種や pH に大きく依存する。このように、ナノポア内では、SiO<sub>2</sub>—溶液界面と DNA—溶液界面（ソフト界面）が、DNA の運動とイオン電流に大きく寄与する。2 つの界面を制御する技術が、イオン電流型ナノポアデバイスのコア技術であり、私達は、SiO<sub>2</sub> に埋め込んだゲート電極を持つナノポアデバイスを開発している<sup>2-4</sup>。

### トンネル電流型ナノポアで 1 分子を識別する

ナノポアの直径(2nm 以下)と同じ電極間距離を持つナノギャップ電極の間を、分子が通過するとき、分子を介して電極間にトンネル電流が流れる(図 3a、3b)。トンネル電流は、分子の電子状態に敏感に反応するため、トンネル電流の値から、分子の種類を識別することができる。この原理は、米国立衛生研究所が進める \$1000 ゲノムプロジェクトのターゲットである次々世代 DNA シークエンサーの原理である。ところが、この原理は、2010 年まで実現されることはなく、空想の科学とされていた。

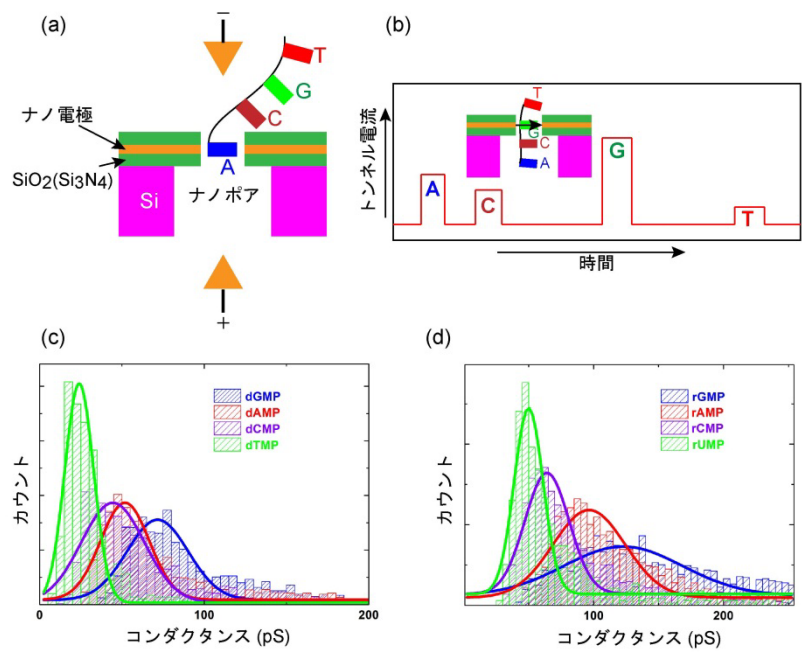


図3. トンネル電流型ナノポア. (a)デバイス構造、(b)電流—時間プロフィール、(c)DNA と(d)RNA を作る4つの塩基分子の1分子コンダクタンスのヒストグラム.

電極間距離が、約 1nm のナノギャップ電極を機械的破断接合 (Nano-fabricated Mechanically Controllable Break Junction: Nano-MCBJ) で作製した<sup>5</sup>。Nano-MCBJ を用いて、DNA と RNA を作るそれぞれ4つの塩基分子水溶液の電流—時間プロフィールを測定したところ、スパイク状の電流シグナルが得られた。各塩基分子について、約 1000 個のシグナルを積算して作成した1分子電気伝導度 (コンダクタンス) のヒストグラムには、各塩基に対応したピーク電流が得られた (図 3c、3d)<sup>6,7</sup>。それぞれ4つのピーク電流が異なるので、ピーク電流を読むことで、1塩基分子を識別することができる。また、トンネル電流を用いると、現在のDNAシーケンサーでは識別できない、メチル化シトシンやオキソグアニン等、変異塩基分子も識別することができる<sup>8</sup>。さらに、3塩基からなるDNAと7塩基からなるRNAの塩基配列決定も、この1分子識別法により実現された<sup>9</sup>。

トンネル電流型ナノポアデバイスでは、電極間距離と分子の大きさが同程度であるため、SiO<sub>2</sub>—溶液界面とDNA—電極界面 (ソフト界面) が、ナノポア内の1分子ダイナミクスとトンネル電流に大きく寄与する。ここでも、1分子ダイナミクス制御技術が、ナノポア内の現象を解明するカギとなる。

## 文献

- [1] **Sci. Rep.** 2, doi:10.1038/srep00394 (2012). [2] *J. Mater. Chem.*, 22 (2012) 13423. [3] **ACS Nano** 6 (2012) 3499. [4] **ACS Nano** 5 (2011) 8391. [5] **Nano Lett.** 8 (2008) 345. [6] **Nat. Nanotechnol.** 5 (2010) 286. [7] **Sci. Rep.** 1, doi:10.1038/srep00046 (2011). [8] **J. Am. Chem. Soc.** 133 (2011) 9124. [9] **Sci. Rep.** 2, doi: 10.1038/srep00501 (2012).

# タンパク質認識単分子膜の構造と分子認識への動的効果

佐藤 縁

産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門

## 1. はじめに

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。生体分子のみを実サンプルから効率よく取得、感度よく検出するためには、1) 認識部位(膜側) - 生体分子(検出側)間の相互作用をできるだけ増強させる、2) 夾雑物質による非特異的な吸着の徹底的な排除を試みる、3) 認識基板の構造と材質を検討する、検出手法そのものの検討、などを行っていく必要がある。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、基板への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実験的に確認してきた。

モデルとして植物レクチンコンカナバリリン A (Con A) を用いて、高感度検出にふさわしいハイブリッド膜構造を詳細に検討した。その後、実際に疾病マーカー候補分子として期待されているレクチンの一種である、ガレクチン類の高感度・高選択的検出についても検討を行った。しかし、免疫反応を用いずにレクチンの検出を行う場合、ハイブリッド膜の採用、非特異吸着抑制の効率的な利用等、いろいろと工夫しても、それでもなお検出限界・検出感度の問題が懸念される。糖とレクチンの弱い相互作用は、電気化学活性基を糖の周りに配置することで膜全体を電気化学的に変化させた場合に、増強されることを新規に確認した。この結果が起こる要因について電気化学 SPR (表面プラズモン共鳴法) と電気化学 QCM (水晶振動子マイクロバランス法) によりレクチン認識の高感度化について検討した結果を報告する。

また、非特異吸着抑制分子として設計、合成して用いている、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、大きな分子の透過は抑制するが小さい分子(分子量100以下程度)は膜内を自由に透過できるものであることを確認した。この機能を生かして電気化学免疫測定法に応用した結果も合わせて報告する。

## 2. レクチン認識ハイブリッド膜の作製と高感度認識

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 ( $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 程度)、抗原-抗体の場合 ( $10^{-9}$ 程度))、基板上での検出は難しい場合が多い。このような弱い相互作用の系でも、将来的には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に検討した。

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。認識分子としてマルトシド-ドデカンチオール分子 (MalC12SH)、基板へのタンパク質の非特異的な吸着を抑制する分子として、水酸基末端チオールを採用した。金基板上にマルトシド-ドデカンチオール分子 100%で構築した単分子膜と比較して、水酸基末端チオールを混合し、ハイブリッド膜とした場合、水酸基末端チオール分子の割合が増加するにつれてレクチン (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 29%のマルトシド分子のとき、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。結果としてアルキル鎖長単位(CH<sub>2</sub>)<sub>n</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るが、これは Con A-糖鎖間の結合が 1 対 1 結合から、2 価結合に変わるためであることも確認した。



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。

### 3. 非特異吸着抑制分子 TEG-アルカンチオール分子 の新たな利用

TEG-アルカンチオール類（TEGC<sub>n</sub>SH, C<sub>n</sub>=(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。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 TEGC<sub>n</sub>SH 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作製、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 TEGC<sub>n</sub>SH 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。

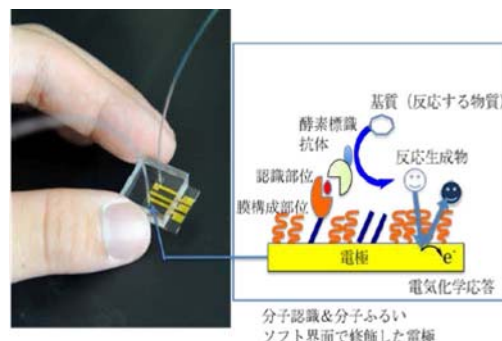


図 2. 糖尿病マーカーの測定を可能にした電気化学的免疫測定用チップ

### 4. 分子認識薄膜への電気化学活性基の導入とタンパク質高感度検出

水酸基末端アルカンチオールあるいは TEG-アルカンチオール類などのスペーサー分子を、電気化学活性基を有する分子に変えて、糖鎖分子とともにハイブリッド膜を構築し、レクチンの認識を試みた。フェロセン基を末端に有するアルカンチオールをスペーサーとして用い、糖鎖分子とで各種ハイブリッド膜を作製、フェロセン基がニュートラルな状態である場合と比較して、フェロセンが酸化状態になる電位 (+0.5V vs Ag/AgCl) に基板電位を保持すると、マルトシドの認識が数倍から十数倍に高まった。電位を与えることで膜構造が変化し、応答検出しやすくなったものと考えられ、さらに詳細な機構を検討している。

- 1) K. Yoshioka, Y. Sato, M. Tanaka, T. Murakami, and O. Niwa, *Anal. Sci.*, **26**, 33-37 (2010).
- 2) K. Yoshioka, Y. Sato, T. Murakami, M. Tanaka, and O. Niwa, *Anal. Chem.*, **82**, 1175-1178 (2010).
- 3) T. Nishimura, Y. Sato, M. Tanaka, R. Kurita, K. Nakamoto and O. Niwa, *Anal. Sci.*, **27**, 465-469 (Cover & Hot article) (2011).
- 4) Y. Sato, K. Yoshioka, T. Murakami, S. Yoshimoto and O. Niwa, *Langmuir*, **28**, 1846-1851 (2012).

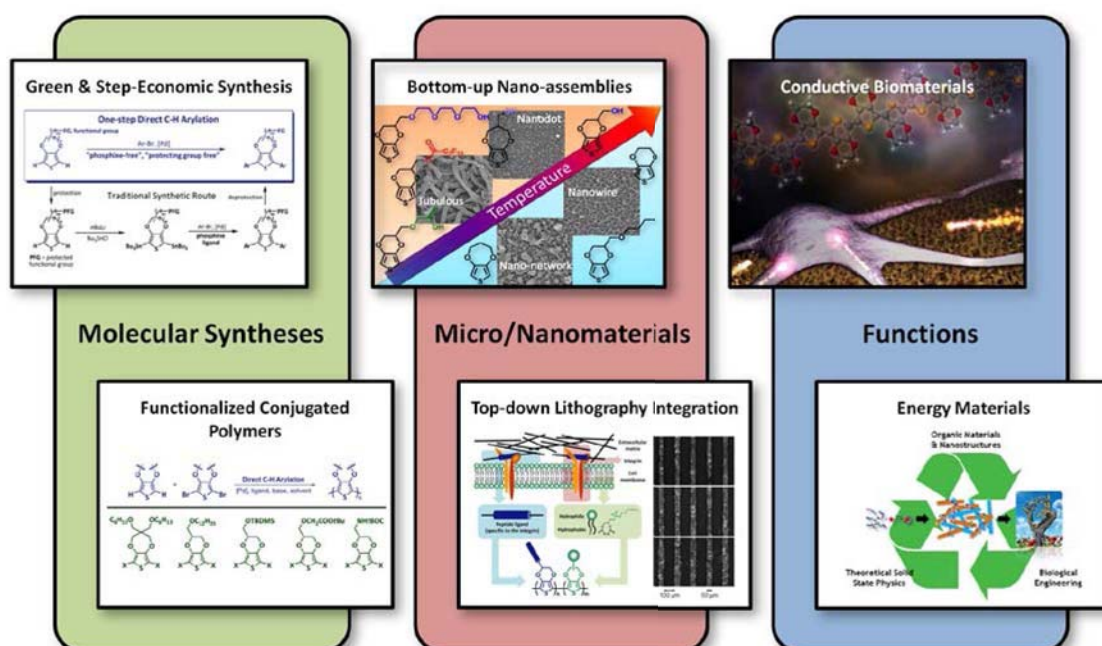


# FUNCTIONAL AND NANOSTRUCTURED CONDUCTING POLYMERS FOR CELL ENGINEERING

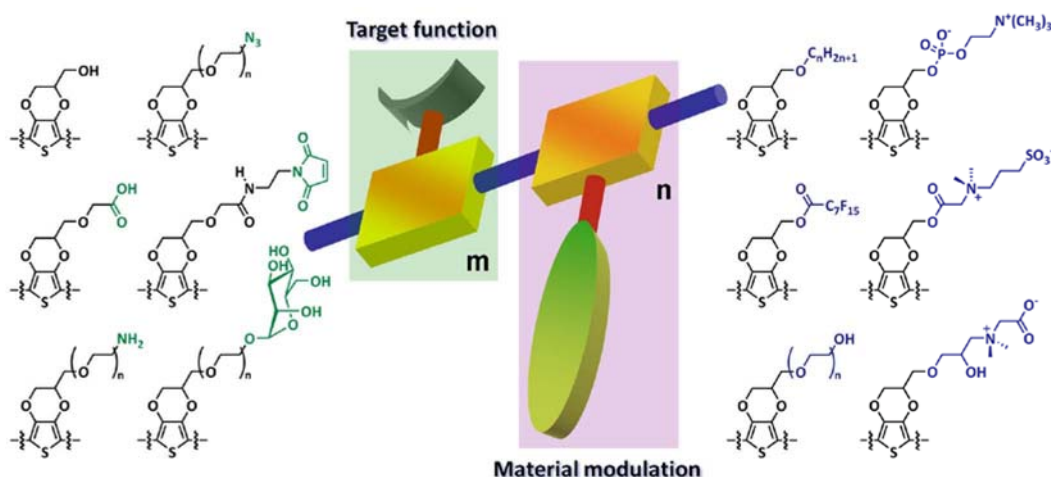
Hsiao-hua Yu

*Yu Initiative Research Unit, RIKEN Advanced Science Institute  
2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, JAPAN  
Email: bruceyu@riken.jp*

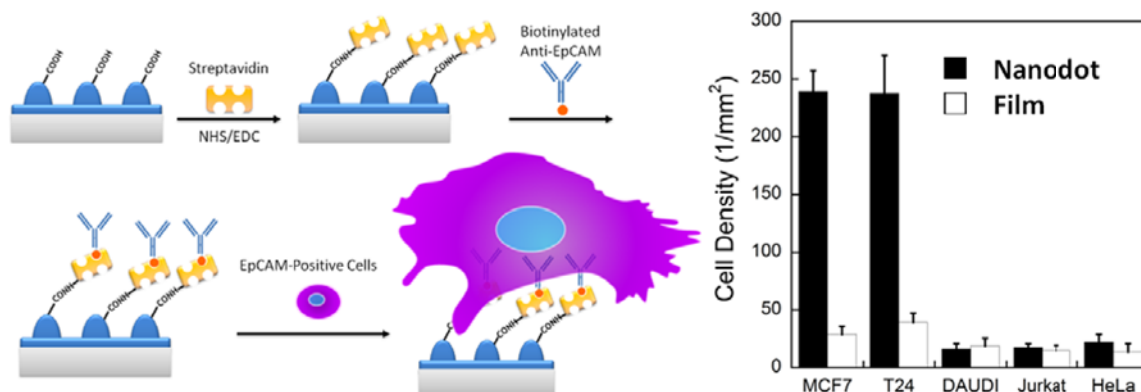
Interfacing materials with cells through specific ligand/receptor interactions, matching mechanical properties, and matching nanostructures are very critical in biomedical technologies. Recently, conducting polymers have emerged for various related applications, ranging from biosensing to medical bionics. Many features of conducting polymers, including simplicity for nanostructure fabrication, tailored functional groups for bioconjugation, intrinsic electrical conductivity, and softer mechanical characteristics than metals, provide advantages as materials for cell-related diagnostic and therapeutic platforms as well as controlled cell engineering. The research of Yu Initiative Research Unit focus on the development of independent and multidisciplinary research program through the triangle of chemistry, electronic materials, and biomedical/biological investigations based on molecular and nano-assembled building blocks of conducting polymers. The organic conductive biomaterials we developed, unlike traditional polymers or inorganic metals/ceramics, provides a unique toolkit which integrates electrical control with all the known molecular and biomolecular building blocks required for bioengineering. Ultimately, it would provide a platform which can combine biochemical control, spatial arrangement, and matching mechanical characteristics with electrical stimulation or signaling.



Nanostructures of conjugated materials have become one of the most important research topics in the research because of the nanostructure's influence on the materials performance. Up to date, most research focus on the nanostructures and material properties of unfunctionalized  $\pi$ -conjugated materials and limited studies on nanostructures of functionalized ones. Because of the molecular advantageous features of dioxythiophenes, we are particularly interested to develop general approaches for their polymeric nanostructures with various functional groups. We first enlarged the dioxythiophene-based monomer library with a variety of molecular building blocks. The monomers can be classified as two groups. Material modulation monomers are synthesized to manipulate the material properties, ranging from highly hydrophobic to highly hydrophilic, and create desired assemblies. The side chains included alkyl groups, perfluorinated groups, oligoethylene glycol groups, and especially zwitterionic phosphorylcholine and betain groups. Our research represents the first example in linking these biomimetic zwitterionic side-chains in conjugated materials to create enzyme/cell resistant conductive surface. The other group of monomers is the ones provide target function. For the biomaterials research, they provide the site for bioconjugation (-COOH, -NH<sub>2</sub>, -maleimide, -N<sub>3</sub>). The library now consists of >50 monomers with different linkers and functional groups. Mixing the monomers from two groups, we would achieve  $\pi$ -conjugated materials with desired functions and material characteristics. For example, we combined the maleimide- and phosphorylcholine-functionalized dioxythiophenes to construct conductive membranes. Upon bioconjugation with neuron-targeting IKVAV ligand, the membrane selective binds PC12 cells with zero binding to the control NIH3T3 cells.



Moreover, we also developed several approaches on the efficient syntheses of  $\pi$ -conjugated material nanostructures. The main goal is to develop a universal approach to create these nanostructures from various functionalized monomers. We successfully built nanocapsules,<sup>1</sup> nanodots,<sup>2</sup> nanowire networks,<sup>3</sup> nanotubes,<sup>4</sup> and nanorod arrays<sup>5</sup> with a variety of monomers. These materials allow us to differentiate the origins of the material functions. It is important to utilize the molecular and nanostructural design principles and synthetic approaches we developed to investigate the plausible applications of these functional  $\pi$ -conjugated nanomaterials. One specific area we are working on is efficient capturing of cells, particular the cells with diagnostic and therapeutic applications. For example, circulating tumor cells is an important index for cancer metathesis. However, their extremely low concentration has hampered the study and use for diagnostic routinely. Using the carboxylic acid group functionalized conjugated polymer nanodots previously described in Figure 6, we have demonstrated enhanced tumor cell capturing by the synergistic effect of nanostructures and capturing agents as shown in Figure 8. Antibody grafted nanodots displayed 4~5 times capturing efficiency comparing to smooth films.



In summary, we synthesized a variety of monomers which provide the target functions and modulate material properties. We also developed several methodologies to control the nano-assembly process during polymerization. With the ability to control molecular structure and nanostructures, we demonstrated the applications of these materials in cell capturing and engineering.

## References

- [1] Luo, S.-C.; Wan, A. C. A.; Han, Y.; Yu, H.-h.; Ying, J. Y. *Small* **2008**, *4*, 2051.
- [2] Sekine, J.; Luo, S.-C.; Wang, S.; Zhu, B.; Tseng, H.R.; Yu, H.-h. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 4788-4792.
- [3] Luo, S.-C.; Zhu, B.; Nakao, A.; Nakatomi, R.; Yu, H.-h. *Adv. Eng. Mater. (Advanced Biomaterials)* **2011**, *13*, B423-B427.
- [4] Luo, S.-C.; Sekine, J.; Zhu, B.; Zhao, H.; Nakao, A.; Yu, H.-h. *ACS Nano* **2012**, *6*, 3018-3026.
- [5] Lin, H.-A.; Luo, S.-C.; Zhu, B.; Yamashita, Y.; Yu, H.-h. *submitted*.

# 光分解性ゲルを利用したタンパク質の機能制御

加藤 大

東京大学大学院薬学系研究科

kato@cnbi.t.u-tokyo.ac.jp

## 1. 緒論

タンパク質は大きさが数ナノメートルの物質であり、選択性に優れ、生体親和性が高く、環境負荷が低く、反応の効率が良いなど優れた性質を有する。そのため、酵素アッセイ、バイオセンサー、ELISA 等の分析化学分野やバイオレメディケーションの環境浄化などに加えて、最近では、バイオ医薬品として抗体などのタンパク質製剤が、売り上げを急速に伸ばし注目を集めている。しかし一般的に、タンパク質には、変性・失活し易く、また機能を制御する汎用的な手法がないという問題が残されていた。



図1 PARCEL 法のご概念図

我々は、光分解性ゲルの中にタンパク質を包含することで不活化し、光照射によってゲルを崩壊させ、タンパク質を放出することで機能化させるタンパク質の機能制御法を開発し、PARCEL(Protein Activation and Release from Cage by External Light)法と名付けた (図1)。PARCEL 法は、様々なタンパク質に対し、その機能を光によって非侵襲的に時空間制御することが可能であると、いう特徴を有している。

## 2. 光分解性ゲルによるタンパク質の機能制御

光刺激によってゲルを崩壊させるために、まず始めに、ゲルの網目構造の中に光照射によって開裂する構造を有する新しいモノマー分子を設計、合成した。本モノマーとアクリルアミドの混合液を重合することで、ゲルが形成され、その重合時にタンパク質を添加することで、タンパク質を内包したゲルが形成される。その後、光照射による2-ニトロベンジル基の開裂によって網目構造が壊れるため、内包されていたタンパク質が放出され、機能を発現すると考えた[1, 2]。光開裂基である2-ニトロベン

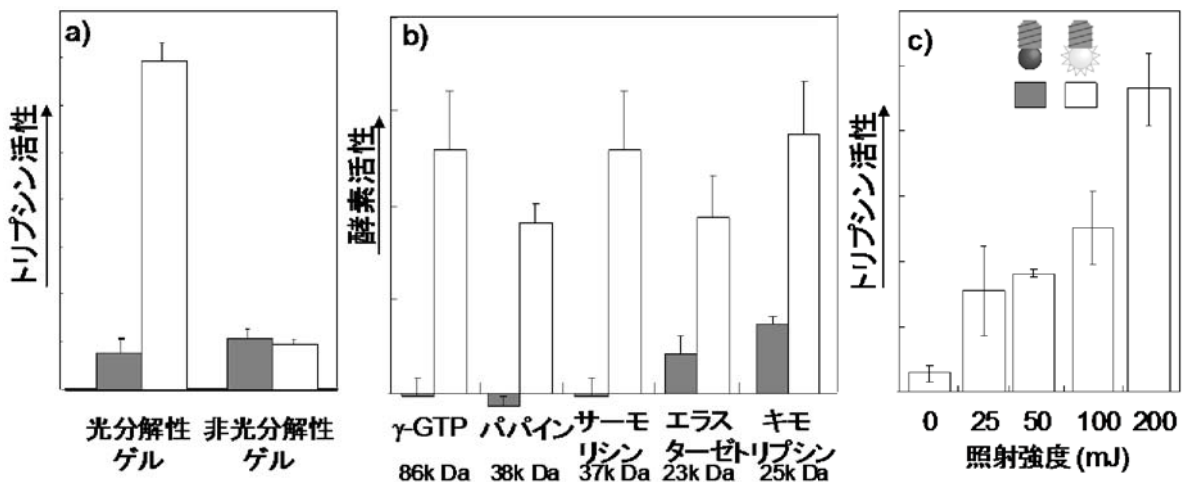


図2 光分解性ゲルを用いた酵素機能制御

a) 光開裂基の影響、b) 5種類のタンパク質の放出制御、c) 光の照射量と放出量の関係



ジル基の影響を調べるために、2種類のトリプシン内包ゲルを調製し、その一方には光開裂基を導入し、もう一方のゲルには光開裂基を導入しなかった。それぞれのゲルの光照射前後（UV=365 nm、10 秒間）でのトリプシン活性を比較した結果、照射前は両者のゲルとも殆どトリプシン活性を示さなかったのに対し、光照射後は光開裂基を有するゲルのみでトリプシン活性の大幅な上昇が確認された（図 2a）。したがってゲルの網目構造内に 2-ニトロベンジル基を導入することで、光照射によりゲルの網目構造が崩壊し、内包していたタンパク質が放出され、機能させることに成功した。

本ゲルは網目構造を利用してタンパク質を内包していることから、物性の異なった様々なタンパク質を内包し、光によって放出し、機能を発現させることができると考えられた。そこで分子量の異なるタンパク質の光による機能制御を試みた。その結果、図 2b に示した5種類のタンパク質を始め、これまでに試みた全てのタンパク質の機能制御に成功している。本ゲルは、タンパク質とゲルの網目構造との間には化学結合が不要であり、ゲルが形成している網目構造の開裂によってタンパク質が機能を発現しているためと考えられる。さらに照射する光の強度を 25-200mJ の範囲で変化させた所、照射強度が増加するにしたがって放出されるタンパク質の量が増加したことから（図 2c）、光の強度を調節することで放出量の調節が可能であると考えられる。またトリプシンは、本光分解性ゲルに内包されることで安定性が向上した。

### 3. ナノ粒子化光分解性ゲル

これまでの検討で、いろいろな物質をゲルに内包し、光刺激によって放出することに成功しており、本ゲルをナノ粒子に成型することができれば、医薬品の送達技術や細胞内タンパク質の機能制御に利用できると考えた。これまでの光分解性ゲルは、反応液を静置することでバルク形状のゲルを調製していたが、重合時に激しく攪拌したところ、粒子径が 150 nm 程度の粒径分布の狭いナノ粒子ゲルが調製できることを見出した（図 3）。重合反応に必要なペルオキシ

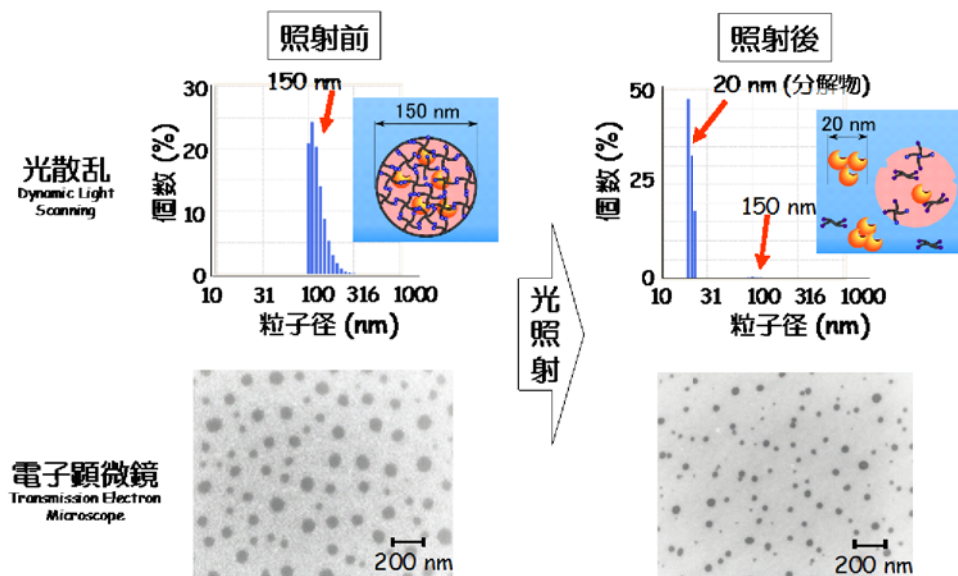


図3 光照射前後のナノ粒子ゲル

二硫酸アンモニウム（APS）濃度を変えることで、70nm から 200nm の範囲で粒子径の揃ったナノ粒子が調製された。ナノ粒子内に内包されるタンパク質の量は、調製時に添加したタンパク質の量に比例するため、ナノ粒子に内包されるタンパク質の数量も簡単に調節することができる。

ナノ粒子化した光分解性ゲルの光照射前後（20 秒）の変化を電子顕微鏡及び動的

な断片に崩壊することが確認された (図3)。このナノ粒子の崩壊によって内包していたタンパク質が外部に放出されたかを確認するため、トリプシン内包ナノ粒子を調製し、光照射後に放出されたトリプシン活性を測定した。その結果、照射前にはほとんど活性が見られなかったのに対して、照射後は強い活性が検出された。これまでに3種類のタンパク質 (トリプシン、カスペース、カゼイン) の内包を試み、いずれのタンパク質についても内包したナノ粒子を調製し、光照射による放出に成功した。

最後に、調製したタンパク質内包ナノ粒子を細胞に導入し、細胞内でナノ粒子からのタンパク質の放出を光によって制御した。ナノ粒子には、細胞死に関与するカスペースを内包させ、細胞内に導入した。細胞は、カスペース内包ナノ粒子を導入しただけでは変化を示さず、またナノ粒子を導入していない細胞に対してナノ粒子が崩壊する条件で光照射を行っても変化が見られなかった。一方、カスペース内包ナノ粒子を導入した細胞に光を照射すると全てが細胞死を引き起こした。したがって本ナノ粒子を用いることで、細胞内でタンパク質が機能を発現するタイミングの制御が可能であることが示唆された。さらに光は集光することで照射領域を数マイクロメートルの領域に限定することが可能なため、細胞内の特定の局所を光照射し、その局所でカスペースの放出を試みた。細胞局所で放出されたカスペースは、ラメリポディアの収縮など細胞死に至る細胞の変化が光の照射領域周辺から引き起こした。

本ナノ粒子は、光照射を受けるまでは、内包物を安定に保管し、光照射によって崩壊することで、内包物を放出することから、タンパク質が機能を回復 (発現) する “場所”、 “タイミング”、 “強度” を光刺激によって高精度に制御することができた。

#### 4. 参考文献

- [1] S. Murayama, M. Kato, *Anal. Chem.* **82**, 2186-2191 (2010)
- [2] S. Murayama, F. Ishizuka, K. Takagi, H. Inoda, A. Sano, T. Santa, M. Kato, *Anal. Chem.* **84**, 1374-1379 (2012).
- [3] S. Murayama, B. Su, K. Okabe, A. Kishimura, K. Osada, M. Miura, T. Funatsu, K. Kataoka, M. Kato, *Chem. Comm.* in press.

