

令和 4 年 10 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03036

研究課題名(和文) 構造的堅牢さと柔軟性を併せ持つ自己集合膜の形成と機能

研究課題名(英文) Functional Self-Assembled Membranes with Structural Rigidity and Flexibility

研究代表者

原野 幸治 (Harano, Koji)

東京大学・総括プロジェクト機構・特任准教授

研究者番号：70451515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では円錐型両親媒性フラレン(CFA)を用い、脂質などの小分子自己集合膜よりはるかに高い安定性を持ちながら柔軟性をもち、かつ様々な置換基の導入を許容する「柔らすぎず、固すぎない」分子膜の創製を目指した。その成果として、CFA分子が両親媒性分子でありながら界面活性をもたずに、フラレン同士の強い会合力を介して自己集合するという特異な自己集合挙動を持つことを明らかにした。この性質を活かし、様々なCFAを合成し、水を極めて通しにくい分子膜、高い自立性とプロトン伝導性を有する二次元ナノシートの開発に成功し、さらにはCFA集合体を基盤とした細胞への核酸輸送システムを実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果の意義は、様々な材料応用がなされてきたフラレンの新たな応用用途として「柔軟性と構造堅牢性を併せ持つ新型分子膜」を提案できたという点に集約される。膜を形成する個々のユニットは低分子であり、有機合成的なアプローチでの分子膜構造の精緻なチューニングが可能である一方で、低分子集合体としては特異なまでの高い安定性を利用した化学合成および超分子合成による膜への機能付与が可能となる。極めて幅広い機能設計と極薄にもかかわらず取り扱い可能な丈夫さをもったこの分子膜は機能性材料開発の基盤となると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used conical amphiphilic fullerenes (CFAs) to create a molecular membrane that is neither too soft nor too hard, which is much more stable than small self-assembled membranes such as lipids, yet flexible enough to allow the introduction of various substituents. As a result, we found that CFA molecules are amphiphilic but have no interfacial activity and have a unique self-assembling behavior mediated by the strong association force between fullerenes. Based on this property, we have synthesized a variety of CFA molecules and succeeded in developing a molecular film that is extremely impermeable to water, a two-dimensional nanosheet with self-supporting nature and proton conductivity, and a nucleic acid transport system for cells based on micellar assembly of CFA.

研究分野：超分子化学

キーワード：フラレン 超分子化学 分子集合体 二分子膜 電子顕微鏡 両親媒性分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分子膜は物質のふるい分け、外界とのバリア、分子やナノ材料の担体など自然界のみならず医療、工業プロセスなど産業界でも重要な役割を担う材料である。これまで知られている分子膜の構築法は大きく分けて、生物に範をとった脂質様両親媒性分子の水中での自己集合と、有機高分子からなるネットワーク構造構築の二つに分かれる。前者は非共有結合に基づく数ナノメートル厚の分子性膜であり構造強度が弱く、炭化水素からなる分子構造のため柔軟であり思い通りに膜の集合構造を制御することが難しい。生物界では脂質二重膜にコレステロールやタンパク質分子を複合化することで物理強度や機能を持たせているが、人工的に生物界の膜の構造と機能を再現することは困難である。一方で、高分子膜はミクロン厚の共有結合に由来する強固な膜であり、人間の手で機能を持たせることが容易であるが、分子レベルで構造と機能を制御するのは未だ挑戦的課題として残されている。

申請者らは、精密設計した水溶性[60]フラレーンの自己集合化およびドラッグデリバリーシステムの担体としての応用を探究する中で、コア・シェル型の二層構造をもつ新型分子二重膜からなる小胞体(ベシクル)の開発と機能化研究を行ってきた。構成要素となる分子は、5つの置換基を有する剛直なアニオン型[60]フラレーン $R_5C_{60}-K^+$ であり、フラレーン骨格と(パーフルオロ)アルキル鎖という2種類の異なる性質をもった疎水部からなる。この分子を水に溶解させると、フラレーン同士が強い疎水性相互作用により集合し二重膜を形成し、アルキル側鎖が水相側に呈示される。これは親水基が表面に露出して水溶性とコロイド安定性を獲得する従来型の両親媒性分子膜とは大きく異なるものであり、フラレーン分子同士の強い凝集力が堅牢な膜構造を創り出すことで初めて可能となった特異な水溶性ベシクルである。

