

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870429

研究課題名(和文) 種々の二酸化炭素応答性を持つ高分子微粒子の創製と分子認識材料への応用

研究課題名(英文) Synthesis of Carbondioxide/Nitrogen Responsive Polymer Particles Bearing Switchable Recognition Capability

研究代表者

北山 雄己哉 (Kitayama, Yukiya)

神戸大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40649745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、温和な気体刺激にตอบสนองする官能基を含む開始剤あるいはモノマーを用い、乳化重合などの粒子設計技術とCLRPPなどの高分子設計技術を駆使することでCO₂に様々な形で刺激応答を示す新規な分子認識用高分子微粒子材料を創製した。具体的には以下の成果を得た。

(1) 温和な気体刺激により可逆的に分散・沈降状態を操作できる有機/無機複合微粒子の創製と高効率回収法の開発 (2) 温和な気体刺激により分子認識能をON/OFFスイッチャブルに調整可能な分子認識能をもつMIP粒子の開発 (3) 重合温度やモノマー種が温和な気体刺激応答性MIP粒子の分子認識能に与える影響についての詳細な検討

研究成果の概要(英文)：We successfully developed the versatile CO₂/N₂ responsive polymer particles as described below.

(1) CO₂/N₂-triggered stability-controllable gold nanoparticles (AuNPs) grafted with poly(2-(diethylamino)ethyl methacrylate) (PDEAEMA) layers (PDEAEMA-g-AuNPs) were synthesized by the surface-initiated atom transfer radical polymerization of DEAEEMA with AuNPs bearing initiator groups. (2) Core-shell type molecularly imprinted polymer (MIP) particles bearing protein recognition cavities in the shell layer with switchable molecular recognition capability responding to CO₂ and N₂ gas. (3) Effects of comonomer and polymerization temperature on the switchable molecular recognition capability of MIP particles was investigated.

研究分野：高分子化学・界面コロイド化学・分子認識化学

キーワード：刺激応答性 分子認識 高分子微粒子 タンパク質 二酸化炭素

1. 研究開始当初の背景

特定分子に対してのみに選択的に結合する分子認識材料は様々な物質が混在した複雑なマトリックス中から簡便に目的の分子を選び出せることから、環境学、プロテオミクス、診断学及びタンパク質精製などの生命科学領域において注目を集めている。従来、タンパク質などへの分子認識材料として生体由来の酵素や酵素結合性タンパク質などがプロテオミクスにおけるタンパク質の分離・認識及び酵素捕集などに用いられてきたが、生体由来の分子認識材料は非常に高価で壊れやすいという大きな問題点があった。そのため近年では、生体由来の分子に代わる分子認識材料を人工的に創製するという試みが世界中で取り組まれており、その中でも分子インプリンティング法が、人工的にあらゆる分子に対して認識可能な高分子材料を一段階で簡便に作り出せることから一大研究分野として盛んに研究が行われている。分子インプリンティング法は鑄型重合法の一種で、認識対象である分子及び架橋剤を重合反応場中に共存させ、重合後この認識対象分子を除去することで、対象となる分子のみに選択性のある鑄型を形成する方法であり、これまでに本手法により様々な分子に対して特異的に結合する分子認識能をもつ高分子材料が創製されてきた。しかしながら、報告の多くは分子認識能をもつ高分子材料を塊状重合系で作製し、その後粉碎して粒子として使用することが一般的に行われてきたが、多段階のプロセスが必要な上、構築した認識サイトが粉碎時に壊れてしまうことが問題視されていた。そのため、分子認識高分子材料を乳化重合などの水媒体不均一系重合により直接粒子状で作製する研究が上記問題点を解決できるだけでなく、高分子微粒子に機能性を付与することで全く新しい分子認識高分子材料を作製できることが期待され世界中で試みられている。

