

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17904

研究課題名(和文) 温度応答性層状ペロブスカイトの創製と動的構造制に基づくタンパク質選択分離

研究課題名(英文) Preparation of thermoresponsive layered perovskites and protein separation based on dynamic control of their structures

研究代表者

井戸田 直和 (IDOTA, Naokazu)

早稲田大学・理工学術院総合研究所(材料技術研究所)・助教

研究者番号：60451796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：動的に表面物性や構造を制御できる2次元ナノ構造体の創製とタンパク質分離への応用を目指し、表面開始リビングラジカル重合によりN-isopropylacrylamideと金属配位性モノマーから成るコポリマーを層状ペロブスカイトの層間表面に修飾した後、その層構造を剥離させることで温度応答性ナノシートを合成した。このナノシートを用い、温度変化に伴う相転移挙動や金属イオン配位性、固定化金属イオンへのタンパク質のアクセス制御を評価した。得られた試料の温度応答特性や金属イオン配位性は示されたが、タンパク質吸着実験については再現性のある結果が得られなかった。

研究成果の概要(英文)：Thermoresponsive copolymer-modified inorganic nanosheets bearing N-isopropylacrylamide (NIPAAm) and (N,N-dicarbonylmethyl)aminomethylstyrene (DCAS) were prepared using layered perovskite  $\text{HLaNb}_2\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  (HLN) through surface-initiated atom transfer radical polymerization (SI-ATRP) at the interlayer followed by their exfoliation. Their thermoresponsibility, metal-coordination ability and protein accessibility were evaluated for development of functional protein separation system. Thermoresponsive phase transition and effective coordination to Cu ions were successfully investigated using the modified nanosheets, although no reproducible results of temperature-dependent protein adsorption on the surfaces were obtained.

研究分野：無機-有機ハイブリッド、バイオマテリアル

キーワード：温度応答性高分子 層状化合物 表面開始ATRP 金属配位 ナノシート タンパク質吸着

1. 研究開始当初の背景

(1) ナノレベルの無機シートが積層した構造を持つ層状無機化合物は、二次元的な層状のナノ空間内に交換性イオンを持つ構造を取っており、様々な有機分子を取込・表面修飾できる無機-有機ハイブリッド材料として盛んに研究されている。このようなハイブリッド化によって、有機分子の特性を無機材料に付与できるだけでなく、層間距離の制御や無機ナノシートの剥離・再積層化のような構造的性質も変えることができる。しかし、既往研究の多くは、層表面に修飾する分子サイズや溶液交換等の『静的な層構造制御』という観点に留まっており、『動的な層構造制御』に着目した応用には至っていない。

(2) 固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)は、多座配位性キレート剤に結合した遷移金属イオンとタンパク質のヒスチジン残基との高い親和性を利用した高選択的な分離法として実用化されている。一方で、この手法は強固な特異結合に基づいており、担体からのタンパク質の回収には、塩濃度の増加や競合キレート剤の添加を伴うため、多段階の分離プロセスが必要となる。

2. 研究の目的

本研究では、外部刺激によって動的に層構造や表面物性を制御できる無機-有機ハイブリッド材料を開発し、固定化金属アフィニティーによるタンパク質分離における新規な吸脱着システムの提案を目指す。具体的には、温度刺激によって水溶性や構造が変化する poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) をベースに、金属配位性モノマー (*N,N*-dicarboxylmethyl)aminomethylstyrene (DCAS) と共重合した温度応答性コポリマーを H 型層状ペロブスカイト  $\text{HLaNb}_2\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  (HLN) の層間表面に修飾する。この修飾 HLN の積層構造を剥離することで温度応答性ナノシートを作製し (図 1)、温度変化に伴うナノシートや修飾ポリマーの動的な構造変化により、ポリマー側鎖に固定化された遷移金属とのアフィニティー (親和性) を制御したタンパク質の吸脱着を検討する (図 2)。

