

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 10 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13261

研究課題名(和文) ウイルスを模倣した核酸内包金ナノプレート多面体構造の構築

研究課題名(英文) Nucleic acid-encapsulated virus-like polyhedral structure made by goldnanoplates

研究代表者

新倉 謙一 (Niikura, Kenichi)

北海道大学・電子科学研究所・准教授

研究者番号：40360896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：機能性ナノ粒子の自己集合化制御は、光学・電子・医療デバイス開発につながる技術となる。本研究では水溶液中で、ナノ粒子が外部から加えた高分子とともにpH刺激に応じて集合体形成する系を見いだした。粒子表面にオリゴエチレングリコール分子を固定化した金ナノ粒子と、外部に添加したポリアクリル酸のようなアニオン性高分子が酸性条件下で共凝集することを示した。アニオン性高分子の分子量によって金ナノ粒子の集合サイズが制御でき、疎水基の導入によって凝集pHを変えられることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Controlling the self-assemblies of functional nanoparticles is a key technology for development of optical, electronic and medical devices. In this research, we present the pH-responsive coassembly system of gold nanoparticles with external anionic polymers in aqueous solutions. Oligoethyleneglycol-coated gold nanoparticles were coassembled with poly(acrylic acid)s as an external mediator under the acidic condition. The assembly size was tuned by molecular weight of the anionic polymers and the induction of hydrophobic moiety into the polymers changed the responsive pH range.

研究分野：コロイド・界面化学, 生体機能関連化学

キーワード：自己組織化 金ナノ粒子 高分子 オリゴエチレングリコール

### 1. 研究開始当初の背景

我々はフッ素化オリゴエチレングリコール分子を提示した金ナノ粒子が自己集合し、カプセルを形成することを見出した(Niikura *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 134, 7632, 2012)。その集合体の大きさの分散度が低い(すなわちサイズが比較的揃っている)ことから、正三角形の金ナノプレートを用いれば多面体を作るのではないかと考えたのが申請提案に至った経緯である。本研究では多面体構造が安定するようにアニオン性の高分子である核酸を内包させることで中空の集合体構造の促進を狙った。そのために高分子と金ナノ粒子の複合体を安定に溶液中で得るための手法を確立する必要があった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の2つである。

- (1) アニオン性高分子とカチオン性金ナノ粒子の静電的な相互作用を利用して金ナノ粒子の自己組織化を誘起できることを実証する。
- (2) 正三角形(一片数十ナノメートル)の金ナノプレートを溶液中において自己組織化によって組みあげ、核酸を内包した多面体構造を作製する。

本研究では金ナノ粒子を使って目的(1)までを中心に進めた。

### 3. 研究の方法

本研究で用いた化合物の構造式と略称を図1に示した。2種類の表面修飾用オリゴエチレングリコール(EG)リガンド; EG6とC1EG6は、我々が以前に報告した文献(*J. Phys. Chem. C* **2016**, 120, 15846)を参考にして合成した。EG3はSigma-Aldrichから購入した。クエン酸修飾の金ナノ粒子(直径10nm)はTakahagiらの方法(*Jpn. J. Appl. Phys.* **2001**, 40, 346)に従って合成した。金ナノ粒子が集合体を作っているかどうかの判断は、紫外可視吸光度計および動的光散乱測定によって行った。

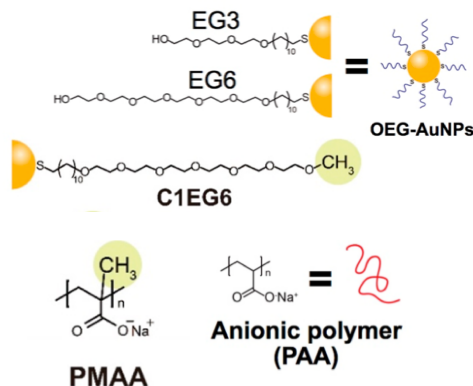


図1. 本研究で用いた表面リガンド分子とアニオン性高分子

### 4. 研究成果

(1) 局所的にカチオン性残基をもつ金ナノ粒子の作製と、核酸による金ナノ粒子凝集誘起の試み

アニオン性高分子とカチオン性金ナノ粒子の静電的な相互作用を駆動力としたナノ粒子集合体の制御について着手した。具体的には、局所的に正電荷をもつ金ナノ粒子を作製し、アニオン性高分子として核酸との静電的相互作用を駆動力とした集合体の形成を目指した。

