

平成22年6月10日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20760491

研究課題名（和文） 静電場多体間相互作用によるバイオプラットフォームの構築

研究課題名（英文） Formation of bio-platform utilizing interaction between many-bodies in static electric field

研究代表者

石崎 貴裕（ISHIZAKI TAKAHIRO）

独立行政法人産業技術総合研究所・サステナブルマテリアル研究部門・研究員

研究者番号：50397486

研究成果の概要（和文）：官能基の異なる有機分子を利用した自己組織化単分子膜を作製し、その表面上での静電ポテンシャルのゆらぎの状態を明らかにした。また、その表面上での細胞接着および細胞の分化、増殖、アポトーシスで重要な役割を果たすタンパクの吸着に及ぼす静電ポテンシャルの影響を調査した。

研究成果の概要（英文）：Self-assembled monolayers with different chemical properties were formed on Si substrate. The effects of chemical properties on the electrostatic potentials on the surfaces were revealed. The effects of the electrostatic potentials on the protein adsorption that plays important roles in adhesion, differentiation, proliferation, and apoptosis of cells were also investigated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：表面科学、バイオマテリアル

科研費の分科・細目：材料工学・材料加工・処理

キーワード：自己組織化、静電ポテンシャル、生体分子

1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジー時代の到来とともに、ナノメートルスケールの微細加工技術が急速に進展した。ナノメートルスケールのパターンを作製し、このパターンをテンプレートに用いた微粒子の位置選択的固定化技術や無機・有機材料の位置選択的固定化技術が多くの研究者により確立されている。これらの位置選択的固定化技術は、基材表面の物理化学的性

質の差違、例えば、表面の疎水・親水性、静電的相互作用、立体的斥力等を利用して行われている。現在の研究の主流は、パターンより小さいサイズの材料を、基材上に、位置選択的に固定化することである。一方、生物に着目してみると、特異的な複数の分子間力を複数の分子同士が認識して構造を形成し、機能を発現している。例えば、生物の遺伝情報を司るDNAは4種類のみの塩基から構成され

ている。その構造は、近距離的には無秩序配列し、中距離的には特定の塩基がパーコレーションすることにより螺旋構造をとっている。この構造から導き出される情報伝達機能こそが生物の進化を支えてきたのは言うまでもない。また、生物を構成している細胞などは、自分のサイズよりも小さいサイズを有するタンパク質などを認識し、生命活動に必要な役割を果たしている。このような認識機能の主要な相互作用には、疎水性相互作用や静電的相互作用、水素結合などがあることが知られている。これらの相互作用は、いわゆる、分子間力である。分子間力の中では、遠距離まで相互作用が働く静電的相互作用が重要となる。静電的相互作用が及ぼす材料の位置選択的固定化への影響を調べるために、微細加工技術を利用したパターン化表面の作製が行われている。これらの作製技術は、いわゆる、トップダウン的アプローチである。一方、自己組織化単分子膜は、有機分子の自己組織化を利用したボトムアップ的アプローチで膜を形成する。複数の有機分子を自己組織化的に基材表面に形成させることにより、同一表面上に異なる表面電荷を有する領域を自己組織的に作製することが可能である。自己組織化単分子膜は、雪の結晶のようなドメイン構造を有しながら成長することが知られているが、複数の有機分子を用いて自己組織的に膜を形成させることにより、分子同士の立体的な引力や斥力を介して、新規形状のドメイン構造を形成できる可能性がある。このような表面上では、静電ポテンシャルに大きなゆらぎが生じるので、分子、タンパク質、細胞等の表面に対する認識機能が通常の場合と異なり、特異的な認識を行う可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、以下の項目に着目し、有機分子同士、分子と細胞、あるいは有機分子のドメインサイズと細胞等の静電場多体間相互作用についての検討を行うことを目的とした。

- ① 2種類の異なる表面官能基を有する有機分子を利用し、自己組織的に静電ポテンシャルのゆらぎを有する表面を創製
- ② 3種類の異なる表面官能基を有する有機分子を利用し、自己組織的に静電ポテンシャルのゆらぎを有する表面を創製
- ③ 有機分子の官能基の種類や双極子が表面形成に及ぼす静電ポテンシャルのゆらぎへの影響
- ④ 有機分子のドメインサイズや形状と静電ポテンシャルの揺らぎの相関関係
- ⑤ 細胞の分化、増殖、アポトーシスに及ぼす静電ポテンシャルのゆらぎの影響

