

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21710117

研究課題名（和文） 自己組織化ナノチューブハイドロゲルによるバイオ分離デバイス創出

研究課題名（英文） Construction of Separation Systems for Biomacromolecules by Using Self-Organized Nanotube Hydrogels

研究代表者

亀田 直弘 (KAMETA NAOHIRO)

独立行政法人産業技術総合研究所・ナノチューブ応用研究センター・研究員

研究者番号：20517297

研究成果の概要（和文）：室温下、pH に応答して形成可能な自己組織化ナノチューブハイドロゲルの開発に成功した。ナノチューブ同士が形成する三次元網目構造のナノ・マイクロ空間、ナノチューブ自身の一次元中空シリンダー(ナノチャンネル)といった2つの独立した空間を有するナノチューブハイドロゲルをキャピラリー内に充填し、バイオ高分子の電気泳動分離を行った。イメージング技術を駆使し、内径約8nmのナノチャンネルがDNAの高効率分離場として機能することを実証した。

研究成果の概要（英文）：Novel wedge-shaped amphiphiles self-organized in water to form nanotube hydrogels responding on pH stimulus. The nanotube hydrogel possessed two independent spaces consisting of three-dimensional meshworks formed between nanotubes and one-dimensional hollow cylinder of the nanotube itself. Introduction of the nanotube hydrogel as sieves into the capillary electrophoresis allowed to construct a separation system for biomacromolecules. Imaging technique showed that the one-dimensional hollow cylinder of the nanotube with 8 nm inner diameter acts as a functional space for the DNA separation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノ材料、自己組織化、ナノチューブ、ハイドロゲル、DNA、分離

1. 研究開始当初の背景

生命科学や医療分野では、限られたサンプルや高価な分析試薬に対応した簡易且つ迅速に行える超微量分析手法の開発が望まれ、これまで様々なマイクロチップデバイスが開発されてきた。マイクロチップを用いた電気泳動によるDNAの分離は、マイクロチャンネル内に分離媒体として充填した高分子架

橋ハイドロゲルの三次元網目構造からのすりぬけやすさの違い(分子ふるい効果)を利用して行われるのが一般的である。しかしながら、マイクロチャンネル内へ高粘性の高分子ハイドロゲルを充填することが困難であること、三次元網目構造の空孔サイズに大きなばらつきがあることなどが、分離効率の低下を招き、また分子量が異なるDNAの一斉分析

には不向きである。近年これらの問題点を克服するため、トップダウンテクノロジーに代表される半導体微細加工技術により構築した数百ナノメートルサイズの柱状構造体(ナノピラー)や異方性障壁、ボトムアップテクノロジーにより構築した数十ナノメートル径の高分子ナノ粒子(ナノボール)や磁性粒子をマイクロチャンネル内に導入した分離デバイスが開発された。ナノピラーを用いた系は、5万塩基以上のDNAの高速分離を達成できたが、ナノピラーの直径や間隔に起因して分子量が小さなDNAの分離は困難であった。現在の半導体微細加工技術では、シリコン以外の材料を100 nm以下に加工することは難しいとされている。一方ナノボールを用いた系は、数百~1万塩基の全DNAの一斉分離を可能にした。しかしながら、ナノボールの調製には重合反応を含む多段階のステップ、サイズ分画を要するだけでなく、粒子サイズを数ナノメートル単位で制御することや表面官能基を均一に配置することは不可能であった。

一方、研究代表者はこれまで、的確な分子設計を施した両親媒性分子を水中で自己組織化させることで形成するチューブ状ナノ構造体(以後ナノチューブと略す)の開発に取り組んできた。その結果、内径が数ナノメートル以内の誤差範囲で制御され、世界に類を見ない非対称内外表面特性を有したナノチューブの構築に成功している。内表面のみにカチオン性官能基を導入したナノチューブは、タンパク質や二重らせんDNAといったアニオン性バイオ高分子を静電引力によりその中空シリンダーへ選択的且つ効率的に包接可能であることを見出している。