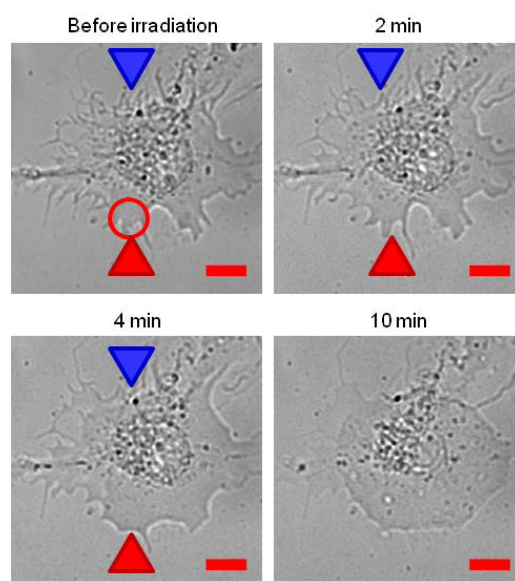


図4 細胞局所で放出したカスペースの影響

# 「バイオトランジスタ」のための界面設計戦略

東京医科歯科大学 ○松元亮・合田達郎・前田康弘・宮原裕二

Strategy and surface design for biotransistors

(Tokyo Medical and Dental Univ.) ○Matsumoto, Akira; Goda Tatsuro; Maeda Yasuhiro; Miyahara, Yuji

**Abstract:** A field effect transistor (FET) represents a label-free molecular detection platform, in which intrinsic molecular charges immobilized on the gate surface can directly be transduced into electrical signals. Molecular events of interest involving charge density changes can be detected as a mode of modified characteristics of the FET synchronized with electrostatic interactions between the intrinsic molecular charges and the thin-insulator-segregated silicon electrons. The principle has been applied to many types of label-free biosensors. We provide an overview of our recent progress in the field and some aspects of new approaches to broaden the extent of the application.

**Keywords:** Field Effect Transistor; Sialic Acid; Boronic Acid; Debye Length; Smart Gel

## はじめに

我々は、電界効果トランジスタ (Field Effect Transistor: FET) 原理に立脚した種々の生体分子検出法の開発に取り組んでいる。FET法とは、薄い絶縁膜上に捉えた分子の固有電荷をトランジスタ特性変化と同期させて検出する全くの非侵襲・非標識計測法であり、リアルタイム計測であること、レーザーや光学系が不要なため安価で小型化に有利であること、半導体加工技術による高密度・超並列化が容易に行える点など、ハイスループットシステム化において求められる主要要件を潜在的に網羅したユニークな検出法として近年注目されている。<sup>1,2</sup>

## ラベルフリーな細胞診断を指向した糖鎖検出トランジスタ

糖鎖は細胞間相互作用に深く関わり、その構造は、発生や分化などの正常な細胞現象から疾病に至るまで「細胞の状態」と同期した変化を見せることから、しばしば「細胞の顔」とも形容される。なかでもシアル酸は、糖鎖中に最も高頻度かつ糖鎖末端に多く存在する分子であり、その密度や分布は、細胞の疾病 (癌、転移、糖尿病、自己免疫病)、発生、分化など、様々な細胞現象と関係している。<sup>3</sup>シアル酸分子を特異的に認識するフェニルボロン酸化合物<sup>4</sup>をFETゲート表面に固定化した「シアル酸認識トランジスタ」を構築し、ラベルフリーで従来法よりも簡便かつ非侵襲的な評価の行える細胞診断デバイスの創出に取り組んだ。金スパッタ薄膜基板を作成し、ここへ 10-carboxy-1-decanethiol による自己組織化単分子膜 (SAM) を形成し、この表面に 3-acrylamidophenylboronic acid を導入したものをFETエクステンデッドゲートとして用いた。形成した電極表面のSAM膜およびフェニルボロン酸分子層の密度、膜厚、表面モーフロジーの評価を、それぞれ水晶振動子微量天秤法 (QCM)、エリプソメトリー、SEM観察により行った。<sup>5,6</sup>作成したゲート上に種々の単糖、ウサギ赤血球 (未処理およびシアリダーゼ処理)、セルストレイナーにより濾過・分散させた肺組織 (正常および癌細胞) などを種々の濃度で添加し、その際に生ずるゲートしきい値電圧 ( $V_T$ ) 変化をリアルタイムFET計測装置により観測した。赤血球表面のシアル酸発現量変化はI型糖尿病との関連が報告されており、簡便に行

える赤血球表面のシアル酸定量は糖尿病診断の目的においても重要である。検討の結果、あらかじめ正常な細胞についての濃度- $V_T$ プロファイルが得られれば、以後、既知濃度の赤血球をゲート上に播種するだけで、そのシアル酸発現量がリアルタイムに求められることが確認された。<sup>6</sup>肺組織に対する評価においても同様に、癌細胞表面ではシアル酸発現が亢進するため、癌転移度が濃度- $V_T$ プロファイルから求められることを明らかとした。<sup>7</sup>

#### デバイ長の制約を受けない FET 計測のための動的ソフト界面の活用

FET法の最大の弱点は電気二重層（デバイ長）により規定される検出距離限界であり、これがタンパクや長鎖DNAの検出を難しくしている。これを克服する新たな「信号伝達素子」として「スマートゲル」と呼ばれる刺激応答性の高分子ゲルを用いた動的ナノ界面を開発し、その動作機序について実験、理論の両面から詳細を明らかとした。この中で、スマートゲルの含水率変化に同期して起こるゲート界面近傍での誘電率変化が信号変換機序として作用することを見いだした。<sup>8</sup>これにより、従来法では原理的に不可能であった「デバイ長フリー」な分子検出、電気的に中性な物質に対しても有効な（FETに基づく）分子検出法の開発に成功した。また、この原理に基づくと、FET法は、「荷電変化」と「誘電率変化」に対する二重応答性を呈するが、これを活用した新たなケモメカニカル検出システムをデザイン・実証した。すなわち、FETゲート上にカルシウム応答性のゲル薄膜を導入し、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、FETによって独立に可視化できることを明らかとした。<sup>9</sup>さらには、ゲート上に導入するゲルの物理的な構造を制御することによっても、高分子ゲルの応答動力学に基づき、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。「スマートゲル」には、グルコースやカルシウムなどの低分子ターゲットにとどまらず、抗原抗体反応、バイオマーカ、相補的なDNAなどを認識するものが多数報告されており、これらのターゲットに対しても同様の方法が適用可能と考えられる。

#### 参考文献

1. Bergveld, P. *Sens. IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1970, 17, 70-71.
2. Sakata, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 24, 118-120.
3. Hakomori, S. *Cancer Res.* 1985, 45, 2405-2414.
4. Otsuka, H., *et al. J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 3493-3502.
5. Matsumoto, A. *et al. J. Solid State Chem.* 2009 13, 165-170.
6. Matsumoto, A. *et al. J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 12022-12023.
7. Matsumoto, A. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 5494-5497.
8. Matsumoto, A. *et al. Adv. Mater.* 2009, 21, 4372-4378.
9. Matsumoto, A. *et al. Chem. Comm.* 2009, 37, 5609-5611.
10. Maeda, Y. *et al. Nanoscale. Res. Lett.* 2012, 7, 108.



# バイオマテリアル表面の分子運動性制御による細胞機能の調節

東京医科歯科大学

JST-CREST

由井 伸彦

生体内埋込型の医療デバイスには、生体防御を担当する炎症細胞群や液性因子が出現する環境下で生体と共存する表面の構築が不可欠である。生体には血液凝固反応や炎症反応などがあり、更に液性因子の誘導による細胞分化・増殖過程などを経て正常に戻る恒常機能が備わっている為、医療デバイスを生体内へ埋植すると、こうした一連の生体防御系が発動して最終的にはデバイスの拒絶へ至る異物反応が生起する。このことから、相界面を単一的に物理化学から取り扱う従来からの材料表面構築・創製技術が生体との界面設計においては無力であることがわかる。すなわち、生体応答を制御する生体-材料・界面について全篇に亘るシナリオを描く設計概念が欠如しており、このことがナノバイオ機能設計を推進する研究者に戸惑いを与える結果となっていた。

一方、細胞における情報伝達系は高度に階層的かつ相補的な素過程が巧妙に仕組まれていて、構成成分間に働いている分子間力の自在な調節機構と直結している。このように細胞そのものが非共有結合を巧みに活かした構造の動的特性をもとにして機能発現を調節していることから、非共有結合からなる超分子集合体が潜在的に有している動的特性は生体との界面設計の上で重要な鍵になると考えた。そこで、生体の動的特性に対応できるポテンシャルを有する動的バイオマテリアルの設計を 1993 年に開始し、以降 20 年近くに亘ってポリロタキサンに代表される高分子系超分子集合体の動的特性に基づいたバイオマテリアル機能の創成を研究してきた。

ポリロタキサンの特徴は、線状高分子鎖が多数の環状分子空洞部を貫通しているインターロック構造（機械的連結）にある。環状分子と線状高分子鎖とのあいだに分子間力が働かなければ、環状分子は線状高分子鎖に沿って自由に回転・スライドなどの運動が可能である。これまでに、ポリロタキサンに導入した糖鎖リガンドとタンパク質レセプターとの結合定数が  $10^3$  倍以上増大し、分子可動性を有するポリロタキサン骨格が多価相互作用の充進に効果的であることを見いだした。一方、ポリロタキサン末端のストッパーが外れれば、環状分子が線状高分子鎖から脱離してインターロック構造そのものが消失するので、これを利用して細胞内分解に伴って核酸を安全かつ効果的に核内あるいは細胞質内に送達するキャリアー設計の有効性も実証してきた。

こうした背景のもとに 2007 年より実施している JST-CREST 研究プロジェクトでは、ナノメートルオーダーの分子間力に基づいてバイオマテリアル表面の分子運動を任意に操作することにより、生体分子や細胞を取り巻く水分子・細胞情報伝達を制御するリガンド分子・細胞膜タンパク質・周囲組織に配慮し、生体との界面における自然治癒過程を理想的に誘導することを目指している。こうした分子運動に着目した表面構築は未踏な課題であり、従来のバイオマテリアルに関する学問の missing part として新しい界面設計指針を実証できるものと考えている。

具体的には、著者らは分子運動性を制御したバイオマテリアル表面のプラットフォームとして、 $\alpha$ -シクロデキストリンとポリエチレングリコールとからなるポリロタキサンを一成分とするトリブロック共重合体を合成し、そのキャスト表面における分子運動性と生体応答全般（接触初期の血漿タンパク質吸着、吸着タンパク質の細胞結合部位の表面露出、表面における細胞接着挙動の解析、

細胞の接着斑形成と機能、周囲コラーゲン組織との結合、埋植による炎症反応、細胞の分化誘導など)との関係を明らかにしつつある。吸着タンパク質を介した非特異的な細胞接着のみならず RGD-インテグリン結合を介した特異的な細胞接着においても、材料の表面運動性の強い関与が示唆されている。当日は、こうした最近の成果を中心に表面運動性による生体応答調節の可能性について議論する。

#### 謝辞

ここで紹介する内容のいくつかは、東京大学・石原一彦教授、井上祐貴助教、東京医科歯科大学・岸田晶夫教授、徐 知勲助教、国立循環器病研究センター研究所・山岡哲二部長、柿木佐知朗博士との共同研究による成果であり、深謝します。

#### 参考文献

1. N. Yui (ed), *Supramolecular Design for Biological Applications*, CRC Press, Boca Raton USA, 2002.
2. N. Yui, K. Ishihara, A. Kishida, T. Yamaoka (eds.), *Nanobio-Interfaces in Relation to Molecular Mobility*, JAIST Press, Ishikawa, 2010.
3. T. Ooya, M. Eguchi, N. Yui, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13016 (2003).
4. T. Ooya, H. S. Choi, A. Yamashita, N. Yui, Y. Sugaya, A. Kano, A. Maruyama, H. Akita, K. Kogure, H. Harashima, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 3852 (2006).
5. A. Yamashita, N. Yui, T. Ooya, A. Kano, A. Maruyama, H. Akita, K. Kogure, H. Harashima, *Nature Protocol* **1**, 2861 (2006).
6. N. Yui, T. Ooya, *Chem. Eur. J.* **12**, 6730 (2006).
7. N. Yui, R. Katoono, A. Yamashita, *Adv. Polym. Sci.* **222**, 55 (2009).
8. Y. Yamada, T. Nomura, H. Harashima, A. Yamashita, R. Katoono, N. Yui, *Bio. Pharm. Bull.* **33**, 1218 (2010).
9. H. Hyun, N. Yui, *Macromol. Rapid Commun.* **32**, 326 (2011).
10. H. Hyun, N. Yui, *Macromol. Biosci.* **11**, 765 (2011).
11. T. Ehashi, H. Hyun, N. Yui, *Macromol. Res.* **19**, 495 (2011).
12. N. Yui, in: *Supramolecular Polymer Chemistry* (A. Harada, ed.), Wiley-VCH, Weinheim, 2012, p. 195.
13. Y. Inoue, L. Ye, K. Ishihara, N. Yui, *Colloid Surf. B: Biointerface* **89**, 223 (2012).
14. K. Yamada, R. Katoono, N. Yui, *Polym. J.* **44**, 286 (2012).
15. Y. Yamada, M. Hashida, T. Nomura, H. Harashima, Y. Yamasaki, K. Kataoka, A. Yamashita, R. Katoono, N. Yui, *ChemPhysChem* **13**, 1161 (2012).
16. Y. Yamada, T. Nomura, H. Harashima, A. Yamashita, N. Yui, *Biomaterials* **33**, in press (2012).
17. J. H. Seo, S. Kakinoki, Y. Inoue, T. Yamaoka, K. Ishihara, N. Yui, *Soft Matter* **8**, 5477 (2012).
18. 徐 知勲、由井伸彦、*化学工業* **63**, 169 (2012).
19. J. H. Seo, N. Yui, *Adv. Sci. Tech.* **78**, in press (2012).

# 生体適合高分子表面の力学的計測

東京理科大学理学部応用化学科 大塚英典

## 1. 緒言

原子間力顕微鏡 (AFM) は試料表面の弾性率を測定するツールとして有用であるため、高分子や生体分子のような弾性的性質を持つ試料の観察ツールとして広く用いられるようになってきている。AFM の空間分解能は原子オーダー、力の検出精度はピコニュートンのオーダーであり、それゆえ AFM は、高分子や生体分子のようにナノメートルスケールでヤング率の分布がある試料の力学物性を測るのに非常に適している。

さらに AFM は、10nm 程度の先端曲率半径を有する探針によって試料表面を二次元走査することができるため、探針-試料間に働く全ての分子間相互作用を反映した力が観測され、さらに探針表面を化学修飾することで表面官能基に働く分子間相互作用やタンパク質間相互作用といった力を直接測定できるようになった。

とりわけ、生体膜環境での固-液界面における現象の分子レベルの理解のために、コロイドプローブ原子間力顕微鏡を用いた表面間力測定が検討されている。本研究では、固体表面間の相互作用の距離依存性 (相互作用ポテンシャル) を、直接測定する手法について検討を行った。本測定で得られる相互作用曲線 (表面力曲線) は、固-液界面からバルクへの特異変化が空間的に反映されるために、固-液界面の特性を項目別に評価可能である。たとえば、立体力から高分子の吸着状態や分子の空間的広がり・硬さ、摩擦力から膨潤高分子鎖の粘弾性、などをそれぞれ評価できる。このような特徴は、界面での生体分子反応をより詳細に解析できることを示唆している。

そこで、タンパク質の吸着を抑制するハイドロゲルを作成し、そのゲルが持つ表面物性に焦点を当て、その AFM による解析と生体適合性の評価を行った。また、高分子末端に存在する糖鎖とレクチンの相互作用モデルを採用し、糖鎖密度や分岐構造、高分子鎖長の違いが特異的糖鎖-タンパク質相互作用へ与える影響を、AFM による吸着力測定 (Fig. 1)、表面プラズモン共鳴装置 (SPR) による結合定数算出から評価することを検討した。

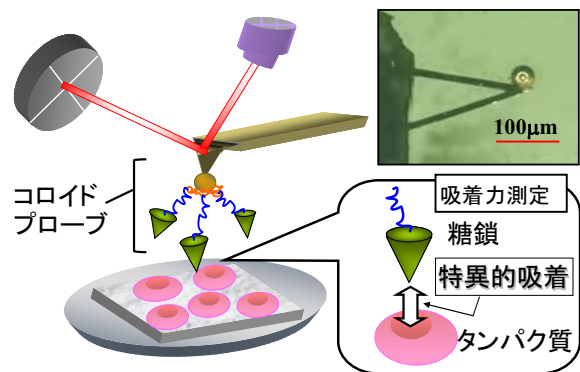


Fig. 1. Schematic illustration of colloidal probe method for AFM.

## 2. 実験方法

### 2-1. ゲルの調整

イエロールーム内で光反応性官能基を有するマクロモノマー (3arm20k, 4arm5k, 4arm20k, 8arm40k) のトルエン 1% 溶液を PLL コートガラスにスピコートした。この基盤に UV 光 ( $10\text{mW}/\text{cm}^2$ ) を照射し、ゲル化を行った。

### 2-2. フリクションフォース測定

フリクションフォース測定は、鋭い探針を有するカンチレバープローブを試料表面に接触させ、そのたわみとねじれを光でこの機構によって検出した。AFM には E-sweep (SII 社) を用いた。カンチ

レバーは 0.1N/m のバネ定数をもつ窒化シリコン製を用いた。作製したサンプル基盤を水溶液に浸漬し、24h 後 AFM の液中用ステージに固定し、測定を開始した。初期触圧を 1.25nN になるように基盤表面にアプローチし、フリクションフォース測定を行った。測定条件は左右に 5 $\mu$ m 走査し、その操作速度は 5 $\mu$ m/sec で行った。

### 2-3. フォースカーブ測定

顕微鏡観察下、エポキシ樹脂を塗布した V 字型カンチレバーの先端に銅線で補足した球状粒子を固定してコロイドプローブとした。この AFM カンチレバーのバネ定数は cleveland 法を用いて決定した。このコロイドプローブを AFM(S-image) の液中セルに固定し、液中ステージに固定したサンプル基板上でフォースカーブを測定した。

### 2-4. 糖鎖-レクチン分子間相互作用の解析

Lactose に特異性を有するヒマ豆レクチン(RCA<sub>120</sub>)を化学結合で基板に固定化し、微量タンパク質検出法によって定量的に固定化の確認を行った。また、ポリオキシエチレン(PEO)を両末端に有するトリブロック共重合体 pluronic (L81:PEO(3)-PP0(43)-PEO(3), P84:PEO(19)-PP0(39)-PEO(19), F88:PEO(103)-PP0(43)-PEO(103))の PEO 鎖末端に Lactose 修飾を行い、得られた Lac-pluronic を 1-octanethiol を介在してカンチレバーに固定化し probe とした。さらに Lac-pluronic の糖鎖密度を変えて固定化し、Lactose 固定化密度(0~100%)の異なる probe を作製した (Fig. 1)。基板上 RCA<sub>120</sub> と probe 上 Lactose 間での相互作用力(吸着力)の測定は生理条件環境下(pH:7.8・リン酸緩衝溶液)で AFM を用いて行った。

## 3. 結果と考察

各種ハイドロゲル表面が持つ摩擦力を測定するために AFM のフリクションカーブ測定を行った。その結果を Fig. 2 に示す。同一表面上にレファレンスとなる PLL 表面を作製し、PLL 表面とハイドロゲル表面の比較からそれぞれのハイドロゲルが有する摩擦力の特徴を比較した。ハイドロゲルを構成するモノマーを変化させることで、ゲル表面の摩擦力は異なる挙動を示すことが確認された。今回の測定では、PEG4arm5k のゲル表面が最も摩擦力が大きく、PEG3arm20k が最も小さいという結果が確認された。このことから表面の摩擦力は、ゲルを構成するマクロモノマーの分子鎖長に起因していることが示唆された。つまり分子鎖長が短いものほど摩擦力は大きく、反対に分子鎖長が長いものほど摩擦力は小さい。また 4arm20k と 8arm40k では分岐構造が異なるが、分子鎖長は同じものである。フリクションカーブを測定すると、ほぼ同じ値を示した。それゆえ、同じ濃度条件下においては、ハイドロゲルの摩擦力はマクロモノマーの構造ではなく、架橋点間距離といったゲルを構成するネットワークの密度が影響することが示唆された。続いて、ハイドロゲルが持つ弾性挙動をフォースカーブを用いて検討した。Fig. 3 にそれぞれのフォースカーブを示す。図の縦軸にはカンチレバーの反り量を、横軸は機械的な距離を示した。つまり表面が硬いサンプルであると、反り量 100nm に対して、機械的距離は短く、表面が柔らかいサンプルであると機械的距離は長くなる。このフォースカーブより、機械的距離が最も短い PLL の表面は硬いといえる。続いて 4arm5k が硬く、最も柔らかい表面は 3arm20k ということが確認された。この結果よりハイドロゲルを構成するマクロモノマーの分子鎖長が長いものほど、フォースカーブの機械的距離が長く、柔らかい表面を持つということになる。さらに、分子鎖長や分岐構造の違いがハイドロゲルの硬さに影響をおよぼす状態を定量的に評価・検討を加えた。

AFM を用いて、基板上 RCA<sub>120</sub> と probe 上 Lactose 間の吸着力を測定した。吸着力は PEO 鎖が長いものほど大きくなる傾向にあり、高分子構造および末端での糖鎖の自由度がタンパク質認識に影響した結果であることが示唆された。さらに糖鎖の密度効果(面密度)を調べた結果、糖鎖-タンパク質間の特異的認識における密度効果(面密度)は空間距離依存的に存在することが分かった。発表では糖鎖構造の違いが吸着に及ぼす影響についても紹介を行う予定である。

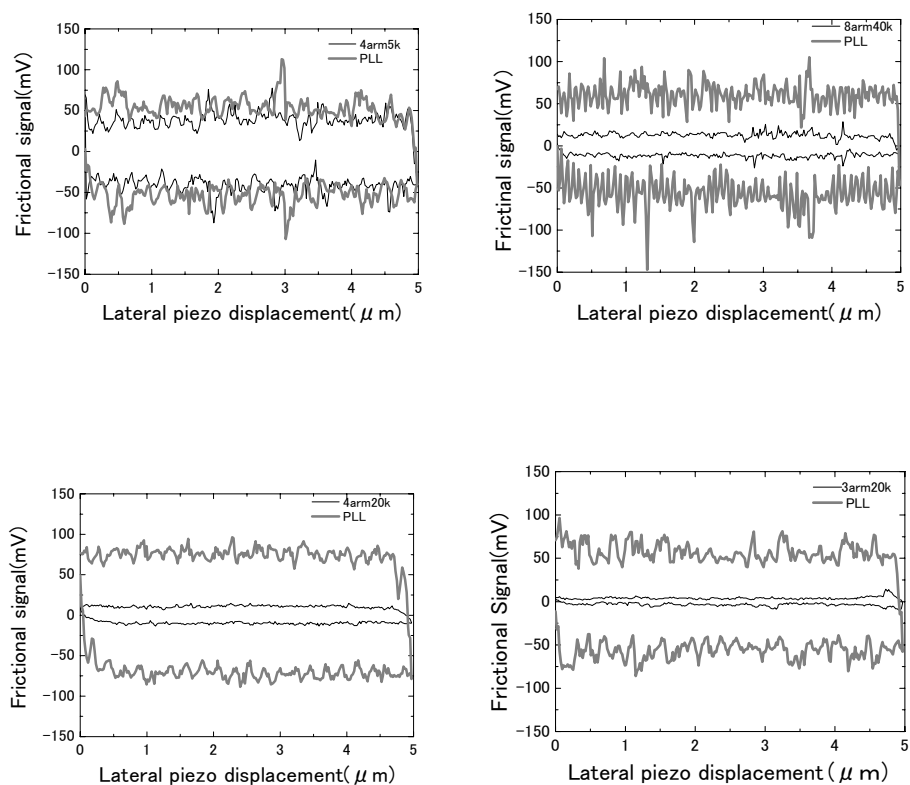


Fig.2. Raw friction data: (upper left) PEG 4arm5k; (upper right) PEG 4arm20k; (bottom left) PEG 8arm40k; (bottom right); PEG 3arm20k.

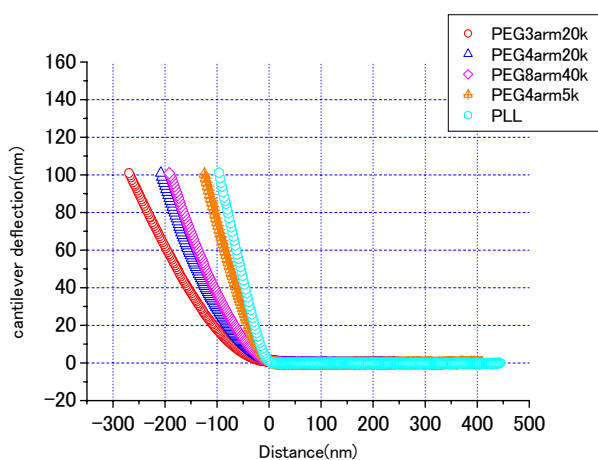


Fig3. Force curve between AFM probe and PEG hydrogel coated substrate.



