

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26390020

研究課題名(和文)外部応答性ナノシート材料の創製と細胞への適応性

研究課題名(英文)Development of external-stimuli-responsive nanomaterials and evaluation of their compatibility with living cells

研究代表者

桑原 穰(Kuwahara, Yutaka)

熊本大学・大学院先端科学研究部(工)・助教

研究者番号：60347002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：外部(光)刺激応答性分子を利用し、光応答性材料を設計し、作製した。ナノ材料に修飾する光応答性分子は、生体膜内などで組織化している分子に対して相互作用するように考慮して設計し、合成した。作製した光応答性ナノ材料に光刺激を与えることによって、二分子膜中の組織化した分子に対してナノ材料上の光応答性分子が局所的な応答拳動を誘発させ、組織化した分子の配向構造を破壊することに成功した。さらに、枯草菌など細菌の増殖過程に上記光応答性材料を添加して、細胞膜の分子配向状態の乱れを誘発し、光照射時の細菌(細胞)増殖抑制効果を評価した。

研究成果の概要(英文)：We have developed photo-responsive small materials by utilizing external (photo)-stimuli-responsive molecules. The photo-responsive molecules were designed and synthesized under considering intermolecular interaction to organized molecules like liquid crystals and lipids. Under light irradiation, the photo-responsive materials modified by the photo-responsive molecules were able to induce partially disorganization of the aligned molecules. We have also evaluated inhibitory effect on cell multiplication by the photo-responsive materials under light irradiation.

研究分野：光機能材料

キーワード：光応答性材料 光応答性分子 アゾベンゼン ナノシート 液晶 生体膜

1. 研究開始当初の背景

機能を発現できる最小単位である分子は、最も微小のパーツであり、マイクロマシンのビルディングブロック・構成パーツとして利用出来る。この機能分子を外部刺激で自由に制御できれば、マイクロマシンの遠隔が可能となる。遠隔操作に最も適している刺激として光が挙げられ、分子集合体の制御については、いくつかの報告がある。分子組織体である液晶の光相転移制御 (Ikeda ら、Chem. Lett. 1987) や脂質ベシクル崩壊の光制御 (Baigl ら、J. Am. Chem. Soc. 2012; Okuro ら、J. Am. Chem. Soc. 2012) についての報告がその一例である。ベシクルの膜流動性に対するアゾベンゼン分子の相互作用およびデンドリク構造による多点相互作用の重要性が示されている。しかし、これを発展させたような細胞・生体を用いた系へ応用した報告は未だない。

申請者らのグループは、これまでに、可逆的に光に反応するアゾベンゼン部位 (図1) を利用したマイクロ粒子の遠隔操作に関する報告を行った (例えば、Sci. Rep. 2013)。アゾベンゼン化合物を共存した液晶 (分子組織体) 中に可視光を照射すると、トランス体シス体の異性化を繰り返す、連続異性化が起こる。さらに、この連続異性化がホストとなる液晶分子の分子配向を乱して、光相転移を引き起こす挙動が観測される。この結果、2 相間 (光照射部に発現したアイソトロピック相 (I 相) と未照射部の液晶 (LC) 相との相間) に液体流動のドライビングフォースが誘発され、マイクロ粒子の遠隔操作が可能であった。また、この光操作の可能性は、サーモトロピック液晶だけではなく、リオトロピック液晶においても確認している。

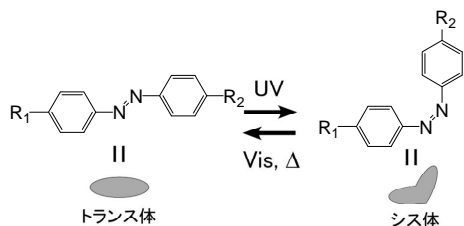


図1 アゾベンゼン化合物の光異性化

2. 研究の目的

外部 (光) 刺激応答性分子を利用した、光応答性ナノ材料を設計・作製する。刺激応答性ナノ材料、特にシート状ナノ材料 (ナノシート) の光刺激によって、脂質分子などが示す液晶相、および生体膜 (二分子膜) 中の組織化した分子に相互作用したナノ材料の局所的刺激応答挙動を誘発し、光応答性ナノ材料周辺の分子組織構造が光に反応する挙動を評価する。ナノ材料への修飾により、刺激応答性官能基は局所に濃縮されて存在する状態となる。光照射部における分子組織構

造変化とそれに伴う相転移を効果的に誘起して、秩序 (液晶相) - 乱れ (等方相) に伴う組織構造の破壊を検討・評価する。さらに、枯草菌などの細菌を用いて、光応答による二分子膜の分子配向状態の乱れから発現する細菌 (細胞) 増殖抑制が可能かを評価する。このとき、当該材料は、細菌 (細胞) に直接作用するために、数マイクロメートル以下のサイズに設計する必要がある。

