

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26390003

研究課題名(和文)非平衡分子拡散流による固液界面の高次構造化と機能

研究課題名(英文)Functional superstructures emerged by nonequilibrium molecular flux at the solid-liquid interface

研究代表者

森川 全章 (Morikawa, Masa-aki)

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：10363384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、カチオン性脂質分子とアニオン性色素分子を用い、静的・動的自己組織化の融合による階層的な高次構造を固体基板上に構築し、得られた高比表面積の色素ネットワーク構造を活かした光励起エネルギー移動界面の創成について検討した。炭素数16のジアルキルアンモニウム塩のスピんキャスト膜上にアニオン性シアニン色素の水溶液を滴下するだけで、サンゴ礁様の超構造体が自発的に形成された。この超構造体においてシアニン色素はJ会合しており、その高効率な光励起エネルギー移動により生命分子の高感度な蛍光増感検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, higher-order structures composed of cationic lipids and anionic dyes were constructed on solid substrates based on static self-assembly far from thermodynamic equilibrium. Photon energy migration properties of the obtained superstructures were characterized by using confocal laser scanning microscopy. Coral reef-like superstructures were formed spontaneously by dropping an aqueous solution of anionic cyanine dye onto the spin-cast film of a dialkylammonium (2C16) bromide. The cyanine dyes formed J-aggregates in the superstructures, and efficient fluorescence resonance energy transfer from the cyanine J-aggregates to acceptor dyes occurred, which can be utilized for fluorescence sensitization of biological molecules at the interface.

研究分野：分子組織化学

キーワード：高次構造 自己組織化 非平衡 光励起エネルギー移動 界面

1. 研究開始当初の背景

分子の自己組織化は、自然と調和した温和な条件、省エネルギープロセスによる機能性材料の創製アプローチとして注目されてきた。溶液中の分子は、熱力学的平衡の近傍において安定な構造体へ自己組織化されやすい環境にあり、その静的な秩序構造の形成に基づく機能発現が達成されている。一方、これら溶液系の超分子化学における基本的な分子設計指針は成熟を迎え、近未来のエネルギーやバイオ分野、IT 技術のイノベーションを実現するには、固体表面にナノ～マイクロスケールの 3 次元集積構造をボトムアップ的に構築する技術を開拓し、新しい薄膜材料を創出することが重要である。

熱力学的平衡下における“静的”自己組織化は、原子・分子レベルの局所的な秩序構造の形成に有効な手段である。これに対して、時々刻々と変化する非平衡系の中かで起こる“動的”自己組織化は、散逸構造と呼ばれる巨視的な空間秩序を与える。両者を有機的に結び付けることにより、分子から巨視的なスケールにおよぶ 3 次元の階層的な高次構造化が可能となり、近未来の自己組織性ナノ材料を開発するための基盤技術になるものと期待される。しかしながら従来、動的自己組織化は単純な分子や粒子を対象とした物理の領域で研究されており、分子物性との相関はほとんど意識されていない。一方、化学の領域における動的自己組織化は、基板表面のディウェッティング法による単純なマイクロパターン形成に限定されている。すなわち、静的・動的自己組織化の融合による階層的な高次構造の制御は、未開拓の研究課題であった。

2. 研究の目的

非平衡下で形成されるマイクロ構造として、古くからケミカルガーデンや脂質のミエリン像が知られている。しかしこれらは、浸透圧を駆動力としたアモルファスな構造形成であり、階層的な高次構造として意義ある特性は得られていない。一方、我々は巨視的な液-液界面ならびに微少液滴の界面における自己組織化研究を通じて、散逸的な有機溶媒クラスターを鋳型とする Eu^{III} 錯体の自己集合と特異的な発光増強、ならびにレドックス活性なマイクロ粒子の形成、タンパク質の速度論的な液-液界面吸着による階層的中空構造の構築と触媒機能など、速度論支配の構造形成に由来する超分子モルフォロジーの制御とその機能を開拓してきた。本研究では、これら液-液界面系の分子組織化に関する蓄積を、固-液界面系へ発展させ、光エネルギーの有効利用や医療診断などへ応用できる革新的な高比表面積の薄膜材料を創製することを目的とする。具体的には、水と適度な親和性を有する脂質二分子膜を作製し、膜内への水分子の拡散、色素分子との相互作用、脂質分子膜の再配列を協同的かつ周

期的に引き起こすことにより、時空間的な自己組織化の履歴として高次構造が固体表面上に記録される仕組みを明らかにする。さらに、得られた高比表面積を有する色素ネットワーク超構造の光捕集機能を活かして、種々のバイオアッセイの高感度化を実現する普遍的な分子情報の変換・増幅システムを開発することを目標とする。