この二重膜はコア部を成すフラレーンの電子豊富かつ疎水的な空隙に由来して種々の特異的な性質を示す。例えば、水分子が膜内部のフラレーン部位と電荷移動相互作用によりフラレーン間の空隙に強くとらわれることで、天然の脂質膜の1万分の1、さらには人工両親媒性高分子の膜よりも低い、これまで知られている分子膜の中で最も水の保持能を示す。さらに、自己集合膜としての安定性にも優れており、80 °Cの熱水の中でも構造を維持するだけでなく、ベシクルを固体基板上で乾燥し10⁻⁵ Pa という走査電子顕微鏡(SEM)の高真空環境に晒してもカプセル構造は崩壊しない(図1)。この構造的な堅牢さはベシクル形成後の共有結合的および超分子的化学修飾を可能とし、生体親和性の高いタンパク被覆ベシクルへの誘導化とこれを担体とした細胞への薬剤輸送に成功している。このように、コア・シェル分子膜は過酷環境や化学修飾に耐える構造的堅牢さと柔軟な化学修飾性という、高分子膜と分子集合体膜それぞれの利点を持ち合わせており、機能性低分子、高分子、ナノ材料、および生体分子をの複合化により、脂質様分子からなる従来の自己集合膜では実現できなかった高性能分子膜の創製への途が拓けている。

2. 研究の目的

本研究は、小分子集合体の膜と高分子ネットワーク構造の間に存在するギャップを、数ナノメートルサイズで分子量1000-3000のオリゴマー領域のサイズを持つ両親媒性フラレーンの化学を基盤として探究することを目的とする。このフラレーン自己集合膜は、従来の自己集合膜に比べて構造的に堅牢であるが、高分子膜よりは構造柔軟性があり厚さも薄い、すなわち「柔らかすぎず、固すぎない」ことが大きな特徴である(図2)。本研究ではこの特長を活かして、(1)フラレーン膜の重合による「薄くて柔らかいが壊れない高分子膜」の合成、(2)フラレーン膜をテンプレートして用いた重合反応制御によるナノメートル厚・サイズを持った高分子膜・集合体の合成、(3-1)フラレーン膜の堅牢性を活用した有機・無機ハイブリッド膜の合成をめざす。さらには脂質膜とは異なる特殊な膜環境を利用した(3-2)表在性膜タンパク質の機能改変、にも挑戦する。フラレーン膜を基盤とした膜性能制御、膜空間を反応場としたポリマー合成とフォールディングの制御、もしくはポリマー、ナノ材料や生体分子とのハイブリッド化を達成することによって、高効率ドラッグデリバリーシステムに資する輸送担体や不均一反応場として応用化の基盤を築く。

3. 研究の方法

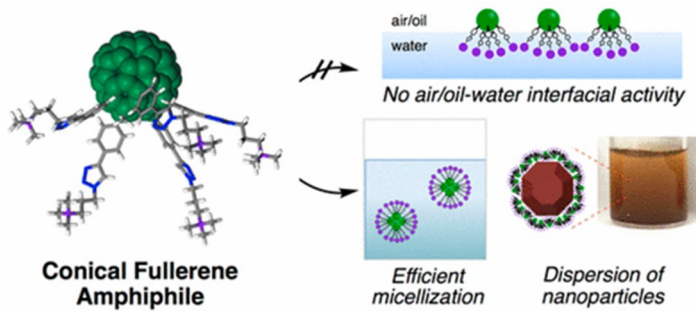
機能性修飾の土台となるフラレーン二重膜の合目的的な性質制御の基盤を固めるため、初年度は合成化学的アプローチに基づく、(1-1)膜重合による堅牢性の付与(1-2)側鎖の配座設計による流動性の付与、に取り組む。二年目以降はこれらの二重膜を基盤とし、超分子化学的アプローチに基づく膜機能化研究を推進する。具体的には、膜表面を修飾化土台とした(2)フラレーン膜の堅牢性を活用した有機・無機物のハイブリッド膜の合成、および膜内疎水空間を修飾化土台とした(3-1)フラレーン膜をテンプレートとしたポリマーナノ集合体の合成、(3-2)膜タンパク質との複合化と機能改変、を検討する。