3. 研究の方法

本研究では、官能基の異なる有機分子を利用した自己組織化単分子膜を作製し、その表面上での静電ポテンシャルのゆらぎの状態を調査した。特に、極性を有する異なる分子同士の自己組織化により形成される表面の静電ポテンシャルのゆらぎの分布と分子の混合比などの関係について検討した。また、その表面上での細胞接着および細胞の分化、増殖、アポトーシスに及ぼす静電ポテンシャルの影響について調査した。

4. 研究成果

本研究では、はじめに、自己組織化プロセスを高度に制御するために、シリコン上の有機シラン系自己組織化単分子膜 (Self-assembled Monolayer, SAM) の自己組織化メカニズムに及ぼす反応条件 (末端官能基の対称性, 反応温度, 湿度) の影響について原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope, AFM), X線光電子分光 (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS), 微小角入射 X線回折測定 (Grazing Incidence X-ray Diffraction, GIXD), フーリエ変換赤外分光法 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR), 水滴接触角測定などを用いて検討を行った。反応性末端官能基の対称性が分子の配列状態に及ぼす影響を調べるために、反応性末端官能基に C3 の対称性を有するオクタデシルトリクロロシラン (Octadecyltrichlorosilane, OTS), 反応性末端官能基が非対称性であるオクタデシルメチルジクロロシラン (Octadecylmethyldichlorosilane, ODMS) およびオクタデシルジメチルクロロシラン (Octadecyldimethylchlorosilane, ODMS) 分子を用いて成膜を行った。図 1 に微小角入射 X線の測定結果を示す。反応性末端官能基

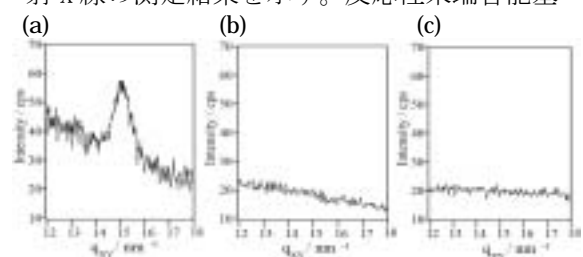


図 1. (a) OTS, (b) ODMS, (c) ODMS 有機単分子膜の GIXD 測定結果

に C3 の対称性を有する OTS 分子を原料に用いて成膜した場合、自己組織的に分子が集合し、高い配向性を示した。OTS 分子の 2 次元の配列の格子面間隔は 0.417nm であった (図 1(a))。一方、非対称性の反応性末端官能基を有する ODMS, ODMS 分子で成膜すると、その分子配列状態はアモルファスであった (図 1 (b), (c))。また、20℃以下の温度条件下で成膜した OTS-SAM の形成初期段階では、

有機分子がドメイン構造を形成しながら二次元的に成長した(図2)。一方、高温下

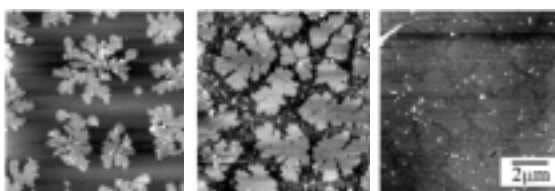


図2. OTS-SAMの成長過程の表面形状像

および気相法で成膜した OTS-SAM は、基板上で乱雑に成長し、その配列状態はアモルファスであった。高温で成膜した OTS-SAM に比べて、低温で成膜した OTS-SAM の配向性および分子密度は高く、その配列状態は規則的であった。また、低湿度で成膜した OTS-SAM に比べて、高湿度(35%以上)で成膜した OTS-SAM は、配向性および分子密度が高く、その配列状態は規則的であった。

以上の結果、この有機シラン系 SAM は、形成初期段階で分子同士の分子間相互作用による自己集合により、ドメイン構造を形成することがわかった。さらに、この形成初期段階でのドメイン構造のサイズは、成膜条件の制御により、ナノからマイクロサイズまで制御できることを明らかにした(図3)。