金ナノ粒子表面に局所的にカチオン性部位を露出させるために、アビジン-ビオチンの結合を利用した。単量体ストレプトアビジン(mSAv)の末端にカチオン部位(リジン残基12連続配列、アルギニン残基12連続配列)を導入し、大腸菌で発現・精製した(図2)。市販の金修飾用のビオチン誘導体を使って金ナノ粒子にビオチンを提示し、低濃度で反応させることでカチオン部位をもつmSAvを分子固定化した。局所的に正電荷をもつ金ナノ粒子の合成は成功したが、核酸との混合時に金ナノ粒子の凝集は誘起されなかった(図2)。

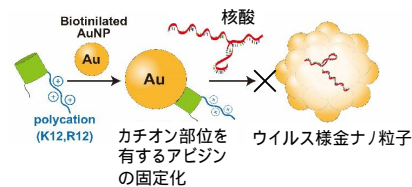


図2. 局所的にカチオンを有する金ナノ粒子の作製と核酸による集合体形成の試み(核酸を添加しても集合体が得られなかった)

(2) オリゴエチレングリコール(EG)修飾金ナノ粒子(EG-AuNPs)とアニオン性高分子の酸性溶液中における凝集誘起

オリゴエチレングリコール(EG)分子で修飾した金ナノ粒子(直径10nm, EG-AuNPs)とアニオン性高分子であるポリスチレンスルホン酸を混合し、酸性下におくとプラズモン吸収ピークの長波長シフトが観察された。当初この実験は上記研究成果(1)の試みにおけるコントロール実験であったが、アニオン性高分子を介して中性のナノ粒子が凝集するという予想外の結果は本研究テーマの目的に合致することから実験をさらに進めた。

EG6分子(構造式は図1を参照)で修飾した金ナノ粒子を分散した水溶液に塩酸を添加しても、プラズモン吸収波長に変化は見られず分散状態は維持されていることが分かった。一方、ポリアクリル酸(PAA:分子量15000)を添加したEG6-AuNPs分散水溶液では、pHに依存してプラズモン吸収の長波長シフトが見られた(図3)。ここではポリスチレンスルホン酸は強酸のため、pH変化による凝集を解析しやすいポリアクリル酸を用いた。pH 2~3付近よりもpHを下げると金ナ

ノ粒子の溶液が赤色から紫色に変化した。これはPAAのカルボン酸がこのpH領域でほぼプロトン化することより、プロトン化が駆動力となりEG6-AuNPsとPAAが複合体を形成していることを示している。さらにこの金ナノ粒子/PAA複合体は塩基性と酸性条件を繰り返すことで凝集と分散状態が可逆的に起こることがわかった。今までの研究として、高分子であるポリエチレングリコールとPAAが酸性条件下で水素結合により複合体をつくるのが古くから知られている(Tsuchida *et al.*, *J. Macromol. Sci., Part B: Phys.* **1980**, 17, 683.)。本研究の新規性はナノ粒子と高分子の複合体形成を目的としてこのシステムを利用している点である。金ナノ粒子の表面に提示しているのは高分子ではなく、低分子量であるオリゴエチレングリコール分子であるのも特徴である。ナノ粒子上にオリゴエチレングリコールが高密度で提示されることで、高分子であるポリエチレングリコールと同様な効果を示していると言える。