4. 研究成果

コニカル両親媒性フラーレン (CFA) の分子設計と自己集積化制御により、従来に無かった機能を有する分子膜の機能を開発したと共に、CFA の特異性質を利用した核酸輸送システム、および電子線トモグラフィーによる三次元構造解析手法の開発に成功した。その内容を以下に示す。

(1) CFA の特異な界面挙動の発見と高いミセル形成能を利用した固体分散

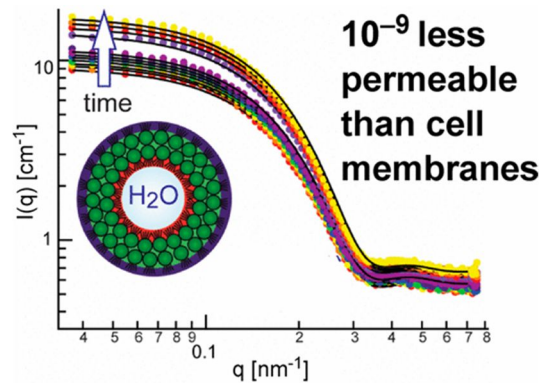
界面活性剤の二大機能は気液・液液界面への吸着による界面活性の発現と、液相および固液界面でのミセル形成による可溶化であり、それぞれ重要な応用用途がある。一方で界面活性作用によって引き起こされる泡立ちは工業プロセスにおいてしばしば問題となることから、ミセル化能のみを維持し界面活性を抑えた材料が望まれている。しかし、そのような界面不活性のミセル化分子は両親媒性高分子においてわずかに報告例があるのみであり、特にその分子構造と非界面活性発現の相関については不明であった。我々は、五重付加型 [60] フラーレン骨格を有する両親媒性分子を用いた分子膜研究の形成を進める中で、周縁部にイオン性親水基を有するコーン型両親媒性分子 (CFA) が、水中で μm オーダーの臨界ミセル濃度を持つ優れたミセル化分子である一方で、高濃度においても気液・液液界面を示さない、両親媒性低分子として新しい性質を示す化合物であることを見いだした。本研究では、親水基の種類や骨格を変えた一連の CFA の界面活性とミセル化能を系統的に調べることにより、コーン型の分子骨格と密に配列したイオン性親水基が協同的に作用して界面における Gibbs 単分子膜の形成を抑制し、液中におけるミセル化の効率化に寄与していることを明らかにした。さらに、CFA の優れたミセル形成能を活かし、磁性粒子やカーボンナノチューブ等のナノカーボン材料をわずかな添加量で水中に分散させる事にも成功した。



当初目的である分子膜開発を行う過程で、フラーレン両親媒性分子の界面活性というこれまで着目されていなかった性質に着目し研究を進めた結果、界面活性をもたないミセル化分子という従来にない機能をもった分子を発見するに至った。フラーレン分子が極めて高い自己集合能を持つことを示す結果でもあり、今後の分子膜デザインにも活用できる重要な知見である。