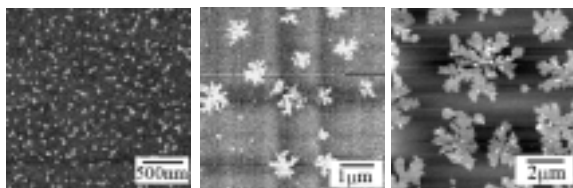


図3. 様々な成膜条件下で形成した初期段階でのドメイン構造の表面形状像

この自己集合のメカニズムを利用して、メチル・アミノ 2 元有機シラン系 SAM を作製し、ケルビン力顕微鏡やゼータ電位測定により、2 元 SAM の表面特性の測定を行った。図4(a)にメチル・アミノ 2 元有機シラン系 SAM の表面電位像を示す。図中で明るい部分は表面電位が高く、暗い部分は表面電位が低い。表面形状像との比較から、図4(a)中の暗い部分がメチル基に相当し、明るい部分がアミノ基に相当する。アミノ基末端部の表面電位は、メチル基末端部よりもおよそ 50 mV 高い。この表面電位の差は、分子の双極子モーメントに起因する。ケルビン力顕微鏡から分かるように、ドメインサイズの変化によりメチル・アミノ 2 元有機シラン系 SAM の表面電位の分布が変化した。表面電位のゆらぎが表面特性に及ぼす影響を調べるために、ドメインサイズの異なるメチル・アミノ 2 元有機シラン系 SAM のゼータ電位測定を行った。図4(b)にメチル・アミノ 2 元有機シラン系 SAM のゼータ電位の pH 依存性を示す。メチル基に起因するドメインサイズの増加に伴い、等電位点を示す pH は大きくなった。これらの結果は、ドメインサイズの制御により 2 元 SAM の表面

電位ゆらぎが制御可能であることを明らかにした。

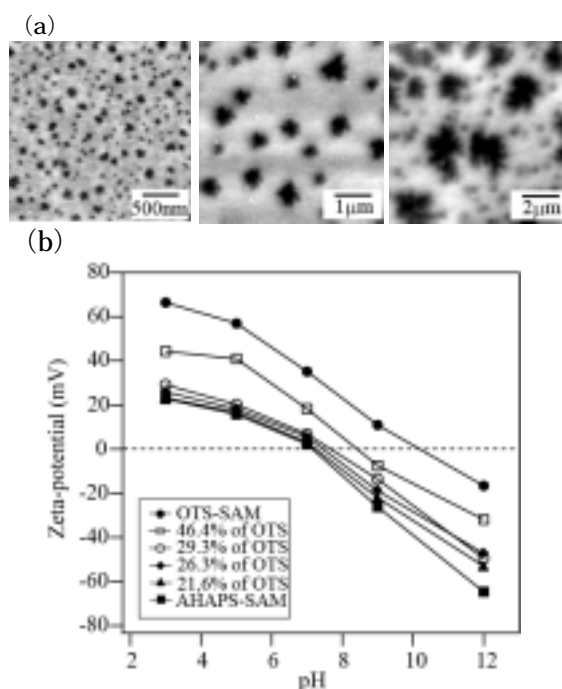


図4. (a) 様々な成膜条件下で形成したメチル・アミノ 2 元有機シラン系 SAM の表面電位像、および (b) ゼータ電位の pH 依存性

次に、確立した自己組織化プロセスにより、シリコンをはじめとした数種類の基材上に異なる官能基を有する有機シラン系自己組織化単分子膜 (Self-assembled Monolayer, SAM) を形成させ、その表面上での生体分子の吸着挙動に関する検討を行った。その結果、OTS-SAM 表面(疎水性)では、溶液滴下 30 秒後に、吸着層が高密度に形成され(図5)、600 秒後には、凝集体の形成が確認された。このような凝集体の形成は、OTS-SAM と HPF の疎水性相互作用に起因する。PEG 表面上(疎水性)では、末端にある CH₃ 基の影響により、HPF 同士が凝集して吸着していったが、PEG 鎖のゆらぎにより、網目状に吸着が進行した。PEG 中の主鎖のエーテル結合(自由度が大きい)に起因するゆらぎにより、HPF の吸着阻害が生じるが、末端メチル基の影響により、吸着した HPF は疎

