

ポリペプチドを利用した液相自己組織化法による ナノ粒子のリング状精密配列

東京科学大学 総合研究院 生体材料工学研究所 鳴瀧彩絵

Ring-like Precise Alignment of Nanoparticles by
Liquid-Phase Self-Assembly using Polypeptides

Ayae Sugawara-Narutaki

Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, Institute of Integrated Research,
Institute of Science Tokyo

水中でシリカナノ粒子と両親媒性高分子を混合し、適切な条件で静置すると、シリカナノ粒子の配列体を得られるが、その構造多分散性が課題となっていた。本研究では、ポリプロピレンオキシドとポリエチレンオキシドからなるブロック共重合体の存在下でリング状自己集合体が形成する過程について、走査型電子顕微鏡を用いた *ex situ* 観察、および小角 X 線散乱による *in situ* 観察の両方からアプローチして調べた。さらに、両親媒性のポリペプチドを用いた場合のシリカナノ粒子自己集合挙動を観察した。シリカナノ粒子の配列体は、走査型電子顕微鏡観察では構造多分散に見えるが、小角 X 線散乱による観察では、ブロック共重合体を用いた場合に 5 員環のリング、ポリペプチドを用いた場合に 8 面体の頂点に粒子が配置した構造体が収率良く形成していた。本自己組織化法は、液相において構造単分散性にすぐれる粒子配列体を与えることを明らかにできた。

When silica nanoparticles and amphiphilic polymers are mixed in water and allowed to stand under appropriate conditions, silica nanoparticle arrays are obtained, but their structural polydispersity has been an issue. In this study, the formation process of ring-shaped self-assemblies in the presence of a block copolymer composed of polypropylene oxide and polyethylene oxide was investigated by approaching both *ex situ* observation using scanning electron microscopy and *in situ* observation using small angle X-ray scattering. In addition, silica nanoparticle self-assembly behavior was observed when amphiphilic polypeptides were used. The silica nanoparticle arrays appeared to be structurally polydisperse in scanning electron microscopy, but small-angle X-ray scattering observations showed that the particles formed structures with good yields, with particles arranged in five-membered rings in the case of the block copolymer and at the vertices of an octahedron in the case of the polypeptide. It has been revealed that this self-assembling method gives particle arrays with structural monodispersibility in the liquid phase.

1. はじめに

無機合成化学の飛躍的な進歩により、組成、形状、サイズ、表面状態などが様々に制御されたナノ粒子が入手可能となった。このようなナノ粒子の精密配列化は、超高密度メモ

り、光センシング材料、メタマテリアルなどの次世代機能性材料を生み出す基盤技術たりえる。筆者らはこれまでに、無機ナノ粒子と有機高分子の相互作用を利用した液相プロセスにより、無機ナノ粒子を1~3次元に自己組織化させる方法を開拓してきた¹⁻⁵⁾。たとえば、シリカナノ粒子(Silica nanoparticle; SNP)のコロイド分散液に両親媒性高分子を添加し、pHや温度をパラメータとして粒子間力を制御すると、ナノ粒子がチェーン^{1,2)}、リング^{3,4)}、あるいはベシクル⁵⁾等の構造体へ自己組織化する。本手法は、水中で進行するグリーンプロセスであり、粒子と高分子を混合して加温するだけの簡便性を備えていることから、持続可能な社会の実現に向けて追及していくべき粒子配列技術であると考えている。しかしながら、このような自己組織化で得られるナノ構造は、熱力学的準安定構造を含む場合があり、構造が多分散化しやすいという欠点を抱えている。本技術を、社会のものづくりを転換できる真に有用な方法へと発展させるためには、構造単分散性を向上するためのアプローチが不可欠である。本研究では、ナノ粒子のリング状配列体に焦点を当て、まずはポリプロピレンオキシド(Poly(propylene oxide); PPO)とポリエチレンオキシド(Poly(ethylene oxide); PEO)からなるブロック共重合体PPO-PEOの存在下で形成するSNPリングの構造を小角X線散乱法(SAXS)を用いてその場観察することに取り組んだ⁶⁾。これにより、従来の走査型電子顕微鏡法を用いた構造解析^{3,4)}と比較して、液中における配列体の構造情報を非破壊で得ることができる。続いて、分子量分布を持つPPO-PEOとは異なり、均一な分子量を有するポリペプチドを用いた場合のSNP自己集合について調べた。