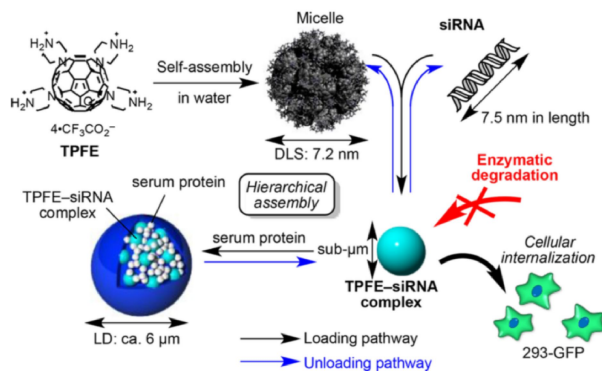
(2) 真空下でも水が漏れない分子膜からなるナノ小胞体を開発

独自開発したコニカル両親媒性フラーレン分子の自己集合により形成する直径 28nm の二重膜ベシクルについて、中性子散乱法および高分解能電子顕微鏡観察によりベシクル構造および二重膜の物質透過能を精査した結果、脂質膜に比べ最大 10 億倍水を通しにくく、真空中でも水を保持する特異な性質を有することを明らかにした。特に電子顕微鏡観察において、 10^{-10} 気圧という高真空下においても内水相に由来する水分子からの酸素原子のシグナルが検出された。このようなナノスケールの器に閉じ込められた水相の物理化学性質に興味を持たれると共に、電子顕微鏡により水相内の分子・ナノ材料の動的挙動を追跡できる可能性を秘めている。



(3) 階層的集積化を鍵とした低毒性薬剤輸送システムの機構解明

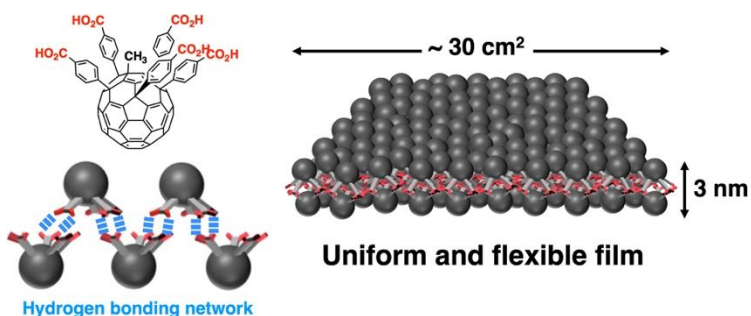
カチオン性フラーレンを薬剤輸送キャリアとして用いた肺選択的 siRNA 輸送システムについて、フラーレンと siRNA の血中における複合体形成を顕微鏡観察を中心とした分析手法により追跡した。その結果、血中において siRNA とフラーレンのサブミクロンサイズ集合体が血清タンパク質とさらに階層的に集積化しミクロンサイズ凝集体となり、肺の毛細血管へ選択的に蓄積され、肺選択的輸送を実現していることが明らかとなった。低毒性



の薬剤輸送システムの開発に繋がる成果である。

(4) 柔軟性と堅牢性を併せ持つ 3nm 膜厚のプロトン伝導膜

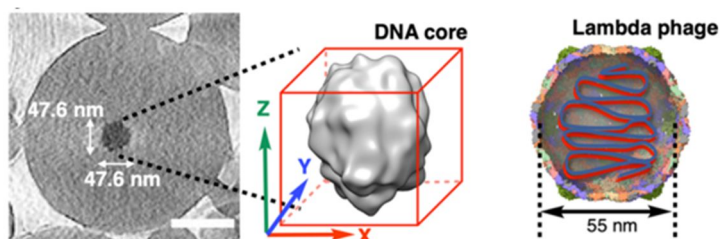
界面での低分子自己組織化と [60] フラーレンを材料とした有機合成技術を駆使し、「自立可能な剛直性を有する自己集合型有機ナノシート」という新二次元材料の創製を目指した。五重付加型 [60] フラーレンが自己集合して形成する分子膜からなる小胞体(ベシクル)が、フラーレン同士



