

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22710097

研究課題名（和文）酵素機能ON-OFF型刺激応答性微粒子の創成

研究課題名（英文）

Design of Stimuli-Responsive Particles with Tunable Enzymatic Activity

研究代表者

石井 治之（ISHII HARUYUKI）

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：80565820

研究成果の概要（和文）：

本研究では、まず細胞膜を模倣した温度応答性の脂質ベシクルと無機成分の複合化の基礎的研究として、ベシクル界面へのシリカコートを行い、形成するシリカ層の形態制御に成功した。この知見を基に、金属ナノ粒子とベシクルの複合化およびそのシリカコートを検討し、金ナノ粒子およびセリアナノ粒子を複合化した中空粒子合成に成功した。金ナノ粒子の場合はバイオセンサーや水溶液中の有機合成触媒として、セリアナノ粒子の場合は抗酸化酵素様活性の発現が期待できる。また、温度応答性ゲル内への白金ナノ粒子の担持を検討し、高担持率を達成すると同時に、合成粒子は抗酸化酵素のカタラーゼ活性を発現することを確認した。以上より、温度応答性のベシクルおよび高分子ゲル粒子と酵素の代替である無機ナノ粒子を複合化した、酵素機能を発現可能な刺激応答性微粒子の合成に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Inorganic nanoparticles with enzyme-like activity were deposited on thermo-responsive particles that are vesicle-including hollow silica particles or polymer gel particles. Silica coating of vesicles was first examined and solution pH affected the morphology of silica shell. Gold and ceria nanoparticles were then adsorbed on the vesicles, followed by the silica coating. As-synthesized composite particles can be used as biosensors and catalysts with enzyme-like activity. Platinum nanoparticles were deposited on the poly(*N*-isopropylacrylamide) gel particles with *in situ* method and the composite particle showed catalase-like enzymatic activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ・ ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：中空シリカ粒子、ベシクル、酵素様活性、無機ナノ粒子、温度応答性ゲル

1. 研究開始当初の背景

酵素反応はバイオ分野だけでなく、工業分野でも広く利用されている。この酵素反応を外部刺激により制御できれば、生体内やリアクター内におけるその反応を精密に制御可能となる。本研究では、熱などの外部刺激を加え刺激応答性微粒子の特性を変化させることで、複合化した酵素活性を制御可能な新規微粒子の合成を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、無機ナノ粒子を酵素の代替として用い、幅広い条件で使用可能な酵素様活性発現型の熱刺激応答性微粒子の合成を試みた。具体的には、温度により特性が変化するベシクルおよびポリイソプロピルアクリルアミド (PNIPAM) ゲル粒子に、酵素様活性を有する無機ナノ粒子の担持を検討した。またベシクルとの複合化では、酵素と同様に安定性が低い場合シリカコートを行うことで、ベシクルの有する温度応答性や薬物封入能を維持しながら、シリカ成分由来の強度や特性を付与した。

3. 研究の方法

(1) ベシクルと無機ナノ粒子の複合化

ベシクルの調製は、凍結・融解法や溶液 pH を調整することで行った。粒径調整は押し出し法により適宜行った。ベシクルへのシリカコートは、弱塩基性水溶液中でシリカ源を添加して行った。無機ナノ粒子とベシクルの複合粒子は、無機ナノ粒子をベシクル懸濁液に添加し、その後シリカコートを行うことで合成した。無機ナノ粒子として、金ナノ粒子ならびにセリアナノ粒子を用い、シリカコート時にはシリカ源の他にシランカップリング剤ならびにエタノール適量添加した。

(2) PNIPAM ゲル粒子への白金ナノ粒子担持

水相析出重合で合成した PNIPAM ゲル粒子懸濁液中で、白金源を還元する *in situ* 合成で行った。

4. 研究成果

(1) ベシクルと無機ナノ粒子の複合化

① ベシクル表面へのシリカコート

ベシクルを利用した中空シリカ粒子の合成において、ベシクルの表面電荷および反応 pH がベシクル表面で生じるシリカ層形成反応に与える影響を検討した。ベシクル (粒径 100 nm) の表面電荷は、中性のリン脂質ベシクルに正あるいは負電荷の両親媒性物質を添加して調整した。正電荷あるいは中性のベシクルを用いた場合、凝集が生じた一方で、負電荷ベシクルを用いると反応終了後に凝集は生じなかった。負電荷ベシクルを用いた条件の生成粒子を電子顕微鏡で観察したと

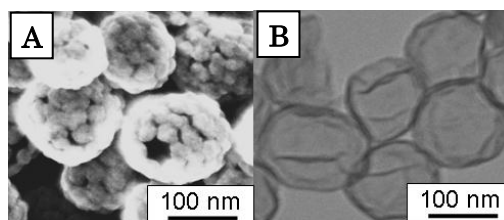


図 1. 中空シリカ粒子の電子顕微鏡像。
(A)ラズベリー型。(B)平滑型。

ころ、内部に空洞を有する中空シリカ粒子を確認した (図 1 A)。また、その粒子表面はシリカナノ粒子が集積した凹凸のあるラズベリー型であった。次に、反応 pH が中空シリカ粒子の形態に与える影響を検討した。ラズベリー型の中空粒子が生成した条件 (pH 10.5) よりも高い pH 11.5 の条件で反応を開始したところ、平滑型でシリカシェル厚が薄い中空粒子が形成した (図 1 B)。これは、水溶液中のシリカ溶解度が高くシリカが析出しにくい環境であったため、シリカナノ粒子が析出せずベシクル表面にシリカ層を形成したと考える。

さらに、2種の生成粒子の物性評価を行ったところ、ベシクルの薬物徐放能に寄与するリン脂質の相転移温度および粒子表面の濡れ性が、シリカ層の形態により変化した。以上より、負電荷ベシクルを利用した中空シリカ粒子の合成において、シリカ層の形態制御 (ラズベリー型、平滑型) に成功した。

(2) 金属ナノ粒子とベシクルの複合化およびシリカコート

① 金ナノ粒子 (AuNP、粒径 4 or 15 nm)

AuNP を正もしくは負電荷のベシクルに添加し、その後シリカコートを行い、AuNP とのベシクルの複合化を検討した。正電荷ベシクルの場合、負電荷の AuNP との静電相互作用により、AuNP がベシクル表面に吸着し、またシリカコートに成功した。負電荷ベシクルの場合は、AuNP 添加時にベシクル表面に吸着しなかったが、シリカコート反応中にベシクルと良好に複合化することがわかった。さらに、AuNP 添加量を増やすことで高い担持率を達成した (図 2 A)。この合成粒子は、AuNP のプラズモン特性や触媒能を利用した、

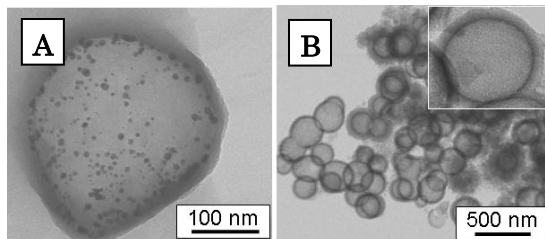


図 2. 金属ナノ粒子とベシクルの複合化。
(A)金ナノ粒子担持中空シリカ粒子。
(B)セリアナノ粒子集積担持中空シリカ粒子。

バイオセンサーや水溶液中での有機合成触媒として利用できる。

②セリアナノ粒子(CeNP、粒径 4 nm)

CeNP とオレイン酸ナトリウム(NaOA)を水溶液中で混合し、その後シリカコートすることでCeNPを集積担持した中空シリカ粒子の合成に成功した。生成粒子を観察すると、200nm程度の中空粒子が形成し、その構造はCeNPが中空状に集積し、内部に黒色のリング構造を確認した。また電子顕微鏡の元素マッピングにより、リング構造にはCe成分が、その表層にSi成分が存在していた。この粒子形成メカニズムを検討したところ、CeNPとNaOAが混合時にナノ粒子ベシクルを形成していたことが示唆された。さらに、生成粒子を焼成し特性評価を行うと、粒子内のCeNPは焼成後も粒径を維持していた。また、窒素吸着量測定より、焼成後の生成粒子はメソ細孔を有することがわかった。セリアは自動車触媒の助触媒として広く利用されているが、近年では生体内の抗酸化酵素に似た活性を示すことが報告されている。したがって酵素様活性発現型の複合粒子の合成に成功した。

(3)PNIPAM粒子への白金ナノ粒子の複合化

温度応答性のPNIPAMゲル粒子存在下で白金イオンを還元したところ、最大30wt%の担持に成功した(図3A)。また、粒子の断面観察を行うと、Pt成分が粒子表面に存在していた(図3B)。したがって、還元反応は粒子表面近傍で生じたことが示唆された。さらに、合成粒子は過酸化水素を分解する抗酸化酵素のカタラーゼ活性を示すことがわかった。PNIPAMゲル内部の親・疎水環境は温度により大きく変化するため、カタラーゼ様活性を温度により制御可能であると考えられる。

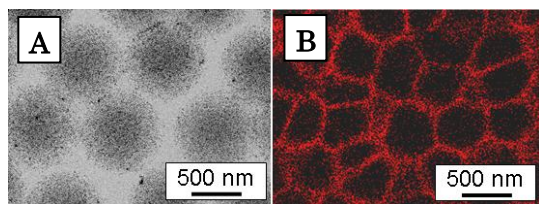


図3. 白金ナノ粒子担持PNIPAMゲル粒子の電子顕微鏡像。(A)TEM像。(B)断面観察およびマッピング像(Pt成分)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Haruyuki Ishii, Kumi Sato, Daisuke Nagao, Mikio Konno, Anionic liposome template synthesis of raspberry-like hollow silica particle under ambient conditions with basic catalyst, *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*, 査読有, 92 (2012) 372-376. DOI:10.1016/j.colsurfb.2011.11.005

〔学会発表〕(計11件)

1. Haruyuki Ishii, Saki Ito, Kumi Sato, Daisuke Nagao, Mikio Konno, Novel Designs of Mesoporous Hollow Silica Particles via Anionic Surfactant Templating Route, 8th International Mesoporous Materials Symposium, 2013年5月20-24日, 兵庫
2. 伊藤 早希, 石井 治之, 長尾 大輔, 今野 幹男, セリア-シリカ複合中空粒子の合成に関する研究, 化学工学会 第78年会, 2013年3月19日, 大阪大学
3. 工藤麻美, 石井 治之, 長尾 大輔, 今野 幹男, ベシクルテンプレート法を利用した金ナノ粒子複合中空シリカ粒子の合成, 化学工学会 第78年会, 2013年3月19日, 大阪大学
4. Haruyuki Ishii, Kumi Sato, Daisuke Nagao, Mikio Konno, Formation of raspberry-like and smooth silica shells in vesicle-template synthesis, IACIS2012, 2012年5月15日, 宮城県
5. 佐藤公美, 石井治之, 長尾大輔, 今野幹男, リポソームを鋳型とした中空シリカ粒子のシェル形態制御に関する研究, 化学工学会 札幌大会 2011, 2011年8月25日, 北海道大学
6. Haruyuki Ishii, Kumi Sato, Daisuke Nagao, Mikio Konno, Raspberry-like Hollow Silica Particles Synthesized by Using Negatively Charged Vesicles as Templates, 10th International Conference on Materials Chemistry (MC10), 2011年7月4日, Manchester, U.K.
7. 石井治之, 佐藤公美, 長尾大輔, 今野幹男, 中空シリカ粒子のリポソームテンプレート合成に及ぼすリポソーム表面特性の影響, 化学工学会 第76年会, 2011年3月24日, 東京農工大学
8. 佐藤公美, 石井治之, 長尾大輔, 今野幹男, アニオン性リポソームを鋳型とした中空シリカ粒子の合成, 第13回化学工学会学生発表会(秋田大会), 2011年3月5日, 秋田大学
9. 石井治之, 佐藤公美, 長尾大輔, 今野幹男, 脂質ベシクルを鋳型とした中空シリカ粒子の合成, 材料化学システム工学討論会 2010, 2010年12月10日, 京都大学

10. Haruyuki Ishii, Daisuke Nagao, Mikio Konno, A Facile Synthesis of Hollow Silica Particles in Aqueous Media by Using Negatively Charged Liposomes as Templates, 8th International Symposium on Membrane Stress Biotechnology, 2010年9月22日,大阪大学

11. Haruyuki Ishii, Daisuke Nagao, Mikio Konno, Anionic Liposome-Template Synthesis of Hollow Silica Particles, 7th International Symposium on Engineering Science of Liposome, 2010年9月19日,大阪大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.che.tohoku.ac.jp/~mickey/index2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 治之 (ISHII HARUYUKI)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：80565820

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：