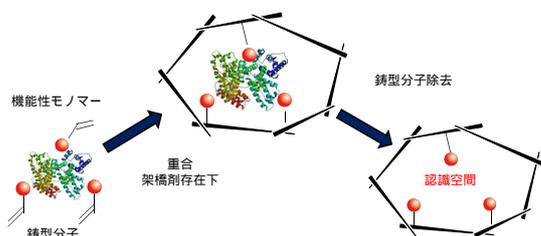


図1 分子インプリンティングの概略図

本手法において得られる分子インプリントポリマー (MIPs) は、その構成成分が重合性官能基をもつ様々なモノマー種であるため、天然由来の分子認識材料である抗体などと比べると、そのビルディングブロックの範囲が非常に広い。このことは、分子認識能だけでなく他の様々な機能を同時に高分子材料中に付与することに繋がり、天然の分子認識材料では成し得ない人工系の分子認識材料ならではの特徴と言える。

その機能付与の例として、分子認識能を熱や pH という外部刺激によって分子認識能を可逆的に制御可能な MIPs が報告されているが、標的分子をタンパク質などとした場合、認識対象分子の変性などの問題から分子認識材料に適応することが困難であった。

そのような中最近、これまでの温度や pH とは異なる新たな刺激応答性として Jessop, Cunningham らによりアミジン基や 3 級アミノ基などの特定の官能基が水中で CO₂ と反応し炭酸塩になることでプロトン化し、N₂ 及びアルゴン導入による CO₂ 除去により脱プロトン化するという CO₂ に対する可逆的な応答性が見出された。



図2 CO₂ および N₂ による気体刺激応答性

2. 研究の目的

本研究では、温和な気体刺激に応答する官能基を含む開始剤およびモノマーを用い、乳化重合などの粒子設計技術と CLRP などの高分子設計技術を駆使することで CO₂ に様々な形で刺激応答を示す新規な分子認識用高分子微粒子材料の創製を試みた。CO₂ による刺激応答は、上述した熱や pH による刺激応答に比べて安全・安価というだけでなく、タンパク質を扱う際、分子の変性を抑制できることから分子認識材料に応用する際に魅力的な刺激応答性である。具体的には以下の目的の研究を行った。

- (1) 温和な気体刺激により可逆的に分散・沈降状態を操作できる金ナノ粒子の創製と高効率回収法の開発

(2) 温和な気体刺激により分子認識能を ON/OFF スイッチャブルに調整可能な分子認識能をもつ MIP 粒子への応用

(3) 重合温度やモノマー種が温和な気体刺激応答性 MIP 粒子の分子認識能に与える影響についての検討

3. 研究の方法

(1) 金ナノ粒子の表面に気体刺激応答性ポリマーを修飾した有機/無機複合材料の合成を、表面開始原子移動ラジカル重合 (ATRP) によって行った。開始基導入金ナノ粒子は Bis[2-(2-bromoisobutyryloxy)undecyl]disulfide および HAuCl_4 を溶解させた混合溶液中に、室温・攪拌下で、 NaBH_4 水溶液を少しずつ添加後、室温・15 h 反応を行い、遠心洗浄を行うことで Br 修飾金ナノ粒子を作製した。得られた Br 修飾金ナノ粒子を開始剤シード粒子、 $\text{CuBr}/N,N,N',N'',N'''$ -Pentamethyldiethylenetriamine を触媒種として用いたジエチルアミノエチルメタクリレート (DEAEMA) の表面開始 ATRP をエタノール中 40°C で試みた。モノマー種のプロトン・脱プロトン変化および重合率は核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$)、粒子径・粒子径分布は動的光散乱法 (DLS)、表面分析は光電子分光法 (XPS) を用いて解析を行った。得られた PDEAEMA 修飾 AuNPs (PDEAEMA-g-AuNPs) の温和な気体刺激による分散性制御は、分散媒体を純水へ置換し、 CO_2 および N_2 をシリンジによって導入することで試みた。有機溶媒を用いた PDEAEMA-g-AuNPs の回収は、有機溶媒としてトルエンを用いた純水/トルエン二相系で水相中に上記気体を導入することによって試みた。

