

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：32660

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 modulation of biomolecules interaction

研究代表者

菊池 明彦 (KIKUCHI AKIHIKO)

東京理科大学・基礎工学部・教授

研究者番号：40266820

研究成果の概要（和文）：本研究では、温度変化にตอบสนองして親水性/疎水性変化する表面をキャピラリー内表面に構築した。この表面の性質変化を利用して微量な生理活性物質の分析を行う分離カラムとしての特性を調査した。ポリ（*N*-イソプロピルアクリルアミド）（PNIPAAm）とその誘導体の修飾表面で、温度のみを変化させ、ごく微量なステロイド類やタンパク質との相互作用を制御し、分析、分離を実現するマイクロキャピラリーの設計概念を構築することができた。

研究成果の概要（英文）：In the present research, we prepared thermoresponsive soft interfaces on capillary luminal surface. Thermoresponsive surface property alteration was utilized to the modulated interaction of tiny amount of biomolecules. Steroids and/or proteins interaction was regulated by temperature on poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) and its derivatives modified surfaces. Thus we proposed the design of thermoresponsive surfaces in microcapillary to separate and analyze the tiny amount of biomolecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,500,000	1,350,000	4,850,000
2009年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2010年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2011年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2012年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
総計	42,200,000	12,660,000	54,860,000

研究分野：新学術領域研究

科研費の分科・細目：ソフト界面

 キーワード：ソフト界面・ポリ（*N*-イソプロピルアクリルアミド）（PNIPAAm）・原子移動ラジカル重合・温度応答性・生体分子・分離・固定化金属イオンアフィニティー・モノリスカラム

1. 研究開始当初の背景

クロマトグラフィー法は種々の化合物などの分離・分析に重要な手法として広く応用されている。一方で、生体由来分子、特にタンパク質や細胞などとの相互作用を制御する表面（担体）は、タンパク質の変性

や、細胞の生存率を維持するために水系で用いられることがきわめて重要である。これらの分離を行うカラムは比較的多くのサンプルが必要であり、体内でごく微量で活性を示す生理活性物質の分析・分離には向かない。さらに、1測定ごとに数十 mL の

廃液が生じ、これらの処理は環境への影響が大きいと考えられる。そこで、ごく微量の生理活性物質の分離分析を行うための微小領域の表面機能化を行う必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、ごく微量の生理活性物質の分析・分離を実現するため、温度刺激に応答して生理活性物質との相互作用が変化する高分子修飾キャピラリーを構築し、その特性を評価することを目的にした。

3. 研究の方法

実験に用いたガラス平板はピラニア溶液（過酸化水素：硫酸=3:7）に浸漬して洗浄し、超純水で繰り返し洗浄後、減圧乾燥機で乾燥したものをを用いた。フューズドシリカキャピラリーは、1MNaOH、0.05MHC1で順次洗浄後、超純水を連続的に通液し、排出液のpHが中性であることを確認後アクリルデシケータで減圧乾燥した。

(1)疎水性相互作用制御を目指した感温性高分子ブラシ修飾キャピラリーの調製：キャピラリー内にm/p-クロロメチルフェニルエチルトリクロロシランを反応し、原子移動ラジカル重合(ATRP)開始剤であるクロロメチル基を導入した。このキャピラリー内に、所定量のNIPAAmモノマー、CuCl₂、トリス(N,N,N-ジメチルアミノ)エチルアミン(Me₆TREN)を含む溶液を連続的に通液し、所定時間重合を行った。重合後のカラムは十分洗浄後マイクロHPLC(JASCO)に接続して実験を行った。