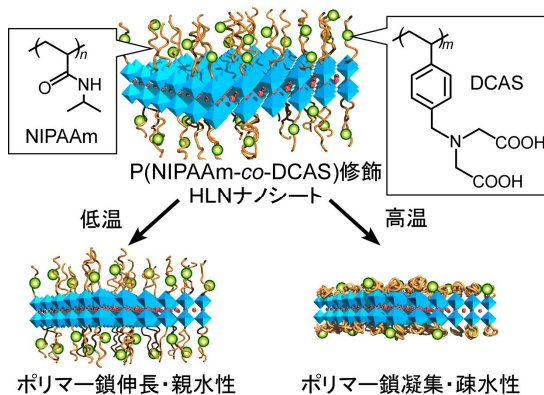


図 1. 金属配位能を有する温度応答性ナノシート

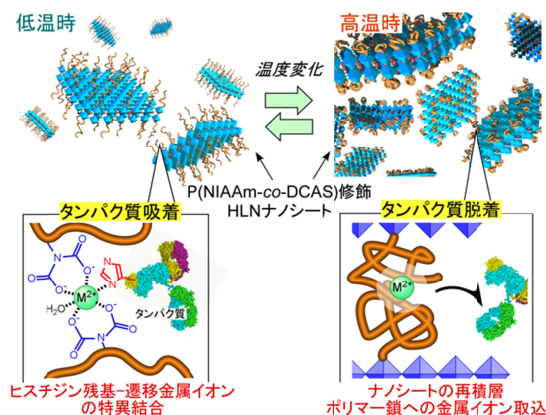


図 2. 金属配位能を有する温度応答性ナノシートを用いたタンパク質吸脱着制御の構想

3. 研究の方法

$\text{Rb}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{La}_2\text{O}_3$  を湿式混合・焼成した後、酸処理することで HLN を合成した。*n*-propanol および *n*-decanol を用いた逐次的なアルコール交換反応を介して、HLN 層間表面に *n*-decoxy 基を導入し、層間隔を一時的に拡張させた。その後、表面開始原子移動ラジカル重合 (SI-ATRP) の重合開始基を有するホスホン酸を HLN 層間表面に固定化した。凍結脱気した 2-propanol を溶媒として用い、 $\text{CuCl}$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{tris}[2-(\text{dimethylamino})\text{ethyl}]\text{amine}$  存在下でカルボキシル基を保護した DCAS と NIPAAm を開始基修飾 HLN 表面から共重合した。得られた試料を遠心分離により回収し、 $\text{HCl}$  を用いて DCAS のカルボキシル基を脱保護することで P(NIPAAm-co-DCAS)修飾 HLN (PND\_HLN) を作製した。

4. 研究成果

赤外吸収分光分析 (FTIR) より、 $1650$ ,  $1540 \text{ cm}^{-1}$  付近にポリマー側鎖のアミド由来の吸収帯、および  $1370 \text{ cm}^{-1}$  付近にポリマー側鎖のイソプロピル基由来の吸収帯を観測したことから、HLN 表面にポリマーが存在していることを確認した。熱重量分析 (TG) より、試料からの有機基脱離による重量減少率がモノマー濃度の増加に伴って直線的に増加した。また X 線回折測定 (XRD) パターンより、 $d = 2.85 \text{ nm}$  に存在する開始剤修飾 HLN 由来の回折線の強度が減少し、モノマー濃度  $5 \text{ mol/L}$  まではモノマー濃度の増加と共に層間隔の拡張に起因する新規回折線 ( $d = 4 \sim 6 \text{ nm}$ ) が検出されたことから、SI-ATRP により HLN 層間で重合が進行していることが示唆された。一方で、モノマー濃度  $10 \text{ mol/L}$  では、いずれの回折線も見られず、積層構造の保持を確認できなかった。透過型電子顕微鏡 (TEM) 像から、得られた試料は透明性のある板状形態であり、ペロブスカイト構造を示す (100), (110) の電子線回折 (ED) パターンをスポットとして観測したことから、重合過程で層構造が剥離したと考えられる (図 3)。また原子間力顕微鏡 (AFM) 像より、厚さ  $20 \text{ nm}$  程度のナノシート構造を有していることが確認

できた (図 4)。以上の結果より、HLN 層間からの SI-ATRP によりモノマー濃度に依存したポリマー修飾が示唆され、高モノマー濃度で調製した修飾 HLN では層構造が剥離したナノシートとして回収できた。

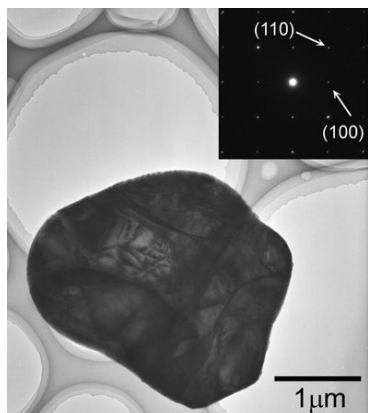


図 3. PND\_HLN の TEM 像と ED パターン。

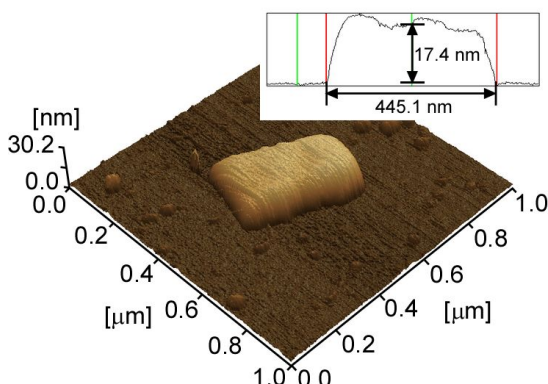


図 4. PND\_HLN の AFM 像と断面プロファイル。

PND\_HLN ナノシートの温度変化に伴う相転移挙動温について、温度を変化させたときの紫外可視分光分析 (UV-vis) における濁度変化から評価したところ、23°C 付近から急激な吸光度の低下が確認された。これは HLN ナノシートに修飾された NIPAAm コポリマーの疎水化に伴う凝集・沈降に起因すると考えられ、温度変化にตอบสนองした相転移挙動を確認することができた。また、修飾 NIPAAm コポリマー中の DCAS の脱保護前後において、吸光度の低下が開始する温度が変化していた。これは、DCAS の脱保護に伴うカルボキシアニオンの生成により、DCAS に存在する三級アミンカチオンとの静電相互作用による凝集の促進が起因していると考えられる。以上の結果より、P(NIPAAm-co-DCAS)を HLN 表面に修飾することで、温度応答特性を付与することができた。

高周波誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP) より、PND\_HLN ナノシートへの  $\text{Cu}^{2+}$  吸着容量は 0.18 mmol/g と算出され、酸塩基滴定から算出したイミノ二酢酸基量 (0.30 mmol/g) に比べて小さい値となった。これは、ポリマー鎖に複数の DCAS が存在するため 1 つの  $\text{Cu}^{2+}$  に対して 2 つのイミノ二酢酸基で配

位している場合があるためと推測された。以上の結果から、PND\_HLN ナノシートの金属イオンに対する配位能が示された。一方で、 $\text{Cu}^{2+}$  を配位させた修飾ナノシートを用い、ウシ血清アルブミン (BSA) の吸脱着試験を検討したところ、再現性のある結果が得られなかった。定量で用いた Micro-BCA 法において、SI-ATRP でわずかに残存した  $\text{Cu}^{2+}$  が検出されたことが原因と考えられ、タンパク質定量法の再検討が必要であることが分かった。

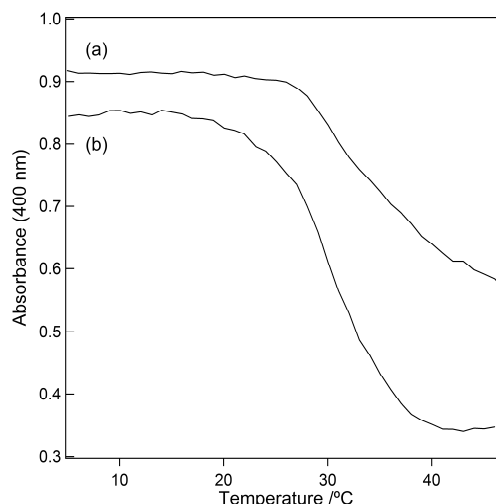


図 5. PND\_HLN ナノシート水分散液の濁度変化。(a) DCAS 脱保護前、(b) DCAS 脱保護後。

## 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 6 件)

Satoshi Maeda, Masato Fujita, Naokazu Idota, Kimihiro Matsukawa, Yoshiyuki Sugahara  
Preparation of Transparent Bulk  $\text{TiO}_2$ /PMMA Hybrids with Improved Refractive Indices via an in Situ Polymerization Process Using  $\text{TiO}_2$  Nanoparticles Bearing PMMA Chains Grown by Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization, ACS Applied Materials & Interfaces, 査読有, 8, 34762-34769 (2016).  
DOI: 10.1021/acsami.6b10427

井戸田直和, 菅原義之

スマート二次元ナノ材料 - 刺激応答性分子を修飾したナノシートの調製と応用, 化学, 査読無, 71, 62-63 (2016).

井戸田直和, 菅原義之

無機ナノ構造を利用した表面修飾による元素ブロックの作製とその応用, セラミックス, 査読無, 51, 777-780 (2016).

Masato Fujita, Naokazu Idota, Kimihiro Matsukawa, Yoshiyuki Sugahara  
Preparation of oleyl phosphate-modified  $\text{TiO}_2$ /poly(methyl methacrylate) hybrid thin films for investigation of their optical

properties” Journal of Nanomaterials, 査読有, 2015, 297197 (2015).  
DOI: 10.1155/2015/297197

Naokazu Idota, Satoshi Fukuda, Takehiko Tsukahara, Yoshiyuki Sugahara  
Preparation of thermoresponsive nanosheets exhibiting phase transitions in water via surface modification of layered perovskite nanosheets with poly(*N*-isopropylacrylamide), Chemistry Letters, 査読有, 44, 203-205 (2015).  
DOI: 10.1246/cl.140956

井戸田直和, 菅原義之  
自己組織化を利用した表面修飾による無機-有機ハイブリッド, 高分子, 査読無, 64, 645-647 (2015).

[学会発表](計 8件)

阿部修一郎, 井戸田直和, 菅原義之  
層間表面修飾による金属配位能を有する温度応答性層状ペロブスカイトの合成, 第 55 回セラミックス基礎科学討論会, 2017.1.13, 岡山大学 (岡山).

Kohei Kaneta, Naokazu Idota, Seiichi Tahara, Yoshiyuki Sugahara  
Preparation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles/polymer hybrids based on reversible exchange reaction of C-ON bonds, 第 65 回高分子学会年次大会, 2016.5.27, 神戸国際会議場 (兵庫).

前田聡志, 井戸田直和, 松川公洋, 菅原義之  
鎖長を制御したポリメチルメタクリレート修飾 TiO<sub>2</sub> ナノ粒子を導入したポリマーハイブリッドバルク体の作製と屈折率制御, 粉体粉末冶金協会 平成 28 年度春季大会, 2016.5.24, 京都工芸繊維大学 (京都).

井戸田直和, 菅原義之  
ポリマーハイブリッド材料の作製に向けた無機ナノ構造体の有機表面修飾, 平成 27 年度 第 19 回原子炉研コロキウム, 2016.3.22, 東京工業大学 (東京).

高橋志織, 井戸田直和, 松川公洋, 菅原義之  
液-液二相系を利用した TiO<sub>2</sub> ナノ粒子表面へのリン酸エステル修飾とポリマーハイブリッドへの応用, 第 64 回高分子討論会, 2015.9.16, 東北大学 (宮城).

Naokazu Idota, Hironori, Ohshta Yusuke Kawamura, Ahmad Mehdi, Bruno Boury, Yoshiyuki Sugahara  
Preparation of sol-gel derived lamellar-type polysilsesquioxane bearing carboxyl groups for intercalation and grafting reaction of

organic compounds, Sol-Gel 2015, 2015.9.8, Kyoto (JAPAN).

井戸田直和, 福田聡, 塚原剛彦, 菅原義之  
層状ペロブスカイトを用いた温度応答性を有する無機-有機ハイブリッドの作製, 粉体粉末冶金協会 平成 27 年度春季講演大会, 2015.5.27, 早稲田大学 (東京).

井戸田直和, 藤田雅人, 松川公洋, 菅原義之  
リン酸オレイル修飾 TiO<sub>2</sub> ナノ粒子を導入したポリマーハイブリッド薄膜の屈折率制御, 粉体粉末冶金協会 平成 27 年度春季講演大会, 2015.5.27, 早稲田大学 (東京).

[図書](計 3件)

Naokazu Idota  
Chapter-5.5 On/Off Switchable Interfaces, Biomaterials Nanoarchitectonics, eds. M. Ebara, Elsevier B.V., 279-294 (2015).

井戸田直和, 菅原義之  
第 4 章 第 2 節 ナノ粒子表面修飾による有機-無機ハイブリッド材料の合成とその評価, ナノ粒子の表面修飾と分析評価技術, 情報機構, 275-283 (2015).

菅原義之, 井戸田直和  
第 3 章 第 1 節 無機ナノ構造からの元素ブロックの作製, 元素ブロック高分子-有機-無機ハイブリッド材料の新概念-, 中條 善樹 編, CMC 出版, 65-72 (2015).

[その他]

ホームページ等

<http://waseda-sugahara-lab.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井戸田 直和 (IDOTA, Naokazu)

早稲田大学・理工学術院総合研究所 (材料技術研究所)・助教

研究者番号: 60451796

(4) 研究協力者

菅原 義之 (SUGAHARA, Yoshiyuki)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号: 50196698