

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23750137

研究課題名(和文) 生分解性高分子鎖の配列制御と酵素を用いたソフトマター表面の機能化

研究課題名(英文) Controlling the Molecular Arrangements of Biodegradable Polymers and Functionalization of Soft-Matter Surface by Enzymatic Reaction

研究代表者

吉川 佳広 (Kikkawa, Yoshihiro)

独立行政法人産業技術総合研究所・電子光技術研究部門・主任研究員

研究者番号：30373294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：生分解性高分子とそのモデル化合物を高配向グラファイト上(HOPG)に集積化し、その表面形態と分子配列を走査型プローブ顕微鏡によって可視化した。HOPG上にはポリカプロラク톤のエッジオン結晶がエピタキシャル成長していることがわかった。モデル化合物については、アルキル鎖長の偶奇効果によって多様な二次元配列を形成することができた。また、高分子重合酵素の固定化とインビトロ重合により、ソフトマテリアル表面の機能化に成功した。

研究成果の概要(英文)：Biodegradable polymers and their model compounds were assembled on a highly oriented pyrolytic graphite (HOPG), and their surface morphologies and molecular arrangements were visualized by using scanning probe microscopy. Edge-on crystals of polycaprolactone were epitaxially grown on the HOPG. For the model compounds, it was found that various two-dimensional patterns were fabricated by activating the odd-even effect of alkyl chains. In addition, functionalization of soft-matter surface was successfully achieved through the immobilization of polyester synthase and following in vitro polymerization.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：生分解性高分子 酵素 偶奇効果 走査型トンネル顕微鏡 走査型プローブ顕微鏡 高配向グラファイト 自己組織化 薄膜

1. 研究開始当初の背景

自己組織化によって形成されるナノマテリアルを既存の装置と接続するなどして有効に利用するためには、それらを適切に基板の上に集積化する必要がある。また、ナノテクノロジー研究において、環境低負荷を達成するためには、使用する部材およびプロセスを、できるだけバイオマス由来や低エネルギープロセスに置き換えることが、グリーンイノベーションの観点からは望まれる。そこで本研究では、バイオマス由来の生分解性高分子を含め、生体関連性物質を基板の上に規則的に配置する手法の開発を試みることにした。

生分解性高分子は、糖や植物油等の再生可能な資源から微生物が生産され、環境中に生息する微生物が体外に分泌する高分子加水分解酵素によって分解される。これまでに、生分解性高分子やその分解酵素に関して、環境材料としての応用を目指して、構造と機能の解明に向けた研究は種々あった。しかし、これらの優れた性能を持つ材料を、ナノテクノロジーに応用する研究は殆ど無く、グリーンナノテクノロジー研究の一つとして本研究の提案に至った。

2. 研究の目的

本研究では、生分解性高分子をはじめとする生体関連ナノ物質を、基板の上に規則配列させる手法を開発することを目的とした。そして、生分解性高分子や関連する生体分子を単なる環境低負荷材料としてだけでなく、魅力的なナノ材料として応用・展開していくための第一歩を踏み出す。さらに、酵素等機能性物質の機能的な基板への集積化法の開発を目標とした。

3. 研究の方法

高分子鎖を多様なパターンとして集積化する基板として、高配向グラファイト (HOPG) を選択した。HOPG はアルキル鎖と親和性を持ち、規則構造を形成することが知られている。また、HOPG の格子定数は一定であるため、走査型トンネル顕微鏡 (STM) 観察の際に内部標準試料として用いることができる。

生分解性高分子としては、微生物が合成するポリヒドロキシブタン酸 (PHB)、ポリ(L-乳酸) (PLLA)、およびポリカプロラクトン (PCL) を用いて、HOPG 上に分子鎖を規則配置することを試みた (図1)。基板表面に形成された形態は、原子間力顕微鏡 (AFM) で観察した。

さらに、生分解性物質や生体分子が持つエステル結合、アミド結合、カルバモイル結合を担持させたモデル化合物を合成した。そして、基板との相互作用部位であるアルキル鎖の鎖長と形成される二次元構造の関係について STM を用いた分子レベルの観察によって詳細に検討した。