2. 研究の目的

ナノチューブの一次元中空シリンダーが、バイオ高分子の分離場を兼ねたナノ流路として機能する可能性を期待した。そこで、ナノチューブの特性を生かしつつ、それらの高次階層化によって得られる水ゲル(世界初)を「分子ふるい」としてキャピラリー内に実装したバイオ分離デバイスを構築することを目的とした。まず、マイルドな条件下、オンデマンドに形成可能な刺激応答型ナノチューブ水ゲルの開発を目指した。均一且つ高密度にナノチューブ水ゲルをキャピラリー内に充填する手法を確立し、バイオ高分子の電気泳動分離を試みる。特にナノチューブの一次元中空シリンダーにおけるバイオ高分子の泳動挙動を解析するためのイメージングシステムを構築し、分離機構について検討した。さらに、ナノチューブ水ゲルに束縛された水の物性解析を行い、バイオ高分子の分離に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) ナノチューブ水ゲルを分離媒体に用いたバイオ高分子の電気泳動分離

疎水部メチレン鎖の両端にそれぞれグルコース残基、オリゴグリシン残基を連結した両親媒性化合物1、そしてエチレンジアミンの両端にそれぞれアゾベンゼン、オリゴグリシン残基を連結した両親媒性化合物2を合成した(図1)。化合物1、2の水中における自己組織化挙動、ゲル化能、外部刺激応答能を詳細に検討した。自己組織化体の形態観察及び分子パッキング解析は、各種電子顕微鏡、各種分光測定により行った。ナノチューブ水ゲルを溶融シリカキャピラリー(15 cm, ϕ 50 μ m)に充填し、DNA Ladder (タカラバイオ, 20 bp (20–500 bp), 50 bp (50–1500 bp), 100 bp (100–1500 bp))の電気泳動分離を行った。

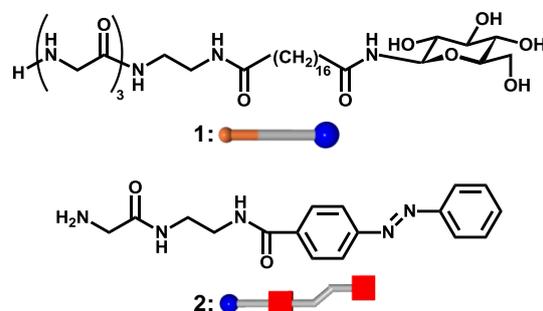


図1. 両親媒性化合物1, 2の構造式

(2) ナノチューブチャンネルにおけるバイオ高分子の泳動挙動

化合物1から成るナノチューブ水ゲルを凍結乾燥後、水中へ再分散させ、超音波処理を行い、孤立分散状態のナノチューブを調製した。ナノチューブと蛍光ドナー分子として4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラザン(NBD-F)を水/アセトニトリル溶液中、60 $^{\circ}$ Cで1分間加熱し、ナノチューブ内表面アミノ基にNBDを共有結合を介して修飾した。NBD修飾ナノチューブと蛍光アクセプター分子DABCYLを修飾したオリゴDNA(Eurogentec, 20量体, 25量体, 30量体)を混合し、蛍光スペクトル測定、時間分解蛍光顕微鏡観察を行った。

化合物1から成る孤立分散ナノチューブの中空シリンダーに環境応答プローブである8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸(ANS)を包接し、蛍光スペクトル測定及び蛍光寿命測定を行った。

4. 研究成果

(1) ナノチューブ水ゲルを分離媒体に用いたバイオ高分子の電気泳動分離

化合物1の弱酸性水分散水溶液に塩基を添加すると瞬時に水ゲルが形成した。

ハイドロゲル内では、内径約 8 nm の中空シリンドラーを有し、長さ数~数十 μm に及ぶナノチューブが形成していることが明らかとなった(図 2)。赤外分光測定により、化合物 1 がトリグリシン部位でポリグリシン II 型の多点水素結合ネットワークを形成していること、またオリゴメチレン鎖の副格子構造が三斜晶系平行型をとることが分かった。これより、ナノチューブは、化合物 1 が平行にパッキングした単分子膜構造を有すること、また電子顕微鏡観察より見積もった膜厚 3 nm は化合物 1 の分子長 4.64 nm に近似していることから一枚の単分子膜から構成されていることが分かった。

