

原子間力顕微鏡を用いた温度応答性高分子のナノスケール構造解析

Nanoscale Structure Analysis of Temperature-Responsive Polymer using an Atomic Force Microscope

竹原真紀 Maki TAKEHARA

(ライフサイエンス専攻 人間生活工学コース)

1. はじめに

近年, 高分子科学分野では, 光, 熱, pH, 電気刺激等の外部刺激に対し形状や物性を変化させる, 刺激応答性高分子を利用した材料の研究開発が盛んに行われている. この一つである温度応答性高分子は, 水溶液中においてスレッシュホールド温度をさかいに可逆相転移現象をおこすもので, 化学分析や生体検査, 薬物送達システム (Drug Delivery System: DDS) の分野への応用が期待される.

1-1 温度応答性高分子の性質

温度応答性を示すポリ-*N*-イソプロピルアクリルアミド(PNIPAAm)は, 下限臨界溶液温度(LCST)32°C付近を境に, 低温側では水に溶解し, 高温では高分子鎖が凝集し不溶性となる¹⁾ (Fig. 1). このLCSTはヒトの体温に近い32°Cであることから, バイオマテリアルとしても注目されている.

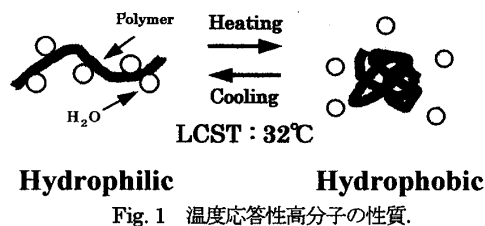


Fig. 1 温度応答性高分子の性質.

1-2 原子間力顕微鏡 (AFM)

AFMは, 試料表面と探針間に働く原子(分子)間力を一定に保ちながら試料表面を走査し, 試料表面の凹凸形状を画像化する顕微鏡²⁾であり, 電子顕微鏡と同程度, もしくはそれ以上のナノスケール分解能を有する. また観察環境については大気中, 真空中, さらに液体中で可能であることから, 観察対象は金属や半導体のみならず, 生物試料や生体分子の経時的測定なども可能であり, 生物学, 医学に大きく貢献している³⁾.

2. 目的

本研究では, 温度応答性高分子をナノデバイスとして利用するための基礎研究として, 高分子のナノスケール挙動解析を行うことを目的とした. 具体的には, 大気中および溶液中において, ガラス基板に結合させた高分子試料の形状を原子間力顕微鏡(AFM)を用いて測定するとともに, 溶液中における分子鎖の挙動変化を解析した.

3. 実験方法

3-1 PNIPAAmの合成とガラス基板への導入

PNIPAAmは, *N*-イソプロピルアクリルアミド

(IPAAm), 3-メルカプトプロピオン酸(MPA), ラジカル開始剤としての2,2'アゾビスイソビチロニトリル(AIBN)を用い, ラジカル重合により合成した. 回収したPNIPAAmのカルボキシル基を, 縮合剤のNN'ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)とジメチルホルムアミド(HoSu)と反応させることで活性エステル化させた.

次に, 高分子のガラス基板への固定は, 活性エステル化PNIPAAmの末端のカルボキシル基とガラス表面のアミノ基とのアミド結合により行った. すなわち活性エステル化PNIPAAm溶液に, 表面を3-アミノプロピルトリエトキシシランでコーティングしたシランコートスライドガラスを常温で24時間反応させた(Fig. 2). PNIPAAmの分子量は10330, 溶液濃度は 1.0×10^{-6} mol/L, 1.0×10^{-7} mol/Lとした.

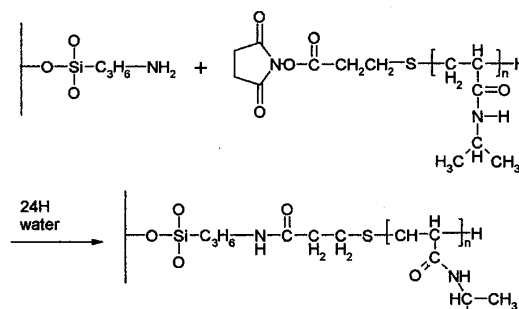


Fig. 2 PNIPAAmのガラス表面への導入.

3-2 AFMによる測定

本実験では, 走査型プローブ顕微鏡SPM-9500(島津製作所製)を用い, 作製したPNIPAAm導入ガラスを大気中および液中環境にて測定した.

(1)大気中測定

濃度(a) 1.0×10^{-6} mol/L, (b) 1.0×10^{-7} mol/L溶液中で作製したPNIPAAm固定化ガラスを高温100°C(>LCST), ならびに低温25°C(<LCST)の温度下で乾燥させたもの, また比較対照として(c)洗浄したスライドガラスを観察試料とした. バネ定数42 N/mのカンチレバー(オリンパス製)を用い, 常温, 大気中下でダイナミックモードで表面測定した.

(2)液中測定

1.0×10^{-6} mol/L溶液中で作製したPNIPAAm固定化ガラスを, 蒸留水中に浸したものを観察試料とした. バネ定数0.57 N/mまたは0.15 N/mのカンチレバー(オリンパス社製)を用い, コンタクトモードにて, 溶液温度を25°C及び35°Cとして, 試料表面の断面プロファイルカーブを測定した.

4. 結果

4-1 大気中測定結果

各試料の測定範囲内における、500 nm×500 nm 範囲の表面粗さ解析を行った結果を Table 1 に示す。

	R_{ms} / nm	
	低温乾燥	高温乾燥
(a)	0.56±0.28	0.47±0.11
(b)	0.55±0.47	0.41±0.14
(c)	0.29±0.11	

低温乾燥における R_{ms} は、(c)と比較して(a), (b)では増加した。これは(a), (b)の試料表面の凹凸がガラスのものより増加したことを示し、表面に高分子が結合したことが分かる。

低温乾燥時と高温乾燥時の R_{ms} 値に関しては、(a), (b)共に高温乾燥時で R_{ms} 値は減少しており、高温乾燥時に分子鎖が収縮した状態で乾燥したと考えられる。LCST 以下の低温溶液中では分子鎖は膨潤し、また LCST 以上では分子鎖が収縮した状態となることを実証する結果を得た。

PNIPAAm 固定時の溶液濃度に関しては、(a)ならびに(b)から得られた R_{ms} 値に差は見られなかったことから、ガラス基板に結合した高分子数には差がないと考えられる。従って、試料作製時の溶液濃度と、ガラス基板との高分子の結合数に関して相関は得られなかった。

4-2 液中測定結果

AFM 観察像から、断面線を抽出し、断面線粗さ解析を行った。Fig. 3 に測定範囲 1 μm における高さデータを示す。

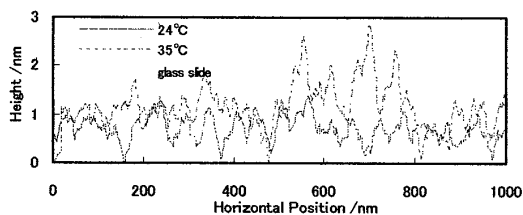


Fig.3 測定断面線の比較。

液温を 25°C から 35°C に上昇させた場合、プロファイルカーブの高低差は増加した。次に、測定したプロファイルカーブの断面線粗さ解析を行った結果を Table 2 に示す。

	25°C	35°C	Glass slide
R_{ms}/nm	0.45±0.26	0.60±0.32	0.18±0.03

35°C の水中化での R_{ms} 値は、液温 25°C のそれと比較し増加しており、35°C における試料表面形状は 25°C でのそれより粗くなった。

5. 考察

4-1 大気中における測定結果から、PNIPAAm 分子

がガラス基板に結合したことを確認した。同濃度溶液により作製した試料で、乾燥時の温度により R_{ms} 値に差が生じることは、溶液中で分子鎖の形状を保持したまま乾燥したためと考えられる。

Fig. 3 に関して水平・垂直のスケールは大きく異なることに注意してプロファイルにおける 1 つの凸形状について見ると、水平長が数十 nm 以上あるのに対し、高さは数 nm であることが分かる。LCST 以上の温度での高分子状態が球状であることを考えると、測定された凸形状が 1 分子を意味するものとは考えにくい。

ここで、液体中における 1 分子のおおよその大きさとして高分子の平均直径を考える。高分子の両端を結ぶベクトル R は、 $\langle R^2 \rangle = Nb^2$ (N : ボンドの個数, b : ボンド長さ) で表され、 R の大きさを高分子の平均直径とみなすことができる。おおよそ $N=100$, $b=0.2$ nm として計算すると $|R| = 2$ nm となる。測定で得たプロファイル上の凸形状の水平長さは数十 nm であり、計算で得た分子の大きさとは 10 倍異なる。このことから、断面プロファイル上の凹凸は 1 分子の形状ではなく分子の集合体であり、AFM 測定ではガラスに固定された分子層の上面を走査していたと考えられる。また、LCST 以下では PNIPAAm は親水性であるため、高分子鎖が膨潤している。AFM の原理上、試料自身がゆらぐ場合の測定では、試料形状を正確に捉えることは難しいため、LCST 以下の 25°C の測定においてプロファイル高低差が小さくなったと考えられる。

高分子 1 分子計測については、蛍光分子標識による DNA 観察⁴⁾ や筋肉分子の観察⁵⁾ に始まり、X 線を用いた DNA の運動計測⁶⁾ なども報告されている。分子の構造解析、形状計測または分子分布を見るなど、目的により求める精度も異なるが、1 分子を観察できるかは試料作製法に依存するところが大きいと考えられる。

6. 結論

AFM による粗さ解析から、LCST 前後で PNIPAAm 分子の形状が変化することを確認した。本研究における AFM 計測では 1 分子を捕らえたとは言いきれないため、試料の作製方法についてさらに検討が必要である。

【謝辞】

本研究にご協力・ご助言いただきました共立薬科大学 金澤秀子教授ならびに綾野絵理助手、お茶の水女子大学 仲西正助教授に感謝いたします。

【参考文献】

- 1) M. Heskins, et al.: *J. Macromol. Sci. Chem*, A2, 1441(1968)
- 2) G. Binnig, et al.: *Phys. Rev. Lett*, 56, 930 (1986)
- 3) 小堀俊郎ら: *生物物理*, 44(6), 255(2004)
- 4) S. Matsumoto, et al.: *J. Mol. Biol.*, 152(2), 501(1981)
- 5) T. Yanagida, et al.: *Nature*, 307, 58(1984)
- 6) T. Okajima, et al.: *Biophys. Chem.*, 107(1), 51(2004)

(指導教員 太田裕治)