## ナノとマクロをつなぐソフト界面： ダイナミックに操作される分子識別・センシング

物質・材料研究機構 WPI 国際ナノアーキテクトゥクス研究拠点 有賀 克彦

ナノテクノロジーあるいはマイクロテクノロジーの恩恵は計り知れない。しかしながら、テクノロジーとユーザーの溝は深まり、我々は十分な理解のもと賢く機械を使うことは出来なくなっている。例えば、はさみを使うように最先端の技術を思う存分活用しているわけではない（機械を十分に使っているように見えて、その実、ただ単にボタンを押しているに過ぎない）。ユーザーフレンドリーな技術の開発に対して、高度な機能を得るためにいかに難しい技術を開発するかという時代からは卒業して、いかに簡単な動作で高度な機能を達成するかという方法論の確立を目指すべきときに来ている。

簡単な動作、日常的な動きというのは、マクロスコピックな刺激であり、特に力学的なもの（圧縮したり、伸ばしたり、つまんだりなど）であることが多い。したがって、マクロスコピックな力学刺激を分子・ナノレベルの機能に連結するコンセプトの確立が必要である。この大きさの非常に異なる現象をカップリングできる環境がソフト界面であることに気がつく。二次元のソフト界面では、横方向（いわゆる X-Y 平面）には目で見えるような大きさの変化を引き起こせると同時に、それと垂直方向（Z 軸）にはナノ・分子レベルの変化を期待しうるからである。この環境を動的に使えば、マクロスコピックな力学刺激をナノ・分子レベルの現象に反映することができる。これが、「ナノとマクロをつなぐ動的界面ナノテクノロジー」である。我々は、そのパイオニア的な例として、開閉可能な分子マシンを気-水界面上に敷き詰めた単分子膜を作製し、その単分子膜の数十センチレベルの圧縮膨張と連動して、ナノメートルレベルの分子捕捉・放出の制御を実現している（図1）<sup>2)</sup>。これは、動的界面において力学的なマクロスコピックな刺激が、分子現象に反映された例である。

このコンセプトを使って、分子認識やセンシングの常識を変えられないかというのが、我々のチャレンジである。分子認識の研究は、対象分子を精密に認識するためにはレセプターの精緻な設計とその合成が必要であるというのが常識であり、生体分子のように極めて微妙な差を見分けるためには、それ相応の優れたレセプター分子を合成することが必要であった。それに対し、我々はキラルな部位を持つ構造の簡単な分子を気-水界面に並べて、それを圧縮膨張することによってその分子の分子ひねりを調節し、水面下からのアミノ酸の吸着現象をコントロールした、その結果、加える圧力によってアミノ酸の D 体と L

体の吸着割合が変化することを発見した<sup>3)</sup>。つまり、不斉認識を行うためにそれに対応するレセプター分子を特別に合成するのではなく、単純な構造の同一分子をレセプターとして用いて、外的な圧力を変えるだけでアミノ酸のキラル構造を見分けられることを実証したのである。

我々は、そのコンセプトをさらに進展し、核酸塩基のウラシルとチミンの識別を行った。ウラシルとチミンは、塩基部分の分子構造はメチル基の有無が異なるだけである<sup>4)</sup>。DNA や RNA はいずれもアデニンを相補的塩基として用いていることから、これらの天然の核酸では一般にチミンとウラシルの識別ができない。光などによる塩基構造の望まれない改変に対処しているのは、生体では特殊な酵素である。つまり、ウラシルとチミンの識別は、水素結合対の配列のような平面的な認識構造を考えていたのでは無理で、酵素の認識ポケットのように立体的な認識構造をデザインする必要があるということである。これを人工的に合成・構築することは容易ではない。我々は、図2に示すようなアームドシクロノナンという分子を“だいたいよい構造のレセプター分子”として用い、この分子の構造を最適な認識構造にするため水面上に単分子膜として並べ、膜の横方向から圧力を徐々にかけていき、その分子の形を連続的に徐々に歪ませた。この単分子膜への下水相からのチミンやウラシルの結合の差が、IR スペクトルなどから確認され、表面張力の変化から核酸塩基（実際にはヌクレオシドを使用）の結合定数を定量化したところ、最適条件（共存するリチウムイオンが 10 mM で表面圧力が 35 mN/m）で、この膜が 64 倍の精度でウラシルを選択的に識別できることがわかった。

これまで、分子認識のためのレセプター設計は、結晶構造などの安定構造を参考に一義的に考えられてきた。しかしながら、動的に最適構造を探し出すという要素を加えれば、レセプター分子の潜在能力を引き出すことができるのである。つまり、高度に設計されたレセプター分子を合成する必要は必ずもなく、比較的簡単な構造の分子を我々の手で歪ませてやることによって性能の良いレセプター構造を得ることができるのである。構造は無限に変えられる。可能性は無限にある。

## 文献

- (1) K. Ariga et al., *Chem. Sci.*, (2011), 2, 195-203. (b) K. Ariga et al., *Adv. Mater.*, (2012), 24, 158-176. (2) (a) K. Ariga et al., *J. Am. Chem. Soc.*, (2000), 122, 7835. (b) K. Ariga et al., *Langmuir*, (2005) 21, 976-981. (3) (a) T. Michinobu et al., *J. Am. Chem. Soc.*, (2006), 128, 14478-14479. (b) T. Michinobu et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, (2011), 13, 4895-4900. (4) T. Mori et al., *J. Am. Chem. Soc.*, (2010), 132, 12868-12870.

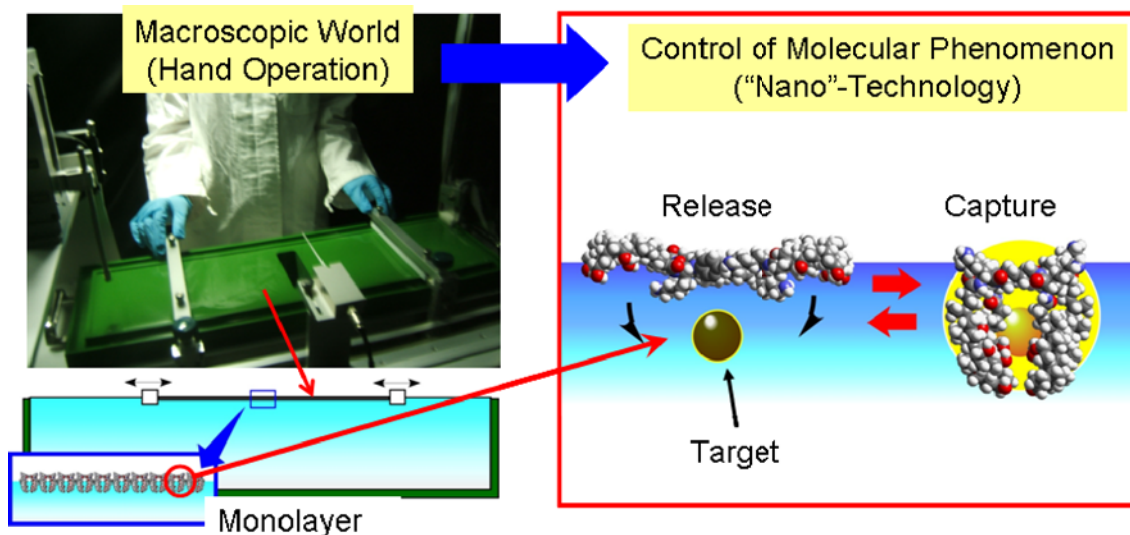


図1 界面におけるマクロスコピックな動作による分子機能の制御の例

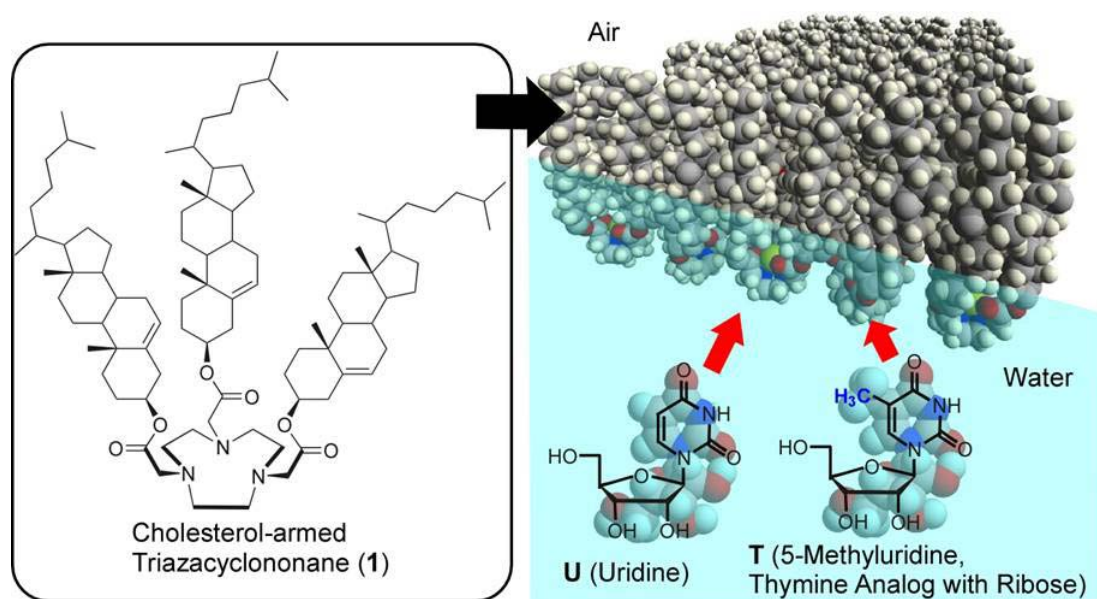


図2 界面単分子膜の力学操作によるウラシルとチミンの識別



# イオン液体を用いたソフトマテリアル

(横浜国大院工) 渡邊正義

## 1. はじめに

イオン液体とはプラスとマイナスのイオンのみからなる塩であるにも係わらずその融点が室温以下にある常温溶融塩である。演者らはこの液体を高分子の溶媒として用いることを提案してきた。本稿ではイオン液体を溶媒に用いたゲルのユニークな特徴と最近の研究動向を紹介する。高分子ゲルの構成成分は大きく高分子ネットワークと溶媒の二つに分けられる。高分子ネットワークが水で満たされていれば「ハイドロゲル」、油や有機溶媒で膨潤していればそれは「リポゲル」あるいは「オルガノゲル」と呼ばれる<sup>1)</sup>。ここではイオン液体というユニークな溶媒と高分子ネットワークから構成される「イオンゲル」の多彩な特徴を示すことにより、新しいゲルの形成とその有用性を提案する。

## 2. 高分子のイオン液体への相溶性を利用したゲル

イオン液体は、特に蒸発しないという特徴から、有害な揮発性有機化合物を大気中に排出しない環境に優しい液体としても注目を集めている<sup>2)</sup>。またイオン液体は水や有機溶媒に続く第三の液体と位置づけられており、様々な分野で従来用いられていた液体の代替物として認知されつつある。

イオン液体は食塩水のような塩を溶かした溶液とはまったく性質が異なる。イオンのみを構成成分とするため蒸発し難く、熱安定が高く、また単位体積あたりのイオンの数が多いためイオン導電率が高い。蒸気圧がほぼゼロで蒸発しないから燃えず、(電気)化学的に安定なイオン液体も多い。イオンの構造や組み合わせを変えることで所望の液体物性を組み込むことができる。こういった多彩なデザイン性からしばしばイオン液体は「Designer's solvent」と呼ばれる。また、イオン液体は一見すると均一な液体だが微少な時間/空間スケールでは局所的に秩序化したナノ構造体からできているとの指摘もあり、液体化学の見地から見ても魅力的な素材である<sup>3)</sup>。これらユニークな特徴を総じて、イオン液体の登場を“液体科学の革命”と位置づける研究者も多い。

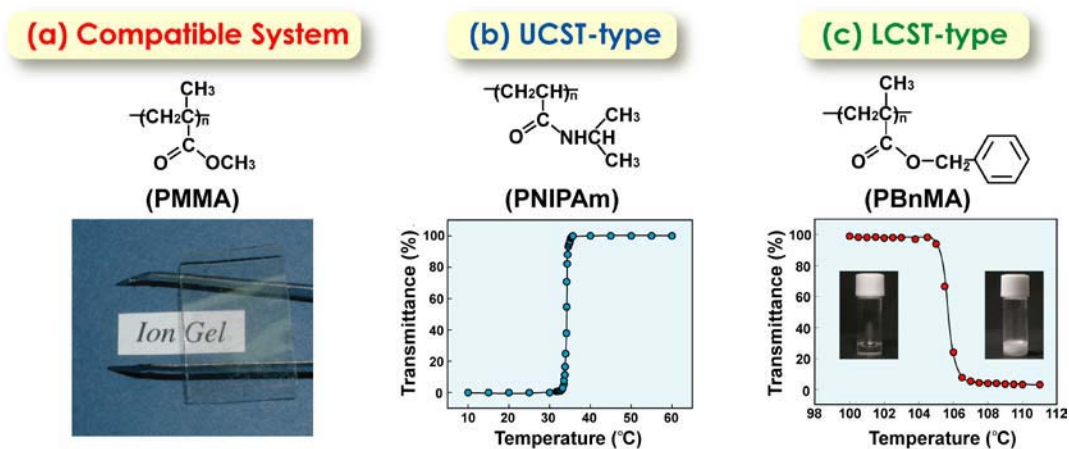


Fig. 1 各種高分子化合物とイオン液体の組み合わせが見せる多彩な相挙動：(a)完全相溶系(PMMA)、(b)UCST（上限臨界溶液温度）型相分離(PNIPAm)、(c)LCST（下限臨界溶液温度）型相分離(PBnMA)

イオン液体は「液体」だから面白い。しかしイオン液体の優れた性質を損なわずに固体化（ゲル化）することができれば、その利用価値は大きく広がる<sup>4,6)</sup>。事実、イオン液体は各種電池用電解質、分離膜、触媒担持膜やガス貯蔵膜などの材料化に際してはゲル状態で利用されるものも多い。固体化のための一つの方法論として、安価で軽量の汎用合成高分子とイオン液体の組み合わせが考えられる。典型例をFig. 1(a)に示す。高分子ネットワークにポリメタクリル酸メチル(PMMA)を、溶媒に疎水性イオン液体の代表格である1-エチル-3-メチルイミダゾリウム（ビストリフルオロメタン sulfonium）アミド（[C<sub>2</sub>mim][NTf<sub>2</sub>])を組み合わせたイオンゲルの写真である。この柔軟かつ透明なイオンゲルは軽量で自己支持性を有しており成形性にも優れる。さらに室温で10<sup>-2</sup> S/cmという電解質溶液に匹敵する高イオン導電率を有する新規な導電性薄膜である<sup>4)</sup>。詳細な検討の結果、本イオンゲル中のイオン伝導は、高分子ネットワークの動きとは独立して生起するデカップリングメカニズムで起こっていることも見出されている<sup>7)</sup>。

PMMAの完全相溶性を利用したもう一つのイオンゲルをFig.2に示す。直径120 nmのシリカ表面にPMMAをグラフト化させた微粒子はイオン液体中に安定に分散させることが可能であった。さらに興味深いことに、このイオン液体-PMMAグラフト化シリカ微粒子コンポジットはある特定濃度以上でゲル化し、美しく発色し、さらに濃度増大とともにその色は赤から青への変化した<sup>8)</sup>。この発色現象は構造色と呼ばれ、鮮やかなモルフォ蝶の羽や真珠の輝きと発色原理は同じである。一般的にこれら構造色が呈する色調はブラッグの式にスネルの法則を考慮した反射条件に従い角度依存性を持って変化する。しかし、この特殊発色体は、その色調に角度依存性がみられなかった。イオン液体を分散媒とするコロイドの面白いところは、この分散系を直接電子顕微鏡で観察できる点である。構造色を発するゲルを直接観察したところ、その粒子配列は長距離の秩序を持たず、この配列写真から得たパワースペクトルをさらに反射スペクトルに変換した結果、実測の反射スペクトルと良好な一致をみせた<sup>8)</sup>。

一般的なコロイド分散系において分散安定性の駆動力を生む電気二重層による斥力は、イオン液体の中では働かない<sup>9)</sup>。イオン液体という極限濃厚イオン雰囲気において、このような電气的効果は完全に遮蔽されてしまうからである。しかしPMMAのようにイオン液体に相溶する高分子をコロイド表面に修飾すると、その排除体積効果による反発力のため、極めて良好な分散安定性が確保されたと考えられる<sup>9)</sup>。イオン液体の不揮発性を利用すると、液体を含有したウェットな状態のサンプルを電子顕微鏡で直接観察できることは、新しい電顕観察法に発展している<sup>10)</sup>。このような液体と真空技術の共存は、次世代の分析、材料化学技術として期待される<sup>10, 11)</sup>。



Fig. 2 PMMA 修飾シリカ微粒子を高濃度に分散させたコンポジットイオンゲルが発色する美しい構造色とイオン液体(右)の外観

### 3. イオンゲルのエネルギー変換への応用

イオン液体が高分子に相溶したゲルは、

分子設計により、エネルギー変換系への応用が可能となる。たとえば、電池<sup>12)</sup>、燃料電池、アクチュエータ<sup>13)</sup>などが挙げられる。燃料電池は、水素と酸素をエネルギー源とし、水のみを排出するクリーンな発電装置であり、その普及に期待が高まっている<sup>14)</sup>。我々は、ある種のブレンステッド酸と塩基を等モル量混ぜるだけで合成できるイオン液体（プロトン性イオン液体）に注目した<sup>15)</sup>。すなわち、このイオン液体が系中を自由に動ける活性なプロトンを持つカチオンからなることに注目し、これをプロトン伝導体に用いた燃料電池発電の実現に着手した<sup>16)</sup>。結果としてジエチルメチルアンモニウムトリフロロメタンスルフォネート（[[dema][TfO]）が極めて高いイオン導電率を示すこと、さらに重要なことに、このイオン液体が白金電極上で活性な水素酸化および酸素還元能を併せ持つことを見出した<sup>17)</sup>。この特徴を活かし [[dema][TfO]を高分子膜形燃料電池に適用するため、強靱なポリイミド骨格と組み合わせた。このマトリックスをスルホン化しカウンターカチオンにイオン液体類似構造を導入することにより、イオン液体との高い相溶性、良好なプロトン伝導特性と力学特性の両立を実現した (Fig.3)<sup>18)</sup>。このイオンゲルを用いた燃料電池は、室温から水の沸点を大幅に超える 140℃という中温条件まで、無加湿状態で発電できることを見出した<sup>19)</sup>。中温領域での燃料電池発電は貴金属（白金）触媒量の低減や、CO被毒の回避という側面からも技術確立の要求は大きい。加えてこの系は水をプロトン伝導媒体に用いておらず原理的に低温（0℃以下）でも発電可能なことから、作動温度範囲を大幅に拡大できる。まだまだ課題も多いが、低温から 100℃以上の温度範囲まで無加湿状態で発電できるプロトン伝導体がいまだ存在しないため、燃料電池電解質としての期待が広がる。

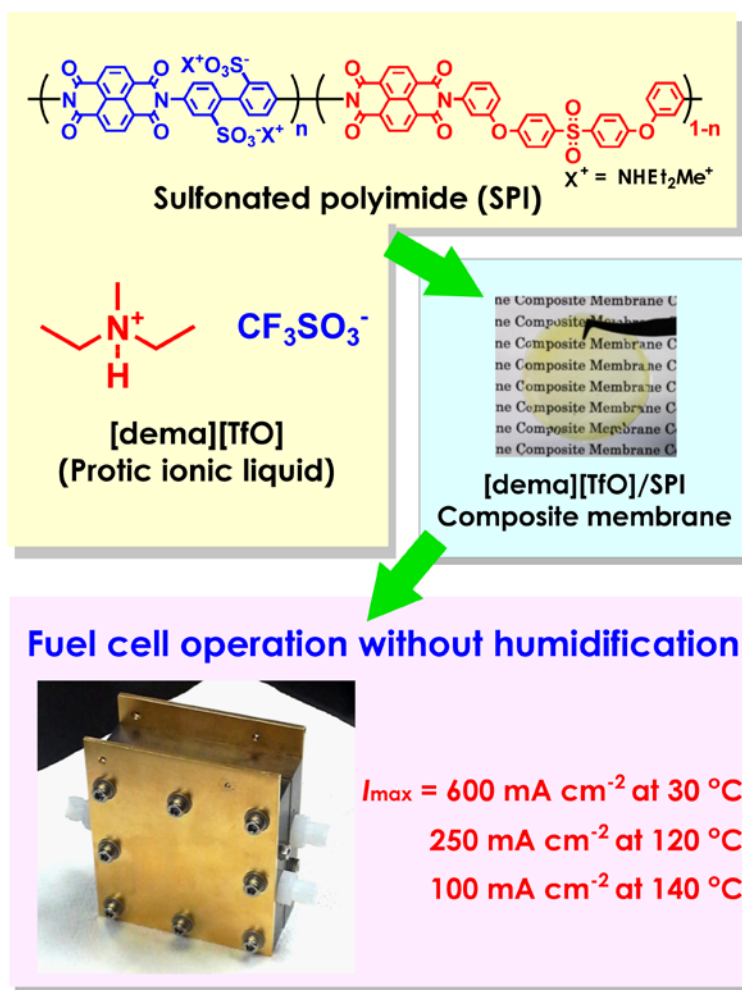


Fig. 3 プロトン性イオン液体([dema][TfO])とスルホン酸化ポリイミドの構造、膜の外観、および燃料電池特性

#### 4. LCST 型に相転移するイオンゲルの

##### 特徴と利用 —溶媒が蒸発しない、新しいスマートゲル—

物理化学的外部刺激に応答して溶液中で溶解性を変化させる高分子は刺激応答性高分子と呼ばれ、水溶液中の刺激応答性高分子に関しては活発に研究が進んでいる。その中でも特にポリ（*N*-イソプロピルアクリルアミド）(PNIPAm)は最も広く研究されている刺激応答性高分子と言って良いだろう<sup>20)</sup>。PNIPAmは水中で室温～人間の体温付近で低温相溶—高温相分離のLCST型相分離を見せる。これを反映して



PNIPAmを水で膨潤させたハイドロゲルは水中で低温膨潤－高温収縮型に体積を変化させる。PNIPAmハイドロゲルの膨潤収縮応答はDDS、アクチュエータ、光学デバイスなど様々な応用展開が期待されている。このようにゲルの刺激応答性を利用し、材料自身が外部刺激を感じ(sensing)、判断(processing)した後、行動(action)するゲルをスマートゲルと呼ぶ<sup>21, 22)</sup>。このようなスマートゲルはいずれも高分子ネットワークへの溶媒の出入りがゲルの体積変化を生み、あらかじめ設計された機能を発現する。しかし溶媒が経時的に蒸発してしまうと機能を発揮できない。もちろん、溶媒の融点以下、沸点以上の温度でも使えない。言い方を換えるとスマートゲルにとって機能の本質を担う溶媒の存在が、ときに最大の弱点になってしまう。そこで我々は液体温度領域が広く、蒸発しないイオン液体をスマートゲルの溶媒に適用した。検討の結果、ポリベンジルメタクリレート (PBnMA)が、あたかもPNIPAm水溶液のように、[C<sub>2</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]中でLCST型に相分離することを見出した (Fig.1(c))<sup>23)</sup>。LCST型相分離の本質は構造形成性溶媒和にある。例えばPNIPAm水溶液では疎水性側鎖のイソプロピル基周辺の疎水性水和により水が秩序化し、混合のエントロピー変化が負となっていると考えられている。PBnMAのイオン液体溶液でも混合のエントロピー変化が負となっているはずなので系中で溶媒あるいは高分子の構造化が起きていると推察された。このエントロピー低下効果を解くヒントとして近年、ベンゼンやトルエン、キシレンなど種々の芳香族系低分子化合物をイオン液体と混合すると液状包摂化合物(liquid clathrate)と呼ばれる秩序構造を形成するという報告がある<sup>24)</sup>。PBnMAにおいても芳香族側鎖近傍にイオン液体が秩序化して混合のエントロピーが低下していると考えられている。最近の検討では芳香族側鎖近傍の分子設計により、相転移温度を我々の室温域まで低下させた高分子<sup>25)</sup>やイオン液体中で光に応答して相転移する高分子<sup>26)</sup>も見出されており、一層の発展が期待される。

また、PBnMAを高分子ネットワークとしたイオンゲルがイオン液体中で温度に応じて不連続かつ可逆に体積相転移する現象を見出した(Fig.4)<sup>27)</sup>。繰り返しになるがイオン液体は蒸発せず、燃えない。有機物としては驚異的ともいえる液体温度範囲を持つ。従来のハイドロゲルではカバーできなかった温度・圧力条件も適用可能であることから、スマートゲルの新たな用途拡大が期待できる。ゲルの体積相転移は1978年、MITの田中により発見されたゲルサイエンスの一大ブレイクスルーであり、今でも多くの研究技術者を魅了し続けている<sup>28)</sup>。この神秘的な現象は高分子網目に働く浸透圧効果で理論的に記述され、水中のイオン性ハイドロゲル(電荷を持った高分子ネットワーク)によるものがよく知られている<sup>29)</sup>。しかし、イオン液体(電荷を持った液体)の中で中性PBnMA高分子網目に働く浸透圧効果の分子論的解釈は、実はまったく未解決な問題である。イオンゲルの科学は純粋な基礎学術対象として眺めても興味深い。

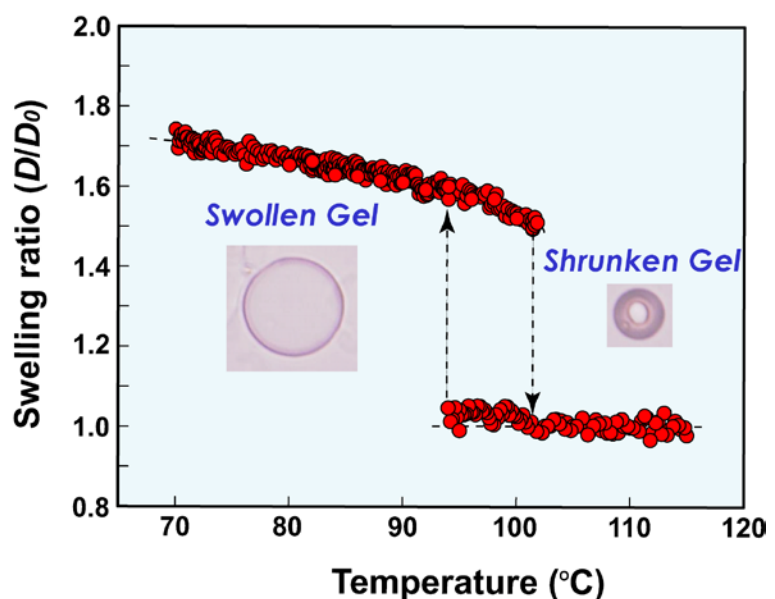


Fig. 4 PBnMA イオンゲルの体積相転移現象

## 6. おわりに

今回はイオン液体を溶媒に用いた高分子ゲルの特徴と機能に関して、相溶系、LCST型相変化系、UCST型相変化系と分けて多彩なイオンゲルの世界を紹介した。無限のデザイン性を誇るイオン液体が高分子と出会い、新たな特徴が生まれる。イオン液体を溶媒とするソフトマテリアルの世界の広がりを実感頂けたならば講演者としての役割は果たせたかなと思う。

## 参考文献

1. 吉田亮 著, “高分子ゲル”, 共立出版 (2004).
2. N. V. Plechkova, K. R. Seddon, *Chem. Soc. Rev.* **37**, 123 (2008).
3. For example, S. Shigeto, H. Hamaguchi, *Chem. Phys. Lett.* **427**, 329 (2006).
4. M. A. B. H. Susan, T. Kaneko, A. Noda, M. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4976 (2005).
5. T. Ueki, M. Watanabe, *Macromolecules* (Review), **41**, 3739 (2008).
6. T. Ueki, M. Watanabe, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (Accounts), **85**, 33 (2012).
7. S. Seki, M. A. B. H. Susan, T. Kaneko, H. Tokuda, A. Noda, M. Watanabe, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 3886 (2005).
8. K. Ueno, A. Inaba, Y. Sano, M. Kondoh, M. Watanabe, *Chem. Commun.* 3603 (2009).
9. K. Ueno, M. Watanabe *Langmuir* (Invited Feature Article), **27**, 9105 (2011).
10. S. Kuwabata, A. Kongkanand, D. Oyamatsu, T. Torimoto *Chem. Lett.* **35**, 600 (2006).
11. E. F. Borra, O. Seddiki, R. Angel, D. Eisenstein, P. Hickson, K. R. Seddon, S. P. Worden *Nature* **447**, 979 (2007).
12. 高分子学会 編, “燃料電池と高分子”, 共立出版 (2005).
13. K. Yoshida, M. Nakamura, Y. Kazue, N. Tachikawa, S. Tsuzuki, S. Seki, K. Dokko, M. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 13121 (2011).
14. S. Imaizumi, Y. Kato, H. Kokubo, M. Watanabe, *J. Phys. Chem. B*, **116**, 5080 (2012).
15. T. L. Greaves, C. J. Drummond, *Chem. Rev.* **108**, 206 (2008).
16. A. Noda, M. A. B. H. Susan, K. Kudo, S. Mitsushima, K. Hayamizu, M. Watanabe, *J. Phys. Chem. B*, **107**, 4024 (2003).
17. H. Nakamoto, M. Watanabe, *Chem. Commun.* 2539 (2007).
18. S.-Y. Lee, A. Ogawa, M. Kanno, H. Nakamoto, T. Yasuda, and M. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9764 (2010).
19. T. Yasuda, S.-Y. Lee, S. Nakamura, M. Watanabe, *高分子*, **59**, 134 (2010).
20. H. G. Schild *Prog. Polym. Sci.*, **17**, 163 (1992).
21. H. Wei, S. -X. Cheng, X. -Z. Zhang, R. -X. Zhuo, *Prog. Polym. Sci.* **34**, 893 (2009).
22. L. A. Lyon, J. D. Debord, S. B. Debord, C. D. Jones, J. G. McGrath, M. J. Serpe, *J. Phys. Chem. B* **108**, 19099 (2004).
23. T. Ueki, M. Watanabe, *Langmuir*, **23**, 988, (2007).
24. J. D. Holbrey, W. M. Reichert, M. Nieuwenhuyzen, O. Sheppard, C. Hardacre, R. D. Rogers, *Chem. Commun.* 476 (2003).
25. K. Kodama, H. Nanashima, T. Ueki, H. Kokubo, M. Watanabe, *Langmuir*, **25**, 3820 (2009).
26. T. Ueki, A. Yamaguchi, N. Ito, K. Kodama, J. Sakamoto, K. Ueno, H. Kokubo, M. Watanabe, *Langmuir*, **25**, 8845 (2009).
27. T. Tanaka, *Phys. Rev. Lett.* **40**, 820 (1978).
28. 田中豊一 著, “ゲルと生命” 東京大学出版会 (2002).
29. For example, M. Shibayama, T. Tanaka, *J. Chem. Phys.* **102**, 9392 (1995).

