

- [8] Bertini I., Scozzafava A.: Copper(II) as probe in substituted metalloproteins. in 'Metal ions in biological systems' (Ed.: Sigel H.) Marcel Dekker, New York, **12**, 31–74 (1981).
- [9] Kowalik-Jankowska T., Ruta-Dolejsz M., Wisniewska K., Lankiewicz L., Kozłowski H.: Copper(II) complexation by human and mouse fragments (11–16) of β -amiloid peptide. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 4511–4519 (2000).
- [10] Aronoff-Spencer E., Burns C. S., Avdievich N. I., Gerfen G. J., Peisach J., Antholine W. E., Ball H. L., Cohen F. E., Prusiner S., Millhauser G. L.: Identification of the Cu²⁺ binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy. *Biochemistry*, **39**, 13760–13771 (2000).
- [11] Kumar A., Kamihira M., Galaev I. Y., Iijima S., Mattiasson B.: Binding of Cu(II)-poly(*N*-isopropylacrylamide)/vinylimidazole copolymer to histidine-tagged protein: a surface plasmon resonance study. *Langmuir*, **16**, 865–871 (2003).
- [12] Kumar A., Wahlund P.-O., Kepka C., Galaev I. Y., Mattiasson B.: Purification of histidine-tagged single-chain Fv-antibody fragments by metal chelate affinity precipitation using thermoresponsive copolymers. *Biotechnology and Bioengineering*, **84**, 494–503 (2003).
- [13] Carter S., Rimmer S., Sturdy A., Webb M.: Highly branched stimuli responsive poly[(*N*-isopropylacrylamide)-co-(1,2-propandiol-3-methacrylate)]s with protein binding functionality. *Macromolecular Bioscience*, **5**, 373–378 (2005).
- [14] Carter S., Rimmer S., Rutkaite R., Swanson L., Fairclough J. P. A., Sturdy A., Webb M.: Highly branched poly(*N*-isopropylacrylamide) for use in protein purification. *Biomacromolecules*, **7**, 1124–1130 (2006).
- [15] Stile R. A., Burghardt W. R., Healy K. E.: Synthesis and characterization of injectable poly(*N*-isopropylacrylamide)-based hydrogels that support tissue formation in vitro. *Macromolecules*, **32**, 7370–7379 (1999).
- [16] Cini R., Defazio S., Tamasi G., Casolaro M., Messori L., Casini A., Morpurgo M., Hursthouse M.: *fac*-(Ru(CO)₃)²⁺-core complexes and design of metal-based drugs. Synthesis, structure, and reactivity of Ru-thiazole derivative with serum proteins and absorption-release studies with acryloyl and silica hydrogels as carriers in physiological media. *Inorganic Chemistry*, **46**, 79–92 (2007).
- [17] Casolaro M., Casolaro I., Spreafico A., Capperucci C., Frediani B., Marcolongo R., Margiotta N., Ostuni R., Mendichi R., Samperi F., Ishii T., Ito Y.: Novel therapeutic agents for bone resorption. Part 1. Synthesis and protonation thermodynamics of poly(amidamine)s containing bis-phosphonate residues. *Biomacromolecules*, **7**, 3417–3427 (2006).
- [18] Lin J. H.: Bisphosphonates: A review of their pharmacokinetic properties. *Bone*, **18**, 75–85 (1996).
- [19] Casolaro M., Bottari S., Ito Y.: Vinyl polymers based on L-histidine residues. Part 2. The swelling and electric behaviour of smart poly(ampholyte) hydrogels for biomedical applications. *Biomacromolecules*, **7**, 1439–1448 (2006).
- [20] Nitschke M., Götze T., Gramm S., Werner C.: Detachment of human endothelial cell sheets from thermoresponsive poly(NiPAAm-co-DEGMA) carriers. *Express Polymer Letters*, **1**, 660–666 (2007).
- [21] Morcellet-Sauvage J., Morcellet M., Loucheux C.: Polymethacrylic acid derivatives. 1. Preparation, characterization, and potentiometric study of poly(*N*-methacryloyl-L-alanine-co-*N*-phenylmethacrylamide). *Die Makromolekulare Chemie*, **182**, 949–963 (1981).
- [22] Ishii T., Wada A., Tsuzuki S., Casolaro M., Ito Y.: Copolymers including L-histidine and hydrophobic moiety for preparation of nonbiofouling surface. *Biomacromolecules*, **8**, 3340–3344 (2007).
- [23] Okamoto Y.: Hydrolyses of α -amino acid p-nitrophenyl esters by poly(*N*-methacryloyl-L-histidine) (in Japanese). *Journal of The Chemical Society of Japan*, **6**, 870–873 (1978).
- [24] Iwakura Y., Toda F., Suzuki H.: Synthesis of *N*-[1-(1-substituted 2-oxopropyl)]acrylamides and -methacrylamides. Isolation and some reactions of intermediates of the Daikin-West reaction. *Journal of Organic Chemistry*, **32**, 440–443 (1967).
- [25] Rempp P., Merrill E. W.: Polymer synthesis. Huthig and Wepf, Basel (1991).
- [26] Penco M., Bignotti F., Sartore L., Peroni I., Casolaro M., D'Amore A.: Stimuli-responsive polymers based on *N*-isopropylacrylamide and *N*-methacryloyl-L-leucine. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **202**, 1150–1155 (2001).
- [27] Barbucci R., Casolaro M., Danzo N., Barone V., Ferruti P., Angeloni A.: Effect of different shielding groups on polyelectrolyte behaviour of polyamines. *Macromolecules*, **16**, 456–462 (1983).
- [28] Gans P., Sabatini A., Vacca A.: Superquad: an improved general program for computation of formation constants from potentiometric data. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1195–1200 (1985).
- [29] Ishiyama M., Tominaga H., Shiga M., Sasamoto K., Ohkura Y., Ueno K.: A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **19**, 1518–1520 (1996).
- [30] Casolaro M.: Vinyl polymers containing L-valine and L-leucine residues: thermodynamic behaviour of homopolymers and copolymers with *N*-isopropylacrylamide. *Macromolecules*, **28**, 2351–2358 (1995).
- [31] Casolaro M., Barbucci R.: Thermodynamic behaviour of polyelectrolytes with the lower critical solution temperature (LCST) phenomena. *Polymers for Advanced Technologies*, **7**, 831–838 (1996).

