

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20106004

研究課題名（和文） 温度応答性インターフェースの創成と生体分子認識制御

研究課題名（英文） Preparation of thermoresponsive soft interfaces for recognition of biomolecules

研究代表者 菊池 明彦

(KIKUCHI AKIHIKO)

東京理科大学・基礎工学部・材料工学科・教授

研究者番号：40266820

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：温度応答性、ポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド)、原子移動ラジカル重合、ポリマーブラシ、ソフトインターフェース、疎水性相互作用、キャピラリー

1. 研究計画の概要

(1) 研究の目的：

①本研究では、水系溶離液のみで分離・分析を達成するクロマト担体の設計と評価を目指し、特に温度応答性ソフトインターフェースの設計と、機能評価を目的にしている。

②温度変化に応答して水溶性の変化するポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) とその誘導体をキャピラリー内表面上、表面開始原子移動ラジカル重合(ATRP) で、鎖長と密度を制御して重合する。

③この界面をマイクロ高速液体クロマトグラフィー(μ HPLC)のカラムとして生体分子の分離認識制御を行う。

(2) 背景：種々の物質の分離・分析にクロマトグラフィー法が広く用いられているが、種々の試料を有機溶媒、または有機溶媒を水溶液の混合溶媒を用いて分離している。この廃液処理とそれともなう環境への負荷が大きな問題となっている。微量で高活性な生体分子の分離分析を、水系で微量分析しうる担体表面設計が重要である。

2. 研究の進捗状況

(1) PIPAAm 表面の調製

①重合時間を 8h までの範囲で、また重合 6h でモノマー濃度を変化させ、開始剤固定フェーズドシリカキャピラリー内表面上に PIPAAm を導入した。

②PIPAAm 修飾キャピラリーを、 μ HPLC に接続し、キャピラリー温度を恒温水槽で制御しながら PIPAAm 表面とステロイドホルモンのコルチゾン(cor)、酢酸ヒドロコルチゾン

(hca)、テストステロン(tes)の相互作用を評価した。モノマー濃度によらず PIPAAm 鎖の転移温度である 32°C 付近を境に高温側でステロイドの保持時間は延長した。

③モノマー濃度が高いと、転移温度以上でのステロイド分子と疎水性化 PIPAAm 修飾表面との疎水性相互作用が大きくなり、 $cor < hca < tes$ の順に保持時間が延長した。

④分析 10 分以内で完了し、廃液量も μ L オーダーの極少量である。

(2) P(IPAAm-co-BMA)(IB)表面の調製

①IPAAm に疎水性のブチルメタクリレート(BMA)を共重合したソフト界面を ATRP で調製した。

②PIPAAm 表面では 20°C でタンパク質は吸着せず、IB 表面では 37°C で吸着したタンパク質は 20°C では脱着せず、より低温では脱着した。

③IB キャピラリーを μ HPLC システムに接続し温度変化に伴う生理活性物質の保持挙動を解析した。

④PIPAAm 修飾キャピラリーに比して、IB 修飾キャピラリーでは、より低温で生体分子が吸着し、タンパク質のような生理活性物質をより低温で認識制御しうる可能性を明らかにした。

⑤テストステロンとコルチゾンの2種類のステロイドを用いた場合、20°C 未満で両者は1つのピークで溶出したが、20°C 以上でテストステロンの溶出が遅れ、水中で疎水性相互作用を制御するだけで生体分子の分離の可能性が示された。

3. 現在までの達成度

本研究課題に対し、その達成度は②おおむね順調に進展している。

理由：

重合時の溶媒やモノマー濃度、反応時間などの種々条件を検討した結果、温度応答性ソフトインターフェースの調製法は確立できていると考えている。

温度応答性ソフトインターフェースを有するキャピラリーを用いた生体分子との相互作用解析をスタートさせており、PIPAAm ブラシと疎水性化 PIPAAm ブラシとで、生体分子との相互作用解析について評価できている。

修飾表面の分子レベルでの解析が十分とはいえないため、今後詳細に検討する必要がある。

4. 今後の研究の推進方策

(1) PIPAAm 誘導体ブラシ修飾キャピラリーの調製と生体分子との相互作用解析

① 疎水性基の空間分布と組成を変化させたブラシ表面と生体分子との相互作用を解析する。

② 生体分子と特異的に相互作用する親和性基の導入と温度変化のみでの生体分子の吸・脱着制御に関する基礎検討を行う。

③ 生体分子との相互作用部位を増加させるため、モノリスシリカをもつキャピラリーを調製し、比表面積を増加させた上で感温性ソフト界面を調製する。これにより生体分子との相互作用変化を解析する。

以上の項目に着目して材料設計と生体分子認識制御に関する研究を推進する。

(2) 温度応答性ソフトインターフェースの表面物性解析

① 和周波発生分光法による水中での PIPAAm 誘導体ブラシ表面の物性解析：水中で温度変化させながら PIPAAm 誘導体ブラシ表面の和周波発生分光分析を行い、温度変化に伴う表面状態の解析を行う。

② PIPAAm 誘導体ブラシ表面と生体分子間相互作用の解析：表面力測定法、または AFM のフォースカーブ解析等から高分子ブラシ表面物性解析を行う。

以上は、領域内共同研究を積極的に行うことで推進していく。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) A. Mizutani, A. Kikuchi, (3 番, 他 6 人), Preparation of thermo-responsive polymer brushes on hydrophilic polymeric beads by surface-initiated

atom transfer radical polymerization for a highly resolutive separation of peptides, *J. Chromatogr. A*, (査読有) 1217, 2010, 5978-5985.

(2) A. Mizutani, A. Kikuchi, (3 番, 他 6 人), Effective separation of peptides using highly dense thermo-responsive polymer brush-grafted porous polystyrene beads, *J. Chromatogr. B*, (査読有) 878, 2010, 2191-2198.

(3) A. Mizutani, A. Kikuchi, (3 番, 他 6 人), Thermo-responsive polymer brush-grafted porous polystyrene beads for all-aqueous chromatography, *J. Chromatogr. A*, (査読有) 1217, 2010, 522-529.

[学会発表] (計 19 件)

(1) A. Kikuchi, Thermoresponsive soft interfaces for modulated interaction with biomolecules, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PacifiChem 2010), 2010.12.15-20, Hawaii

(2) 菊池明彦, 疎水性モノマーを導入した温度応答性マイクロ流路による生体分子の分離, 第 59 回高分子討論会, 2010.9.15-17, 北海道

(3) 菊池明彦, 感温性ソフトインターフェースを有するキャピラリー内表面の調製と生体分子との相互作用, 第 59 回高分子学会年次大会, 2010.5.26-28, 横浜

(4) 菊池明彦, 温度応答性ナノインターフェースの調製と生体分子との相互作用制御, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会, 2009.11.16-17, 京都

(5) H. Moriyama, A. Kikuchi, Separation of bioactive compounds on thermoresponsive capillary column modified with poly(N-isopropylacrylamide) (PIPAAm) brushes, The 1st FAPS Polymer Congress, 2009.10.22, Nagoya

[図書] (計 1 件)

(1) 菊池明彦, 4.4 温度応答性ソフトインターフェース(分担執筆), ソフトマター, 高原・栗原・前田編, 2009, 丸善, p. 233-242