

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：82626

研究種目：基板研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510106

研究課題名（和文）人工細胞膜を目指した安定なナノ構造分子膜構築に関する研究

研究課題名（英文）Fabrication of Stable Nano-Structured Membranes for Formation of Artificial Cell Membranes

研究代表者

澤口 隆博（SAWAGUCHI TAKAHIRO）

独立行政法人 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：50357175

研究成果の概要（和文）：新規に開発したホスホリルコリン誘導体分子を電極基板上に単分子膜形成させ、膜タンパクなどの生体分子を捕捉し安定に機能発現しうる、生体膜類似のナノ構造分子膜を構築した。金(Au)単結晶電極上に構築したナノ構造分子膜は、ホスホリルコリン部位がかなりかさ高く、ホスホリルコリン系分子はダブルストライプ状の配列構造を有した単分子膜であることが判明した。このナノ構造分子膜内に膜タンパク補足用リンカー分子を均一分散させることで、膜タンパクであるユビキノンを比較的再現性良く膜内に導入可能であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Newly synthesized phosphorylcholine derivatives were used to fabricate biomimetic and mono-molecular nano-structured membranes for stable introduction of biomolecules without loss of their functions. The nano-structured membranes formed on an Au(111) single crystal surface exhibited a closely packed monolayer with a double-stripe shaped structure due to relatively large bulkiness of a phosphorylcholine moiety. Reproducible introduction of ubiquinone membrane protein into the nano-structured membrane could be possible by using uniformly dispersed linker molecules capable of capturing the protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

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・ナノ構造科学

キーワード：表面・界面ナノ構造

1. 研究開始当初の背景

生体機能の高度利用技術は、省エネルギープロセスや環境調和型のシステムの構築の観点からもその必要性が益々高まりつつあ

り、生体分子の機能を電気信号（電流・電圧等）に効率良く変換しうるシステムの研究開発が進められている。このような情報変換システムとして、例えば、バイオセンサやバイ

オチップ等があり、生体内成分の医療計測や検査・診断、毒物や有害物質の環境安全性モニタリングに用いられている。これらは、ポストゲノム研究における有望な解析ツールとしても期待されている。また、微生物や生細胞を単位として生体機能を利用したバイオリアクターや生物電池等の環境浄化システムやクリーンなエネルギー変換系の研究開発や、生理活性物質の選択的合成や医薬品開発への展開も図られるなど、生体機能の高度利用技術の広がりが増しつつある。

一方、生体分子が持ち合わせている高機能性や高選択性は、生体分子がもつ立体構造や高次構造によって維持されていると言われており、これらは分子内や分子間で働く種々の相互作用に基づいている。また、細胞などの生体膜では、膜タンパクや脂質分子等によるラフトと呼ばれるマイクロドメイン構造が形成し、このような超分子集積構造が細胞機能に直結しているとも言われているものの、ラフトのような超分子集積構造と機能発現の関係は未だ解明されていない。このような生体分子の高度な生体機能を引き出して有効に利用するには、構造・機能の維持とともに機能発現のメカニズムについての理解が必要不可欠であり、脂質分子や膜タンパクが形成する膜構造や超分子集積体を分子レベルで解析し、構造と機能の因果関係について分子レベルでの解明が必須である。

2. 研究の目的

本研究は、表面修飾材料として新規に開発したホスホリルコリン系分子を電極基板上に単分子膜形成させ、膜タンパクなどの生体分子を捕捉し安定に機能発現しうる、生体膜類似のナノ構造分子膜を構築することを目的としている。このホスホリルコリン系分子は金電極基板上に化学結合するチオール基を有し、生体脂質分子の構造的類似性をもちつつ、物理的、化学的な安定性を重視して設計した人工的な脂質分子である。チオール基を介した結合により電極上での膜構造の安定化を図り、膜の集積状態の解析、膜を介した物質移動や電子移動反応を解析する。また、ナノ構造分子膜への非変性的な吸着や捕捉により膜タンパクを導入し、膜タンパク機能の発現に必要な膜特性を詳細に検討する。

具体的には、新規に開発したホスホリルコリン系分子によるナノ構造分子膜について、(1) 膜の基本特性、すなわち、膜の密度、物質透過性、電気化学特性等の評価、(2) 電気化学STMによる膜構造の分子レベル解析、(3) ツビッターイオン性であるホスホリル

コリン部位の界面構造の解明、(4) 膜タンパクを補足し安定に機能発現しうる分子設計の検討を行う。これにより、ホスホリルコリン誘導体の膜密度等を制御した電極基板表面修飾により、膜タンパク等を補足するナノ構造分子膜の構築が可能であり、ホスホリルコリン系分子による人工細胞膜の構築を目指した研究展開を図る。