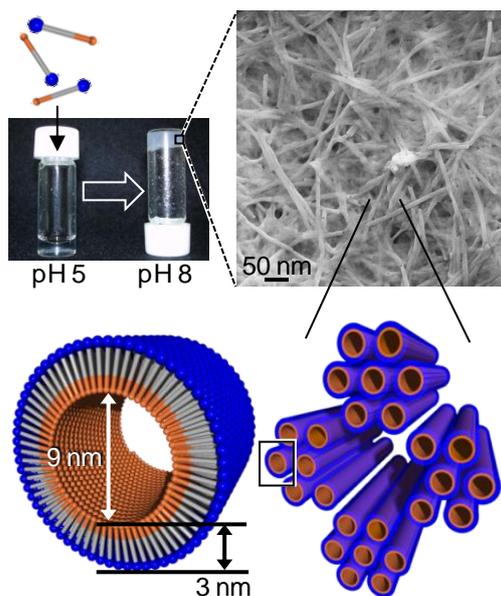


図 2. 化合物 1 から成る pH 応答型ナノチューブハイドロゲル

化合物 2 を中性 pH 付近の水に加熱分散後、室温まで徐冷することで自己集合を行ったところ、内径約 20 nm、二分子膜構造から成るナノチューブが形成することが明らかとなった(図 3)。ナノチューブに紫外光を照射すると、アゾベンゼン部位のトランス \rightarrow シス構造異性化に伴い、シリンダー状ナノファイバーへと形態変化が観察された。そこにさらに可視光を照射するとアゾベンゼン部位が完全にトランス体に戻るとともに、ヘリカルナノテープへの形態変化がさらに起った。また、このような光照射による形態変化が、ナノチューブの中空シリンドラーに包接したゲストのバルク水中への放出を著しく促進できることを見出した。

化合物 1 の弱酸性水分散水溶液をキャピラリーに充填後、水酸化ナトリウム水溶液をインジェクションし、光学顕微鏡により、ナノチューブハイドロゲルの形成過程をモニタリングした。キャピラリーの端からハイドロゲルが形成していく様子が観察されたが、

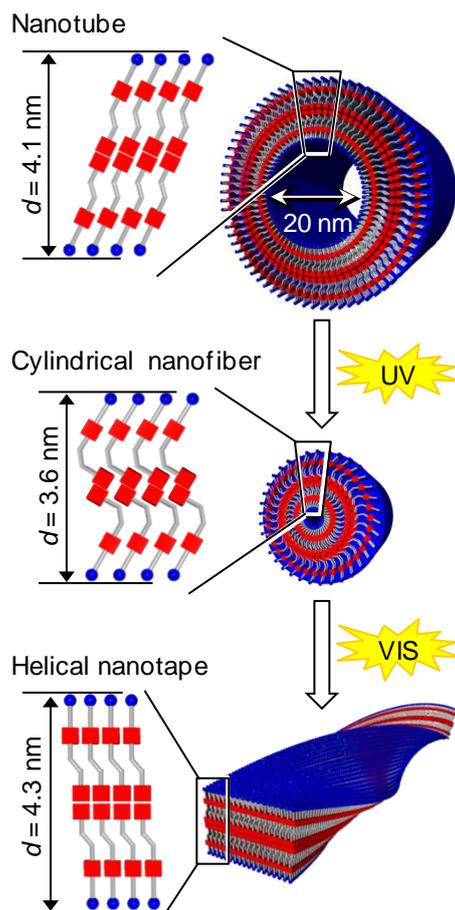


図 3. 化合物 2 から成る光刺激応答性ナノチューブ

部分的に空隙が生じた。そこで、化合物 1 の弱酸性水分散水溶液と化合物 2 から成るナノチューブの孤立分散水溶液の混合溶液をキャピラリーに充填後、紫外光及び可視光の照射を行った。化合物 2 から成るナノチューブの中空シリンドラーには、あらかじめ塩基性アミノ酸であるリシンをゲストとして包接した。その結果、ナノチューブハイドロゲルを均一且つ高密度にキャピラリーに形成させることに成功した(図 4)。光照射によって、化合物 2 から成るナノチューブのヘリカルナノテープへの形態変化とそれに伴うリシンの放出、そして塩基性環境になったことで化合物 1 がナノチューブハイドロゲルを形成したものと解釈できる。