の強い凝集作用により真空下でも膜形状を保つという知見に基づき、界面合成手法を用いて五重付加型フラーレンを二次元界面に押し込めることで「自立有機ナノシート」を作成することに成功した。具体的には、5つのカルボン酸部位をもつ円錐状フラーレン両親媒性分子(CFA)を気液界面にて集積化することで、数十 cm²の面積にわたって柔軟かつ構造的に均一な厚さ 3nm の逆二重膜へと自己組織化させ、フィルムとして単離することができた。理論的には、1gの両親媒性物質で 300m²もの広さを 3nm の膜で覆うことができる。この逆二重膜構造の特徴として、単純に CFA の濃度を上げるだけで容易に多層膜を形成することも明らかとなった。これらのフィルムは、逆二重膜構造を維持したまま、さまざまな平面または穴の開いた基板に転写することができ、例えば、金の楕円電極に転写したフィルムは、 $1.4 \times 10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$ までのプロトン伝導性を示した。このフィルムはアモルファスで柔軟性があり、電子線を照射すると巻き上がるという、屈曲電気特性を示す。

(5) フラーレン球状粒子を用いた電子線トモグラフィー

電子線トモグラフィー法を用いた生体物質やナノ材料の構造解析のための試料調製法を開発したこの研究は、理医共同研究の真骨頂とも言うべき成果である。通常、タンパク質や生体組織などの構造解析では非晶質氷やポリマー薄膜などに観察試料を包埋・固定するが、傾斜観察時の包埋材料の厚みが増加による試料コントラストの低下が問題となる。



