

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700483

研究課題名(和文) 静水圧を利用したハイブリッドコアセルベートによる生体分子分離システムの創成

研究課題名(英文) Development of biomolecule separation system by hybrid coacervate using hydraulic pressure

研究代表者

山元 和哉 (Kazuya, YAMAMOTO)

鹿児島大学・理工学研究科・助教

研究者番号：40347084

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)：静水圧による高圧力条件下での刺激応答性ハイブリッドコアセルベートの反応場への展開を検討した。まず種々の官能基をランダムに含んでいる高分子量体のアクリルアミド系共重合体を設計し、温度および圧力変化におけるコアセルベート滴の形成を評価した。次に、高圧力条件下でのコアセルベート滴におけるラジカル重合と生体分子分離システムについて検討した。コアセルベート滴にモデル生体分子としてフェリチンを添加した場合、複合エマルジョンは長時間、安定であった。さらに液-固界面におけるフェリチンの高分子修飾を検討した。

研究成果の概要(英文)：We examined the development of stimuli-responsive hybrid coacervate as the reaction field under high pressure condition by hydraulic pressure. First, we designed the acrylamide-based copolymers with higher molecular weight randomly containing carboxyl or hydroxyl groups. Their stimuli-responsive behavior on comonomer composition and pH of the polymer solution was precisely investigated. The coacervate droplets were easily formed above a lower critical solution temperature. Furthermore, we studied the coacervate droplet formation under high pressure conditions. Next, we examined radical polymerization and biomolecule separation system with the coacervate droplet under high pressure. When we added the ferritin protein cages (ca. 12 nm) as model biomolecule to the coacervate droplets, the composite emulsions were stable for a long time. Furthermore, we examined the assembly behavior of ferritin on the liquid-liquid and liquid-solid interface.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：インテリジェント材料 コアセルベート

1. 研究開始当初の背景

水溶液中で外部環境に応答して可逆的なコンフォメーション変化を示す刺激応答性高分子の材料化が著しい発展を成し遂げている。この刺激応答性高分子を積極的にバイオマテリアル分野で材料展開するためには、応答性を損なわない材料設計が重要である。

これまでにモノマー構造に着目した分子設計として、モノマー反応性比を考慮し、高分子鎖の一次構造における親-疎水性のバランスの制御により、液-固型の相転移およびコアセルベート滴を形成する液-液型の相分離を示す刺激応答性高分子を調製した。一方で、交流磁場内で自発的に発熱する磁性粒子表面への高分子固定化や、交流磁場の制御による刺激応答性高分子の迅速な応答性を制御したドラッグデリバリー担体やカラム充填剤についても報告している。また圧力効果による水溶性合成高分子の材料化も研究しており、静水圧により等方的に圧力誘起される特殊な反応場に注目し、ポリビニルアルコール水溶液からナノ粒子および網目状の細孔を有するヒドロゲルの調製を報告している。

2. 研究の目的

本研究では特殊な反応場として静水圧条件下でのリビングラジカル重合の適用によるコアセルベート滴を形成する刺激応答性高分子の超高分子量化と、異なる水溶性高分子種や自発的に発熱するナノ粒子との組み合わせによる“ハイブリッドコアセルベート”の構築を目的とした。静水圧条件下（～1,000 MPa）でのリビングラジカル重合の適用により、短時間で分子量分布の狭い、数十万から百万程度の高分子量体を調製し、異なる種類の高分子を調製した。異なる種類の高分子の組み合わせによる semi-IPN 型の機能化や、磁場や光等の外部エネルギーにより自発的に発熱するナノ粒子を熱源とし、生体分子の分離・精製を目的としたシステムの構築を目指した。

3. 研究の方法

静水圧（高圧）条件下でのリビングラジカル重合の適用により、組成比やブロックおよびランダムに配列制御された超高分子量体（100 万程度）のコアセルベート型刺激応答性高分子を調製し、高分子鎖およびコアセルベートの分布や制御挙動を評価した。リビングラジカル重合としては原子移動ラジカル重合（ATRP）、モノマーとしてはアクリルアミド誘導体を選択し、刺激応答性高分子を調製した。分子量およびポリマー濃度、塩濃度等の調製条件により、コアセルベートのサイズ制御を検討し、静水圧（高圧）条件下において異なる刺激応答高分子との組み合わせによる semi-IPN コアセルベートゲルの調製を検討した。

