

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20750117
 研究課題名 (和文) ミセル—ベシクル相転移の光制御を用いたマイクロ領域における試薬のカプセル化
 研究課題名 (英文) Photoregulated transition from micelle to vesicle and encapsulation of compound in micro space
 研究代表者
 宇田 亮子 (Uda Ryoko)
 奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・准教授
 研究者番号：90321463

研究成果の概要 (和文)：ミセル (球状集合体) からベシクル (小胞体) への相転移の光制御とそれに伴う試薬のカプセル化を目指し、光照射により正電荷を持つカチオン性界面活性剤となる分子と、負電荷を持つアニオン性界面活性剤混合させた。暗時ではミセルの状態であるが、光照射後はカチオン性とアニオン性の両方の界面活性剤が存在するため、直径 10–200nm のベシクルが形成された。またこのベシクル形成に伴うグルコースのカプセル化に成功した。

研究成果の概要 (英文) : A photoresponsive compound which turns to be a cationic surfactant by irradiation was used as a functional compound. Mixture of the photoresponsive compound and anionic surfactant was found to afford micelle-to-vesicle transition. The photoresponsive compound was dissolved in the micelle of an anionic surfactant under dark conditions. In contrast, irradiation provided vesicles with a diameter of 10-200 nm. The photoinduced transition from micelle to vesicle involved encapsulation of glucose.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：有機化学

科研費の分科・細目：複合科学・機能物質化学

キーワード：膜・集合体、光応答、ベシクル、ミセル、相転移、マラカイトグリーン

1. 研究開始当初の背景

ベシクルは、二分子膜により構成される小胞体であり中に試薬を内包することができるため、マイクロカプセルとしての研究が盛んになされている。特にミセルからベシクルへ相転移する系では、ナノ材料作製のためのテンプレートとして、またはドラッグデリバ

リーシステムへの応用展開が期待されている。ミセル—ベシクル相転移のために、温度・pHや塩濃度を変化させる研究がすでになされているが、これらの方法では微小領域での制御が困難であり、薬品添加による環境への負荷が懸念され応用範囲を狭めることになる。そこで本研究では、光照射を外部刺激

とすることに着目した。光照射は、環境への負荷が少なく、非接触で簡便、微小領域までコントロールできるため、ターゲットとした場所でのベシクル形成が可能となる。

研究者はこれまでに、長鎖アルキル基を有するマラカイトグリーン誘導体 (MGL) を分子設計し、光照射によってカチオン性界面活性剤としての機能を得ることに成功している (*Colloid and Polymer Science*, 2007, **285**, 699, *Langmuir*, 2007, **23**, 7936, *J. Phys. Org. Chem.*, 2007, **20**, 802, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2005, **78**, 1862, *Chem. Lett.*, 2004, **33**, 586)。そこで、この光応答分子をアニオン性界面活性剤に溶解させ (ミセル)、光照射によりカチオン性界面活性剤が発生すると、アニオン性とカチオン性界面活性剤から成るベシクルを形成することにより、ミセルからベシクルの相転移を光で行うことを着想した。

2. 研究の目的

本研究は、暗時では脂溶性分子である一方、光照射によりカチオン性となる光応答性分子を用い、ミセルからベシクルへの相転移を誘起して光照射部分のみベシクルを発生させるものである。照射領域を選択することで、ターゲットとした試薬のみをベシクル内に取り込むことが可能であり、光による“非接触”、“短時間”、“微小領域”でのカプセル化が可能となる。

3. 研究の方法

(1) アニオン性界面活性剤の検討

光イオン化によりカチオン性界面活性剤となった MGL (図1) と混合することでベシクル形成が可能でアニオン性界面活性剤について検討した。

図1 マラカイトグリーン誘導体 (MGL) の光イオン化反応

(2) 保持効率の評価

ベシクル内にカプセル化された薬剤の量を評価するために、保持効率を調べた。保持

効率は、 $[\text{ベシクル内に取り込まれる薬剤の量}] / [\text{溶液中に存在する薬剤の全量}] \times 100(\%)$ で算出される。薬剤としては、グルコースを用い、Scaler 法にてグルコース濃度の定量を行った。