# ソフト界面の振動分光法によるその場分子構造評価

魚崎浩平

物材機構 WPI-MANA

【緒言】 生体内でのタンパク質をはじめ、ソフトマターの機能発現において水を含む周囲の分子との相互作用が大きな役割を果たしている。しかし、ソフトマターが実際に存在する環境下でソフトマター自身とその表面近傍の分子の構造を相互作用という観点で直接的に決定・議論することはこれまでほとんど行われていない。われわれはこれまでソフトマターの機能材料としての表面に関する基礎情報はもちろん、生命活動における水の役割という生物学的に重要な問題に対する新たな知見を得ることを目的とし、反射赤外分光法と界面選択的な振動分光法である和周波発生 (Sum Frequency Generation: SFG) 分光法を「ソフトマター界面」へ適応することで、分子間相互作用 (水素結合等) に関する情報を得ることを目指して研究を行ってきた(1-9)。本発表では、反射赤外分光法による金基板上に固定化した Calmodulin の機能評価とペプチド固相合成過程におけるペプチド構造のその場追跡および SFG 分光法による高分子電解質ポリマーブラシの界面構造評価について紹介する。

## 【赤外反射吸収分光法による金基板上に固定化した Calmodulin の機能評価】

Calmodulin(CaM)は細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化のシグナルを伝達するCa<sup>2+</sup>結合タンパク質である。このシグナル伝達系は筋収縮をはじめとする多くの生理現象に関わっており、CaMの酵素活性メカニズムの解明は非常に重要である。しかし、これまでのCaMの酵素活性に関する多くの研究は間接的手法によるもので、リアルタイムで直接観測した例は少ない。そこでCa<sup>2+</sup>濃度変化に応じたCaMの構造変化およびCaM結合ペプチドであるMastoparan(MP)との結合、解離の過程をin situ 赤外吸収分光法によりリアルタイムで直接観測した。

N末端にオリゴヒスチジンタグを発現させたCaMを金基板上に修飾した nickel-chelating nitrilo-triacetic acid (Ni-NTA)と結合させることで基板に固定した (図1)。In situ 赤外吸収測定は半円筒 Si プリズム上に作製した金薄膜表面で赤外光(1000~4000 cm<sup>-1</sup>)を内部反射させ、金薄膜上のCaM、およびMPの赤外吸収を測定した。図2は金基板上に固定されたCaMの各Ca<sup>2+</sup>濃度のリン酸緩衝液中におけるアミド領域のIRスペクトルである。リファレンスはCa<sup>2+</sup>を含まないリン酸緩衝液中で測定した結果を用いた。Ca<sup>2+</sup>

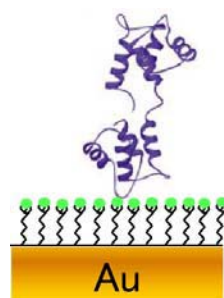


図1 金基板上に Ni-NTA 分子を介して固定化した CaM.

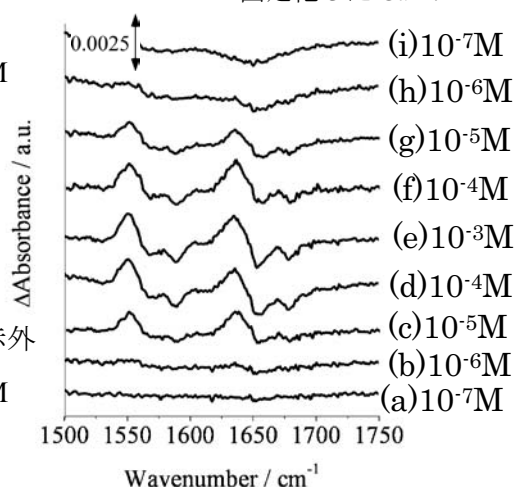


図2 種々の濃度の Ca<sup>2+</sup> イオンを含むリン酸緩衝液中における CaM の IR スペクトル。

濃度が  $10^{-7}$  M (図 2(a)) から  $10^{-3}$  M (図 6 (e)) へ上昇するにつれて、 $1550\text{ cm}^{-1}$  と  $1634\text{ cm}^{-1}$  にピークが出現した。これらはそれぞれEFハンド内の酸性残基が  $\text{Ca}^{2+}$  と配位結合した構造のピークと、セントラルヘリックスが伸びた構造のピークに帰属される。再び  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が  $10^{-3}$  M から  $10^{-7}$  M (図 2(i)) へ減少するとこれらのピークは消失した。この変化の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存性は図 3 に示すように過去の均一系の結果と一致しており、固定化  $\text{CaM}$  は均一系と同様に振舞うことを示している。以上

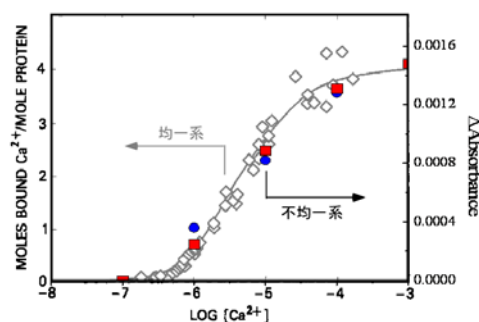


図 3  $1550\text{ cm}^{-1}$  のピーク強度 (■ :  $\text{Ca}^{2+}$  濃度増加時、● :  $\text{Ca}^{2+}$  濃度減少時; 図 2) および均一系における  $\text{Ca}^{2+}$  結合量<sup>15</sup> の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存性

の結果に基づく固定化  $\text{CaM}$  の  $\text{Ca}^{2+}$  結合による構造変化の模式図を図 4 に示した。また、この基板を用いて種々の  $\text{MP}$  濃度における  $\text{CaM}$  と  $\text{MP}$  の結合、解離過程のリアルタイム測定を行い、基板上的  $\text{CaM}$  が  $\text{MP}$  の分子間相互作用により、図 5 に示す構造変化を起こすことを明らかにした。

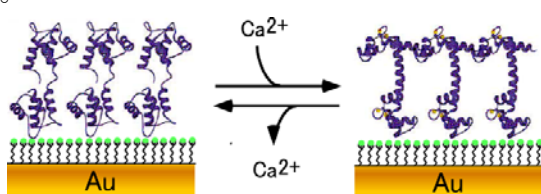


図 4  $\text{Ca}^{2+}$  結合による固定化された  $\text{CaM}$  の構造変化の模式図

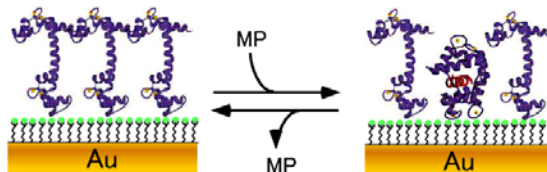


図 5 固定化された  $\text{CaM}$  と  $\text{MP}$  との分子間相互作用の模式図

### 【赤外反射吸収分光法によるペプチド固相合成過程におけるペプチド構造のその場追跡】

ペプチド固相合成法は表面をアミノ基で修飾したポリスチレンビーズなどを固相として用い、脱水反応によって段階的にアミノ酸鎖を伸長する手法である。しかし、これまで固相合成過程におけるペプチドの構造を直接評価した例はなく、表面においてペプチドがどのように伸張しているかは未だ不明瞭である。固相合成過程におけるペプチドの構造評価法の確立はペプチド固相合成法の収率の改善、および合成が困難とされる「difficult sequence」の合成にも繋がると考えられ非常に重要である。本研究は溶媒によって異なる構造を持ち、表面固定による機能付与に興味を持たれているポリプロリン(8)をペプチド固相合成法により金基板上で段階的に合成し、各段階の構造を赤外反射吸収分光法により評価した。

金基板上に、末端アミノ基を有する単分子層を自己組織化法により構築した後、①9-フルオレニルメチルオキシカルボニルプロリン (Fmoc-Pro) を含む溶液を添加することで保護基を有するプロリンの導入、②ペピリジン溶液を添加することで保護基の除去を行った。以下①、②を繰り返すこと

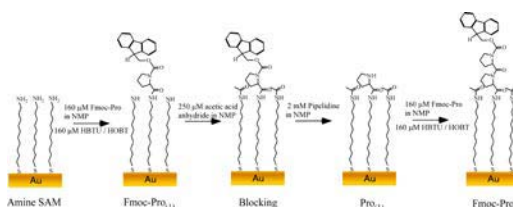


図 6 金基板を用いたペプチド固相合成スキーム

とでポリプロリンを段階的に金基板上に構築した (図 6)。In situ 赤外吸収測定は半円筒  $\text{Si}$  プリズム上に作製した金薄膜表面で赤外光 ( $1000\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ ) を内部反射させ、金薄膜上のポ



リペプチド由来の赤外吸収を測定した。図7はジクロロメタン中で得られた各段階のポリプロリンのIRスペクトルである。合成初期段階ではプロリンのC=O伸縮振動に由来する  $1680\sim 1650\text{ cm}^{-1}$  のブロードなピーク、プロリンのC-N伸縮振動などに由来する  $1439\text{ cm}^{-1}$  のピーク、アミンSAMとプロリンによるアミド結合のN-H変角振動とC-N伸縮振動のカップリングに由来する  $1364\text{ cm}^{-1}$  のピークが観測された。プロリンの導入回数の増加に

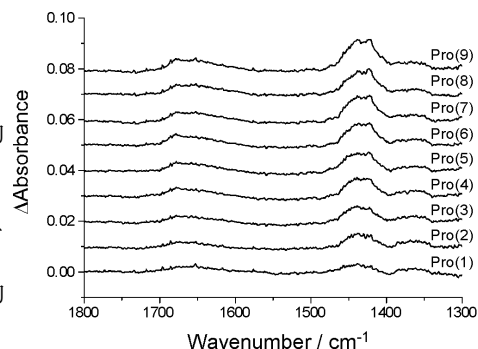


図7 固相合成の各段階のポリプロリンのIRスペクトル

に伴いプロリン由来の  $1680\sim 1650\text{ cm}^{-1}$  のブロードなピークと  $1440\text{ cm}^{-1}$  付近のピーク強度の増加が観測されたことから、ポリプロリンが段階的に金基板上に固定化されていることが確認された。ポリプロリンは周囲の環境により異なった構造をとるため、ペプチド固相合成の溶媒依存性についての検討も行った。

### 【SFG分光法によるポリマーブラシの表面分子配向と界面水の構造評価】(7)

高分子薄膜の特性は表面の分子構造に大きく影響される。表面に高感度な和周波発生(SFG)分光法を用いると高分子の表面における分子構造及び配向を選択的に知ることが出来る。本研究では高分子鎖の一部を固体表面に固定したポリマーブラシの、乾燥窒素・気体及び液体の水に接した際の表面分子構造を評価した。アルキル化ポリビニルピリジン (CnPVP,  $n=0, 2, 6, 12$ ) を四級化反応により石英基板上に固定したポリマーブラシを試料とした。図2-(a)はC6PVP/乾燥窒素界面のSFGスペクトルである。 $2879\text{ cm}^{-1}$  と  $2940\text{ cm}^{-1}$  のピークは各々側鎖末端のメチル基の対称伸縮及びフェルミ共鳴、 $3030\sim 3070\text{ cm}^{-1}$  のブロードなピークはピリジン環の芳香族CH伸縮、 $2859\text{ cm}^{-1}$  と  $2913\text{ cm}^{-1}$  付近のメチレン基の対称及び非対称伸縮に帰属される。この試料を飽和水蒸気(b)、水(c)、および再び乾燥窒素(d)と接触させた時の構造変化をOH領域の結果に基づく水の構造とあわせても議論する。

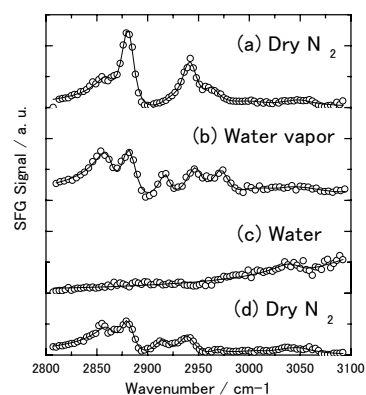


図8 C6PVP/Quartz 界面のCH伸縮領域のSFGスペクトル。(a)乾燥窒素中、(b)飽和水蒸気中、(c)水中、(d)乾燥窒素中。

### 【参考文献】

- (1) S. Ye, S. Nihonyanagi and K. Uosaki, *PCCP*, **3**, 3463 (2001).
- (2) H. Noguchi, T. Okada, and K. Uosaki, *Faraday Discuss.*, **140**, 125 (2006).
- (3) H. Asanuma, H. Noguchi, K. Uosaki, and H-Z. Yu, *JACS*, **130**, 8016 (2008).
- (4) H. Noguchi, H. Minowa, T. Tominaga, J. P. Gong, Y. Osada and K. Uosaki, *PCCP*, **10**, 4987 (2008).
- (5) H. Asanuma, H. Noguchi, K. Uosaki, and H. Yu, *J. Phys. Chem. C*, **113**, 21155 (2009).
- (6) H. Noguchi, K. Taneda, H. Minowa, H. Naohara, K. Uosaki, *J. Phys. Chem. C*, **114**, 3958 (2010).
- (7) K. Uosaki, H. Noguchi, R. Yamamoto, and S. Nihonyanagi, *JACS*, **132**, 17271 (2010).
- (8) Y. Han, H. Noguchi, K. Sakaguchi, and K. Uosaki, *Langmuir*, **27**, 11951 (2012).
- (9) Y. Zhang, H. Noguchi, S. Ye, and K. Uosaki, *Surf. Sci.*, in press (2012).



# リン脂質二分子膜の酵素反応に伴う界面構造解析

(北海道大学・触媒化学研究センター) 叶 深

【序】脂質二分子膜と種々の生体分子との相互作用過程を解明することは、細胞膜の機能発現を理解する上で極めて有用である。ホスホリパーゼA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)は、リン脂質分子の不斉炭素に接するエステル結合の加水分解反応を選択的に触媒することが知られている[1]。これまでに様々な手法により検討されてきたが、脂質二分子膜表面におけるこの酵素反応の反応機構や反応速度論について分子レベルでまだ解明されていない。本研究では、PLA<sub>2</sub>によるリン脂質分子の加水分解に伴う脂質二分子膜の構造変化について、界面分子の構造と配列に極めて敏感である和周波発生(SFG)振動分光法と原子間力顕微鏡(AFM)などのその場計測技術を駆使し調べ、該酵素反応の速度論と反応機構の解明を目指している。

【実験】リン脂質分子はジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)を用いた。脂質二分子膜は、LB法により、固体膜に対応する 30mN/mの表面圧で基板表面へトランスファーされた。脂質分子の不斉炭素に隣接するエステル結合の加水分解反応において、L型分子のみと触媒作用するPLA<sub>2</sub>の立体選択性を利用し、L/L型二分子積層膜のほかに、L/D、D/L、D/D及びラセミ型LD/LDのような二分子積層膜の加水分解に伴う膜表面の構造変化について調べた。SFG分光測定は、当研究室に構築されているブロードバンドSFG分光測定システムで行われた[2,3]。AFM測定は、Agilent 5500を用いてタッピングモードで行われた。測定は5mM Ca<sup>2+</sup>を含むトリス緩衝溶液(pH 8.9)中で行われた[4]。

【結果と考察】L-DPPCのみからなるL/L二分子膜の加水分解過程についてSFG測定により調べた[3]。酵素が導入された最初の約10分間ではDPPC分子末端メチルの非対称伸縮のピークが減少したが、対称伸縮のピークが殆ど変化していなかった。これはPLA<sub>2</sub>の導入に伴い、DPPC分子の再配向によるものと考えられる。その後、二分子膜からのSFG信号が急速に減衰し、約30分後ほぼ消失した。このことから、PLA<sub>2</sub>による加水分解過程は「誘導と加速」といった二段階で進行することが示唆された。そして、PLA<sub>2</sub>は二分子膜表面に吸着し、脂質分子を最適な構造に再配向させてから、反応が一気に加速されたものと予想される。

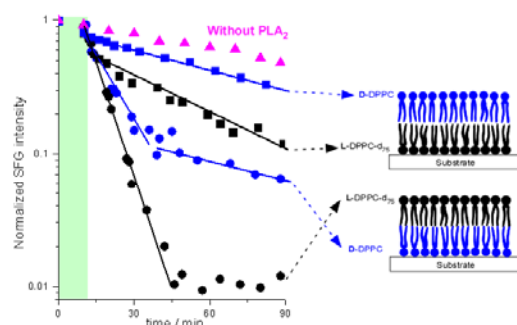


Figure 1. Time-dependent SFG peak intensities for D/L and L/D DPPC bilayers after PLA<sub>2</sub> introduction.

この加水分解過程の反応機構を詳細に検討するために、PLA<sub>2</sub>の高い立体選択性を利用し、キラリティが異なるDPPC分子を積層した二分子膜を構築し、PLA<sub>2</sub>による触媒反応過程を追跡した(図1)[3]。上層にD(反応性なし)と下層にL(反応性あり)を積層したD/L二分子膜の場合、上層と下層からのSFG信号がゆっくり減衰し、基本的にPLA<sub>2</sub>酵素が存在しない場合に近い挙動を示した。これは脂質二分子膜の加水分解の速度が遅く、SFG信号の低下は主に脂質分子のフリップ・フロップが関与するものと考えられる。一方、L/D積層膜では、酵素が導入されると同時に、L層とD層のSFG信号ともに速く減衰し、L-DPPC由来のSFG信号が先に消失し、D-DPPC由来のSFG信号の減衰速度が小さくなる。PLA<sub>2</sub>に触媒される二分子膜の

加水分解反応は膜の表面層から始まり、その生成物が表面から脱離すると同時に、下層にある分子が表面層に反転し、**D/D**二分子層を形成するために、その信号強度が減少すると示唆される。上層の**L-DPPC**が少なくなると、**D-DPPC**の反転も起こりにくくなるので、減少速度が低下する [3]。

一方、加水分解に伴う膜表面の形状変化や反応サイトに関する情報が、**SFG** 測定から直接に得られないので、我々はさらにその場 **AFM** 観察により膜表面の形状変化について追跡した[4]。図 2 には、**L/L** 二分子積層膜の加水分解反応に伴い観測された **AFM** 結果を示す。室温の条件下では、脂質二分子膜の表面に深さが二分子の **DPPC** の長さ（ $\sim 5\text{nm}$ ）に相当する穴が観測され、膜作成の際にできた欠陥だと考えられる。酵素を導入した直後、**AFM** イメージの変化が小さく、酵素添加した約 10 分後、これらの表面欠陥の縁からリン脂質分子の加水分解が進行するようになり、約 30 分で基板表面にある **DPPC** 分子が殆どなくなった。これは、**SFG** 測定で得られた結果と対応している。

また、二分子膜の構成方法により、二分子積層膜の加水分解速度が大きく異なっており、**L/L**  $\gg$  **LD**  $\sim$  **LD/LD**  $>$  **D/L**  $\gg$  **D/D** という順番で減少することが観測された。さらに、**L/D**、**D/L** と **LD/LD** の二分子膜の加水分解の最終段階において、約五割の脂質分子が表面に残ったことから、**PLA<sub>2</sub>** の高い立体選択性を示した。ここで、脂質分子の表面拡散とフリップ・フロップ運動の速度を考慮しながら、**Michaelis-Menten** 式に基づき、**PLA<sub>2</sub>** による脂質二分子膜の加水分解反応の速度論と反応機構の定量的な説明を試みている [4]。

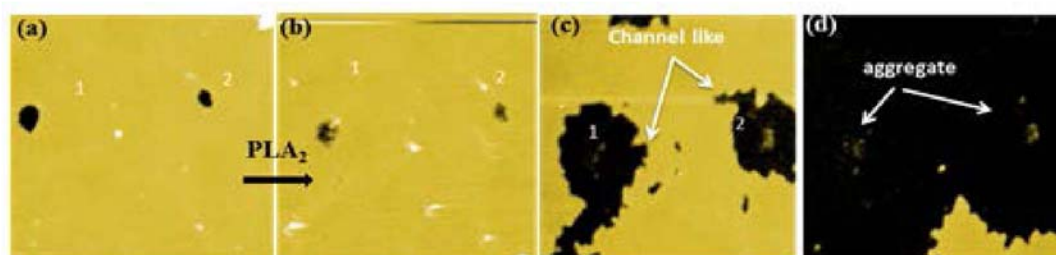


Figure 2. AFM images ( $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ ) of **L/L-DPPC** bilayer (a) before and (b)-(d) 8, 15, 29 min after **PLA<sub>2</sub>** injection.

このように、**SFG** と **AFM** などの高感度の界面計測技術を活用し、擬似細胞膜表面における酵素触媒反応過程のその場追跡に成功した。今後、分子レベルで細胞膜表面における様々な反応過程への応用を目指したい。

#### 【参考文献】

- (1) Wilton, D. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*; 5th ed.; Vance, D., Vance, J., Eds.; Elsevier B.V.: Amsterdam, 2008, p 305.
- (2) Ye, S.; Noda, H.; Morita, S.; Uosaki, K.; Osawa, M. *Langmuir* **2003**, *19*, 2238; **2004**, *20*, 357
- (3) Tong, Y.; Li, N.; Liu, H.; Ge, A.; Osawa, M.; Ye, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2319
- (4) Wu, H.; Yu, L.; Osawa, M.; Ye, S. *submitted*.

【略歴】1993年3月北海道大学大学院理学研究科化学専攻博士後期課程修了，北海道大学化学科助手，米国カリフォルニア大学バークレー校博士研究員，科学技術振興事業団「さきがけ研究」研究員（兼任）等を経て2001年北海道大学触媒化学研究センター准教授，同センターバイオインターフェース研究クラスター・リーダー，現在に至る。

## ポスターセッション

				題名
	計画	菊池 明彦		東京理科大学 基礎工学部
1			岩下 直人	東京理科大学 大学院基礎工学研究科 材料工学専攻
2			坂本 和美	東京理科大学 大学院基礎工学研究科 材料工学専攻
	計画	高井 まどか		東京大学大学院工学系研究科
3			久代 京一郎	東京大学工学系研究科バイオエンジニアリング専攻
	計画	長崎 幸夫		筑波大学大学院 数理物質科学研究科
4			片町 仁哉	筑波大学大学院 数理物質科学研究科
	計画	前田 瑞夫		理化学研究所
5			平峯 勇人	
	計画	宮原 裕二		東京医科歯科大学生体材料工学研究所
6			前田 康弘	
7			松元 亮	
8	研究分 担者	馬原 淳		国立循環器病センター研究所
9	公募	藤井 秀司		大阪工業大学工学部
	公募	山本 拓矢		東京工業大学理工学研究科
10			菅井直人	
11	公募	遊佐 真一		兵庫県立大学大学院工学研究科
12	公募	森田 裕史		産業技術総合研究所ナノシステム研究部門
	公募	武田 直也		早稲田大学大学院 先進理工学研究科 生命医科学専攻
13			峯口 竜	
	連携協 力者	岩崎 泰彦		関西大学
14			折坂雅樹	

# 温度応答性ブラシの一次構造がタンパク質相互作用に与える効果

○岩下直人・麻生隆彬・菊池明彦  
東京理科大学 大学院基礎工学研究科

【緒言】密度高くかつ、鎖長制御されたポリマーブラシを固体表面に修飾する方法として、原子移動ラジカル重合 (ATRP) が有効な方法であることが認識されている。また ATRP の特徴を利用し修飾するポリマーの密度や分子量、組成などを変化させ、表面の濡れ性および細胞やタンパク質の吸着性を制御する方法が近年注目されている<sup>[1]</sup>。一方、化学構造によりタンパク質の吸着を特異的に制御し、特定の物質のみを分離・精製する方法として固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー (IMAC) が知られているが<sup>[2]</sup>、複雑な操作により生じるタンパク質変性の可能性や競合剤など混入物の存在が問題となっている。これらを解決するため、温度応答性高分子のポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) に金属イオンのリガンドとなるニトリロ三酢酸 (NTA) 基を導入し、PNIPAAm の温度変化に伴う高分子鎖の伸長 / 凝集と、それに伴うリガンド-タンパク質間の見かけの結合定数の変化を利用したタンパク質の吸・脱着制御を検討している。しかし、共重合によりリガンドがポリマー鎖中へランダムに導入されることで、温度応答に伴う見かけの結合定数の変化が制御しにくくなることが予想される。

そこで本研究では、モノマーの重合順序を変化することでポリマーの一次構造を制御し、タンパク質相互作用を明確に制御可能な材料表面の設計を目的とした。

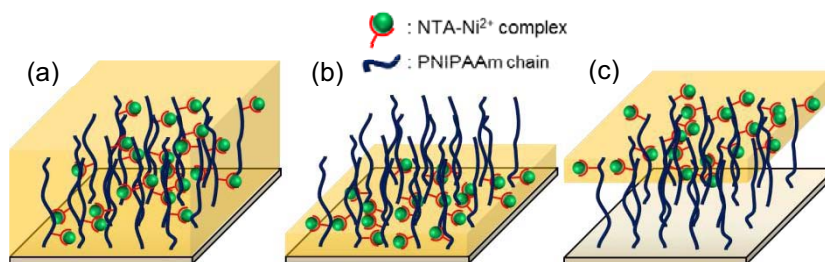


Figure 1 Illustration of poly(NIPAAm-co-NTA) (PIN) modified surface having controlled primary structure. (Ligand position; (a) random: R, (b) proximal end: P, (c) distal end: D)

【実験】モノマーとして (1)NIPAAm、および (2)NIPAAm と *tert*-ブチルアクリレート (*t*BA) の混合物 (99.5 : 0.5 mol/mol) をそれぞれ *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) に溶解した。続いてトリス(2-(*N,N*-ジメチルアミノ)エチル)アミン (Me<sub>6</sub>TREN)、CuCl を加え、窒素置換した。これらの溶液を用い、ATRP 開始基を修飾した内径 100 μm のフューズドシリカキャピラリー内壁表面に対して 25°C で表面開始原子移動ラジカル重合 (SI-ATRP) を所定時間行った。その際、(1)と(2)の溶液を用いる順序を変化させ、得られる高分子鎖中の NIPAAm / *t*BA 組成を制御した。重合停止後、5-アミノ-1-カルボキシペンチルイミノ二酢酸 (AB-NTA) とトリエチルアミン (TEA) を溶解したジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液を 70°C で 24 h 通液し、*t*BA の側鎖を NTA に変換することで一次構造を制御した poly(NIPAAm-co-NTA) (PIN) 修飾キャピラリーを得た。それらの表面について、FITC により蛍光標識化したウシ血清アルブミン (FITC-BSA) を用いて、蛍光検出器を備えたマイクロ HPLC によりその吸着挙動を評価した。

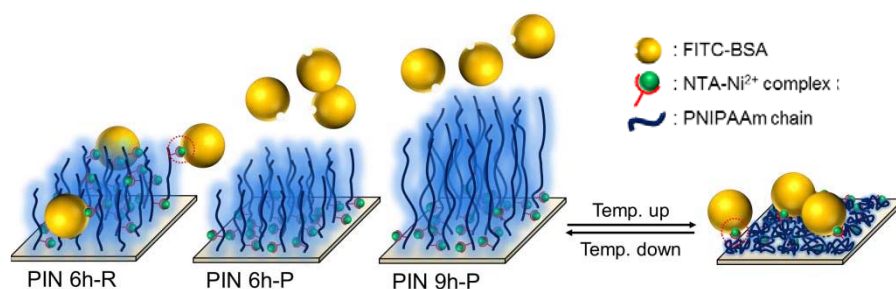


**【結果・考察】** まず、ATRP 開始基を修飾した内径 100  $\mu\text{m}$  のフューズドシリカキャピラリー内壁表面に対して、PNIPAAm または poly(NIPAAm-co-NTA) (PIN)をそれぞれ 6 h 重合し、PNIPAAm 6 h および NTA をランダムに導入した PIN 6 h-random (R)修飾キャピラリーを調製した。それら高分子表面に対する BSA の吸着量を、マイクロ HPLC を用いて評価した(Fig. 2 a,b)。その結果、4 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$  のいずれの温度でも BSA は吸着しなかった。一方、PIN 6 h-R に対して  $\text{Ni}^{2+}$  を固定化した PIN- $\text{Ni}^{2+}$  6 h-R 修飾表面では大幅な吸着量の増大が認められ、かつ温度によらず BSA が吸着した (Fig. 2c)。重合において常に新しいモノマー溶液をキャピラリー内に通液し続けたことで、タンパク質と相互作用しうる NTA- $\text{Ni}^{2+}$  が露出し、タンパク質吸着量が増大したと考えられる。一方、疎水性のテストステロン (tes)は、37 $^{\circ}\text{C}$  でその溶出時間が 4 $^{\circ}\text{C}$  の場合に比べて 2 分程度遅れ、脱水和した PNIPAAm 表面と tes が疎水性相互作用を生起することが示された。したがって、これらのキャピラリーは温度応答性を有するものの、ポリマー鎖中に NTA がランダムに存在しているために BSA 吸着の温度依存性が見られなかったと考えられる。

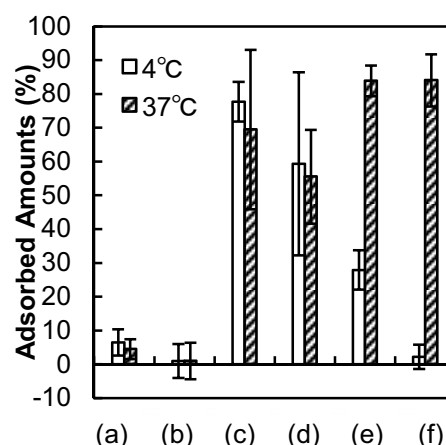
そこでまず PIN- $\text{Ni}^{2+}$  3 h-R 修飾表面を調製し、さらに 3 h ごとに重合溶液を交換することで PIN- $\text{Ni}^{2+}$  3 h-R 上で NIPAAm の ATRP を 3 h あるいは 6 h 行い、NTA を基板表面付近に導入した PIN- $\text{Ni}^{2+}$  6 h-proximal end (P)および 9 h-P を調製した。PIN- $\text{Ni}^{2+}$  3 h-R では、6 h-R と同様温度によらず BSA が吸着した(Fig. 2d)。一方 PIN- $\text{Ni}^{2+}$  6 h-P では、4 $^{\circ}\text{C}$  で 30%、37 $^{\circ}\text{C}$  で 85%の BSA が吸着し、PIN- $\text{Ni}^{2+}$  9 h-P では BSA の吸着量は 4 $^{\circ}\text{C}$  で 3%、37 $^{\circ}\text{C}$  で 85%となり、温度に応答して吸着量に差が認められた (Fig. 2e, f)。これは、NTA を含まない PNIPAAm が重合末端側に存在することで、4 $^{\circ}\text{C}$  ではポリマー鎖の水和に伴い生じた排除体積効果により NTA が遮蔽されたことで BSA の吸着量が大幅に低下したと予想でき、さらに、重合時間 9 h に延長すると、PNIPAAm 鎖が延長し、NTA の遮蔽がより有効に機能したと考えられる。このように、末端の PNIPAAm 鎖の存在とその鎖長効果により、温度応答に伴う BSA の吸着量に変化が現れるとわかった。

**謝辞** 本研究の一部は、文部科学省科研費新学術領域研究「ソフトインターフェースの分子科学」(20106004)により実施した。

**参考文献** [1] R. Barbey *et al.*, *Chem. Rev.*, **109**, 5437–5527 (2009)  
[2] J. Porath, *et al.*, *Nature*, **258** 558-559 (1975)



**Figure 3** Adsorption behavior between PIN- $\text{Ni}^{2+}$  modified surface and FITC-BSA.



**Figure 2** Adsorbed amount of FITC-BSA for PNIPAAm or PIN modified capillary. (a) PNIPAAm 6 h, (b) PIN 6 h-R, (c) PIN- $\text{Ni}^{2+}$  6 h-R, (d) PIN- $\text{Ni}^{2+}$  3 h-R, (e) PIN- $\text{Ni}^{2+}$  6 h-P and (f) PIN- $\text{Ni}^{2+}$  9 h-P.