ナノチューブハイドロゲルを実装したキャピラリーを用いて DNA の電気泳動分離を行った。50 bp 以下の DNA については、分離の再現性が得られたが、100 bp 以上の DNA については再現性が全く得られなかった。分離操作後、キャピラリー内の状態を調べたところ、ナノチューブ自身の形態に変化は見られなかったものの、ハイドロゲルの収縮・相分離が起っていること、即ちナノチューブ同士が

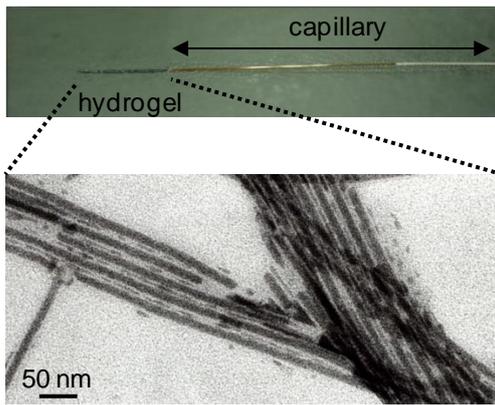


図 4. ナノチューブハイドロゲルを実装したキャピラリー(上図、ハイドロゲルはキャピラリーから溶出させた)とナノチューブの電子顕微鏡像(下図、リンタングステン酸によって黒色に染まった箇所がナノチャンネル)

形成する三次元網目構造が大きく変化していることが明らかとなった。ナノチューブハイドロゲルは、pH や塩に対しては非常に安定なことから、印加電圧が収縮・相分離の要因であることが示唆された。分子ふるいとして機能すべきナノチューブ同士が形成する三次元網目構造の均一性及び空孔サイズに変化が生じたため、特に 100 bp 以上の長い DNA の分離再現性が得られなかったと考えられる。一方、分離再現性が得られた 50 bp 以下の短い DNA については、ナノチューブ自身の内径約 8 nm の中空シリンダーを泳動することが可能であったと考えられる。

(2) ナノチューブの一次元中空シリンダー(ナノチューブチャンネル)におけるバイオ高分子の泳動挙動

NBD 修飾ナノチューブ分散水溶液に DABCYL 修飾オリゴ DNA 分散水溶液を添加した直後の時間分解蛍光顕微鏡像を示す(図 5)。時間経過に従い、ナノチューブの NBD に由来する直線状蛍光イメージが、その端から消光していく様子が観察された。蛍光スペクトル解析により、この現象がナノチューブチャンネルに包接された DABCYL 修飾オリゴ DNA とナノチューブ内表面に修飾された NBD 間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に起因することが明らかとなった。即ち FRET と時間分解蛍光顕微鏡観察を組み合わせることにより、ナノチューブチャンネルにおける DNA の泳動挙動を可視化することに成功した。

DABCYL 修飾オリゴ DNA のナノチューブチャンネル内を移動した距離の二乗(X^2)をそれに要した時間(Δt)に対してプロットしたところ、拡散係数(D)の一般式($X^2 = 4D\Delta t$)を表わす一次の直線関係を示した。傾きから算出した D は、動的光散乱測定により別に求めたバルク水中のそれよりも著しく小さく、制限空間に