生体分子の集積化を目指し、PHB 重合酵素

(PhaC) を基板の上に固定化する手法を探索した。金基板をピラニア溶液で洗浄し、末端にニトリロ三酢酸を有する自己組織化膜を調製した。その後、二価金属イオンを様々検討し、His-tag 化した PhaC を固定化した。

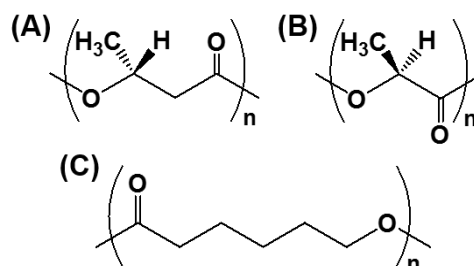


図1 本研究で用いた生分解性高分子の化学構造、(A)PHB、(B)PLLA、(C)PCL

4. 研究成果

(1) 生分解性高分子の規則配列

PHA、PLLA、および PCL を用いて、HOPG 上に分子鎖を規則配置することを試みた。まず、PLLA は、膜厚を調節して成膜しても、規則的な構造は見出すことができなかった。一方、PHA では、溶媒をトルエンとしてスピニングキャストで成膜したところ、ある程度規則性を持って結晶集合体が配列することを、AFM で確認できた。最も規則的に配列されたのは、PCL であった。HOPG は 3 回対称の格子を有しているが、PCL の溶融結晶化膜では、分子鎖が基板と平行に配置し、結晶が基板面に対して立った形で配列したエッジオン結晶が形成された (図2)。したがって、アルキル鎖と似た構造部分を有する PCL の主鎖が基板と強く相互作用していると考えられた。PCL の報告されている c 軸方向の格子定数は 1.726 nm であり、HOPG の格子 (0.246 nm) の整数倍 (7 倍) に相当するため、PCL 鎖が HOPG 上でエピタキシャル成長していることが示唆された。

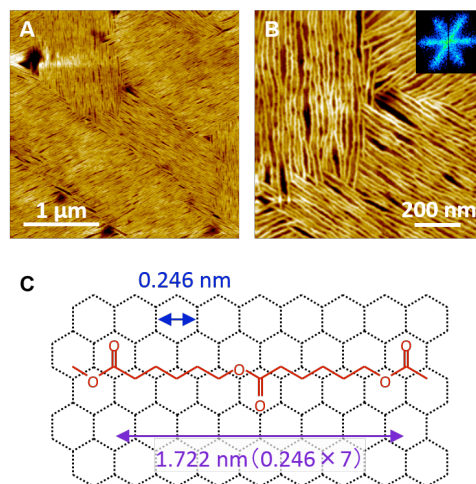


図2 (A)エピタキシャル成長した PCL の AFM 像と(B)その拡大図、および(C)PCL 鎖と HOPG との関係を示した模式図

(2) モデル化合物の自己組織化挙動

本研究では、アルキル鎖長の偶奇効果によって、基板上での分子配向を制御することを目指した。そこで、様々な鎖長のアルキル鎖を、エステル、アミド、カルバモイル結合で導入したモデル化合物を準備した (図3)。そして、HOPG 基板上に形成される二次元構造を STM 観察し、分子構造と形成される二次元構造の相関を調べた。

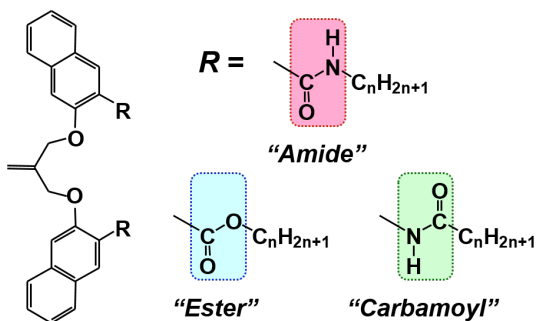


図3 様々な結合様式でアルキル鎖を導入したモデル化合物 (イソブテニルエーテル化合物) の構造式

図4の STM 像において、明るく表示される部分はナフタレン部位、暗く見える部分はアルキル鎖を示している。アルキル鎖をアミド結合で導入したモデル化合物では、炭素数が 18 以上で偶奇効果が発現し、波形と三脚構造がアルキル鎖中の炭素数の偶奇に応じて交互に出現することがわかった。さらに、エステル結合を有する化合物では、アミド型とは全く異なる二次元構造を示した。アルキル鎖中の炭素数が偶数の場合には、アルキル鎖が入れ子上になった基本単位が存在し、それらが一直線上に配列していた。一方、奇数の炭素数の場合には、上述の基本単位が斜めに配列し他構造を示していた。このように、エステル結合の場合でも、18 以上の炭素数で偶奇効果に基づく構造モジュレーションを示した。