3. 研究の方法

スライドガラス上に三本鎖型カチオン性脂質のマイクロ粉末を載せ、アニオン性色素の水溶液を滴下した。蛍光顕微鏡により脂質-色素の特異的な複合超構造体の形成について評価した。また、ジアルキルアンモニウム塩のスピンキャスト膜を作製し、アニオン性シアニン色素の水溶液を滴下し、膜表面の顕微鏡観察を行った。

膜表面に形成されたシアニン色素の J 会合体を用いた光励起エネルギー移動特性について、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察により評価した。アクセプター色素の導入は、事前に脂質分子と混合し膜内に埋め込む方法を試みた。CLSM を用いた分光分析や光刺激実験 (FRAP) を行い、微視的な領域における光励起エネルギー移動特性を評価し、高比表面積の光アンテナ効果について検討した。

また、生命分子の高感度蛍光検出システムを開発するために、一例として基板上の色素ネットワーク超構造にベンゾフラザン誘導体により蛍光標識したグルタミン酸水溶液を滴下した。水洗後、膜表面の色素 J 会合体を光励起し、FRET を利用したグルタミン酸の蛍光検出について評価した。

4. 研究成果

(1) 脂質/色素分子から成る超構造体の形成

アニオン性シアニン色素は、三本鎖型カチオン性脂質のマイクロ粉末表面に静電的相互作用および疎水性相互作用により速やかに吸着した。興味深いことに、その後、固体表面から針状構造体が次々と出現した (図 1)。顕微分光測定の結果、針状構造体中においてシアニン色素は J 会合体を形成していることが示された。このような複合超構造の形成メカニズムを調べるために、成長途中の針状構造体の先端部分にレーザー光を照射して色素を分解したところ、成長が止まった。このことから、針状構造は先端部分から伸長していることが示された。また、蛍光標識した脂質分子を用いて FRAP (光退色後蛍光回復) 実験を行った結果、針状構造体の内部において脂質分子が流動性を示すことが確認された。これらの結果から、脂質-色素水溶液界面における針状ナノ構造の伸長は、脂質分子がマイクロ粉末内部から針状構造体の中心部を通して先端部へ移動し、針状ナノ構造の先端においてシアニン色素とペア

リングし、複合体が形成されるという特異な自己組織化プロセスによるものと考察された。

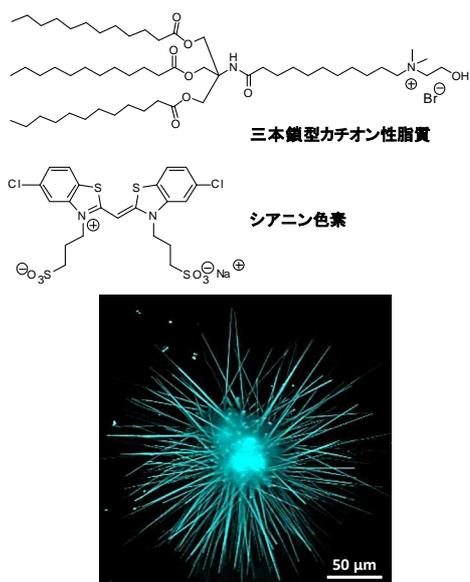


図1 三本鎖型カチオン性脂質とアニオン性シアニン色素から成る針状構造体の CLSM 像 ($\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$, bandpass filter: 465-510 nm)

つぎに、スライドガラス上にジアルキルアンモニウム塩のスピんキャスト膜を作製した。その後、シアニン色素の水溶液 (0.2 mM) を滴下し、固-液界面の構造を CLSM により観察した。炭素数 18 の脂質分子を用いた場合、平坦な脂質膜表面に色素分子が吸着するのみであった (図 2a)。また、水溶液中の吸収スペクトルに比べて、脂質膜表面に吸着した色素分子の吸収スペクトルは、鋭く長波長シフトした。このことは、色素分子が脂質分子膜上において J 会合体として吸着していることを示している。一方、炭素数 16 の脂質分子を用いた場合では、興味深いことに、膜表面に高さ数十ミクロンにおよぶサンゴ礁様の超構造体が自発的に形成された (図 2b)。

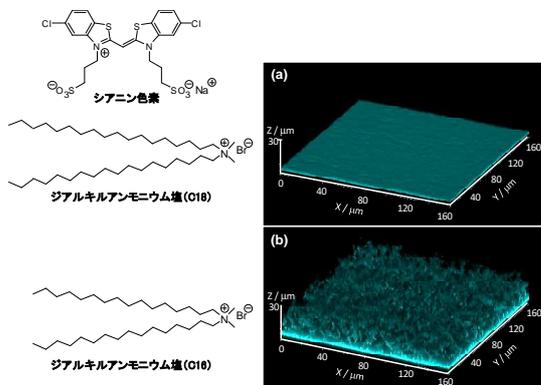


図2 ジアルキルアンモニウム塩とアニオン性シアニン色素から成る複合膜の CLSM 像 ($\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$, bandpass filter: 465-510 nm)