(2)感温性シリカモノリスカラムの調製：感温性シリカモノリスは以下の様に調製した。氷浴上PEGの酢酸溶液にテトラメトキシシランを加え攪拌し、これをキャピラリー内に通液した後、ゾルゲル反応を行い、330°Cの電気炉で焼成後、(1)と同様に表面に開始剤を導入し、NIPAAmのATRPを行った。(3)(1)で調製したATRP開始剤固定中空キャピラリー内に、NIPAAm、1mol%のt-ブチルアクリレート(tBA)を共重合した。その後、アミノブチルトリロ三酢酸(NTA)を用いてアミノ加水分解を行い、側鎖にNTA基を導入した。NiCl₂をNTAに固定後、十分水洗して実験を行った。リゾチームとウシ血清アルブミン(BSA)を用いた。

4. 研究成果

(1)疎水性相互作用制御を目指した感温性高分子ブラシ修飾キャピラリーの調製：水中で温度変化に応答して生理活性物質との相互作用制御を実現するHPLCカラムの設計はすでにKanazawa, Kikuchi, Okanoらによって実現されている。(1-3)一方で、微量の生

理活性物質の分離には、従来のHPLCカラムでは、担体への非特異吸着や検出シグナルの微小化とブロードニングなどが生じうるため必ずしも十分な機能を果たせるわけではない。はじめに、水中で表面開始(SI-)ATRPによりPNIPAAm修飾表面をキャピラリー内に構築した。仕込みNIPAAm濃度の増加、あるいは重合時間の増加に伴って、PNIPAAm鎖長が増大し、かつステロイド類(テストステロン(tes: logP=3.32)、酢酸ヒドロコルチゾン(hca: logP=2.30)、コルチゾン(cor: logP=1.47))の保持係数がより大きくなることが明らかとなった。保持係数の変化は、PNIPAAmの転移温度である32°C近傍で急激に増大したことから、ステロイド類の相互作用の駆動力は疎水性相互作用であり、用いたステロイドの疎水性度を示す水/1-オクタノール系の分配係数の対数値であるlogP値が大きいステロイドほど高温での保持係数はより増大することが明らかとなった。一方、クロマトグラムから、ピーク形状とピークの分離を検討すると、ステロイド混合物を用いた分離では、モノマー濃度500mMで調製したPNIPAAm表面で疎水性相互作用が強くなる結果、カラム温度が変化しても複数のステロイドの溶出ピークが重なってしまった。一方で、300mMで調製したPNIPAAm表面では、コルチゾンとテストステロンを昇温とともに分離できる可能性が示され、これは、すでに報告している結果と類似したものであることがわかった。

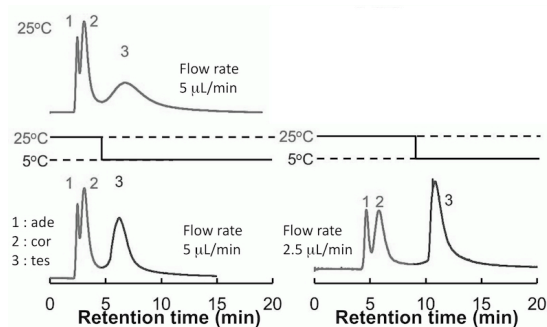


Fig. 1. Chromatograms of steroids on P(NIPAAm-co-BMA)-grafted fused silica capillary with step-temperature gradient at flow rate of 5 µL/min and 2.5 µL/min.

次に、疎水性基の導入効果を検討した。ここでは、DMF 中でブチルメタクリレート (BMA) を ATRP で NIPAAm と共重合した。BMA を仕込み濃度 1mol% で調製した場合、転移温度はホモポリマーの 32°C から 24°C まで低下した。そこで、このポリマーを修飾したマイクロカラムを調製し、ステロイドの分離挙動を調べた。疎水性温度応答性高分子修飾表面では、PNIPAAm に比して低温でステロイド類との相互作用が大きくなったが、ピーク面積は温度に依らず一定だったことから不可逆的吸着は起こらなかった。これは、密度高くポリマー鎖がキャピラリー内表面に導入された結果と考えられた。さらに、混合サンプルの分離特性を明らかにするために実験を行い、図 1 の結果を得た。25 °C、5 μ L/min の条件では、アデノシン(ade)と cor のピーク分離は不十分であり、かつテストステロン(tes)のピークブロード化が無視できない。ここで、25°C で ade、cor が溶出後カラム温を 5°C にすると、tes のピークが狭く高くなった。さらに流速を 2.5 μ L/min に下げると、ade、cor の分離が改善し、25°C、5 μ L/min における分離係数 0.66 から 0.91 に向上した。さらに、cor と tes の分離は、25°C、5 μ L/min で分離係数が 0.77 だったのに対し、流速を 2.5 μ L/min、カラム温度を 25°C から 5°C に下げることによって分離係数が 2.67 にまで向上した。