(2) 高分子微粒子へのタンパク質認識能は分子インプリンティング法により付与した。2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] (VA-061) を用いた無乳化剤乳化重合により Styrene (S) および Divinylbenzene (DVB) からなる Poly(S-DVB) (P(S-DVB)) シード粒子を 65°C にて作製した。次に P(S-DVB) シード粒子分散液にヒト血清アルブミン (HSA、鑄型分子)、2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA、モノマー)、 N,N' -Methylenebisacrylamide (MBAA、架橋剤)、および VA-061 (タンパク質

と相互作用する機能性開始剤) を加え CO_2 導入水媒体中で 65°C にてコアシェル型高分子微粒子を合成した。得られた粒子を Cetyltrimethylammonium bromide および Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride を用いて HSA を取り除き、十分に水に置換することで、コアシェル型 MIP-HEMA-65 粒子を得た。また、鑄型分子である HSA を添加せず同様の手順で重合することで、認識空間を構築していない参照粒子としてコアシェル型ノンインプリントポリマー (NIP-HEMA-65) 粒子を得た。

MIP 粒子分散液に対し 90 分間 CO_2 導入+超音波処理および 90 分間 N_2 導入処理を連続的に施した。それぞれの気体導入時間 30 分ごとにサンプリングを行い、各サンプルの平均粒子径およびゼータ電位を DLS により評価した。

CO_2 導入+超音波処理あるいは N_2 導入を 90 分間施した 1 mg/mL の MIP、NIP 粒子分散液に 15.1 ~ 302 nM の HSA および参照タンパク質として 151 nM の Immunoglobulin G (IgG)、Cytchrome C (Cyt)、Lysozyme (Lys) を加え 90 分間インキュベートし、上澄み液のタンパク質濃度を micro BCA アッセイによって定量することで結合実験を行った。この時、MIP 粒子の CO_2 および N_2 導入時における結合定数 (K_a) の比を Responsive Factor (RF) 値として評価し (式 1)、 CO_2 導入時における MIP と NIP の K_a の比を Imprinting Factor (IF 値) として示した (式 2)。また、標的分子である HSA の結合量に対する同濃度の参照タンパク質結合量を Selectivity Factor 値 (SF) 値として示し (式 3)、それぞれの機能を定量的に評価した。

$$RF = \frac{K_a(\text{MIP}_{\text{CO}_2})}{K_a(\text{MIP}_{\text{N}_2})} \quad (1)$$

$$IF = \frac{K_a(\text{MIP}_{\text{CO}_2})}{K_a(\text{NIP}_{\text{CO}_2})} \quad (2)$$

$$SF = \frac{B_{\text{Ref}}}{B_{\text{HSA}}} \quad (3)$$

ここで、 $K_a(\text{MIP}_{\text{CO}_2})$ 、 $K_a(\text{MIP}_{\text{N}_2})$ および $K_a(\text{NIP}_{\text{CO}_2})$ は CO_2 導入時の MIP 粒子の HSA に対する K_a 値、 N_2 導入時の MIP 粒子の HSA に

対する K_a 値および CO_2 導入時の NIP 粒子の HSA に対する K_a 値である。また、 B_{Ref} および B_{HSA} は参照タンパク質および HSA に対する結合量である。

(3) (2)と同様の方法で MIP 粒子を合成した。その際、モノマーを *N*-Isopropylacrylamide (NIPAm) (MIP-NIPAm-65) Di(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (DEGMEMA) (MIP-DEGMEMA -65) に変更した MIP 粒子およびモノマーとして HEMA を用いて重合温度を 40°C に変更した MIP 粒子 (MIP-HEMA-40) の合成を行い、結合実験を同様の方法で行った。

