

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19750177

研究課題名（和文） 生体関連高分子の表面極近傍水の力学的物性評価

研究課題名（英文） Evaluation of physical properties of biomacromolecules including solution on a substrate

研究代表者

古澤 宏幸(FURUSAWA HIROYUKI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：60345395

研究成果の概要：

水晶発振子基板上に原子移動ラジカル重合法(ATRP法)を用いて様々な合成高分子をグラフト重合あるいは様々なタンパク質を固定化させ、それらの水和量と振動エネルギー散逸値を求めたところ、分子に固有の値を示すことがわかった。水晶発振子は基板上的分子を直接振動させることのできるデバイスであり、揺らしてみることによって質量だけでなく物質の固さ・柔らかさ(粘弾性)などの力学的物性情報を得ることができる新たなツールになることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学、高分子・繊維材料

キーワード：水晶発振子、エネルギー散逸、生体関連高分子、結合水、固液界面

## 1. 研究開始当初の背景

以前より申請者らは、マイクロバランスとして知られる水晶発振子を用いてその基板上で生じる生体分子間相互作用などの事象を、基本的な物理量である質量変化として検出することを検討してきた。水晶発振子は水晶薄板の両面に金電極を蒸着し交流電圧を印加することにより水晶板を規則正しく振動させたものである。マイクロバランス法とはその電極上に物質が吸着するとその質量に応じて振動数が変化することを利用した方法である。別の観点から見ると、水晶発振

子は基板上的分子を直接振動させることのできるデバイスであり、揺らしてみることによって質量だけでなく物質の固さ・柔らかさ(粘弾性)などの力学的物性情報を得ることができる新たなツールになると期待できる。

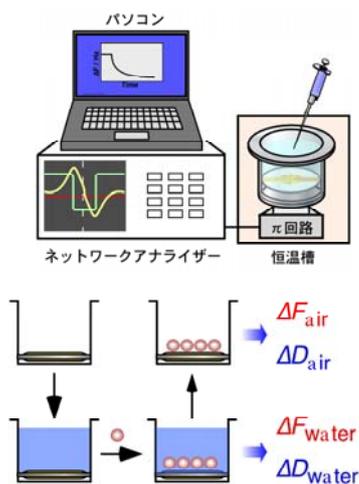
## 2. 研究の目的

本研究では、水晶発振子基板に合成高分子やDNA、糖鎖、タンパク質といった生体高分子を固定化した基板を作製して、溶媒と接触させることで様々な固液界面を作り出し、その中を水晶発振子の力学的な振動を伝播

させることによって物質-界面ごく近傍薄層空間内の固定化物質および溶媒に関する力学的物性に対する知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 水晶発振子の振動現象を高精度に解析することのできる装置の開発を行った。基本構成として、水晶板を組み込んだセル、恒温槽、 $\pi$ 回路、ネットワーク・アナライザー、パソコンを用いる。水和量と振動エネルギー散逸値を求めるために、ネットワーク・アナライザーを用いて水晶発振子に対し交流電場の周波数掃引を行うことでコンダクタンスの周波数応答より得られる共振曲線を解析し、共振周波数 ( $F_s$  値) とその値に対する共振曲線の半値幅の比として与えられる振動エネルギー散逸値 ( $D$  値; Dissipation Factor) を算出した。基板上へ物質を固定化する前後での水中および気相中での各数値の差分 ( $\Delta F_{\text{water}}$ 、 $\Delta D_{\text{water}}$ 、 $\Delta F_{\text{air}}$ 、 $\Delta D_{\text{air}}$ ) から、単位質量当たりの水和量 ( $(-\Delta F_{\text{water}})/(-\Delta F_{\text{air}})-1$ )、単位質量当たりのエネルギー散逸値 ( $\Delta D_{\text{water}}/(-\Delta F_{\text{air}})$ ) を求めた。