これらの結果は、温度応答性高分子を導入した表面の特性であり、分離中に温度グラジエントを与えることで、分離特性が向上することが確認できた。

(2) 相互作用部位の増大を目指した感温性シリカモノリスキャピラリーの調製：内径の細かいキャピラリーでは、比表面積は大きくなるものの相互作用点である表面積は必ずしも十分ではない。一方、シリカ担体の最密充填は分離特性を向上させられるが、キャピラリーの場合背圧の著しい増大をまねく。一方、シリカモノリスは比較的大きな連通孔を有し、シリカ担体の細密充填に比して低背圧で送液可能であることが知られ(4)、近年分離担体としての特性が検討されている (5,6)。しかし、これまで検討されていたモノリスはほとんどが逆相クロマトカラムとして応用

されており、水系で感温性高分子を固定した例はない。そこで、キャピラリー内でゾルゲル法によりモノリスシリカを調製後、この表面で表面開始 ATRP を行い、PNIPAAm 修飾表面を構築した。調製後のキャピラリー断面解析から、PNIPAAm 修飾前後でシリカモノリスの形状に変化はなく、比較的大きな貫通孔が空いていた。中空キャピラリーに比して比表面積は増大する一方、実際に背圧は修飾前後で変化がなかったことから、流路は十分維持されたことが実証された。次に、PNIPAAm 修飾モノリスカラムを μ HPLC に接続し、ステロイド類の溶出変化を解析した。1M NIPAAm、反応時間 3h で PNIPAAm を修飾した中空キャピラリー (10cm、100cm 長) とモノリス (10cm 長) におけるテストステロンの保持挙動を調べた。10cm 長の中空キャピラリーでは、テストステロンの保持係数変化は温度変化と共にごくわずかに上昇するのみで、PNIPAAm が修飾された表面でもその比表面積の小ささからテストステロンと疎水性化 PNIPAAm 表面との相互作用はきわめて小さいと考えられた。一方、PNIPAAm 修飾モノリスシリカキャピラリーの場合は、中空キャピラリー (1m 長) と同様の温度変化に応答した保持係数変化を示した。すなわち、低温ではテストステロンとほとんど相互作用しなかったが、32°C 以上で疎水性相互作用によりテストステロンの保持係数は増大した。モノリス(10cm 長)では中空キャピラリーのデータに匹敵する値が示された。このことは、カラム長が短くてもテストステロンと十分相互作用しうる表面積をもつ PNIPAAm 修飾表面を構築できたことを示している。今後さらに詳細な検討を行う必要があるが、微小領域で生理活性物質との相互作用を増幅させることが可能な温度応答性ソフト界面の設計概念が構築できたと考えられる。

(3) タンパク質との親和性制御を目指した感温性固定化金属イオンアフィニティー (IMAC) 表面の調製：固定化金属イオンアフィニティーリガンドの位置を制御することはタンパク質との相互作用制御に重要であると考えられる。そこで、本研究では、重合初期に NIPAAm と tBA との共重合を 3h、続け