(3) 暗時におけるミセル状態の評価

暗時における MGL の局所的な存在を調べるために、ピレンをプローブ分子として用い評価を行った。

(4) 光照射後のベシクル形成の観察

透過型電子顕微鏡によるベシクルの観察とサイズの評価を行った。

(5) グルコースオキシダーゼのカプセル化

ゲルクロマトグラフィーを用い (充填剤 Sephacryl S300)、グルコースオキシダーゼをカプセル化したベシクルの調整を行った。

4. 研究成果

(1) アニオン性界面活性剤の検討

① オクチル硫酸ナトリウム (SOS) 溶液

アニオン性とカチオン性の界面活性剤を混合してベシクルを形成する研究 (*Science*, 1989, **245**, 1371, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 13792 など) によると、アニオン性界面活性剤にはオクチル硫酸ナトリウム (SOS) が用いられ、カチオン性界面活性剤には本研究の光応答分子と同じ炭素数のアルキル鎖をもつ界面活性剤が添加されている。

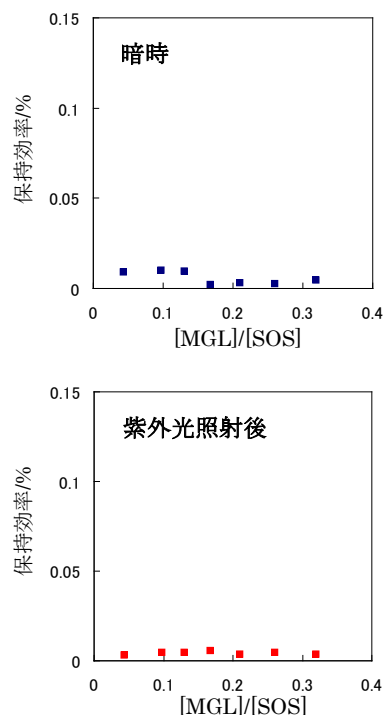


図2 SOS—MGL 系における保持効率の変化 ([SOS] + [MGL] = 2 wt%)

そこで、SOS と光応答分子を混合させたサン

プルを調整した。ベシクルが形成されている場合には、中に試薬を内包させることができるため、保持効率を指標としてベシクル形成を評価した。紫外光照射はキセノンランプからの光を光源とし、ガラスフィルターにて330nm以下の波長の光を5分間照射した。紫外光照射前後での保持効率を図2に示す。暗時ではベシクルが形成していないためいずれのMGL濃度でも低い保持効率となった。しかし、紫外光照射後の条件においても暗時とほぼ同じ程度の保持効率を示したため、この条件ではベシクルが形成していないことが結論付けられた。

②ビス(2-エチルヘキシル)コハク酸ナトリウム(AOT)溶液

ベシクル二分子膜形成に有利な形状をつくるには、親水基のかさ高いマラカイトグリーン誘導体には、同じく親水基のかさ高いSOSではなく、疎水基のかさ高い界面活性剤が適しているのではないかと考えた。そこで、ビス(2-エチルヘキシル)コハク酸ナトリウム(AOT)を用いたサンプルを調整し、保持効率の変化を調べた。紫外光照射前後での保持効率の変化を図3に示す。