2. 実験方法

2-1. PPO-PEO存在下におけるSNP自己組織化

PPO-PEOとして、POとEOの重合度がそれぞれ95,409のものを用いた。直径約15nmのSNPとPPO-PEOを等重量ずつ水中で混合し、PPO-PEOが親水性となる10℃にてpHを7.8に調整した。その後PPO-PEOが両親媒性となる45℃に昇温し、自己集合を開始させた。1, 3, 14日後に分散液の一部をSi基板にスピコートし、試料をUV-Ozone処理して高分子を除去したのち、走査型電子顕微鏡を用いて自己集合構造を観察した。放射光SAXS測定はSpring-8 BL40B2で実施した。

2-2. ポリペプチド存在下におけるSNP自己組織化

Valine-Proline-Glycine-X-Glycine (VPGXG)の繰り返し配列を有するエラスチン類似ブロックポリペプチド $[VPGX_1G]_{50} - [VPGX_2G]_{60}$ ($X_1 = V(80\%), F(\text{Phenylalanine}, 20\%), X_2 = A(\text{Alanine}, 60\%), G(40\%)$)を用いた⁷⁾。直径約11nmまたは15nmのSNPとポリペプチドを重量比2:1となるよう水中で混合し、ポリペプチドが親水性となる10℃にてpHを7.8に調整した。その後ポリペプチドが両親媒性となる45℃に昇温し、自己集合を開始させた。1日後に分散液の一部をSi基板にスピコートし、試料をUV-Ozone処理して高分子を除去したのち、走査型電子顕微鏡を用いて自己集合構造を観察した。放射光SAXS測定はSpring-8 BL40B2で実施した。

3. 結果と考察

3-1. PPO-PEO存在下におけるSNP自己組織化

PPO-PEOは、PPOセグメントの下限臨界共溶温度である約20℃未満で親水性、20℃

以上で両親媒性となる。また、PPO-PEO は、水素結合を介して SNP 表面に吸着できる。SNP 分散液に PPO-PEO を混合したのち 45°C に昇温して 1, 3, 14 日後に撮影した走査型電子顕微鏡像を Fig.1 に示す。1 日後では、3~6 個程度の SNP が湾曲したチェーンを形成しているようなユニークな構造体が多数見られた (Fig.1a)。一方で、閉環したリング状集合体の形成はわずかであった。観察されたナノ構造を以下の 3 種、すなわち「リング状：3 個以上の SNS が集合し閉環しているもの」、「チェーン状：3 個以上の SNS がひも状に集合し、末端が存在するもの」、「その他：リングやチェーンに分類されないもの」に分類し、リング状集合体形成割合の経時変化を調べたところ、6.0% (1 日後)、27.7% (3 日後)、43.9% (14 日後) と増加した。一方、チェーン状集合体の形成割合は、46.9% (1 日後)、21.6% (3 日後)、24.5% (14 日後) であり、1 日後から 3 日後にかけて半減した。このことから、SNP はまずチェーン状に自己集合し、それが湾曲して閉環したリングを形成するというメカニズムが考えられた。このメカニズムを検証するために、SAXS による *in situ* 構造解析を行った。

Fig.2a には SNP 水分散液と PPO-PEO 水溶液を混合せずに独立に SAXS 測定を行った結果を示す。縦軸の $I(q)$ は散乱強度、横軸の q は散乱波数を表す。SNP の 4°C と 45°C の結果において有意な差はなく、どちらも半径 7.7 nm の球のモデルで実験値を再現するこ

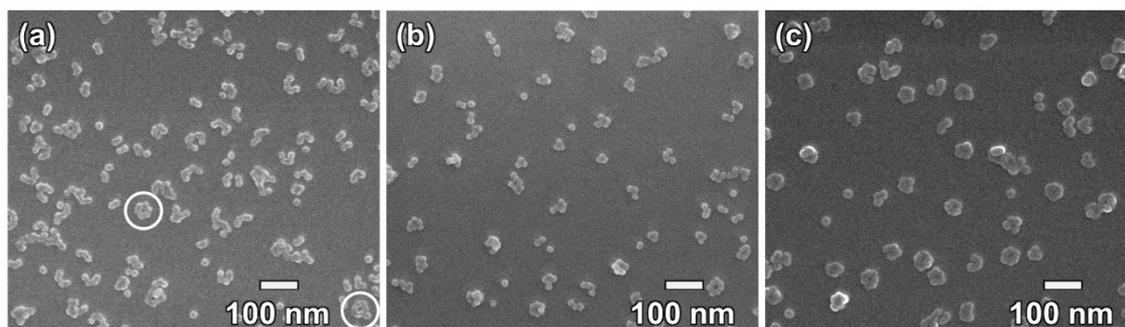


Fig.1 Scanning electron microscopy images of SNP self-assembly structures: (a) after 1 day, (b) after 3 days, and (c) after 14 days. In panel a, closed rings are highlighted with white circles. Adapted with permission from ref. [6]. Copyright 2023, American Chemical Society.

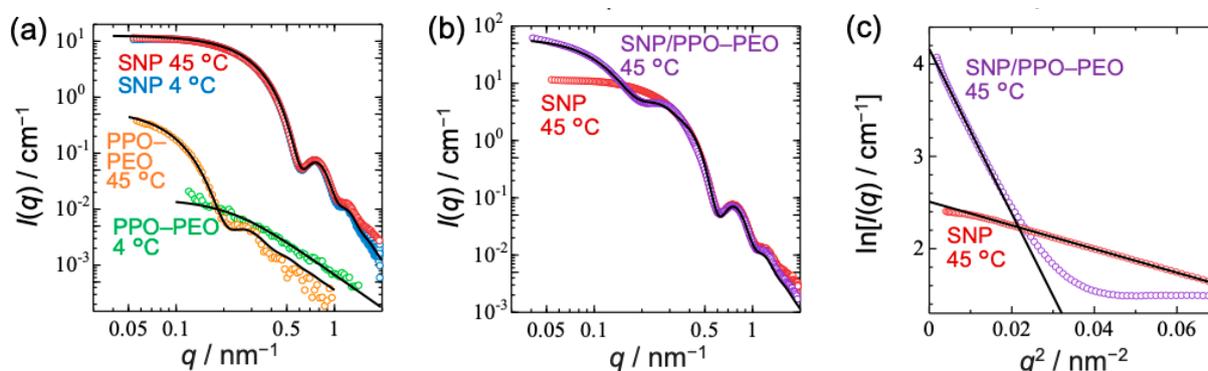


Fig.2 SAXS results: (a) SAXS profiles of SNP aqueous dispersion and PPO-PEO aqueous solution at 4°C and 45°C. (b) SAXS profiles at 45°C for a mixture of SNP aqueous dispersion and PPO-PEO aqueous solution and at 45°C for SNP aqueous dispersion. Solid lines in panels a and b represent fitting curves from the model. (c) Panel b is shown in the form of a Guinier plot. The solid line in panel c represents the extrapolated line. Adapted with permission from reference [6]. Copyright 2023 American Chemical Society.

とができた。一方、PPO-PEO は4℃においては散乱強度が小さく、45℃にすると q が小さい領域で散乱強度が増加した。これら PPO-PEO の散乱プロファイルはそれぞれガウス鎖と球状ミセルのモデル⁸⁾でよく再現された。PPO 水溶液は下限臨界相溶温度型の相挙動を示すことが知られており、4℃において PPO-PEO はどちらのブロックも親水性で、45℃にすると PPO ブロックが疎水性になりミセルを形成したと考えられる。

続いて、SNP 水分散液と PPO-PEO 水溶液の混合物 (SNP/PPO-PEO) を 45℃ に加熱した直後 (約 75 秒後) の結果を Fig.2b に紫色のシンボルで示す。ここで、SNP の X 線散乱のコントラストは PPO-PEO のそれよりも 24 倍程度高く、SNP と PPO-PEO の混合物における X 線散乱においては、PPO-PEO からの散乱は SNP からの散乱よりも無視できるほど小さい。すなわち、SNP/PPO-PEO の SAXS プロファイルには、ほとんど SNP の構造情報のみが反映されているとみなせる。Fig.2b には SNP のみの散乱プロファイルも重ねて示すように、SNP/PPO-PEO の散乱プロファイルは、 q が小さい領域で SNP のみの散乱プロファイルと異なっている。

q が小さい領域の散乱強度は散乱体のモル質量に比例するため、SNP が自己集合していることがわかる。Guinier プロット (Fig.2c) の形にして、 q を 0 に外挿したときの散乱強度は、SNP/PPO-PEO の場合に、SNP のみの場合より 5.0 ± 0.1 倍大きいことが明らかとなった。すなわち、5つの SNP が自己集合したと言える。

この SNP と PPO-PEO の混合物の散乱プロファイルの構造を調べるために、SNP (球) が様々な構造に集合した形状因子のモデルを計算し、実験結果と比較した。結果として、球の中心が正五角形の頂点に位置するモデルが最もよく実験値を再現した (Fig.3a, b)。さらに、DENSS アルゴリズム⁹⁾を用いると、散乱プロファイルから正五角形状に球が並んだ実空間像が構築された。これらの解析から、SNP は、PPO-PEO 存在下において 45℃ にすると直ちに自己集合して正五角形の頂点に位置する構造を形成すると結論づけられた。

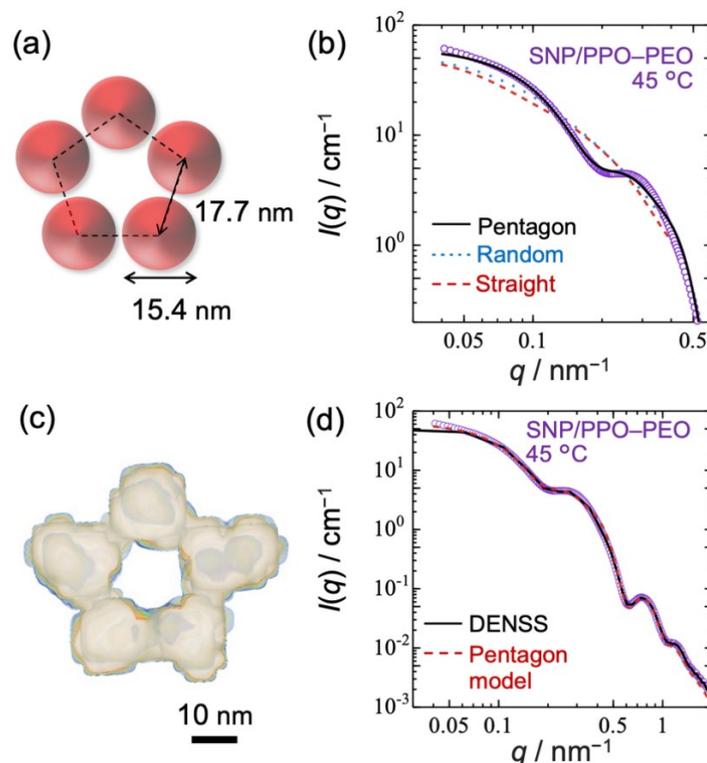


Fig.3 (a) Models used for fitting SAXS profiles of SNP/PPO-PEO at 45°C. (b) Fitting curves for various models. The solid line represents a model with spheres located at the vertices of a regular pentagon, the dotted line represents a model with six spheres randomly meeting, and the dashed line represents a model with six spheres aligned on a straight line. (c) Real-space image constructed by DENSS from SAXS profiles of SNP/PPO-PEO at 45°C. (d) SAXS profile of SNP/PPO-PEO at 45°C overlaid with the scattering function for the structure in panel a (dashed line) and the scattering profile constructed from the image in panel c transformed to inverse space (solid line). Adapted with permission from ref. [6] Copyright 2023, American Chemical Society.

走査型電子顕微鏡による *ex situ* 観察では、SNP がチェーン状に自己集合したのちに湾曲し、数日かけて閉環したリングを形成する機構が示唆された一方で、SAXS による *in situ* 観察では、リング状配列体は昇温後速やかに形成された。リング形成速度に関するこの違いはどのように説明されるのだろうか？我々は、SNP リングの構造安定性に由来すると考えている。本研究で用いた SNP は、自己集合して互いに接すると、表面のシラノール基 (SiOH 基) が脱水縮合し、シロキサン結合 (Si-O-Si 結合) を生じて自己集合構造が固定化される²⁾。SNP のリング状自己集合は、PPO-PEO が両親媒性を示す条件下で速やかに起こるが、SNP 間に化学結合が形成するには数日を要するため、走査型電子顕微鏡観察において SNP リングが基板にスピコートされた際、物理的に解離あるいは変形し、単粒子、二粒子、湾曲したチェーン状集合体等として観察されたと考えられる。つまり、PPO-PEO の存在下で SNP がリング状に自己集合する本現象は、PPO-PEO が両親媒性を示す条件下で速やかに起こり、その後数日をかけて SNP 間に化学結合が形成することで、リング状構造が固定化されると言える。

3-2. ポリペプチド存在下における SNP 自己組織化

使用したポリペプチド [VPGX₁G]₅₀-[VPGX₂G]₆₀ (X₁=V (80%), F (20%), X₂=A (60%), G (40%)) の下限臨界共溶温度は、左側のブロックで約 20°C、右側のブロックで約 60°C であり、45°C の条件でミセルを形成する⁷⁾。PPO-PEO を用いた場合と同様に、まず粒径 15 nm の SNP 分散液にポリペプチドを混合したのち 45°C に昇温したところ、粒子が凝集・沈殿した。ポリペプチドのミセル径は約 30 nm であり⁷⁾、PPO-PEO のミセル径が約 46 nm⁶⁾ であるのと比較して小さい。SNP のサイズに対してミセル径が小さいと SNP が鎖状に集合する傾向があるため⁵⁾、SNP の粒径を 11 nm に変更して同様の実験を行った。この場合には沈殿が生じず、走査型電子顕微鏡観察では Fig. 4 に示すような粒子集合体を得られた。リング様の配列体に加えて、金平糖様の配列体が多数観察された。

粒径 11 nm の SNP とポリペプチドを混合して 45°C に昇温した直後の SAXS プロファイルを示す。青色のシンボルが試料からの散乱である。この散乱プロファイルは、図中にオレンジ色で示すような SNP が立方体の 8 つの頂点に存在する構造の散乱関数モデルでフィッティングできた。

なお、本研究においては様々なパラメータ (ポ

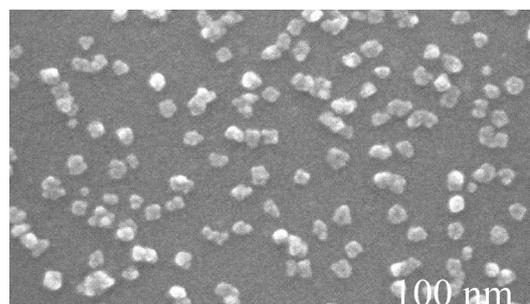


Fig. 4 Scanning electron microscopy image of SNP self-assembly structures formed in the presence of polypeptide after 1 day.

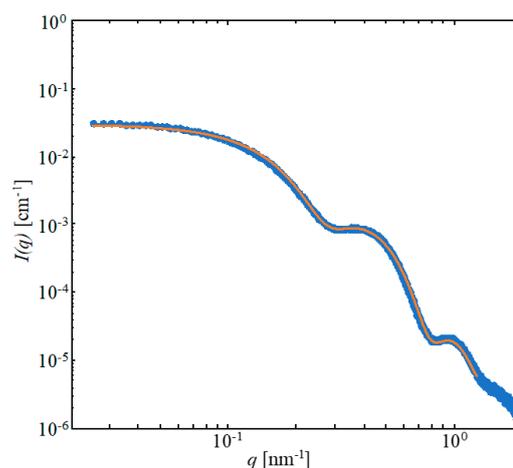


Fig. 5 SAXS profiles for a mixture of SNP aqueous dispersion and the polypeptide at 45°C (blue symbols). Solid line represents a fitting curve from the model.

リペプチド鎖長、温度、pH)等を変化させて粒子配列構造を解析した。いずれの場合においても、ポリペプチドを用いた場合には二次元的なリング状配列体よりも、三次元的な金平糖様配列体が得られる傾向が見られた。この理由は現時点で不明であるが、柔軟な高分子鎖を有する合成高分子と比較して、ポリペプチドにおいては β -turn等の二次構造が存在し、ミセル構造がより剛直であることが関与している可能性がある。

4. 結論

水中で SNP と両親媒性の PPO-PEO を混合すると、SNP がリング状に自己集合する珍しい現象について、走査型電子顕微鏡を用いた *ex situ* 観察、および小角 X 線散乱による *in situ* 観察から、自己集合の速度、構造安定性、液相における構造単分散性を明らかにできた。さらに、ポリペプチドを用いた場合には金平糖状の SNP 配列体が得られ、高分子の構造によって粒子配列制御が可能であることを示した。本系で得られる高分子/無機ナノ粒子リング状複合体は、液相中で沈殿を生じない安定なコロイド分散液であることから、分散液の力学物性等も興味深い。また、この現象を SNP に留まらず金属ナノ粒子に展開できれば、特異な光学的性質を示すメタ流体としても発展が期待される。

5. 謝辞

本研究は、令和4年度日本板硝子材料工学助成会の研究助成を受けて遂行しました。同助成会に心より御礼申し上げます。SAXS 測定は SPring-8 (課題番号 2020A1198, 2021A1270, 2022A1193, 2022B1233) において実施しました。

6. 参考文献

- 1) M. Fukao, A. Sugawara, A. Shimojima, W. Fan, M. A. Arunagirinathan, M. Tsapatsis, T. Okubo, *J. Am. Chem. Soc.* 131, 16344-16345 (2009).
- 2) S. Zhou, T. Sakamoto, J. Wang, A. Sugawara-Narutaki, A. Shimojima, T. Okubo, *Langmuir* 28, 13181-13188 (2012).
- 3) S. Zhou, Y. Oda, A. Shimojima, T. Okubo, S. Aoshima, A. Sugawara-Narutaki, *Polym. J.* 47, 128-135 (2015).
- 4) C. Atsumi, S. Araoka, K. B. Landenberger, A. Kanazawa, J. Nakamura, C. Ohtsuki, S. Aoshima, A. Sugawara-Narutaki, *Langmuir* 34, 7751-7758 (2018).
- 5) S. Zhou, A. Sugawara-Narutaki, S. Tsuboike, J. Wang, A. Shimojima, T. Okubo, *Langmuir* 31, 13214-13220 (2015).
- 6) R. Takahashi, K. Yamamoto, R. Sugahara, R. Otake, K. Hayashi, J. Nakamura, C. Ohtsuki, S. Aoshima, A. Sugawara-Narutaki, *Langmuir* 39, 11379-11387 (2023).
- 7) J. Pille, A. Aloï, D. H. T. Le, I. Vialshin, N. van de Laar, K. Kevenaar, M. Merckx, I. K. Voets, J. C. M. van Hest, *Small* 2 17, 2007234 (2021).
- 8) J. S. Pedersen, M. Gerstenberg, *Macromolecules* 29, 1363-1365 (1996).
- 9) T. D. Grant, *Nat. Mater.* 15, 191-193 (2018).