

研究課題別評価書

1. 研究課題名

分子応答性材料を用いたインテリジェントインターフェースの創製

2. 氏名

宮田隆志

3. 研究のねらい

近年、pH や温度などの外部環境の変化に応答して体積変化する刺激応答性ゲルが、DDS や細胞培養、アクチュエーターなどへ応用可能なインテリジェント材料として精力的に研究されている。これまで報告されている刺激応答性ゲルのほとんどは pH や温度に応答するゲルであり、特定の分子を認識して膨潤収縮するゲルはグルコース応答性ゲルなどごくわずかし報告されていない。研究代表者は、新しいインテリジェント材料の開発を目指して、ゲルの可逆的架橋点として生体分子複合体を利用することにより二種類の分子応答性ゲル(生体分子架橋ゲル、生体分子インプリントゲル)を合成してきた。このような分子応答性ゲルは、生体分子の分子認識能と高分子ネットワークの協同効果の相互連携によって応答性を示すことができる。そこで、分子応答性ゲルの表面や界面を利用することによって、従来にないインテリジェントインターフェースを創製し、新しいナノ界面制御材料の基礎と応用について研究することを目的とした。特に、本研究では分子応答性ゲルから微粒子や薄膜、マイクロ流路バルブなどを作製し、標的分子を認識して構造変化する微粒子表面や薄膜表面を利用したセンシングシステム、微細ゲルを用いたマイクロ化学分析システム(μ TAS)への応用を目指した。

4. 研究成果

本研究では、抗原抗体複合体や二本鎖 DNA などの生体分子複合体をゲルネットワーク内に配列させることにより、標的分子を認識して膨潤する生体分子架橋ゲルおよび収縮する生体分子インプリントゲルといった二種類の分子応答性ゲル(図 1)を合成し、その表面や界面を利用したインテリジェントインターフェースの創製を試みた。特に、分子応答性ゲルからなる微粒子や超薄膜、マイクロ流路バルブを作製し、シグナル分子に応答したナノ粒子表面の制御や超薄膜の表面変化に関する基礎研究、それらを利用したセンサーシステムの開発、さらにはマイクロ化学分析システム(μ TAS)に応用できるマイクロ流路バルブの構築を試みた結果、以下のような研究成果が得られた。

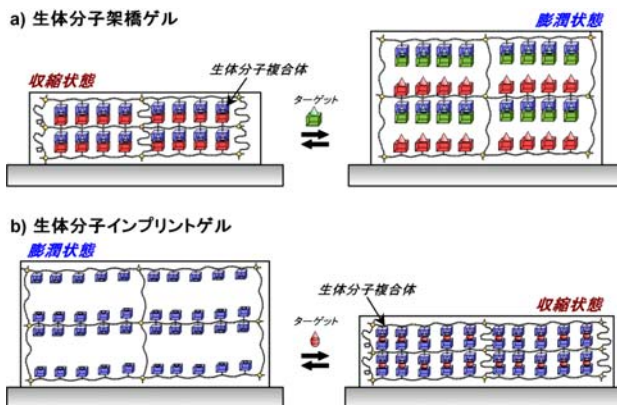


図 1 分子応答性ゲルを利用したインテリジェントインターフェース

(1) 分子応答性ゲル微粒子の合成

標的分子として内分泌攪乱化学物質の疑いのあるビスフェノール A (BPA)を選び、その芳香環を認識するリガンドとしてシクロデキストリン(CD)を用い、無乳化剤乳化重合法によって 200~300nm 程度の微粒子を合成することに成功した。特に、分子応答性ゲル微粒子の場合にはクリーンな表面が必要であるため、通常の乳化重合とは異なり、界面活性剤を利用しない無乳化剤乳化重合法によって微粒子を合成する方法を見出した。得られた CD 導入ゲル微粒子が分散した水溶液に少量の BPA を添加すると粒径が急激に減少して収縮した(図 2)。これは、BPA の二つの芳香環を CD が包接して CD-BPA-CD 複合体を形成し、これが架橋点

として作用するためであることがわかった。一方、一つの芳香環しかもたないフェニルエチルアセテート(PEA)が存在しても、ゲル微粒子の粒径はほとんど変化しなかった。したがって、CD 導入ゲル微粒子はBPAを認識して粒径変化するBPA 応答性を示すことがわかった。このような分子応答性ゲル微粒子は、環境センサーや環境汚染物質除去材料として利用できる。

