

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700449

研究課題名(和文) 金属ナノ構造と光の相互作用を利用した生細胞 人工材料界面の分子プロセスの解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular processes between cells and artificial materials by surface-enhanced Raman spectroscopy

研究代表者

林 智広 (HAYASHI, Tomohiro)

東京工業大学・総合理工学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30401574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞と人工材料の界面における分子プロセスの解析のために、界面を選択的にラマン分光可能な表面増強ラマン分光装置、及び測定のための基板作製を行った。装置はレーザー光導入系、光学顕微鏡、分光装置からなり、細胞の足場となる細胞外マトリックスのラマンスペクトルを所得する技術の確立に成功した。また、本研究では当初の予定であった上記成果に加え、細胞外マトリックスを形成するタンパク質を同定する技術を確認した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this work is to investigate molecular processes occurring between living cells and artificial materials by surface-enhanced Raman scattering. Through this project, we develop the optical system and metallic substrates for surface-enhanced Raman scattering. We succeeded in acquiring the Raman spectra of extra-cellular matrix. In addition, we developed a method to identify proteins constituting extra-cellular matrix by using MALDI ToF Mass spectroscopy. In this method, all processes can be done on the substrate, different from the conventional sample preparations.

研究分野：表面科学

キーワード：バイオインターフェース ナノバイオ 表面分光

## 1. 研究開始当初の背景

今後の高齢化社会の医療では人工臓器をはじめ、神経細胞などの組織工学チップ、幹細胞から必要な機能細胞を創り出す再生医療などの需要が急激に増加することが確実である。これらの応用では、生体組織・細胞を目的に応じて人工材料表面と適切に相互作用させ、さらには我々が求める細胞機能を発現させることも必要となる。人工材料と接した細胞の挙動を決定する要因として、細胞を取り巻く溶液の成分(液相因子)に加え、細胞の足場となる材料の物理化学的性質(固相因子)も重要な因子として認識されている。しかし後者の材料の物理化学的性質と界面における分子プロセス、細胞の挙動に関する一連の系統的な知見は極めて乏しい。

本研究では細胞外マトリックスとして生体親和性に深く関与している足場タンパクに注目する。人工物が体内に導入されると、まず体液中のタンパク質が吸着し、細胞は吸着タンパクを足場として接着する。体外での細胞接着実験では接着時に細胞自身が足場タンパク質を生成する。いずれの場合においても、材料側の足場タンパク質と細胞側の受容体タンパク質(接着タンパク質であるインテグリンなど)との分子認識により、様々な情報伝達が細胞内部に行われ、接着、伸展、組織化、分化、細胞死への誘導が行われる。つまり材料の最表面の物理化学的性質(濡れ性、電荷、極性など)によって足場タンパク質の分子の配向・構造が決まり、細胞接着因子との特異的相互作用に影響を与え、材料表面に接着した細胞の運命を決定する。

吸着タンパク質の吸着量に関しては、表面プラズモン共鳴分光法、水晶振動子マイクロバランス法など解析手法が確立されている一方、生細胞が表面に接着している状態で細胞外マトリックスとして機能する足場タンパク分子の構造、配向を解析する手法は今

までに存在しない。

## 2. 研究の目的

本研究では金属ナノ構造を有する基板を用いて、固体表面から数～数 10 nm の領域に集中する増強された近接場光を発生させ、この領域を高感度かつ選択的にラマン分光する技術を開発する。初年度は上記を可能にする光学系の構築、基板作製技術を確立する。これらを用いて、基板表面に吸着したタンパク質の構造、配向を解析する手法を確立する。

次年度では実際に細胞を基板に接着させ、細胞接着斑における細胞による足場タンパク質の生成、足場タンパク質の材料との相互作用による構造変化(変性)及び配向変化、細胞の動き・反応(細胞死、伸展、分化など)をリアルタイムに計測する手法を確立する。足場タンパク質の種類の同定結果と組み合わせることにより、従来ブラックボックスとなっていた「材料表面の物理化学的特性(濡れ性、電荷、極性など)が細胞外マトリックス(足場タンパク質)にどの様に影響を与え、細胞本体へどのようなシグナルとして伝達されるか?」という本質的な課題解決に繋がる系統的な知見を得る事が可能となる。

以上から生体親和性および細胞の異物反応の根源的理解、再生医療のための幹細胞の足場材料設計など、ライフサイエンス分野、バイオマテリアル分野の主要な課題解決に貢献する事を目標とする。

## 3. 研究の方法

### 1) 測定光学系の構築

本研究では低いバックグラウンドノイズで界面の選択的な分光を行うために全反射条件でレーザを照射する。ガラス基板の場合では 100-200 nm 程度の減衰長を持つエバネッセント場が形成されるが、本研究で実