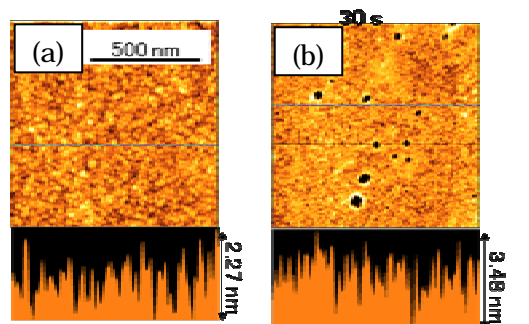


図5 OTS-SAM 上に吸着した HPF の表面形状像 (a) 吸着前、(b) HPF 溶液滴下 30 秒後

水性表面と同様に高密度で凝集した。一方、親水性表面である AHAPS 上では、HPF は疎水性表面に比べ低密度に吸着した。600 秒後には、局所的に凝集した HPF が観察された。より親水性の高い OH 表面上では、HPF は AHAPS 表面の場合と同様に、低密度で吸着した。600 秒後も、吸着した HPF の密度は低いままであった。これらの吸着挙動の違いの原因を調査するために、HPF および各種基板表面のゼータ電位測定を行った。pH7.7 の PBS 溶液における HPF のゼータ電位は-8.7mV と負の値を示した。OTS, PEG, AHAPS, OH 表面のゼータ電位はそれぞれ-19.1, -25.1, -24.2, -33mV であった。HPF に対する基板表面の静電的斥力の大きさの序列は、OH 表面>APAHS 表面=PEG 表面>OTS 表面である。すなわち、HPF の基板表面への吸着のしやすさの序列は、OTS 表面>PEG 表面=APAHS 表面>OH 表面になることを明らかにした。

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 4 件)

- ① T. Ishizaki, N. Saito, O. Takai, Correlation of Cell Adhesive Behaviors on Super-hydrophobic, Super-hydrophilic, and Micropatterned Super-hydrophobic/Super-hydrophilic surfaces to their surface chemistry, *Langmuir*, 26, 2010, 8147-8154.
- ② S. H. Lee, T. Ishizaki, N. Saito, O. Takai, Effect of Humidity and Solution Age on Growth of Organosilane Self-Assembled Monolayers, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 47, 2008, 6416-6421.
- ③ S. H. Lee, T. Ishizaki, N. Saito, O. Takai, Surface Characterization of Binary Nano/Micro Domains Composed of Alkyl and Amino-Terminated Self-Assembled Monolayers, *Appl. Surf. Sci.*, 254, 2008, 7453-7458.
- ④ S. H. Lee, T. Ishizaki, N. Saito, O. Takai, Effect of Reaction Temperature on Growth of Organosilane Self-Assembled Monolayers, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 47, 2008, 6442-6447.

[学会発表] (計 3 件)

- ① T. Ishizaki, N. Saito, O. Takai, Cell adhesion behaviors on micropatterned super-hydrophobic/super-hydrophilic surface, Florida Chapter of the AVS Science and Technology Society (FLAVS32), March 2010, Florida, USA
- ② T. Ishizaki, N. Saito, O. Takai, Adsorption Behaviors of Human Plasma

Fibrinogen on Micro-domains Composed of Binary Self-Assembled Monolayers terminated with Methyl and Amino groups by Scanning Probe Microscopy, European conference on surface science (ECOSS 26), Sep 2009, Parma, Italy

- ③ Y. Miyahara, T. Ishizaki, N. Saito, O. Takai, Adhesion Control of Bacteria with Micropatterned Super-hydrophobic/Super-hydrophilic and Super-hydrophobic/Poly(ethylene glycol) Surfaces, INTERFINISH2008 17th WORLD INTERFINISH CONGRESS & EXPOSITION, June 2008, Busan, Korea

[図書] (計 2 件)

- ① N. Saito, T. Ishizaki, J. Hieda, S. Fujita, O. Takai, Wiley-VCH, *New Industrial Plasma Technology*, Chapter 17, Hydrophilicity and Bioactivity of a Polyethylene Terephthalate Surface Modified by Plasma-Initiated Graft Polymerization, 2010, 15.
- ② 石崎貴裕, 齋藤永宏, 高井治, 株式会社シーエムシー出版, *撥水・撥油の技術と材料—機単分子膜処理による超はっ水ナノ分子ペーパーの作製*, 2008, 207-221.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石崎 貴裕 (ISHIZAKI TAKAHIRO)
独立行政法人産業技術総合研究所・サステナブルマテリアル研究部門・研究員
研究者番号：50397486