4. 研究成果

(1) $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}-d_6$ 混合溶媒中で DEAEMA を溶解させ、 CO_2 および N_2 バブリング後の $^1\text{H-NMR}$ を測定した結果、 CO_2 後は三級アミノ基周辺に存在するプロトンが主に低磁場側にシフトしており、 N_2 後はそれらのピークが高磁場シフトしほぼ元の状態に戻っていたことから、DEAEMA のジエチルアミノ基が $\text{CO}_2 \cdot \text{N}_2$ に応答してカチオン化・脱カチオン化することが示された。PDEAEMA の良溶媒であるエタノール中で、重合の進行とともに PDEAEMA-g-AuNPs の粒子径は増大しており、重合中に金ナノ粒子の凝集は見られず表面のポリマー鎖が伸長していることがわかった。その際、UV-vis スペクトルがほとんど変化していないことから、この粒子径増大は、金ナノ粒子の凝集によるものではないことが明らかとなった。さらに重合後の粒子の XPS 測定の結果、重合前には存在しない $\text{N}1s$ 軌道に由来するピークが観察されたことから、PDEAEMA を表面にグラフト化出来ていることが明らかとなった。さらに、得られた PDEAEMA-g-AuNPs の CO_2 をバブリングした水中における分散性を DLS により確認したところ、低重合率においては粒子同士の凝集が確認されたが、重合率の増大に伴い高い分散安定性を示すことがわかった。これは保護層である PDEAEMA の鎖長の増大に伴い CO_2 を導入した水中における安定性が増大したためであると考えられる。一方で N_2 バブリングを行うと空気/水界面へ凝集することが明らかとなった。このことから、温和な気体刺激によって、分散性を制御可能な有機/無機複合微粒子材料の創製に成功した。

さらに、本粒子の回収・再利用について検討を行うために、PDEAEMA-g-AuNPs が分散した CO_2 溶解水にトルエンを導入し、 N_2 バブリングを行ったところ、有機溶媒相に複合粒子が移行した。このことから、得られた有機/無機複合微粒子は、温和な気体を導入するという簡便な操作で有機溶媒中に簡便に回収できることを明らかとした。

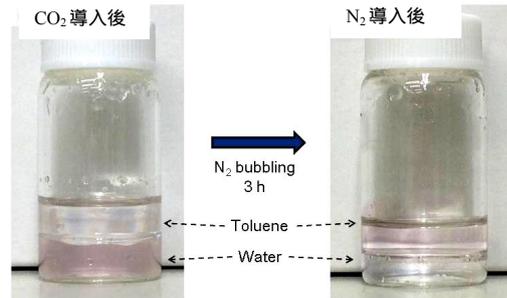


図3 CO_2 および N_2 導入による PDEAEMA-g-AuNPs の相間移動

(2) 水溶性開始剤である VA-061 のイミダゾリン基の CO_2/N_2 応答性に着目し、この開始剤を標的タンパク質との相互作用のための機能性分子として応用することで、これらの気体で認識能を ON/OFF 制御可能な高分子微粒子の創製を行った。

核磁気共鳴装置を用いて、 D_2O に溶解させた VA-061 の CO_2 および N_2 導入に対する応答性を評価した。VA-061 を溶解させた D_2O 溶液に CO_2 を導入することによって、イミダゾリン基中のエチルプロトンが低磁場側に明確にシフトし、続けて N_2 導入を行うことで高磁場側にケミカルシフト値が戻ることを明らかとした。このことから、VA-061 に上記の気体に応答して電荷状態を変化することがわかった。

タンパク質に対する選択的認識能を示す高分子微粒子は、高分子材料中に標的タンパク質に対する認識空間を構築することができる分子インプリンティングによって行った。分子インプリンティングにおける開始剤および機能性分子として VA-061、高分子マトリクスを形成する架橋剤およびモノマーとして MBAA および HEMA を選択し、モデル標的分子として HSA を選択した。これらを混合し、P(S-DVB)シード粒子存在下における無乳化剤シード重合を 65°C で行った後、カチオン性界面活性剤および還元剤を用いたタンパク質除去を行うことで、シェル層に認識空間をもつコアシェル型 MIP 粒子を合