験系ではガラス基板上の金属ナノ構造の局在プラズモンとエバネッセント場の相互作用で、基板表面近傍の数～数 10 nm の範囲に集中する近接場光を発生させ、これを励起光として表面近傍を選択的にラマン分光する。また、細胞形態を観察するための微分干渉顕微鏡の装備も備え、試料に照射するレーザー・白色光、試料からのラマンシグナル、顕微鏡像を切り替えて交互に測定を行うことでラマンスペクトル測定と細胞の挙動の観察をほぼリアルタイムに近い時間オーダー(測定時間差は数秒)で行う。

## (2) 基板の製作

電場増強は基板上の金属ナノ構造の形状・サイズで決定される。測定に用いる基板はガラス基板上へ Ag または Au を室温で蒸着し、島状構造のナノ構造(幅・高さ共に 5～20 nm 程度)が形成された基板を用いる。続いて基板の最表面は 1-2 nm の厚さで蒸着、スパッタリング、その他のコーティング技術を用いて異種材料をコーティングし、酸化物、単分子膜、高分子膜、脂質 2 重膜など様々な表面を構築・評価可能な汎用性を確保する。また、この基板は可視波長領域で光透過率が高い(80-90%程度)ため、微分干渉顕微鏡法による基板表面に接着した細胞の形態観察も可能となる。

また AFM、走査型電子顕微鏡(SEM)等で得られる金属ナノ構造の形状データを基に有限差分時間領域(FDTD)法を用いた基板近傍の電磁場強度計算を行い、ラマン測定対象領域を定量的に試算する。また最大のラマン散乱強度を得るため、蒸着条件(蒸着速度、基板温度)を検討し、金属ナノ構造の形状の最適化を行う。

## (3) 固体表面上に吸着したタンパク質の構造・配向の解析手法の確立

(2)で作製した基板を用いてフィブリノーゲン、アルブミンなどの代表的なタンパク質の吸着後の構造・配向を調べる。基板として末端基を変えることで簡単に表面の物理化学的性質(濡れ性、極性、電荷など)を制御可能である自己組織化単分子膜(SAM)を用いる。ラマンスペクトルの Amide I～III バンドの形状からタンパク質中のヘリックス構造、シート構造の割合を求め、タンパク質分子の変性の度合いを解析する。さらに、(FDTD 計算で求めた電場強度) $\times$ (各アミノ酸残基の溶液のラマンスペクトルのピーク強度)の線形結合でスペクトルをフィッティングし、官能基の基板表面垂直方向の空間的分布を求め、タンパク質分子の配向を決定する。上記手法で得られた知見を AFM による吸着タンパク質の形状観察、水晶振動子マイクロバランス法などによる吸着タンパク質の吸着量・粘弾性計測の結果と組み合わせ、固体表面の物理化学的性質がタンパク質の吸着量、構造、配向に与える影響に関して包括的な議論を行う。

## 4. 研究成果

本研究では細胞と人工材料の界面における分子プロセスの解析のために、界面を選択的にラマン分光可能な表面増強ラマン分光装置、及び測定のための基板作製を行った。装置はレーザー光導入系、光学顕微鏡、分光装置からなり、細胞の足場となる細胞外マトリックスのラマンスペクトルを所得する技術の確立に成功した。

また、本研究では当初の予定であった上記成果に加え、細胞外マトリックスを形成するタンパク質を同定する技術を確立した。

## 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 9 件)

1. Oguchi, M., Mochizuki, M., Yano, T.-a., Hara, M., Hayashi, T.: "Light-transmittable Ultrasoother Gold Film for Gap Mode Tip-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy", *Chem. Lett.*, 43: 808-810, (2014) (査読あり)  
<Go to ISI>://WOS:000336878900021

2. Hiraguchi, Y., Nagahashi, K., Shibayama, T., Hayashi, T., Yano, T., Kushiro, K., Takai, M.: "Effect of the distribution of adsorbed proteins on cellular adhesion behaviors using surfaces of nanoscale phase-reversed amphiphilic block copolymers", *Acta Biomaterialia*, 10: 2988-2995, (2014) (査読あり)  
<Go to ISI>://WOS:000338402200010

3. 林智広: "生体不活性特性における水分子の役割", *C & I Commun*, 38: 17-18, (2013) (査読あり)

4. 小出 裕基, 久保 光亮, 関根 泰斗, 水下佳紀, Ganbaatar, N., 林智広: "原子間力顕微鏡を用いた生体不活性表面近傍の水分子の解析", *表面科学*, 34: 494-499, (2013) (査読あり)