# 生体分子の高分離能を有する感温性高分子ソフト界面の構築

○坂本和美・麻生隆彬・菊池明彦  
東京理大学 大学院基礎工学研究科

【緒言】医薬品や生体分子の分離・精製に用いる一般的なクロマトグラフィーカラムは、有機溶媒を移動相とするため生体分子の変性や分離後の廃液による環境への負荷が懸念されている。この問題に対し、水のみを移動相とし温度変化させることにより分離を行う感温性クロマトグラフィーカラムの研究が行われてきた。このカラムは、水系単一溶媒での分離を実現するために、水中で温度変化により親水性・疎水性が変化する温度応答性高分子ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm)修飾表面が分離担体として用いられている<sup>1)</sup>。また我々は微量分析を目的とし、マイクロキャピラリー内壁面に PNIPAAm を表面開始原子移動ラジカル重合法 (SI-ATRP 法)により PNIPAAm を修飾したカラムの調製を検討している<sup>2)</sup>。このようなマイクロ流路での分離は、環境<sup>3)</sup>や医療の分野<sup>4)</sup>における応用においてわずかな検体中のごく微量に含まれる疎水性のステロイドホルモン等の分離に有用であるが、さらなる高感度化が求められる。一方で、大きな比表面積と比較的広い貫通孔を有するモノリスシリカカラムは、高い分離能力を持ち、低背圧下での高速分離が可能なカラムとして実用化されている<sup>5)</sup>。本研究では、キャピラリー内にモノリスシリカを調製し、その表面に PNIPAAm を修飾することで温度スイッチングを用いた高い分離能力を有するキャピラリーカラムの調製を行った。さらに、マイクロ高速液体クロマトグラフィー (μHPLC)を用いて調製したカラムの評価を行い、生理活性物質の分離を検討した。

【実験】氷浴下で所定量のポリ(エチレングリコール)とテトラメトキシシランを酢酸水溶液に溶解し、ゾル溶液を調製した。脱気後、アルカリ洗浄し中和した 10 cm のフューズドシリカキャピラリーにゾル溶液を通液し、40°C でゲル化反応を行った後、乾燥したモノリスシリカ充填キャピラリーを焼成した。

トルエン洗浄後、2-(*m/p*-クロロメチルフェニル)エチルトリクロロシランのトルエン溶液を通液し、モノリスシリカ表面に SI-ATRP 開始剤を固定化した (Fig.1)。窒素雰囲気下で所定量の NIPAAm、CuCl、トリス-(2-(*N,N*-ジメチルアミノ)エチル)アミン (Me<sub>6</sub>TREN)の DMF 溶液を通液し、モノリスシリカ表面に PNIPAAm を修飾した。モノリスシリカの構造は走査型電子顕微鏡 (SEM)で観察し、PNIPAAm 修飾モノリスシリカキャピラリーの温度変化にともなうステロイドの溶出挙動をμHPLC で解析した。

【結果・考察】内径 100 μm のキャピラリー内にゾルゲル法を用いてモノリスシリカを充填し、SEM によりその断面を観察した (Fig. 2-a)。キャピラリー内には、球状シリカが三次元ネットワーク状に連なり、5 μm 以上の空隙を有する骨格が認められた (Fig. 2-b)。また、高分子修飾前後でのモノリスシリカの表面を比較すると、モノリスの空隙に大きな変化は見られなかった。さらに、ポリマー修飾後のモノリスシリカキャピラリーをμHPLC に接続した際の送液時の背圧は、10~40°C の下で 0.6~1.0 MPa と非常に低背圧での送液が可能であった。そのため、重合後においても大きな流路が保たれていることが示唆された。

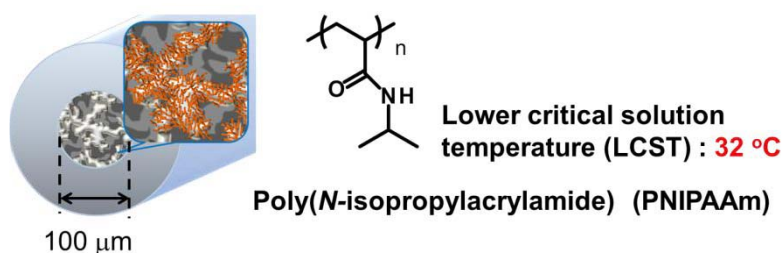


Fig. 1 PNIPAAm modified monolithic silica surface in capillary via SI-ATRP.



次に、 $\mu$ HPLC を用いて、調製したカラムに親水性のアデノシン (ade) と疎水性であるテストステロン (tes) の 2 種類の生理活性物質を送液し、その溶出挙動を評価した。親水性の ade は溶出挙動が温度に依存しないため基準物質とし、重合時間の異なるカラム長 10 cm PNIPAAm 修飾モノリスシリカキャピラリーを用いて、生理活性物質の溶出挙動を比較した。その結果、重合時間の延長に伴い、すべての温度範囲でより大きな保持係数が得られた。これは、重合時間の増加に伴い高分子の鎖長が生長し、より長い鎖長のもの程高温下で疎水性物質と大きな相互作用を生じたためと考えられる。さらに、重合時間を延長する程、高温下で疎水性の強い物質のピークはより大きく広がった。これは、疎水性の強い物質程、疎水化した高分子界面との間でより強い疎水性相互作用が起こったため、溶出に長い時間を要したと考えられる。

また、重合時間 3 時間で調製した 10 cm PNIPAAm 修飾モノリスシリカキャピラリー (mono-10) と、モノリスシリカを充填していない 100 cm PNIPAAm 修飾中空キャピラリー (hollow-100) の温度変化に伴う tes 保持係数の変化を評価した (Fig. 3)。これより、mono-10、hollow-100 とともに、温度上昇に伴ってテストステロンの保持時間が延長し、PNIPAAm の下限臨界溶液温度付近である 30~40°C 間で最も大きな変化が得られた。このことから、モノリスシリカ充填・中空カラムともに、PNIPAAm 鎖が修飾できたことが示された。ここで、モノリスシリカ充填のものは、中空のものと比較して非常に大きな保持係数の変化が得られた。これは、モノリスシリカの充填によってキャピラリー内の比表面積が著しく増大したことから、PNIPAAm 鎖の修飾面積が増加したためであると考えられる。さらに、 $\mu$ HPLC による調製したカラムを用いた生理活性物質の分析時間に着目すると、PNIPAAm 修飾モノリスシリカキャピラリーカラムでは、中空のものに比べて注入した tes が高温下で比較的短時間ですべて溶出した。そのため、これらの結果より PNIPAAm 鎖を修飾したモノリスシリカキャピラリーカラムは高い分離能力を持ち、このカラムを用いることで短時間での生理活性物質の分離精製が期待できる。

【謝辞】 本研究は文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究 (20106004) により行った。

【参考文献】

- 1) H. Kanazawa, et al. *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 100.
- 2) N. Idota, et al. *Langmuir*, **2006**, 22, 425.
- 3) A. Cappiello, et al. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 29
- 4) F. Mashige, et al. *J. Chromatogr. B*, **1994**, 658, 63
- 5) N. Ishizuka, et al. *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23, 111,

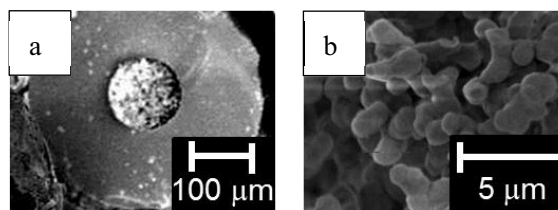


Fig. 2 SEM image of monolithic silica in fused-silica capillary. (i.d.:100  $\mu$ m)

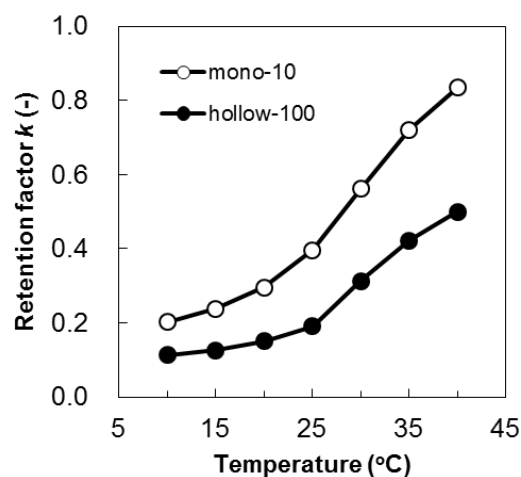


Fig. 3 Temperature-dependent change in retention factor for testosterone on PNIPAAm grafted monolithic silica capillary (10 cm, open circle plot) and PNIPAAm grafted hollow silica capillary (100 cm, closed circle plot). Reaction time: 3h. Monomer concentration: 1 M.

# 表面固定化された細胞外マトリックスマイクロパターンによる細胞方向性移動のコントロール

久代京一郎<sup>1</sup>、アナンド・アシタギリ<sup>2</sup>、高井まどか<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京大学工学系研究科バイオエンジニアリング専攻、<sup>2</sup>ノースイースターン大学院化学工学専攻

**要約**：近年、材料の弾性や材料表面に固定化するリガンドの種類等を用いて細胞の様々な挙動、主に接着性や増殖性等、を制御する技術が細胞工学分野において広く研究されている。また、細胞の配向や移動を制御する目的で、マイクロパターンの使用が広まり、最近では非対称性の形状や構造のマイクロパターンによる非勾配的細胞走性の効果が注目されている[1,2]。本研究は、リガンド（細胞外マトリックスタンパク質やペプチド）の表面固定方法（物理吸着や化学結合）や固定箇所の非対称的図形を利用し細胞の移動方向を定め、その移動メカニズムを理解するのを目的とした。

リガンドの種類、固定化状態を変化させて細胞移動速度を検討したところ、物理吸着されたリガンドより化学結合されたリガンドの方が細胞速度は速く、RGD ペプチド分子（RGD）よりフィブロネクチン（FN）がより細胞の移動を促進させた。さらに、FN を COOH-SAM に化学結合した非対称な涙状マイクロパターンを特定の配置や間隔で構成すると、上皮細胞が一定方向に高確率（特定方向のパターン間移動の割合：82%）で移動する事が分かった。PDMS スタンプを用いて FN を直接物理吸着で涙状マイクロパターンを作った場合、この高い方向性は軽減され（65%）移動性も低下した。高い方向性移動をしている細胞を高倍率で観察したところ、規則正しい新たな膜状仮足の形成が細胞移動の方向性を維持していることも分かった。本研究の結果は形状や構造を駆使した化学勾配を用いない非勾配的な細胞走性制御システムであり、チップ上の細胞分別コントロールや組織スキャフォールドの形成に応用でき、さらに体内に存在する様々な組織形状上の細胞移動の生物学的理解にも繋がると思われる。

**背景**：細胞移動の方向性は臓器形成、免疫反応、癌の転移等、様々な生物学的現象に深く関わっている。従来の化学勾配による細胞の走化性を初め、走触性、走電性等、様々な勾配に基づく細胞の方向走性が知られているが、これら勾配を実験等で用いる場合様々な不都合が生じる場合がある。勾配を使わない形状や構造に基づく細胞の方向性移動の研究は再生医学等への応用ポテンシャルを保持し、様々な生物学的現象を理解するのにも役立つ。

**実験方法**：リガンドはフィブロネクチン（FN）とRGDペプチド分子（RGD；配列GRGDSP）を使用した。マイクロパターンはPDMSスタンプを用い、図1に示すマイクロコンタクトプリンティング手法を用いて、ポリスチレン上にリガンドを物理吸着させたリガンド固定化基板

(Ads)とガラス上に金・チオール結合を用いた自己組織化単分子膜を作りリガンドを化学結合させた基板(SAM)を作成した(図1)。Cy3でラベル化された牛血清アルブミン(BSA)を混ぜパターンを蛍光可視化した。

**結果と考察：**

**1. リガンドの種類と固定方法の細胞速度への影響**

まず物理吸着したリガンド上での細胞移動を観察すると、FNの方がRGDより上皮細胞の移動速度が高かった。化学結合したリガンドを比較すると、FNとRGDの間に有意な違いは見られなかったが、両方のリガンドにおいて物理吸着より移動速度は上がった(図2)。化学結合で固定化されたリガンドの方が細胞の牽引力が高まり移動速度が増加したと思われ、RGDの増加に関してはリガンドの密度または配向性に関わっていると推測される。

**2. 涙状マイクロパターンと細胞移動の方向性**

FNを、図3に示す涙状マイクロパターン上に形成させ、細胞移動の方向性を調べたところ、同じパターンでも物理的に吸着したFN(65%)より、SAM-FNの表面(82%)で高い方向性が実現された(図3)。さらに、高い方向性移動の細胞を高倍率で観察すると、パターン間を移動する際横に新たな膜状仮足を形成していることが分かった。細胞の膜状仮足形成は基板への牽引力やパターンの鋭さに比例していることが知られており[3]、このことから、SAM上の高い方向性は細胞の牽引力増加による膜状仮足形成の活性に起因しているものと思われる。

**結論：**リガンド分子の種類によりSAMの表面が上皮細胞の移動速度を物理吸着の表面より40~100%増加させる事が分かった。さらに、涙状マイクロパターンによる高い方向性制御は細胞の基板への牽引力に左右される高い移動性や膜状仮足形成が不可欠であることが分かった。

**参考文献：**[1] Kumar, G., et al. *Advanced Materials* 2007, 19, 1084-1090.; [2] Mahmud, G., et al. *Nature Physics* 2009, 5, 606-612.; Brock, A. et al. *Langmuir* 2003, 19, 1611-1617.

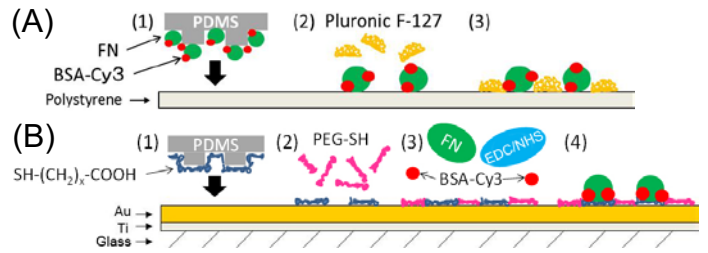


図1 Ads(A)や SAM(B)のマイクロパターンの作成法。細胞は FN 部位に接着出来るが、PEG や Pluronic 部位には接着出来ない。

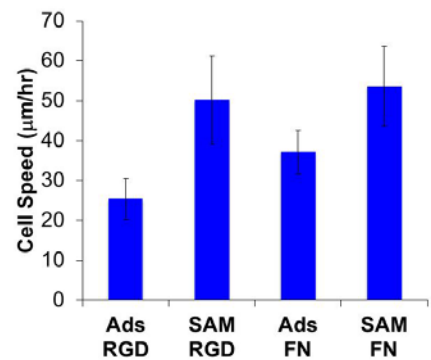


図2 RGDやFNリガンドの均一なAdsやSAM表面上の細胞移動速度。全体的に SAM 表面上の速度が Ads の速度を上回った。

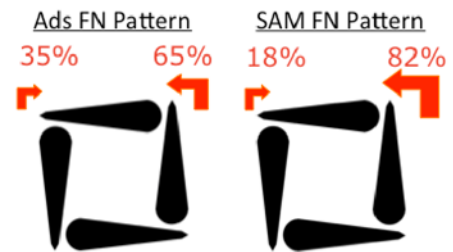


図3 FNの涙状マイクロパターンの方向性。特定の方向に接着部位間を細胞が移動した割合が表示されている。Adsに比べSAM表面の方が高い方向性が観察され、細胞の移動速度も高かった。

## 次世代タンパク質PEG化技術の開発

片町 仁哉<sup>1)</sup>、河崎 弘道<sup>1)</sup>、池田 豊<sup>1)</sup>、長崎 幸夫<sup>1), 2), 3)\*</sup>

1). 筑波大学大学院 数理物質科学研究科

2). 筑波大学大学院 人間総合科学研究科

3). 物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 (NIMS,MANA)

ポリエチレングリコール (PEG) は、人体に対して低毒性であることが知られており、また非免疫原性の高分子であるため生体適合性材料として薬剤開発をはじめ医療の分野で多く用いられている。近年、様々なタンパク質が治療薬として効果を発揮しているが、タンパク質治療薬の開発においてPEGによるタンパク質の修飾は非常に有用であり盛んに研究されている。タンパク質のPEG化には1) タンパク質のサイズを増加させ腎臓からの排泄を抑えられる、2) タンパク質の血中における分解耐性を上昇させる、3) タンパク質の生体内における抗原性を低下させるといった利点があり、すでに幾つものPEG化タンパク質が医薬品として開発されている。現在広く用いられているPEG化の技術は、活性エステル末端PEGをタンパク質のアミノ基と反応させ、アシル化によりPEG化タンパクを調製する方法である。このPEG化の技術では、アミノ基がアミド結合に変化するため、電荷バランスや水素結合性の誘起により、しばしばタンパク質活性の大幅な低下を招くことがある。タンパク質の活性を維持したまま効率的なPEG化を行うためには、様々なコンジュゲーションの化学が不可欠である。これまでにアルデヒド末端の還元アミノ化などによりアミノ基を残存させる研究が行われているが、反応条件の厳しさ、反応効率の悪さ及び副生成物の問題などから、医薬品としての効果が期待されながらも現状のPEG化技術では開発に至らなかったタンパク質も数多く存在する。そこで我々は中性付近の温和な条件で効率よく反応し、これまでとは全く異なる結合様式にてタンパク質のアミノ基をアルキル化によってPEG化する技術の開発を行った。すなわち図1に示すように混合するだけでタンパク質の1級アミンとのみ選択的に反応し、アミノ基を残存させることでPEG化した後も高いタンパク質の活性を維持させる事を目的とした。

末端にグルタルアルデヒド基を有する新規2-arm PEG (PEG-GALD, compound 1) の合成を試みた。合成経路を図2に示す。各化合物の解析は、<sup>1</sup>H-NMR、MALDI-TOF MS、GPCを用いて行った。合成したPEG-GALDとアミノ基の結合部

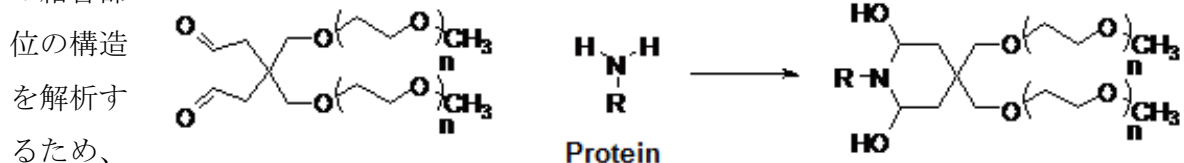
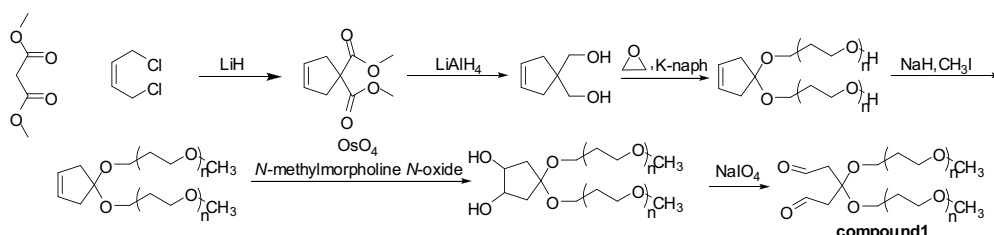


Figure 1. Novel PEGylation Chemistry for proteins modifications



GALDと2-アミノエタノールを反応させ、 $^1\text{H-NMR}$ 、MALDI-TOF MSによる解析により図1に示す反応が進行したことを確認した。

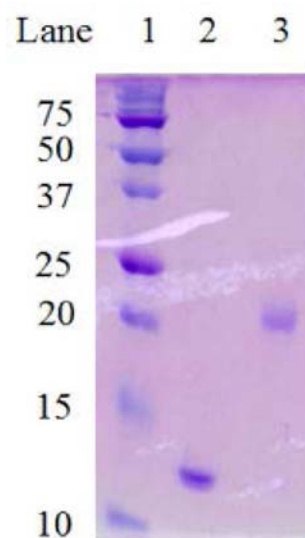


**Figure 2.** Synthetic route of a novel PEG derivative possessing glutaraldehyde moiety

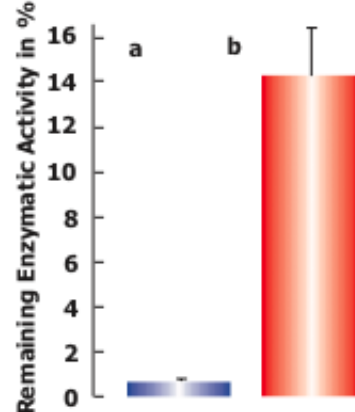
続いて、合成したPEGを用いてPEG化タンパク質を構築した。本実験では、モデルタンパク質としてリゾチームを用いた。合成したPEGとリゾチームを0.1Mリン酸緩衝液中(pH 7.0)で反応させた。反応は4°Cの中性水溶液において効率よく進んだ。HPLC、SDS-PAGE及びMALDI-TOF MSによる解析の結果、PEG化リゾチームが合成できたことを確認した。本手法によりPEG化したリゾチームの活性を現在広く用いられている活性エステル末端PEG (PEG-NHS)によりPEG化したリゾチームの活性と比較した。

PEG-GALD (10 kDa)とPEG-NHS (5 kDa)をそれぞれリゾチームに修飾し、1個のPEG基が導入されたリゾチームを精製した(図3)。単離した各PEG化リゾチームの活性を、溶菌法により測定した。測定結果を図4に示す。PEG-NHS (5 kDa)が1つ導入されたPEG化リゾチームの活性は大きく失われ、リゾチームに対して1%以下の活性しか示さなかったのに対し、PEG-GALD (10 kDa)が1つ導入されたPEG化リゾチームの活性は、リゾチームに対して14.4%の酵素残存活性を示すことが分かった。

タンパク質医薬品のPEG化は数十年来アミノ基のアシル化が圧倒的に多く使用されてきた。開発したPEG化技術は温和な条件で効率よく反応し、PEG化タンパク質の残存活性も大きいことから新しい世代のタンパク質PEG化技術であり、今後PEG化医薬品開発だけでなく表面処理等様々な分野での応用が期待できる。



**Figure 3.** SDS-PAGE analysis of unmodified lysozyme (Lane 2) and mono-PEG-lysozyme conjugates (PEG-GALD: 10kDa) (Lane 3) along with protein markers (Lane 1).



**Figure 4.** Enzymatic activities of PEGylated lysozyme. (a) mono-PEG-lysozyme conjugates (PEG-NHS: 5 kDa), (b) mono-PEG-lysozyme conjugates (PEG-GALD: 10 kDa).