さらに熱エネルギー以外のエネルギー照射（例えば交流磁場など）により自発的に発

熱する熱源媒体としてコア内部に鉄を含んでいるフェリチンタンパク質を選択し、複合体の調製を検討した。サイズ制御可能な三次元構造化の知見として、フェリチンの表面アミノ基とカルボキシル基を有する刺激応答性高分子を用い、交互積層法により多層構造を作成し、さらに共有結合を導入することで安定な積層膜を調製した。またフェリチン粒子の集合化を目的に、固-液界面においてヤス型フェリチン粒子の調製を行った。

4. 研究成果

1) 静水圧条件下（～1,000 MPa）での刺激応答性高分子の調製とコアセルベートの形成評価

モノマーとしてアクリルアミド誘導体である *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) と側鎖に水酸基を有する *N*-hydroxymethylacrylamide (HMAAm) を選択し、開始剤に ethyl 2-bromoisobutylate、触媒に CuBr、リガンドに tris(2-dimethyl-aminoethyl)amine を用いて、600 MPa 下での ATRP による刺激応答性高分子の調製を検討した。得られた poly(NIPAAm-co-HMAAm) の組成比は仕込み比と同程度であり、共重合体水溶液は温度変化に対して鋭敏かつ可逆的な透過率変化を示した。下限臨界溶液温度 (LCST; 透過率 50 % の温度とする) は共重合体中の HMAAm 含有量の増加に伴い高温側にシフトした。光学顕微鏡により LCST 以上でコアセルベート滴が観察され、時間経過に伴うコアセルベート滴同士の融合化（粒径の増大）も観察された。また同程度の HMAAm 含有量 (ca. 10 mol%) である分子量 (Mw) が異なる 3 種類の共重合体 (Mw=10 万, 16 万, 52 万) の調製も可能であり、LCST および同一濃度 (0.5 w/v%) の LCST 以上におけるコアセルベート滴の粒径は、分子量に依存せず、ほぼ同程度であった。さらに条件を最適化することで、Mw が 100 万以上の超高分子量体の調製も可能であった。

2) semi-IPN コアセルベートゲルの調製およびナノ粒子による安定化（ピッカリング効果）

静水圧条件下でのコアセルベート内部への拡散効果を期待した semi-IPN コアセルベートゲルの調製を検討した。水溶性高分子として polyNVA を用いて検討した結果、明確な内部への侵入は確認できなかった。そこで架橋したコアセルベートゲル存在下、NVA、開始剤を溶解させ、静水圧条件下で NVA の重合を行った。反応後の重量変化より、コアセルベート滴内部への polyNVA の導入と考えられる質量増加が確認された。次に所定濃度に調整した共重合体溶液の LCST 以上で保温し、コアセルベート滴内での NVA の重合を検討した。反応後の GPC 測定の結果より、コアセルベート滴存在下では、polyNVA に由来するピークの増大が確認された。さらに反

応時間の経過に伴って、polyNVA の分子量のわずかながらの増加、モノマーのピークの減少が確認された。これより水溶性モノマーとして NVA を選択し、コアセルベート滴の存在有無における重合挙動を評価した結果、モノマーの濃縮に起因すると考えられる polyNVA の生成量の増加が確認された。

またコアセルベート滴の液-液界面の安定化として、約 15 nm の球状ナノ粒子であるコロイダルシリカを混合し、ピッカリング効果による温度応答性コアセルベート滴複合体の安定性を評価した。所定濃度に調整した共重合体水溶液(HMAAm 含有量 10 mol%, N₉₀H₁₀)について LCST 以上で顕微鏡観察を行ったところ、コアセルベート滴が観察され、LCST 以下に冷却すると完全に消失した。さらに塩濃度 150 mM の共重合体水溶液は、LCST 以上の保温状態において、塩無条件下に比べて、液滴の粒径サイズが大きくなり、さらに時間経過に伴う液滴の粒径サイズの増大も観察され、これはコアセルベート滴同士の融合化によるものと考えられた。次に、塩濃度 150 mM の共重合体溶液を LCST 以上で保温し、コアセルベート滴の形成後に所定濃度のコロイダルシリカを添加した。顕微鏡観察より、5 分後および 30 分後の粒径は約 2.49 μm および 2.65 μm とほぼ等しく、共重合体水溶液のみとは異なり、時間経過に伴う液滴の粒径サイズの増大が抑制されていた (Fig. 1)。これよりコロイダルシリカとコアセルベート滴の複合化により、コアセルベート界面の安定性の向上が示唆された。