アミド型とエステル型でアルキル基を導入した両化合物では、アルキル鎖の炭素数が 17 以下では、それぞれ同一の二次元構造を示すことが STM 観察により明らかとなった。したがって、上述した二つの化合物のにおいて、基板上での偶奇効果には、特異なアルキル鎖長が存在することが示唆された。すなわち、アルキル鎖中の炭素数が 18 以上では偶奇効果を示し、17 以下ではアルキル鎖長の効果が無いことを明らかにすることができた。

最後に、カルバモイル型でアルキル鎖を導入した化合物で二次元構造を STM 観察したところ、アルキル鎖長に関わらず、全て同一の直線構造を示した。したがって、化合物の基本骨格が同一であっても、アルキル鎖との結合方法で偶奇効果の発現が変わることを見出した。

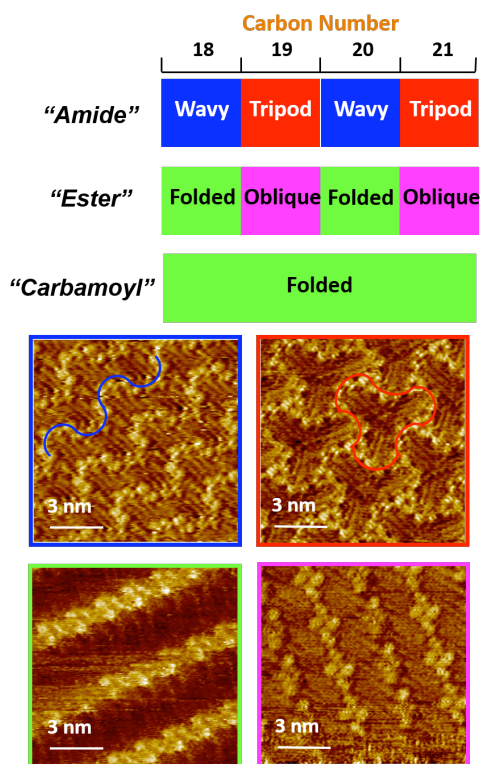


図4 各結合様式に対応した偶奇効果の分類と STM 像。図中の構造的特徴を色分けして表示している。

(3) PHB 重合酵素の基板上への配置とインビトロ重合

まず、PhaC を機能的ナノマテリアルとして基板上に設置する方法の探索を行った。ニトリロ三酢酸の自己組織化膜を金基板表面に調製し、His-tag 化した PhaC をニッケル、銅、あるいはコバルトイオンで固定化を行い、PHA の重合能の比較を行った。その結果、銅イオンで固定化した場合が最も効率よく PHB を合成できていることを見出した (図5左)。

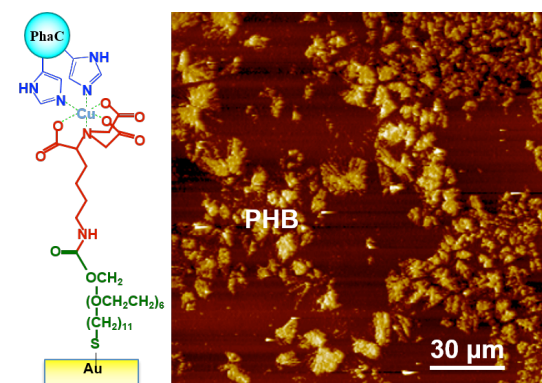


図5 (左)His-tag 化した PhaC の金表面への固定化と(右)特定領域を酵素分解して PhaC を露出させ、インビトロ重合した PHB の AFM 像

次いで、PhaC の機能を特定領域に集積化するため、PhaC を基板上に固定化した後、酵素

の全面を PCL 溶液をスピンキャストすることで被覆した。その後、PCL の特定領域をリパーゼで酵素分解することにより、一旦埋没させた PhaC を露出させた。そして、PhaC のモノマー基質である 3HB-CoA を基板上に滴下して所定時間反応させると、PHB 合成された領域が PCL の被覆面より隆起した様子が AFM 観察により認められた (図 5 右)。したがって、一度包埋した酵素を、酵素分解によって特定領域で露出させ、酵素機能を発現させる生体分子集積化法を開発することができたといえる。