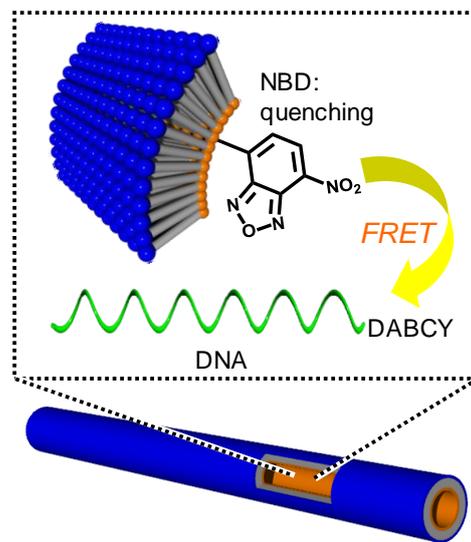
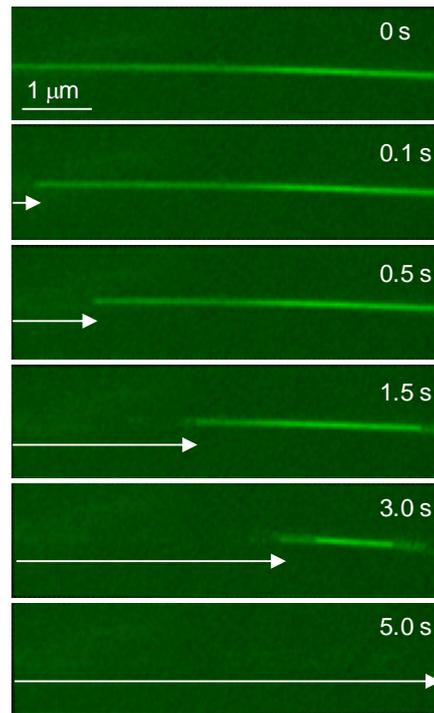


図 5. DABCYL 修飾オリゴ DNA 添加直後の NBD 修飾ナノチューブの時間分解蛍光顕微鏡像と FRET 機構

おいては物質の拡散が抑制されるという理論を反映していた。また、ナノチューブチャンネルのプロトン化した内表面アミノ基はカチオン性を帯びており、アニオン性の DNA との静電相互作用も D の減少要因と考えられる。ナノチューブチャンネルに包接した ANS の蛍光寿命及びスペクトルシフトの解析より、ナノチューブチャンネル内の水が、バルク水と比較して、10%程度極性が低下、2 倍程度粘性が増大していることが明らかとなった。このような束縛水の存在も D の減少要因と考えられる。バルク水中におけるオリゴ DNA の D は、塩基数に依存せずほとんど同じ値を示した。一方、

ナノチューブチャンネルにおけるオリゴ DNA の D は、塩基数が大きくなるほど、小さくなっていった。これは、ナノチューブチャンネルを拡散泳動させることで 5 塩基数の差しかない DNA を分離できることを示している。

以上の結果より、ナノチューブチャンネルといった超微小空間を利用した新たな DNA の分離デバイス創出の可能性を提示することができた。今後、ナノチューブ 1 本を基盤上に配置し、検出システムを組み合わせることで、DNA の一塩基差分分離、単一分子分析の実現が期待できる。

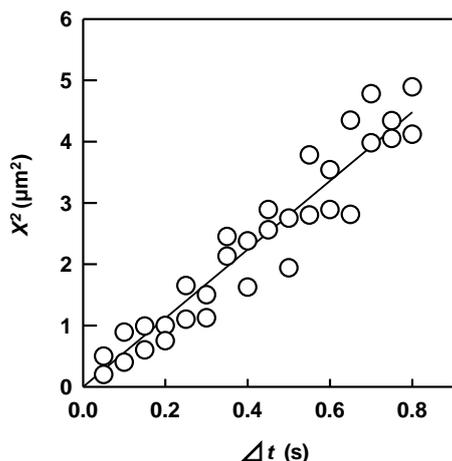


図 6. ナノチューブチャンネルにおける DNA (25 量体) の泳動距離とそれに要した時間の関係

表 1 ナノチューブチャンネル及びバルク水中における DNA の拡散係数

DNA	in bulk [m^2s^{-1}]	in nanotube [m^2s^{-1}]
20 mer	3.5×10^{-10}	0.033×10^{-10}
25 mer	3.3×10^{-10}	0.012×10^{-10}
30 mer	3.3×10^{-10}	0.0083×10^{-10}