この脂質二分子膜のゲル-液晶相転移温度 (T_c) は 38°C であり、室温ではアルキル鎖が

結晶化した固体状態にある。しかし、 T_c が比較的室温に近いことから、脂質分子膜のゆらぎにより水分子がラメラ層間へ浸透すると考えられる。このとき、色素分子も膜内へ浸透し、脂質/色素からなる結晶性ドメインが形成され、これが膜表面から逐次的に部分剥離することにより、サンゴ礁様の高次構造が形成されるものと推測した。

(2) 脂質/色素分子超構造体の光捕集特性
得られた超構造体は、高い表面積を有し、色素分子が J 会合体を形成していることから、高効率な光捕集界面として機能するものと期待される。そこで、蛍光アクセプター色素と脂質分子の混合溶液からスピんキャスト膜を作製し、先と同様にアニオン性シアニン色素水溶液を滴下し、サンゴ礁様の超構造体を構築した。得られた構造体の吸収スペクトルを測定した結果、アクセプター色素のモノマー吸収が 568 nm に現れ、ドナー色素の J 会合体の吸収が 467 nm に観測された。次に、ドナー色素の J 会合体を光励起すると、その発光が著しく消光され、代わりにアクセプター色素に由来するモノマー発光が強く観測された。このことは、ドナー色素の J 会合体から脂質膜内に導入されたアクセプター色素への効率的な光励起エネルギー移動を示している。実際に、CLSM 観察により超構造体の蛍光観察 (励起光: 405 nm) を行ったところ、アクセプター色素に由来する黄色発光のみが超構造体から確認された (図 3)。

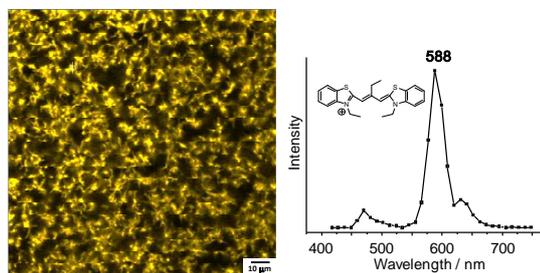


図3 アクセプター色素を導入した脂質/色素超構造体の CLSM 像と発光スペクトル ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$, longpass filter: 411 nm)

また、炭素数 18 の脂質分子を用いて同様の実験を行い、平坦な脂質/色素複合膜と、高比表面積を有する超構造膜における光励起エネルギー移動特性について比較検討した。その結果、平坦な脂質/色素複合膜においても、FRET によるアクセプター色素の発光が観測されたが、ドナー色素の J 会合体に由来する発光も明確に観測され、光励起エネルギー移動の効率が低いことが示唆された。このことは、膜表面の高次構造化が光励起エネルギー移動特性の向上に重要であることを示している。

(3) 生命分子の超高感度検出システム

つぎに、得られた超構造体における光励起エネルギー移動を利用した高感度な蛍光分析システムへの応用について検討した。一例として、グルタミン酸の高感度蛍光検出の結

果について述べる。4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) は、各種アミン、アミノ酸、ペプチドなどの蛍光誘導体化に使用され、反応生成物は 465 nm に吸収を与え、560 nm に発光する。NBD-誘導化グルタミン酸の吸収波長と超構造体中のドナー色素の J 会合体の発光波長 (477 nm) が良く重なるため、効率的な FRET が期待できる。まず、炭素数 16 の脂質分子とアニオン性シアニン色素 (ドナー色素) からサンゴ礁様の超構造体を構築した。つぎに、NBD-誘導化グルタミン酸水溶液 (1 nM) を滴下し、10 分間静置した後、純水で 3 回洗浄し蛍光スペクトル測定を行った。また、対照実験としてドナー色素の非存在下において NBD-誘導化グルタミン酸水溶液を脂質膜表面に吸着させた試料を作製した。顕微蛍光スペクトル測定の結果、ドナー色素非存在下において作製した試料では、NBD-誘導化グルタミン酸を直接励起してもその発光は全く観測されなかった。一方、ドナー色素の J 会合体が存在する超構造体表面に吸着させた場合では、J 会合体を光励起すると、NBD-誘導化グルタミン酸の発光が 560 nm 付近に明確に観測された。これは、膜表面において FRET が起こり、NBD-誘導化グルタミン酸の発光がドナーの J 会合体により著しく増感されたためと考えられる。