今回 CFA を出発物質とした自己集合型フラーレン球状粒子を包埋材料として用いることで試料コントラストを維持したまま高傾斜観察を実現し、たとえばバクテリオファージの DNA 構造を捉えることに成功した。本手法は水中での中性フラーレン分子とそのカリウム塩間での平衡を利用してナノ粒子(Fullersphere)を生成させたところにオリジナリティーがある。簡便な実験手法で実行でき、無機材料から生体分子まで幅広い試料のトモグラフィー解析に適用可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Harano Koji, Nakamura Eiichi	4. 巻 52
2. 論文標題 Interfacial Chemistry of Conical Fullerene Amphiphiles in Water	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Accounts of Chemical Research	6. 最初と最後の頁 2090 ~ 2100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.accounts.9b00318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Harano Koji	4. 巻 94
2. 論文標題 Self-Assembly Mechanism in Nucleation Processes of Molecular Crystalline Materials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 463 ~ 472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20200333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sekine Ryosuke, Ravat Prince, Yanagisawa Haruaki, Liu Chao, Kikkawa Masahide, Harano Koji, Nakamura Eiichi	4. 巻 143
2. 論文標題 Nano- and Microspheres Containing Inorganic and Biological Nanoparticles: Self-Assembly and Electron Tomographic Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 2822 ~ 2828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c11944	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsuura Ryo, Hiraishi Atsuko, Holzman Lawrence B., Hanayama Hiroki, Harano Koji, Nakamura Eiichi, Hamasaki Yoshifumi, Doi Kent, Nangaku Masaomi, Noiri Eisei	4. 巻 10
2. 論文標題 SHROOM3, the gene associated with chronic kidney disease, affects the podocyte structure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-77952-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minami Kosuke, Okamoto Koji, Harano Koji, Noiri Eisei, Nakamura Eiichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Hierarchical Assembly of siRNA with Tetraamino Fullerene in Physiological Conditions for Efficient Internalization into Cells and Knockdown	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 19347 ~ 19354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.8b01869	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abuillan Wasim, Becker Alexandra S., Deme Bruno, Homma Tatsuya, Isobe Hiroyuki, Harano Koji, Nakamura Eiichi, Tanaka Motomu	4. 巻 140
2. 論文標題 Neutron Scattering Reveals Water Confined in a Watertight Bilayer Vesicle	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 11261 ~ 11266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.8b04066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nitta Hirohisa, Harano Koji, Isomura Mayuko, Backus Ellen H. G., Bonn Mischa, Nakamura Eiichi	4. 巻 139
2. 論文標題 Conical Ionic Amphiphiles Endowed with Micellization Ability but Lacking Air/Water and Oil/Water Interfacial Activity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 7677 ~ 7680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.7b01596	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 原野幸治
2. 発表標題 高分解能走査電子顕微鏡を駆使した有機分子集合体の機能開拓
3. 学会等名 SCAN TECH 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Harano
2. 発表標題 Molecular Electron Microscopy for Visualization of Dynamic Chemical Events
3. 学会等名 School of Physical Science and Technology Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Harano
2. 発表標題 Molecular Electron Microscopy for Self-Assembly and Chemical Reactions
3. 学会等名 Department Lecture of Fudan University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関根良輔, ラバト プリンス, 柳沢春明, 吉川雅英, 原野幸治, 中村栄一
2. 発表標題 電子顕微鏡観察における包埋材料としてのアモルファスフラーレン粒子の開発
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryosuke Sekine, Prince Ravat, Haruaki Yanagisawa, Chao Liu, Masahide Kikkawa, Koji Harano, Eiichi Nakamura
2. 発表標題 Organofullerene Nano- and Microspheres Containing Inorganic and Biological Nanoparticles: Self-Assembly and Electron Tomography
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Harano
2. 発表標題 Ultrathin and Watertight Fullerene Membranes
3. 学会等名 The China-Japan Workshop for Innovations in Molecular Science and Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関根良輔, Prince Ravat, 柳澤春明, 吉川雅英, 原野幸治, 中村栄一
2. 発表標題 フラーレンアモルファス粒子の調製法と電子顕微鏡観察試料包埋材としての応用
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第74回学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原野幸治・Wasim Abuillan・Alexandra S. Becker・Bruno Deme・本間達也・磯部寛之・中村栄一・田中求
2. 発表標題 中性子散乱法で明らかにしたフラーレン二重膜ベシクルに束縛されたナノ水相
3. 学会等名 第29回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koji Harano
2. 発表標題 Molecular Motion, Assembly, and Reactions Investigated by Atomic-Resolution Electron Microscopy
3. 学会等名 Pure and Applied Chemistry International Conference 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Harano
2. 発表標題 Functional Hybrid Vesicles Made of [60]Fullerene Amphiphiles
3. 学会等名 Japan-China Joint Interdisciplinary Symposium on Coordination-based Hybrid Materials (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 関根良輔, Sai Prakash Maddala, 柳澤春明, 吉川雅英, 原野幸治, 中村栄一
2. 発表標題 フラーレン自己集合膜で被覆したマイクロメートルサイズ水粒子の単離と特異な熱安定性
3. 学会等名 第28回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原野幸治, 新田寛久, 磯村真由子, Ellen H. G. Backus, Mischa Bonn, 中村栄一
2. 発表標題 コーン型両親媒性フラーレン: 気液・液液界面活性をもたないミセル形成分子
3. 学会等名 第28回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原野幸治, 新田寛久, 磯村真由子, Ellen H. G. Backus, Mischa Bonn, 中村栄一
2. 発表標題 コーン型両親媒性フラーレン: 気液・液液界面活性をもたない優れたミセル化剤
3. 学会等名 第53回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原野幸治
2. 発表標題 高分解能電子顕微鏡を駆使した分子集合体科学の探求
3. 学会等名 2017年度中国四国支部高分子講演会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryosuke Sekine, Prince Ravat, Chao Liu, Haruaki Yanagisawa, Masahide Kikkawa, Koji Harano, Eiichi Nakamura
2. 発表標題 Size-controlled Self-assembly and Characterization of Amorphous Particles Made of Pentasubstituted [60]Fullerenes
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学総括プロジェクト機構「革新分子技術」総括寄付講座 https://moltech.jp/ja/</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------