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 5 件)

- ① Yoshihiro Kikkawa, Masato Fukuda, Tomoya Kimura, Ayumi Kashiwada, Kiyomi Matsuda, Masatoshi Kanetsato, Masahisa Wada, Tadayuki Imanaka, Takeshi Tanaka, Atomic Force Microscopic Study of Chitinase Binding onto Chitin and Cellulose Surfaces, *Biomacromolecules*, 15, 1074-1077 (2014). 査読有り, DOI: 10.1021/bm500046f
- ② Yoshihiro Kikkawa, Masato Fukuda, Nobuhiro Ichikawa, Ayumi Kashiwada, Kiyomi Matsuda, Masatoshi Kanetsato, Tomohiro Hiraiishi, Tuning the Enzymatic Hydrolysis of Biodegradable Polyesters and Its Application to Surface Patterning, *Journal of Materials Chemistry A*, 1, 4667-4670 (2013). 査読有り, DOI: 10.1246/cl.2012.1196
- ③ Yoshihiro Kikkawa, Formation of 2D Structures and Their Transformation by External Stimuli: A Scanning Tunneling Microscopic Study, *Polymer Journal*, 45, 255-260 (2013). 査読有り, DOI: 10.1246/cl.2012.1196
- ④ Yoshihiro Kikkawa, Kazuhiro Omori, Mayuko Takahashi, Masatoshi Kanetsato, and Kazuhisa Hiratani, Effects of Alkyl Chain Length, Solvent and Tandem Claisen Rearrangement on Two-Dimensional Structures of Noncyclic Isobutenyl Compounds: Scanning Tunneling Microscopic Study, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10, 8087-8094 (2012). 査読有り, DOI: 10.1039/c2ob26015h
- ⑤ Yoshihiro Kikkawa, Kazuhiro Omori, Masatoshi Kanetsato, and Kazuhisa Hiratani, 2D Structures of Isobutenyl Ether Compounds Possessing Dodecyl and Tridecyl Chains: Effects of Solvent and Tandem Claisen Rearrangement, *Chemistry Letters*, 41, 1196-1198 (2012). 査読有り, DOI: 10.1246/cl.2012.1196

[学会発表] (計 7 件)

- ① 吉川佳広、イソブテニル化合物の二次元ナノアーキテクトニクス：STM による解析、2013 年 12 月 10 日、横浜
- ② Yoshihiro Kikkawa, Binding Force Analysis of Polymer-Degrading Enzyme for Spatially Controlled Enzymatic Degradation、2013 年 11 月 25 日、台湾
- ③ 吉川佳広、酵素分解速度制御と表面パターンニングへの応用、第 2 回 JACI/GSC シンポジウム、大坂
- ④ 吉川佳広、イソブテニル化合物の二次元構造形成と制御、第 10 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム、2013 年 5 月 2 日、和歌山
- ⑤ Yoshihiro Kikkawa, Two-Dimensional Structures of Isobutenyl Compounds Revealed by Scanning Tunneling Microscopy, International Polymer Conference (IPC2012), 2012 年 12 月 14 日、神戸
- ⑥ Yoshihiro Kikkawa, Nanoarchitectonics in Two-Dimensions for Thermally Responsive Isobutenyl Compounds, International Workshop on Soft Interface Sciences for Young Scientists 2012 (SISYS2012), 2012 年 11 月 21 日、つくば
- ⑦ Yoshihiro Kikkawa, Transformation of Two-Dimensional Structures by External Stimuli: STM Reveals, International Association of Colloid and Interface Scientists (IACIS) 2012 Conference, 2012 年 05 月 16 日、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 佳広 (KIKKAWA, YOSHIHIRO)

独立行政法人産業技術総合研究所・電子光技術研究部門・主任研究員

研究者番号：30373294