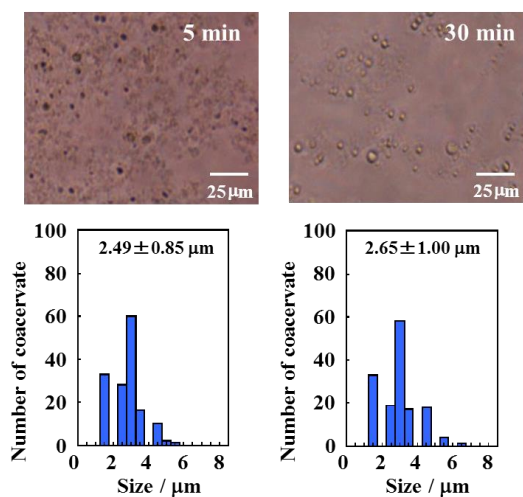


Fig 1. Photographs and size distribution histograms of N₉₀H₁₀ (0.5 w/v % ; 2000 μL) with colloidal silica (20 w/v % ; 100 μL) in water containing salt (NaCl conc., 150 mM) above LCST (60 °C).

さらにモデル生体分子として直径 12nm の球状タンパク質であるフェリチンを用いて同様の安定性を評価した結果、コアセルベート滴は長時間、安定であった。このフェリチンは代表的なケージ型タンパク質であり、コア内部に鉄を含むため、交流磁場による自己発熱する熱源媒体としての活用が期待できる。

3) フェリチンタンパク質と刺激応答性高分子の三次元積層化

ハイブリッドコアセルベートによる生体分子-分離システムの検討として、高分子修飾された金属ナノ粒子とコアセルベートとの複合化を検討した。交流磁場による自発的な発熱を有すると考えられるナノ粒子として、コア内部に鉄を含んでいるフェリチンタンパク質を選択した。まずフェリチンを含む水溶液の交流磁場内での発熱挙動を評価したが、水溶液の顕著な温度上昇は確認できなかった。(熱)変性に伴うと考えられるタンパク質の構造破壊は確認されたものの、水溶液中のフェリチン濃度が低いこと、またナノサイズの鉄コア (約 6 nm) であるため自己発熱による温度効果が観察されにくいことが示唆された。そこでサイズ制御可能な三次元構造化として、フェリチンの表面アミノ基と先述した調製法で得られるカルボキシル基を有する刺激応答性高分子を用い、交互積層法により多層構造を作成し、さらに共有結合を導入することで安定な積層膜を調製した。積層薄膜のフェリチン内部の金属酸化・還元反応について電気化学的手法を用いて評価した。

まずフェリチンもしくは内部空間に金属を保持していないアポフェリチンとカルボキシル基を有する刺激応答性高分子である poly(*N*-isopropylacrylamide-co-2-carboxyisopropylacrylamide)[poly(NIPAAm-co-CIPAAm)]を用いた積層薄膜の調製および縮合剤 (EDC) 溶液浸漬後の安定性を水晶発振子 (QCM) の振動数変化から定量的に解析した。Fig. 2 に QCM により解析したフェリチンまたはアポフェリチンと poly(NIPAAm-co-CIPAAm) (CIPAAm content ; 30 mol%) の積層挙動を示す。フェリチン、アポフェリチンのどちらを用いても poly(NIPAAm-co-CIPAAm) との間で逐次的な積層化が観察された。

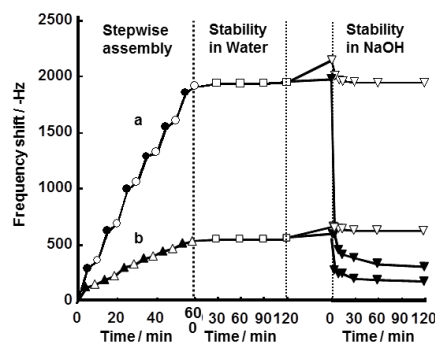


Fig. 2. QCM analysis of the assembly between Ferritin (a) or Apoferritin (b) and poly(NIPAAm-co-CIPAAm) with an CIPAAm content of 30 mol% at 4 °C for each immersion time of 5 min. The open and closed symbols show the Ferritin or Apoferritin and copolymer, respectively. The figure shows also the stability of multilayer films in water: open square and after the 24 hours immersion in EDC aqueous solution in 0.01N-NaOH: open and closed reverse triangle are respectively presence and absence of EDC.

また、QCM による振動数解析から内部空間に存在する鉄の有無により積層数に伴う積層量が異なることが確認できた。調製した積層薄膜を EDC 溶液に浸漬することにより共有結合(アミド結合)の導入を試みた結果、EDC 溶液に浸漬した積層薄膜はアルカリ水溶液中でも安定であるのに対し、EDC 溶液に浸漬しない場合は、アルカリ水溶液中で静電相互作用の解消による剥離が観察された。これより積層薄膜調製後、EDC 溶液に浸漬するという簡便なプロセスによる共有結合の導入が示唆された。

また、CV により安定化された積層膜中の酸化還元挙動を評価した結果、フェリチン/poly(NIPAAm-co-CIPAAm)積層膜では、酸化・還元に伴うピークが観察されたが、アポフェリチン/poly(NIPAAm-co-CIPAAm)積層膜では観察されず、フェリチンが内包している鉄の存在による酸化還元挙動の違いが明らかとなった。さらにフェリチンを含む積層膜の増加に伴って酸化還元挙動の増大が確認された (Fig. 3)。

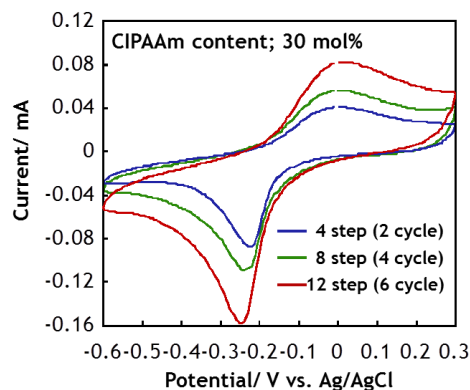


Fig. 3. Cyclic voltammograms of (→) 4-, (→) 8-, and (→) 12-step assembled film prepared from Ferritin and poly(NIPAAm-co-CIPAAm) with a CIPAAm content of 30 mol% in pH 7.0 PBS. Scan rate = 50 mV/s.

これより分子内にカルボキシル基を均一に含有する高分子との静電相互作用によりフェリチンタンパク質の三次元集積が可能であり、カルボキシル基含量により集積プロセスを制御できることが示唆され、共有結合による三次元集積膜の安定化にも成功した。

4)ヤヌス型フェリチン粒子の調製と生体分子-分離システムへの展開

フェリチンを規則的に集合化させることで、交流磁場照射による自発的な発熱効果の向上を目指し、ハイブリッド型コアセルバートによる分離システムへの展開を検討した。まずフェリチンタンパク質の異方的高分子修飾として、高分子電解質多層膜表面との静電相互作用により基板上にフェリチンタンパク質を単層で固定化した。その後、親水性高分子である poly(ethylene glycol) (PEG)を用い、基板上に固定化されたフェリチンの異方的修飾について検討した (Fig. 4)。

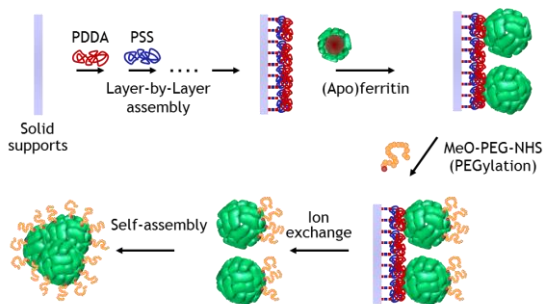


Fig. 4. Schematic representation of the solid-phase approach using a polyelectrolyte multilayer for the asymmetric PEGylation of apoferritin protein cages.

はじめにアポフェリチン単層固定化膜を調製し、分子量の異なる NHS 活性化 PEG (MeO-PEG-NHS, Mw = 5000, 12000, 20000 g/mol) 鎖の導入 (PEGylation) について検討した。Fig.5 に様々な MeO-PEG-NHS 濃度で PEGylation を行った結果を示す (10 mM Borate/NaOH buffer (pH 8.4), 4 °C, 24 h)。QCM 解析の結果 (Fig. 5a)、反応時の MeO-PEG-NHS 濃度の増加に伴い飽和型の振動数減少 (重量増加) が確認された。MeO-PEG-NHS とは対照的に、末端活性化されてない PEG-OH ではこのような振動数減少が確認されなかった。このことは、固定化アポフェリチンへの PEG 鎖導入に末端官能基の反応性が重要であることを示すとともに、アポフェリチン表面に PEG 鎖が共有結合により導入されたことを示唆している。一方、低濃度側では導入を試みた PEG 分子量による PEGylation 挙動にわずかな違いが確認されたものの、検討した最も高い濃度である 1000 μM におけるそれぞれの振動数変化はほぼ同程度であった。そこで QCM の振動数変化よりアポフェリチン分子あたりに導入された PEG 鎖数を算出した (Fig. 5b)。

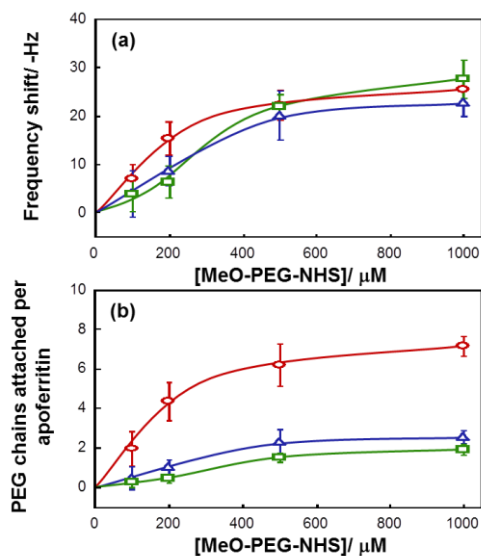


Fig. 5. Effect of the concentration and molecular weight of PEG reagents (Mw, ○: 5000, △: 12000, □: 20000) on (a) the frequency shifts and (b) the number of attachment chains of PEGylation to apoferritin. The apoferritin-immobilized films were incubated in pH 8.4 borate/NaOH buffer solution with different concentrations of PEG reagents at 4 °C for 24 h. The PEG chains attached per apoferritin was calculated from the results of QCM analysis.

同一分子量において反応時のポリマー濃度を変化させることにより導入本数を容易に制御可能であることが示唆された。また、分子量 5000, 12000, 20000g/mol の MeO-PEG-NHS を用い、1000 μ M 条件下で反応を行った際の導入本数はそれぞれ約 7.1、2.5、1.9 chains/apoferritin であり、分子量増加に伴う導入本数の減少が確認された。

これは分子量増加による固定化された PEG 鎖と未反応 PEG 鎖との立体障害の増大あるいは反応性官能基間の衝突頻度の低下が原因であると考えられる。本研究における PEG 鎖導入数の結果は、バルク (等方的) 系と比較して著しく低い値を示すものの、固定化アポフェリチンが異方的に PEG 修飾されている可能性を示唆した。

更に単離したヤヌス型フェリチンは、未修飾のフェリチンとは異なり等電点付近で安定な集合体を形成し、高分子鎖の導入量 (グラフト量、密度) により自己集合挙動を制御することに成功した。現在、これら会合体とコアセルベートとの複合体を調製し、交流磁場照射による自発的な発熱に伴う形態変化や、熱によるタンパク質のダメージ等を評価している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1) K. Uto, K. Yamamoto, K. Iwahori, T. Aoyagi, I. Yamashita

Solid-phase PEGylation of an Immobilized Protein Cage on Polyelectrolyte Multilayer *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 338-345 (2014) (査読有)

2) K. Uto, K. Yamamoto, N. Kishimoto, M. Muraoka, T. Aoyagi, I. Yamashita

Characterization of Stable, Electroactive Protein Cage/Synthetic Polymer Multilayer Thin Films Prepared by Layer-by-layer Assembly *Journal of Nanoparticle Research*, 15, 1516-1526 (2013) (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1) Yuji Hoshino, Kazuya Yamamoto, and Junichi Kadokawa, Atom Transfer Radical Polymerization of *N*-Isopropylacrylamide under High Pressure Conditions, Japan-Taiwan Bilateral Workshop on Nanoascience (2012 年 12 月 5 日, Osaka university)

2) 星野裕志、山元和哉、門川淳一、高圧条件下での ATRP により調製されたポリ (N-イソプロピルアクリミド) の構造および溶液挙動評価、日本化学会西日本大会 (2012 年 11 月 11 日, 佐賀大学)

3) 星野裕志、山元和哉、門川淳一、高圧条件下での N-イソプロピルアクリルアミドの原子移動ラジカル重合、第 49 回化学関連支部合同九州大会 (2012 年 6 月 30 日, 北九州国際

会議場)

4) 星野裕志、山元和哉、門川淳一、高圧力条件下で調製したポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) の溶液挙動、第 61 回高分子学会年次大会 (2012 年 5 月 30 日, パシフィコ横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山元 和哉 (YAMAMOTO, Kazuya)

鹿児島大学大学院理工学研究科・助教

研究者番号：40347084