成した。MIP 粒子の CO₂ および N₂ 応答性を確認するために、それぞれの気体導入後の粒子径およびゼータ電位測定を行った。粒子径は、それぞれの気体を導入した場合においても、ほとんど変化を示すことはなく、どちらの状態でも高い分散安定性を示すことがわかった。一方で、ゼータ電位は、CO₂ 導入時に高いカチオン性を示し、N₂ 導入時にはカチオン性は明らかに低下した。そのため、得られた MIP 粒子は上記の気体刺激に反応して、同様の分散状態を保ちつつ、表面電荷状態を変化させることが可能であることが明らかになった。

次に得られた MIP 粒子の標的タンパク質認識能およびその気体刺激応答性を検討した。HSA 結合実験の結果、CO₂ を導入した MIP 粒子は HSA に対する結合親和性が高いのに対し、N₂ を導入した MIP 粒子ではその親和性が低下した。このことから、同一の MIP 粒子でありながら、気体導入の違いで結合定数にして約 3.6 倍変化する HSA 結合能の変換可能性が示唆された。さらに、参照高分子微粒粒子として、全く同じモノマー種および開始剤を使用し、鑄型分子不在で重合したコアシェル型 NIP 粒子を合成し、これに対する HSA 結合実験を行った。その結果、CO₂ を導入した NIP 粒子の HSA に対する結合定数は、MIP 粒子の約 4.2 倍高い親和性を有していた。これは分子インプリンティングによって認識空間が構築されていることを示す結果であると考えられる。

次に、MIP 粒子および NIP 粒子に対して、参照タンパク質として IgG、Cyt および Lys を用いた選択性実験を行った。その結果、CO₂ を導入した NIP 粒子では、HSA に対する選択的な結合が観察できなかった (SF 値: IgG: 0.32, Cyt: 1.73, Lys: 2.02) のに対し、CO₂ を導入した MIP 粒子では HSA を特異的に結合しており (SF 値: IgG: 0.06, Cyt: 0.43, Lys: 0.66) CO₂ を導入した MIP 粒子中に HSA 認識空間が形成されていることが示唆された。

以上のことから、本研究において CO₂/N₂ という温和な気体刺激に反応して HSA 特異的認識能をスイッチャブルに制御可能な新奇 MIP 粒子の合成に成功した。このように、分子インプリンティングの分野において、これらの温和な気体刺激によって分子認識能を制御可能な材料を創製したのは、本研究が

世界で初めての例である。

(3) 重合時の温度やモノマー種が温和な気体刺激応答性 MIP 粒子の分子認識能に与える影響について検討を行った。

MIP-NIPAm-65 では、RF 値は 6.5 と高い気体刺激応答性を示したが、SF 値は IgG、Cyt および Lys に対して 0.34、0.74 および 0.85 と参照タンパク質に対する非特異的吸着が大きくなり、選択性が MIP-HEMA-65 に比べて悪くなることがわかった。さらに、MIP-DEGMEMA-65 でも同様の傾向が観察され、HEMA がモノマーとしてもっとも高い HSA 選択性をもって分子認識能をスイッチャブルに制御できることが明らかになった。HEMA が他の二つのモノマーと比べて最も高い親水性を示す (log P 値 HEMA:0.54, NIPAm:0.87, DEGMEMA:1.01) ことから、MIP 粒子の非特異的吸着の抑制にはモノマーの親水性が重要であることがわかった。