3. 研究の方法

これまでの研究結果を踏まえて、光刺激応答性修飾分子として、アゾベンゼン化合物を利用する。ナノ材料の修飾に適した官能基を有するアゾベンゼン化合物 (MAz) の分子設計とその合成を行なう。ナノ材料の母材としての検討は、当初は、マイクロメートルサイズの粒子での評価を進めながら、ナノ材料として、シリカナノ粒子、ナノシートとして酸化グラフェンまたは鱗鉄鉱型ナノシートを、MAz 分子の修飾官能基としてアルコキシシラン基またはリン酸基を採用する。リオトロピック液晶系において、修飾用 MAz の参照化合物となるモデル分子 modAz 分子を用いて、ベシクル二分子膜における液晶性分子組織体の光応答性を評価する。当初は、蛍光色素などをベシクルに内包して、ベシクルの分子構造変化が検出可能となる評価実験系を探索・検討する。単細胞細菌である、大腸菌または枯草菌の培養系において、MAz 修飾ナノ材料を添加して、外部刺激による細菌増殖抑制の有無を評価する。

4. 研究成果

(1) 修飾用アゾベンゼン化合物 (MAz) の合成とナノシートへの修飾、光応答挙動の評価

これまでのサーモトロピック液晶中での研究結果を踏まえて、ナノシートの修飾に適したトリエトキシシラン基を有する push-pull 型および通常型アゾベンゼン化合物の合成を行ない、粒子表面修飾用化合物 MAz1 および MAz2 (図2) を得た。

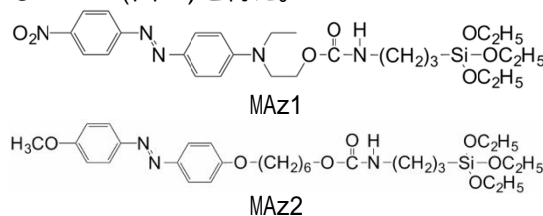


図2 用いたシラン基を有するアゾベンゼン化合物の分子構造

修飾する母材として、シリカマイクロ粒子、またはシリカナノ粒子、酸化グラフェンナノシート (GONS)、ニオブ化合物ナノシート、雲母片 (MiSh) を 10mM MAz 溶液に浸漬して、18 時間加熱・反応させ、MAz 修飾ナノ材料に作製した。MAz 修飾マイクロ粒子は、光応答挙動、細菌実験などの各評価と条件最

適化のために作製した。分光分析および熱分析、光応答挙動により、各 MAz 修飾材料の評価を行なった。

MAz 修飾二オプ化合物ナノシートにおいては、光応答挙動は確認されなかった。材料の再設計が必要と判断した。MAz 修飾 GONSh については、光応答挙動が観測されたが、GONSh 単体でも光吸収帯を有するため、分光分析における有効な評価が困難であった。MAz 修飾 MiSh においても、光応答挙動が見られたが、粒子により再現性に問題があり、分光分析も困難であった。以上より、MAz 修飾 GONSh と MAz 修飾 MiSh において、光応答相転移挙動が観測されたが、光応答挙動に影響した修飾 MAz 分子に由来する特性パラメータについてのより再現性のある評価を行うため、MiSh 表面に近い構造を有するシリカナノ粒子（シリカ NS）とシリカマイクロ粒子（シリカ MS）を用いて、粒子表面上の MAz 分子の特性を評価することとした。分光分析および熱分析の結果、粒子表面上の MAz 修飾量が光応答挙動に影響していることが示唆された。また、MAz 分子は粒子表面においても溶液中と同様の光異性化挙動を示すことを確認した（図 3、4）。

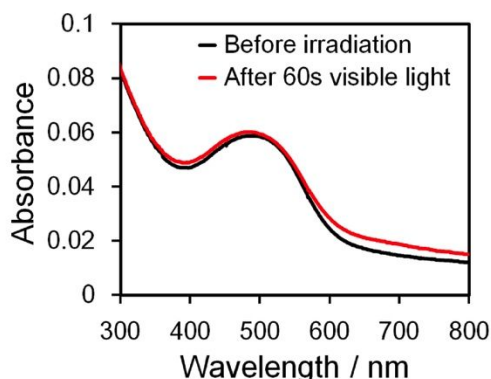


図 3 粒子表面に修飾した MAz1 における可視光 ($\lambda=488\text{nm}$) 照射前後の紫外可視吸収スペクトルの変化

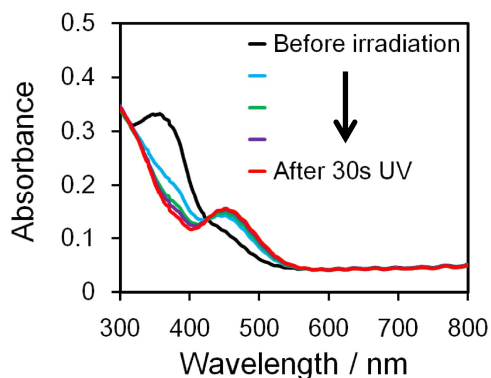


図 4 粒子表面に修飾した MAz2 における UV ($\lambda=365\text{nm}$) 照射下の紫外可視吸収スペクトルの変化

(2) モデル分子 (modAz) の合成とリオトロピック液晶系における光応答相変化挙動

蛍光色素を内包したベシクルからの蛍光発光挙動の変化を検出することにより、二分子膜からなるベシクル構造体の分子構造変化を評価した。その結果、MAz1 および MAz2 より強い相互作用を有するアゾベンゼン化合物を得るための分子再設計・再合成が必要と判断した。それゆえ、表 1 に示した修飾用 MAz のモデル分子 (modAz) 群を合成した。

