

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 4 月 14 日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02546

研究課題名（和文）高分子鎖一本の構造ダイナミクスとポリマー分子間相互作用のイメージング

研究課題名（英文）Single-Molecule Imaging of Structural Dynamics of a Polymer Chain and Interactions between Polymer Chains

研究代表者

篠原 健一（Shinohara, Ken-ichi）

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：10292244

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：アニオン性ポリマー鎖とカチオン性ポリマー鎖には、静電相互作用による引力が働くと考えられるが、それでは、水中室温の条件下で、基板上でゆらく両ポリマー鎖一本一本は、互いにどの位の距離から引力を感じ、そして結合するだろうか？ 先ず、これを高速AFMイメージングによって直接観測して明らかにした。アニオン性ポリマーにはPAMPSおよびPAMPSナトリウム塩を用い、一方、カチオン性ポリマーにはポリアリルアミン（PAA）およびPAA塩酸塩を採用した。PAMPSのスルホン酸基とPAAのアミド基との間のダイナミクスを解明した結果、PAMPS長鎖一本の末端部にPAA短鎖1分子が結合した複合体が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子間相互作用には、ファンデルワールス相互作用、静電相互作用、水素結合による相互作用、水中における疎水性相互作用などがある。本研究では、これらの相互作用がポリマーの分子内（鎖中）および分子間（鎖間）でどう働き、どのような構造とダイナミクスが観測されるかを明らかにした。

その結果、ポリマー鎖一本同士の相互作用が高速AFMで直接確認された。これは、分子マシンの創製に必須の見解であり、将来実現されるであろう分子モーターに繋がる成果である。

研究成果の概要（英文）：Anionic and cationic polymer chains are thought to be attracted by electrostatic interactions. From what distance do the chains feel their attraction to each other and join together? We first clarified this by direct observation by high-speed AFM imaging. PAMPS and PAMPS sodium salt were used as anionic polymers, while polyallylamine (PAA) and PAA hydrochloride were employed as cationic polymers. Since it is necessary to distinguish between the two by high-speed AFM, one having a significantly different molecular weight was used. Since it is possible to interact between the sulfonic acid group of PAMPS and the amide group of PAA, as a result of elucidating this dynamics, a complex in which one PAA short chain molecule is bound to the end of one PAMPS long chain was confirmed.

研究分野：高分子化学

キーワード：ポリマー 1分子 AFM 高速AFM 分子マシン 分子モーター キラル高分子 機能性高分子

1. 研究開始当初の背景

高分子は優れた物性を有する有用な物質であり、人類にとって文明を維持発展させるために不可欠な材料である。ところが、高分子は一般に、その構造が動的である上に多様なため、非常に複雑で、分子レベルの構造と機能の関係を議論することが難しい。すなわち、「どの様な高分子(ポリマー)の構造が如何なる機能を発揮しているのか?」という問いに対して、これまで直接分子レベルで答えることが難しかった。そこで研究代表者は、もしポリマー1分子の構造と機能を直接観測することが出来れば、仮定や推測なしに高分子の構造と機能の関係を議論できると考えた[篠原, 高分子論文集 73, 491-504 (2016)(特集号・総合論文)]。

一方、生命体は人類の英知を遙かに凌駕した機能体であることに疑う余地はない。生体高分子であるタンパク質は、生命機能の発現に重要な役割を担っている。タンパク質が有する卓越した柔軟な機能は、熱によってゆらぎながら水中でタンパク質が形成しているしなやかな高次構造によって発現していると考えられている。そこで、合成高分子にタンパク質の様な高次構造やその組織体を液中で形成させることが出来れば、人工生命的機能を有し、かつ安定性を適度に併せ持つポリマーを創製できるのではないかと考えた。生物物理学の分野では、生体高分子の1分子イメージング研究によってタンパク質などの有する機能の理解が進んでいる[Y. Okada, H. Higuchi, N. Hirokawa. *Nature* 424, 574-477 (2003)]。これらのバイオ研究に触発された代表者は、生物物理学などの異分野の研究者と共同でポリマー1分子のイメージング研究を開始し、これまでに種々のポリマーを合成してこれら高分子鎖一本の構造と機能を探索してきた。ここで、分子性物質の最小単位である1分子をイメージングする装置として、走査トンネル顕微鏡(STM)や原子間力顕微鏡(AFM)また全反射型蛍光顕微鏡(TIRFM)を用いた。また顕微鏡は必要に応じてポリマー観測仕様に改造あるいは新規に製作し、合わせて観測・解析方法を開発した(K. Shinohara, WO 2014104172 A1 国際公開特許)(篠原, 特許第 5907484 号, Apr. 2016 登録特許)。最近、代表者はキラルらせんポリマー鎖一本(長鎖)に沿って短鎖分子が室温の有機溶媒中で移動する歩行現象「ポリマー分子モーター」を発見した。

このポリマー鎖にはペンダント基としてコレステリル基が導入されているので、この長鎖と短鎖の間には、主にファンデルワールス(vdW)力による相互作用引力が働いているものと考察した。また既に、静電相互作用の利用を目論み、準備段階の実験として、いくつかのイオン性ポリマー鎖の高速 AFM イメージングに成功しており(篠原ら, 「ポリマー1分子の直視: ハイドロゲル素材高分子 PAMPS のポリマー鎖一本の動態イメージング」, 第 64 回高分子討論会, 2H07, 2015)。これらの成果を基盤として本応募課題において本格的に展開する。

2. 研究の目的

高速 AFM イメージングは、高分子鎖の動きが直接見える点で極めて有用ではあるが、得られる構造情報はナノメートルスケールであるので、高分子鎖の分子構造から見れば巨視的であり、原子レベルの構造情報ではない。そこで、原子レベルで高分子鎖の動的構造を計算する全原子 MD 法によれば、本研究における相補的手法と成るので有効である。高分子鎖一本の直接観測と計算の実効的な連携である。本研究では、種々の相互作用動態を可視化する。

3. 研究の方法

静電相互作用の高速 AFM イメージング: アニオン性ポリマー鎖とカチオン性ポリマー鎖には、静電相互作用による引力が働くと考えられるが、それでは、水中室温の条件下で、基板上でゆらぐ両ポリマー鎖一本一本は、互いにどの位の距離から引力を感じ、そして結合するだろうか? 初年度では先ず、これを高速 AFM イメージング(篠原, 登録特許, 特許第 5907484 号)によって直接観測して明らかにする。カウンターイオンの影響もあるのでイオン種の選択と水溶液濃度を最適化する。1価イオンを基本的に使用するが、2価イオンを使えばイオン架橋の効果も見る事ができる。これまでの研究で、高分子鎖同士がブラウン運動で偶然、分子接触することは確認されているが、互いに引力が作用していない場合には、速やかに解離することが分かっている。

アニオン性ポリマーには PAMPS および PAMPS ナトリウム塩を用い、一方、カチオン性ポリマーにはポリアリルアミン(PAA)および PAA 塩酸塩を採用する。高速 AFM で両者を見分ける必要があるので、分子量が大幅に異なる($M_w: 10^4$ と 10^5 など)かつ分散度は小さい試料(市販品、必要に応じて重合する)を用いる。もし静電相互作用が過度な場合には、中性モノマーとの共重合体を用いることで相互作用力を調整する。また、アニオン性の PAMPS 鎖と中性のポリアクリルアミド(PAAm)鎖との相互作用の高速 AFM イメージングも実施し上記実験との相違を探る。スルホン酸基とアミド基との間で相互作用が可能であるので、このダイナミクスを解明する。高速 AFM イメージングで得られた高分子鎖の重心および鎖中の各観測点の軌跡から MSD(Mean-Square

Displacement)解析を行い、ブラウン運動およびマイクロブラウン運動の拡散係数を算出することで、定量的に運動性を比較し序列化する。合わせて、鎖中の相互作用するセグメントの位置、拡散係数を明らかにする[篠原, WO 2014104172 A1 国際公開特許. 篠原ら, *Sci. Rep.* **8**, 13982 (2018)]。

全原子 MD による静電相互作用の in silico 観察: 高速 AFM イメージングで観測された構造ダイナミクスを原子レベルで理解するため、スーパーコンピュータを利用して実際の密度で構築した MD セル中にポリマー鎖を配置し、相互作用の動態を in silico 観察する[篠原ら, *Sci. Rep.* **9**, 9791 (2019)]。また、応募者の所属機関で自由に使用できるスーパーコンピュータは、原子数 10 万を超える MD 計算であっても 1.0 ns のシミュレーションを 50 時間程度で完了するので、比較的大規模な計算であっても実行可能である。

高速 AFM と in silico 観察結果の統合的理解: アニオン性ポリマー鎖とカチオン性ポリマー鎖との間に働く静電相互作用を解明する。具体的には、静電相互作用し易いセグメントは運動性が高い鎖末端なのか?」などの問いに答える。加えて、「相互作用引力によって運動に変化(引き寄せられ始める)が見られる距離を計測する。ここに、全原子 MD 計算の結果を加えて、両ポリマー鎖中で静電相互作用する置換基の数とその動的変化および距離を二次解析して計測する。合わせて算出されるエネルギー値の変化にも注目し MD モデルの動きとの関連を明らかにする。また温湿度制御ユニットを高速 AFM 装置に組み込み次年度以降に計画している温度応答性ポリマー鎖動態観測に備える。もし高速 AFM のスキャナーが観測対象の状態に合わない場合には、伸び係数など特性が異なる piezo に変更すれば、見たい構造動態に合わせて最適化できるので、適宜、高速スキャナーを製作する装置改造を実施する。代表者は、高速 AFM 装置改造等の技術を有する。[篠原, 特許第 5907484 号 (2016)]

平均二乗変位 (MSD) プロット解析: 短鎖分子の拡散係数が計測された。ポリマー分子間相互作用している分子鎖の MSD プロットとは別に、コントロール実験として相互作用していない分子鎖の MSD プロットとを比較する。相互作用をパラメータ化することによって、ポリマー構造との相関関係を序列化する。(篠原, WO 2014104172 A1 国際公開特許)

全原子 MD によるポリマー鎖相互作用の in silico 観察: 少数本のイオン性ポリマー鎖が相互作用する様子を in silico 観察する。同様に、上記 PNIPAM などの系についても in silico 観察し、原子レベルで相互作用のダイナミクスを計測する。高速 AFM と全原子 MD の結果を相補的に活用して高分子鎖のダイナミクスを理解し、ポリマー分子間コミュニケーションに関する新しい概念・原理原則を創出する。

vdW 相互作用の高速 AFM イメージングと in silico 観察: キラルらせんポリマー鎖間の vdW 相互作用のイメージングを実施する。in silico 観察より、短鎖と長鎖の間で形成される動的構造すなわち分子咬合が再現された。這行運動には、短鎖分子が何量体であるかが重要である。すなわち、長過ぎても動的多点相互作用が強すぎて動かない一方、短すぎると相互作用が弱すぎて直ぐに解離してしまうことが in silico 観察結果より分かった。この点を意識して、高速 AFM で短鎖分子のサイズと這行運動性を定量化 (MSD 解析法) しメカニズムを解明する。

4. 研究成果

アニオン性ポリマー鎖とカチオン性ポリマー鎖の静電相互作用ダイナミクスの高速 AFM イメージングに成功した。アニオン性ポリマーとして PAMPS [poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid)] ($M_w: 2 \times 10^6$, Sigma-Aldrich) を用い希薄水溶液 ($< 10^{-6}$ M) を調製した。カチオン性ポリマーとして PAA · HCl [Poly(allylamine hydrochloride)] ($M_w: 1.5 \times 10^4$, ニットーボームディカル) を用い希薄水溶液 ($< 10^{-6}$ M) を調製した。先ず PAMPS 水溶液 (2 μ l) をマイカ基板上にキャスト、静置後純水でリンスした。その後 PAA · HCl 水溶液 (2 μ l) をマイカ基板上にキャスト、静置後純水でリンスしたものを AFM 観測試料とし 25、30 mM KCl 水溶液中で AFM イメージングした。AFM は高速走査型原子間力顕微鏡 (NVB500, Olympus, Japan) をベースに、独自に改造して用いた。

アニオン性長鎖上をプロセッシブ運動するカチオン性短鎖分子: 室温の水溶液中、PAA · HCl 短鎖分子が PAMPS 長鎖分子上を離れることなくプロセッシブ運動した。この動態を PIV 法によってベクトル解析した結果、PAMPS の長鎖に沿って溶媒流が発生していることが明らかになった(整流効果)。PAMPS/PAA·HCl 間の静電相互作用と PAMPS 長鎖に沿った溶媒流によって高分子鎖上のプロセッシブ運動が観測されたと考察した。また、静電相互作用によるポリマー鎖同士の結合は、全原子 MD シミュレーションで確認された。

複合分子鎖の一方方向性プロセッシブ運動とその制御: 室温の水溶液中、PAMPS 長鎖と PAA · HCl 短鎖 (高分子量体) からなる複合分子鎖がマイカ基板上を一方方向にプロセッシブ運動した。PIV 解析を行ったところ、PAMPS に沿った溶媒流が発生していることが明らかになった(整流効果)。また観測された複合分子鎖の一方方向性プロセッシブ運動は、全て共通して進行方向が構造の偏りに依存する傾向にあった [例えば、PAMPS の上側に PAA · HCl が結合した場合の進行

方向は上、PAMPS の下側に PAA・HCl が結合した場合の進行方向は下]。PAMPS/PAA・HCl 複合分子鎖の「しなやかな」非対称構造と整流効果が一方向性運動を生む本質であり、バイアスブラウン運動であると考察した。さらに複合分子鎖から PAA・HCl 分子が解離すると、一方向性プロセス運動が停止することを発見した。ポリマー 1 分子運動を制御することができることを示す。ナノマシン開発において重要な知見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大貫佑河、篠原健一
2. 発表標題 ポリマー1分子の直視：アニオン性ポリマー長鎖とカチオン性ポリマー短鎖の 複合分子鎖の一方方向性プロセッシブ運動の再現性
3. 学会等名 第70回高分子討論会、3J04
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀諒雅、篠原健一
2. 発表標題 ポリマー 1 分子の直視：分岐構造を有するキララらせん高分子の合成と1分子イメージング
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会、C203-1vn-13
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大貫佑河、篠原健一
2. 発表標題 ポリマー 1 分子の直視：アニオン性ポリマー鎖とカチオン性ポリマー鎖からなる複合分子鎖の一方方向性プロセッシブ運動の発見
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会, 1Pe057
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北陸先端科学技術大学院大学・篠原研究室
<http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/shinohara/>
北陸先端科学技術大学院大学 篠原研究室
<http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/shinohara/>

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
---------	---------