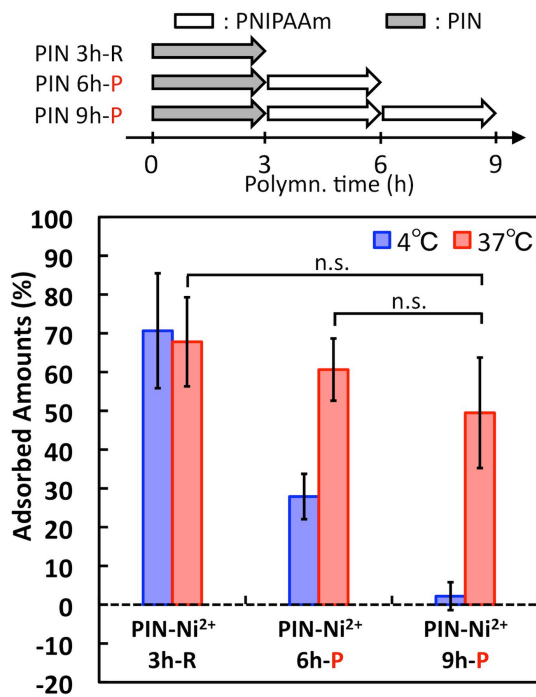


Fig. 2. Effect of polymerization condition on thermoresponsive BSA interaction on thermoresponsive immobilized metal ion affinity surfaces.

て PNIPAAm のみを ATRP し (さらに 3-6h)、tBA 側鎖のアミノ加水分解により NTA 基を導入したキャピラリー (カラム長 100cm、内径 100 μ m) を作製した。ここに、ウシ血清アルブミン (BSA) を通液し、タンパク質の温度変化に伴う溶出挙動を調べた。3~9h ランダム共重合を行った。ランダム共重合表面では、温度変化によらず BSA は吸着し、これらは温度変化のみでの脱着はできなかつた。初期に共重合を行い、その後、PNIPAAm の重合を行うと、図 2 に示したように、PNIPAAm の重合時間に伴い、4°Cでの BSA の吸着が低下し、3h-R で 70%の吸着が、6h-P では 28%、9h-P では 4%にまで低下した。一方、37°Cでの BSA 吸着は、60~70%で変化しなかつた。この結果は、37°Cでポリマーが脱水すると NTA-Ni²⁺リガンドが露出し、タンパク質が固定化金属イオンとの親和性に基づいて吸着する一方、4°Cでは PNIPAAm が水和してポリマー下部に存在するリガンドを遮蔽するためタンパク質とリガンドとの相互作用が小

さくなくなったものと考えられる。さらに、この遮蔽効果は PNIPAAm 鎖延長とともに増大することが示唆された。Ni²⁺を配位していない PNIPAAm 表面では、温度変化に依らず BSA はまったく吸着しなかつた。以上の結果は、PNIPAAm 鎖によるリガンド露出・遮蔽変化によるタンパク質の吸着制御であることを示している。すなわち、リガンドの位置と PNIPAAm 鎖長の制御により、温度変化のみで、目的のタンパク質のキャッチ・アンド・リリースが可能である表面であることが明らかとなった。固定化金属イオンアフィニティー (7)は、近年のバイオテクノロジーの発展に伴う遺伝子産物としてのヒスチジンタグ (His-tag)タンパク質の精製に活用されている (8-10)が、タンパク質の回収には、イミダゾールなどの競合剤や EDTA などのキレート剤、あるいは溶離液の pH やイオン強度を変化させる必要がある。一方で、今回提案した手法は目的タンパク質の吸脱着制御を実現できる世界で初めての例である。今後、His-tag タンパク質の精製の可能性を検討する必要があるが、今回得られた結果は非常に有益なものと思われる。

参考文献

1. H. Kanazawa, et al. *Anal. Chem.* **68**, 100-105 (1996).
2. A. Kikuchi, T. Okano, *Progr. Polym. Sci.* **27**, 1165-1193 (2002).
3. K. Nagase, et al. *J. Chromatogr. A* **1218**, 8617-8628 (2011).
4. T. Takeuchi, et al. *J. Chromatogr. A*, **1021**, 55-59 (2003).
5. N. Tanaka, et al. *Anal. Chem.* **73**, 420A-429A (2001).
6. V. V. Tolstikov, et al. *Anal. Chem.* **75**, 6737-6740 (2003).
7. J. Porath, et al. *Nature*, **258**, 558-559 (1975).
8. O. Gonzalez-Ortega, et al. *J. Chromatogr. A*, **1227**, 115-125 (2012).
9. P. Jain, et al. *Biomacromolecules*, **8**, 3102-3107 (2007).
10. K. E. Idrissi, et al. *J. Chromatogr. B*, **879**, 2852-2859 (2011).

結言

以上、本研究では、キャピラリー内に PNIPAAm とその誘導体からなるソフト界面を構築し、その構築条件を検討することで、疎水性相互作用、ならびに固定化金属イオンアフィニティー相互作用により生体分子の認識制御をできることを明らかにした。この成果は、微量で高活性な生理活性物質や、薬物代謝物等の分析・分離を行うことが可能な微小分離システムとして応用可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(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 7 件) DOI

- 1) N. Idota, A. Kikuchi, J. Kobayashi, K. Sakai, T. Okano, Modulation of graft architectures for enhancing hydrophobic interaction of biomolecules with thermoresponsive polymer-grafted surfaces, *Coll. Surf. B. Biointerfaces*, 99, 95-101 (2012). doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.10.033 (査読有)
- 2) K. Nagase, N. Mukae, A. Kikuchi, T. Okano, Thermally modulated retention of lymphocytes on polymer-brush-grafted glass beads, *Macromol. Biosci.*, 12, 333-340 (2012). DOI: 10.1002/mabi.201100283 (査読有)
- 3) K. Nagase, M. Watanabe, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, Thermo-responsive polymer brushes as intelligent biointerfaces: Preparation via ATRP and characterization, *Macromol. Biosci.*, 11, 400-409 (2011). DOI: 10.1002/mabi.201000312 (査読有)
- 4) A. Mizutani, K. Nagase, A. Kikuchi, H. Kanazawa, Y. Akiyama, J. Kobayashi, M. Annaka, T. Okano, Preparation of thermo-responsive polymer brushes on hydrophilic polymeric beads by surface-initiated atom transfer radical polymerization for a highly resolute separation of peptides, *J. Chromatogr. A.*, 1217(38), 5978-5985 (2010). doi: 10.1016/j.chroma.2010.07.067 (査読有)
- 5) A. Mizutani, K. Nagase, A. Kikuchi, H. Kanazawa, Y. Akiyama, J. Kobayashi, M. Annaka, T. Okano, Effective separation of peptides using highly dense

- thermo-responsive polymer brush-grafted porous polystyrene beads, *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. In Biomed. Life Sci.*, 878(24), 2191-2198 (2010). doi: 10.1016/j.jchromb.2010.06.026 (査読有)
- 6) A. Mizutani, K. Nagase, A. Kikuchi, H. Kanazawa, Y. Akiyama, J. Kobayashi, M. Annaka, T. Okano, "Thermo-responsive polymer brush-grafted porous polystyrene beads for all-aqueous chromatography", *J. Chromatogr. A.*, 1217, 522-529 (2010). doi: 10.1016/j.chroma.2009.11.073 (査読有)
 - 7) A. Mizutani, A. Kikuchi, M. Yamato, H. Kanazawa, T. Okano, "Preparation of thermoresponsive polymer brush surfaces and their interaction with cells", *Biomaterials*, 29, 2073-2081 (2008). doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.004 (査読有)

[学会発表] (計 50 件)