# 新しいセンシング材料としての DNA 担持ナノ粒子

平峯 勇人<sup>1</sup>, 金山 直樹<sup>2</sup>, 藤田 雅弘<sup>2</sup>, 宝田 徹<sup>2</sup>, 前田 瑞夫<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>東京大学大学院新領域創成科学科, <sup>2</sup>理化学研究所前田バイオ工学研究室

## 【緒言】

我々の研究室では、二重鎖DNAを表層に密生させたナノ粒子（DNA担持ナノ粒子）のコロイド安定性がDNA自由末端の塩基対構造に明敏に応答する奇妙な現象を発見した<sup>1,2</sup>。図1に示すように、二重鎖DNAの自由末端にミスマッチ（一塩基変異）が存在すると、高塩濃度下でも粒子は安定に分散したままである。一方、完全に相補的なDNAを作用させ二重鎖を形成させると安定性が低下し、粒子は直ちに凝集（非架橋凝集）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。温度応答性ポリマーである poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)、金ナノ粒子やラテックス粒子と、核の材質を問わずこの界面現象は生じることが明らかになっている。

現在、DNA鎖とPNIPAAmとの共重合体の精密合成とその自己組織化を利用したDNA担持ナノ粒子の作製<sup>3</sup>、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<sup>4</sup>を目的として研究を強力に推進している。その結果、非架橋凝集の原因の一つは「ソフト界面での核酸分子の剛直性や熱的揺らぎの変化」にあると推察している。この考えに基づき、分子やイオン認識素子として働く機能性核酸（DNAアプタマー）などと組み合わせることによる一般的な化合物の検出法の開発も行っているのでその結果について報告する。

## 【DNA アプタマーを用いたターゲット分子の認識】

様々なタンパク質や低分子化合物を認識し結合する機能性核酸はアプタマーと呼ばれている。DNAアプタマーをナノ粒子に組み込めば、ターゲット分子の比色検査法への展開が期待できる。その一例として、我々は図2に示すスキームでATPを特異的に認識するDNAを利用したバイオセンサーを提案した<sup>5</sup>。DNA担持ナノ粒子上のプローブDNAは、アプタマーの一部と相補的な配列となるように設計してある。アプタマーとプローブDNA間の二重鎖形成がターゲット分子の認識・結合によって阻害されることが重要である。系中

に加える第三のDNA（補助DNA）の塩基配列をプローブDNAと完全相補鎖になるようにした場合（図2a）、アプタマーがターゲット分子を認識することによってプローブDNAと補助DNAからなる二重鎖がDNA担持ナノ粒子表層に形成され、その結果、DNA担持ナノ粒子の凝集が誘起される。一方、補助DNAの塩基配列をプローブDNAとアプタマーが作る二重鎖の突出部位と完全相補鎖になるようにした場合（図2b）、試料中にターゲット分子が存在しなければ、プローブDNA/補助DNA

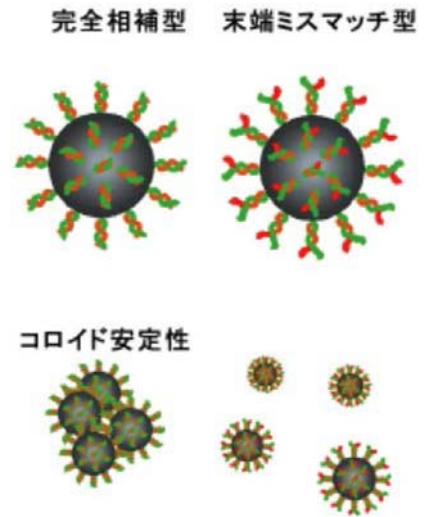


図1 DNA 担持ナノ粒子のコロイド分散安定性に及ぼす末端塩基対の効果。

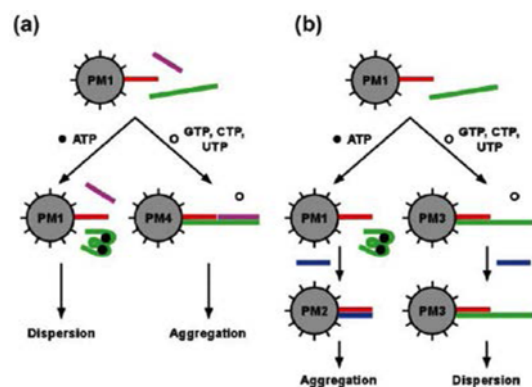


図2 DNA アプタマーを担持したナノ粒子を用いる分析システム。



／アプタマーの三成分からなるDNA二重鎖がDNA担持ナノ粒子に形成され凝集が誘発されることになる。

### 【アプタザイムと DNA 担持ナノ粒子を用いるバイオセンシング】

アプタザイムとは特定の分子などに応答して自己切断反応を引き起こす機能性核酸のことで、すなわちアロステリックリボザイムである。ターゲット分子が存在するとこれに適応するアプタザイムの自己切断が起こる。その結果生じた切断リボ核酸（RNA）と完全に相補的なDNAを固定化した金ナノ粒子を系中に存在させておけば、ターゲット分子存在下で非架橋凝集が生じるはずである（図 3）。本システムではごく少量の切断RNAが生成されればDNA担持ナノ粒子の凝集を誘起することが可能であり、検出感度が高いという特徴がある<sup>6</sup>。

#### 【金属イオン検出】

水銀(II)イオンは二重鎖DNA中のチミン-チミン(T-T) ミスマッチペア部に選択的に取り込まれ、水銀(II)イオンを介して塩基対を形成することが知られている。末端近傍にT-Tミスマッチペアを有するDNA二重鎖を担持したナノ粒子は高塩濃度下でも安定に分散するのに対し、水銀(II)イオン共存下では分散安定性が大きく低下する現象を見いだした<sup>7</sup>。他の二価カチオンでは粒子は分散したままであり、水銀(II)イオンに特異的な現象である。これはミスマッチ部位に水銀(II)イオンが取り込まれて塩基対形成したためであるのは明らかであり、二重鎖末端の揺らぎの抑制が非架橋凝集を誘引するとの考えと矛盾しない。

#### 【References】

- (1) Mori, T. et al., *Langmuir*, **20**, 313–319 (2004).
- (2) Maeda, M., *Polymer J.*, **38**, 1099 (2006).
- (3) Pan, P. et al., *Polymer*, **52**, 895 (2011).
- (4) Fujita, M. et al., *J. Colloid Interface Sci.*, **368**, 629 (2012).
- (5) Miyamoto, D. et al., *Chem. Commun.*, 4743–4745 (2007).
- (6) Ogawa et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 6517 (2008).
- (7) Kanayama, N. et al., *Chem. Commun.*, **47**, 2077 (2011).

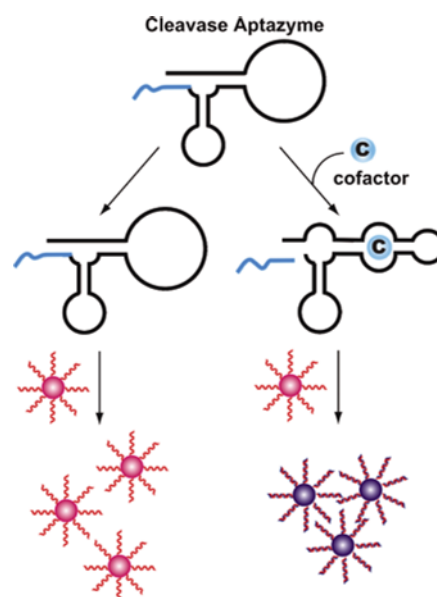


図 3 アプタザイムを用いるターゲット分子検出の原理.

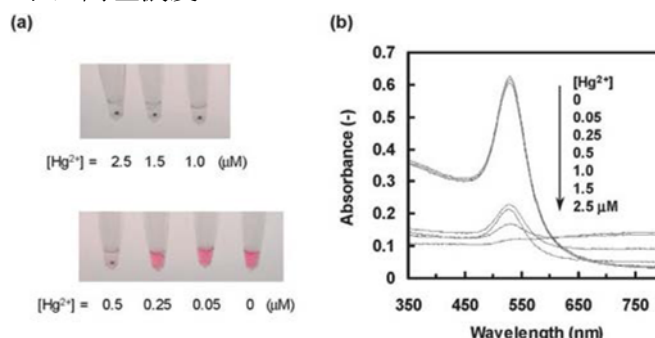


図4 DNA担持金ナノ粒子の非架橋凝集を利用した水銀イオンセンサー.

# 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

前田康弘、松元亮、宮原裕二

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

【はじめに】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。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 法の欠点の一つに、その短い検出距離制限が挙げられる。これには溶液／ゲート絶縁膜界面の電気二重層幅 (デバイ長、生理的塩濃度で 1nm 程度) が関係している。センシング層として抗体分子 (約 10nm) をゲート絶縁膜表面に固定化した場合、抗原は電気二重層外で抗体と結合することとなり、結果、抗原-抗体相互作用による表面電位変化は原理的に検出困難となる。我々のグループでは、上述のようなデバイ長由来の検出制限を克服し、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んでいる。

## 【研究経過】

<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

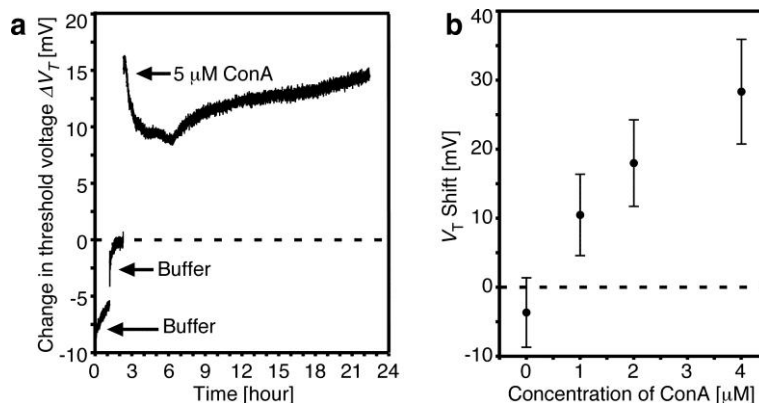


図 1 レクチン応答電界効果トランジスタによる Con A 検出。(a) 5  $\mu$ M Con A 注入時の  $V_T$  時間変化。(b) Con A 濃度に対する  $V_T$  シフト。

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。

#### <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  $V_T$  値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。

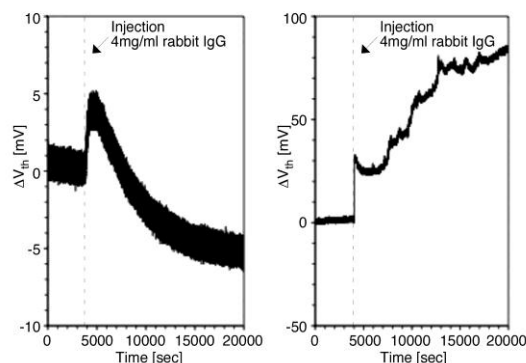


図 2 抗原応答電界効果トランジスタによる抗原検出。4mg/mL 抗原注入時の  $V_T$  時間変化。(a) 抗原応答ゲル修飾 FET の場合、(b) AAm ゲル修飾 FET の場合。

#### 【参考文献】

- [1] A. Matsumoto, N. Sato, T. Sakata, R. Yoshida, K. Kataoka, Y. Miyahara, *Adv. Mat.*, **21**, 4372 (2009).
- [2] A. Matsumoto, T. Endo, R. Yoshida, and Y. Miyahara, *Chem. Comm.*, **37**, 5609 (2009).
- [3] Y. Maeda, A. Matsumoto, Y. Miura, and Y. Miyahara, *Nanoscale Res Lett*, **7**, 108 (2012).

# ベタインポリマー固定化界面による細胞ローリングカラムの開発

○馬原 淳<sup>1</sup>・陳 顥<sup>1</sup>・アグデロ カルロス<sup>1</sup>・北野 博巳<sup>2</sup>・山岡 哲二<sup>1</sup>

1 国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部

2 富山大学大学院 理工学研究部

【緒言】細胞ローリング現象とは、細胞表面と固定化されたリガンドとの間で起こるダイナミックな現象の1つである。これまでに我々は、この現象を模倣した新たな細胞分離手法として細胞ローリングカラムを開発した。細胞ローリング速度は、細胞表面のマーカ分子と固定化されたリガンド分子との特異的な相互作用によって変化することから、ローリング速度によって識別・分離される細胞は表面マーカ分子の種類やその密度が異なる。これまでに分離細胞の表面マーカ密度とその分化能について検討し、細胞表面マーカの発現密度により細胞が分離されること、分離細胞の分化能はマーカ発現密度に依存して異なることを明らかとした<sup>1</sup>。しかし一方で固定化リガンドと細胞表面との非特異的な相互作用による細胞ローリングの阻害も認められ、細胞表面分子の特異的な相互作用の誘起は、分離精度の向上において重要な問題である。本研究では、ガラスキャピラリー界面に対してポリアクリル酸のグラフト鎖を導入した界面と、原子移動ラジカル重合法によりスルホプロピルベタイン界面を構築し、細胞ローリングにおける非特異的な細胞吸着挙動の違いを高速度カメラにより比較した。さらに、抗体固定化スルホプロピルベタイン界面において分離された脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) の分離挙動についても検討した。

【実験】内径 0.5mm、長さ 12cm のガラスキャピラリー内腔に対してシランカップリング剤により開始剤を導入し、3-sulfo-N, N-dimethyl-N-(2'-methacryloyloxyethyl)propanaminium inner salt (SPB) を ATRP により重合した。反応をトレースするために、X 線光電子分光法 (XPS) ならびに水接触角測定で評価した。次いで、ガラスキャピラリー内部での細胞ローリング挙動を観察するために、キャピラリーを顕微鏡下に設置し、高速度カメラにより細胞が流れる様子をリアルタイムでモニターした。

【結果と考察】ポリアクリル酸のグラフト鎖を導入した界面では、細胞を注入することで、多くの細胞が界面に吸着している様子が示された (Figure 1)。一方、スルホプロピルベタインを導入した界面では、細胞が吸着することなく流れる様子が観察された。タンパクの非特異吸着を抑制する界面を用いることで、動的に相互作用する界面において細胞表面とリガンドとの非特異吸着反応を抑制することができた。

スルホプロピルベタイン界面に抗体を固定化して、流れる速度と溶出プロファイルの評価した (Figure 2)。溶出時間の遅いフラクションにおいては、界面において細胞がローリングしている様子が観察され、ローリング速度が 1/10 程度まで異なる細胞フラクションを分離することができた。

【結語】 以上の結果より、ベタインポリマーで界面を修飾することで、細胞の非特異吸着を抑制し特異的な細胞ローリングを誘起し発現密度により細胞を分離することに成功した。

## 【参考文献】

1. Mahara A and Yamaoka T, Continuous separation of cells of high osteoblastic differentiation potential from mesenchymal stem cells on an antibody-immobilized column. *Biomaterials*, 2010, 31: 4231-4237.

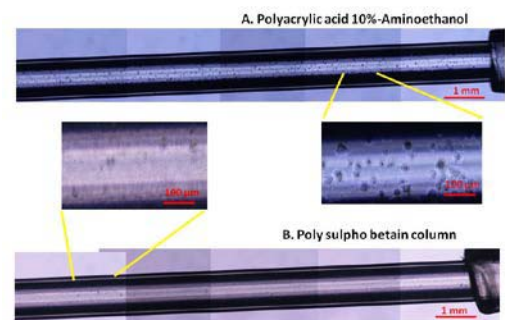


Figure 1 Photographs of the control columns immediately after cell rolling. A. polyacrylic acid-Amino-EtOH graft columns. B. Polysulphobetain modified column. Ellipses indicate the cells attached on the column.

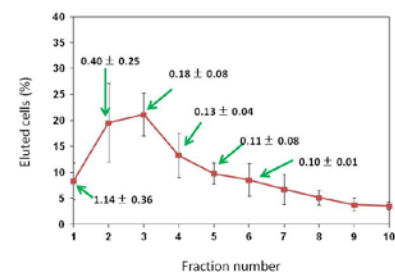


Figure 2 Elution profile and cell rolling speed (mm/sec) on the anti-CD90 antibody immobilized column (at distance D=8 cm, n=80). ADSC was separated on the anti-CD90 antibody modified column



# ヤヌス粒子の界面吸着現象を利用した分散系の安定化

藤井 秀司<sup>1</sup>、横山 雄一<sup>1</sup>、中村 吉伸<sup>1</sup>、遊佐 真一<sup>2</sup>、伊東 聖訓<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪工大・<sup>2</sup>兵庫県立大

## 【緒言】

双面を有する異方性微粒子はJanus粒子と呼ばれ、電子ペーパー表示材料、乳化剤として利用可能であることから、近年注目を集めている<sup>1,2)</sup>。しかし、これまでに使用されているJanus粒子は、ナノメートル～サブミクロンメートルサイズのものが多く、光学顕微鏡を用いた湿潤状態での観察が困難であった。本研究では、光学顕微鏡観察が容易であるミクロンメートルサイズのシリカ粒子を金で真空蒸着することで、半球が金で覆われた金-シリカJanus粒子の合成を行った。さらに合成したJanus粒子を乳化剤として用いてピッカリングエマルションを作製し、湿潤状態でのエマルションの構造評価、および安定性について検討を行った。

## 【実験方法】

ガラス基板上に作製した2次元シリカコロイド結晶に対し、真空蒸着装置を用いて100 nmの厚みの金を真空蒸着した。次いで、イオン交換水中で超音波を照射し、ガラス基板からJanus粒子を剥離した。次に、2 mL サンプル管に金-シリカ Janus 粒子の水分散体(1 wt%)と*n*-ドデカンを用いた系でも同様の操作を行い、安定性を比較するため両系を1週間静置した。さらに、Janus粒子およびシリカ粒子の油水界面における吸着エネルギーの比較を行った。

## 【結果と考察】

金蒸着後、サンプルの光学顕微鏡観察を行ったところ、半球が黒色(金面)、もう半球が無色(シリカ面)の異方性を有するJanus粒子の生成を確認した(Fig. 1)。乳化剤としてJanus粒子およびシリカ粒子を用いてエマルションを作製したところ、Janus粒子の系ではエマルションが1週間以上安定に

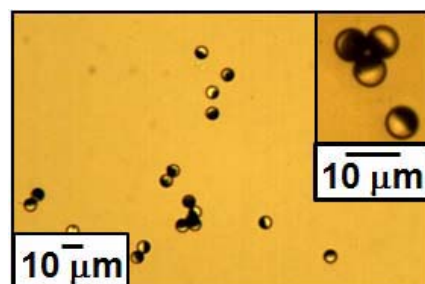


Fig. 1 Optical microscopy images of Au-silica Janus particles dispersed in aqueous medium.

存在したが(Fig. 2)、シリカ粒子の系では、2時間後に完全に解乳化した。これは、金-シリカ Janus 粒子の方がシリカ粒子よりも油水界面に強く吸着しているためであると考えられる。Janus粒子およびシリカ粒子の油水界面での吸着エネルギーの比較を行った結果、Janus粒子の方がシリカ粒子よりも約2000倍高いことが明らかになった。

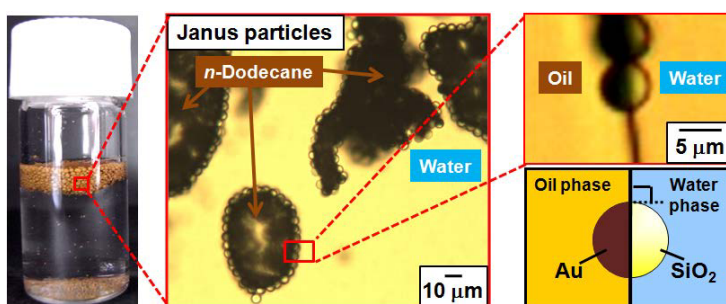


Fig. 2 'Pickering-type' emulsion stabilized with Au-silica Janus particles.

## 【参考文献】

- 1) N. K. Sheridan, M. A. Berkovitz, Proc. SID, 1977, 18, 289.
- 2) A. Walth, A. H. E. Müller, Soft Matter, 2008, 4, 663.

# Head-to-Head および Head-to-Tail 型連結様式を有する環状ステレオブロックポリ乳酸の合成と特性評価

○菅井直人・山本拓矢・手塚育志

東京工業大学大学院理工学研究科 有機・高分子物質専攻

## 【諸言】

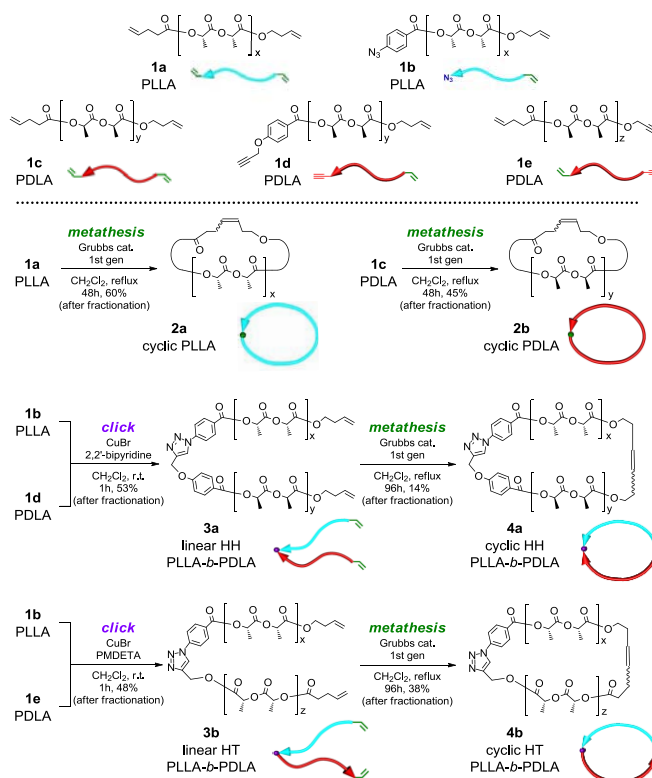
生体高分子において、「かたち」と「主鎖の方向」は機能性の発現に重要な役割を果たしている。例えば、環状 DNA は直鎖状 DNA と比べて RNA との結合が弱まることから<sup>[1]</sup>、この現象を利用してモルフォリノに環状構造を導入することにより、相補的な RNA との結合を阻害することで遺伝子発現を制御した事例が報告されている<sup>[2]</sup>。これは、高分子の「かたち」を利用した機能性の制御である。また、「主鎖の方向性」が重要な役割を果たしている例としてとしては、DNA の逆平行二重らせんが挙げられる。このように、生体高分子に見られる「かたち」や「主鎖の方向」による相互作用の制御を模倣することができれば、スマートマテリアルへの応用が期待できる。

そこで本研究では、光学異性体の主鎖間で特異的な相互作用を有するポリ乳酸(PLA)を用い、高分子の「かたち」および「主鎖の方向」が相互作用に与える影響を調査した。すなわち、ポリ-L-乳酸(PLLA)およびポリ-D-乳酸(PDLA)間でステレオコンプレックス(sc)結晶を形成することから、環状ホモ PLLA(**2a**)、PDLA(**2b**)、および head-to-head(HH)型(**4a**)、head-to-tail(HT)型(**4b**)の連結様式を持つ環状ステレオブロック PLA (sbPLA)を合成し、DSC を用いた融点測定により、環と直鎖といった主鎖の「かたち」および HH と HT といった「主鎖の方向」が PLAsc の熱的性質に与える影響を検討した<sup>[3]</sup>。

## 【実験・結果】

エチニル基またはエチニル基を有するアルコールを開始剤としたラクチドの開環重合後、得られたプレポリマーのアルコール末端にエステル化を用いて各種官能基を導入し、テレケリクスプレポリマー **1a-e** を得た(Scheme 1)。続いて、両末端にエチニル基を有する PLLA(**1a**)および PDLA(**1c**)の開環メタセシス反応を Grubbs catalyst 1st generation 存在下、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中希釈条件下で行った<sup>[4]</sup>。生成物の SEC、<sup>1</sup>H NMR および MALDI-TOF MS 測定結果から、数平均分子量 3000 程度の環状ホモ PLLA (**2a**)および PDLA (**2b**)の合成が確認された。また、末端にエチニル基とアジ基を有する PLLA(**1b**)およびエチニル基とエチニル基を有する PDLA(**1d**, **1e**)を用いたクリックケミストリーによる連結反応を行い、プレポリマーの組み合わせを変えること

Scheme 1. Synthetic Scheme of Cyclic homo-PLAs and Cyclic Stereoblock PLAs with the HH and HT Linking Orientations of the Enantiomeric Segments





でHH型(**3a**)およびHT型(**3b**)の連結様式を持つ直鎖状sbPLAを合成した。続いて、**3a**および**3b**の環化反応をホモPLAの合成と同様に行い、数平均分子量6000程度のHHおよびHT型の環状sbPLA**4a**および**4b**を合成した。

PLAのトポロジーおよび連結様式が、熱的性質に与える影響を調べるために各ポリマーおよびブレンドのDSC測定を行った。ホモPLLAの融点は、環化前後で4°C減少した(**1a**: 151°C→**2a**:147°C, Figures 1a and 1b)。直鎖状PLLA/PDLA(**1a/1c**)ブレンドの融点は、従来知られているようにscの形成により60°C以上上昇した(**1a/1c**: 214°C, Figure 1c)。一方、環状PLLA/PDLA(**2a/2b**)ブレンドの融点は180°Cであり(Figure 1d)、直鎖状PLAブレンド(**1a/1c**)から得られるSCより約30°Cも低い値を示した。さらに、直鎖状PLLA/環状PDLA(**1a/2b**)ブレンドの融点は187°Cを示し(Figure 1e)、直鎖状同士から得られるscよりも低く、環状同士から得られるscよりも高い値を示した。ここから、環状構造の導入に伴い、高分子主鎖間の相互作用が阻害された結果、生成するscの融点が低下したことが示唆された。

続いてsbPLAのDSC測定を行った。HH型のsbPLAでは、環化前後での融点が15°C上昇したが(**2a**: 206°C→**3a**: 211°C)、HT型では5°C低下した(**2a**: 213°C→**3a**: 208°C)。これは、HH型の環状sbPLA**3a**ではPLLA鎖とPDLA鎖が並行に配列したエネルギー的に最安定であるparallel scが形成される一方、HT型の環状sbPLA**3b**では環状構造の導入によりPLLA鎖とPDLA鎖が逆並行とならざるを得ず、antiparallelなどのエネルギー的に不利なscが形成されたことを示唆しており、主鎖方向の制御に伴う高分子間の相互作用の制御が期待される。

#### 【文献】

- [1] Tang, X.; Su, M.; Yu, L.; Lv, C.; Wang, J.; Li, Z. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 3848-3855.
- [2] Yamazoe, S.; Shestopalov, I. A.; Provost, E.; Leach, S. D.; Chen, J.K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, ASAP.
- [3] Sugai, N.; Yamamoto, T.; Tezuka, Y. *ACS Macro Lett.* **2012**, *1*, in press.
- [4] Tezuka, Y.; Komiyama, R. *Macromolecules* **2002**, *35*, 8667-8669.

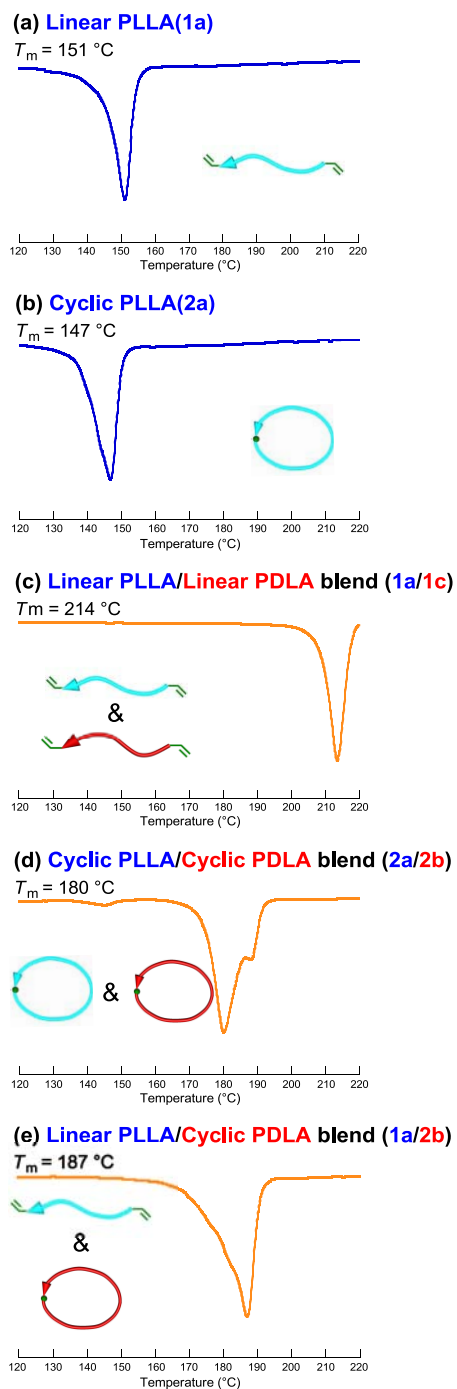


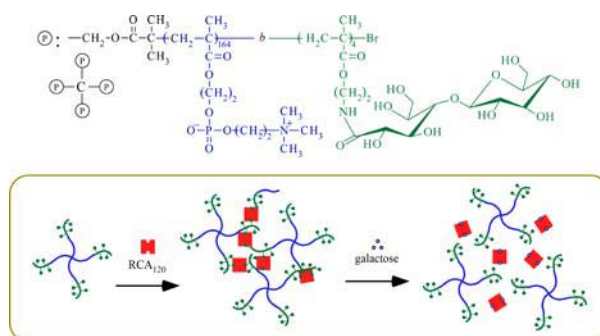
Figure 1. DSC thermograms of individual homopolymers (**1a** and **2a**) and blends (**1a/1c**, **2a/2b** and **1a/2b**) during 1st heating

## 糖を側鎖結合した星形ポリマーとレクチンの相互作用

遊佐真一<sup>1</sup>、伊東聖訓<sup>1</sup>、石原一彦<sup>2</sup>、金田勇<sup>3</sup>、Françoise M. Winnik<sup>4</sup>

<sup>1</sup>兵庫県大院工、<sup>2</sup>東大院工、<sup>3</sup>酪農大院酪農、<sup>4</sup>モントリオール大

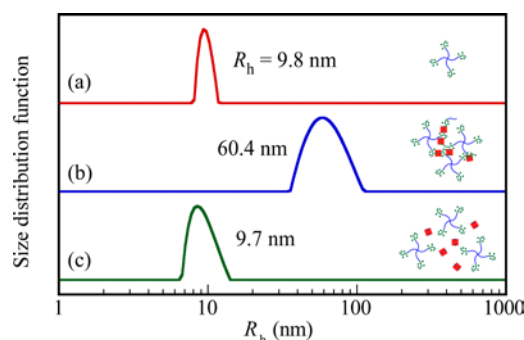
レクチンと呼ばれるタンパク質は糖を認識して特異的に結合することが知られている。本研究では、水溶性で生体適合性を示すホスホリルコリン基を側鎖結合したブロック（PMPC）と糖を側鎖結合したブロック（PMLA）からなる星型ジブロック共重合体（4-P(MPC-MLA)）を原子移動ラジカル重合（ATRP）法で合成することを目的とする。この星型ジブロック共重合体の水溶液にレクチンの一種であるRCA<sub>120</sub>を添加するとPMLA側鎖の糖とRCA<sub>120</sub>間の相互作用で会合体を形成すると考えられる（Figure 1）。さらに、この溶液に単糖を添加するとブロック共重合体とRCA<sub>120</sub>の結合が単糖とRCA<sub>120</sub>の結合に置き換わるため会合体が解離すると期待される。



**Figure 1.** Chemical structure for star-shaped diblock copolymer and schematic illustration of association behavior of polymer-RCA<sub>120</sub> complexes.