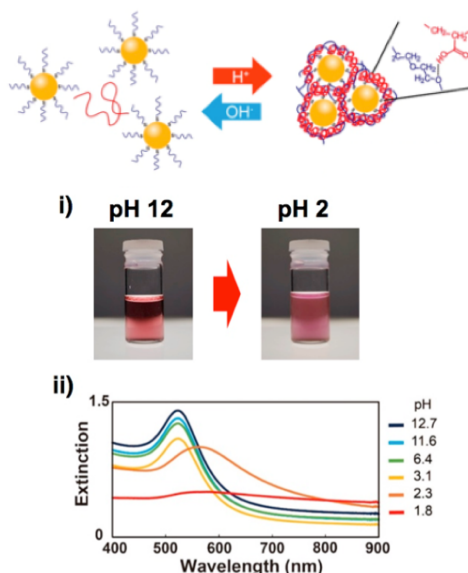


図3. PAA存在化におけるEG6修飾金ナノ粒子のpH依存的な凝集。pH12の時は分散しているが、pH2の時はナノ粒子とPAAが複合体を形成して凝集している。(i)写真(ii)吸光度計による測定。

またナノ粒子/高分子複合体形成は水素結合を駆動力としているため、強固な静電的な相互作用を使った場合と比較して凝集pHや凝集条件などを制御しやすいことが期待できる。まず高分子の分子量によって複合体の大きさがどのように変化するかを調べた。PAAの分子量を1200, 8000そして15000としたときの複合体の大きさを動的な光散乱測定によって評価した。分子量が変わっても凝集が始まるpHそのものには変化は見られなかったが、凝集サイズに違いが見られた(図4)。分子量8000のPAAを用いると複合体の大きさは900nm程度などに対し、分子量1200と

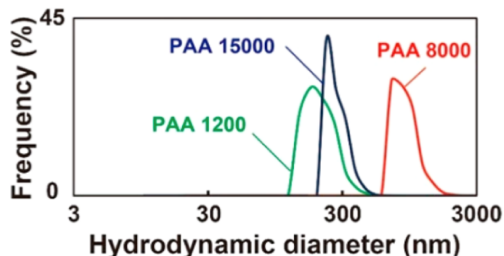


図4. EG6-AuNPsとPAA複合体の大きさ(流体力学直径)に及ぼすPAA分子量の効果。PAAの分子量が8000の時に最も大きな複合体を与えた。

15000のPAAではそれぞれ200nm, 300nm程度の小さな複合体が観察された。分子量1200のPAAの場合、そもそも金ナノ粒子に対する結合量が少ないことが原因だと考えられる。一方分子量15000の時は強い結合で粒子を覆うため、集合体同士の融合が進まないためと推測された。同様の効果はPAAと金ナノ粒子の濃度比[PAA]/[AuNP]においても観察された。[PAA]/[AuNP]が高いとき、すなわちPAAが大過剰存在するときは、複合体の大きさが小さくなる傾向があった。これもPAAが粒子間を架橋するのか、あるいは粒子を覆って安定するのかの違いが現れていると考えられる。

複合体形成時のpHが、アニオン性高分子あるいは表面リガンド分の化学構造によってどれだけ影響を受けるのかは、水素結合を駆動力とした複合体だけに興味深い。そこで次の3つの場合の凝集pHを調べた。(1)オリゴエチレングリコールの長さをヘキサエチレングリコール(EG6)からトリエチレングリコール(EG3)に短くした場合。(2)PAAにメチル基が付加したPMMAを用いたとき。(3)ヘキサエチレングリコール(EG6)の末端にメチル基を導入した(C1EG6)分子で粒子を被覆したとき。

EG3で被覆した場合は凝集pHに違いは見られなかった。これは粒子の最末端に露出している官能基が凝集には効いていることを意味している。一方(2)と(3)の場合は、より中性側、すなわち高いpHで凝集が引き起こされていることが分かった(図5の緑と赤のプロット)。これはメチル基を導入することによ

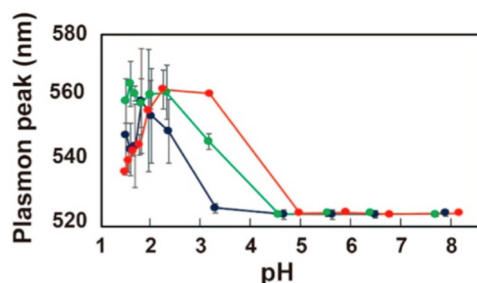


図5. アニオン性高分子とEG修飾金ナノ粒子のpH依存的な凝集(青)PAAとEG6-AuNPs、(緑)PMMAとEG6-AuNPs、(赤)PAAとC1EG6-AuNPs

って生じた疎水環境において水素結合がより強固になるためと考えられる。本研究では疎水基の導入によって複合体形成の pH が変化することを意味し、今後様々な化学修飾によって凝集 pH を変えられる可能性を示すことができた。

### (3) まとめ

本研究では、アニオン性高分子（当初は核酸の予定）とカチオン性金ナノ粒子の相互作用を利用したナノ粒子自己組織化を目的として研究を始めた。研究を続ける中で、中性のオリゴエチレングリコールで修飾した金ナノ粒子がアニオン性高分子と酸性条件下で複合体を形成することを見いだした。本研究成果はアメリカ化学会誌 *Langmuir* にて発表するに至った。また複合体そのものに多面体のような特徴的な構造などは見いだされていないが、オリゴエチレングリコールと PAA という汎用的な分子の組み合わせでナノ粒子凝集を誘起できるという本知見は広い応用が可能である。本研究成果をもとに引き続き三角形プレートなど粒子の形状が集合体構造に及ぼす効果などを明らかにしていきたい。

### 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2件)

Yu Torii, Naotoshi Sugimura, Hideyuki Mitomo, Kenichi Niikura, and Kuniharu Ijiro, “pH-Responsive Co-assembly of Oligo(ethylene glycol)-Coated Gold Nanoparticles with External Anionic Polymers via Hydrogen Bonding”, *Langmuir* 査読有り, published on ACS website (DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b01084)

三友秀之、新倉謙一、居城邦治, “分子を超えた自己組織化:表面修飾を利用したナノ粒子集合体の形成と機能材料への展開”, *高分子論文集*, 査読有り, 73(2),147-156, 2016

〔学会発表〕(計6件)

鳥居悠、杉村尚俊、新倉謙一、三友秀之、居城邦治, PEG 被覆金ナノ粒子とアニオン性高分子の pH 依存的な集合化挙動, ポスター発表, 第6回 CSJ 化学フェスタ 2016, 船橋 2016年11月14~16日

Yu TORII, Naotoshi SUGIMURA, Kenichi NIIKURA, Hideyuki MITOMO and Kuniharu IJIRO, Size controllable co-assembly of gold nanoparticle with poly(sodium 4-styrenesulfonate), Poster, AsiaNANO 2016, 札幌コンベンションセンター, 2016年10月10~13日

鳥居悠、杉村尚俊、新倉謙一、三友秀之、居城邦治, オリゴエチレングリコール被覆金ナノ粒子とアニオン性高分子の pH 依存的複合体形成, 口頭, 第65回高分子討論会, 神奈川大学横浜キャンパス, 2016年9月14~16日

Kenichi Niikura, “Surface Engineering of Gold Nanoparticles for Functional Self-Assembly” (Invited) RIKEN CEMS Topical Meeting “Nanoparticles / Nanotubes / Nanosheets”, 理化学研究所(和光), 2016年9月7~8日

鳥居悠、杉村尚俊、新倉謙一、三友秀之、居城邦治, 局所正電荷をもつ金ナノ粒子を用いたウイルス様自己集合, ポスター, 第26回バイオ・高分子シンポジウム, 東工大, 2016年7月28~29日

鳥居悠、新倉謙一、杉村尚俊、飯田良、三友秀之、居城邦治, ウイルス様自己集合のための局所的な正電荷をもつ金ナノ粒子の作製, 口頭, 日本化学会第96春季年会(2016), 同志社大学 京田辺キャンパス 2016年3月24~27日

出願状況(計0件)  
なし

取得状況(計0件)  
なし

〔その他〕  
ホームページ等

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

新倉謙一 (Kenichi Niikura)  
北海道大学電子科学研究所・准教授  
(現在: 日本工業大学工学部・教授)  
研究者番号: 40360896

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

#### (4) 研究協力者

本研究は北海道大学電子科学研究所居城研究室で行われた。居城邦治(Kuniharu Ijiro)教授、三友秀之(Hideyuki Mitomo)助教、北海道大学大学院総合化学院の鳥居悠(Yu Torii)氏、杉村尚俊(Naotoshi Sugimura)氏と協力して実験を進めた。