

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：56101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25810129

研究課題名(和文) 単一粒子ナノ加工法によるセンサー機能を持つ高分子ナノアクチュエータ群の創成

研究課題名(英文) Fabrication of polymeric nano-actuators with sensor by the single-particle nanofabrication technique

研究代表者

大道 正明(Omichi, Masaaki)

阿南工業高等専門学校・その他部局等・助教

研究者番号：10625453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：単一の高エネルギー荷電粒子を高分子薄膜に照射することで、粒子の飛跡に沿った円柱状の領域に高密度にエネルギーが付与される。その部分にのみ架橋反応が起こり、ナノワイヤが形成される。本研究では、この単一粒子ナノ加工法(SPNT法)を刺激応答性高分子することで温度や光刺激などの外部刺激に応じて可逆的に形状を変化させるナノアクチュエータ群の形成に成功した。さらに、このナノアクチュエータ群の形状の変化によってナノアクチュエータ表面へのポリスチレンナノ粒子の吸着を制御することにも成功した。また、SPNT法をタンパク質に適用することで酵素活性を有するタンパク質ナノワイヤ群の形成にも成功した。

研究成果の概要(英文)：A single particle nanofabrication technique (SPNT) was successfully applied to the fabrication of reversible thermo-responsive and photo-responsive nano-actuators over a large area by using poly(N-isopropylacrylamide) and poly[(9,9'-di-n-octylfluorenyl-2,7-diyl)-co-4,4'-azobenzene]. Trapping of the polystyrene nano-particles by the thermo-responsive nano-actuators can be controlled by changing the temperature. Furthermore, the human serum albumin (HSA) nanowires of various lengths can be fabricated by SPNT. The biotinylated HSA nanowires can be transformed into nanowires exhibiting a biological function such as an enzyme through using avidin-biotin interaction. SPNT is expected to provide nano-actuators with sensor, which are otherwise difficult.

研究分野：高分子・繊維材料

キーワード：アクチュエータ タンパク質 ナノワイヤ 単一粒子ナノ加工法 粒子線 高分子

1. 研究開始当初の背景

高アスペクト比を有するナノワイヤは、単位体積当たりの総表面積が大きく、センサーチップや触媒などに大幅な性能の向上をもたらす。また細胞を含むマイクロ、サブマイクロ粒子の除去などさまざまな分野への応用が期待されている。温度や光などの外部刺激もしくは、特定の物質に反応して形状を変化させるナノワイヤ(ナノアクチュエータ)を形成することができれば、必要に応じてナノワイヤの表面積を変化させることでその機能を制御することが可能になると考えられる。しかし、これまでナノワイヤの形成手法は限られており、センサー部位やアクチュエータ部位などの複数の機能を持たせることは困難であった。そこで、我々が開発した単一粒子ナノ加工法(SPNT法)に着目した。SPNT法は適用した高分子の機能をもつナノワイヤを形成することが可能であり、さらに異種高分子を積層した薄膜に対して適応することで、簡便に異種高分子の連結したナノワイヤを形成することができる。そのため、それぞれの機能性高分子に応じて機能性部位を持つナノアクチュエータの形成が可能である。本研究では、温度や光などの外部刺激もしくは、特定の物質に反応して形状を変化させるナノアクチュエータ群の形成手法としてSPNT法を検討した。

2. 研究の目的

SPNT法を利用して、複数の機能性高分子の連結ナノワイヤを形成し、これまでの手法では困難であったさまざまな刺激や特定の物質に可逆的に応答するインテリジェントナノアクチュエータ群の創成を本研究の目的とした。本研究では、まずアクチュエータ部位として刺激応答性高分子を利用することで温度に可逆的に形状を変化するナノワイヤの形成、センサー部位としてタンパク質を利用することで特定の物質に反応する酵素活性を持つナノワイヤの形成についてそれぞれ検討した。

SPNT法によって形成されるナノワイヤは、現像条件によって、ナノワイヤが基板から剥がれてしまう。適切な現像条件を探すには、正確に粒子線の照射線量を測定し、ナノワイヤの密度を評価する必要がある。そのため、短時間でかつナノメートルオーダーで粒子線の照射位置を検出できる粒子線の高解像度検出技術の開発についても検討した。

3. 研究の方法

本研究では、以下の3項目について検討した。

温度刺激に可逆的に形状を変化するナノワイヤ群の形成とその機能評価

上層に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(PNIPAM)とN,N'-メチレンビスアクリルアミド(MBAAm)の混合薄膜、下層に親水性高分子であるポリビニルピロリドン(PVP)とMBAAmの混合薄膜

の積層膜に対して、SPNT法を適用した。形成されたPNIPAM-PVP連結ナノワイヤが温度刺激に対して、可逆的に形状が変化するかを原子間力顕微鏡(AFM)で観察した。また、PNIPAM-PVP連結ナノワイヤ群の形状の違いによって、そのナノワイヤ群表面へのポリスチレン(PS)ナノ粒子の吸着性の違いをAFMで観察した。

酵素活性を示すタンパク質ナノワイヤの形成

代表的な血清タンパク質であるヒト血清アルブミン(HSA)薄膜に対して、SPNT法を適用した。形成されたHSAナノワイヤをトリプシン溶液に浸漬することでトリプシンによってHSAナノワイヤが分解されるか検討した。また、HSAナノワイヤの表面に存在するアミノ基(-NH₂)とN-ヒドロキシスクシンイミドピオチンを反応させ、ピオチンをHSAナノワイヤに導入した(ピオチン化HSAナノワイヤ)。そのピオチン化HSAナノワイヤをストレプトアビジン結合蛍光色素(Alexa Fluor 488)やストレプトアビジン結合西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)溶液にそれぞれ浸漬して、蛍光発光性やペルオキシダーゼ活性を示すかを調べた。

高分子架橋反応を利用した粒子線の高解像度検出

オスミウム荷電粒子を照射したポリアクリル酸とN,N'-メチレンビスアクリルアミドを混合した高分子-架橋剤混合薄膜を室温にて3分間飽和水蒸気下で静置した。その後、その高分子-架橋剤混合薄膜の表面をAFMで観察し、粒子線の照射による表面形状の変化を調べた。

4. 研究成果

温度刺激に可逆的に形状を変化するナノワイヤ群の形成とその機能評価

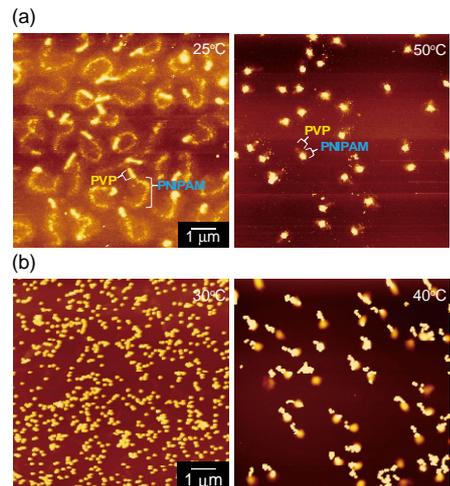


図1. (a) PNIPAM-PVP連結ナノワイヤの温度による形状の違い(左:25°C、右:50°C)(b) PNIPAM-PVP連結ナノワイヤ群への温度によるPSナノ粒子の吸着挙動の違い(左:30°C、右:40°C)

図1aにPNIPAM-PVP連結ナノワイヤ群の

AFM 画像を示す。PNIPAM の下限臨界共溶温度の 32°C を超えると、PNIPAM ナノワイヤ部位が凝集し、球状になることが確認された。また、PVP ナノワイヤ部位が挿入されることにより、PNIPAM ナノワイヤと異なり、PNIPAM-PVP 連結ナノワイヤは優れた可逆性を示した。

高アスペクト PNIPAM-PVP 連結ナノワイヤに対して PS ナノ粒子の吸着挙動が温度によってどのように変化するかを調べた。40°C の場合では 30°C の場合に比べて PS ナノ粒子の吸着量が明らかに減少していた(図 1b)。これは、PNIPAM 部位の表面積が温度によって大きく異なるためであると考えられる。以上の結果から、SPNT 法により基板表面に外部刺激によって形状が変化するナノアキュエータ群を形成することでその表面に特異な機能を付与できることが明らかとなった。

酵素活性を示すタンパク質ナノワイヤの形成

HSA ナノワイヤをトリプシン溶液に浸漬すると、分解されることが確認された。トリプシンはタンパク質のアルギニン残基とリシン残基を認識して、それらのペプチド結合を加水分解する。タンパク質ナノワイヤにおいて、それらの残基の大部分が破壊されている場合は、HSA ナノワイヤは分解されない。しかし、実際は、HSA ナノワイヤはトリプシンによって分解されたことから、SPNT 法によって形成されたタンパク質ナノワイヤのアミノ酸残基の大部分は改質されていないことを示唆している。また、ビオチン化 HSA ナノワイヤをストレプトアビジン結合蛍光色素やストレプトアビジン結合西洋わさびペルオキシダーゼ溶液に浸漬すると、ナノワイヤに蛍光発光性やペルオキシダーゼ活性が付与されることが確認された。この結果から、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用を利用することで、蛍光性や酵素活性を付与できることを示している(図 2)。