4-P(MPC-MLA)中に含まれる糖の数とRCA<sub>120</sub>の数の比が250:1となるようにPBSバッファール中で混合した。また、ポリマー/RCA<sub>120</sub>混合溶液にポリマー中の糖の5倍のモル比の濃度のガラクトースを添加した。これらのPBSバッファール溶液の流体力学的半径 ( $R_h$ ) を動的光散乱（DLS）測定により求めた。

4-P(MPC-MLA)の $R_h$ の値は9.8 nmだった。RCA<sub>120</sub>と混合した時の $R_h$ は60.4 nmと増加したため会合体の形成が確認できた。さらに、会合体の水溶液にガラクトース水溶液を添加したときの $R_h$ は9.7 nmとなり、4-P(MPC-MLA)の $R_h$ と近い値だったので会合体の解離が確認できた。



**Figure 2.** Hydrodynamic radius ( $R_h$ ) for (a) 4-P(MPC-MLA), (b) 4-P(MPC-MLA)/RCA<sub>120</sub> complexes, and (c) 4-P(MPC-MLA)/RCA<sub>120</sub> complexes in the presence of galactose in PBS buffer solutions.

# ポリマー溶解界面の大規模シミュレーション解析

森田裕史

(独) 産業技術総合研究所 ナノシステム研究部門

水やアルコールに接したポリメチルメタクリレート (PMMA) 薄膜における界面の構造について、九州大学の田中敬二教授らによって精力的に研究されている。[1] そして、その膨潤界面等のソフト界面の解析を目的に、粗視化シミュレーションを用いて解析を行ってきた。その解析を行う際の 1 つの問題点として、界面の面内の揺らぎ等の問題が考えられ、この問題は、直接シミュレーションサイズの依存性とのかかわりがある。そこで、シミュレーション解析を行う際のこの問題について検証を行うためには、シミュレーション箱サイズ依存性について検討を行い、各々の規模 (サイズ) における信憑性を確かめる必要がある。そこで、ソフト界面のシミュレーション研究の一環として、散逸粒子動力学法における大規模シミュレーションについて、検討を行った。

通常、深さ (z) 方向については十分に大きくなるようにしていたが、今回は、それ以外の x, y 方向のサイズを大きく変える。そこで、最小サイズを 10rc とし、そこから、30rc、50rc、80rc と変えて、シミュレーションを行った。(なお、rc は、シミュレーションの長さの単位) 深さ方向は 40rc あるが、この計算の際には、10rc の場合には、溶媒+ポリマーのすべてを 12000 粒子で表しているのに対して、80rc の場合は単純にその 8x8 倍、つまり 768000 粒子の

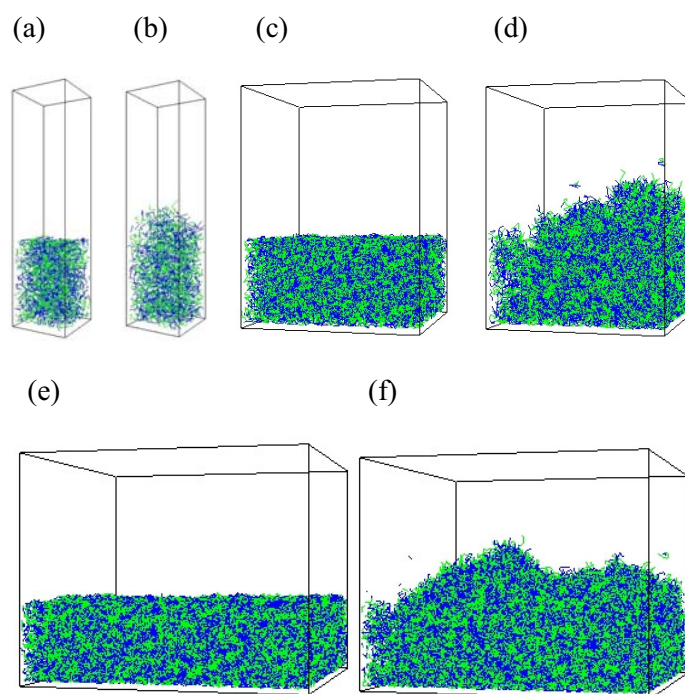


Fig.1 溶解プロセスシミュレーションの時間  $1000\tau$  の際のスナップショット。x, y 方向の箱のサイズは、(a)(b)は 10rc、(c)(d)は 30rc、(e)(f)は 50 rc の結果を示す。なお、rc は、シミュレーションの長さの単位を表す。

計算となる。このような大規模シミュレーションを行うためには、single cpu 用プログラムを用いた計算だと数か月経っても計算が終わることがない。そこで、本研究には、北海道大学情報基盤センターから提供された Intel 製 cpu 用並列版 COGNAC を用いて、シミュレーションを行った。80rc のサイズの場合、8 コアを持ちいた並列化の場合、約 2 週間程度で、 $1000\tau$  時間分の計算を行うことができ、数か月の計算を 5 倍程度高速化できていることがわかった。

今回の計算であるが、ポリマーにおいて、溶ける粒子と溶けない粒子をランダムに重合させたポリマーを用いた。この場合、マイクロには溶ける成分が存在することから、部分的には溶解しやすい状況にあるが、溶けない成分が多く含まれた場合、むしろこの成分の凝集を誘起する。よって、凝集しやすい溶けない成分を溶けやすい成分が液体との界面に濃縮する双方の効果によって、界面に揺らぎが生成する。このことから、ソフトな揺らぎのある界面を作り出すことができると予想される。シミュレーションは、システムサイズ 10rc を用いて、条件の検証をまず行った。その結果、

Fig.1 に結果のスナップショットを示す。結果として、システムサイズ如何に関わらず、揺らいでいる界面が生成された。小さいシステムサイズの場合には、界面の揺らぎが 1 周期であるのに対して、50rc 以上の場合には、2 周期程度の揺らぎが見え始めている。このことから、揺らぎの周期がシステムサイズに依存することが示されているが、十分な大きさをとれば、問題がない可能性も並べて示された。

[1] K. Tanaka et al., *Langmuir*, **24**, 296, (2008)

# 配向化させた「弦状」エレクトロスピン・コラーゲンファイバー足場での効率的な三次元筋管形成

峯口 竜・田村健一・武田直也

早稲田大学大学院 先進理工学研究科 生命医科学専攻

## <緒言>

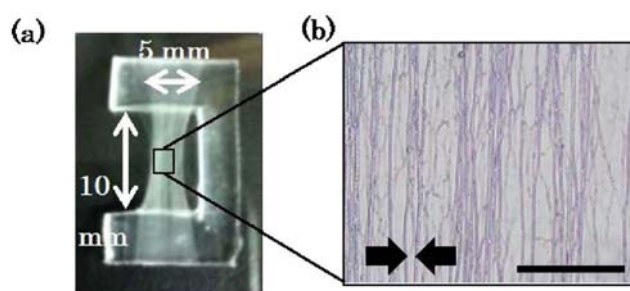
骨格筋組織は、多数の筋管が高密度に、同一方向に配向した立体的な構造となっている。この構造は多数の筋芽細胞が一行に連なり筋管を形成することで作られているため、骨格筋の *in vitro* 再生組織作成のためには三次元的な筋芽細胞の配向制御、ひいては筋管の配向制御が重要となってくる。しかしながら、従来行われていた二次元のマイクロパターニング基板や足場材料自体が高密度に集積して足場内部に細胞が入り込みにくい三次元培養足場では、上記のような三次元組織を作成するのは容易ではない。

そこで本研究では上述のような三次元培養足場として、筋膜に多く含まれる I 型コラーゲンを材料とした無数の配向したコラーゲンファイバーを、エレクトロスピン法を用いて作製した。ファイバーの機械的強度と耐水溶性を改善するために、コラーゲンとグルタルアルデヒドを反応させながら紡糸をする新たな架橋方法を開発し、さらに同一方向に配向させつつ適度な間隔を保って中空に張られた「弦状」の細胞培養足場を新規に構築した。足場上への細胞の維持・配向に適するよう、コラーゲン濃度、グルタルアルデヒドの混合比、溶液の噴出時間、噴出距離、印加電圧などの諸条件を最適化して、ファイバー径はおよそ  $2\ \mu\text{m}$  に制御した。

この弦状の培養場を構成するファイバーに沿ってマウス筋芽細胞 C2C12 ならびにラット初代筋芽細胞を培養・配向させ、細胞融合・多核化ならびに筋管形成を促進し、さらにファイバー間の空隙にも細胞を入り込ませることで、高密度に筋管が含まれた三次元組織の構築を検討した。

## <実験方法>

エレクトロスピン法により、I型コラーゲンをを用いた配向化マイクロファイバーを作製した。I型コラーゲンを 10% w/v で 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) 中に溶かし、さらにグルタルアルデヒドを混合して室温で架橋反応を進めながら 2 cm の間隙のある二枚の電極



**Figure 1.** (a) 配向化させて、コの字型治具の中空に「弦状」に固定した I 型コラーゲンの三次元培養足場。(b) 配向化したコラーゲンファイバーの位相差顕微鏡像。図中上下方向への配向度は 68%。矢印は平均的なファイバー間隔 ( $6\ \mu\text{m}$ ) を示す。Scale bar  $200\ \mu\text{m}$ 。



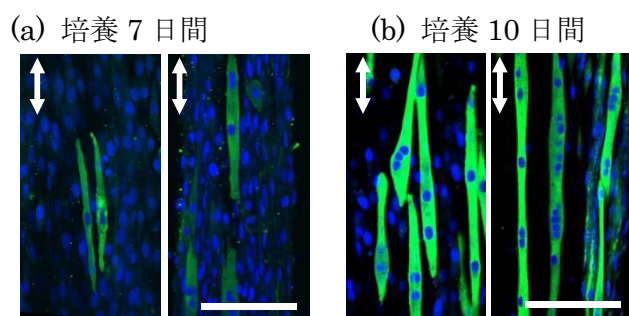
をターゲットとして短時間噴出させ、エレクトロスピンング法で直径がマイクロメートルスケールのファイバーを作製した。二枚の電極間に配向しながら紡糸されたコラーゲンファイバーは、polydimethylsiloxane (PDMS) 製のコの字型の治具によって回収して中空に三次元に固定した (Figure 1)。未反応のグルタルアルデヒドは、細胞培養前に細胞培養液に浸しながら 37 °C、5% CO<sub>2</sub> の環境下で 24 時間プレインキュベーションを行い不活性化した。

三次元筋管組織構築には、マウス筋芽細胞由来の株化細胞 C2C12 とラット初代筋芽細胞を用いた。D-MEM + 10% FBS + 1% Ab で培養し、C2C12 については培養足場上で 100% コンフルエントになったと判断した時点で D-MEM + 2% HS + 1% Ab の分化誘導培地に置換を行った。筋管組織構築の確認は、分化した筋に特異的なマーカーであるミオシン重鎖 (MHC) に対する免疫蛍光染色で行い、形成された筋管の数、大きさ、タイミングなどについても定量的に評価を行った。

### <結果・考察>

グルタルアルデヒド高濃度条件ではファイバーが形成されず低濃度条件では水溶性となる一方で、I型コラーゲン：グルタルアルデヒド = 1 : 0.2 (w/w) において、水中でも安定に存在するコラーゲンファイバーが作製できた。グルタルアルデヒドの架橋反応と同時に紡糸した場合は個々のファイバーが独立して存在し得たのに対し、比較として紡糸後にグルタルアルデヒド蒸気中で架橋したファイバーは、各ファイバーの一部が溶融したような形状を示した。これより、紡糸と架橋を同時に行なうファイバー作製法の有用性が強く示唆された。二枚の電極をターゲットとして短時間噴出させた紡糸により、68%が一方向に配向したコラーゲンファイバーが得られた (Figure 1b)。

このファイバーを中空固定した弦状培養足場に細胞を播種したところ、C2C12 細胞とラット初代筋芽細胞のいずれにおいても培養足場への接着・配向が観察された。培養液中での足場材料のプレインキュベーションにより、細胞毒性は見られなかった。さらに、培養 7 日後以降は、ミオシン重鎖抗体染色に対して陽性を示す多核化した筋管組織が形成された。ほぼ全ての筋管がコラーゲンファイバーの配向方向に沿って伸びており、弦状の新規培養足場によって筋管の配向を制御できたことが強く示唆された (Figure 2)。



**Figure 2.** C2C12 細胞を配向化「弦状」コラーゲンファイバー足場で培養し構築した三次元筋管組織の蛍光顕微鏡像。核：青、MHC 陽性筋管組織：緑。図中上下方向 (矢印方向) に配向したコラーゲンファイバーに沿って、多核化した筋管組織が観察され、その数は経時的に増加した。(a) 培養 7 日間、(b) 培養 10 日間。Scale bar 100 μm。

# 高密度グラフト膜を表面に形成させた金ナノ粒子によるタンパク質検出

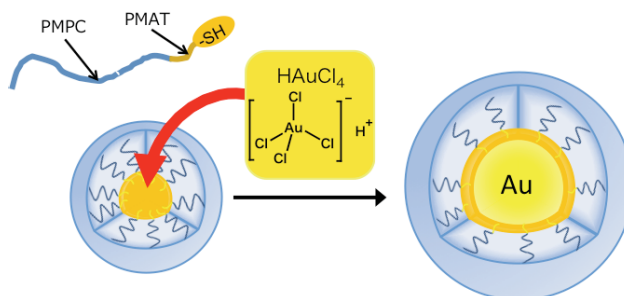
折坂雅樹<sup>1</sup>・岩崎泰彦<sup>1,2</sup>・川崎英也<sup>1,2</sup>・遊佐真一<sup>3</sup>

関西大院工<sup>1</sup>・関西大化生工<sup>2</sup>・兵庫県立大院工<sup>3</sup>

**【緒言】** 本研究では還元性と生体適合性を併せ持つブロックコポリマーを新たに合成し、このポリマーを利用して、分散性に優れた金ナノ粒子の調製した。粒径が数nm~数十nmのナノ粒子は量子サイズ効果によってバルク体では持ち得なかった特徴を示すようになる。特に、金や銀ナノ粒子は表面プラズモン共鳴(SPR)による発色があり、それぞれ赤、黄を示す。これらの

発色はガラスの着色はもとより、最近では組織の染色、妊娠判定キットや糖尿病検査キットなどのプローブとしても使用されている。一方、金属ナノ粒子はそれ単体で凝集しやすく、保護剤を添加し分散安定性を向上させる必要がある。また、金属ナノ粒子の調製方法としては一般的に強力な還元剤を用いるが、近年では環境に配慮して生体分子を還元剤に用いた研究も盛んに行われている<sup>1,2</sup>。本研究では、還元剤と保護剤の機能を兼ね備えた新たな両親媒性ブロックコポリマーを合成し、ポリマー以外の還元剤を使用しない金ナノ粒子の調製を試みた(Fig.1)。合成したブロックコポリマーは還元剤として機能する疎水性セグメントと両性イオンを持つ親水性セグメントからなり、水中で会合体を形成する。この会合体の中心部で金ナノ粒子の前駆体が還元され、その結果、親水性高分子グラフト膜を纏った金ナノ粒子が得られた。この金ナノ粒子の物性を評価するとともに、金ナノ粒子を用いた溶存タンパク質の検出も試みたので報告する。

**【実験】** 所定量の4-シアノ吉草酸ジチオベンゾエート、4-4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)、MPCを純水に溶かし、アルゴンで脱気した後75°Cで3時間加熱し、可逆的付加開裂型連鎖移動(RAFT)重合により2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ホモポリマー(PMPC)を合成した。これをマクロ連鎖移動剤とし、*N*-メタクリロイル-(*L*)-チロシンメチルエステル(MAT)をエタノール中でRAFT重合(70°C, 15時間)し、ブロックコポリマー(PMPC-*b*-PMAT)を得た。次いでPMPC-*b*-PMATをメタノールに溶解し、エタノールアミンを反応させることにより、末端にチオール基を持つブロックコポリマー(PMPC-*b*-PMAT-SH, Fig.2)を得た。PMPC-*b*-PMAT-SH水溶液に塩化金(III)酸(四水和物)水溶液を加え60°Cで2分間攪拌した後NaOH水溶液を加え、さらに攪拌した。調製した金ナノ粒子の形態観察を透過



**Fig.1** Schematic representation of gold nanoparticle prepared in this study.

型電子顕微鏡(TEM)により行った。また、動的光散乱(DLS)測定により金ナノ粒子のサイズを測定するとともに、粒子の分散性と媒体のイオン強度の関係も調べた。

タンパク質検出ではグラフト膜にローダミン 123 含浸させた金ナノ粒子を調製し、これを所定濃度のタンパク質溶液に添加した。

**【結果・考察】** 合成した PMPC-*b*-PMAT の分子量は  $M_n=1.60 \times 10^4$  (g/mol) ( $M_w/M_n=1.08$ )であり、 $^1\text{H}$  NMR より MPC と MAT の組成比は 9:1(モル分率)だった。エタノールアミン処理前後のブロックコポリマーの分子量に変化はなかった。調製した金ナノ粒子は紫外・可視分光光度計測定より SPR 由来の吸収ピークが 523 nm に検出され、DLS 測定よりその粒径は 60 nm 程度であった。金ナノ粒子の TEM 画像を Fig.3 に示す。この写真からも数十 nm の直径を持つ金ナノ粒子の形成が確認できた。また、ポリマーブラシ膜で被覆された金ナノ粒子は、生理的条件下に比べおよそ 100 倍のイオン強度の水溶液中においても良好な分散性を示した。

ポリマーブラシ膜にローダミン 123 を含浸させた金ナノ粒子では励起光を照射してもローダミン 123 由来の蛍光が確認できなかったのに対し (Fig.4(a)), タンパク質を接触させると、ローダミン 123 由来の蛍光が認められた (Fig.4(b))。

#### 【参考文献】

- [1] J. Xie et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 888-889.
- [2] M. A. H. Muhammed et al., *Chem. Eur. J.*, **2009**, 15, 10110-10120.

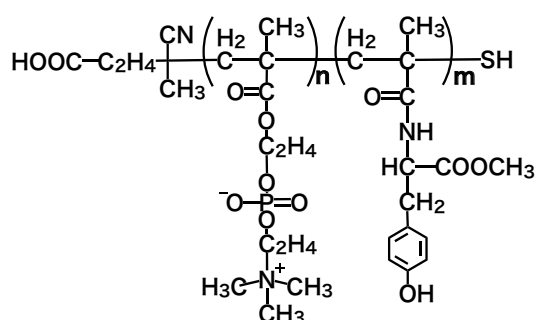


Fig.2 Structure of PMPC-*b*-PMAT-SH.

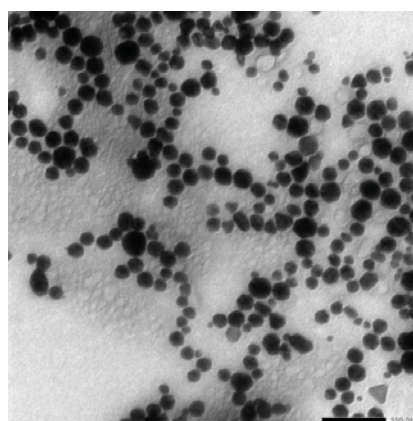


Fig.3 TEM micrograph of gold nanoparticle (bar=100nm).

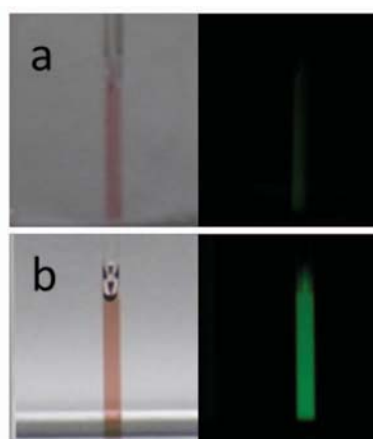


Fig.4 Optical and fluorescence images of aqueous solution containing fluorescent-immobilized gold nanoparticles before (a) and after (b) in contact with albumin.

# インフルエンザウイルスの

## H5 型ヘマグルチニンに結合性を有するペプチドの探索

○郡 遥香・上野 慎士・金子 里枝子・川添 大吾・松原 輝彦・佐藤 智典

(慶應義塾大学理工学部)

1. はじめに インフルエンザは、毎年流行し多くの犠牲者が出ており、2009 年には世界的大流行(パンデミック)が発生し、社会問題となった。現在主にヒトの間で流行しているウイルスは、弱毒型である H1 および H3 型である。しかし、近年では強毒型である H5 型ウイルスのヒトへ感染と死亡例が複数報告されており、新たな流行に備えて国レベルでの対応策が練られている。

大流行の原因となる A 型ウイルスの表面には、抗原なり得る 2 つの膜タンパク質、マグルチニン (HA) およびノイラミニダーゼ (NA) が存在する。予防ワクチンではこれらのタンパク質に対する組み合わせを考慮して準備されるが、A 型ウイルスはその変異が激しく、多くの亜型が存在する事から、流行を見越したワクチンの準備が必要である。迅速かつ性格にウイルスの亜型を同定する技術は、臨床現場において予防や治療に有用になると考えられる。A 型ウイルスの感染は、HA が宿主細胞膜上のシアル酸含有糖鎖に結合することで開始される。そのため糖鎖結合部位は、抗原部位とは異なり、変異が少ない。我々は以前に、H1 および H3 型 HA に特異的に結合し、ウイルス感染を阻害する 15 残基の D1 ペプチド(GLAMAPSVGHVRQHG)をファージディスプレイ法によって得た(図 1)。本発表では、高病原性 H5 型を標的とした D1 ペプチドの分子進化を行い、配列の最適化を試みた。

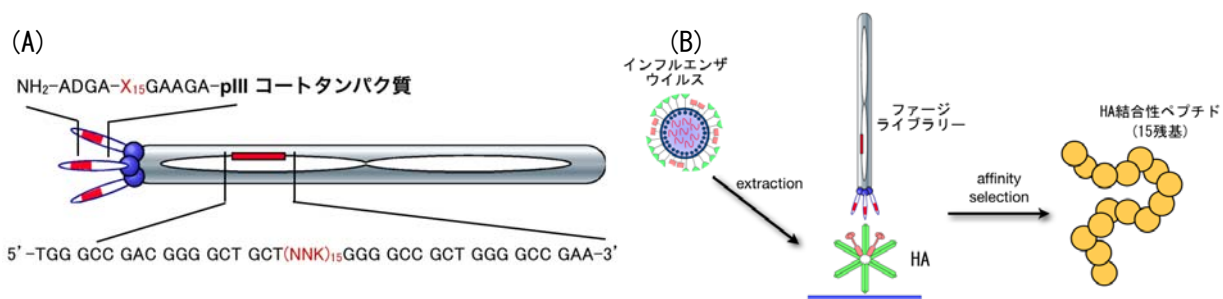


図 1 (A) ファージディスプレイ法 (B) ファージディスプレイ法による HA 結合性ペプチドの同定

2. D1 の HA 結合活性評価 ファージ ELISA を行い、D1 の HA 結合活性を評価した(図 2)。WT ファージと比較から、D1 ファージは H1、H3 および H5 型 HA に対して同程度結合することがわかった。また、D1 ファージは濃度依存的に 3 種類の HA に結合した。D1 がセレクション時に用いた H1 および H3 型だけではなく高病原性 H5 型の検出にも応用できる可能性が示された。

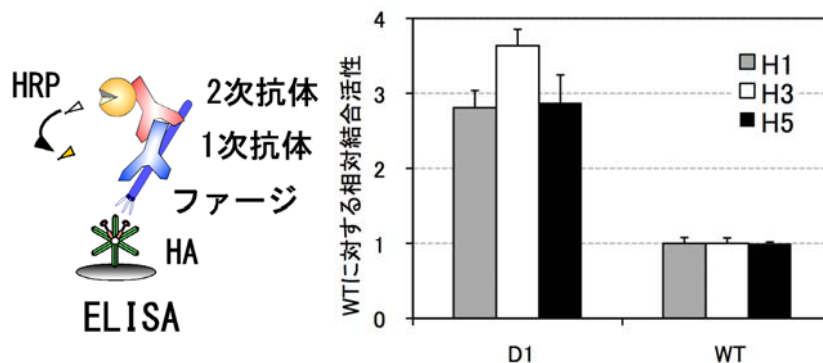


図 2 D1 の HA 結合活性(ファージ ELISA)



3. アラニンスキャンニング D1 のアミノ酸残基を 1 つずつアラニンに置換したビオチン化ペプチド 13 個を合成し、ABC 法を用いて H1 および H3 型 HA に対する結合活性を評価した(アラニンスキャンニング)(図 3)。D1 の N 末端側に近い Gly1、Leu2、Met4 および Arg12 をアラニンに置換したペプチドは、D1 と比べて結合活性が大きく減少した。このことから、これらのアミノ酸が D1 の結合活性に重要な結合モチーフであることが示された。

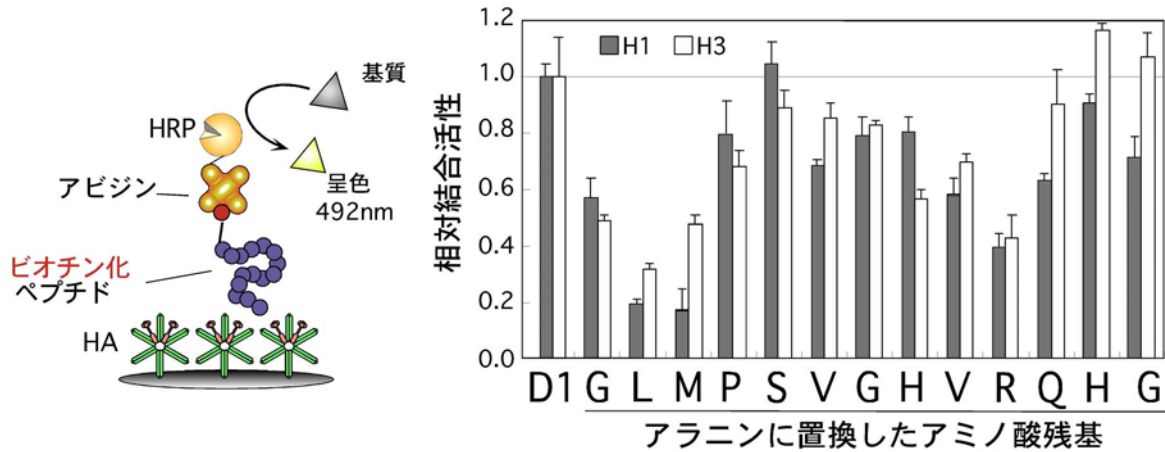


図 3 アラニンスキャンニングによる結合モチーフの同定

4. サブライブラリーを用いたセレクション アラニンスキャンニングの結果を元に、D1 の結合モチーフを固定した D1 モチーフ固定ライブラリー(多様性:  $2.7 \times 10^7$  pfu)とランダムに変異を導入した D1 ランダムライブラリー(多様性:  $3.6 \times 10^7$  pfu)を用いて、H1 および H3 型に対して親和性選択を行った。溶出には、シアル酸を有するガングリオシド GM3 を用いた。セレクション操作を 6 回繰り返して、得られたファージの HA 結合活性を ELISA で評価した。モチーフ固定ライブラリーからは D1 と同程度の結合活性を持つファージが得られた。また、ランダムライブラリーからは H1、H3 および H5 型 HA 全てに対して D1 よりも高い結合活性を持つ配列 D215 が得られた。ビオチン化ペプチドを化学合成し、SPR 法で結合活性を評価したところ、解離定数( $K_d$  値)より D215 はいずれの 3 種類の HA 亜型に対しても D1 の約 2 倍の結合活性を示した(図 4)。

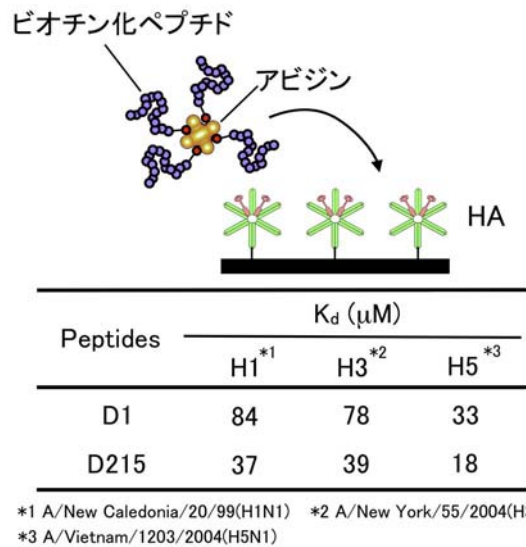


図 4 SPR 法を用いた D215 の HA 結合活性評価

5. 今後の予定 ペプチドのウイルス高親和性を旨とするため、配列の最適化や分子設計について検討する。



# 生体膜類似の糖脂質ナノクラスターの構造および糖鎖認識機能の解析

○福田 竜統<sup>1</sup>・小島 昂大<sup>1</sup>・飯島 一智<sup>1</sup>・松原 輝彦<sup>1</sup>・山本 直樹<sup>2</sup>・柳澤 勝彦<sup>3</sup>・佐藤 智典<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>慶大理工・<sup>2</sup>立命館大薬・<sup>3</sup>長寿医療セ)