一方、上記と同様の方法で無乳化剤乳化重合法によって抗原抗体複合体を架橋点とするゲル微粒子の合成にも成功した。この抗原抗体複合体ゲル微粒子の合成は、緩衝液中で行い、さらに生体分子に悪影響を及ぼす界面活性剤を利用しない無乳化剤乳化重合法であるため、ある特殊な条件下でのみ安定した抗原抗体複合体ゲル微粒子を合成できることが明らかとなった。この抗原抗体複合体ゲル微粒子も200~300nm 程度の粒径を有しており、pH7.4 の緩衝液中でも安定に分散していた。このゲル微粒子の粒径は標的抗原の存在下で増加し、明確な抗原応答性を示した。これは、ゲル架橋点として作用している抗原抗体複合体が標的抗原によって解離し、ゲル微粒子の架橋密度が減少するためと考えられた。また、通常のゲルとは異なり、微粒子化することによって標的分子に対する応答速度が著しく向上することもわかった。このような抗原応答性ゲル微粒子は、抗原センサーや自律応答型薬物放出システムへの応用が期待できる。

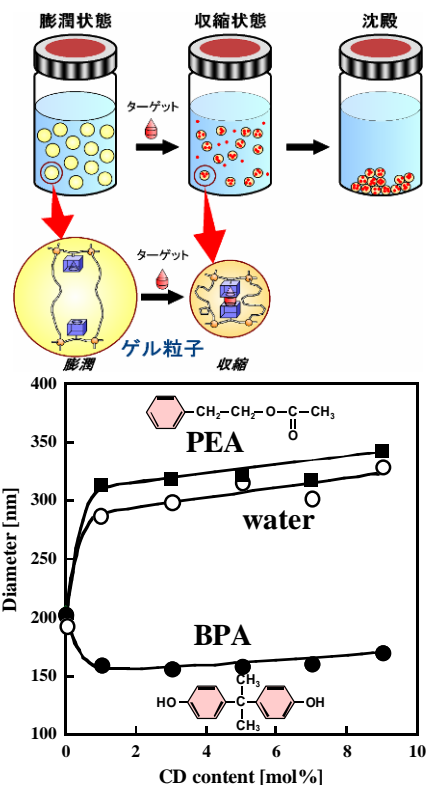


図2 標的分子に応答したCD 導入ゲル微粒子の粒径変化

(2) 分子応答性ゲル薄膜の認識応答挙動

まず、分子インプリント法によって表面プラズモン共鳴(SPR)センサーチップ表面にBPAインプリントゲル膜を調製した。標的BPA存在下におけるBPAインプリントゲル膜およびノンインプリントゲル膜の膜厚変化を測定し、膨潤率変化を調べた結果、BPAインプリントゲルがBPAに応答して収縮することが明らかとなった。さらに、SPRセンサーを利用してBPAに応答したシグナル変化を測定すると、ノンインプリントゲル膜に比較してBPAインプリントゲル膜の方が、標的BPAに対して顕著なSPRシグナル変化を示した(図3)。従来の分子インプリント法では多量の架橋剤を必要とされていたが、本研究によって架橋密度の低い膨潤ゲルに対しても分子インプリント法が有効であることを示すことができた。さらに、BPAインプリントゲル膜では標的BPA吸着に伴うSPRシグナル変化の後、ゲルネットワーク変化に基づくSPRシグナル変化も観察でき、BPA応答性ゲル膜はSPRセンサーチップとして有望であることがわかった。さらに、原子移動ラジカル重合(ATRP)法によって、SPRセンサーチップ表面上にナノオーダーの膜厚を

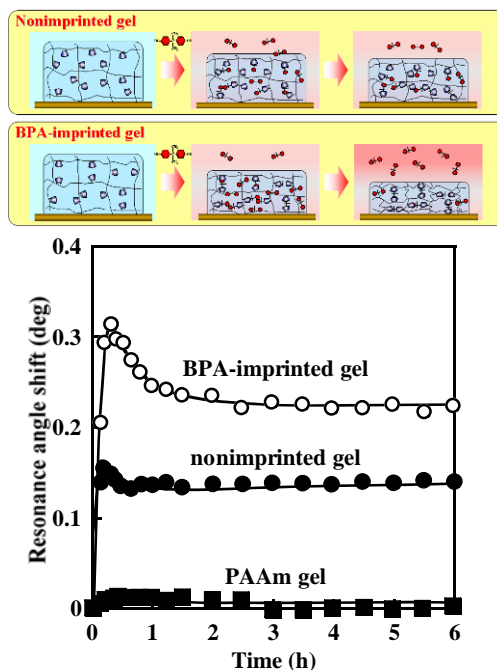


図3 BPAインプリントゲル薄膜、ノンインプリントゲル薄膜およびPAAmゲル薄膜のSPR変化

有する BPA インプリントゲル超薄膜の調製にも成功し、同様に BPA に応答した SPR シグナル変化を示した。このような分子応答性ゲル薄膜は SPR などのセンサーチップとしての応用が可能である。

さらに、当初の研究計画にはなかったテーマであるが、蛍光ドナーとアクセプターが結合した二本鎖 DNA を架橋点として用いたクロモフォア導入 DNA 架橋ゲル膜を合成した。得られたクロモフォア導入 DNA 架橋ゲル膜は、緩衝液中の DNA の配列を認識して異なる膨潤挙動を示し、それに伴って蛍光強度も増加した(図 4)。また、生体分子インプリント法によって蛍光ドナーとアクセプターが結合した DNA をリガンドとして有するクロモフォア導入 DNA インプリントゲルも合成した。クロモフォア導入 DNA インプリントゲルは DNA 配列を認識して次第に収縮し、それに伴って蛍光強度を減少させた。したがって、クロモフォア導入 DNA 架橋ゲルおよびクロモフォア導入 DNA インプリントゲルは DNA の一塩基の位置の違いも認識して膨潤率と蛍光強度を同時に変化させることから、診断と治療を同時に行うことができる新しい医用材料としての応用が期待できる。

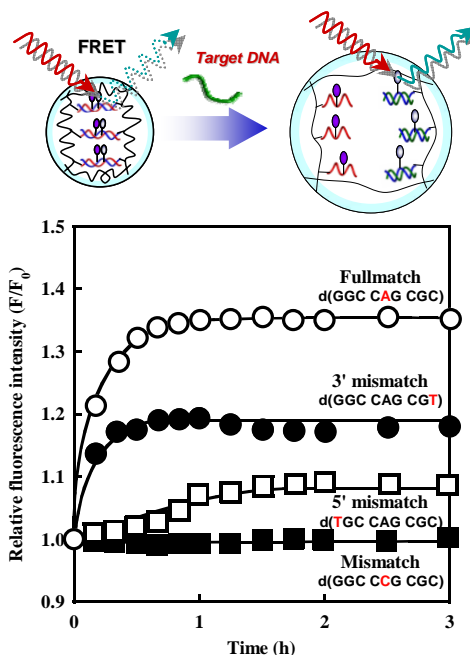


図 4 様々な配列を有する DNA 存在下でのクロモフォア導入 DNA 架橋ゲルの蛍光強度変化

(3) 分子応答性ゲルによるマイクロ流路制御

マイクロ化学分析システム(μ TAS)の重要な構成要素であるマイクロ流路を制御するバルブとして分子応答性ゲルを利用するため、光重合によって任意の位置に分子応答性ゲルを合成する方法を確立した。まず、蛍光顕微鏡を用いてマイクロ流路の所定部分に UV 光を照射することにより、微細な分子インプリントゲルを合成することに成功した(図 5)。そこで、マイクロ流路内に標的分子を流した場合の流速変化を調べた結果、T 字型流路で標的分子が存在するとゲルの体積が変化し、流速が急激に変化することがわかった。したがって、光重合法でマイクロ流路内に分子応答性ゲルを合成することによって、標的分子の有無によって流路の開閉を制御できる自律応答型マイクロ流路バルブとして有望であることが示された。さらに、様々な分子応答性ゲルの合成にも成功しており、診断チップなどへの応用研究も進めている。

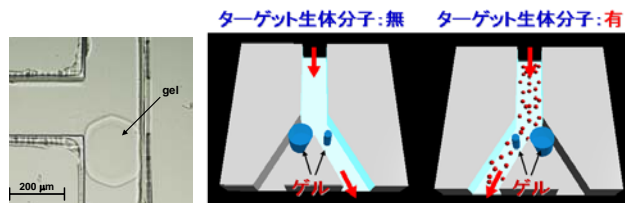


図 5 光重合によって合成した分子応答性ゲルとそのマイクロ流路制御機能のモデル図

以上のように、標的分子に応答して膨潤または収縮する分子応答性ゲルの表面や界面を利用したインテリジェントインターフェースを創製するために、分子応答性を示す全く新しい微粒子や薄膜、マイクロ流路バルブの調製に成功した。このような標的分子に応答するインテリジェントインターフェースに関する成果は世界で初めてであり、今後、医療分野や環境分野への応用が期待できる。

5. 自己評価

本研究では、研究代表者が世界で初めて合成に成功した分子応答性ゲルの表面や界面を利用することにより、全く新しいインテリジェントインターフェースの創製を試みた。特に、分

子応答性を示す微粒子や薄膜、マイクロ流路バルブの調製を中心に、インテリジェントインターフェースといった新概念の提案を目標として研究を進めてきた。その結果、特定の分子に応答する表面をもった微粒子や薄膜、マイクロ流路バルブの調製に成功した。このような微粒子や薄膜、マイクロ流路バルブはいずれも世界に類のないユニークな表面をもっており、さきがけ研究の申請段階で目標としていたインテリジェントインターフェースという全く新しい界面を提案できたと考えている。また、当初予定に入っていなかった研究ではあるが、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用することにより、DNA 配列を認識して蛍光強度と膨潤率を同時に変化させる DNA 応答性ゲルの合成にも成功した。さらに、最終年度には JST 国際強化支援策によってゲルに関する国際シンポジウムを開催することができ、これらの研究成果を発表すると共に、世界中の著名な研究者との交流によって新しい展開も見出すことができた。

研究期間内には実用化までに至らなかったが、当初の目標である微粒子や薄膜、マイクロ流路バルブの調製に成功し、さらに蛍光強度変化する DNA 応答性ゲルなどの思いがけない成果も得ることができた。本研究では、分子応答性を示す微粒子や薄膜、微細ゲルなどの一般的な合成方法を確立することができた点が、今後の研究展開につながる最も大きな成果といえる。この成果を利用すると、様々な分子複合体からなる多種多様なインテリジェントインターフェースを創製することができる。一方で、インテリジェントインターフェースを実用化するためにはまだ多くの課題が残っており、応答性などの向上を目指さなければならない。今後は、インテリジェントインターフェースの実用化を目指して、具体的な構造設計およびシステム設計を行っていききたい。さらに、分子に応答性を示すインテリジェントインターフェースは生まれたばかりの概念であり、学術的観点からも基礎研究を進め、今後はインテリジェントインターフェース分野を広げていききたいと考えている。

当初は微粒子合成やセンサーチップ表面での薄膜形成、バルブ用の光重合ゲルの合成などの方法を見つけ出すために非常に手間取り、なかなか原著論文としてまとめられる成果が得られなかった。しかし、後半に入ってこれらの合成に成功し始め、現在いくつかの論文を投稿中および執筆中である。以上のように合成方法の確立に時間を要したため、研究期間中には十分に原著論文として発表できなかったが、上記のような数多くの新しい成果を得ることができたので、早急に原著論文として公表したい。

今回のさきがけ研究では、インテリジェントインターフェースとして世界的に類のない分子応答性の微粒子や薄膜、マイクロ流路バルブの合成に成功し、今後大きく展開できるライフワークといえる研究の芽を見つけることができた。このさきがけ研究に採択されていなければ、多くの研究成果と研究の芽を見出すことができなかった。このような機会を与えて頂き、広い視野からアドバイスを頂戴した研究総括およびアドバイザーの先生方に心から感謝したい。

6. 研究総括の見解

特定の分子種に応答するゲルを作り、自律的に収縮するゲルをバイオセンサーやマイクロ流路バルブに応用する試みを展開し、興味ある成果が得られている。宮田氏はアイデアに富んでおり、様々な応用展開が提示されている。実現に向け、さらに努力いただきたい。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. K. Okawa, T. Miyata, T. Uragami, Fluorescence Resonance Energy Transfer by Quencher Adsorption into Hydrogels Containing Fluorophore, *J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Phys.*, **44**, 3245–3252 (2006).
2. T. Miyata, N. Asami, T. Uragami, Structural Design of Stimuli-Responsive Bioconjugated Hydrogels That Respond to a Target Antigen, *J. Polym. Sci., Polym. Phys.*, **47**, 2144–2157 (2009).

②特許

研究期間累積件数:2 件

1. 発明者:宮田隆志, 浦上 忠

発明の名称:分子応答性ゲル微粒子およびその製造方法ならびにその利用

出願人:独立行政法人科学技術振興機構, 学校法人関西大学

出願番号(出願日):2007-122459(2007 年 5 月 7 日)

国際公開番号(公開日):WO2008/139902(2008 年 11 月 20 日)

EPC 公開番号(公開日):2154166(2010 年 2 月 17 日)

(その他 4 ヶ国に出願中)

2. 発明者:宮田隆志, 浦上 忠

発明の名称:核酸応答性ゲルおよびその製造方法ならびにその利用

出願人:独立行政法人科学技術振興機構, 学校法人関西大学

出願番号(出願日):2008-116058(2008 年 4 月 25 日)

公開番号(公開日):2009-261334(2009 年 11 月 12 日)

③受賞

1. 平成 20 年度 高分子学会 Wiley 賞受賞

④著書

1. T. Miyata, Biomolecule-Responsive Gels: Design of Smart Gels Using Biomolecular Interactions, Bottom-Up Nanofabrication: Supramolecules, Self-Assemblies, and Organized Films (eds. K. Ariga, H. S. Nalwa), American Scientific Publishers, Volume 6, Chapter 9, 137-150 (2009).

2. 宮田隆志, スマート 3 次元高分子ネットワーク分子応答性ゲル, 超分子サイエンス&テクノロジー基礎からイノベーションまで(国武豊喜監修), エヌ・ティー・エス出版, 454-463 (2009).

3. 宮田隆志, ハイドロゲル, 遺伝子医学 MOOK 別冊「ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術」(田畑泰彦編集), メディカルドゥ, 139-145 (2009).

4. 宮田隆志, 新しい機能の膜(第 4 章), よくわかる分離膜の基礎(中尾真一編著), 工業調査会, 第 4 章, 131-158 (2009).

⑤招待講演

1. T. Miyata, N. Asami, T. Uragami, Preparation of Smart Membranes That Control Drug Permeation in Response to Target Biomolecules, The Fourth Conference of Aseanian Membrane Society (AMS4), Taipei (2007.8).

2. T. Miyata, Smart Hydrogels That Respond to Target Biomolecules, 3rd International Conference Smart Materials, Structures and Systems (CIMTEC2008), Italy (2008. 6).

3. T. Miyata, Biomolecule-Responsive Hydrogels Prepared by Molecular Imprinting, 5th International Workshop on Molecular Imprinting (MIP2008), Kobe (2008. 9).

4. T. Miyata, Preparation of Smart Hydrogels that Respond to Target Biomolecules, Japan-Korea Polymer Young Scientist Symposium, Niigata (2008. 10).

5. T. Miyata, Smart Hydrogels Exhibiting Biomolecule-Responsive Behavior, Annual Spring Meeting of Polymer Society of Korea, Daejeon, Korea (2009. 4).

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. T. Uragami, S. Yanagisawa, T. Miyata, Water/Ethanol Selectivity of New Organic-Inorganic Hybrid Membranes Fabricated from Poly(vinyl alcohol) and an Oligosilane, *Macromol. Chem. Phys.*, **208**, 756-764 (2007).

2. K. Funakoshi, T. Inada, T. Tomita, H. Kawahara, T. Miyata, Thermal Hysteresis Induced by Ammonium Polyacrylate as Antifreeze Polymer, *J. Cryst. Growth*, **310**, 3342–3347 (2008).

②著書

1. 宮田隆志, 接着と界面化学, プロをめざす人のための接着技術教本(日本接着学会編), 日刊工業新聞, 第1章, 1–22 (2009).