3. 研究の方法

新たに開発したホスホリルコリン表面修飾材料は、細胞膜の天然脂質分子の構造的類似性と物理・化学的な安定性を兼ね備えた新しい分子である。よって、第一に、このホスホリルコリン系分子のナノ構造分子膜としての基本特性を電気化学計測により明らかにする。また、電気化学STMにより膜構造を分子レベルで明らかにする。次に、このナノ構造分子膜への膜タンパクの導入を試み、安定的な補足に必要な諸条件および機能の発現・維持に必要な膜特性について検討する。

具体的には、以下の検討を行った。

(1) 原子的に平滑な Au 単結晶電極を高純度金属線の火炎溶融法により溶融して自作し、この単結晶電極(111)表面上にチオール基を介した化学結合形成によりホスホリルコリン誘導体の新規ナノ構造分子膜を構築し、膜としての基本特性、電気化学特性等の評価を行う。

(2) 構築したナノ構造分子膜について、チオール-Au 結合の電気化学還元による切断に要する電気量から膜密度を決定する。また、フェロシアンイオンやヘキサアンミンルテニウムイオン等の酸化還元錯体を電気化学プローブとして、これらの錯体イオンがナノ構造分子膜内に侵入可能か否かを電気化学的に検証する。これにより膜としての基本特性、すなわち、膜の密度、膜の親水性・疎水性、物質透過性やイオンの透過性等について電気化学計測により評価する。

(3) 電気化学STMを用いてホスホリルコリン誘導体のナノ構造分子膜を溶液中でその場観察し、個々の分子がどのように配置しているのか解析する。ホスホリルコリン誘導体の分子配列や分子配向を明らかにし、印加する電気化学電位による膜構造の変化や安定性を検証する。また、ツビッターイオン性のホスホリルコリン部位の溶液中での直接構造解析を試み、膜構造や膜特性に及ぼす影響を明らかにする。

(4) ホスホリルコリン系ナノ構造分子膜への膜タンパクの捕捉・導入を検討する。ユビキノンおよびグラミシジン等を導入タンパクとして用い、ナノ構造分子膜内への非変性的

かつ安定に捕捉・導入する諸条件を検討する。ホスホリルコリン系ナノ構造分子膜の微細構造と、物質透過性、電気化学特性等、膜の基本特性との因果関係を分子レベルで検討し、人工細胞膜構築に必要な要素を明らかにする。

4. 研究成果

生体脂質分子と構造的類似性をもつ表面修飾分子として新規に開発したホスホリルコリン誘導体分子を電極基板上にチオール基等の表面結合基を介して単分子膜形成させることで、膜タンパクなどの生体分子を捕捉し安定に機能発現しうる、生体膜類似のナノ構造分子膜を構築した。電気化学計測および電気化学STMを用いた溶液中その場表面解析により表面の構造および機能の分子レベル解析を行った。その結果、以下のような研究成果が得られた。

(1) 新規に開発した一連のホスホリルコリン誘導体について検討したところ、チオール基を介した結合形成により金(Au)単結晶電極上にナノ構造分子膜を構築することで、Au-チオール結合の電気化学還元反応からその表面濃度は約 $5.2 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$ 程度で、ホスホリルコリン基のない分子膜よりも表面濃度が約 30%ほど低い単分子膜であることが判明した。さらに、電気化学計測および電気化学STMを用いて膜の基本構造、すなわち、膜の密度、分子配列や配向等の詳細な評価・検討を行った結果、①ホスホリルコリン部位がアルキル鎖に比べてかなりかさ高いこと、②そのためホスホリルコリン系分子はダブルストライプ状の配列構造を有している可能性が高いこと(図1)、③電気化学計測から算出された表面濃度 $5.2 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$ はダブルストライプ配列構造の表面濃度と一致

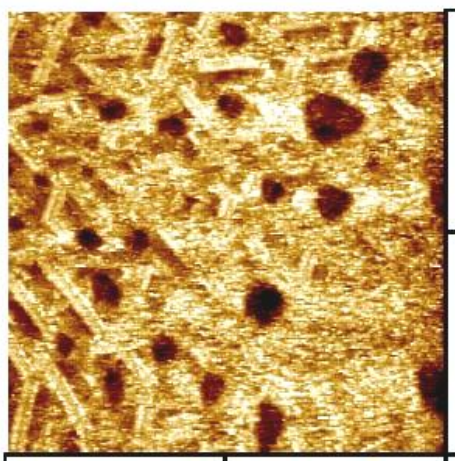


図1 ホスホリルコリン誘導体分子がAu(111)電極表面に形成したナノ構造分子膜ダブルストライプ構造のEC-STM像。
50nm×50nm.