## 1. はじめに

細胞膜上にはスフィンゴ脂質やコレステロールからなるラフトと呼ばれる膜マイクロドメインが存在する。膜マイクロドメインにはスフィンゴ糖脂質(GSLs)が豊富に存在し、ガングリオシドがクラスターを形成している。膜マイクロドメインは細胞-細胞間接着、シグナル伝達、そして様々な病原性分子の認識に関与している (図 1)。

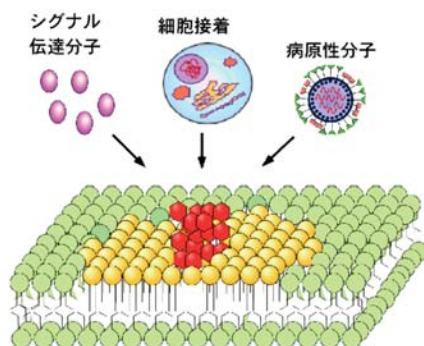


図 1 膜マイクロドメインの機能と構造

近年、ガングリオシド Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4(Neu5Ac $\alpha$ 2-3)Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1'Cer (GM1)集合体がアルツハイマー病の原因タンパク質であるアミロイド $\beta$ (A $\beta$ )の重合を促進することが明らかとなった<sup>1)</sup>。GM1含有リポソームや老齢マウス脳由来のシナプトソーム(SPS)とインキュベートすることで可溶性A $\beta$ がモノマーから凝集体を形成することが報告されている。原子間力顕微鏡(AFM)観察から、A $\beta$ はGM1を含むSPSラフト画分との相互作用により直径30nm程度の球状の凝集体を形成することがこれまでに示されている。この凝集メカニズムを明らかにするために、本発表ではSPSおよび非シナプトソーム(nSPS)ラフト画分の脂質成分を定性・定量解析した。この結果をもとに、ガングリオシドGM1、スフィンゴミエリン(SM)、1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(POPC)、コレステロール(chol)より形成されるモデル組成を構築し、その人工脂質膜の構造および認識機能をAFM観察により解析した。

## 2. SPS および nSPS のラフト画分の脂質分析

高性能薄層クロマトグラフィー(HPTLC)により、SPS および nSPS 界面活性剤不溶(DRM)画分中に含まれる主要な脂質成分を定量した。A $\beta$ の重合を促進するGM1の含有量はSPSとnSPSで大きな違いは見られなかったが、膜マイクロドメインの主要な構成成分であるcholはnSPSと比較してSPSに豊富に含まれていることが分かった(表1)。

表 1 HPTLC による DRM 画分の脂質組成

	SPS(nmol/mL)	nSPS(nmol/mL)
GM1	0.87	0.62
SM	75.9	85.5
PC	93.1	128.0
chol	54.6	26.0

このことから、GM1量ではなくGM1集合体の構造がA $\beta$ の重合促進において重要である可能性が示された。

### 3. SPS および nSPS ラフト画分の糖脂質の分析

高速液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC-MS) により SPS および nSPS 中の糖脂質を定量した (表 2)。どちらのラフト画分中にも GM1 が豊富に含まれていることが分かった。nSPS と比較して、SPS では各糖脂質が多く含まれている傾向があることが分かった。

表 2 LC-MS による DRM 画分の糖脂質の組成

	SPS(nmol/mL)	nSPS(nmol/mL)
GM1	0.87	0.62
GM2	0.24	0.13
GM3	0.67	1.05
GD1a	0.18	0.10
GlcCer	0.67	1.05
LacCer	0.18	0.10

### 4. 生体モデル膜の構造および認識機能解析

定量結果を基に、GM1, SM, POPC, chol から成る SPS および nSPS のモデル組成を構築した。これらの人工脂質膜における GM1 の状態を調べるために、高密度 GM1 に対して結合能を持つ p3 ペプチド<sup>2)</sup>を用いて AFM 観察を行った (図 2)。これまでに表面プラズモン共鳴法や AFM 観察により、p3 ペプチドは SPS 再構成膜に対して有意に結合し、SPS 再構成膜の GM1 クラスタが高密度で存在していることが示されている。nSPS モデル膜と比較して、SPS モデル膜では p3 ペプチドの結合が多く観察でき、モデル膜で GM1 集合体の構造の違いを再現できたことが示された。

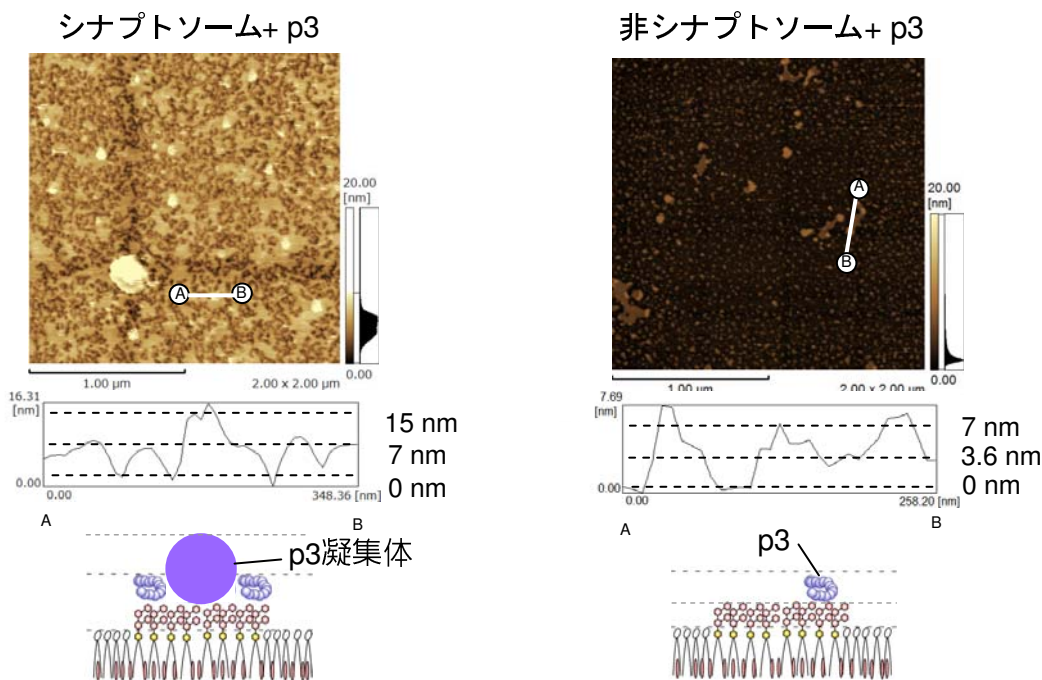


図 2 シナプトソームの DRM 画分の脂質モデル 2 分子膜への p3 ペプチド(10  $\mu$ M)の結合の AFM 像

### 5. 今後の予定

モデル組成の最適化のために、中性糖などの他の糖脂質も含む膜モデルを構築し、構造と機能を評価する。その人工脂質膜と A $\beta$ との相互作用解析を行い、A $\beta$ の毒性構造形成に重要な脂質あるいは膜構造の解明を目指す予定である。

<sup>1)</sup> K. Yanagisawa, *et al.*, Nat. Med., 2007

<sup>2)</sup> T. Matsubara, *et al.*, Langmuir, 2007

## 平成 24 年度ソフトインターフェースの分子科学

### 研修コースの概要

研修コース 1「TOF-MS イメージング法」

研修コース 2「マイクロコンタクトプリンティング法」

研修コース 3「和周波発生(SFG)分光法」

研修コース 4「X 線反射率測定」

研修コース 5「クライオ透過型分析電子顕微鏡(Cryo-TEM)」

研修コース番号	ソフト界面研修コース1
研修名	液体クロマトグラフ質量分析法
開催日時	2012 年 9 月 6 日～7 日 (6 日)10:00 – 16:00、(7 日)10:00 – 16:00
開催場所	筑波大学長崎研究室
担当者	長崎先生、池田先生
担当者連絡先	nagasaki@nagalabo.jp、iked@ims.tsukuba.ac.jp
募集人数	5 名まで
研修内容	高速液体クロマトグラフィーに連結した質量分析法は多数の成分からなる分析対象に対して LC でこれらの成分を分離した後、MS により解析を行うため、多成分系の定性及び定量解析を行う事ができる。本研修では、有機合成反応解析から薬物の動態解析まで幅広い分野でのトレーニングを行う。
申し込み期限	2012 年 8 月 10 日

研修コース番号	ソフト界面研修コース2
研修名	ナノインプリンティングによるソフト界面の形状制御と表面濡れ特性評価
開催日時	2012 年 10 月 5 日 10:00-17:00
開催場所	九州大学 高原研究室
担当者	高原先生
担当者連絡先	takahara@cstf.kyushu-u.ac.jp
募集人数	6 名まで
研修内容	ナノインプリンティングは材料表面に微細構造を形成する手法である。この手

	法はバイオセンサーをはじめとする様々なデバイスの作製に利用されている。本研修コースではポリ乳酸などの高分子フィルムへのナノインプリントを行い、ナノインプリントしたフィルムの表面微細構造の観察、濡れ性の評価を行う。またソフト界面の構造、物性の評価のための様々な装置の見学も行う。
申し込み期限	2012年9月14日

研修コース番号	ソフト界面研修コース4
研修名	和周波発生(SFG)分光法
開催日時	2012年11月30日 (1日)13:00 – 17:30
開催場所	物質・材料機構(並木地区)魚崎研究室
担当者	野口先生
担当者連絡先	e-mail:NOGUCHI.Hidenori@nims.go.jp TEL: 029-860-4841
募集人数	10名程度
研修内容	SFG 分光法は、界面の分子構造を調べるのにとっても有用な振動分光法のひとつである。本研修コースは昨年と同様、SFG 分光法についての簡単な説明を行った後、有機単分子膜や界面水の測定を行う。また、希望者があれば参加者の持参したサンプルの測定も行う予定。(ただし、事前に打ち合わせが必要)
申し込み期限	2012年11月23日(金)

研修コース番号	ソフト界面研修コース5
研修名	X線反射率測定
開催日時	未定 (2012年12月頃を予定)
開催場所	京都大学 松岡研究室
担当者	松岡先生
担当者連絡先	matsuoka@star.polym.kyoto-u.ac.jp
募集人数	3名まで
研修内容	X線反射率測定は、界面に垂直方向のナノ構造(電子密度プロファイル)をÅオーダーの精度、非破壊で調査できる手法であり、概ね1000Å程度の深さまで調査できる。本コースでは、主として脂質または高分子の水面単分子膜の反射率測定とその解析の実際を体験していただきます。なお、固体表面の測定も可能です。参加者持参の試料をお考えの場合は、事前にご相談ください。なお、原則として、放射性同位元素等取扱者の

	資格をお持ちであることが条件となりますので、ご注意ください。
申し込み期限	

研修コース番号	ソフト界面研修コース6
研修名	クライオ透過型分析電子顕微鏡(Cryo-TEM)
開催日時	随時受付
開催場所	東京大学浅野キャンパス内工学部9号館
担当者	岸村先生
担当者連絡先	kishimura@bmw.t.u-tokyo.ac.jp
募集人数	応相談
研修内容	<p>ソフトマテリアル、生体由来サンプルなどの微細構造の直接観察・解析には、高い分解能とコントラストを有する透過型電子顕微鏡(TEM)が大変有用である。本研修コースでは、元素分析、極低温観察、3次元トモグラフィなどを可能とする多機能TEMを使いこなすための基礎講義と、各種測定法のデモ測定やトレーニングを行う。受講希望者は、以下の内容で特にどれに興味があるかとともに申し込みをお願いしたい(複数回答可;時間の許す限り希望に応じたトレーニングを行う)。なお、本研修の修了により、本装置の管理組織・東京大学先端ナノ計測ハブ拠点が開催する利用説明会を修了したと認定する。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) EDS による元素分析</li> <li>2) STEM 観察</li> <li>3) エネルギーフィルタの利用;EELS</li> <li>4) 3次元トモグラフィとその画像解析</li> <li>5) 凍結試料作製によるクライオ観察</li> </ol> <p>なお、3)、5)については装置の準備状況次第でのデモとなり、当日は利用説明のみの可能性がある。利用希望者は、本研修の受講を勧める。詳細 &lt;<a href="http://lcnet.t.u-tokyo.ac.jp/spec/JEM-2100F.html">http://lcnet.t.u-tokyo.ac.jp/spec/JEM-2100F.html</a>&gt;</p>
申し込み期限	希望者集まり次第開催



## アウトリーチ活動報告

第 14 回 International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference (IACIS2012) Sendai Exhibition

開催場所：仙台市青葉区 仙台国際センター

日時：2012 年 5 月 14 日～16 日

「ソフトインターフェースの分子科学」では、領域の研究成果やそれに関連する科学技術を一般の国民に広め、理解してもらうためのアウトリーチ活動を積極的に行っています。去る 2012 年 5 月 13 日～18 日に開催された第 14 回 International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference (IACIS2012) (於 仙台国際センター (仙台市)) 国際会議にて、通常の研究発表とは別に、本研究領域の学術背景などを展示ならびに紹介する機会を得ましたので、その様子について今回報告いたします。

IACIS 国際会議はコロイドならびに界面科学分野最大の国際会議で、国内外から非常に多くの研究者らが期間中來場していました。当研究領域に参画しているメンバーや大学院生も数多く参加し、各自の研究成果を発信されるとともに、当該分野の研究者との交流を深めていたようです。そのようななか、学術展示 (Sendai Exhibition) は 5 月 14 日から 16 日までの 3 日間にわたりおこなわれ、当研究領域も展示ブースを設け、計画班メンバーである高井まどか先生 (東京大学) と菊池明彦先生 (東京理科大学) らのグループにも出展に協力していただき、領域を代表して活動を行いました。一般市民向けの学術展示ということでしたので、両先生をはじめ研究室の皆様には日本語を併記したわかりやすいパネルの作製など展示物の準備にご尽力いただきました。近隣から多くの小学生が校外学習に訪れ最先端の科学技術とその背景に触れてもらうという絶好の機会でもありましたので、高井先生のグループにはマイクロチップの体験操作、菊池先生のグループには PNIPAAm 材料の温度応答に関する実演といった工夫を凝らした企画をしていただきました。理化学研究所のグループからは DNA-金ナノ粒子の展示とその映像によるデモンストレーションをおこないました。出展期間中は多くの方々に当展示ブースまで足を運んでいただきました。小学生たちには体験型展示に興味を持ってもらえたようで、実際に手に持ち、操作し、ものが動いたり、色が変わったりする様子などをつぶさに観察するなど、科学を身近に感じてもらうことができました。説明員を質問攻めにする子供たちもいて、私たちも大いに刺激を受けました。





(記 藤田雅弘、独立行政法人理化学研究所)

## その他のアウトリーチ活動

温度応答性材料のデモンストレーション (大学訪問に来た春日部高校の高校生に対して) [菊池明彦]

日時：2012年5月25日

開催場所：東京理科大学

## 関連イベント報告

(1) 日本化学会年会 特別企画 “ソフト界面を生かした先端化学”

開催場所：慶応大学

日時：2012年3月28日

### 1. 概要

文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究「ソフトインターフェースの分子科学（ソフト界面）」の主催した日本化学会年会特別企画が、慶応大学で平成24年3月28日に開催されました。公募班若手研究者から、7件の講演がありました。参加者は80名を超え、盛況裡に終了いたしました。

### 2. 特別企画内容

最初に九州大学 三浦佳子より、本特別企画の趣旨の説明が行われました。その後、慶応大学 栄長泰明先生より、界面への有機分子層の修飾による強磁性ナノ粒子の開発に関する研究を発表していただきました。次に、産業界より参加していただきました、ユニカムノルタナノテクノロジーセンターより、彼谷高敏先生より、表面プラズモン励起増強蛍光分光免疫測定を利用したバイオセンサーについて講演していただきました。彼谷先生からは、産業界のソフト界面に関する考え方や、実際のバイオセンサー実用化における重要点についてお話がありました。次に、大阪工業大学 藤井秀司先生より、微粒子の界面挙動をベースとした、気液分散系の安定化について講演いただきました。次に、埼玉大学 藤森淳博先生から高分子の界面挙動を利用したフィルムやナノスフィア—作製に関する最新の研究を発表していただきました。次に、産業技術総合研究所 森田裕史先生より、高分子の液体界面での挙動に関するシミュレーションについてお話しいただきました。次に、九州大学 松野寿生先生から、高分子材料の物理化学特性に着目したバイオ材料の創製に関する研究についてご講演いただきました。最後に、早稲田大学 武田直也先生より、微細加工した界面を利用した細胞の挙動操作について講演していただきました。どの講演も日本化学会年会最終日にもかかわらず、多くの聴衆者があり、活発な質疑応答が行われました。

最後になりましたが、ご多忙にもかかわらずご参加頂きました皆様に厚くお礼申しあげます。

文責：三浦佳子

九州大学工学研究院化学工学部門

(2) 日本膜学会 第34年会 境界領域シンポジウム

「人工膜と生体膜をつなぐソフト界面の利用」

開催場所：早稲田大学理工学部 大久保キャンパス

日時：2012年5月8日、9日

日本膜学会 第34年会（2012年5月8日（火）、9日（水）、早稲田大学理工学部、大久保キャンパス）において、境界領域シンポジウム「人工膜と生体膜をつなぐソフト界面の利用」が開催された。本境界領域シンポジウムは、オーガナイザーである山口 猛央 先生（東京工業大学）が、人工膜と生体膜の融合領域研究として、新学術領域研究「ソフト界面の分子科学」を含む話題をとりあげた企画であった。シンポジウムタイトルに「ソフト界面」が入っているのは、その意図を表すものである。

講演は「ソフト界面の分子科学」の領域代表である前田瑞夫先生（理化学研究所）が、まず「ソフト界面」の概念を説明され、さらにご自身の研究「DNAがつくるソフト界面の特異な性質」について講演され、DNAと合成高分子複合体がつくる特異なソフト界面を利用した様々なセンサーが紹介された。さらに領域研究者である筆者から「生体適合性ポリマー膜によるバイオインターフェースの創製」というタイトルで、生体膜を模倣した人工のリン脂質ポリマー膜についての講演を行った。前田先生と私の講演に対する討論を通して、「ソフト界面」という概念が研究者の間で広く理解されつつあることを実感した。その他の講演としては、松井 淳先生、宮下 徳治先生（東北大学多元物質科学研究所）から「高分子ナノシート集積膜による光機能材料創製」、酒井 誠先生、藤井正明先生（東京工業大学 資源化学研究所）から「振動和周波発生法を利用した赤外超解像顕微鏡の開発と生細胞への応用」の講演があり、ソフトな人工膜の光機能材料への応用、さらには細胞というソフトな界面を観察する赤外超解像顕微鏡の開発が紹介された。人工膜と生体膜をつなぐソフトな界面という視点から議論ができ、大変有意義な講演会であった。

文責：高井まどか

東京大学大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻



### (3) 14th International Association of Colloid and Interface Scientists Conference

開催場所：仙台市国際センター

日時：2012年5月13日～18日

第14回 IACIS 国際会議（14th International Association of Colloid and Interface Scientists Conference : IACIS2012）が仙台市国際センターにて、2012年5月13日～18日に開催されました。

IACIS はコロイドおよび界面化学の分野の研究者の国際団体であり、主な活動として、国際会議を3年に1度、世界各地でこれまでに13回開催しており、今会議が14回目、日本では24年ぶりになります。

13日の開会式は天皇皇后両陛下の御臨席を賜り行われました（写真1）。東日本大震災後ながら、世界34カ国から1,000人を超える参加者があり、コロイドおよび界面科学分野、および関連分野の国内外のトップレベルの研究者が一堂に会し、最新の研究成果の発表と活発な討論と交流が行え、大変有意義な国際会議でした。

“ソフトインターフェースの分子科学”からは栗原和枝（東北大）が実行委員長として、前田瑞夫（理研）、高原淳（九州大）、松岡秀樹（京都大）が組織委員として開催、運営に尽力しました。

なお、会期中に IACIS の総会が開催され、栗原和枝（東北大学）が IACIS の President に就任しました。



写真1 開会式の様子

文責：栗原和枝

東北大学 多元物質科学研究所ナノ界面化学研究分野



#### (4) 新学術領域研究合同公開シンポジウム

開催場所：東京大学

日時：2012年7月10日

平成20年度にスタートした新学術領域研究(研究領域提案型)に、私たちのソフトインターフェースの分子科学が採択されたのち、これまでに、合計98の新領域が立ち上がってきました。人文社会系4、理工系36、生物系44、複合領域10領域です。先日、前田班に続いて21年度に立ち上がった「融合マテリアル:分子制御による材料創成と機能開拓(加藤隆史 領域代表)、23年度にスタートした「超高速バイオアセンブラ(新井健生 領域代表)、および、ナノメディシン分子科学(石原一彦 領域代表)が、合同公開シンポジウムを開催しました(図は要旨集の表紙)。領域内での共同研究にとどまらず、領域間の協調と切磋琢磨が、我が国の学術水準の向上と強化を目指す新学術領域研究の必須の戦略でしょう。



それぞれの領域の研究者や学生が100人以上参加し、クレムソン大学の長富次郎先生からは、近年、注目されているメカノトランスダクションに関する興味深い招待講演を伺うことができました。静水圧刺激による細胞変化の本質がかなり明らかになりつつあると驚きました。4つの領域からは、それぞれ、長崎幸夫先生(筑波大学)、大槻主税先生(名古屋大学)、大和雅之先生(東京女子医科大学)、石原一彦先生(東京大学)が、それぞれの領域の概要とご自身の研究内容について熱く語られました。紙面の都合上、先生方のご講演の詳細は述べられません。新たな分子の制御システムにより全く異なった現象を起こし、さらにそれを利用するという共通の軸を強く感じるご講演でした。私たちの領域は、あっという間に最終年度をむかえているわけですが、その成果は、他の3つの関連領域に脈々と生かされていくのだと確信いたしました。

最後に、私ごとで恐縮ですが、立ち上げ間もないヨタヨタの研究室でございましたが、多くの先生方との情報交換と共同研究の機会を得、大きな活力を注入して頂きましたことを心より感謝しております。



文責：山岡哲二

国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部

## 関連イベント情報

### ●当領域主催の会議

- 2012年7月26-27日 山形 第八回公開シンポジウム・第九回領域会議
- 2012年8月8-9日 東京 第3回ミニシンポジウム:ソフト界面と計測、センシング
- 2012年11月9日 東京 ソフト界面新技術発表会  
[http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~nagasaki\\_lab/nagasaki/sis/softinterface.html](http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~nagasaki_lab/nagasaki/sis/softinterface.html)
- 2013年1月23-24日 東京 第九回公開シンポジウム・第十回領域会議
- 2013年7月(予定) 東京 第十回公開シンポジウム

### ●関連会議

- 2012年9月23~28日@横浜  
IUMRS Int'l Conf. on Electronic Materials (IUMRS-ICEM2012)  
<http://iumrs-icem2012.org/index.html>
- 2012年10月9~12日@筑波  
Gelsympo2012 (9th International Gel Symposium)  
[http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~nagasaki\\_lab/gelsympo/index.html](http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~nagasaki_lab/gelsympo/index.html)
- 2012年11月2日 @慶応大学  
第6回 多糖の未来フォーラム  
[http://www.bio.keio.ac.jp/labs/sato/tatou\\_no\\_mirai6](http://www.bio.keio.ac.jp/labs/sato/tatou_no_mirai6)
- March 20-22, 2013@Tsukuba  
2nd Inter International Conference on Biomaterials Science in Tsukuba (ICBS2013)  
[http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~nagasaki\\_lab/nagasaki/icbs/icbs2013/index.html](http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~nagasaki_lab/nagasaki/icbs/icbs2013/index.html)

# ソフトインターフェースの分子科学「新技術発表会」

文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「ソフト界面の分子科学」主催  
[http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~nagasaki\\_lab/nagasaki/sis/program.pdf](http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~nagasaki_lab/nagasaki/sis/program.pdf)

- 13:00-13:10 領域代表ご挨拶  
理研 前田瑞夫
- 13:10-13:30 無機ナノチューブミセル  
九州大学先導物質科学研究所 高原 淳
- 13:30-13:50 新規シラン系表面修飾材料  
産業技術総合研究所 田中睦生
- 13:50-14:10 フラクタルエラストマー/ゲル  
山形大学大学院理工学研究科 野々村美宗
- 14:10-14:30 セルロース触媒  
東京工業大学大学院工学研究科 芹澤 武
- 14:30-14:50 幹細胞分離システム  
国立循環器病研究センター 山岡哲二
- 14:50-15:10 休 憩
- 15:10-15:30 高感度イムノアッセイ用抗体固定化基材  
東京大学大学院工学系研究科 高井まどか
- 15:30-15:50 生体組織モデル  
大阪大学大学院工学系研究科 松崎典弥
- 15:50-16:10 タンパク質-ナノ磁性ビーズ複合体  
東京農工大学大学院 工学研究院 吉野知子
- 16:10-16:30 酵素やタンパク質表面を活用した化学反応制御法の創製  
一特に光反応を活用した超分子不斉光反応の創製一  
東北大学多元物質科学研究所 和田健彦
- 16:30-16:50 ブロッキング材の設計  
筑波大学数理物質系 長崎幸夫
- 16:50-17:00 事務連絡・閉会  
筑波大学数理物質系 長崎幸夫

日 時： 2012年11月9日(金) 13:00~17:00

場 所： 山上会館2階大会議室

<http://www.sanjo.nc.u-tokyo.ac.jp/sanjo/>

所在地：〒113-8654 東京都文京区本郷 7-3-1

## 新聞・報道等(2012年4月～7月)

◆研究成果トピックス「DNA折り紙法の活用によるナノメカニカルデバイスの構築」の記事が、科研費NEWS レター2012VOL. 1に掲載されました。 葛谷明紀（関西大学）

### 班員および若手研究者の奨励賞等

日付	受賞・報道名	受賞・報道者	タイトル	団体
2011.10.24	NNT2011, Best Poster Awards	安井力、田和圭子、細川千絵、西井準治、青田浩幸、松本昭	Sensitive Fluorescence Microscopic Observation of Neurons Cultured on a Plasmonic Chip	Nanoimprint and Nanoprint Technology (NNT2011)
2012.03.29	第13回「貴金属に関わる研究助成金」MMS賞	藤井 秀司	再利用可能な磁性ナノコンポジット触媒粒子の開発	田中貴金属グループ
2012.03.30	平成24年度 第一回 電気化学会女性躍進賞	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	電気化学会
2012.5.14	ポスター賞(E-MRS (European Materials Research Society) Spring Meeting)	Akira Matsumoto, Kazunori Kataoka, Yuji Miyahara	Noninvasive Cytology Enabled by Sialic Acid Sensitive Field Effect Transistor	E-MRS (European Materials Research Society)
2012.05.24	一般社団法人日本ゴム協会 第5回CERI若手奨励賞	森田裕史	シミュレーションを用いたソフトマテリアルのガラス転移温度の解析	一般社団法人日本ゴム協会
2012.6.12	若手研究奨励賞優秀賞(YIA)	馬原 淳・Kristi Kiick・山岡哲二	エラスチン様ポリペプチドハイドロゲルからなる小口径人工血管の開発	再生医療学会
2012.6.23	最優秀ポスター賞	Magdalena Hałupka-Bryl, Kei Asai, Sindhu Thangavel, Magdalena Bednarowicz, Bernadeta Dobosz, Ryszard Krzyminiewski, Yukio Nagasaki	PEG-modified iron oxide nanoparticles as potential magnetic drug delivery system	2nd Nanosymposium on Nanomaterials Organizational Summary, Poznan, Poland
2012.6.25	第41回医用高分子シンポジウム学生奨励ポスター発表優秀賞	染川将太・馬原淳・増谷一成・木村良晴・山岡哲二	温度応答性を有する生分解性ハイドロゲルを用いた心筋梗塞治療効果の検討	高分子学会医用高分子研究会
2012.07.13	第58回高分子研究発表会[神戸] ヤングサイエンティスト賞	藤井 秀司	高分子微粒子の界面吸着現象を利用した気液分散体の安定化	高分子学会

「ソフトインターフェースの分子科学」News Letter Vol. 10

発行日 2012年8月7日 発行  
発行責任者 前田 瑞夫（理化学研究所）  
編集責任者 高井まどか（東京大学大学院）  
製 作 株式会社ジェイテックスマネジメントセンター  
〒162-0825 東京都新宿区神楽坂 1-2  
03-3235-8681（代）

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）  
「ソフト界面」総括班  
<http://www.riken.jp/soft-kaimen/>  
新学術領域研究ソフトインターフェースの分子科学運営事務局  
[softinterface@nagalabo.jp](mailto:softinterface@nagalabo.jp)