(2) 合成高分子もしくは生体高分子を固定化した水晶発振子基板を用いて溶媒和量と振動エネルギー散逸値の測定を行った。得られた界面ごく近傍領域の溶媒和量と振動エネルギー散逸値の二次元プロットを作成し、高分子膜の機能との相関関係の有無を明らかにすることを試みた。さらに、様々なタンパク質表面に対しても検討を行い、タンパク質の液体との摩擦などの物性特性の評価を試みた。

### 4. 研究成果

(1) 2-Hydroxyethyl Methacrylate (HEMA), 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA), MPC (2-Methacryloyloxyphosphorylcholine) 高密度基板 ( $s = 0.6 \pm 0.1$  chains/nm<sup>2</sup>,  $M_n =$

4000-20000) は、原子移動ラジカル重合 (ATRP) 法を利用し、QCM 金基板表面に高密度ブラシを調製した。測定はネットワークアナライザーを用いて 27 MHz 域に共振周波数を持つ水晶発振子のアドミタンス解析をすることにより行った。種々の表面グラフト高分子を pH や温度などを変化させ、 $F$  及び  $D$  値の変化を観察した。種々のポリマーの高密度と低密度基板の溶媒和とエネルギー散逸値を下図に示した。

黒塗りのプロットで示される高密度基板は、

Qual-Timer Q7  
ELEKTROPHORA  
C™C+CAEENE EEE™ACECECPC™...CQKovC-CAB

溶媒和 (縦軸) エネルギー散逸 (横軸) どちらも小さい原点付近に位置するが、白抜きプロットで示される低密度基板は、溶媒和のみ大きいもの (NIPAM)、エネルギー散逸のみ大きいもの (HEMA)、どちらも大きいもの (DMAEMA)、どちらもほとんど変化しないもの (MPC) があった。このように低密度ではポリマーによって傾向は異なったが、高密度基板では溶媒和もエネルギー散逸も小さくなり、外部刺激にも応答しなくなることがわかった。

(2) タンパク質及び DNA 等の生体分子を水晶発振子基板に固定化させた時の水中での振動数変化 ( $-\Delta F_{\text{water}}$ ) とエネルギー散逸変化 ( $\Delta D_{\text{water}}$ )、気相での振動数変化 ( $\Delta F_{\text{air}}$ ) を求めた。 $-\Delta F_{\text{water}}$ 、 $\Delta D_{\text{water}}$  を  $-\Delta F_{\text{air}}$  で除した値を単位質量当たりの水和量 [ $(-\Delta F_{\text{water}})/(-\Delta F_{\text{air}})$ ] 及びエネルギー散逸量 [ $\Delta D_{\text{water}}/(-\Delta F_{\text{air}})$ ] として算出し、これらの相関関係を比較した。未変性タンパク質は、DNA と比較してエネルギー散逸の小さい固い性質を持っていることがわかった。一方、S-S 結合を還元メチル化しタンパク質を変性させると、水と水が増加して分子自身のエネルギー散逸が大きい柔らかい構造になることがわかった。一本鎖 DNA および二本鎖 DNA はともに柔らかい構造物性を示したが、ヘキサアンミンコバルトのような多価カチオンを添加すると、タ

ンパク質と同程度の硬い構造となることがわかった。 $F$ 値および $D$ 値を用いて基板上の物性評価が可能であることがわかった。

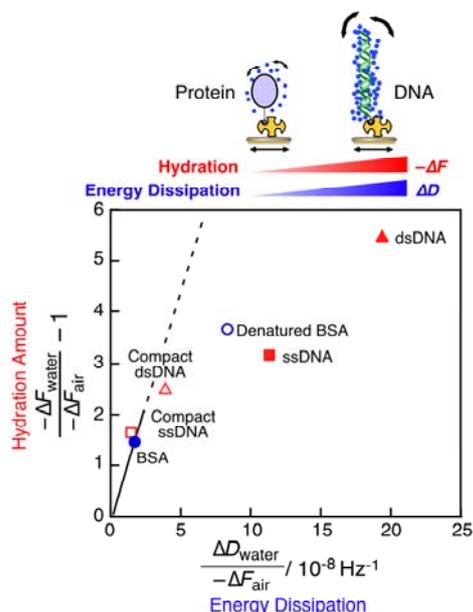


図 種々の生体高分子の水和とエネルギー散逸値の比較

#### 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3件)

① Hiroyuki Furusawa, Mizuki Morita, Tomomitsu Ozeki, and Yoshio Okahata, Added Mass Effect on Immobilizations of Proteins on a 27 MHz Quartz Crystal Microbalance in Aqueous Solution, *Anal. Chem.*, **81**, 2268-2273 (2008). (査読有)

② Tomomitsu Ozeki, Mizuki Morita, Hiroshi Yoshimine, Hiroyuki Furusawa, and Yoshio Okahata, Hydration and Dissipation Energy Measurements of Biomolecules on a Piezoelectric Quartz Oscillator by Admittance Analyses, *Anal. Chem.*, **79**, 79-88 (2007). (査読有)

③ 岡畑 恵雄・古澤 宏幸、水晶発振子を用いた生体分子の水和と粘弾性の定量化、*表面科学*, **28**(10)、606-609 (2007). (査読なし)

[学会発表] (計7件)

① 古澤 宏幸、小関 智光、森田 瑞樹、岡畑 恵雄、水晶発振子上で振動させられるタンパク質の水中での挙動と物性比較、日本化学会第89回春季年会、2009年3月27-30日、日本大学船橋キャンパス

② 古澤 宏幸、鯉田 健一朗、岡畑 恵雄、水晶発振子エネルギー散逸測定法を用いてタンパク質の水和と粘弾性を観察する、第22回生体機能関連化学シンポジウム、2007年9月28-29日、東北大学多元物質科学研究所

③ 岡畑 恵雄、関根 朋美、古澤 宏幸、辻井 敬亘、福田 猛、水晶発振子エネルギー散逸測定評価によるポリマーブラシの刺激応答性、第56回高分子学会年次大会、2007年5月29-31日、国立京都国際会館

④ 古澤 宏幸、鯉田 健一朗、岡田 和恵、篠原 康郎、西村 紳一郎、岡畑 恵雄、水晶発振子エネルギー散逸測定評価による抗体タンパク質の糖鎖の効果、第56回高分子学会年次大会、2007年5月29-31日、国立京都国際会館

⑤ 古澤 宏幸、岡畑 恵雄、水晶発振子エネルギー散逸測定装置の開発とその応用、日本化学会第87回春季年会、2007年3月25-28日、関西大学千里山キャンパス

⑥ 鯉田 健一朗、古澤 宏幸、岡田 和恵、篠原 康郎、西村 紳一郎、岡畑 恵雄、水晶発振子エネルギー散逸測定法を用いた抗体タンパク質の粘弾性評価、日本化学会第87回春季年会、2007年3月25-28日、関西大学千里山キャンパス

⑦ 関根 朋美、古澤 宏幸、辻井 敬亘、福田 猛、岡畑 恵雄、水晶発振子エネルギー散逸測定法を用いたポリマーブラシの刺激応答性の評価、日本化学会第87回春季年会、2007年3月25-28日、関西大学千里山キャンパス

[図書] (計1件)

① 古澤 宏幸・岡畑 恵雄、1-VI-1 水晶発振子マイクロバランス法(分担執筆)、*実験医学別冊 分子間相互作用解析ハンドブック*、磯辺俊明・中山敬一・伊藤隆司 編集(羊土社)、137-143 (2007).

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古澤 宏幸 (FURUSAWA HIROYUKI)  
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教  
研究者番号：60345395

(2) 研究分担者

—

(3) 連携研究者

—