していること等が判明し、ホスホリルコリン系分子が電極表面に形成するナノ構造分子膜の基本構造が概ね明らかになった。

(2) 一連のホスホリルコリン誘導体をAu電極以外の電極表面上に導入するため、種々の表面結合基を有する分子を設計し、カーボン(C)電極やシリコン(Si)電極の表面上へのナノ構造分子膜の構築を検討した。カーボン(C)電極表面への膜構築では、表面結合基としてアジド基、ジアゾニウム基を有するホスホリルコリン誘導体分子を検討した。アジド基は光化学反応で、ジアゾニウム基は電気化学的還元反応により表面結合を形成させることができ、どちらも安定なナノ構造分子膜を構築できることが分かった。表面濃度の計測のためフェロセン(Fc)を導入したFc-C12-ジアゾニウムでは表面濃度は $6.6 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$ で単分子膜であることが確認された(図2)。また、シリコン(Si)基板上へはエトキシシラン基を導入したホスホリルコリン誘導体がナノ構造分子膜の構築に有効であることが分かった。エトキシシラン基は反応性が高いため、多分子膜形成を抑制し単分子膜形成させるには、表面修飾溶液の濃度や修飾温度や時間等の制御が必要であるほか、有機溶媒に含まれる水の除去が極めて重要であることが判明した。

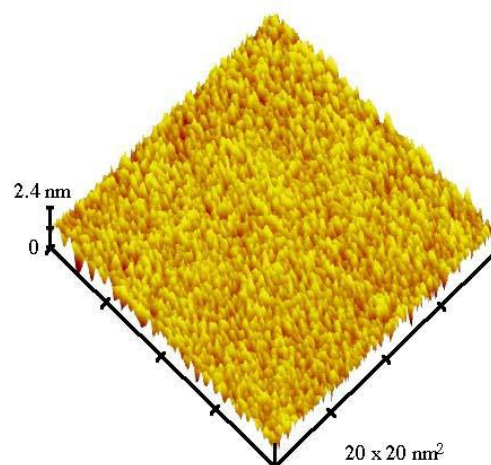


図2 ジアゾニウム基を有するフェロセン導入誘導体分子がカーボン(HOPG)表面に形成したナノ構造分子膜のEC-STM像。

(3) 膜タンパクのナノ構造分子膜内への導入時には、膜タンパクを膜内に固定・捕捉するリンカー分子を用いるが、このリンカー分子の電極表面での固定化状態を検討したところ、極めて緻密に固定化されることが分かった。このことはホスホリルコリン系分子によるナノ構造分子膜内に膜タンパク補足用リンカー分子の分散が可能であることが示唆された。

(4) ホスホリルコリン系分子によるナノ構造分子膜内に膜タンパク補足用リンカー分子の混合分散を詳細に検討したところ、リンカー分子が約 10%以下では、均一な混合分散が電気化学STM観察により確認され、ホスホリルコリン系分子のナノ構造分子膜が有する基本的な膜特性を損なわないことが分かった。また、膜タンパクとしてユビキノンをを用いた検討では所定の条件で比較的再現性良く膜内への導入が可能であることから、膜タンパクの非変性導入におけるいくつかの重要な技術要素が明らかになった。

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 田中睦生、澤口隆博、桑原正史、丹羽 修、
Surface Modification of Silicon Oxide with Trialkoxysilanes toward Close-Packed Monolayer Formation, Langmuir, 査読有、in press.
DOI: 1a-2013-009834.R1
- ② 平 修、金子大作、横山憲二、澤口隆博、
In Situ Scanning Tunneling Microscopy Study of Interfacial Structures of Self-Assembled Monolayers of 3-(2-Pyridithio)Propionyl Hydrazide on Au(111), Molecular Imaging & Dynamics, 査読有、in press.
DOI: 10.4172/2155-9937.S1-001
- ③ 田中睦生、澤口隆博、佐藤 縁、吉岡恭子、
丹羽 修、Surface Modification of GC and HOPG with Diazonium, Amine, Azide, and Olefin Derivatives, Langmuir, 査読有、vol. 27, 2011, 170-178.
DOI: 10.1021/la1035757

[学会発表] (計8件)

- ① 澤口隆博、ナノ構造分子膜の構築と分子レベル構造・機能解析、電気化学会第80回大会(招待講演)、2013年3月29日、東北大学(宮城県)。
- ② 澤口隆博、田中睦生、カーボン(HOPG)電極上に化学結合したナノ構造分子膜の構造・機能評価、電気化学会第80回大会、2013年3月29日、東北大学(宮城県)。
- ③ 澤口隆博、田中睦生、Interfacial Structure and Function of Nano-Structured Membranes of Newly Synthesized Phosphorylcholine Derivatives, PACIFIC RIM MEETING 2012 on Electrochemical and Solid-State Science, 2012年10月9日、Hilton

Hotel(Hawaii/米国)。

- ④ 澤口隆博、田中睦生、ホスホリルコリン新規ナノ構造分子膜の界面構造・機能評価、2011 電気化学秋季大会、2011 年 9 月 10 日、朱鷺メッセ(新潟県)。

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：表面修飾シリコン基板

発明者：田中睦生、澤口隆博、佐藤 縁、吉岡恭子、丹羽 修、

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2010-189219

出願年月日：2010 年 8 月 26 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤口 隆博 (SAWAGUCHI TAKAHIRO)

独立行政法人 産業技術総合研究所 バイ

オメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：50357175