さらに重合温度を 40°C に低下させて MIP 粒子を合成し (MIP-HEMA-40) その分子認識能および温和な気体刺激応答性の評価を行った結果、IF 値は約 13 倍を示し、より分子インプリンティングによる高親和性認識空間が構築されていることがわかった。さらに、RF 値は約 24 倍と高い値を示し、温和な気体刺激応答性においても高い可逆能を示すことが明らかになった。加えて、SF 値も全ての参照タンパク質に対して十分低い値 (IgG: 0.25, Cyt: ~0, Lys: 0.04) を示し、他のタンパク質に対する非特異的吸着が減少していることがわかった。

以上の結果から、重合温度を低温で行うことにより、より標的分子に対して高親和性・高選択性の分子認識空間を構築できたことが明らかになった。さらに、その結果として、構築されたタンパク質認識空間の CO₂/N₂ 刺激応答性が高くなることを明らかにした。

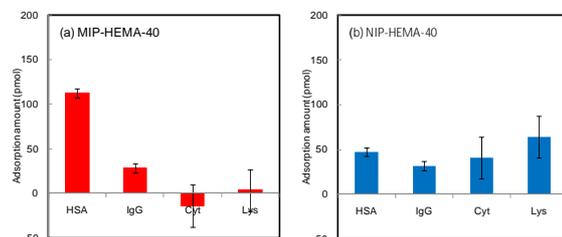


図4 CO₂およびN₂導入下におけるMIP-HEMA-40およびNIP-HEMA-40の選択性実験

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 2 件)

Kyohei Takimoto, Eri Takano, Yukiya Kitayama, and Toshifumi Takeuchi
Synthesis of Monodispersed Submillimeter-Sized Molecularly Imprinted Particles Selective for Human Serum Albumin Using Inverse Suspension Polymerization in Water-in-Oil Emulsion Prepared Using Microfluidic,
Langmuir, **31**, 4981–4987 (2015) 査読有

Yukiya Kitayama, and Toshifumi Takeuchi
Synthesis of CO₂/N₂-Triggered Reversible Stability-Controllable Poly(2-(diethylamino)ethyl methacrylate)-grafted-AuNPs by Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization
Langmuir, **30**, 12684–12689 (2014) 査読有

[学会発表](計 6 件)

Manabu Isomura, Yukiya Kitayama, Toshifumi Takeuchi
Synthesis of protein-imprinted core/shell polymer particles bearing ON/OFF switchable molecular recognition property via CO₂/N₂ bubbling
The international chemical congress of pacific basin societies 2015 (Pacifichem2015), Honolulu, Hawaii (USA), 10-15 December (2015)

北山雄己哉、竹内俊文
二酸化炭素・窒素に反応して分散安定性制御可能な金ナノ粒子の合成
第 64 回高分子学会年次大会, 札幌コンベンションセンター (北海道) 5 月 27 日~5 月 29 日 (2015)

Yukiya Kitayama, Reo Sasao, Toshifumi Takeuchi
Molecularly Imprinted Nanoparticles as Artificial Antibodies for Protein Recognition
4th International Conference on Bio-Sensing Technology, Lisbon (Portugal), 10 - 13 May (2015)

北山雄己哉、竹内俊文
二酸化炭素および窒素に反応して水中分散状

態制御可能な有機/無機複合微粒子の創製
第95回日本化学会春季年会, 日本大学船橋キャンパス (千葉) 3月26日~3月29日 (2015)

磯村学・北山雄己哉・竹内俊文
二酸化炭素および窒素導入によって分子認識能のON/OFF制御が可能なタンパク質インプリントコアシェル粒子の合成
第95回日本化学会春季年会, 日本大学船橋キャンパス (千葉) 3月26日~3月29日 (2015)

北山雄己哉、竹内俊文
二酸化炭素および窒素に反応して分散状態制御可能な有機/無機複合微粒子の合成
第 60 回高分子研究発表会 (神戸) 兵庫県立会館 (兵庫) 7 月 24 日~7 月 25 日 (2014)

6. 研究組織

(1)研究代表者

北山雄己哉 (KITAYAMA Yukiya)
神戸大学大学院工学研究科・助教
研究者番号: 40649745