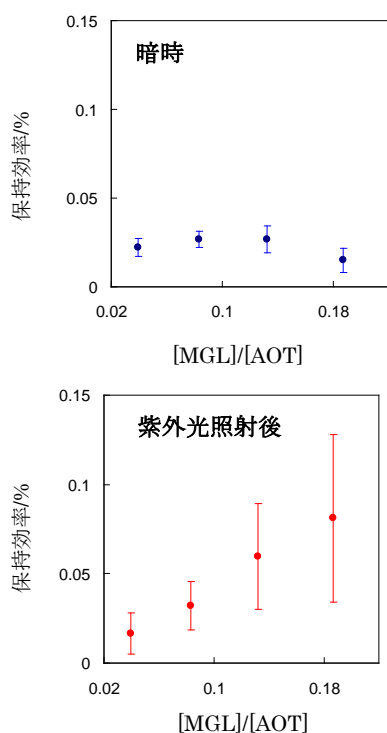


図3 AOT-MGL系における保持効率の変化 ([AOT] + [MGL] = 0.5 wt%)

暗時では、いずれのAOTとMGLの割合でも保持効率は低いが、紫外光照射後では保持効率の上昇が得られた。特に、[MGL]/[AOT] = 0.13

以上の割合では、暗時に比べて明確な保持効率の増加が見られた。疎水基のかさ高いAOTは親水基のかさ高いMGLと相互作用することにより、SOS-MGL系に比べて二分子膜が形成されやすかったためと考えられる。また、[MGL]/[AOT]が0.186以上の割合では、暗時においてMGLがAOTに溶解しなかったため、サンプルが得られなかった。

(2) 暗時におけるミセル状態の評価

N,N-ジメチルアニリンとピレンはエキシプレックスを形成することが知られている (*J. Phys. Chem. A*, 2001, **105**, 9077)。また、ピレンはミセル中では脂溶性の高い中心部に存在することが分かっている (*Langmuir*, 1988, **4**, 942)。つまり、*N,N*-ジメチルアニリン部位を有するMGLはピレンとエキシプレックスを形成することができ、このエキシプレックスの存在から、MGLが疎水的環境にあることが示唆できる。そこで、AOT溶液中のピレンと、AOTとMGLを含む溶液中のピレンの蛍光スペクトルを調べた(図4)。MGLが含まれていない場合には、ピレンの蛍光に由来するピークが350-450 nm付近に現れ、このピレン濃度では、ピレンの二量体に由来するピークは見られなかった。一方で、これにMGLを加えたサンプルでは、ピレンの蛍光ピークに加え、490 nm付近に新たなピークが認められた。これは、MGLの*N,N*-ジメチルアニリンとピレンのエキシプレックスに由来するピークであると考えられる。この結果により、暗時の溶液中でMGLがピレンと同じ脂溶性環境、つまりAOTミセルの中心に存在することが確認された。

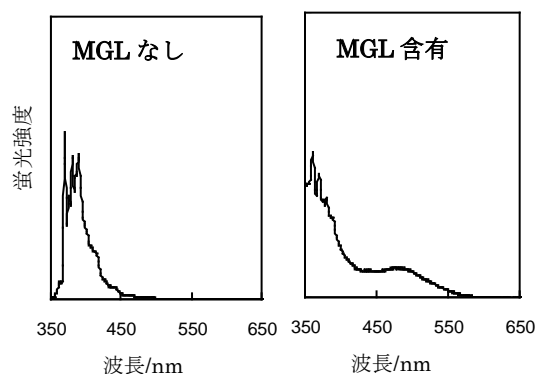


図4 AOT溶液中のピレンの蛍光スペクトル

[ピレン] = 10^{-6} M, [AOT] = 9 mM, [MGL] = 1.68 mM, 励起波長 337 nm

(3) 透過型電子顕微鏡による評価

MGLを含むAOT溶液に光照射を行うことで、ベシクルの形成が保持効率の増加により示された(図3)。さらにベシクル形成の直接

的な証拠を得るために、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた観察を行った。紫外光照射後のサンプルの TEM 像を図 5 に示す。

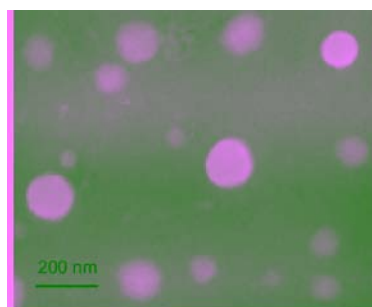


図 5 紫外光照射後の AOT-MGL 溶液の TEM 像

[AOT] = 9 mM、[MGL] = 1.68 mM、ネガティブ染色

ベシクルに対応した直径 10nm から 200nm の球状の像が観察され、ベシクル形成の直接的な証拠が得られた。一方、紫外光を照射していないサンプルでは、このような球状の像は観察されなかった。また、紫外光を照射したサンプルでも、[MGL]/[AOT] > 0.13 の割合ではベシクルが確認されたが、[MGL]/[AOT] < 0.1 ではベシクルは全く観られなかった。この結果は、図 3 の保持効率の上昇と良い対応を示している。

(4) グルコースオキシダーゼのカプセル化光によるミセル-ベシクル相転移をマイクロ領域での反応制御に展開するために、グルコースオキシダーゼのカプセル化を行った。図 3 からグルコースの保持効率の結果が得られているため、グルコースと反応する物質としてグルコースオキシダーゼに着目した。

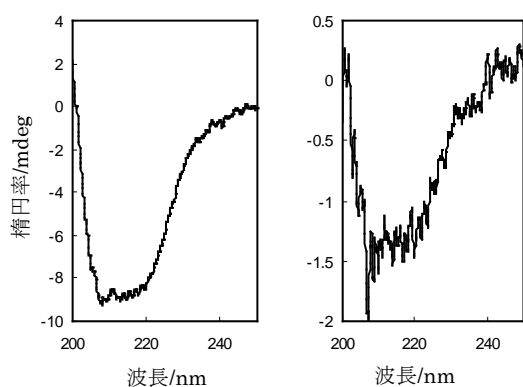


図 6 グルコースオキシダーゼの CD スペクトル

左: 40.3×10^3 units/L グルコースオキシダーゼ、右: グルコースオキシダーゼ内包ベシクル

グルコースオキシダーゼの分子量は 18 万を超えるため、グルコースで用いた透析による分離は適していない。そこで、ゲルろ過によるグルコースオキシダーゼ内包ベシクルの調整を試みた。充填剤には Sephacryl-S300 を用いた。流量 5-10mL のフラクションにグルコースオキシダーゼを内包したベシクルが存在することが分かった。図 6 に、ゲルろ過により調整したグルコースオキシダーゼ内包ベシクルと、ネイティブグルコースオキシダーゼの円二色性 (CD) スペクトルを示す。ベシクルに内包されなかったグルコースオキシダーゼは除去されたため、全体の濃度が低く楕円率は小さくなっているが、ベシクル内のグルコースオキシダーゼは、ネイティブのグルコースオキシダーゼと同じ二次構造を持つことが示された。

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 1 件)

① Ryoko M. Uda, Eri Hiraishi, Ryo Ohnishi, Yoshio Nakahara, Keiichi Kimura, Morphological Changes in Vesicles and Release of an Encapsulated Compound Triggered by a Photoresponsive Malachite Green Leuconitrile Derivative, *Langmuir*, 査読有、26 巻、2010、5444-5450

[学会発表] (計 2 件)

① 杵岡拓哉、櫻井芳昭、宇田亮子、光応答性マラカイトグリーン誘導体含有ベシクルの融合を用いた酵素反応の制御、日本化学会第 89 春季年会、2010 年 3 月 28 日、近畿大学

② Ryoko M. Uda, Keiichi Kimura, Photoinduced transition from micelle to vesicle by Malachite Green leuconitrile derivative, XXII IUPAC Symposium on Photochemistry, 2008 年 7 月 31 日、Gothenburg, Sweden

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇田 亮子 (UDA RYOKO)

奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・准教授

研究者番号：90321463

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし