

「組織化と機能」研究領域 領域活動・評価報告書

— 平成 16 年度終了研究課題 —

研究総括 国武 豊喜

1. 研究領域の概要

ナノメートルサイズの極微単位が組織化され、単純な構造から複雑な組織体へと転換する過程においては、マイクロからマクロに至るいずれのサイズでも、組織構造を保つ境界として界面が重要である。このような観点に基づき、組織化と界面がもたらす機能について研究する。例えば、分子膜の関与するさまざまな働き、単一構造の観察と機能化、組織化の基礎として分子認識、構造のヒエラルキー、組織化・構造のダイナミクス、ナノ構造体(材料)組織や機能、及びこれらの応用研究を含む。

2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

- 1) 選考は「組織化と機能」研究領域に設けた選考委員会(9名)で行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考の基本的考え方は以下の通りである。
 - ①独創性
 - ・時代を先駆けていること(未踏の研究領域を課題として提案していること。)
 - ・既存の研究課題であっても、独自の的方法論を提案しており、ブレークスルーが期待されること。
 - ②将来性
 - ・新たな研究領域への展開や新たな可能性が期待できること。
 - ③主体性
 - ・既存の研究グループから独立していること。
 - ④妥当性
 - ・3年間で実施可能であること。
 - ⑤その他
 - ・次世代を担う人材育成を目指すため、年齢は原則として40歳半ば以下とする。
 - ・さきがけ研究に専念することが難しい教授、所長、室長等は対象としない。
 - ・現在JSTの諸事業を含む有力な研究支援を代表として受けていない申請者を優先する。

4. 選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー2名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	101名	23名	10名

5. 研究実施期間

平成 13 年 12 月～平成 17 年 3 月

6. 領域の活動状況

領域会議: 6回

研究総括の研究実施場所訪問: 研究実施期間中に全研究者を訪問し、研究環境の整備や研究進捗状況の確認、組織の責任者への協力依頼を行った。

7. 評価の手続き

研究総括が個人研究者からの報告・自己評価を基に必要に応じて領域アドバイザーの協力を得て行った。また、一般公開の研究報告会において産学官の参加者から研究成果に対する意見、評価を受け、それらを参考にした。

(評価の流れ)

平成 17 年 1 月	研究報告会開催
平成 17 年 3 月	研究終了
平成 17 年 3 月	研究報告書および自己評価提出
平成 17 年 3 月	研究総括による評価

8. 評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表など)、特許、研究を通じての新たな知見の取得などの研究成果状況
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献

9. 研究結果

本領域の主題である「組織化と機能」は、原子・分子を出発材料とするナノからマイクロに及ぶ組織化、それらの機能開発である。この分野が新しい研究のトレンドとして関心呼び始めていた1999年春に「組織化と機能」領域が開設され、選考委員会の席でアドバイザーのメンバーと厳しい議論をしたことが記憶に残っている。いずれにしても、新しい可能性に賭けているか、大胆でしかも実現可能と考えられる提案をしているか、など「さきがけ」プログラムの精神を生かすという方針であったので、厳しいながらも材料分野で新たな可能性をもたらす課題に期待する楽しさがあった。

2000年春には、米国クリントン大統領の国家ナノテクノロジー戦略が発表され、先進諸国が一斉にナノテクノロジーに対する強力な取り組みを始めるきっかけとなった。われわれの領域は正にナノテクの中心的課題であったので、アメリカの国家戦略に引きずられることのない我が国独自のプログラムとしてスタートしたことは重要なことであった。米国流ナノテクの亜流となるような課題は含まれていなかったのである。

第3期研究メンバーは、1,2期研究メンバーに比べ若い研究者が集まったが、皆高い水準にあり、メンバーのうち半数ほどは期間中に昇任や栄転となった。また、いくつもの研究成果が国際的な一流専門誌に掲載され、ニュースとしてマスコミや専門誌に紹介された。3年間の研究期間を通して、基礎研究に関しては、人工筋肉タンパク質の創製、氷内の新しい拡散機構の発見およびスフィンゴ脂質と膜タンパク質の相互作用の発見など、興味深い成果が得られている。また、要素技術として、糖鎖の精緻配置、分子ワイヤーの精密な組織化、分子間相互作用の精密なシミュレーションおよび膜タンパク質の精密配置技術などがあり、今後の科学技術進展の基盤となることを期待している。さらに、応用研究に関しては、高精度なDNA-塩基ミスマッチ検出技術および近接場光学顕微鏡プローブの高効率製造技術などがあり、早期の実用化を期待したい。

最後に「さきがけ」の仕組みは若手研究者育成の手法としてきわめて優れていることを、研究総括としての経験から述べておきたい。研究開始当時は、見通しが不明確であったり不安を抱かせ

る状況があっても、1-2年経つと成果とともに研究者としての広がりを見せ始める。新鮮な発想とそれなりの経験を持っている30代の段階で、余裕のある研究費で自分のテーマを追求できることは大きな飛躍のきっかけとなる。

10. 評価者

研究総括 国武 豊喜 北九州市立大学 副学長

領域アドバイザー氏名(五十音順)

板谷 謹悟	東北大学大学院工学研究科 教授
岩本 正和	東京工業大学資源化学研究所 教授
生越 久靖*1	福井工業高等専門学校 校長
梶山 千里	九州大学 総長
雀部 博之	千歳科学技術大学 学長
南後 守*2	名古屋工業大学応用化学科 教授
藤平 正道	東京工業大学生命理工学部 教授
村田 朋美	北九州市立大学国際環境工学部 教授
村山 徹郎	三菱化学有機エレクトロニクス研究所 チーフサイエンティスト

*1 生越久靖氏は平成11年度のアドバイザー。

*2 南後守氏は平成12年度から生越久靖氏の後任として領域アドバイザーとなる。

(参考)

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	8	75	83
口頭	84	24	108
その他	32	7	39
合計	124	106	230

(2)特許出願件数

国内	国際	計
13	2	15

(3)受賞等

- ・ 田中 賢
日本化学会「講演奨励賞」(H14.3)
日本化学会「講演奨励賞」(H15.3)
応用物理学会「講演奨励賞」(H14.3)
応用物理学会「講演奨励賞」(H16.4)
日本再生医療学会「優秀演題賞」(H16.6)
- ・ 中村 史夫
日本化学会「講演奨励賞」(H15.6)
- ・ 深澤 倫子
大学婦人協会「守田科学研究奨励賞」(H16.5)
- ・ 物部 秀二
(社)表面技術協会「論文賞」(H13.2)

(4)招待講演件数

国際 46 件

国内 60 件

別紙

「組織化と機能」研究領域 研究課題名および研究者名

研究者名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費 (百万円)
青井 啓悟 (兼任)	分子ピラミッドによる機能性ナノ組織体の創出 (名古屋大学大学院生命農学研究科)	名古屋大学大学院生命農学研究科 助教授 (同上)	50
木村 睦 (兼任)	両親媒性ディスク状化合物の自己組織化とナノデバイスへの応用 (信州大学繊維学部機能高分子学科)	信州大学繊維学部機能高分子学科 助教授 (同上 助手)	48
清川 悦子 (専任)	スフィンゴ脂質の自己組織化と細胞機能 (大阪大学微生物病研究所)	科学技術振興機構 研究者 (理化学研究所 研究員)	44
龔 劍萍 (兼任)	筋肉タンパク自己組織化ゲルによるソフトナノマシンの創製 (北海道大学大学院理学研究科)	北海道大学大学院理学研究科 教授 (同上 助教授)	47
佐々木 成朗 (兼任)	ナノ力学理論の開発と力学的制御による表面機能発現 (成蹊大学工学部物理情報工学科)	成蹊大学工学部物理情報工学科 助教授 (科学技術振興機構 研究者)	39
田中 賢 (兼任)	バイオインターフェイスにおいて組織化された水分子の機能 (北海道大学創成科学研究機構)	北海道大学創成科学研究機構 助教授 (北海道大学電子科学研究所 助手)	60
出羽 毅久 (兼任)	脂質－膜タンパク質ドメインの制御によるナノプラントの構築 (名古屋工業大学大学院工学研究科)	名古屋工業大学大学院工学研究科 講師 (名古屋工業大学応用化学科 助手)	45
中村 史夫 (兼任)	自己組織化単分子膜を用いた DNA センサーの構築 (東レ株式会社先端研究所)	東レ株式会社先端研究所 研究員 (理化学研究所 研究員)	46
深澤 倫子 (兼任)	氷内部および界面に存在する気体分子の拡散と組織化 (統計数理研究所)	科学技術振興機構 研究者 (同上)	37
物部 秀二 (兼任)	無電解めっきのサイズ依存性とナノ光デバイスへの応用 (神奈川科学技術アカデミー)	神奈川科学技術アカデミー 副室長 (同上)	39

研究課題別評価

1 研究課題名:分子ピラミッドによる機能性ナノ組織体の創出

2 研究者氏名:青井 啓悟

3 研究の狙い:

本研究は、ピラミッド状分子の頂点に分子認識機能素子としての糖を固定し、そのピラミッド分子を組織化することで、糖鎖の二次元精密レイアウトを行い、細胞培養基材などの新素材への応用展開に資する機能性ナノ組織体を自在に構築する新たな手法を確立することを目的としている。まず、精緻な細胞認識・情報伝達能をもつ糖を分子ピラミッド頂点に固定した新規両親媒性ピラミッド状分子の合成を行う。ピラミッド台座を組織化させることにより、二次元的に特定のナノ間隔を隔てて糖を精密配列させる手法を開拓する。分子ピラミッドの一次構造と、二次元配列した糖の間隔との相関を明確にして、ナノレベルでの糖鎖空間配列の制御を行う。そして、これらの新素材と小麦胚芽レクチンなどのタンパク質との相互作用を調べることにより、最適糖鎖間隔を検討する。肝細胞標的型のガラクトース型ピラミッド状分子の合成を行い、薬物送達システムの担体や肝細胞培養基質などに応用する高性能生医学材料の開発をめざす。

4 研究成果:

(1) 分子量が単一で、分岐鎖の欠損がない両親媒性分子ピラミッドの合成

複数の疎水基をもつ新しいタイプの両親媒性分子として、一連の新規両親媒性脂肪族ポリエーテル型 dendrimer の創出を行った。すなわち、コアが水酸基あるいは糖で、4個あるいは8個の疎水基をもつポリエチレングリコール型 dendrimer の合成を行った。Dendrimer の合成法は、表面末端の疎水基からコアに向かって段階的な合成を進める convergent 法により行い、分岐の欠損のない単一分子量の dendrimer を得ることができた。糖としては、分子認識能を評価するための *N*-アセチル-D-グルコサミン型と、肝細胞標的型のガラクトース型を合成した。疎水基としては、*n*-ヘキシル基、シクロヘキシル基、ベンジル基をもつ各種の dendrimer を合成した。

既存の両親媒性分子の概念からは、これらの疎水基はいずれも小さく、組織化には不十分と考えられてきた。ところが、次項で述べるように、本研究で合成した一連の両親媒性 dendrimer は二次元平面配列することが判明した。このことは、小さな疎水基でも、Dendrimer に、規則的に複数個の疎水基を導入することで、疎水ゾーンとも呼ぶべき疎水台座を形成し、組織化に有効な疎水ブロックとなることを示しており画期的である。また視点をかえれば、本研究では分子形態が規制されたナノオブジェクトを創出することができたことに意義がある。自在にコア官能基と、疎水基を変換できるために、ナノ組織体を意のままに構築するための新しい素構造を開発できた。

なお、本項の両親媒性分子ピラミッドの構築については、初期の計画より充実し発展した内容の分子構築ができた。すなわち、次項の二次元レイアウトによりナノレベルの精密糖鎖配列制御ができることがわかったので、ファインチューニングが可能な一次構造設計にフィードバックし、多彩な分子ピラミッドの作製を行った。

(2)糖鎖二次元精密レイアウト技術の確立

両親媒性脂肪族 dendrimer を空気-水界面に展開し、単分子膜を調製することで糖の二次元配列を行った。上述の一連の dendrimer からは単分子膜「糖鎖ナノマトリックス」が得られた。技術的には、圧縮速度を低くするなど工夫を施しているものの、小さな疎水基にもかかわらず両親媒性 dendrimer の単分子膜が形成できたことは特筆に値し、ピラミッド状分子のモチーフを活かして平面組織体を具現化することができた。

なお、分岐鎖がベンジレーテルの芳香族ポリエーテル dendrimer (第2世代、末端4分岐ベンジル型、コア水酸基型)は、安定な膜を形成しなかった。ピラミッド型両親媒性分子による二次元精密レイアウトには、Dendrimer 骨格自体が両親媒性である脂肪族ポリエーテル dendrimer が好ましいことが明確となり、本研究での考案が適切であったことが裏付けられた。

両親媒性脂肪族ポリエーテル dendrimer 単分子膜の糖鎖間隔は 2nm に近い値で系統的に制御することができた。例えば、コア(すなわちピラミッド分子頂点)が *N*-アセチル-D-グルコサミンで、疎水基(ピラミッド台座)が *n*-ヘキシル基の8末端型(第3世代)の dendrimer 単分子膜の糖質間隔(すなわち分子間距離)は、1.7nm であった。ある哺乳類の肝細胞の糖結合部位は 2nm 前後の間隔であることが知られており、本研究の dendrimer を用いて理想的な細胞標的材料や細胞培養材料を設計どおりに作製できる道筋が分かった。

この dendrimer に対応するコアが水酸基の dendrimer の単分子膜の頂点間隔(分子間距離にあたる)は、1.8nm であった。このことは、ピラミッド分子を組織化することで、その頂点に配した分子をナノ間隔を隔てて配列できることを示している。

16末端型の第4世代脂肪族ポリエーテル型 dendrimer (コア:水酸基、疎水性台座:ベンジル型)の単分子膜の形成にも成功した。ピラミッド頂点間距離は、2.31nm となり、目標とする肝細胞の受容体結合部位の間隔 2nm をカバーすることができた。

また、両親媒性 dendrimer の一次構造を変換すること、つまり末端基の数と、疎水基の組み合わせを変えることで、二次元組織体のコア間隔を次のように精密制御できるとわかった。

ピラミッド分子の一次構造と二次元組織体の頂点ナノ間隔の対応

ピラミッド分子の一次構造	頂点のナノ間隔
末端基の数: 4末端型(第2世代) → 8末端型(第3世代)	小 → 大
疎水基: ベンジル → ヘキシル → シクロヘキシル	小 → 大
コアの置換基: 水酸基 → 糖	ほぼ同じ

本研究では、本来集合しやすい糖などの機能素子を一定のナノ間隔をあけて並べることができる手法を開発することができた。従来法では、糖が会合してしまうために、糖をもたない両親媒性分子と混合するなどの方法をとったとしても、初期の目的を達することはできていなかった。本法では、生体分子である糖に限らず、各種の機能分子を頂点に容易に導入できるので、生医学材料のみならず、ひろく電子材料や触媒などの機能性材料に新しい材料設計概念を提供できたと考えている。

なお、この精密レイアウトは当初の計画より充実した結果が得られ、前項の分子ピラミッドの設計にフィードバックした。

(3) ドラッグデリバリーシステムや遺伝子デリバリーシステムに好ましい糖鎖ピラミッド被覆ナノ粒子の創製

糖置換脂肪族ポリエーテル dendrimer (第2世代、ベンジル末端型)は、水には溶解しにくかったが、超音波照射により分散させることができた。レーザー光散乱装置により、ナノ粒子を測定した結果、平均直径は 260nm ほどであった。表面が二分子膜で覆われていると仮定して 13 万分子以上の dendrimer により形成されていると見積もられる。水中で調製しているため、表面は糖鎖が二次元に配列した構造からなっていると考えられる。薬物送達システム用の輸送担体としては、100~400nm ほどのサイズが望ましいが、ピラミッド状分子を用いて理想的なサイズのナノ粒子を調製することができた。

(4) 生医学材料としての性質

両親媒性 dendrimer の生医学材料としての応用に向けて、生体親和性や生分解性などの性質を調べた。コレステロールエステラーゼを用いて、生分解性を評価した。ベンジル末端脂肪族ポリエーテル dendrimer のコアにポリカプロラクトンを導入し、その酵素分解性を全有機炭素量(TOC)測定で評価したところ、ポリカプロラクトンと比較して明らかに高い分解性を示すことがわかった。また、ベンジル末端脂肪族ポリエーテル dendrimer 部分の生物化学的酸素要求量(BOD)試験を行った結果、良好な分解性が認められ、菌体により分解資化され代謝されることが明らかになった。疎水基をはずした脂肪族ポリエーテル dendrimer 骨格自体の生分解性も BOD 試験により評価したところ、ベンジル型より分解速度は低いものの良好な分解性を確認することができた。

この dendrimer は、生医学材料として工業的にも利用されているポリエチレングリコールの分岐型にあたり、新素材として望ましい性質を具備していることがわかった。

5 自己評価:

これまでの研究で、分子ピラミッドの一次構造を設計することで、その二次元組織体の糖鎖間隔を理想とするナノレベルで精密制御でき、新しいタイプの機能性材料として有望であることを明らかにしてきた。今後、肝細胞標的型のガラクトース型の糖鎖間制御の評価を行う必要がある。また、レクチンを用いた細胞認識能の評価、ならびに細胞培養基質としての性能評価をさらに推進したい。

6 研究総括の見解:

青井啓悟研究員は、両親媒性ピラミッド分子の合成において、dendrimer 世代及びピラミッド頂点の置換基(糖鎖)に依存してパッキング状態を制御することを実現した。着眼点の面白さを実証した点の評価したい。生分解性の評価も良好な結果を示したことから、今後の生物学的応用に期待したい。

7 主な論文等:

- 1) Ito, M., Imae, T., Aoi, K., Tsutsumiuchi, K., Noda, H. and Okada, M. In Situ Investigation of Adlayer Formation and Adsorption Kinetics of Amphiphilic Surface-Block Dendrimers of Solid Substrates. *Langmuir*, **18**(25), 9757-9764 (2002).
- 2) Manna, A., Imae, T., Yogo, T., Aoi, K. and Okazaki, M. Synthesis of Gold Nanoparticles in a Winsor II Type Microemulsion and Their Characterization. *Journal of Colloid Interface Science*, **256**, 297-303 (2002).
- 3) Aoi, K., Katsube, M., Tsutsumiuchi, K. and Okada, M. Controlled Architecture of Nano-Structures Based on Star Dendrimers. *Kobunshi Ronbunshu*, **59**(12), 742-752 (2002).
- 4) Aoi, K., Takasu, A., Okada, M. and Imae, T. Nano-Scale Molecular Shapes of Water-Soluble Chitin Derivatives Having Monodisperse Poly(2-alkyl-2-oxazoline) Side Chains. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **203**(18), 2650-2657 (2002).
- 5) Aoi, K., Miyamoto, M., Chujo, Y. and Saegusa, T. A New Type of Block Copolymerization with One-Shot Feeding of Two Monomers. *Macromolecular Symposia*, **183**, 53-64 (2002).
- 6) Aoi, K., Aoi, H. and Okada, M. Synthesis of a Poly(vinyl alcohol)-Based Graft Copolymer Having Poly(ϵ -caprolactone) Side Chains by Solution Polymerization. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **203**(7), 1018-1028 (2002).
- 7) Nomura, N., Ishii, R., Akakura, M. and Aoi, K. Stereoselective Ring-Opening Polymerization of Racemic Lactide Using Aluminum-Achiral Ligand Complexes: Exploration of a Chain-End Control Mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, **124**(21), 5938-5939 (2002).
- 8) Tsurugi, K., Nomura, N. and Aoi, K. Palladium-Catalyzed Allylic Substitution Reaction: Oxidative Addition versus Dissociation in an Olefin-Palladium(0) Complex. *Tetrahedron Letters*, **43**(3), 469-472 (2002).
- 9) Sato, H., Mizutani, S., Ohtani, H., Tsuge, S., Aoi, K., Seki, T. and Okada, M. Determination of Degree of Substitution in *N*-Carboxyethylated Chitin Derivatives by Pyrolysis-Gas Chromatography in the Presence of Oxalic Acid. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **64**, 177-185 (2002).
- 10) Tanaka, K., Dai, S., Kajiyama, T., Aoi, K. and Okada, M. Aggregation States and Molecular Motion in Amphiphilic Poly(amido amine) Dendrimer Monolayers on Solid Substrates. *Langmuir*, **19**(4), 1196-1202 (2003).
- 11) Funayama, K., Imae, T., Seto, H., Aoi, K., Tsutsumiuchi, K., Okada, M., Nagao, M. and Furusaka,

- M. Fast and Slow Dynamics of Water-Soluble Dendrimers Consisting of Amido-Amine Repeating Units by Neutron Spin-Echo. *Journal of Physical Chemistry B*, **107**(6), 1353-1359 (2003).
- 12) Funayama, K., Imae, T., Aoi, K., Tsutsumiuchi, K., Okada, M., Furusaka, M. and Nagao, M. Small-Angle Neutron Scattering Investigations of Layer-Block Dendrimers in Aqueous Solutions. *Journal of Physical Chemistry B*, **107**(7), 1532-1539 (2003).
- 13) Imae, T., Hirota, T., Funayama, K., Aoi, K. and Okada M. Binding of Poly(amido amine) Dendrimer to Sodium Hyaluronate in Aqueous NaCl Solution. *Journal of Colloid and Interface Science*, **263**, 306-311 (2003).
- 14) Manna, A., Imae, T., Aoi, K. and Okazaki, M. Gold Nanoparticles Surface-Confined by Hybrid Self-Assembled Monolayers of Dendrimer and Dodecanethiol. *Molecular Simulation*, **29**(10-11), 661-665 (2003).
- 15) Nomura, N., Yoshida, N., Tsurugi, K. and Aoi, K. Versatile Carbon-Carbon Bond-Forming Polycondensation between Terpene Derivatives and Malonic Esters via Palladium-Catalyzed Allylic Substitution Reaction. *Macromolecules*, **36**(9), 3007-3009 (2003).
- 16) Nakamura, R., Aoi, K. and Okada, M. Interactions of Enzymes and a Lectin with a Chitin-Based Graft Copolymer Having Polysarcosine Side Chains. *Macromolecular Bioscience*, **4**(6), 610-615 (2004).

研究課題別評価

1 研究課題名: 両親媒性ディスク状化合物の自己組織化とナノデバイスへの応用

2 研究者氏名: 木村 睦

3 研究の狙い:

ディスク状化合物は、分子間の π - π 相互作用によりスタッキングしたカラム状組織体を形成する。このカラム内では、電子・ホールがカラム軸に沿って輸送されることが報告されており、カラムの成長を自在に行うことができれば新規なナノスケールのワイヤー・ケーブルとして機能すると考えられている。そこで、本研究ではディスク状化合物の自己組織化を利用した垂直配向有機・無機複合膜の構築について研究を行う。具体的には、金属フタロシアニン錯体・金属ポルフィリン錯体・トリフェニレン・コロネンなどの大きさの異なるディスク状化合物が自己組織化したカラム状組織体を固体基盤上で垂直配向させ、これをテンプレートとした有機・無機複合膜の調製を目標とする。

4 研究成果:

(1) ディスク状化合物の自己組織化によるカラム状組織体の形成

ポルフィリンやフタロシアニン錯体の自己組織化によるナノ組織体の構築について研究を行った。これらのディスク状化合物は、化合物間の強い π - π 相互作用によって自発的にカラム状組織体となる。この自己組織化過程に別の非共有結合を導入することにより、これまでにない組織体形成が可能になると考えた。この考えに基づき4種の新規なディスク状化合物を合成し、自己組織体構造について検討を行った。

- 1) 金属ポルフィリン錯体の周辺に剛直な dendrimer を導入し、フラレンとの相互作用による組織体構造の変化について検討を行った。長鎖アルキル基を持つポルフィリン dendrimer は、液晶性を示し XRD 測定より Col_h 相であることがわかった。これに対しフラレンを混合すると液晶相が大きく変わり、フラレンとの超分子錯体形成によって一次元カラム組織が安定化することがわかった。
- 2) フタロシアニン錯体に水素結合部位を導入し溶液内および固体内での自己組織体構造の変化について検討を加えた。ジオール部位を持つ非対称性フタロシアニン錯体を合成したところ、溶液内で安定なダイマー構造を取ることがわかった。さらに、固体内でもこのダイマー構造が積み重なったラメラ構造となることがわかった。さらに、熱によって分子間水素結合を切断することにより Col_h 構造に変化したことから、水素結合の有無によって組織体構造が変化できる材料であることを明らかにした。
- 3) 先にオリゴエチレングリコール側鎖を持つ金属フタロシアニン錯体の形成するカラム状組織体を鋳型とした有機・無機複合体の調製について報告した。そこで、このディスク状化合物を共有結合で連結した両親媒性ロッド状化合物を鋳型とした有機・無機複合体の調製を行った。両親媒性シリコンフタロシアニン錯体の重合により重合度 20 量体程度のロッド状化合物を合成した。このロッド状化合物を鋳型として有機・無機複合体を調製したところ、得られた複合体内には電子輸送能を持つロッド状化合物を高密度で含み、ロッド状化合物同士が一次元状に並んだワイヤーの単離に成功した。
- 4) 液晶性フタロシアニン錯体に重合開始点を導入し、この開始点から原子移動ラジカル重合によって高分子鎖を導入した。親水性の側鎖を持つモノマーを用いディスクへの高分子鎖の導入を行ったところ、アルコール中において物理ゲルを形成することを見いだした。この物理ゲルは、末端のフタロシアニン錯体の結晶-液晶転移点を境にゲルからゾルへの変化が起こり、ゲル-ゾル転移は可逆的であった。この物理ゲルの AFM および TEM 観察から、直径数 nm 長さ数 μm のナノファイバーが三次元的に絡み合った構造であることがわかった。これらの

ナノファイバー内にはディスク状化合物が一次元状にスタッキングしていることがわかった。以上の結果より、ポルフィリン-フラレンとの相互作用・側鎖間の水素結合・両親媒性ディスク間の共有結合によるロッド化・親水性高分子の導入によってディスク状化合物の組織化の制御に成功した。合成した分子間に生じる非共有結合を利用することによって、大きさが数ナノメートルのディスク状化合物をナノメートルサイズの構造に組織化させることが可能となった。多種の非共有結合を利用することによって、伝導性にとって重要な一次元カラム組織内のディスク間距離の制御をもたらすとともに、ワイヤー・ケーブルとなるカラム間の組織化の制御も可能となった。

(2)自己組織体を鋳型とした有機・無機複合体の調製

トリフェニレン・ヘキサベンゾクロネン・フタロシアニンを中心に持つディスク状化合物、配位子を持つ両親媒性ブロック共重合体、チオール基を持つオイルゲル化剤の形成する自己組織体を鋳型とした有機・無機複合体の調製を行った。両親媒性側鎖もしくは無機モノマーを直接結合させたディスク状化合物を合成し、有機・無機複合体の調製を行った。両親媒性側鎖を持つ場合には、ディスク状化合物の自己組織体周辺への無機成分の濃縮によって有機・無機複合体が形成された。これに対し、重合可能な無機成分を持つ場合、側鎖の重合によって側鎖部分が重合し有機・無機複合体が得られた。どちらの場合にも、重合条件によって複合体構造が変化した。配位子を持つブロック共重合体を鋳型とした場合には、ブロック共重合体の分子量によって得られる有機・無機複合体の構造が変化することがわかった。また、配位子をブロック共重合体の両末端に導入したことによって有機・無機複合体内において超分子高分子が形成した。チオール基を導入したオイルゲル化剤を用い金ナノ粒子の集積化を行った。オイルゲル化剤の形成するナノファイバーに金ナノ粒子が結合し三次元編目状の金ナノ粒子組織体が形成した。以上のことから、ホール輸送能を持つディスク状化合物の一次元カラム・酸化還元活性な金属錯体・金ナノ粒子を含む有機・無機複合体の調製に成功した。

以上の結果より、無機成分を有機物の形成する超分子組織体周辺に濃縮させることにより、超分子構造の固定化および無機物の配列化が可能となった。

(3)基盤上での有機・無機複合体薄膜の調製と基盤上での配向制御

両親媒性ディスク状化合物を鋳型とした有機・無機複合体薄膜を固体基板上で調製した。また、得られる薄膜内でのカラム状組織体の配向制御についても検討を行った。鋳型となる有機物の構造・無機モノマーの側鎖・重合速度などの条件を変え、ガラス基板上での薄膜調製を行った。基板に対しカラム状組織体が平行に配列している場合とある程度基板に対し垂直に配列している薄膜を得ることができた。

5 自己評価:

本さきがけ研究により、ディスク状化合物のボトムアップ手法によって大きさや形の異なる新規なカラム状組織体およびそれらを含む有機・無機複合体の調製を行った。分子間の相互作用を合成的にコントロールすることにより、多様な組織構造へと変化しさらに組織構造を無機物のコーティングにより固定化することができた。電子・ホール輸送能を持つカラム状組織体と無機物との融合は、ボトムアップ手法によるナノデバイス内のナノケーブルへの応用展開が可能であることを示すことができた。しかしながら、基板上での配向および得られた材料の評価については期間内で明確な結果を残すことができなかった。特に得られた材料のホール輸送および I-V 特性などを試みたが、残念ながら再現性のある結果を得るに至らなかった。今後、共同研究などを通じ得られた材料の評価を進めたい。

結果のうち、フラレンを含むポルフィリン dendrimer 液晶については、アメリカ化学会のホームページで "Heart Cut Airtile" として紹介され、さらに金粒子のナノファイバーについては Advanced Materials の表紙として採用された。

6 研究総括の見解:

木村睦研究員は、ディスク状化合物をカラム状に組織化し、無機コーティングして、安定化することに成功しており、アメリカ化学会などで関心を集めている成果を挙げたことは評価に値する。このカラムを基板上に垂直配向させるまでには至らなかったが、応用上重要な技術であり、今後の発展を期待したい。

7 主な論文等:

- 1) Kimura, M., Sato, Y., Ohta, K., Hanabusa, K., Shirai, H., Kobayashi, N.
Self-Organization of Supramolecular Complex Composed of Rigid Dendritic Porphyrin and Fullerene
J. Am. Chem. Soc., 124, 5274-5275 (2002)
 - 2) Kimura, M., Narikawa, H., Ohta, K., Hanabusa, K., Shirai, H., Kobayashi, N.
Star-shaped Stilbenoid Phthalocyanines
Chem. Mater. 14, 2711-2717 (2002)
 - 3) Kimura, M., Ueki, H., Ohta, K., Hanabusa, K., Shirai, H., Kobayashi, N.
Aggregation Behavior of Amphiphilic Phthalocyanine Block Copolymers
Langmuir, 20, 7683-7687 (2002)
 - 4) Kimura, M., Kuroda, T., Ohta, K., Hanabusa, K., Shirai, H., Kobayashi, N.
Self-Organization of Hydrogen-Bonded Optically Active Phthalocyanine Dimers
Langmuir, 19, 4825-4830 (2003)
 - 5) Kimura, M., Sakaguchi, A., Ohta, K., Hanabusa, K., Shirai, H., Kobayashi, N.
Selective Ligation to Sterically Isolated Metallophthalocyanines
Inorg. Chem., 42, 2821-2823 (2003)
 - 6) Kimura, M., Wada, K., Y. Iwashima, Ohta, K., Hanabusa, K., Shirai, H., Kobayashi, N.
Preparation of Organic-Inorganic Hybrids containing Rod-like Phthalocyanine Polymers
Chem. Commun., 2003, 2504-2505
 - 7) Kimura, M., Kobayashi, S., Kuroda, T., Hanabusa, K., Shirai, H.
Assembly of Gold Nanoparticles into Fibrous Aggregates Using Thiol-Terminated Gelators
Adv. Mater. 16, 335 (2004)
 - 8) Kimura, M., Ueki, H., Ohta, K., Hanabusa, K., Shirai, H., Kobayashi, N.,
Nanoscale Fibrous Assemblies Made of Metallophthalocyanine-Terminated Amphiphilic Polymers
Chem. Eur. J. in press (2004)
- 国際学会招待講演 三件、国内招待講演 七件

研究課題別評価

1 研究課題名: スフィンゴ脂質の自己組織化と細胞機能

2 研究者氏名: 清川 悦子

3 研究の狙い:

細胞には数千種類の脂質が存在し、生体膜上で脂質は均一に分布していない。脂質分布の違いが、細胞膜に存在する蛋白質の分布をも決定し、延いては細胞の機能を決定しているといつてよい。脂質分布の違いとは、自己組織化の違い、即ち、分子間の相互作用の形式・強度の違いである。ナノメートル単位の観察が出来て、初めてこれら分子間の相互作用の性質を把握することが可能となるが、このような研究は現在始まったばかりである。脂質の組織化から細胞の機能を考えるために、1) 分子間の相互作用を詳細に検討することで得られる生体膜の詳細な理解と、2) 細胞1つ・個体1つを、1システムとして認識しその制御機構を知ること、の2点をリンクさせることが必要だと考えている。

スフィンゴミエリンはモデル膜でも生体膜でも、自己集合して数十ナノメートル程度の微小領域を形成し、細胞機能を発揮させる信号伝達経路の起点になっていると考えられるが、その詳細は不明である。スフィンゴミエリンを標識出来る特異的プローブを開発し、生きた細胞における生体膜のダイナミクスの可視化を目指す。合わせて他の生体膜構成脂質特異的プローブも開発し比較検討し、相互作用の基本原理を探索する。最終的には、生きた細胞1つ・個体1つにおいて時間的・空間的観察をとし、信号伝達に関わる脂質集合の動作機構の解明を目標とする。

4 研究成果:

(1) 脂質特異的蛍光蛋白(プローブ)の作成

- ① スフィンゴミエリンのプローブ: スフィンゴミエリン(SM)の無毒化プローブに関しては完成された。プローブは大腸菌に発現させ精製する方法を用いたが、可溶性が乏しいことが収率の問題になった。試験管内蛋白質翻訳システム・可溶化方法の改変などを行ったが、プローブとしての性質を保ちつつ効率よく可溶化することは出来なかった。大腸菌を大量培養することで、自らの実験に用いるプローブは得ている。
- ② ホスファチジルセリンに対するプローブ: ホスファチジルセリン(PS)に関しては、PS受容体の細胞外領域のcDNAからSM無毒化プローブと同様の方法を用いて、大腸菌での発現・生成を試みたが、可溶化効率はSMプローブより低く、ほとんど可溶化されなかった。SM無毒化プローブと同様に可溶化の検討を行ったが、成果は得られず、プローブ作成は達成されていない。
- ③ イノシトールリン酸群に対するプローブ: イノシトールリン酸群に関しては、PIP2、PIP3に結合するPHドメインとGFPとの融合プローブを京大森井博士・東大福井博士より、それぞれ供与頂いた。

(2) プローブの評価

SM無毒化プローブ(161-297)について記す。

A) プローブの特性: 認識脂質の特異性

ライセニン(161-297)はミズ体腔液から回収される蛋白質で、スフィンゴミエリン(SM)を特異的に認識するが細胞死を誘導することが知られていた。ライセニンのアミノ酸161番から297番のみから成る変異体は、SMを認識するが毒性を示さない。

プローブの脂質特異性はそれまでプラスチックプレートに固定化した脂質を用いて確認していたが、これに加えてリポソームを用いてその結合特異性を観察した。プレートアッセイでは、スフィンシン1リン酸(S1P)・スフィンゴシルホスファチジルコリン(SPC)に弱い結合を示した。リポソーム結合試験ではS1Pには弱い結合性を示すが、SPCには結合しなかった。また、

セラミドへはプレートアッセイでは結合しないが、リポソームでは結合を示した。このことは脂質が固相化された一重膜か、リポソームのような二重膜かに依存してプローブの認識が異なることを示している。これらの認識の相違を数値化するために、一重膜で固相化した場合に関しては表面プラズモンを利用した BIAcore で結合定数を求めようとしたが、一定の結果を得る条件を設定することが出来なかった。また、二重膜のリポソームとカロリメーターを用いた測定では、SM とプローブの結合が弱く結合定数を求めることが出来なかった。しかしながら、T 細胞などの生きた細胞で細胞表面のスフィンゴリエリンを除去すると、プローブは細胞を認識出来なくなる事から、細胞においてはセラミドではなくSMを認識することは確かであり、また一回結合したプローブは T 細胞においては解離する頻度は低く、生きた細胞における観察・脂質ドメイン操作には支障がないことは保証された。

B) プローブの特性: 細胞における分布

脂質ラフトの定義は不明確であり、各種形態の脂質ドメインに対して同じ用語が用いられている。そこで、人工膜では秩序液体相に分配される SM のプローブを用いて、今まで用いられてきた定義、およびそれに基づいたマーカーの挙動を比較することで、脂質ラフトの形態解明を試みた。糖脂質 GM1 を認識するプローブ・コレラ毒素 B サブユニット(CTxB)は脂質ラフトのマーカーとして、蛍光脂質・C6-NBD-SM [N-((6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino) sphingosylphospho -choline)]は細胞内 SM のトレーサーとして、それぞれ汎用されてきた。プローブを用いた内因性 SM の細胞内分布を理解するために、これら2つと比較する。

B1. 細胞表面における糖脂質 GM1 と SM ドメインの分布

蛍光蛋白質と融合させた無毒化 SM プローブにて、細胞表面に共焦点顕微鏡を用いて観察したところ、T 細胞においては、目で見えるドメインは形成されていなかった。付着細胞においては、蛍光蛋白質がオリゴマー化する場合では、温度依存的に 1-2 マイクロメートル程度のプローブ凝集を見た。これらのプローブを用いて、細胞膜上の拡散速度を計算したところ、オリゴマー型 SM 無毒化プローブ(HV161)は、測定不能なほど遅く可動分画は 25.4 %、モノマー型 SM 無毒化プローブ(HVA161)は $0.142 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ (可動分画: 74.7%)であった。蛍光標識した CTxB は、 $0.106 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ (可動分画: 78.5 %)、C6-NBD-SM は、 $0.554 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ (可動分画: 83.6 %)であった。脂質ラフトは生化学的に界面活性剤不溶な分画として回収されるが、オリゴマー・モノマー型 SM プローブ・CTxB は共に界面活性剤不溶、C6-NBD-SM は可溶性であった。内因性の SM は全て界面活性剤に不溶である。以上のことは、GM1 と SM が同じドメインに存在する可能性を示唆する。次に、異なる大きさの金粒子で標識した SM 無毒化プローブ、CTxB を用いて、細胞表面における分布を見ると、CTxB と SM は 50-200 nm 程度のクラスターを形成するが、共局在することはなかった。無毒化 SM プローブで標識すると加温に伴い、クラスターは大きくなる傾向が認められた。細胞の種類によっては、細胞内側にアクチンが集積している場所に集合している像も得られた。

B2. 細胞内における糖脂質 GM1 と SM ドメインの動態

上記プローブを 4°C で細胞表面を標識させた後、37°C に温めて細胞内への取り込みを見た。すると、CTxB、C6-NBD-SM は 30% 以上が細胞内に取り込まれるのに対し、無毒化 SM プローブの場合は、10% 以下であった。その細胞内分布変化を経時的に追うと、15 分ではベジクル状の構造物に共局在する。30 分程度経過すると、3者とも核の周辺に集積し始めるものの、CTxB、C6-NBD-SM はリボン状の形態をなし、無毒化 SM プローブとは解離する。マーカーによる染色では、CTxB、C6-NBD-SM の集積場所はゴルジ体で、無毒化 SM プローブはリサイクリング・エンドソームであった。以上より、細胞内において、SM は糖脂質 GM1 と異なるドメインを形成することが証明された。

以上を表にまとめる。

プローブ名	界面活性剤 可溶性	可動分画 (%)	拡散係数 ($\mu\text{m}^2/\text{sec}$)	細胞内取込 (%)	細胞内運命
CTxB	不溶	78.5	0.106	30 %	ゴルジ体
HV161	不溶	25.4	-	10% 以下	リサイクリングエ ンドソーム
HVA161	不溶	74.7	0.142	10% 以下	リサイクリングエ ンドソーム
C6-NBD-SM	可溶	83.6	0.554	30%	ゴルジ体およびリ サイクリングエン ドソーム

また、生化学的にラフトを単離できるとされていた界面活性剤の感受性、形質膜における可溶性、拡散係数には、相関がない。また、これらのパラメーターは細胞表面の分布、およびそれを反映する細胞内への取り込みにも相関がないことが、明らかになった。

C) 糖脂質 GM1 と SM ドメインに関する細胞内信号伝達経路の差異

細胞外に存在する脂質ラフトのマーカ・GPI 型の蛋白質や糖脂質を抗体によって集合させると、細胞内の酵素が活性化され細胞活性化へ向かうカスケードのスイッチがオンになるという報告などから、脂質ラフトが細胞外から細胞内へ信号を伝達する際のプラットフォームとして機能していることが推定される。そこで、SM が細胞機能へどのように関与しているか考察した。

GM1 は T 細胞受容体 (TCR) を含むドメインを形成することが知られている。無毒化 SM プローブ、および抗体を用いて、細胞形質膜にある SM を集合させたところ、T 細胞においては、細胞内カルシウム、および、リン酸化 ERK の上昇が観察された。これらのアウトプットは GM1 の場合と同じである。しかし、GM1 はチロシンキナーゼの活性化を誘導することによる変化であるのに対し、SM の集合においては、チロシンキナーゼの活性化は観察されない。更に細胞表面の SM を酵素処理によって除去した場合でも、GM1 の集合による ERK 活性化・細胞内カルシウム上昇が観察されることにより、GM1 が ERK 活性化・細胞内カルシウム上昇を起こす経路と SM のそれとは異なることが確認された。このことは、再び、GM1 と SM が形成するドメインの異なりを示している。

SM を細胞形質膜から除去した場合において、リゾホスファチジン酸 (LPA) の信号が伝達されないことを発見した。ただし、SM を集合させた場合の ERK 活性化・カルシウム上昇の程度は、LPA によるものより遥かに大きいため、LPA は SM が関与する経路の一つであり、それが全てではないことが予想される。SM に関わる信号伝達経路を探索するため、細胞形質膜から SM ドメインを除去した場合の変化の調査、および、SM 集合によって特異的にリン酸化される分子の単離・同定を、進めている。

T 細胞では ERK が活性化されたが、線維芽細胞では活性化は観察されない。このことは、細胞の種類によって異なる蛋白質が巻き込まれる(あるいは巻き込まれない)ことを示唆している。そこで、SM ドメインが線維芽細胞の信号伝達に及ぼす影響を検証するために、EGF 受容体と LPA の受容体である EDG と、SM ドメインによる ERK の活性化について観察した。蛍光蛋白質がオリゴマーでも、モノマーでも、ライセニン 161-297 で前処理した場合、細胞外増殖因子 (EGF) 刺激による細胞の活性化を誘導する酵素・ERK の活性化が、やや抑制された。また、EGF 受容体のチロシンリン酸化も抑制された。この現象を説明する仮説はいくつかあるが、一つには、SM プローブを処理することによって、EGF 受容体の流動性が抑制されて

いる可能性が挙げられる。7 回膜貫通型の LPA 受容体(EDG) の場合は、EGF の結果とは逆に、ERK の活性化が促進された。以上の結果より、細胞形質膜上に存在する刺激を伝達する受容体には、SMドメインへの関与の様式が異なることを示している。

D) 細胞骨格への関与

Jurkat 細胞において、重合したアクチンに結合する蛍光標識したファロイジンを用いて、SMドメインを抗体により集合させるとアクチンが重合していることを観察した。これは、SMドメインには、アクチン重合を誘導する分子が存在することを意味している。付着細胞においては、SM集合によって細胞膜が劇的に変化し、波打っている像を呈した。この変化は細胞骨格を制御する低分子量 GTP 結合蛋白質である Rho の優勢劣性型で抑制されることから、膜の形態変化にはアクチンの関与が示唆された。定常状態において、ライセニン 161-297 の分布を免疫電子顕微鏡によって観察すると、その分布は細胞の構造によっても異なり不均一な分布を示していた。また、膜を挟んで SMドメインとアクチンが共存していることから、SMドメインとアクチン細胞骨格には二重膜を挟んで伝達される信号があると、考えられる。

5 自己評価:

当初の狙いは先に示すように、①分子間の相互作用を詳細に検討することで得られる生体膜の詳細な理解と、②細胞 1 つ・個体1つを、1システムとして認識しその制御機構を知ること、の 2 点であった。上記①に関しては、SMドメインと親和性を示す分子を同定することが開始点となる。そこで、ドメインを単離しそのドメインに存在する脂質・蛋白質を網羅的に調査したが、関連する分子を同定することはできなかった。間接的な方法であるが、スフィンゴミエリンの除去、プローブ・抗体を組み合わせたドメインの集積により細胞機能のアウトプット(ERK リン酸化と細胞内カルシウム濃度の上昇)の変化を調査した結果、7 回膜貫通型のひとつである EDG が SM の作るドメインに含まれること、および TCR がそれに含まれないことを確認した。②に関しては、今後蛍光プローブと FRET などを用い、活性化前後の同種あるいは異種脂質(あるいは蛋白質)間の距離を調査する予定である。

また、従来の脂質ラフトのモデルは、図1に示すように糖脂質と SM が同じドメインを形成しているものであったが、ライセニンプローブを用いた本研究において、糖脂質と SM が位置的に異なるばかりか、機能的にも異なるドメインを形成することを確認した。新規モデルを図2に示す。

さらに、プローブを用いて、脂質ドメインを外的に操作する技術を確立した。今後、この技術を用いて、癌・感染症などの疾患における SM が関与する信号伝達分野を詳細に検討していきたい。

図1 従来のラフトモデル (Nature 1997, Science 2001, by Simons et al.)

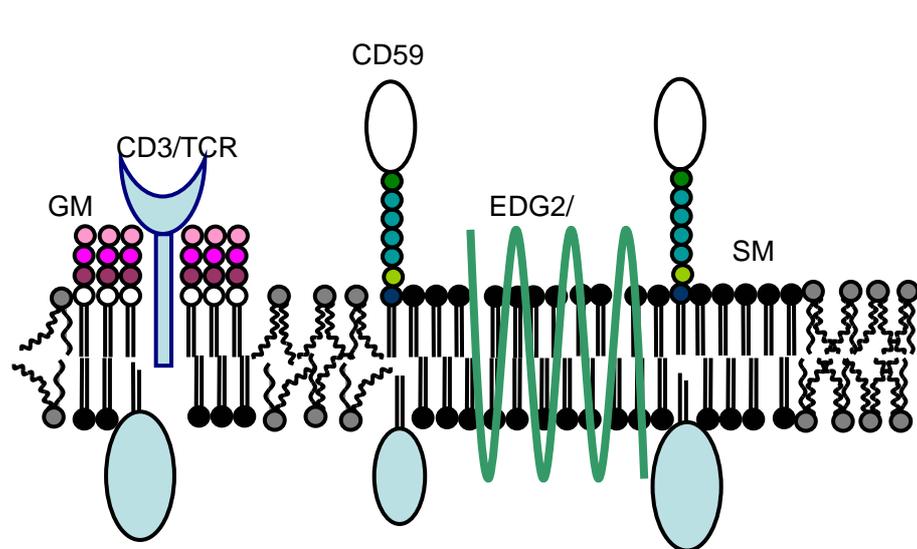
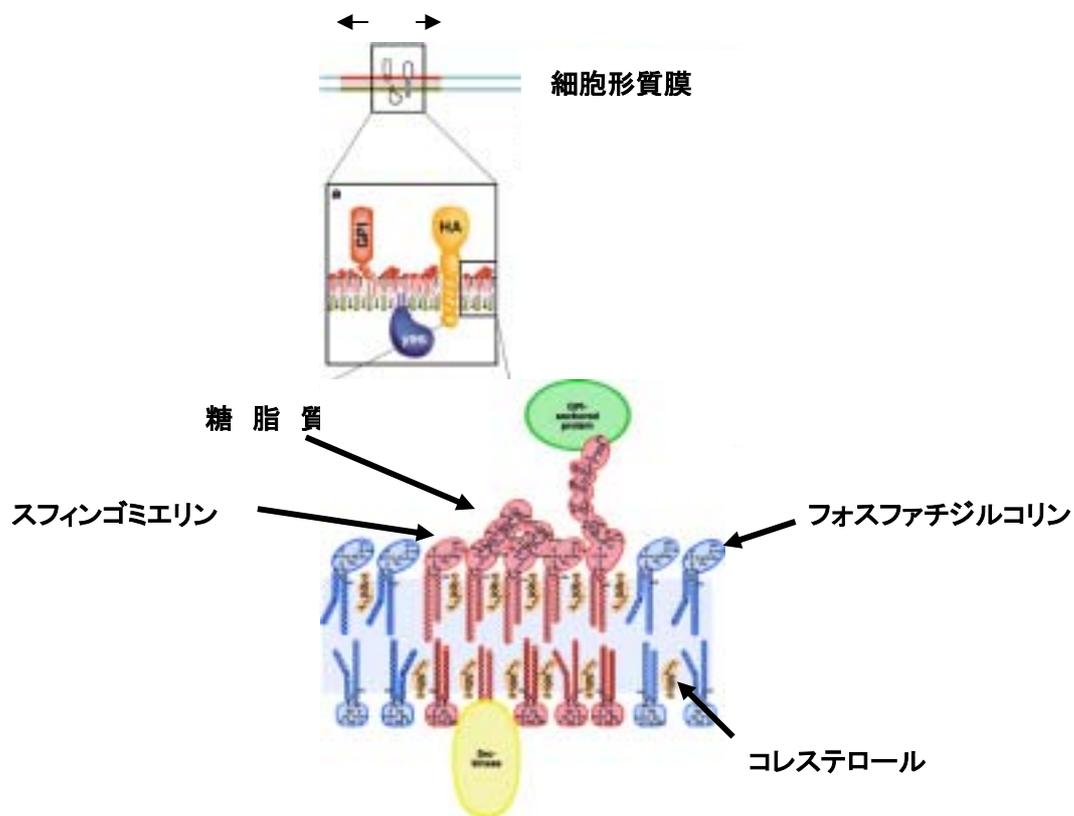


図
2 本研究によ
って提唱され
たラフトモデ
ル

6 研究総括の見解:

清川悦子研究員は、SMを認識するプローブを開発し、脂質ドメインの操作など実験系を工夫することで、SMドメインと相互作用する幾つかの蛋白質の同定に成功している。さらに、今後の研究展開が明確となっており、この研究の発展が期待される。

7 主な論文等:

Kiyokawa, E., Baba, T., Otsuka, N., and Kobayashi, T

Surface distribution and internalization of endogenous sphingomyelin monitored by non-toxic lysenin. Manuscript in preparation.

Kiyokawa, E., Baba, T., Otsuka, N., and Kobayashi, T

Physical and functional heterogeneity of lipid rafts monitored by sphingomyelin-specific probes. Submitted.

Kiyokawa, E., Makino, A., Ishii, K., Otsuka, N., Yamaji-Hasegawa A., and Kobayashi T. Recognition of sphingomyelin by lysenin and lysenin-related proteins, Biochemistry. In press.

研究課題別評価

1 研究課題名: 筋肉タンパク自己組織化ゲルによるソフトナノマシンの創製

2 研究者氏名: 龔 劍萍

3 研究の狙い:

本研究に先立って、ミオシンゲルとアクチンゲルの間に2次元的な接触を持つ巨大なアクチン集合体が、1分子アクチンと同程度の速度($1 \mu\text{m/s}$)で協同的に動くことを発見した。本研究では、このように人工的に再構築した自己組織化化学架橋筋肉蛋白ゲルを用いて、熱揺らぎ($k_B T$)程度のエネルギーで駆動するソフトナノマシンの実現を目標とした。具体的には、このアクチン集合体の構造と運動特性の関係を明らかにし、運動制御が可能なソフトナノマシンの製作に挑む。生物由来のミオシン分子、アクチン分子を化学修飾することにより、高次機能および熱的、機械的、化学的安定性を付与し、同時に生体機械と同様のエネルギー効率を有するソフトマイクロマシンの創出を目指す。

4 研究成果:

1) 筋肉タンパクを用いたゲルバイオマシンの設計および作成

機能性高分子複合体である筋肉を1分子レベルまで分解することで得られるタンパク質分子—アクチン・ミオシン—をそれぞれ自己組織化させながら化学架橋することで再構築型ゲルバイオマシンの作成を試みた。カチオン性ポリマーの導入により、アクチンが様々な形状(ワイヤー状・ファイバー状・リング状)を有した数十マイクロンまでの巨大コンプレックスを形成することを明らかにした。その巨大コンプレックスのサイズやモルフォロジーはカチオン性ポリマーの化学構造に依存することも解明した。ミオシンは自己組織化と同時にシアストレスを印加することにより分子レベルの配向構造をもった数百マイクロンほどのファイバーを形成することがわかった。その配向性は印加するシアストレスの強さを変化させることで制御可能である。このようにして再構築された筋肉タンパクを化学的に架橋することで巨大アクチンゲルおよびミオシンゲルが得られ、これをゲルバイオマシンの運動素子とした。

2) ゲルバイオマシンの生理学的キャラクターゼーション

このように人工的に再構築されたミオシンゲルは筋肉タンパク特有の生理活性(ATPase 活性)を保持しており、ミオシンゲル上においてアクチンが滑り運動をすることを明らかにした。さらに、ミオシンゲル上でのアクチンの最大滑り運動速度はミオシンゲルの ATPase 活性に比例することを明らかにした。

3) ゲルバイオマシンの運動発現と運動制御

さらに配向ミオシンファイバーゲル上で、種々のポリカチオンにより作成した巨大アクチンゲルの滑り運動発現に成功した。ネイティブアクチンと比べ 1.3 倍も速く滑り運動する巨大アチンゲルの作成にも成功した。さらにネイティブアクチンの平均移動距離(L)は観測時間(タイムスケール)の $1/2$ 乗に比例するのに対し巨大アクチンゲルはほぼ 1 乗に比例しており、非常に高い運動方向性が示された。

4) ゲルバイオマシンの運動特性と集合体の構造との相関性

巨大アクチンゲル中の F-アクチンには極性を示すミオシンヘッド(HMM)由来のやじり構造が観察された。F-アクチン同士の極性は巨大アクチンゲルの作成の際に導入するカチオン性ポリマーの種類で変化し、側鎖型ポリカチオンは極性の高いコンプレックスを、主鎖型ポリカチオンでは極性の低いものを形成することが明らかになった。さらに巨大アクチンゲルの運動性は巨大アクチンゲルの極性と非常に強い相関をもち、極性が高いほど運動速度が上昇することを明らかにした。

5) レーザーピンセット装置の構築と最適化

ミオシンゲル上で巨大アクチンゲルが滑り運動する際に発生する力を測定するため pN オーダ

一の力を測定できるシステムをレーザーピンセットを用いて構築した。また ATP の漕流を可能とするフローセルを作成した。その中で滑り運動を発現させ、その際に発生する力を測定する予定である。

5 自己評価:

筋肉蛋白アクチンとミオシンを基本 Building block として使い、人工的に再構築し、ATP 駆動型ゲルマシンの発想と試みはこれまでに例がなく、世界で始めてである。そのため、このように構築した筋肉蛋白ゲルが高い生理活性を保ち、ATP で動いた研究成果を *Advanced Material* 誌に発表されてから、*Nature* 誌の *Science Update* やフランスの科学雑誌(*Sciences Avenir*)に紹介されるほど世間に大きな着目を集めた。

本研究のようなナノ・メソスコピックのゲルマシンについての研究はその中間をつなぎ、これまでに筋肉で未解決の問題であるミオシン・アクチンすべり運動の機構、階層構造の役割、収縮の協同性などを新しい視点から解決できる。筋肉蛋白の集合体が個々のものより高い運動性を示すことが階層構造創発(Emergence)に帰因するものと考えられる。

全体を通して、概ね計画したとおりで研究を推進したものの、筋肉蛋白ゲル同士の滑り運動において、発生する力を定量的に測定することは考えていたより困難で、まだ実現されていない。また、研究を推進している過程で、2次元のカチオンゲル表面でアクチンが3次元的な網目を形成する現象を発見した。この面白い現象を利用して、人工細胞骨格の構築やアクチン駆動システムの創製などへ、今後しっかり展開していきたい。

6 研究総括の見解:

筋肉モデルとして電界に応答する人工材料の開発が行われ、また、生物学的な筋肉たんぱく質の動作機構の解明が行われてきたが、龔研究員は生物から抽出した筋肉たんぱく質を再組織化して、組織構造と動作の関係を明らかにした。さらに、アクチンとミオシンの協同的滑り運動の可視化技術は、筋肉たんぱく質の動作原理解明のための要素技術として重要である。このユニークな研究は海外誌に取り上げられるなど、多くの研究者の関心を集めている。

7 主な論文等:(2002年-2004年)

主な原著論文

- 1) A. Kakugo, S. Sugimoto, K. Shikinaka, J. P. Gong, Y. Osada, "Characteristics of Chemically Cross-linked Myosin Gels", *J. of Biomater. Sci.*, in press.
- 2) A. Kakugo, K. Shikinaka, K. Matsumoto, J. P. Gong, Y. Osada, "Growth of Large Polymer-Actin Complexes", *Bioconjugate Chem.* 14,1185-1190(2003).
- 3) J. P. Gong, Y. Katsuyama, T. Kurokawa, Y. Osada, "Double Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength", *Advanced Materials*, 15,1155-1158(2003).
- 4) T. Kurokawa, J. P. Gong, Y. Osada, "Substrate Effect on Topographical, Elastic, and Frictional Properties of Hydrogels", *Macromolecules*, 35, 8161-8166(2002).
- 5) A. Kakugo, S. Sugimoto, J. P. Gong, Y. Osada, "Nanoactuators built of covalently bound myosin and actin gel fibers", *Advanced Materials*, 14, 1124-1126(2002).

他 19 編

総説 11 編、著書(共著)3 編、基調講演・招待講演・特別講演 20 回、特許 10 件

新聞・雑誌にとり上げられた研究記事

- 1) "Muscle artificial enkit" *SCIENCE ET AVENIR* p20 Oct, 2002 (France の雑誌).
- 2) "Building up some muscle", Artificial muscle made from natural building blocks, *Nature*, Science update, 16, Aug, 2002.
- 3) 「ゼラチンから軟骨—北大、人工軟骨に応用へ」, 日本経済新聞, 2003年5月26日

- 4) 「動物たんぱくで人工筋肉作製」, 日経産業新聞, 2003年5月28日
- 5) “Tough Gels”, *Science*, Editors' choice, 301, 1019(2003).

研究課題別評価

1 研究課題名: ナノ力学理論の開発と力学的制御による表面機能発現

2 研究者氏名: 佐々木 成朗

3 研究の狙い:

ナノ構造体(固体表面上に組織化される薄膜や原子・分子鎖)は、外場により容易に変形して物性が変化し、新たな機能を発現する。そこで本研究では外場の例として「力」を考え、表面・界面ナノ構造の力学的挙動を第一原理的電子状態計算、古典的分子動力学計算を併用して明らかにし、ナノサイエンスの基礎としての「ナノ力学」理論の構築を目指す。具体的には(1)ナノマシンの創出、(2)ナノ加工技術の確立を柱に据えて研究を進めた。

本研究で提案されるナノ力学理論は従来の固体物性論の枠にとどまらない新しい理論的枠組みであり、21世紀のナノテクノロジーの指導原理を与える事が期待される。ナノサイズの摩擦機構、探針-表面間相互作用、金属吸着半導体表面の動力学といった諸問題の解明を通して、理論の立場から有用な機能を示す表面の力学的制御・加工法の理論的提案を狙った。

4 研究成果:

(1) ナノマシンの創出

ナノマシンに関する重要な要素技術として、潤滑系が考えられる。ナノサイズの物体では、物体サイズに対する相互作用力の影響が極めて大きくなるため、容易に駆動することは困難である。そこで相互作用を小さくするような、化学的に安定なファンデルワールス力で相互作用を行う炭素材料の組み合わせによる潤滑系を考えた。

① グラファイト/ C_{60} /グラファイト系 ~ 動摩擦ゼロの超潤滑 C_{60} 分子ベアリング

本研究では、グラファイトの超潤滑に着目し、グラファイト薄膜シートでフラーレン C_{60} の単層膜をはさんだシステムを検討した結果、これが動摩擦ゼロの超潤滑システムになることを、実験研究者との共同研究により世界で初めて発表した。同時に熱揺らぎの効果を取り入れてエネルギー極小経路を実現する「ステップ回転モデル」の概念を提唱した。これは C_{60} 単分子の動力学に着目した「単分子ベアリング描像」と言える。グラファイトシートを動かすと、 C_{60} 分子とグラファイトシートの上にある炭素の六員環が AB 積層を保持するよう、ナノサイズの歯車(ナノギア)としてかみ合っ動作し、 C_{60} が「分子ベアリング」として転がる様子は、我々が日常体験する歯車や転がり摩擦の概念とのアナロジーがあるため理解しやすい。

グラファイト/ C_{60} 単層薄膜/グラファイト系のポテンシャル場を解析した結果、グラファイト- C_{60} 単層膜間の距離を変えるとポテンシャル場の形状や安定点の位置が変化することが分かった。距離の変化は荷重の変化に対応するため、薄膜の搬送特性に著しい荷重依存性が見出された。この特性を利用した制動制御技術への展開が期待される。

② グラファイト/グラファイト系

摩擦力学実験の解析から、グラファイト薄膜は AB 積層を保ちながら stick-slip 運動を示す事が示唆された。測定された摩擦力と slip 運動を行う際のエネルギー障壁の値から、フレークの有効接触半径 0.856nm を見積もる事が出来た。

③ グラファイト系

グラファイト表面上の単突起摩擦を調べ、実験の力曲線から評価出来る水平方向硬さを、探針自体の変形を取り入れたモデルで説明出来た。走査時に探針の変形が起こる事は既に多くの研究者に指摘されているが、実験結果と対比させて定量的にその重要性を示したのは初めてである。

(2) ナノ加工技術の確立

非接触原子間力顕微鏡(NC-AFM)による操作技術のシミュレーションの精密計算技術を確立し、各種プローブおよび条件下にてシミュレーションを行った。

① 化学的に活性な Si(111)プローブおよび不活性な水素吸着プローブ

探針先端に Si が露出している活性 Si(111)探針で、Si(111) $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$ -Ag 表面を走査する場合の非接触原子間力顕微鏡像を計算したところ、6.2K で測定された低温 AFM 実験の像のパターンを非常に良く再現した。また Si 探針を表面に接近させると探針の Si 原子と表面 Ag 原子間に強い凝着が生じ、結合が生成する事を見出した。

更に探針先端を水素で終端した不活性 SiH₄ 探針を Si(111) $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$ -Ag 表面上で走査した時の極低温非接触AFM像の計算を行ったところ、探針の接近に伴い像のパターンが可逆的に変化する現象を発見した。実際の極低温実験でも同様の傾向が観察されており、実験を予測する事に成功した。

② 試料表面のナノ力学効果の温度依存性

Si 探針と Si(111) $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$ -Ag 表面との間に働く相互作用力の密度汎関数法計算を行ったところ、温度の変化により、表面吸着銀原子の熱揺らぎ特性が変化するため、高温、常温、低温で探針が受ける相互作用が顕著に変化する事が明らかにされた。高温では完全にランダムな揺らぎ、常温では IET 相の一方に重みのついた揺らぎ、低温では揺らぎのピン止めを示す結果が得られた。

③ 非接触 AFM 多突起探針モデル

非接触原子間力顕微鏡の多突起探針効果を調べた。単突起計算の結果を重ね合わせる事により、多突起探針による半導体表面の非接触 AFM 像を世界で初めて計算した。その結果従来説明のついていなかった Si(111) $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$ -Ag 表面の実験例の一つを新たに説明する事に成功した。

5 自己評価:

ナノテクノロジーにおける表面ナノ構造体の力学的効果に関する議論はこれまで皆無であったが、本研究のいくつかのテーマが元になり、その重要性を世間にアピールする結果が得られたと考えている。例えば、(1)ナノマシン・C₆₀ ペアリング系のダイナミクス概念は世界最小のペアリングであり、フラーレンを用いる人工ナノマシンとしては世界初の提案でもあるため、世界各国の雑誌や日本の雑誌、新聞でも紹介され、学会でも多く話題に挙げられている。本研究の結果はエネルギーを効率的に伝達する潤滑剤の開発につながり、省エネルギーをキーワードとして環境・エネルギー問題からバイオ、医療技術まで多分野へのインパクトのある研究である。一方 (2)ナノ加工・原子間力顕微鏡の探針効果の研究は、他グループの追従を許さない効率的な大規模 AFM 像シミュレーション法の確立につながり、その計算結果は多くの雑誌の表紙を飾っている。

ナノテクノロジーへの応用を目的としたナノサイズ構造体の制御の基礎を理論的に作るという野心的なテーマであり、当初は摩擦、走査プローブ法の二点からのアプローチでプロジェクトが収束するかどうか不安があったものの、ナノマシン、ナノ加工というより広い観点から本質的にまとめられるきっかけが得られたと考えている。方向付けが出来た。しかしこれらを有機的に結合して機能を引き出す指導原理を系統的にまとめるまでは及ばなかったため、さきがけでの成果を元に新しい理論体系を構築したい。

6 研究総括の見解:

佐々木成朗研究員は原子配列に対する熱振動効果を理論的に推論することに成功した。極低温での熱振動抑制に関しても構造予測し、実験値との一致を示したことは高く評価される。また、Graphite/フラーレン、インターカレーション系では摩擦力がゼロとなることをシミュレーションで見出したことも興味深い。応用面での具体例が期待される。

7 主な論文等:

原著論文 6 編

- 1) K. Miura, D. Tsuda, **N. Sasaki**, "Superlubricity of C₆₀ Intercalated Graphite Films", E-Journal of Surface Science and Nanotechnology, **3**, 21-23(2005).

- 2) S. Kaymiya, D. Tsuda, K. Miura, **N. Sasaki**, "MoS₂(0001)/MoO₃/(010)/MoS₂/(0001) friction-reducing system", Wear **257**, 1133-1136 (2004).
 - 3) **N.Sasaki** and K. Miura: "Key Issues of Nanotribology for Successful Nanofabrication - From Basis to C₆₀ Molecular Bearings", Jpn. J. of Appl. Phys. **43**, 4486-4491 (2004).
 - 4) K. Miura, **N. Sasaki** and S. Kamiya: "Friction of graphite", Phys. Rev. B **69**, 075420-075428 (2004).
 - 5) K. Miura, S. Kamiya and **N. Sasaki**: "C₆₀ Molecular Bearings", Phys. Rev. Lett. **90**, 0555091-0555094 (2003).
- ※本論文は、<http://news.nanoapex.com/>(世界のナノテクノロジーのトピックスを紹介する HP)のフラーレン部門で紹介され、読まれた回数が2004年4月の段階でベスト3に入った。
- 6) S. Furuya, Y. Gohda, **N. Sasaki**, and S. Watanabe: "Ab initio Calculation of the Electric Properties of Al Atomic Chains under Finite Bias Voltages", Jpn. J. Appl. Phys. **41** (2002) L989-L991.

特許 1 件

- 1) **佐々木成朗**、高橋忠孝「動的モード原子間力顕微鏡の振動シミュレーション方法、シミュレーションプログラム、シミュレーションプログラムを記録した記録媒体及び動的モード原子間力顕微鏡探針の振動シミュレータ」、特願 2004-321591 (2004)

著書 7 編

- 1) **佐々木成朗**、塚田捷、「実戦ナノテクノロジー 走査プローブ顕微鏡と局所分光」河津璋 編、(株)裳華房 第2章「2.3 力学分光の理論」、印刷中 (2005).
- 2) **佐々木成朗**、三浦浩治、「ナノマテリアルハンドブック」、(株)エヌ・ティー・エス 第1章 ナノテクノロジー総説、第6節 力学物性「1. ナノトライボロジー」51-59(2005).
- 3) **佐々木成朗**、塚田捷、「複雑現象工学～複雑系パラダイムの工学応用」市川直樹 編、プレアデス出版 5.2章「原子間力顕微鏡に現れるナノと複雑系の物理」281-296 (2005).
- 4) **佐々木成朗**、「極微な力で拓くナノの世界 — 原子・分子のナノ力学最前線」(株)クバプロ「パネルディスカッション: 理論研究の現状」175-193 (2004).
- 5) M. Tsukada, **N. Sasaki**, S. Watanabe, M. Gauthier, and K. Tagami, "Theory of Non-contact Atomic Force Microscopy", "Non-contact Atomic Force Microscopy - NanoScience and Technology Series" (Springer-Verlag), Eds. S. Morita, R. Wiesendanger and E. Meyer, Ch.15, 257-278 (2002).
- 6) 塚田捷, **佐々木成朗**、「原子・分子のナノ力学」森田清三編, 丸善 2.9 章「非接触原子間力顕微鏡の理論的な基礎」51-65, 10 章「半導体を中心としたナノ力学理論」170-188 (2003).
- 7) 塚田捷, **佐々木成朗**、「理論と測定原理」,「ナノテクノロジーのための走査プローブ顕微鏡」2 章, 9-28, 日本表面科学会編, 丸善株式会社、表面分析技術選書 (2002).

解説 19 編

- 1) **佐々木成朗**「特集 I ナノテクノロジー: ナノマシンとトライボロジー」、月刊トライボロジー vol.13、16-18 (2005).
- 2) **佐々木成朗**「HEADLINE REVIEW 摩擦の原子論 — ナノトライボロジーとは何か —」、技術総合誌 OHM vol.92、10-11 (2005).
- 3) **佐々木成朗**「ナノサイズ力学の研究 — 作って動かす基本原理 —」、表面科学 **25**、780-786 (2004).
- 4) **佐々木成朗**「原子間力顕微鏡シミュレータ — ナノ力学の評価ツール」、材料の科学と工学 第 **41** 巻 5 号, 246-251 (2004).
- 5)-11) 三浦浩治, **佐々木成朗**: 連載講座「ナノトライボロジー ナノテクノロジーの新時代における基盤技術(1)-(3)、(6)-(9)」
 - ・機械の研究 第 **56** 巻 6 月号 (1), 681-684(2004).
 - ・機械の研究 第 **56** 巻 7 月号 (2), 789-792(2004).
 - ・機械の研究 第 **56** 巻 8 月号 (3), 880-884(2004).

- ・機械の研究 第 56 巻 11 月号 (6), 1189-1194(2004).
- ・機械の研究 第 56 巻 12 月号 (7), 1271-1275(2004).
- ・機械の研究 第 57 巻 1 月号 (8), 47-50(2005).
- ・機械の研究 第 57 巻 2 月号 (9), 282-286(2005).
- 12)-13) **佐々木成朗**,三浦浩治:連載講座「ナノトライボロジー ナノテクノロジーの新時代における基盤技術(4)-(5)」
 - ・機械の研究 第 56 巻 9 月号 (4), 1001-1006(2004).
 - ・機械の研究 第 56 巻 10 月号 (5), 1076-1080(2004).
- 14) **佐々木成朗**,三浦浩治:「C₆₀ 分子ベアリングの開発」日本機械学会誌 vol.107, p.62 (2004).
- 15) **佐々木成朗**, 塚田捷:「非接触原子間力顕微鏡における摩擦の物理」トライボロジスト 49 巻, 460-465 (2004).
- 16) 三浦浩治, **佐々木成朗**:「ナノ構造体の滑り・回転・転がり運動が拓く摩擦と超潤滑」固体物理 39 巻 388-398 (2004).
- 17) 三浦浩治, **佐々木成朗**:「分子ベアリングによる動摩擦ゼロの超潤滑」日本物理学会誌 52 巻, 907-910 (2003).
- 18) **佐々木成朗**:「SPM におけるナノマニピレーション」,月刊「トライボロジー」11 巻, 48-50 (2003).
- 19) 塚田捷, **佐々木成朗**, 田上勝規:「非接触モード原子間力顕微鏡の理論」, 固体物理 38 巻 4 号, 257-268 (2003).

プレス発表 15 件

- 1) 愛知教育大と成蹊大 摩擦ゼロの炭素系超潤滑物質を開発
(日経ナノビジネス 2005 年 2 月 14 日号、リサーチフラッシュ pp.9 -10)
- 2) 世界初、摩擦ゼロの超潤滑システムを開発 ナノマシン実現への難関を突破
(JST 基礎研究最前線 No.5 2004 年 4 月号, pp.12-13)
- 3) ナノ設計の理論 ～ナノマシン・ナノ加工の力学～
(文部科学省 Japan Nanonet Bulletin 第 54 号 2004 年 2 月 17 日)
- 4) 非接触 AFM 像 原子レベルで解析 成蹊大と東大 観察前の予測も可能
(日刊工業新聞 9 月 8 日 5 面)
- 5) 世界初、摩擦ゼロの超潤滑システムを開発 ナノマシン実現への難関を突破
(JST基礎研究最前線 No.5 2004.4, pp.12-13)
- 6) 愛教大の三浦浩治教授ら、世界最小のベアリング実現
(週刊ナノテク 10 月 20 日号 p.26)
- 7) 100 万分の 1 ミリ ベアリング実現 炭素分子「C₆₀」で
(朝日新聞 8 月 18 日 夕刊 2 面)
- 8) C₆₀ のベアリング ナノマシンの実現に不可欠といわれた技術が実現
(日経サイエンス 8 月号, p.11)
- 9) 摩擦ゼロに近いベアリング
(日本経済新聞 7 月 7 日 朝刊 23 面)
- 10) 動摩擦ゼロの分子ベアリング 愛知教育大と成蹊大が開発
(日刊工業新聞 6 月 11 日 4 面)
- 11) ナノ分子「フラーレン」で摩擦ゼロ 極小マシンの壁に風穴
(東京新聞 6 月 10 日 朝刊 24 面, 同じ記事が中日新聞 6 月 10 日 夕刊 5 面に掲載)
- 12) 分子ベアリングで超潤滑実現
(科学新聞 5 月 23 日 1 面)
- 13) Micro-Machine Lube Job
(Discover Magazine 5 月号, May 2003)

- 14) Fullerenes Add Motion to Micromachines
(Materials Research Society Bulletin 28 巻 4 月号, pp.254-255)
- 15) Friction-free bearing
(Materials Today 3 月号, p.10)

国際会議 9 件 (招待講演 4 件)

- 1) **N. Sasaki**:「Theoretical Study of Mechanics and Friction of Nanostructures on the Surface」
International Symposium on Nano-organization and Function, Tokyo Institute of Technology,
Tokyo, Japan, 2004 年 11 月 12 日 (招待講演).
 - 2) **N.Sasaki** and K. Miura: "Key Issues of Nanotribology for Successful Nanofabrication - From
Basis to C60 Molecular Bearings" , The 11th International Colloquium on Scanning Probe
Microscopy - ICSPM11, Shizuoka, Japan, 2003 年 12 月 12 日 (招待講演).
 - 3) **N. Sasaki**:「First-Principles Study of Tip Effects on Si(111) $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$ -Ag Surface Structure and
Its NC-AFM images」*Japan-Germany Joint Seminar - the 1st research meeting of FRC project
for nanomechanics and nanoelectronics*, Osaka Univ., Japan, 2002 年 7 月 22 日 (招待講演).
- 他

国内会議 69 件 (招待講演 25 件)

- 1) **佐々木成朗**:「Energy Dissipation in Dynamic AFM」第 3 回ナノプローブ研究会, 新世代研究所,
2005 年 3 月 17 日 (招待講演).
 - 2) **佐々木成朗**,三浦浩治:「分子ベアリングによる動摩擦ゼロの超潤滑」
The workshop for young researchers on "New Trends in Condensed Matter Theory"
東大物性研, 2004 年 2 月 19 日 (招待講演).
 - 3) **佐々木成朗**:「大学と科学」公開シンポジウム 極微な力で拓くナノの世界—原子・分子のナノ
力学最前線— パネルディスカッション: 基調講演「理論の現状と将来」, 仙台市情報・産業プ
ラザ, 2003 年 11 月 22,23 日 (招待講演).
- 他

研究課題別評価

1 研究課題名: バイオインターフェイスにおいて組織化された水分子の機能

2 研究者氏名: 田中 賢

3 研究の狙い:

医療デバイスは血液や組織液などに直接触れるため、異物反応がなく、血液適合性および組織適合性など生体適合性をもつ材料が要求される。医療デバイスが使用される環境はウェットであり、生命現象の反応場となっている水分子に着目すると、この水分子はタンパク質や細胞の接着形態や機能発現の場を形成しており、この水分子のクラスター構造やダイナミクスが医療用デバイス材料に要求される生体適合性に影響している。本研究では、フェムト秒パルス赤外レーザーを組み込んだ多光子励起顕微分光装置を開発し、生きた細胞との界面で組織化された生体分子(高分子鎖-水分子-タンパク質ポリペプチド鎖-細胞膜表面糖鎖)の多元構造の解明を目指す。

4 研究成果:

① 生体適合性発現メカニズムの解明

Poly(2-methoxyethyl acrylate)(PMEA)表面は、細胞に対する活性化が軽微であり、表面に吸着したタンパク質の構造変化が小さいことを明らかにした。その理由として、PMEA が有する特異的な水の構造が重要な役割を果たしていることを見いだした。

具体的には、示差走査熱量計(DSC)を用いて、飽和含水した PMEA 中の水の構造を調べたところ、 -100°C からの昇温過程で水のコールドクリスタリゼーション(CC)に由来するシャープな発熱ピークが -40°C 付近に観測された。また、CC の出現直後に六方晶の氷晶の形成が X 線回折より観測されたことから、この低温結晶化はアモルファスの氷から結晶性の氷への転位であることを見いだした。一方、生体適合性の悪い高分子ではこのような水の存在は認められなかった。PMEA 類似体や共重合体について、DSC の各転位における熱量から、高分子中に存在する水を①自由水： 0°C 付近で融解する水、②中間水： -40°C 付近で低温結晶化する水、③不凍水： -100°C においても凍結しない水と定義し、それぞれの量を求め、生体適合性との相関性を調べたところ、CC として観測される中間水量が細胞接着/活性化に強く影響を及ぼしていることを見いだした。CC は生体適合性高分子の代表例であるコラーゲン、細胞膜表面に水和層を形成する役割を担っている多糖にも共通して観測されたことから、PMEA 表面の水はタンパク質や細胞表面の水の構造と類似していると考えられる。

② 生体適合性高分子表面の水の構造

中間水の構造や運動性を明らかにするために、フェムト秒パルス赤外レーザーを組み込んだ多光子励起顕微分光装置の開発を行った。幅広い波長の光をプローブとして、界面選択的な分光法である2光子励起顕微ラマン分光や和周波発生分光などの新手法と、NMR, 振動分光, X線散乱, 誘電緩和, 表面自由エネルギーなど従来法による測定結果から、(1)高い分子運動性を有する PMEA 鎖に弱く束縛され、低温下でも分子運動性の高い水の存在、(2)中間水は自由水と不凍水との界面に存在、(3)中間水は高分子表面にも安定に存在することが示唆された。

特に、生体適合性高分子の含水量(不凍水、中間水、自由水の各含水量)を変えた表面に対して、赤外パルス励起光(波長 $650\sim 1100\text{ nm}$)からの散乱光を分光する2光子励起顕微ラマン分光(Z軸スキャン)により、高分子表面の水の構造を解析した結果、PMEA 表面に含水した水の O-H 伸縮振動ピークは、より束縛を受けていないと考えられる $3400/\text{cm}$ にピークを示し、生体適合性の優れた表面は水分子の構造の破壊効果が小さいことが明らかになった。

③ 新規生体適合性高分子の設計・合成

PMEA と同様の中間水を有する高分子を新規合成した。poly(tetrahydrofurfuryl acrylate)(PTHFA)、poly [2-(2-ethoxyethoxy)ethyl acrylate] (PEEA) とその類似体表面は、表面が血液細胞をはじめ各種生体適合性マーカーに対し活性化が低く、優れた生体適合性を示すことを

見出した。また、PEEA およびその類似体は下限臨界共溶温度(LCST)を有することがわかり、生体適合性と温度応答性を併せ持つ高分子の合成に成功した(国内外特許出願済み)。

④ 自己組織化パターン材料による新しいバイオインターフェイス

高分子溶液を高湿度下でキャストするだけで、孔径の均一な多孔質薄膜が様々な生体適合性材料で作製できることを利用して、その多孔質薄膜の3次元構造制御に成功した。体内埋め込み型治療器具表面にもこの膜を作製することができた。多孔質薄膜表面に粘着テープを張って剥離することによって、剥離破断面(テープ側と基板側)にナノピラー構造を作製した。ナノピラー構造の前駆体となる多孔質薄膜の材質、孔径、膜厚や剥離方法を変えることで、突起の長さや太さ、間隔の制御が可能であった。

また、特定の孔径の多孔質薄膜上で、血管系、消化器系、神経系などの正常細胞の増殖性や機能を上昇させることに成功した。一方、胆管由来がん細胞を、特定の孔径の多孔質薄膜上で、培養したところ、がん細胞の増殖性・細胞死を抑制できることを見いだした。

5 自己評価:

3年間の研究を通じて、これまで不明であった生体適合性発現のメカニズム解明と新たな分子設計と合成にチャレンジすることができた。熱分析で観測される特異的な水の構造を足がかりとして、バイオ界面で組織化された水および生体分子の多元構造と高分子鎖や水分子の構造・運動性を調べることができた。界面選択的な手法である2光子分光と従来の分析技術による高分子表面の水の構造解析と中間水を有する新規高分子の合成により、「自由水と不凍水の間の特性を有する中間水の存在が重要である」という仮説の実証を行うことができたと考えている。界面の水の構造は細胞の接着性—非接着性にも深く関係している。極めて複雑・難解な生体と材料との相互作用を明らかにするために、領域内共同研究ができたのは大きな財産となった。

今後は、本仮説をどこまで一般論にできるか、中間水の構造や分子運動性のさらなる解明とそれが形成されるメカニズム(本質)の解明が課題である。また、新規分子設計指針(水の構造:中間水)に基づいて合成した生体適合性高分子と自己組織化を利用したパターン化技術を融合し、カテーテルやステントなどのバイオメディカルデバイスの表面に最適な物性(潤滑性、抗血栓性、組織適合性)を付与する技術の開発も行っていきたい。さらに、孔径の均一な多孔質薄膜によるがん細胞の増殖や細胞死制御とそのメカニズムについて詳細に検討し、副作用のない新しい再生医療用デバイスやがん治療デバイスの開発設計指針の提案も目指したい。

以上、本研究により得られた分子設計と自己組織化による微細加工の融合により、高齢化社会を支える再生医療技術への展開を図りたい。細胞・生体分子と材料表面の詳細な解析、相互作用の本質解明により、安全性が高く、医療事故がなく、患者の生活の質、病後の生活の質(QOL)を向上し、健やかな生活が可能になるような製品開発に結びつく材料開発を行いたい。

6 研究総括の見解:

田中賢研究員は、バイオインターフェイスでの組織化された水分子の機能について、生体適合性をもつ材料開発の観点から明確にしている。特に、界面での水の構造と生体適合性との関係について、明らかにしており、この結果より、今後の材料開発の指針につながる事が期待される。

7 主な論文等:

原著論文

- (1) M. Tanaka, A. Mochizuki, N. Ishii, T. Motomura, T. Hatakeyama, Study on Blood Compatibility of Poly(2-Methoxyethylacrylate) — Relationship between Water Structure and Platelet Compatibility in Poly(2-methoxyethylacrylate-co-2-hydroxyethylmethacrylate) — , *Biomacromolecules*, **3**, 36-41, 2002.
- (2) M. Tanaka, A. Mochizuki, T. Shiroya, T. Motomura, K. Shimura, M. Onishi, Y. Okahata, Study on Kinetics of Early stage Protein Adsorption and Desorption on Poly(2-methoxyethylacrylate)

- (PMEA) Surface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **203**, 195–204, 2002.
- (3) K. Sato, M. Tanaka, K. Hasebe, M. Takebayashi, K. Nishikawa, T. Kawai, M. Matsushita, S. Todo, M. Shimomura, Preparation of the honeycomb patterned porous film of biodegradable polymer for tissue engineering scaffolds, *International Journal of Nanoscience*, **1**(5,6) 689–693, 2002.
 - (4) M. Ide, T. Mori, K. Ichikawa, H. Kitano, M. Tanaka, A. Mochizuki, H. Oshiyama, W. Mizuno, Structure of Water Sorbed into Poly(MEA-*co*-HEMA) Films As Examined by ATR-IR Spectroscopy, *Langmuir*, **19**, 429–435, 2003.
 - (5) Y. Miwa, M. Tanaka, H. Oshiyama, A. Mochizuki, Study on structure of water in poly(2-methoxyethylacrylate)(PMEA) and poly(2-hydroxyethylmethacrylate) (PHEMA) by ²H solid-state NMR., *Biomaterials-Seitaizairyo (J. Jpn. Soc. Biomater.)*, **21**(2), 143–149, 2003.
 - (6) S. Ye, S. Morita, G. Li, H. Noda, M. Tanaka, K. Uosaki, M. Osawa, Interfacial Molecular Structure Changes in Poly(2-methoxyethyl acrylate) Thin Films Induced by Absorption of Bisphenol A. An Infrared and Sum Frequency Generation (SFG) Study, *Macromolecules*, **36**, 5694–5703, 2003.
 - (7) H. Yabu, M. Tanaka, K. Ijiri, M. Shimomura, Preparation of honeycomb patterned polyimide films by self-organization, *Langmuir*, **19**, 6297–6300, 2003.
 - (8) M. Tanaka, Blood Compatibility of Poly(2-methoxyethyl acrylate) – Design of Novel BioInterfaces, *Koubunshi Ronbunshuu*, **60**(8), 415–427, 2003.
 - (9) M. Tanaka, A. Mochizuki, Effect of water structure on blood compatibility—Thermal analysis of water in poly(meth)acrylate—, *J. Biomed. Mater. Res.* **68A**(3), 684–695, 2004.
 - (10) G. Li, S. Morita, S. Ye, M. Tanaka, M. Osawa, Bisphenol QCM and IRRAS Characterization of Bisphenol A Absorption in the Poly(acrylate) Thin Films, *Anal. Chem.* **76**, 788–795, 2004
 - (11) M. Tanaka, Design of Novel BioInterfaces (I) –Blood compatibility of poly(2-methoxyethyl acrylate)–, *Bio-Medical Materials and Engineering (Bio-Med. Mater. Eng.)*, in press (2004).
 - (12) M. Tanaka, M. Takebayashi, M. Miyama, J. Nishida, M. Shimomura, Design of Novel BioInterfaces (II) –Fabrication of self-organized porous polymer film with highly uniform pores–, *Bio-Med. Mater. Eng.*, in press (2004).

その他国際会議議事録に 15 件

総説・解説・著書

- (1) 田中 賢, 竹林允史, 深山真史, 西川和孝, 西田仁, 佐藤雄久, 長谷部清, 大久保尚, 蒲池浩文, 河合朋明, 松下通明, 藤堂省, 西川雄大, 下村政嗣, 新しいバイオメディカルインターフェース—高秩序多孔質膜の自発的形成—, *化学工業*, **53**(12), 901–906, 2002.
- (2) 田中 賢, 化学のフロンティア 2002—はばたけ若き研究者たち, 新規生体適合性高分子材料—次世代医療を切り拓くバイオインターフェース—, *化学と工業*, **55**(2), 149–152, 2002.
- (3) 田中 賢, 人工臓器を支える高分子材料—ポリ(2-メトキシエチルアクリレート)の生体適合性発現機構—, *未来材料*, **2**(10), 2–5, 2002.
- (4) 田中 賢, 高秩序自己組織化薄膜による細胞の分化機能制御, *Advanced Life Science*, **2**, 56–57, 2003.
- (5) 田中 賢, 竹林允史, 下村政嗣, 特集ナノテク／バイオなど次世代注目技術と微細加工機器・システム 自己組織化によるナノマテリアル, *M&E*, **1**(8), 190–195, 2003.
- (6) 田中 賢, 自己組織化材料とバイオマテリアル, *バイオマテリアル—生体材料—*, **21**(4), 337, 2003.
- (7) M. Matsushita, H. Kamachi, H. Ohkubo, S. Matsumoto, T. Morita, S. Kobayashi, K. Sato, M.

Tanaka, M. Shimomura, S. Todo, Reconstitution of liver tissue through tissue engineering, *Surgery Frontier*, **10**(3), 21-24, 2003.

- (8) 田中 賢, 一高度先端治療デバイスー人工臓器の表面を生体適合化するマテリアル, *BIO INDUSTRY*(バイオインダストリー), **20**(12), 59-70, 2003.
- (9) 田中 賢, 特集/次世代科学技術の展望 次世代医療を切り拓くバイオメディカルインターフェース, *化学工業*, **55**(1), 56-61, 2004.
- (10) 田中 賢, 世代別座談会 高分子を語る, *高分子*, **53**(1), 1-12, 2004.
- (11) 田中 賢, 抗血栓性高分子表面と水の構造, *高分子*, **53**(3), 157, 2004.
- (12) 田中 賢, 下村政嗣, 自己組織化によるナノマテリアルの創成と応用, 第11講, ハニカム構造フィルムのバイオメディカル応用, NTS, 275-292, 2004.
- (13) 田中 賢, 下村政嗣, バイオナノエンジニアリングマテリアル, 自己組織化パターン表面の創製と機能, 第1編, 第8章, pp72-84, 2004. 監修 石原一彦, フロンティア出版

特許

田中 賢, 伊土直子, 下村政嗣, 温度応答性と生体適合性を併せ持つ高分子, 特願 2003-091281. (および PCT 出願)

他 10 件

招待講演

- (1) M. Tanaka, Blood compatibility of poly(2-methoxyethyl acrylate) - Design of novel bio-interfaces -, Second International Conference on New Biomedical Materials: Basic and Applied Studies, 2003. 5-8 April, 2003 (Cardiff, UK)

他 27 件

その他一般発表 50 件

受賞

- (1) 2002 春季第 47 回応用物理学会 第 12 回応用物理学会「講演奨励賞」受賞(2002 年 3 月)

規則的な孔径を有する自己組織化多孔性膜を用いたバイオインターフェイス

田中 賢, 竹林 允史, 下村政嗣

- (2) 第3回日本再生医療学会総会, 「優秀演題」受賞(2004 年 6 月),

自己組織化による血管系組織再生用スキャフォールドの作製

田中 賢、高山あい子、下村政嗣

他 4 件

研究課題別評価

1 研究課題名: 脂質-膜タンパク質ドメインの制御によるナノプラントの構築

2 研究者氏名: 出羽 毅久

3 研究の狙い:

生体膜では、特定の脂質成分が動的平衡によりドメイン(マイクロ相分離構造)を形成し、そこで協同的に機能する複数のタンパク質群が動的に集積化されていると考えられている。もし、ある機能(エネルギー生産や酵素反応など)に関連する一連の膜タンパク質群を脂質ドメイン上の“適材適所”に機能的組織化することができれば、その作用機構の解明のみならず、高効率な多段階触媒反応系「ナノプラント」を構築しうる技術の芽となると期待できる。しかし、膜タンパク質はその高い疎水性の為にランダムな自己会合体を形成しやすく、人工的に多成分の膜タンパク質を脂質膜中で組織化することは、現在の所、極めて困難である。本研究は、脂質が形成するドメインに着目し、複数の膜タンパク質からなる集合体のドメイン中での機能的組織化を目的とする。そのためには、膜タンパク質間および脂質-タンパク質間相互作用を制御する必要があり、そのアプローチとして、脂質と膜タンパク質をハイブリッド化させ、特定の脂質ドメイン中への膜タンパク質の組織化を行う。さらに多成分の膜タンパク質の脂質ドメイン中での組織化とその機能(触媒反応等)の検討へと展開し、ナノプラント構築の可能性を探る。

4 研究結果:

(1) 大腸菌発現系を用いたアンテナ系膜タンパク質の発現と脂質二分子膜中での組織化

・ ジスルフィド化リン脂質による脂質ドメイン選択的な疎水性ポリペプチドの組織化

膜タンパク質として、光合成細菌のアンテナ系膜タンパク質(疎水性ポリペプチド)を用いた。このポリペプチドは光合成色素(バクテリオクロフィル類)と複合体を形成することにより、色素の吸収帯が著しく長波長シフトする。このポリペプチドの特性に注目し、大腸菌発現系によりポリペプチドの末端領域にシステインを導入したミュータントを作成し、ジスルフィド化リン脂質を用いて脂質-疎水性ポリペプチド間の相互作用を調節することにより脂質二分子膜中でのポリペプチド/色素複合体の形成能を検討した。その結果、ジスルフィド化リン脂質の流動性が高い(相転移温度が低い)膜中ほど複合体サイズは小さくなり、逆に、流動性の低い脂質中ではより大きな複合体形成が観測された。このことから、流動性の高いリン脂質とのジスルフィド架橋により、脂質二分子膜中におけるポリペプチド間相互作用を制御できることが示唆された。この結果を受け、上述のジスルフィド化リン脂質(液晶相)と低流動性リン脂質(ゲル相)の二成分相分離系からなる脂質二分子膜中でのポリペプチド/色素複合体形成を調べた結果、前者が形成する脂質ドメイン中に選択的に配置されていることを示す結果が蛍光エネルギー移動により示唆された。

・ 脂質-膜タンパク質(疎水性ポリペプチド)コンジュゲートの作成

上述のドメイン選択的な疎水性ポリペプチド(膜タンパク質)の組織化をさらに明確にするために、あらかじめポリペプチドとリン脂質をジスルフィド架橋したコンジュゲートを用いることを検討したが、単離精製が困難を極めた。そこで、大腸菌発現系により得られていた水溶性のマルトース結合タンパク質(MBP)との融合体を用いることにより、この問題点を克服することができた。(現在、大量合成、および脂質二分子膜への導入を検討中)

・ マルトース結合タンパク質(MBP)との融合体の予期せぬ複合体形成

MBP 部位は疎水性ポリペプチドに比べて分子量で約10倍(40kDa)の大きさを有する。しかし、この融合体は MBP の存在にかかわらず、疎水性ポリペプチド部位が光合成色素と複合体(二量体)を形成することがわかった。また、この二量体は脂質二分子膜中に導入可能であり、加水分解によりMBP部位を切除することが可能であることが見いだされた。

さらに、この立体的に大きな MBP の除去により膜中でポリペプチド／色素複合体がさらに会合することが見いだされた。ここで得られた知見は、水溶性の MBP により脂質二分子膜に対する疎水性ポリペプチドの方向性を制御しうる可能性を示している。(現在進行中)

(2)脂質-膜タンパク質ハイブリッドの脂質ドメインへの組織化と蛍光顕微鏡による観察

・ 非相容系脂質二分子膜のドメインの観察

巨大ベシクルおよびガラス基板上で二分子膜化させたものについて、脂質二分子膜などの界面観察に適した全反射照明による蛍光顕微鏡により、そのドメイン形成を確認した。その結果、特にカチオン性に表面処理したガラス基板上に二分子膜化させたものについて、大きさ約2~5 μm の明確な脂質ドメインが観察できた。

・ドメイン選択的な膜タンパク質(MBP 融合タンパク質)の組織化の観察

上述の MBP 融合タンパク質の蛍光ラベル化を行い、観察可能となった脂質ドメイン中に選択的に組織化される様子を全反射照明による蛍光顕微鏡により観察する(予定)。また、加水分解処理により MBP を切除し、ドメイン内で疎水性ポリペプチド部位が集合するプロセスを観察する(予定)。

4-2 (今後の予定) ナノプラントとしての可能性: 二成分系膜タンパク質(アンテナ複合体/光反応中心複合体等)の組織化と機能評価

これまで得られた結果から、アンテナ複合体を形成する疎水性ポリペプチドを脂質二分子膜の流動相ドメインに配置できることが分かってきた。本研究題目にある“ナノプラント”の構築のために、このドメイン中にアンテナ複合体と光反応中心複合体(RC)が共存するように配置させることを試みる。ドメイン内で組織化することにより光合成膜で行われている光収穫→電荷分離がより効率よく行われると期待する。また、異なるアミノ酸配列からなる疎水性アンテナポリペプチドを用いることにより、吸収/発光波長を変化させることが可能となる。そこで、二成分系アンテナ複合体間のエネルギー移動効率におよぼす脂質ドメインの効果も検討する。

5 自己評価:

研究の発展性:ここまで得られた成果から、ジスルフィド結合を有する脂質ドメインに膜タンパク質(疎水性ポリペプチド)を選択的に組織化する方法を部分的ではあるが確立することができた。対象とした膜タンパク質は光合成系のアンテナタンパク質であるので、この系を用いることにより、光反応中心複合体(膜タンパク質)をドメイン内に組織化することが可能となると期待できる。光合成の初期過程(光収穫、電荷分離、電子移動、ATP合成)に関与するタンパク質はすべて膜タンパク質である。これらが協同的に機能するプロセスを本研究の成果で得られた手法により脂質二分子膜系で組織化することにより、機構解明および人工系(ナノプラント)としての発展が期待できる。今のところ構造が明らかにされた膜タンパク質はほんの40~50例ほどであるが、今後ますますその数は増えるであろう。その際にも、本研究で得られた組織化の手法の有用性が発揮されると期待できる。

6 研究総括の見解:

出羽毅久研究員は、分子膜中へのタンパク質複合体の導入について検討を行い、膜の組成とタンパク質の組織化について明らかにしてきている。特に、光合成でのアンテナ膜タンパク質複合体に着目して、タンパク質複合体形成における膜ドメインの影響を分子レベルで可視化する手法を開発しおり、タンパク質の組織化と膜構造との関係について、より明らかになることが期待される。

7 主な論文等:

- 1) “Design and Expression of Cysteine(s)-bearing Hydrophobic Polypeptides and Their

Self-Assembling Properties with Bacteriochlorophyll *a* Derivatives as a Mimic of Bacterial Photosynthetic Antenna Complexes. Effect of Steric Confinement and Orientation of the Polypeptides on the Pigment/Polypeptide Assembly Process”, T. Dewa, T. Yamada, M. Ogawa, M. Sugimoto, T. Mizuno, K. Yoshida, Y. Nakao, M. Kondo, K. Iida, K. Yamashita, T. Tanaka, and M. Nango, *Submitted to Biochemistry*

- 2) “Effect of Lipid-polypeptide Interaction on Self-assembling Properties of Hydrophobic Polypeptide/Pigment as a Bacterial Light-harvesting Complex”, T. Dewa, M. Sugimoto, K. Yoshida, K. Yamashita, and M. Nango, *In Preparation for submitting to Biochemistry*
- 3) “Lipid-domain Selective Protein Assembly of a Hydrophobic Polypeptide/pigment”, T. Dewa, M. Sugimoto, K. Yoshida, K. Yamashita, and M. Nango, *In Preparation for submitting*
- 4) “Novel Polyamine-Dialkyl Phosphate Conjugates for Gene Carriers. Facile Synthetic Route via an Unprecedented Dialkyl Phosphate”, T. Dewa, Y. Ieda, K. Morita, L. Wang, R. C. MacDonald, K. Iida, K. Yamashita, N. Oku, M. Nango”, *Bioconjugate Chem.*,15, 824-830 (2004).

研究課題別評価

1 研究課題名: 自己組織化単分子膜を用いた DNA センサーの構築

2 研究者氏名: 中村 史夫

3 研究の狙い:

DNA は、4 つの塩基 (アデニン-チミン、シトシン-グアニン) の組み合わせによって遺伝情報を保存・伝達する「分子情報材料」としてとらえることができる。近年、DNA チップに代表されるように、DNA の塩基配列にコードされている遺伝情報の固体基板上での簡便かつ迅速な読みとりが世界的に盛んに行なわれているが、20 塩基対程度のオリゴマーにおいてさえ 1 塩基多型の効率的な検出 (1 塩基ミスマッチ検出) は未だ容易ではない。本研究では、固液界面での DNA の二重鎖形成 (ハイブリダイゼーション) に関する独自の研究成果に基づいて、さらに選択性の高い表面反応場の創製を進めるとともに、ハイスループットな DNA の新規検出法の開発を進めることを研究の目的とする。

4 研究成果:

① ブランチ型プローブ DNA を用いた DNA 自己組織化単分子膜の構築

3 つのプローブ部位を持つブランチ型プローブ DNA からなる DNA 自己組織化単分子膜を固体基板上に作製し、ターゲット DNA のハイブリダイゼーションを表面プラズモン共鳴法 (SPR) により観察した。すでに確立している方法に比べ、同じプローブ DNA の基板上の存在率で約 3 倍量のターゲット DNA の吸着が観察された。また、このブランチ型 DNA 単分子膜を用いることにより、一種類のプローブ DNA で複数種類のターゲット DNA を検出することが可能となる。

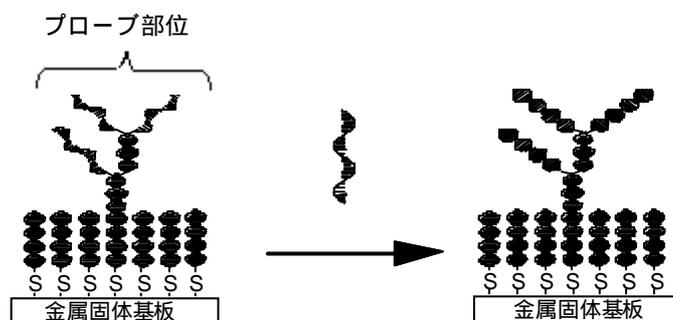


図1 ブランチ型 DNA 単分子膜を用いた DNA ハイブリダイゼーション

② 表面プラズモン顕微鏡 (SPR イメージャ) を用いたハイブリダイゼーションの多点同時観察と一塩基ミスマッチ検出

DNA 自己組織化単分子膜作製法により金基板上に様々な塩基配列を持つ DNA アレイを作製し、SPR イメージャによりハイブリダイゼーションの多点同時観察に成功した。また、この DNA アレイを用いて一塩基ミスマッチの検出に成功した。

③ ナノ粒子を用いた高感度バイオセンサーの構築

DNA 修飾した金ナノ粒子を作製し、この金ナノ粒子を用いてターゲット DNA の検出シグナルの増幅を試みた。(図2参照) ターゲット DNA をメディエーターとして、DNA 単分子膜上への金粒子の吸着挙動を SPR により観察した。この測定から、金ナノ粒子を用いることにより、ターゲット DNA のハイブリダイゼーション時のシグナル増幅が観察された。

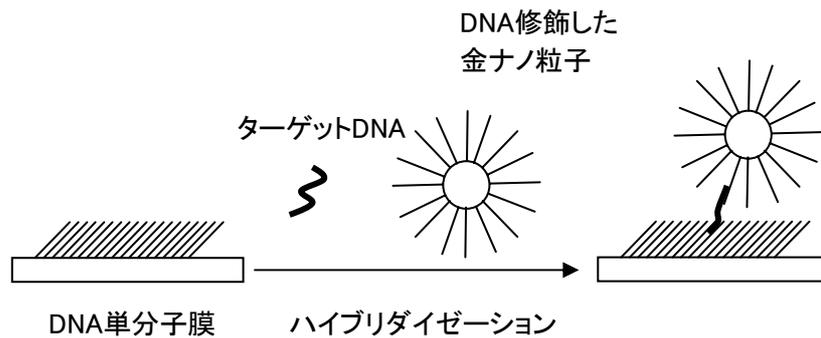


図2 金ナノ粒子を用いた DNA ハイブリダイゼーション

④プローブ DNA の表面被覆率を変化させることによるハイブリダイゼーションの最適化

これまでターゲットとして 20 塩基程度のオリゴ DNA を用いてきたが、さらに長鎖の DNA をターゲットとして用いるためには、プローブ DNA の表面被覆率を変化させることによるハイブリダイゼーションの最適化を図る必要がある。検討の結果、100 塩基のターゲット DNA においても、プローブ DNA の被覆率を制御することにより、高効率なハイブリダイゼーションの検出が可能であることが示された。

5 自己評価:

新規 DNA センサーの構築に際して重要な点として、1.新規 DNA 固定化法の確立、2.簡便な DNA アレイの作製法の確立、3.ハイブリダイゼーションの多点同時観察法の確立、4.検出シグナルの増幅の4点が挙げられる。本さがけプログラムの遂行により、これら4点を含むトータルシステムが構築できたことは有意義なことであり、このシステムを用いた DNA センサーへの展開が期待できる。また、DNA 自己組織化単分子膜と SPR イメージャと組み合わせることにより、当初の目的の一つである、DNA アレイを用いたハイスループットな塩基ミスマッチ検出に成功した。さらに、当初の予定にはない、新規ハイブリダイゼーション検出法を幾つか考案できたことは大きな収穫である。

6 研究総括の見解:

中村史夫研究員は、SRP 法による DNA ハイブリダイゼーションを観察し、DNA 修飾した金ナノ粒子を利用するなどして、高感度化を達成している。今後の実用化の促進を期待したい。

7 主な論文等:

論文

Langmuir, 19, 5823-5829 (2003), "Preparation of Self-Assembled Monolayer Containing Anthryl Groups toward Hybridization of Nucleotides", F. Nakamura, K. Mitsui, M. Hara, S. Kraemer, S. Mittler, and W. Knoll

Nano Letters, 3, 1083-1086 (2003) "Preparation of Branched DNA Self-Assembled Monolayer Toward Novel DNA Biosensors", F. Nakamura, E. Ito, Y. Sakao, N. Ueno, I. N. Gatuna, F. S. Ohuchi, and M. Hara

その他3報

特許

ハイブリダイゼーション用基板、この基板の製造方法及び使用方法 (理研・JSTさがけ)中村史夫・原正彦・林純子、特願 2002-095132

その他国内3件、海外1件

研究課題別評価

1 研究課題名: 氷内部および界面に存在する気体分子の拡散と組織化

2 研究者氏名: 深澤 倫子

3 研究の狙い:

南極大陸に存在する巨大な氷の結晶(氷床)は、過去数十万年の間に雪と共に堆積した様々な物質を保存しているため、過去の気候や地球環境についての情報源である。ところが、最近になって、氷床深層部で起こるクラスレート・ハイドレート生成に伴い、氷床内の大気分子の分布が著しく変化することが明らかになった(Ikeda *et al.*, *Geophys. Res. Lett.*, 26 (1999) 91)。この現象は、氷結晶中の分子拡散に起因すると考えられ、氷床氷から過去の大気組成の変動を解析する際に重大な影響を及ぼすことが予測された。しかし、氷結晶中の拡散は、非常に遅い現象であるため、それまでに観測された例がなく、物理的なメカニズムは全く不明であった。本研究の狙いは、ナノスケールレベルのミクロな視点から空気分子の挙動を観察することにより、氷中の分子拡散のメカニズムを解き明かすことにある。手法としては、主に分子動力学法を用いた。

4 研究成果:

(1) 氷結晶中の空気分子の拡散

空気分子(酸素、窒素、メタン、二酸化炭素分子)が氷格子中の安定サイトから隣接した安定サイトへ連続してホッピングする過程を計算することに初めて成功した。この結果から、氷中の空気分子の拡散のメカニズムが従来予測されていた格子間型ではなく、分子が氷格子中の水素結合を切断することによって結晶内を移動する全く新しい機構(「結合切断機構」と名付けた)であることを発見した。空気分子は、結合切断機構をとることで、氷結晶中を従来予測の数桁以上の速度で拡散することが分かった。

(2) 氷表面のダイナミクスと空気分子の溶解

分子動力学計算により、氷表面に存在する擬似液体層の構造とダイナミクスを調べた。この結果から、表面に存在する水素結合に寄与しないプロトンを持つ水分子の束縛回転振動と格子振動とのカップリングが、擬似液体層形成の要因であることを明らかにした。擬似液体層は、イオンを添加することにより厚さが増加し、気体分子の溶解を促進することが分かった。

(3) 氷界面における空気分子の拡散

本研究の対象である 200K 以上の高温領域では、氷界面は過冷却液体の構造をとる。本研究では、分子動力学計算により、過冷却液体中の空気分子の拡散を調べた。この結果、過冷却液体中の分子拡散の速度は、氷結晶中に比べて一桁程度大きいことが明らかになった。氷多結晶における界面の領域は、結晶領域との体積比にすると非常に微小である。結晶との拡散速度の違いが一桁しかないことから、氷多結晶における界面内の拡散の寄与は小さいと結論した。

(4) 極地氷床における空気分子の分布の時系列変化モデルの構築

上記(1)~(3)の成果を基に、氷床における空気分子の分布の変動をマクロな現象として記述する数理モデルを構築した。このモデルを用いて、42 万年間の分子分布の時系列変化を計算することに成功した。

5 自己評価:

本研究の最も大きな成果は、従来の固体内の分子拡散の分類には含まれない新たな分子拡散機構(「結合切断機構」と名付けた)を発見したことである。結合切断機構をとることにより、二酸化炭素やメタン等の温室効果気体が、従来予測よりも数桁早く南極氷床内部を拡散することが分かったことも重大な結果の一つであると考えられる。これらの成果を基に、今後、過去の大気組成を復

元する新たな古環境復元解析法の確立に発展させたいと考えている。また、本研究の成果、並びに開発した大規模計算の手法は、氷以外の様々な物質にも応用が可能であるため、幅広い材料研究の推進と発展に貢献できると期待している。例えば、本研究により発見した結合切断機構による分子拡散は、水素結合を持つ物質に特有の現象であると考えており、高分子材料に取り込まれた不純物についても同様の拡散が起こると予測している。結合切断機構による分子拡散は周囲の分子を再配置させるため、材料に新たな機能を発現したり、亀裂を形成したりする可能性がある。今後、分子拡散に着目することで、様々な材料の機能や耐久性の研究や新材料の開発に挑戦したい。

6 研究総括の見解:

深澤倫子研究員は、氷結晶中の空気分子拡散過程のシミュレーションにより、古代大気組成の解明を目指す研究に取り組んだ。これは、モデル化の重要性を示すユニークな研究といえる。ホッピングによる拡散は予想外であり、水分子の水素結合の切断・組み換え機構を提案するに至った成果は高く評価される。

7 主な論文等:

- (1) Tomoko Ikeda-Fukazawa, Shinichiro Horikawa, Takeo Hondoh, and Katsuyuki Kawamura: Molecular dynamics studies of molecular diffusion in ice Ih, *Journal of Chemical Physics* **117**, 3886-3896 (2002).
- (2) Tomoko Ikeda-Fukazawa and Takeo Hondoh: Behavior of air molecules in polar ice sheets, *Memoirs of National Institute of Polar Research* **57**, 178-186 (2003).
- (3) Takeo Hondoh, Hideki Narita, Akira Hori, Tomoko Ikeda-Fukazawa, Michiko Fujii, Hiroshi Ohno, Takayuki Shiraiwa, Shinji Mae, Shuji Fujita, Hiroshi Fukazawa, Taku Fukumura, Hitoshi Shoji, Takao Kameda, Atsushi Miyamoto, Nobuhiko Azuma, Yun Wong, Kunio Kawada, Okitsugu Watanabe, and Hideki Motoyama: Physical Properties of the Dome Fuji Ice Core, *Memoirs of National Institute of Polar Research* **57**, 63-71 (2003).
- (4) Tomoko Ikeda-Fukazawa and Katsuyuki Kawamura: Molecular dynamics studies of surface of ice Ih, *Journal of Chemical Physics* **120**, 1395-1401 (2004).
- (5) Tomoko Ikeda-Fukazawa, Katsuyuki Kawamura, and Takeo Hondoh: Diffusion of nitrogen gas in ice Ih, *Chemical Physics Letters* **385**, 467-471 (2004).
- (6) 深澤倫子: 南極の氷とマイクロの世界, *学術の動向* **103**, 70-71 (2004).
- (7) Tomoko Ikeda-Fukazawa, Katsuyuki Kawamura, and Takeo Hondoh: Mechanism of molecular diffusion in ice crystals, *Molecular Simulation* (in press).
- (8) Tomoko Ikeda-Fukazawa, Kenji Fukumizu, Kenji Kawamura, Shuji Aoki, Takakiyo Nakazawa, and Takeo Hondoh: Effects of molecular diffusion on paleo-atmospheric reconstruction from polar ice core, *Earth and Planetary Science Letters* (in press).
- (9) 深澤倫子: 分子シミュレーションが解き明かす南極氷床中の空気分子のダイナミクス, *分子シミュレーション研究会誌「アンサンブル」* (印刷中).
- (10) Tomoko Ikeda-Fukazawa and Kenji Fukumizu: Solution of gas molecules in ice crystal, *Chemical Physics Letters* (submitted).
- (11) Tomoko Ikeda-Fukazawa and Gabor A. Somorjai: Why is ice slippery? (in preparation).

著書

- (1) 深澤倫子: 氷、水、ハイドレートの構造と物性, 吉岡書店 (「氷表面のダイナミクス」の章を担当執筆)印刷中.

受賞

- (1) 2004年5月 守田科学研究奨励賞

口頭発表

国内:9件(招待講演2件)

国際:3件

研究課題別評価

1 研究課題名:無電解めっきのサイズ依存性とナノ光デバイスへの応用

2 研究者氏名:物部 秀二

3 研究の狙い:

90年代半ば頃まで、金属堆積法として広く応用される無電解めっきにおいては、制御可能なその臨界面サイズはサブミリメートルオーダーであるとされていたが、研究者はサブマイクロからナノメートルの領域においても選択的コーティングの臨界面サイズが存在すること、すなわち、ナノメートルサイズの先端径を持つよう先細り加工されたガラスファイバーに無電解めっきにより金属コーティングを行うと、サブミクロンサイズの末梢部分にのみ金属析出が生じないという現象を発見した。このナノ領域のサイズ依存無電解金属めっきをテーパ構造を持つ石英ガラスに適用すれば、サイズ効果は金属開口を自己形成する役割を果たし、テーパ先端にナノオーダーの開口を自動的に組織することができる。しかし、このようなサイズ依存性を示す無電解めっきについては、メカニズムや時間的ダイナミクス、その制御方法も、いまだよく知られていない。本研究においては、それらの解明を通して、無電解めっきのサイズ依存効果を制御する物理的・化学的技術の創出を目指す。また、この制御技術は、ナノ光学デバイス製造技術への応用が期待される。具体的には回折限界を超える高分解能近接場光学顕微鏡の必須デバイスである光プローブの光開口形成技術の開発を行う。

4 研究成果:

(1) サイズ依存性制御技術

① 化学的手法:重金属イオンのめっき浴への添加効果

重金属 Pb イオンを無電解ニッケルめっき浴に添加し、濃度を 0.01~1mg/L で変化させることにより、pH5~7の十分な堆積速度を持つ種々のニッケルめっき液に対して、先端がニッケルめっき膜から突出したニッケルコート先鋭化ファイバーが得られた。最小開口径は20nmである。また、その濃度を変化させることにより、サブミクロンオーダーでの臨界面サイズの制御が可能であった。ここで、Pb は先端の未析出部分においては、持続的な自己触媒ニッケルめっきが立ち上がる前に析出して、触媒能を失わせ、めっき領域においては水素発生反応を抑制する効果を持つ。先鋭化ファイバーにサイズ依存めっきを行うための効果的な添加剤として Pb のほかに Bi が確認されている。

② 物理的手法:超音波攪拌

めっき浴組成を変化させないでサイズ依存性を創出する手法として超音波攪拌法を提案した。底部に1MHz 圧電セラミック振動子を組み込んだめっき浴装置を開発し、セラミック板を入力電力225~375W で励振させたとき、ファイバーのクラッド平坦面からコア先鋭部先端に向かって、堆積速度が単調減少するという特異なサイズ依存性をもってめっきが行われた。このようなニッケルコーティングを先鋭化ファイバーに応用した場合、10nm オーダーの先端径と遮光機能を持つ近接場光学プローブを実現できる。[論文[1]]

③表面触媒化工程の開発

先鋭化光ファイバー表面をめっき活性にするために、従来、塩化スズと塩化パラジウムの2水溶液に浸漬し、スズとパラジウムを吸着させる手法が使用されてきたが、特に塩化スズの吸着力が塩化スズおよびスズ溶液のエージング時間に関して劣化し、また微小径部位のめっきにおいては、その影響が顕著に表れる。この問題を避けるため、Pd スパッタと触媒能制御表面処理からなる手法を新たに開発し、従来法に比べ、サイズ依存効果の実験再現性を飛躍的に向上させることに成功した。表面処理としては、Na₂S 水溶液、チオ硫酸塩水溶液、アセチレングリコール、ヒドラジ

ン、スズ塩水溶液などが有効であった。表面処理をしない場合、一部の浴組成を除いて、ファイバー表面から15nm程度の距離の部分に鋭い水素ピークが現れ、ニッケル膜にクラックが生じる。

(2) サイズ依存無電解めっき機構の仮説

サイズ依存無電解ニッケルめっきのモデルに、めっき部位から発生しめっき液中に拡散する水素を導入し、めっき進行部の近傍領域が溶存水素によって飽和した領域で覆われた水素拡散モデルを提案した。ここでは、Pd 触媒核において誘起されためっき反応が立ち上がり、副反応により生成した水素によってその近傍水素濃度が飽和すると、堆積速度がめっき液のpH、温度、組成等によって決定される一定の値まで増加しめっきが進行する。拡散が効率よく行われる微小径部位で、溶存酸素や微量な不純物イオンの反応、外力による攪拌などによりめっき反応の抑制が生じる場合、サイズ依存性が生じる。クラッドからコアが先鋭角 20 度で円錐状に突出した直径 25 μ m、コア径 2 μ m の先鋭化光ファイバーの例では、平坦なクラッド端部のめっき反応に伴って発生する水素によってファイバー端面近傍に水素飽和層が形成されるため、断面直径 2 μ m から 10nm の微小部位であるコア先鋭部においても水素分子拡散層内では端部と同程度の堆積速度でめっき反応が進行する。この水素拡散モデルは前述の超音波攪拌実験などの結果をよく説明する。

(3) 近接場光学プローブへの応用

近接場光学用プローブの実用化を目指したプロセスを構築するために、(1)の技術のうち、①③の組み合わせを中心に再現性向上とその検証を行い、モデルケースとなるめっき浴の開発を行った。この浴の特徴はニッケル塩の濃度を 0.005~0.01mol/L と小さく設定し、廃液処理の環境負荷の低減をはかるとともに、クラックおよびピンホールの問題に関して、錯化剤、還元剤を最適化したものである。同じめっき浴の繰り返し使用および同じ組成を持つ2つのめっき浴において、開口径 50nm 以下でその再現性を確認した。また、600nm で単一モードで機能する近接場光学プローブ用光ファイバーを独自の設計評価技術により開発した。これを用いて可視偏光近接場光学顕微鏡が開発されている。[論文[2]]

5 自己評価:

研究計画において示した課題は、サイズ依存性制御技術の創出、サイズ依存性の起源の探求、近接場光学ナノ光デバイス作製への応用の3つに大別される。サイズ依存性制御技術に関しては、重金属イオン添加と超音波攪拌という2つの異なるサイズ依存性を示す手法をそれぞれ 1 年目、2 年目で見出し、ほぼ計画通りであった。重金属添加法については、その後は実用化へ向けたモデルケースとするために、2年目から再現性向上などに力点を置いて研究を行ったが、当初半年程度と目論んでいた触媒化プロセスの改良に手間取り、結局 Pd スパッタ法の開発に至るまでに一年以上を要したため、デバイス作製への取り組みが遅れる結果となった。現状、プロセスのモデルケースとなるべき重金属イオン添加めっきの最適化はほぼ完成しつつあるものの、めっきプローブの計測応用は未達となってしまったことは残念である。これについては、研究期間終了後、共同研究等を通じてチャレンジしていきたいと考える。サイズ依存性の起源の探求に関しては、申請当初に比べると必ずしもビジョンが明確であったわけではなく、申請時の優先順位は高くなかったが、その後アドバイザーの先生方からの後押しもあり、1、2年目の取り組みで水素拡散モデルを提唱することができた。検証については、選択的樹脂コーティング法の結果等から現象論的に帰着させることを試みたが、それはアドバイザーの先生方の期待を必ずしも上回るものではなかったかもしれない。研究期間後も、サイズ依存現象に関する再現性のよいデータを蓄積し、このモデルに関する議論を深めていきたいと考える。

6 研究総括の見解:

物部秀二研究員はナノサイズで無電解めっきを行う新規な方法を開発し、その最適化を検討しており、今後の展開が大いに期待される。また、その応用として近接場顕微鏡の光プローブの光

開口形成技術への利用が可能となり、ナノ光学デバイス製造技術開発への展開が期待される。

7 主な論文等:

【論文】

- [1] S. Mononobe, Y. Saito, M. Ohtsu, H. Honma, “Fabrication of a near-field optical fiber probe based on electroless nickel plating under ultrasonic irradiation”, *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol. 43, No. 5B, May 2004, pp. 2862–2863.
- [2] M. Sakai, S. Mononobe, A. Sasaki, M. Yoshimoto, T. Saiki, “High-contrast imaging of NiO nano-channels using a polarization near-field scanning optical microscope”, *Nanotechnology*, Vol. 16, pp. S362–S364, in press.

【書籍】

- [1] S. Mononobe, “Near-field optical probes and the imaging applications”, In: *Progress in Nano-Electro-Optics III*, M. Ohtsu ed., (Springer-Verlag, Berlin, 2004 年出版予定), Chapter 1, 分担執筆.
- [2] 物部秀二, “ファイバースコープ”, In: *ナノテクノロジーハンドブック*, ナノテクノロジーハンドブック編集委員会編, (オーム社, 東京, 2003 年 5 月 25 日), II 編 2.2 節, 分担執筆.
- [3] 物部秀二, “エッチング技術”, In: *ナノ光工学ハンドブック*, 大津元一, 河田聡, 堀裕和編, (朝倉書店, 東京, 2002 年 11 月 25 日), 4.1 節, 分担執筆.

【特許】

- [1] 物部秀二, “無電解めっき方法及び光プローブ”, 特開 2004-84013, 2002 年 8 月 27 日出願, 2004 年 3 月 18 日公開.
- [2] 物部秀二, 特願 2004-58781, 2004 年 3 月 4 日出願.

【受賞】

- [1] 齋藤裕一, 物部秀二, 大津元一, 本間英夫, 第 24 回超音波エレクトロニクス基礎と応用に関するシンポジウム ポスター奨励賞
- [2] 齋藤裕一, 物部秀二, 渡邊新吾, 三浦修平, 本間英夫, 大津元一, 第 17 回エレクトロニクス実装学会 研究奨励賞受賞