以上の結果から、カチオン性脂質のキャスト膜とアニオン性色素の水溶液を接触させるだけで、自発的に高比表面積を有する超構造が形成されることを見出した。また、この膜表面では光励起エネルギー移動が効率的に起こることや、それを利用すると蛍光標識したアミノ酸などを非常に高感度に検出できることを明らかにした。このように固-液界面のダイナミックな非平衡科学は、界面の構造を制御して新しい機能材料を開発するための有用な方法論になるものと期待される。

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 7 件)

- ① K. Ishiba, T. Noguchi, H. Iguchi, M-a. Morikawa, K. Kaneko and N. Kimizuka
“Photoresponsive Nanosheets of Polyoxometalates Formed by Controlled Self-Assembly Pathways”
Angew. Chem. Int. Ed., **56**, 2974–2978 (2017).
DOI: 10.1002/anie.201612473
- ② K. Ishiba, D. Kichise, H. Iguchi, M-a. Morikawa and N. Kimizuka
“Self-assembly of Oligo(ethylene oxide)-linked Diammonium Ions with Polyoxometalates into Ordered Polyhedron Nanocrystals in Aqueous Media”
Chem. Lett., **46**, 430–433 (2017).
DOI: 10.1246/cl.161124

- ③ N. Kimizuka, N. Yanai and M-a. Morikawa
“Photon Upconversion and Molecular Solar Energy Storage by Maximizing the Potential of Molecular Self-Assembly”
Langmuir, **32**, 12304–12322 (2016).
DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b03363
- ④ J. Liu, M-a. Morikawa, H. Lei, K. Ishiba and N. Kimizuka
“Hierarchical Self-Assembly of Luminescent Tartrate-Bridged Chiral Binuclear Tb(III) Complexes in Ethanol”
Langmuir, **32**, 10597–10603 (2016).
DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b02254
- ⑤ J. K.-H. Hui, H. Kishida, K. Ishiba, K. Takemasu, M-a. Morikawa and N. Kimizuka
“Ferroelectric Coordination Polymers Self-assembled from Mesogenic Zinc(II) Porphyrin and Dipolar Bridging Ligands”
Chem. Eur. J., **22**, 14213–14218 (2016).
DOI: 10.1002/chem.201602175
- ⑥ S. Ogawa, M-a. Morikawa, G. Juhász and N. Kimizuka
“Interlocked Dimerization of C3-Symmetrical Boron Difluoride Complex: Designing Non-Cooperative Supramolecular Materials for Luminescent Thin Films”
RSC Adv., **5**, 60373–60379 (2015).
DOI: 10.1039/C5RA11908A
- ⑦ K. Ishiba, M-a. Morikawa, C. Chikara, T. Yamada, K. Iwase, M. Kawakita and N. Kimizuka
“Photoliquefiable Ionic Crystals: A Phase Crossover Approach for Photon Energy Storage Materials with Functional Multiplicity”
Angew. Chem. Int. Ed., **54**, 1532–1536 (2015).
DOI: 10.1002/anie.201410184

[学会発表] (計 5 件)

- ① 永井邑樹, 石場啓太, 森川全章, 君塚信夫
「水中におけるアリールアゾピラゾール誘導体の光誘起溶解と結晶化特性」
日本化学会 第 97 春季年会, 2017 年 3 月, 慶應義塾大学
- ② K. Ishiba, C. Chikara, M-a. Morikawa, T. Yamada and N. Kimizuka
“Reversible photo-induced liquefaction and crystallization of ionic azobenzene derivatives with photon energy storage characteristics”
Pacifichem2015, 2015 年 12 月, Hawaii
- ③ 小河重三郎, 森川全章, 高橋功, 君塚信夫
「多機能性超分子スマートソフトマテリアルの設計: 崇高な親油基を持つ高発光性三回対称型ポロンジフルオリドジケトネート錯体」
第 64 回高分子討論会, 2015 年 9 月, 東北大学
- ④ 石場啓太, 長尾侑弥, 主税智恵, 外山泰弘, 川北美香, 森川全章, 山田鉄兵, 君塚信夫

「イオン性アゾベンゼン誘導体における光誘起結晶－イオン液体フェーズクロスオーバー特性」

第 63 回高分子討論会，2014 年 9 月，長崎大学

⑤ M-a. Morikawa

“Supramolecular engineering of nanostructures by interfacial self-assembly of amphiphilic building blocks”

Korea-Japan Joint Symposium: Assembly Technology in Polymer Science, 2014 年 4 月, Daejeon

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森川 全章 (MORIKAWA Masa-aki)

九州大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：10363384