表 1 新規に合成した MAz のモデル分子 (modAz) 群

	X	Y
modAz1	CN-	-O-
modAz2	C ₆ H ₁₃ -	-O-
modAz3	NO ₂ -	-N(CH ₃)-
modAz4	CH ₃ O-	-O-
modAz5	NO ₂ -	-O-

蛍光色素を内包し、modAz 分子を含んだベシクル分散液の蛍光色素放出挙動を検出する手法を用いて、modAz 分子によるリオトロピック液晶系ベシクル二分子膜の光応答挙動を評価した。表 1 の 5 種の modAz 分子を用いた評価結果より、2 種の modAz を 1:1 で混合した系において、UV 照射に対応した蛍光強度の増強が観測された。modAz 分子の形状および分子長が影響してベシクル分子膜が不安定化し、膜構造を一部破壊できることが示唆された。さらに、modAz 分子を含むリオトロピック液晶の相変化挙動を偏光顕微鏡観察下で観察し、評価した。蛍光分光光度計を用いた評価法と同様に、modAz 分子の混合条件によりベシクル分子膜の不安定化が起こることが示唆された。以上の結果は、修飾用アゾベンゼン化合物の再設計に有用な情報となったが、さらなる最適化が必要であった。

(3) MAz 修飾材料存在下での光刺激による細菌増殖挙動の評価

大腸菌系において、評価法の検討を実施した。MAz の光応答性と発熱抑制を踏まえて、中心波長 460nm の LED 光を照射装置として用いた。照射実験に適し、増殖抑制性の評価が可能である手法（濁度測定法、コロニー計測法）を選定した。可視光照射下での培養を検討した結果、光照射下で菌自身の減菌性が確認された。照射強度の最適化が必要となり、照射手法および評価法の条件検討を進めた。大腸菌系の知見をもとに、枯草菌系の培養実験の条件を検討したところ、菌自身が減菌しない照射強度条件を見出した。この照射条件下で MAz 修飾シリカ MS または MAz 修飾シリカ NS 共存下で枯草菌の培養実験を行ったところ、MAz 修飾シリカ MS 共存下において

光照射の有無でわずかな差異が見られた。しかし、MAz 修飾シリカ MS および MAz 修飾シリカ NS 共存下においても、生菌性の明確な抑制には至らなかった。今後、添加する MAz 修飾材料の濃度条件の最適化で、細菌増殖抑制につながることを示唆された。

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1件)

- (1) Yutaka Kuwahara, Takahiro Oda, Sunnam Kim, Tomonari Ogata, Seiji Kurihara, Photo-responsive traveling of small-particles modified with azobenzene groups as molecular motors in a liquid crystal, *Materials Letters*, 2016, 181, 257-260. DOI: j.matlet.2016.06.010

[学会発表](計3件)

- (1) Su Ma, Yutaka Kuwahara, Tomonari Ogata, Sunnam Kim, Seiji Kurihara, Light-induced phase transition of lyotropic liquid crystals and motion behavior of micron objects via photochemical azobenzene molecules, The 2015 International Conference on Material Science and Application, 2015年6月13日-6月14日, Suzhou, China
- (2) Yutaka Kuwahara, Yoshihiro Yamaguchi, Seiji Kurihara, Remote control of small particles modified with azobenzene derivatives by light irradiation, The Applied Nanotechnology and Nanoscience International Conference, 2016年11月09日-11月09日, Barcelona, Spain.
- (3) Yutaka Kuwahara, Takahiro Oda, Su Ma, Ryo Izumi, Sunnam Kim, Tomonari Ogata, Seiji Kurihara, Optical manipulation of small machines modified with azobenzene groups on a nematic liquid crystal film, the 9th Asian and Oceanian Photochemistry Conference, 2016年12月06日-12月06日, Singapore.

6. 研究組織

(1)研究代表者

桑原 穰 (KUWAHARA, Yutaka)
熊本大学・大学院先端科学研究部・助教
研究者番号：60347002

(2)研究分担者

栗原 清二 (KURIHARA, Seiji)
熊本大学・大学院先端科学研究部・教授
研究者番号：50225265

山口 佳宏 (YAMAGUCHI, Yoshihiro)
熊本大学・環境安全センター・准教授
研究者番号：10363524