- 1) A. Kikuchi, Thermoresponsive soft interfaces for modulated interactions with biomolecules: from capillary to nanoparticles, Joint Symposium of the 5th Utah-Inha DDS & Advanced Therapeutics Research Center Symposium and the 7th International Symposium on Intelligent DDS, Incheon, Korea, May 23-24, 2013 (招待講演)
- 2) A. Kikuchi, Y. Takayama, M. Seo, N. Iwashita, K. Sakamoto, T. Asoh, Thermoresponsive soft interfaces for separation of bioactive compounds, International Conference of Biomaterials Science in Tsukuba 2013, Mar. 19-22, 2013. Tsukuba.
- 3) A. Kikuchi, Y. Takayama, M. Seo, N. Iwashita, K. Sakamoto, T. Asoh, Thermoresponsive interfaces for separation of biomolecules, 9th International Polymer Conference, Dec. 11-14, 2012. Kobe
- 4) 岩下直人、麻生隆彬、菊池明彦、一次構造を制御した温度応答性ポリマーブラシ修飾キャピラリーによるタンパク質のアフィニティー相互作用評価、第 61 回高分子討論会、9.19-21, 2012. 名古屋(1H06)
- 5) 坂本和美、麻生隆彬、菊池明彦、感温性モノリスシリカキャピラリーによる生理活性物質分離に与える分子鎖長の効果、第 61 回高分子討論会、9.19-21, 2012. 名古屋(1H05)

- 6) 菊池明彦、瀬尾昌幸、麻生隆彬、固定化金属イオンアフィニティリガンドを有する感温性マイクロカラム担体の調製、第 61 回高分子学会年次大会、5.29-31, 2012. 横浜 (1Pe145)
- 7) K. Sakamoto, Y. Takayama, T. Asoh, A. Kikuchi, Preparation of thermoresponsive polymer grafted monolithic silica capillary column enabling to separate bioactive compounds, International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference 2012, May 13-18, 2012. Sendai. (S4P15-17)
- 8) N. Iwashita, M. Seo, T. Asoh, A. Kikuchi, Preparation of thermoresponsive immobilized metal ion affinity brush with controlled primary structures for on-off interaction of proteins, International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference 2012, May 13-18, 2012. Sendai. (S4P15-16)
- 9) A. Kikuchi, Y. Takayama, M. Seo, N. Iwashita, K. Sakamoto, T. Asoh, Thermoresponsive soft interfaces for modulation of biomolecules interaction, Softinterface Minisymposium on Biomaterials Science in Tsukuba 2012, 2012.3.17-19, University of Tsukuba
- 10) 菊池明彦、麻生隆彬、温度応答性ソフト界面と生体分子との相互作用、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会、2011.11.21-22, 京都・京都テルサ
- 11) 菊池明彦、麻生隆彬、感温性ポリマーからなるソフトインターフェースの創製とクロマト担体としての特性、第 60 回高分子討論会、2011.9.28-30, 岡山大学津島キャンパス
- 12) A. Kikuchi, Y. Takayama, H. Moriyama, T. Asoh, Thermoresponsive soft interfaces for modulated biomolecular interactions, 12th IUMRS-ICA 2011, 2011.9.19-22, Nangang Exhibition Center (Taipei, Taiwan)
- 13) 高山陽亮、麻生隆彬、菊池明彦、温度応答性ブラシ表面を持つキャピラリークロマト担体による種々ステロイドの分離、高分子学会年次大会、2011.5.25-27, 大阪国際会議場
- 14) A. Kikuchi, T. Asoh, Thermoresponsive soft interfaces for modulated interaction with biomolecules, 2010 International Chemical

Congress of Pacific Basin Societies (PacifiChem 2010), Honolulu, Hawaii, 2010.12.15-20.

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

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

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

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

[図書] (計 3 件)

1) 菊池明彦, 曾我公平, 牧野公子, 柴 建次, 大塚英典, 「命を守る材料」, 東京書籍, pp 2-3, 8-23, 40-71, 148-168, 2012 (分担執筆)

2) 菊池明彦, バイオマテリアルの基礎, 前田・埴・石原編, 日本医学館(東京), pp. 118-124. (分担執筆)

3) 菊池明彦, 「4.3 温度応答性インターフェース」, 「ソフトマター ~分子設計・キャラクターリゼーションから機能性材料まで~」, 高原 淳, 栗原和枝, 前田瑞夫編, 丸善(東京) 2009. 11(分担執筆)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 明彦 (KIKUCHI AKIHIKO)

東京理科大学・基礎工学部・教授

研究者番号: 40266820