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 Naohiro Kameta, “Liquid-Phase Nanospace Chemistry of Self-Organized Nanotube Channels”, *Bunseki Kagaku*, (2011), (査読有り)
- ② Naohiro Kameta, Asuka Tanaka, Haruhisa Akiyama, Hiroyuki Minamikawa, Mitsutoshi Masuda, Toshimi Shimizu, “Photo-Responsive Soft Nanotubes for Controlled Guest Release”, *Chemistry-A European Journal*, vol. 17, pp. 5251-5255 (2011). (査読有り)
- ③ Naohiro Kameta, Hiroyuki Minamikawa,

Yuu Someya, Hiroharu Yui, Mitsutoshi Masuda, Toshimi Shimizu, “Confinement Effect of Organic Nanotubes Toward Green Fluorescent Proteins (GFP) Depending on the Inner Diameter Size”, *Chemistry-A European Journal*, vol. 16, pp. 4217-4223 (2010). (査読有り, インサイドカバー, Very Important Paper)

- ④ Naohiro Kameta, Kaname Yoshida, Mitsutoshi Masuda, Toshimi Shimizu, “Supramolecular Nanotube Hydrogels: Remarkable Resistance Effect of Confined Proteins to Denaturants”, *Chemistry of Materials*, vol. 21, pp. 5892-5898 (2009), (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Naohiro Kameta, Mitsutoshi Masuda, and Toshimi Shimizu, “Organic Nanotubes with a Confinement Nanospace for Biomacromolecules”, International Conference on Biomaterials Science 2011, 2011 年 3 月 16 日, つくば.
- ② Naohiro Kameta, Mitsutoshi Masuda, Toshimi Shimizu, “Supramolecular Nanotube Hydrogels Having a One-Dimensional Confined Nanospace and Three-Dimensional Meshworks for Proteins”, Pacificchem2010, 2010 年 12 月 17 日, ハワイ.
- ③ 亀田直弘, 田中明日香, 秋山陽久, 南川博之, 増田光俊, 清水敏美, “有機ナノチューブのナノ空間化学 (5): ゲスト放出制御のための光刺激応答性ナノチューブの構築”, 第 59 回高分子学会年次大会, 2010 年 5 月 28 日, 横浜.
- ④ 亀田直弘, 南川博之, 増田光俊, 清水敏美, “有機ナノチューブのナノ空間化学 (8): ゲストタンパク質の輸送拡散, 放出速度, 安定性に及ぼすナノチャンネルの内径効果”, 第 71 回分析化学討論会, 2010 年 5 月 16 日, 島根.
- ⑤ 亀田直弘, 田中明日香, 秋山陽久, 南川博之, 増田光俊, 清水敏美, “有機ナノチューブのナノ空間化学 (1): 光刺激応答性ナノチューブの創製とゲスト放出制御”, 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 29 日, 大阪.
- ⑥ 亀田直弘, 南川博之, 増田光俊, 清水敏美, “有機ナノチューブ空間のバイオ応用 (1): ナノチャンネルに包接された生体高分子の動的挙動と安定性”, SORST シンポジウム (4) ナノ空間材料その特性と魅力, 2010 年 1 月 29 日, 東京.
- ⑦ Naohiro Kameta, Kaname Yoshida, Mitsutoshi Masuda, Toshimi Shimizu, “Supramolecular Nanotube Hydrogel”,

GelSympo2009, 2009年12月3日, 大阪.
⑧亀田直弘, 吉田要, 増田光俊, 清水敏美,
“超分子ナノチューブハイドロゲルの構築
とタンパク質固定化特性”, 第58回高分子
討論会, 2009年9月16日, 熊本.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 光異性化基を有するアミド化合物及び
該化合物が自己集合してなる有機ナノ
チューブ並びにその製造方法

発明者: 亀田直弘, 増田光俊, 南川博之, 小木
曾真樹, 秋山陽久, 清水敏美

権利者: 独立行政法人 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2009-198319

出願年月日: 21年8月28日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/ntrc/ci/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀田 直弘 (KAMETA NAOHIRO)

独立行政法人産業技術総合研究所・ナノ

チューブ応用研究センター・研究員

研究者番号: 20517297

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: