

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700403

研究課題名（和文）外部刺激に応答した表面上における生体分子の構造制御

研究課題名（英文）Control of attachment of Biomolecules onto the surface in response to outer stimulus

研究代表者

熊代 善一（KUMASHIRO YOSHIKAZU）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：10401572

研究成果の概要：本研究では、温度応答型高分子であるポリ *N*-イソプロピルアクリルアミド [poly(IPAAm)] をフェリチンの外殻に化学修飾し、それらの温度変化に伴う表面上への吸着挙動を観察し、グラフト鎖の影響について考察した。poly(IPAAm)修飾フェリチンを、種々の温度での疎水基板上への吸着挙動を観察した。それらの結果、低温の条件では、poly(IPAAm)修飾フェリチンは基板上には全く吸着しなかったのに対し、高温では基板上に吸着した。このことは、高温において poly(IPAAm)修飾フェリチンの疎水性度が上昇し、疎水基板との相互作用が上昇したことによる吸着を示唆している。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

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：バイオコンジュゲイト、表面、タンパク質吸着、刺激応答、二次元結晶化

1. 研究開始当初の背景

表面上におけるナノメートルサイズでのパターン化は、細胞認識、DNA センサーを初めとするバイオセンサー、分子エレクトロニクス、半導体技術、表面触媒に至るまで幅広く応用が期待されている。これは、表面上において目的の場所に目的の分子、分子集合体を配置させるものであり、様々な応用が期待されている。

その中でも近年注目を集めているのが、原子・分子で構成されるナノサイズの極小部品（ナノブロック）を積み重ねることで目的の

微細構造を形成するボトムアップ方式と呼ばれる手法である。その中でも、生体系を模倣し機能分子が相互に定まった配列で並んだ組織体が自発的に形成される現象を利用した自発的な自己組織化による選択的パターン化は、コスト面での有利性のみならず、大面積のパターンが作製されることから、広く研究されている。

その中の一つに、「ナノテクノロジーを活用した新しい原理のデバイス開発」があった。これは、球殻状タンパク質であるフェリチン（外殻約 12 nm、内殻約 7 nm）内にバイオミネ

ラリゼーションで無機材料を担持させ、これらを組み上げることで表面上二次元結晶構造を作製し、必要に応じてタンパク質外殻を除去して、ナノエレクトロニクスデバイスを作製するものというものである。この研究課題の中、応募者は、フェリチン分子の表面上二次元結晶構造に寄与する相互作用についての検討を行っていた。研究開始までに、フェリチンの固体表面上における二次元結晶化には、タンパク質間相互作用、タンパク質-基板相互作用を精密に制御することが重要であると考え、溶液種、フェリチン種、基板化学修飾依存性に関しての検討を行った。フェリチン吸着量、吸着過程を水晶振動子マイクロバランス測定法(QCM)によって定量的な解析を行い、走査型電子顕微鏡(SEM)の画像との比較を行うことで、被覆率が90%以上の高密度なフェリチン吸着基板を作製した。また、フェリチン分子に汎用高分子であるポリエチレングリコール(PEG)をグラフトすることで、基板上に自発的な二次元結晶化が起こることを見いだした。このPEGグラフト化フェリチンの特徴的な点は、一般にタンパク質が表面に固定化すると強固に接着するが、PEGをグラフトすることにより表面に接着しにくくなるという特徴を有している。

また、高分子を用いたナノ材料もポリマーブレンド、ポリマーアロイ等を用いて幅広く検討されている。中でも、ブロック共重合体やグラフト共重合体は、その高分子鎖同士の間隔により分子オーダーで相分離することが知られており、その大きさはおよそ10~30nm程度でナノサイズでのパターン等に適用するのに有用である。これらの例として、ブロック共重合体をそのまま基板上に転写した方法が多数報告されている。これらは、基板上で選択配置したブロック共重合体のコア内に、金やコバルトといった無機材料を選択的に吸着させるもので、ナノデバイスへの応用が期待されている。

応募者は、刺激応答型高分子をグラフトした生体分子の酵素分解性について1994年4月より2004年3月まで検討を行ってきた。具体的には、グラフト鎖の分子量、導入量を分子レベルで制御した酵素分解性多糖グラフトコポリマーを合成し、それらの外部刺激に対応した分解制御を行った。これは、外部刺激に応答してグラフト鎖がコイル-グロビュール転移することで、酵素に対する立体障害性を制御するものである。

今回応募者が提案した「外部刺激に応答した表面上における生体分子の構造制御」は、上記のタンパク質の自己集合能と刺激応答

型高分子を組み合わせたことから着想に至った新しい表面ナノ構造制御に関するものである。具体的には、温度応答型高分子をグラフトしたフェリチンを調製し、それらの温度に伴う構造変化を利用して(図1)、表面上の被覆率、吸着制御を行うものである。これは、従来までに行われている塩濃度、基板修飾や溶液のpH制御ではなく、全く異なる外部刺激によってフェリチン吸着を制御することを目的とした。具体的には、温度応答性高分子であるポリ-N-イソプロピルアクリルアミド(PIPAAm)を化学的にフェリチン外殻に導入し、温度(外部刺激)に応じて吸着をON-OFF制御するものである。

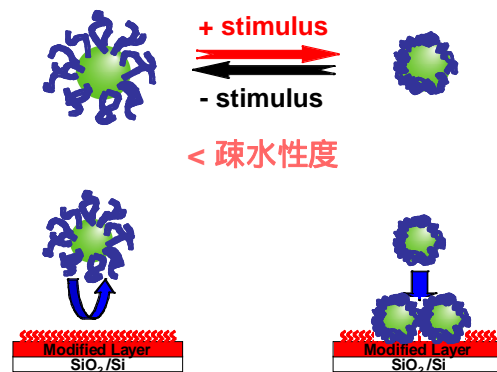


図1. PIPAAm修飾フェリチンの温度に応じた吸着制御

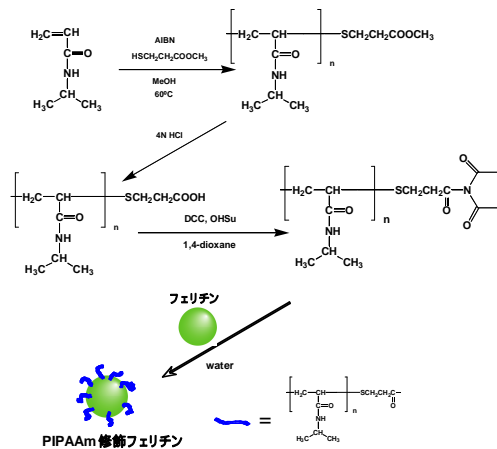
2. 研究の目的

本研究では、フェリチンに温度応答型高分子を導入することで、表面での被覆率や吸着状態を温度によって変化させることが出来る点が特徴的である。一般にタンパク質の表面への固定化は、疎水性相互作用、静電的相互作用や抗原抗体反応を用いて固定化を行うが、一度表面に接触したタンパク質は強固に接着するため、表面被覆率を制御することが困難であった。本研究でも、大まかには従来までの方法を利用して固定化を行うが、タンパク質分子の構造が温度に応じて変化するため、従来とは異なった表面構造が期待できる。また、高分子をグラフトすることにより、フェリチンが表面に接着しにくくなる(上記PEG修飾フェリチンに依る)という特徴があるため、一度表面に固定化した後に温度変化に伴い表面構造を変化させることも期待できる。このとき、温度応答型高分子の導入量、分子量を変化させ、その表面上の微細な構造変化を走査型電子顕微鏡(SEM)によって観察する。これにより、グラフト分子量、導入量、温度に対応した表面構造との相関を明らかにする。

3. 研究の方法

温度応答型分子の合成は Scheme 1 に従って合成した。具体的には、*N*-isopropylacrylamide (IPAAm) をラジカル重合し、この際、連鎖移動剤の仕込み量を制御することで種々の分子量を持つ PIPAAm を合成した。これらの合成高分子の解析は、核磁気共鳴法、赤外分光法、ゲル浸透クロマトグラフィにより判断した。また、PIPAAm は約 32 で下限臨界溶液温度(LCST)を有することが知られており、PIPAAm の温度変化に伴う構造変化を透過率変化によって親疎水性を判断した。

次にフェリチン外殻のリシン残基をターゲットにし、カルボキシル末端 PIPAAm を *N*-ヒドロキシスクシンイミド等で活性化し、フェリチン水溶液中に滴下することで目的の温度応答型高分子フェリチンを得た。これらの構造評価は、粒径サイズ、重量平均分子量に関しては、それぞれ動的、静的光散乱装置を用いて算出した。温度応答型高分子のフェリチンへの導入量の定量は、フェリチン内にある残留リシン基を定量することで求める。これらの合成に関しては、すでに PEG 修飾フェリチンで確立された系で行うため計画通りに遂行可能と考えられた。



Scheme 1. PIPAAm 修飾フェリチンの調製法

応募者が、従事していた「フェリチン分子の表面上二次元結晶構造に寄与する相互作用」についての検討からの知見を基に行った。申請までに、フェリチン(非高分子修飾)の固体表面上における吸着は、フェリチン間相互作用、フェリチン-基板相互作用をすることで、フェリチン吸着量、吸着過程に関する定量的な解析を行っており、その結果、静電的相互作用を高め、塩を添加することにより、基板上に高密度に吸着することが分かっていた。このことから、先ず高密度に吸着する

系から検討を行った。表面密度の判断は SEM を用いて行った。吸着挙動の解析は、膜厚、吸着重量を、それぞれ SPR、QCM を用いて解析した。また、これらを室温から PIPAAm の下限臨界溶液温度以上の温度での吸着実験を同様に行った。

4. 研究成果

主な研究成果を以下に挙げる。

片末端カルボキシル化 PIPAAm を Scheme 1 に従い合成した。このとき分子量を 1,500~10,000 程度まで制御した。これらのカルボキシル化 PIPAAm を *N*-ヒドロキシスクシンイミドを用いて活性化し、その後、水溶液中でフェリチンの e-アミノ基とカップリング反応により修飾した。その結果、凡そ 24 本のフェリチンが修飾されていることを確認した。また、動的光散乱 (DLS) や吸光度測定を用いて PIPAAm 修飾フェリチンの温度応答性を確認した。その結果、フェリチン濃度 0.2 mg/ml 以上の濃度では、PIPAAm 修飾フェリチン水溶液は温度上昇に伴い凝集体が確認されたが、0.1 mg/ml 以下の濃度では全く凝集体が確認されず、PIPAAm 修飾フェリチンが 1 つ 1 つ分散して存在していた。これは、PIPAAm 修飾フェリチン中の PIPAAm 鎖が温度上昇に伴い凝集し、疎水性度が上昇したために 0.2 mg/ml 以上の濃度では凝集体が形成したものと考えられる。一方、0.1 mg/ml 以下の濃度において凝集体が形成しないのは、高分子ミセルの臨界ミセル濃度と同じように考えられ、濃度が薄く分子間の距離が広がるためであると考えられる。そのため、以下の吸着実験では、フェリチン濃度 0.05 mg/ml において行った。

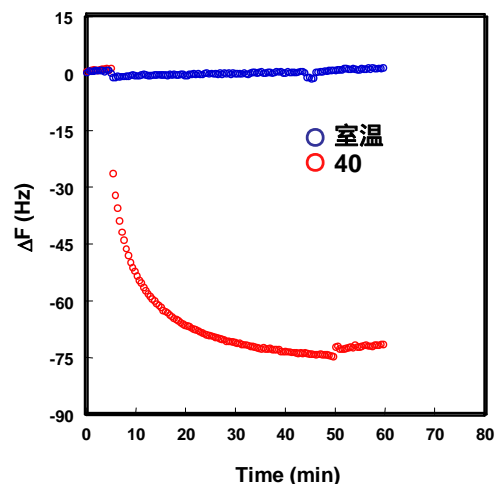


図 2. PIPAAm 修飾フェリチン(PIPAAm 分子量約 2,800、修飾分子数約 25 本)の温度に応答した吸着(室温: 青、40 : 赤)

調製した PIPAAm 修飾フェリチン(PIPAAm 分子量約 2,800、修飾分子数約 25 本)をタンパク濃度 0.05 mg/ml で 0.05 M Bis-Tris buffer [(pH: 5.8), 0.05 wt% TWEEN 20 含有]中に調整し、種々の温度での疎水基板上への吸着挙動を水晶振動子測定法(QCM)や走査型電子顕微鏡(SEM)によって観察した。ここで、TWEEN 20 含有させているのは、TWEEN 20 を添加することにより PIPAAm 修飾フェリチン低温での吸着を抑制し、特異性を上昇させるためであった(参考: T. Hayashi et al. *Nano letters* Vol. 6 (2006) 515-519.)。図 2 に QCM 結果を示す。

図 2 より、PIPAAm の LCST 以下の条件では、PIPAAm 修飾フェリチンは基板には全く吸着しなかったのに対し、LCST 以上の条件では、基板に吸着した。このことは、LCST 以上において PIPAAm 修飾フェリチンの疎水性度が上昇したことで、疎水基板との疎水性相互作用が上昇したことによる吸着を示唆している。ここで、TWEEN 20 を添加しない系に関し

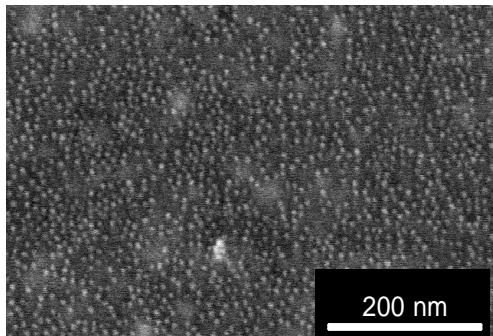
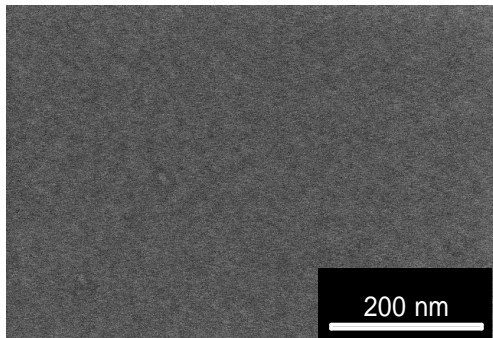


図 3 PIPAAm 修飾フェリチン(PIPAAm 分子量約 2,800、修飾分子数約 25 本)の温度に応答した吸着(上: 室温、下: 40)

ても検討を行った。TWEEN 20 を添加しない系では、低温側でも疎水基板上に吸着した。これは、フェリチン内のタンパク質疎水核が、疎水基板と疎水性相互作用によって吸着したことを示唆している。一方、TWEEN 20 を添加した場合、TWEEN 20 は疎水基板上にナノオーダーで薄く膜を張り、基板と PIPAAm 修飾フェリチンの疎水相互作用を軽減している(T.

Hayashi et al. *Nano letters* Vol. 6 (2006) 515-519)ため、低温側では PIPAAm 修飾フェリチンは基板に全く吸着しない。温度上昇に伴い PIPAAm 修飾フェリチンが基板上に吸着するのは、TWEEN 20 膜と PIPAAm 修飾フェリチンの疎水性相互作用とも考えられる。また、親水 SiO₂ 基板上には TWEEN 20 は全く膜を張らないため、ON-OFF 制御は不可能であった。図 3 に SEM 結果を示す。左図では全くフェリチンが吸着していないのに対し、右図ではフェリチンの大量吸着が観察され、QCM の結果を支持している。

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 4 件)

林智広、齋藤公良、熊代善一(他 3 名, 3 番目), Adsorption processes of thiolated cyclodextrins on Au(111) substrates: a way to organize ordered structures of “bulky” molecules on solid substrates, 表面化学, 29, 495-497, 2008, 査読有

Y. Ikezoe, Y. Kumashiro (他 5 名, 2 番目), Growth of Giant Two-Dimensional Crystal of Protein Molecules from a Three-Phase Contact Line, *Langmuir*, 24, 12836-12841, 2008, 査読有

Y. Kumashiro, Y. Ikezoe, K. Tamada, M. Hara, Dynamic Interfacial Properties of Poly(ethylene glycol)-Modified Ferritin at the Solid/Liquid Interface, *Journal of Physical Chemistry B*, 112, 8291-8297, 2008, 査読有

M. Sadaie, N. Nishikawa, Y. Kumashiro (他 6 名, 3 番目), Quantitative Friction Map on Surface Composed of β -Cyclodextrin Monolayer, *Japanese Journal of Applied Physics*, 46 巻, 7838-7845, 2007, 査読有

[学会発表](計 4 件)

熊代善一, 福守一浩, 秋山義勝, 大和雅之, 岡野光夫, 原子間力顕微鏡による温度応答性高分子膜の温度減少に伴う緩和現象の観察, 第 3 回バイオナノテクフォーラム, 2009.3.12, 東京

熊代善一, 池添泰弘, 玉田薫, 原正彦, 温度応答性高分子を含有したフェリチンの固体表面上への吸着挙動, 第 57 回高分子学会年次大会, 2008.5.30, 横浜

池添泰弘, 熊代善一(他 5 名), 気液界面におけるタンパク質分子の巨大二次元結晶作製, 第 68 回応用物理学会学術講演会, 2007.9.05, 北海道

熊代善一, 池添泰弘, 玉田薫, 原正彦,
ポリマー鎖を修飾したフェリチンの基板上
二次元結晶化, 第56回高分子学会年次大会,
2007.5.31, 京都

〔その他〕

受賞

熊代善一 高木賞 第3回バイオ・ナノテク
シンポジウム、2009.03.12

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊代 善一 (KUMASHIRO YOSHIKAZU)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10401572

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし