

# 化学力学変換挙動を示すポリマーの一分子計測

内田淳也<sup>1</sup>, 近藤雄一<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院 工学系研究科 化学生命工学専攻 加藤研究室

<sup>2</sup> 東京大学大学院 理学系研究科 物理学専攻 樋口研究室

## 著者紹介

内田淳也: 専門分野は有機化学・高分子化学・超分子化学。本研究では、融合研究で用いる温度応答性高分子の設計および合成、温度応答性の定性的評価、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に関する考察を行った。

近藤雄一: 専門分野は生体分子モーターの一分子計測。本研究では高分子を用いた一分子の実験デザインに加え、ビーズ表面の高分子修飾、FRET 計測と定量評価、温度応答性高分子の物性の定量的評価をおこなった。

## Abstract

刺激応答性高分子の一分子での運動を解析することは基礎科学における興味にとどまらず、より高機能な材料開発を目指すうえでも重要である。本研究ではこれまで主に生体分子モーターの解析に用いられてきた一分子測定の手法を活用し、温度上昇に応じて凝集を示す高分子の解析を行った。FRET 測定により、巨視的な凝集は高分子の一分子運動に由来することを示唆する結果が得られた。また、高分子の構造変化・温度・力の関係をより詳細に調べるため光ピンセットを用いた実験系を考案し、測定条件の最適化を試みた。

## 1. 背景・目的

近年、刺激に応答してダイナミックな形状変化を示す高分子が注目されている<sup>[1]</sup>。例えばポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAM)は代表的な温度応答性高分子として知られており、PNIPAM の水溶液は温度上昇に伴い凝集する下限臨界溶液温度(LCST)型の挙動を示す<sup>[2]</sup>。このような刺激応答性分子を用いて作製したフィルムやゲルは外部刺激に応答して大きな形状変化を示すため、アクチュエータなどへの応用が期待されている。しかしながら、巨視的な運動は広く研究されている一方、ポリマー一分子での運動を解析した例は限られている。そこで本研究では、一分子力学計測によってポリマー一分子の運動を明らかにすることを目的とする。一分子測定によって分子の化学力学変換挙動を明らかにすることで、基礎的な興味にとどまらず、材料物性に対する詳細な理解や物性向上に向けた新たな分子設計などが可能になることが期待される。本研究では、これまで主に生体分子モーターの解析に用いられてきた一分子測定の手法<sup>[3,4]</sup>、すなわち FRET 測定や光ピンセットによる一分子測定を活用し、PNIPAM の一分子測定および解析を試みた。

## 2. 実験

### 2.1. 分子の設計・合成(図 1)

末端にカルボン酸部位を有する高分子(**PNIPAM-COOH**)を可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合により合成した<sup>[5]</sup>。FRET ドナーおよび FRET アクセプターとして用いる色素原料 Nitrobenzoxadiazole 誘導体(**NBD-NH<sub>2</sub>**)、Rhodamine B 誘導体 (**RhB-NH<sub>2</sub>**)をそれぞれ合成した<sup>[6]</sup>。さらに、**PNIPAM-COOH** の両末端のカルボン酸部位に **NBD-NH<sub>2</sub>** および **RhB-NH<sub>2</sub>** を反応させ、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)で処理することで未反応の色素の除去を行い、NBD および Rhodamine B で末端修飾された PNIPAM を合成した。

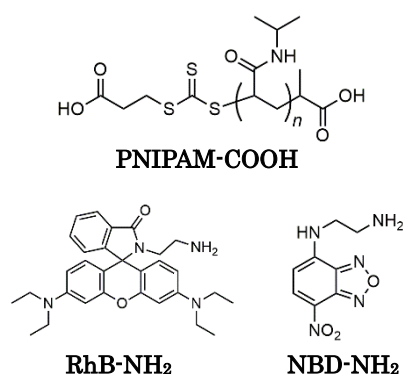


図 1. 本研究で用いる高分子と色素の化学構造

### 2.2. 実験系(図 2)

高分子の一分子力学測定を行うために、生体分子モーターの一分子計測で用いられている方法を応用する。まずビオチン化ガラスと高分子修飾蛍光ビーズを作成する。ビオチン化ガラスは、ガラス表面にビオチン化 BSA を非特異的に吸着させることで作製する。高分子修飾ビーズは、蛍光ビーズ表面と高分子末端を架橋、もう一方の末端をアビジンと架橋することで作製する。ビオチン化ガラスで作製したチャンバー内で高分子修飾ビーズを光ピンセットでトラップし、ガラス表面のビオチンと結合させ、負荷をかけたとき・温度を変えたときの高分子の応答を、ビーズを介して計測する。

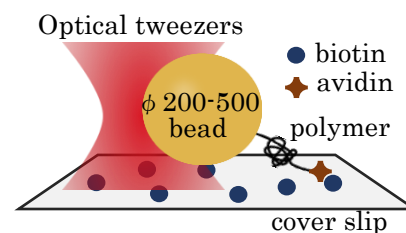


図 2. 実験系

### 2.3. 実験方法

#### 2.3.1. ビーズ表面の高分子修飾方法

アミンが修飾されたポリスチレンビーズと高分子末端のカルボン酸を、EDC を用いて架橋した(図 3)。10mg/ml 高分子 50 $\mu$ l に 50mM MES(pH5) 100 $\mu$ l、50mM EDC 50 $\mu$ l 加えて 20 分室温静置した。次に 4nM アミン修飾ポリスチレンビーズ (直径 200nm) を 50 $\mu$ l 加えて 90 分回転盤で攪拌した。これを 15krpm 10 分遠心することで未反応な EDC を取り除き、水中に分散させることで高分子修飾ビーズを回収した。

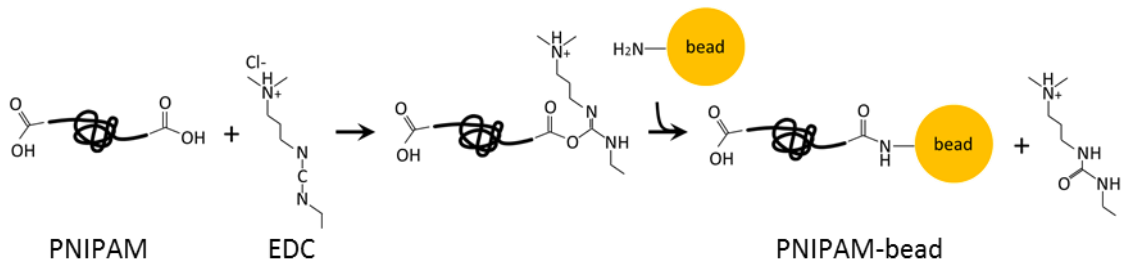


図 3. ビーズ表面の高分子修飾

### 2.3.2. 濁度計測方法

各濃度・温度における波長 300nm・600nm の透過光強度を、分光光度計(日本分光, V530DS)を用いて測定した。水に溶かして作成した各濃度の高分子 500 $\mu$ l を 25 度・60 度のブロックインキュベータに 10 分以上静置し、取り出した直後に測定を行った。

### 2.3.3. FRET 計測方法(図 4)

水と 10mM HCl(pH2)で溶かした色素修飾高分子の温度を変えたときの蛍光スペクトルを、分光蛍光光度計を用いて測定した。各溶媒で溶かした高分子 100 $\mu$ l を 25 度・80 度のブロックインキュベータに 3 分静置し、直後に測定を行った。測定条件は表 1 の通り。

表 1. FRET 測定条件

Ex. Band	5nm
Em. Band	6nm
Response	0.2sec
Sensitivity	medium
Ex. Wavelength	470
Em. Wavelength	480-750
取り込み間隔	2nm
走査速度	200nm/min
濃度	0.02mg/ml

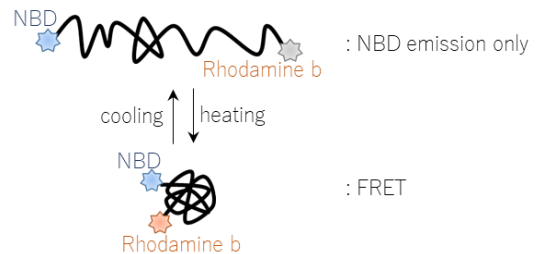


図 4. FRET 略図

### 3. 結果・考察

#### 3.1. 合成した分子の解析

核磁気共鳴(NMR)測定により、目的の高分子および色素誘導体の生成を確認した。また、質量分析(MALDI-TOF-MS)測定の結果、合成した高分子 **PNIPAM-COOH** の分子量は約 8000 と見積もられた。

#### 3.2. 高分子の凝集挙動

##### 3.2.1. 透過光強度測定

4mg/ml 高分子の温度を 37 度に上昇すると白濁する様子を目で確認した(図 5)。しかし、濃度を 0.2mg/ml まで下げると目で判断できなかった。そこで、この高分子溶液の濁度を透過光強度の変化から定量化した。結果、温度上昇に伴って透過光強度は減少した(図 6)。この結果は分子が凝集し散乱光強度が上昇にしたことによると考えられる。目では判断できなかった 0.2mg/ml 高分子でも透過光強度変化は顕著 (20-40%) であり、凝集が生じていることが分かる。波長 300nm、25 度で測定したときに透過光強度が下がっているのは高分子が光を吸収していることに由来する。そこで、25 度ときの曲線をベースラインとすることで吸収の影響を取り除いた結果が図 7 である。低波長のとき透過光強度が低くなる理由はレイリー散乱が波長の 4 乗に反比例 (球体の場合) するためであると考えられる。

次に濃度を十分下げると顕著な濁度変化は分光光度計を用いても見られなくなった。分子同士が凝集したときのサイズが小さく、散乱光強度の変化が小さくなったと考えられる (レイリー散乱・球体の場合、散乱光強度は半径の 6 乗に反比例)。0.02mg/ml では透過光強度変化は 10%以下であった。以上の結果より、高濃度の場合は高分子の凝集が生じていることが分かった。しかしこの結果からは、低濃度のとき、特に一分子が温度変化によって高分子の構造が変化しているかどうか判断することはできない。

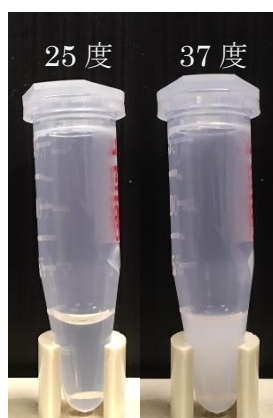


図 5. 4mg/ml PNIPAM の温度応答性凝集

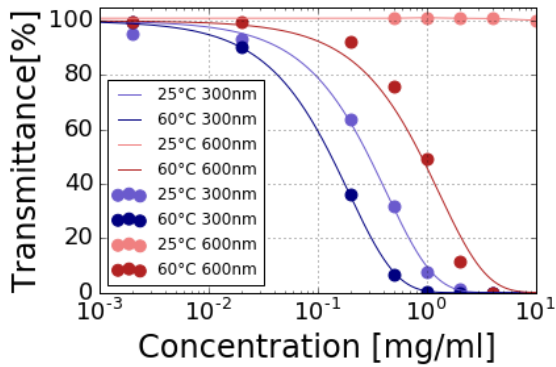


図 6. PNIPAM の透過光強度変化

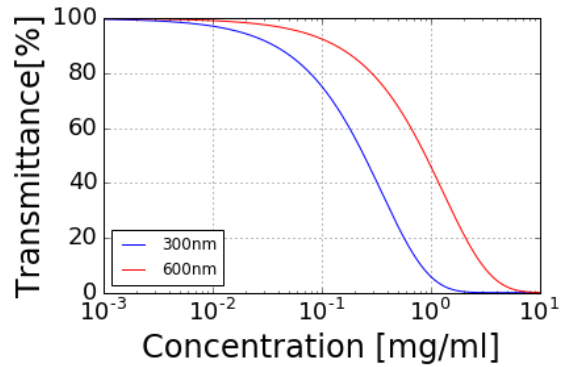


図 7. PNIPAM の透過光強度変化

(分子による吸収の影響取り除いた場合)

### 3.2.2. FRET 測定

そこで、高分子一分子が温度によって構造変化することを明らかにするために FRET 計測を行った。Rhodamine b の蛍光強度が最大となる 10mM HCl (pH2) を用いて高分子濃度を 0.02mg/ml に調整し、励起波長は NBD の励起波長である 470nm、励起波長幅 5nm、検出波長幅 6nm、480nm-700nm まで 2nm 間隔で蛍光スペクトルを計測した。

図 8 を見るとわかるように、室温で測定した場合、蛍光強度は NBD の蛍光波長である 540nm 付近にピークがあり、長波長になるにつれて緩やかに減少し、FRET は生じなかった。一方、80 度で測定すると、540nm と 578nm に蛍光強度のピークが得られた。Rhodamine b の蛍光波長が 579nm であるので、この結果は温度上昇によって高分子が収縮し、両末端に修飾された NBD と Rhodamine b の距離が十分接近したことで FRET が生じていることを示す。

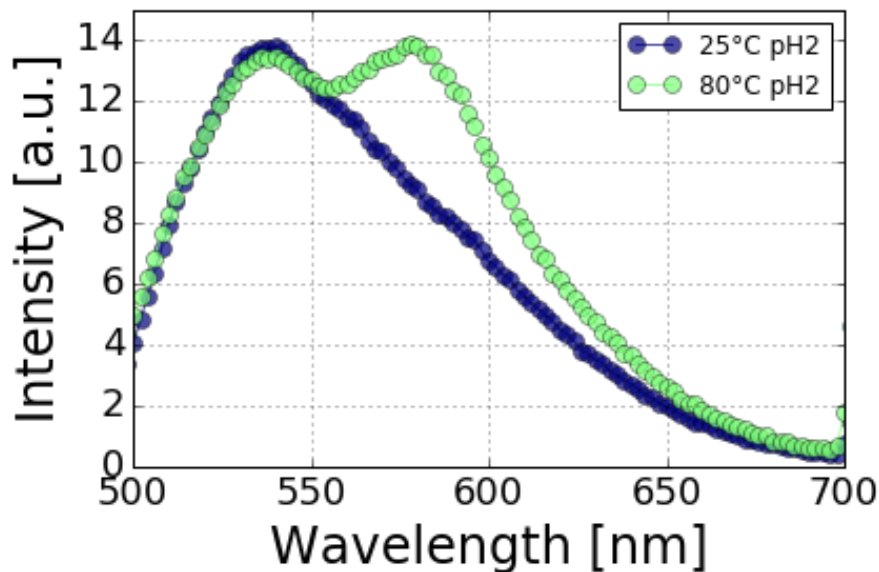


図 8. 色素修飾 PNIPAM の蛍光スペクトル

### 3.3. ビーズ表面の高分子修飾

アミン修飾ビーズ表面に EDC を用いて高分子を修飾した。得られたビーズ濃度はおよそ 1nM であった。このビーズを室温・60 度に 10 分以上静置したものを顕微鏡観察したところ顕著な違いは見られなかった。温度上昇に伴って凝集しない理由として、①高分子修飾がうまくいっていないこと、②濃度が低いことが考えられる。一分子力学測定に向けて、ビーズ表面が高分子修飾されていることを評価する必要がある。今後はガラス表面を高分子でコーティングし、ビーズとガラス表面の相互作用の温度応答性を顕微鏡観察することでビーズ表面状態を明らかにしたい。

## 4. 結論

一分子測定の手法を活用し、温度上昇に応じて凝集を示す高分子の解析を試みた。合成した色素修飾高分子に対して FRET 測定を行い、温度を変化させた際に観察される巨視的な凝集は一分子運動に由来することを示唆する結果を得た。本研究において、光ピンセットを用いた実験条件の最適化はまだできていないが、一分子解析を行っていくうえでの有用な知見を得た。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教官である工学系研究科 化学生命工学専攻 加藤隆史 教授、理学系研究科 物理学専攻 樋口秀男 教授には多大なご支援、ご協力をいただきましたことを深く感謝致します。MERIT プログラムの副指導教官である、工学系研究科 理工学専攻 田中肇 教授は本研究の提案を快くご許可いただいたことにも感謝致します。そして、このような共同研究の機会を与えてくれた MERIT プログラムに心より感謝致します。

## 参考文献

- [1] J. M. Abendroth, O. S. Bushuyev, P. S. Weiss, C. J. Barrett, *ACS Nano*, **2015**, *9*, 7746.
- [2] H. G. Schild, *Prog. Polym. Sci.*, **1992**, *17*, 163.
- [3] S. M. Block, L. S. B. Goldstein, B. J. Schnapp, *Nature*, **1990**, 348, 348.
- [4] T. Ha, T. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1996**, *93*, 6264.
- [5] A. J. Convertine, N. Ayres, C. W. Scales, A. B. Lowe, C. L. McCormick, *Biomacromolecules*, **2004**, *5*, 1177.
- [6] X. Wan, S. Liu, *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*, 10321.