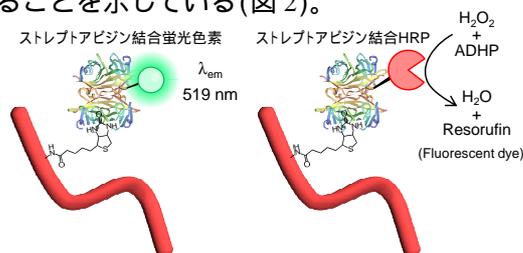


図 2. ビオチン化 HSA ナノワイヤへのストレプトアビジン結合 Alexa Fluor 488 とストレプトアビジン結合 HRP の結合

ストレプトアビジン結合タンパク質はさまざまな種類のもので市販されており、これらをビオチン化 HSA ナノワイヤに結合することで多種多様な機能をもつタンパク質ナノワイヤの形成が期待できる。

高分子架橋反応を利用した粒子線の高解像度検出

図 3 に 3 分間飽和水蒸気下に静置後の高分

子-架橋剤混合薄膜の AFM 画像を示す。飽和水蒸気にさらすことにより、粒子線に対する感度を上げ、オスミウム荷電粒子 1 個の照射位置の検出に成功した。

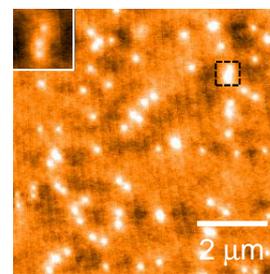


図 3. オスミウム荷電粒子の照射痕(左上:黒枠の拡大図)

本手法は、これまでの CR-39 による粒子線の照射検出に比べ、非常に短時間で済み、かつ粒子線の照射位置がオーバーラップしても、50 nm 以下の高解像度で判別することが可能であった。本研究成果はこれまで困難であった短時間でかつ高解像度の粒子線検出技術の開発につながる可能性がある。

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)

M. Omichi, A. Asano, S. Tsukuda, K. Takano, M. Sugimoto, A. Saeki, D. Sakamaki, A. Onoda, T. Hayashi, S. Seki, Fabrication of enzyme-degradable and size-controlled protein nanowires using single particle nano-fabrication technique Nat. Commun. 5, 3718 (2014). 査読有

M. Omichi, W. Choi, S. Tsukuda, M. Sugimoto, S. Seki, Spatial point analysis of ion track patterns using common polymer films by atomic forced microscopy, J. Photopolym. Sci. Technol. 27, 561 (2014). 査読有

M. Omichi, W. Choi, D. Sakamaki, S. Tsukuda, M. Sugimoto, S. Seki, A simple and rapid method for high-resolution visualization of single-ion tracks, AIP Advances, 4, 117128 (2014). 査読有

H. Cheng, M. Tang, T. Washin, K. Enomoto, A. Chiba, Y. Saito, T. Kamiya, M. Sugimoto, A. Saeki, T. Sakurai, M. Omichi, D. Sakamaki, S. Seki, Reversible control of radius and morphology of fluorene-azobenzene copolymer nanowires by light exposure, Advanced Materials Interfaces, 2, 1400450 (2015).

[学会発表](計 4 件)

M. Omichi, W. Choi, S. Tsukuda, M. Sugimoto, S. Seki, Visualization of single ion particle by atomic force microscopy using common polymer film, ICPST-31, Chiba, Japan, 2014/7/11

大道正明、丸井裕美、佃諭志、杉本雅樹、関修平、単一粒子ナノ加工法を用いた 1 次元ナノアキュエータ群の創成、第 62

回高分子討論会、金沢大学角間キャンパス、2013年9月12日

大道正明、杉本雅樹、関修平、単一粒子ナノ加工法を利用したタンパク質ナノワイヤの形成、TECHNO-FRONTIER2014、東京ビッグサイト、2014年7月23日～25日

大道正明、佃諭志、杉本雅樹、関修平、単一粒子ナノ加工法を利用した高機能性ナノワイヤの形成、第9回高崎量子応用研究シンポジウム、高崎シティギャラリー、2014年10月10日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.anan-nct.ac.jp/cgi-bin/material/wiki/wiki.cgi/jpn>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大道 正明 (OMICHI MASA AKI)

阿南工業高等専門学校・助教

研究者番号：10625453