

高分子ナノゲル粒子の短距離秩序に基づく色彩の研究

九州大学大学院工学研究院化学工学部門

三 浦 佳 子

Synthetic polymer nanogels were investigated in view of structural color component and molecular recognition units. Synthetic nanogels with molecular recognition ability were prepared by addition of acrylamide derivative of sugar ligand. The polymer nanogel showed the blue color based on the short distance order. The structural color was changed by raising the temperature and molecular recognition of specific proteins.

1. 緒 言

色彩は生活の上で欠かせないものであり、鮮やかな色彩は古代以来人類の興味の一つであった。色彩をどのように発現させるかは化合物の探索も含めて長い間研究されてきた。色を出す素材、色素については有機化合物、無機化合物、錯体など多くの化合物の研究が行われてきた。また、近年ではナノテクノロジーについても、光学技術の一つとして注目されている。有機化合物でも無機化合物でも、色素化合物は特殊な電子バンドを有していることが多く、望んだ色を発現させようとする研究には多くの困難が伴う。また、色素化合物は特殊な電子系を満足することが最重要であるため、生体毒性が強い化合物であることがしばしばである。

化合物の電子特性に依存せずに色彩を発現させる方法として、物質の構造特性を利用した、“構造色”の利用が考えられる^{1,2)}。構造色では、物質の周期構造に基づく光の干渉を利用しているため、特殊な電子構造を必要としない。周期構造を持つ分子には種々の有機、無機化合物があるが、均一な構造が必要とされている。私の研究グループでは、Poly(*N*-isopropylacrylamide)を主体とする高分子ナノゲル粒子を各種合成してきている^{3,4)}。このナノゲル粒子は粒径が均一に調製することが可能であるため、構造色の研究に適切であると予想された。高分子ナノゲル粒子の径を中心として、構造色を中心とした光学性質の検討を行った。

高分子ナノゲル粒子では、均一な微細粒子であるばかりではなく、その内部が柔軟であることから、タンパク質などの物質を包摂することができる^{5,6)}。特に、ナノゲル組成を選ぶことによって、特異的にタンパク質を認識する。本研究では、タンパク質に対して結合する、ナノゲルとそ

れを利用したバイオセンサーの開発も含めて検討した。また、癌関連タンパク質である、細胞成長因子に対して結合する、ナノゲル粒子についても新たに調製を行った。

2. 方 法

2. 1. ヒドロゲルナノ粒子の合成⁷⁾

N-イソプロピルアクリルアミド (NIPAAm)、ビスアクリルアミド (BIS)、開始剤 (V-501) を加えて重合を行った。界面活性剤として、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いて重合系に加えた。多くの高分子の組成としては、NIPAAm 95%、BIS 5%、SDSを用いた。ナノゲル粒子の粒径はSDSの濃度に大きく依存しており、SDSを減らした系についても検討した。ナノゲル粒子の直径は、動的光散乱 (DLS、マルバーン社、ゼータサイザーナノ) を用いて測定した。

また、生体分子認識製のモノマーとしては、生理活性糖を持つアクリルアミドを用いた (Figure 1)。糖鎖を側鎖に持つアクリルアミドについては、過去の文献と同じ方法で調製を行った。生体分子である糖の分子を円滑に行わせるために、適宜疎水性のモノマーである、*N*-tert-ブチルアクリルアミドを適宜加えている。例えば、マンノースを含み、コンカナバリン A と結合する高分子モノマーの組成は、NIPAAm 63%、t-BAM 20%、BIS 10%、アクリル酸 (AAc) 5%、マンノース 2% のモル比とした。タンパク質の分子認識については、下記に示す構造色センサーで調べるほか、水晶発振子 (QCM、Affinix Q4 イニシウム) によって測定を行った。

その外に癌関連のタンパク質を認識するナノゲル粒子についても合成を行った。ナノゲル粒子を認識するためのモノマーとして、硫酸基を有するアセチルグルコサミンを加えて、Figure 1 と同様に合成を行った。

2. 2. ナノゲルを認識要素とした構造色の発現とバイオセンサーの開発³⁾

Figure 1 に示す、糖鎖認識ナノゲルを用いて、特異的なタンパク質センサーとしての機能を調べた。糖鎖認識ナ



Structural Color of Short Distance Order of Polymer Nanogel

Yoshiko Miura

Department of Chemical Engineering,
Graduate School of Engineering, Kyushu
University

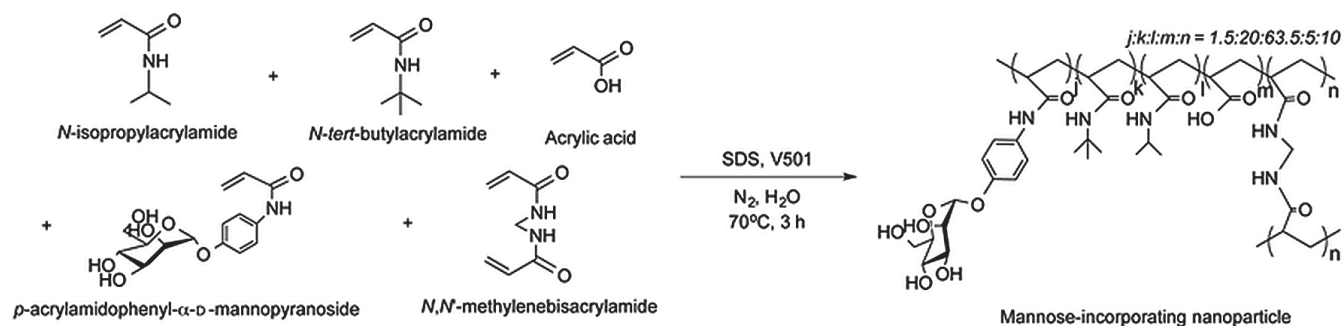


Figure 1 分子認識性を持つナノゲル粒子の合成。メインとなるモノマーとしてNIPAAmを選び、架橋剤、疎水性部位、電荷、糖を持つ各種のモノマーを加えた。

ノゲルはナノゲルの径からの短距離秩序による構造色の変化をUVスペクトルによって調べた。また、構造色を補足する機材として、230 nmの微細構造を持つ基盤を用いた。ナノゲル粒子を微細構造基盤にスクシイミド基を介して固定化した。このナノゲルに対して、垂直方向にファイバー式のUV分光光度計(USB-4000-UV-Vis、オーシャン Optikス)によって、スペクトルを測定し、タンパク質の分子認識に伴う構造色の変化を調べた。UVスペクトルは360-800nmまで測定した。また、タンパク質としては標的タンパク質としてコンカナバリンA、リファレンスタンパク質として牛血清アルブミンを用いた。

2. 3. PolyNIPAAmナノゲル粒子による構造色の発現

PolyNIPAAmナノゲルを2. 1. にしたがって調製した。ナノゲル粒子で多様な色調を発現させるためには、種々の短距離秩序(粒径の大きさ)を実現する必要がある。モノマー濃度、架橋剤、界面活性剤の濃度、種類を変化させてナノゲルの合成を行った。ナノゲルの大きさは100-2000nm程度までとした。これに伴う、構造色の発現について検討した。ナノ粒子の溶液の色は、希薄水溶液のスペクトルをUV分光光度計(cary8453、アジレント)または、ナノゲル溶液をガラス基板に析出させた上で、ナノファイバー分光光度計によっても測定を行った。また、ナノゲル溶液については温度を変化させて測定を行った。

2. 4. ナノゲル粒子によるタンパク質の捕捉と生体材料としての展開⁸⁾

ナノゲル粒子のいくつかは2. 1. に示すようにタンパク質のリガンドを含んでおり、タンパク質に対して分子認識性を示す。in vitroでのタンパク質の分子認識実験は、QCMにナノゲル粒子を固定化した上で、タンパク質を定量的に添加して周波数変化を測定し、Langmuir解析によって結合定数の解析を行った。また、一部のナノゲル粒子については、マウスに対するin vivo試験を行った。マウ

スに対するin vivo試験は外注(静岡県立大学、カリフォルニア大学アーバイン校)によって行った。

3. 結果

3. 1. 構造色によるバイオセンシング

Figure 1に示す組成の分子を用いて、ナノゲル粒子の合成を行った。ナノゲル粒子は、PolyNIPAAmを主体としているため、高温で収縮し、偽沈殿重合によってナノ粒子を形成した。タンパク質認識部位である、糖ユニット(マンノース)を加えてナノゲル粒子を合成した。

ナノゲル粒子については、マンノースを有するナノゲルで約200nmの直径を持つ粒子を用いた。この粒子を230nmの微細構造を持つ基材に対して、スクシイミド基を介して固定化した(Figure 2)。基材は微細孔に基づく色調を発して、500nm付近にUVピークを示した。この基材に対して、タンパク質を付与して、マンノースに特異的に結合するコンカナバリンA(ConA)を添加したところ、スペクトル強度が減少した。一方で、マンノースと結合しない、牛血清アルブミン(BSA)を添加した場合には、UVピークの変化は見られなかった。ピーク強度の変化をタンパク質の濃度に対してプロットして、Langmuir式によってフィッティングを行って、結合定数を算出した。タンパク質との解離定数(K_d)は 10^{-6} Mオーダーで抗体に匹敵するような強さと特異性を示すことがわかった(Figure 3)。

このナノゲルを塗布した材料については、自然蒸発を用いて、ナノゲルを集積させたところ、青色のフィルムへと変化した。ナノゲル自体の構造色と考えられた。一方で、このゲルフィルムに対して、タンパク質溶液を添加したところ、色調は消失した。水自体の添加でも色が消失したため、ナノゲル構造体の自己組織化が弱いことが考えられた。自己組織体の材料特性を強くするために、ナノゲル集積体に対して、PEGジアクリレートを用いて架橋構造を作らせることとした。しかしながら、PEGジアクリレートでの架橋反応を行うときに色が消失することがわかった。

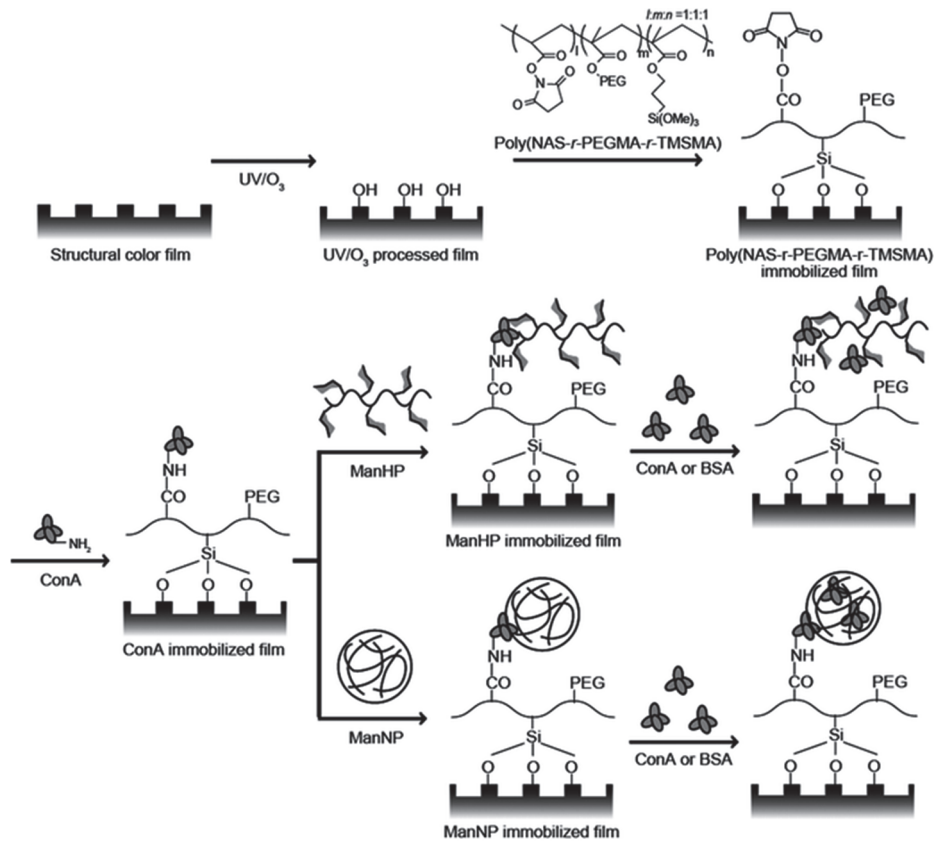


Figure 2 スクシイミド基を介した、ナノゲル粒子の固定化。凹凸基材が構造色を発揮する基板。

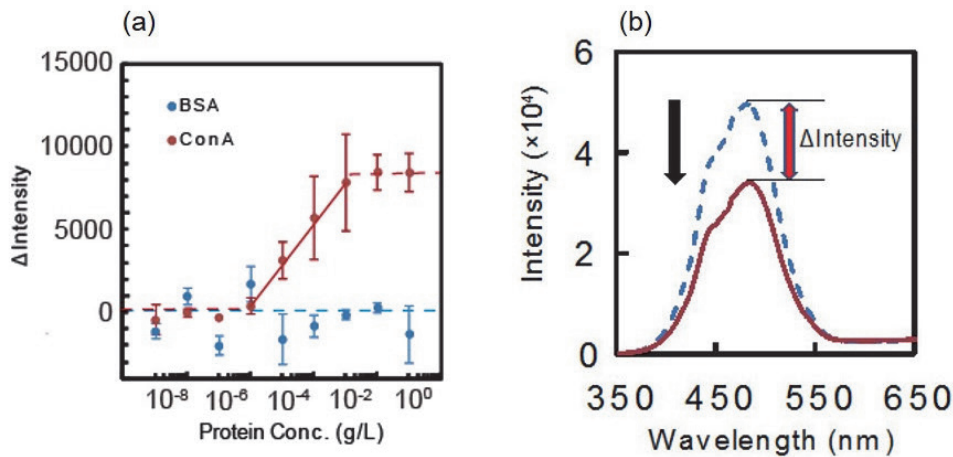


Figure 3 (a)ナノゲル粒子と構造色を組み合わせた基板によるタンパク質のセンシング。(b)構造色基板のスペクトルの代表例。

3. 2. ヒドロゲル粒子による構造色の発現

ナノゲルの溶液は短距離秩序と散乱光に基づく青色を呈している (Figure 4)。ナノゲルについては、PNIPAAmが温度応答性高分子であることから、33度付近で疎水性に変化して、収縮する。ナノゲル溶液についても、温度を上昇させると相転移に基づいて、青色の光を呈さなくなった。また、マンノースを有するナノゲルについては濃厚溶液については青白い散乱光を呈しているが、ConAを添加することによって、色調が見られなくなることがわかった。

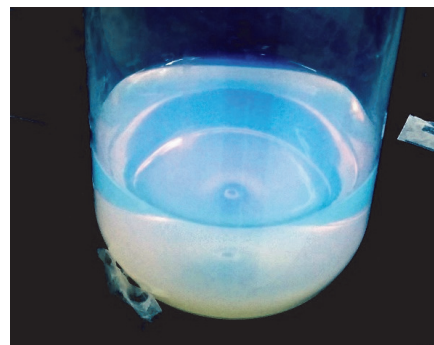


Figure 4
ナノゲル粒子溶液

BSAの添加によっては変化が見られなかった。

また、ヒドロゲル粒子の分散液については、分散光が大きく影響しているため、輝度とコントラストの改善のため、カーボンブラックを複合したナノ粒子の合成を行った。カーボンブラック(和光純薬)分散液を調製し、通常のヒドロゲル粒子と同様にPNIPAAmの合成を行った。ヒドロゲル粒子については、粒径の分散性(PDI)が大きくなり、明確な色を示さなくなった。

ナノゲル分散液の構造色については安定な分散が必要であることが示唆された。そこで、静電相互作用を導入した。正電荷を持つモノマーとして、ジメチルアミノ基を持つモノマー(ジメチルプロピルアミノメタクリルアミド(DMAPM))を加えて重合を行った。DMAPMを含むポリマーについては、室温では安定的に青い発色を示した。ナノゲル粒子については、中性(DMAPM、アクリル酸非含有)、イオン性に限らず、ゲル粒子の分散と発色には界面活性剤の添加が必要であった。

ナノゲル粒子については、界面活性剤を20 mMから2 μ Mまで変化させることによって、ナノゲルの粒径を変化させることができた。界面活性剤が多いと50 nm程度まで小さくなり、 μ Mオーダーまで減らすことによって、ゲル粒子の粒径は2 μ m程度まで増大させることができた。一方で、界面活性剤が多くなると径の均一性が失われる。粒度分布は粒径が1 μ m以上では、1.5以上(動的光散乱測定による)であった。均一なナノゲル粒子(PDI 1.5以下)では、濃厚溶液及び、ガラス基板上で乾燥して調製したナノゲル集積体が青色を発色した。バックグラウンドとして、黒色ガラス(マツナミガラス)を使うと発色性が向上した。

3. 3. 癌関連タンパク質を認識するナノゲルの開発とセンシング

3. 1. では、ConAを認識するナノゲル粒子について報告した。ナノゲル粒子については、内部に分子認識空間を調製することで、抗体のような分子認識要素として用いることができる。3. 1. ではConAを認識するナノゲルについて報告したが、ConAは豆由来のタンパク質で一種のモデルタンパク質である。そこで、疾病などに関係する重要なタンパク質を認識するナノゲルの開発を行った。

N-アセチルグルコサミンに硫酸基を導入し、アクリルアミド化したモノマーを各種合成した。硫酸基について位置選択的に導入した。その上で、種々の硫酸化糖鎖高分子ナノゲルを合成した(Figure 5)。硫酸化糖鎖のうち、3、4、6位に硫酸基を導入したナノゲルでは、細胞成長因子である、血管内皮細胞成長因子(VEGF)と結合することがわかった。他の硫酸化糖(3位硫酸化、4位硫酸化、6位硫酸化のモノ硫酸化のGlcNAcアクリルアミド)を含むナノゲルについては、VEGFとの結合が弱かった。疎水性のモノマーである、TBAmを加えることによって、VEGFの結合を最大化することができた。硫酸化糖鎖高分子ナノゲルについては、濃厚溶液は負電荷の導入によってよく分散し、青い色調を呈した。また、温度の上昇やVEGFの添加によって、青い色調は観察されなくなった。3. 1. の構造色基板に固定化することで、VEGFのセンサーを開発する予定である。

また、VEGFの結合を利用して、癌の阻害効果について検討した。VEGFは癌細胞による血管新生に深く関わっていることが知られている。腫瘍を移植したマウスに対して、硫酸化糖鎖高分子ナノゲルを断続的に投与したところ、癌

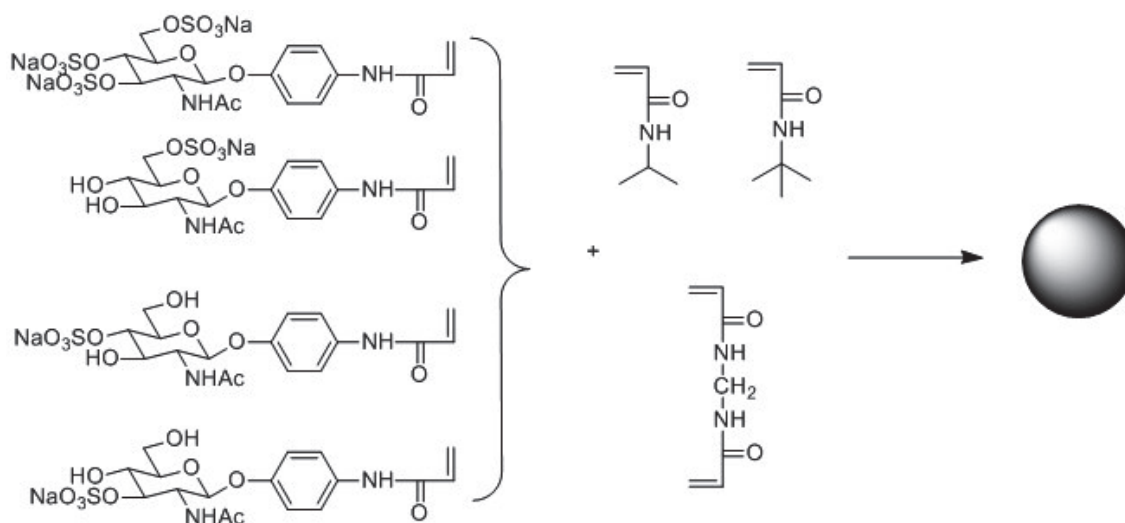


Figure 5 VEGFに結合するナノゲル粒子の合成スキーム。左に示す硫酸化グルコサミンのアクリルアミドモノマーを含むナノゲル粒子は、VEGFと特異的に結合する。

腫瘍体積の減少が見られた。

4. 考 察

4. 1. 構造色によるバイオセンシング

ナノゲル粒子は分子認識素子としてターゲットに対する強い結合と大きな容量を有している。そのため、ナノゲル粒子を用いて抗体を用いたときと同じようなバイオセンシングが可能である。構造色では、規則正しい基材の性質を用いて、色を発現させることができた。ナノゲル粒子と構造色基板を用いることで、構造色を用いたバイオセンシングを行った。構造色基板では、規則的な孔間の光干渉により構造色を生じる。ナノゲルを固定化しても、規則構造は失われずにUVスペクトルが強く発現された。ナノゲルの固定化、タンパク質の添加によって、反射率、規則構造が低下するため、ピーク位置は500nm程度で変化しないものの、強度が変化した。ナノゲル粒子の分子認識能は抗体と匹敵するほど強い(結合定数 10^7 (M^{-1}) オーダー)ことから、分子認識素子として適当であった。ナノゲル粒子を一層固定化することで、ターゲットタンパク質(ConA)をよく捕捉して高感度にタンパク質を検出することができた。

ナノゲルをゆっくり乾燥させて積層させた構造を作製することによって、青色の構造色を発する材料を調製することができた。この青色素材はナノゲル粒子の複合体による長距離秩序の構造色と散乱光によるものと考えられる。この積層構造はもろく崩れやすかった。PEGジアクリレートを架橋剤として加えたが、逆に規則構造が失われたため、色調が発揮されなくなった。また、ナノゲルの構造色を発揮する積層構造は、種々の刺激による構造体の変化に鋭敏に反応して色調が変化するため、環境のセンシングには適した性質であると考えられた。

4. 2. ヒドロゲル粒子による構造色の発現

ナノゲル粒子の分散液では粒子の短距離秩序をベースとした干渉光と散乱光によって青色に発色した。この青色の構造色は分散状態が安定であれば恒常的に色を安定に発現する。短距離秩序をベースにするために、より粒径の大きな粒子も種々調製することができれば種々の色調のナノゲル構造色を実現できると考えられた。しかしながら、各種のナノゲルを調製したが、青色以外は発現させることができなかった。これは、ナノゲルの大きさをセミマイクロオーダーから変化させると粒径の均一性(PDI)が低下して、効果的に構造色を発現させることができないためであった。

また、構造色の発現については、界面活性剤による安定な分散が不可欠だった。重合時には界面活性剤を大量に加えるため、必ず青色色調の構造色を得ることができた。一方で、透析によって界面活性剤を取り除くと青色の色調が失われた。ナノゲル自体にアミンを加えても分散性は完全

には向上せず、透析後は構造色が失われた。硫酸化糖をモノマーとして加えた場合が最も分散性が保たれた。

界面活性剤を加えた状態では、構造色を安定的に発現した。温度を上昇させると、PNIPAmは温度応答性高分子であることから収縮して、粒径が変化した。その場合には青色の構造色が鋭敏に失われた。ナノゲル粒子の構造色では、均一な粒子の分散が重要であり、温度変化によって粒径の均一性が失われると、構造色が発現されなくなった。

4. 3. 癌関連タンパク質を認識するナノゲルの開発とセンシング

VEGFや線維芽細胞増殖因子(FGF)などは細胞の成長に関係するとともに、癌細胞での血管新生による癌細胞の異常増殖に関係することが知られている。そのため、これらを免疫した抗体医薬が実際に治療に使われている。VEGF、FGFは細胞表面の硫酸化多糖(ヘパリン、ヘパラン硫酸など)に結合していることがわかっている。そこで、硫酸化多糖をベースにした、糖モノマーを合成することによって、ナノゲル粒子の開発を行った。硫酸化度が高いグルコサミンモノマーに疎水性を適宜加えることによって、VEGFを効率的に捉える、ヒドロゲル粒子の合成に成功した。QCM解析によって、結合力が抗体と同様に高いことを確認した。ナノゲル粒子をマウスに対して投与することで、in vivo試験を行った。ナノゲルがVEGFを捕捉することにより癌細胞の細胞増殖が抑えられることが実際に確かめられた。

得られた硫酸化糖ナノゲル粒子については、濃厚溶液では構造色に基づく青色色調を呈していた。硫酸基によって一定の分散性が保たれ、アミノ基を導入した場合よりも安定的に青色色調を呈した。この性質を利用することによって、癌関連の細胞成長因子の色調センシングが可能であることを示唆した。また、3. 1.で示した構造色基板と組み合わせた構造色センシングを行うことが近々の課題と考えられる。

5. 総 括

ナノゲル粒子を構成要素として構造色を基礎とした検討を行った。ナノゲル粒子としては、NIPAAmを主モノマーとして用いた。PNIPAAmは高温では収縮することから偽沈殿重合によって各種のナノゲルを均一に合成することができた。界面活性剤存在下で、均一なナノゲル粒子の場合には青色を効率よく発色した。ナノゲル粒子の粒径が、分子認識(タンパク質の包摂)、温度の上昇などの各種刺激によって変化することによって色が消失した。また、ナノゲル自体の開発については順調に進めることができた。モノマーの開発によって、ConA、VEGFといったタンパク質に特異的に強く結合するナノゲルを開発することができた。

ナノゲルについては種々の粒径の高分子ゲルの開発を行った。しかし一方で、粒径自体の構造色、短距離秩序に基づく構造色については色調を制御することは研究期間内では達成することができなかった。特にナノゲル粒子の分散性を制御すること、濃厚溶液を調製することが鍵であると考えられた。

構造色を持つ基板を用いてタンパク質のセンシングを行った。構造色を容易に発揮する基材を用いることで、ナノゲルの持つ分子認識能と構造を生かすことができた。構造色を生かすことで鋭敏なバイオセンシングを開発することができた。

今回の研究では、ナノゲルを新しい構造色の要素として種々の検討を行った。ナノゲルを構造色の発現には分散性が大きな鍵になることが示唆された。また、種々の粒径をつくることができたが多様な色を発現させることには未だ検討が必要と考えられた。

(引用文献)

- 1) 吉岡伸也、木下修一、日本物理学会誌、64、619-623、2009
- 2) 木下修一、吉岡伸也、繊維学会誌、59、35-39、2003.
- 3) Yue, M., Hoshino, Y., Ohshiro, Y., Imamura, K., Miura, Y., Temperature-Responsive Microgel Films as Reversible Carbon Dioxide Absorbents in Wet Environment, *Angewante Chemie* **2014**, *126*, 2692-2695.
- 4) Hoshino, Y., Ohashi, R., Miura, Y., Rational Design of Synthetic Nanoparticles with a Large Reversible Shift of Acid Dissociation Constants: Proton Imprinting in Stimuli Responsive Nanogel Particles., *Adv. Mat.* **2014**, *26*, 3718-3723.
- 5) Hoshino, Y., Nakamoto, M., Miura, Y., Control of Protein-Binding Kinetics on Synthetic Polymer Nanoparticles by Tuning Flexibility and Inducing Conformation Changes of Polymer Chains., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 15209-15212.
- 6) Nakamoto, M., Hoshino, Y., Miura, Y., Effect of Physical Properties of Nanogel Particles on the Kinetic Constants of Multiple Protein Recognition Process., *Biomacromolecules*, **2014**, *15*, 541-547.
- 7) Terada, Y., Hashimoto, W., Endo, T., Seto, H., Murakami, T., Hisamoto, H., Hoshino, Y., Miura, Y., Signal Amplified Two-Dimensional Photonic Crystal Biosensor Immobilized with Glyco-Nanoparticles., *J. Mater. Chem. B*, **2014**, *2*, 3324-332.
- 8) Koide, H., Yoshimatsu, K., Hoshino, Y., Lee, S.I., Okajima, A., Ariizumi, S., Narita, Y., Yonamine, Y., Weisman, A. C., Nishimura, Y., Oku, N., Miura, Y., Shea, K. J., *Nature Chem.* **2017**. Doi:10.1038/nchem.2749.