5. Tanaka, M., Hayashi, T., Morita, S.: "The Roles of Water Molecules at the Biointerface and Application of Medical Polymers", *Polym. J. (Tokyo, Jpn.)*, 45: 701-710, (2013) (査読あり)

6. Tanaka, M., Mabuchi, Y., Hayashi, T., Hara, M.: "Subtractive offset printing for fabrication of sub micrometer scale electrodes with gold nano particles", *Microelectron. Eng.*, 95: 14-20, (2012) (査読あり)

7. Kumashiro, Y., Ikezoe, Y., Hayashi, T., Okabayashi, Y., Tamada, K., Yamato, M., Okano, T., Hara, M.: "Temperature-modulated adsorption of poly(N-isopropylacrylamide)-grafted ferritin on solid substrate", *Colloids Surf B Biointerfaces*, 95: 57-64, (2012) (査読あり)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22421417>

8. Ito, E., Ito, H., Kang, H., Hayashi, T., Hara, M., Noh, J.: "Influence of Surface Morphology and

Substrate on Thermal Stability and Desorption Behavior of Octanethiol Self-Assembled Monolayers: Cu, Ag, and Au", *J. Phys. Chem. C*, 116: 17586-17593, (2012) (査読あり)

<Go to ISI>://WOS:000307748700034

9. Hayashi, T., Tanaka, Y., Koide, Y., Tanaka, M., Hara, M.: "Mechanism underlying bioinertness of self-assembled monolayers of oligo(ethyleneglycol)-terminated alkanethiols on gold: protein adsorption, platelet adhesion, and surface forces", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14: 10196-10206, (2012) (査読あり)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22717889>

[学会発表](計10件)

1. 林智広: "生体不活性特性のキープレイヤーである界面水分子の解析", 高分子同友会, 高分子学会・高分子同友会事務局(中央区・東京都)(2014年3月25日).

2. 林智広: "プローブ顕微鏡・近接場光学を用いたバイオ界面の解析: 生体親和性と界面水分子", 東京理科大学 総合研究機構 平成25年度界面科学研究部門シンポジウム, 東京理科大学 森戸記念館(新宿区・東京都)(2014年3月10日).

3. Hayashi, T.: "Analysis of biointerfaces by scanning probe microscopy: from single molecule & surface force spectroscopy to chemical mapping at nanoscales", 日本MRS年次大会, 横浜市開港記念会館(横浜市・神奈川県)(2013年12月11日).

4. 林智広: "人工材料で血管をつくるには-界面水分子のはたらき", 有機エレクトロニクス材料研究会, 大阪イノベーションハブ(大阪市・大阪府)(招待講演)(2013年9月27日).

5. 林智広: "走査型プローブ顕微鏡・近接場光を利用したバイオ界面の解析", 光化学討論会 シンポジウム "光機能性ナノ生体材料の創製と界面光化学", 愛媛大学(松山市・愛媛県)(招待講演)(2013年9月11日).

6. 林 智広: "生体不活性特性における界面水分子の役割", 表面技術協会 関東支部 学術講演会, 芝浦工業大学(江東区・東京都) (招待講演) (2012年11月26日).

7. 林 智広: "生体不活性特性を生み出す界面水分子", 日本学術振興会 第142委員会, 東京理科大学 森戸記念館(新宿区・東京都) (招待講演) (2012年11月6日).

8. Hayashi, T.: "Surface force analysis of nonfouling self-assembled monolayers", IUMRS-ISEM2012, パシフィコ横浜(横浜市・神奈川県) (招待講演) (2012年9月25日).

9. 林 智広: "生体不活性な表面特性の物理的起源", バイオナノシステムズ研究会, 日本工業大学(南埼玉郡・埼玉県) (招待講演) (2012年8月20日).

10. Hayashi, T.: "Protecting barrier of a structured water layer in the vicinity of non-fouling self-assembled monolayers", International conference STAC6, 横浜文化会館(横浜市・神奈川県) (招待講演) (2012年6月27日).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.echem.titech.ac.jp/~hayashi/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 智広 (HAYASHI, Tomohiro)

東京工業大学大学院 総合理工学研究科 物質電子化学専攻 准教授

研究者番号: 30401574

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

田中 賢 (TANAKA, Masaru)

九州大学大学院 先端物質化学研究所 教授  
研究者番号: 00322850

赤池 敏宏 (AKAIKE, Toshihiro)

東京工業大学 大学院 生命理工学研究科 教授 (現 公益財団法人 国際化科学振興財団 主席研究員)

研究者番号: 30101207

### (4) 研究協力者

Michael Grunze

University of Heidelberg, Angewandte  
Physikalische Chemie, Professor