- [32] Casolaro M.: Intelligent polymer systems for molecular separation and controlled delivery of drugs. In 'Frontiers in biomedical polymer applications' (Ed.: Ottenbrite R. M.) Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, Vol. 1, 109–122 (1998).
- [33] Montaudo G., Montaudo M. S.: Polymer characterization methods. in 'Mass Spectrometry of Polymers' (Eds.: Montaudo G., Lattimer R. P.) CRC Press, Boca Raton, 41–111 (2002).
- [34] Montaudo G., Montaudo M. S., Samperi F.: Matrix-assisted laser desorption ionization/mass spectrometry of polymers (MALDI-MS). in 'Mass Spectrometry of Polymers' (Eds.: Montaudo G., Lattimer R. P.) CRC Press, Boca Raton, 419–521 (2002).
- [35] Montaudo G., Samperi F., Montaudo M. S.: Characterization of synthetic polymers by MALDI-MS. *Progress in Polymer Science*, **31**, 277–357 (2006).
- [36] Morawetz H.: *Macromolecules in Solution*, Wiley-Interscience, New York (1980).
- [37] Katchalsky A., Spitnik P.: Potentiometric titrations of polymethacrylic acid. *Journal of Polymer Science*, **2**, 432–446 (1947).
- [38] Murai N., Sugai S.: Side-chain effect on conformation of ionizable polypeptides in aqueous solution. *Biopolymers*, **13**, 1161–1171 (1974).
- [39] Barbucci R., Casolaro M., Magnani A., Roncolini C.: Different protonation behaviour of two poly (methacrylic acid) derivatives containing *N*-acylglycine and *N*-acyl- β -alanine residues: Thermodynamic and FT-IR studies. *Macromolecules*, **24**, 1249–1257 (1991).
- [40] Schild H. G., Tirrel D. A.: Microcalorimetric detection of lower critical solution temperatures in aqueous polymer solutions. *The Journal of Physical Chemistry*, **94**, 4352–4356 (1990).
- [41] Kudaibergenov S. E.: *Polyampholytes: synthesis, characterization and application*. Kluwer Academic, New York (2002).
- [42] Bekturov E. A., Bakauova Z. Kh.: *Synthetic water-soluble polymers in solution*. Huethig and Wepf Verlag, Basel (1986).

〔総合論文〕

ナノ界面テクノロジーによる機能表面創出

伊藤 嘉浩*1

(受付 2007 年 8 月 22 日・審査終了 2007 年 10 月 22 日)

要 旨 ナノ・レベルで材料表面を修飾するナノ界面テクノロジーによって、機能性表面の創出を行った。第一は、親水・疎水性の傾斜表面を光分解反応により、定量的に再現性高く創り出し、水滴移動を評価し、考察した。第二には、自励振動高分子を固体表面に固定化し、その振動現象を走査プローブ顕微鏡で観察することができた。第三には、天然あるいは合成の光反応性高分子を新たに合成し、生体成分との相互作用を減じる新しい生体適合性材料の合成に成功した。

1 緒 言

表面の性質はナノメートル・レベルの修飾で顕著に制御することが可能である。これまでに私の研究グループではさまざまな表面修飾により、材料の機能化を図ってきた^{1)~3)}が、ここでは、定量的に再現性高く表面に親水・疎水の傾斜を作成することにより水滴移動表面の創出を行った例、自励振動高分子を固定化することにより振動表面を創出した例、そしてタンパク質や細胞との相互作用を抑制するいくつかの高分子を新たに合成し、生体不活性表面の創出を行った例について述べる。

2 水滴移動のためのナノ修飾表面

傾斜表面はその応用、材料科学において非常に有用である^{4)~23)}。たとえば、化学物質の濃度傾斜を作成すれば、その傾斜に従ってマイクロ流体の物質輸送が可能となり、細胞の走化性を調べることも可能である。そのため、これまで温度制御²⁴⁾、蒸気拡散^{4),7)~12),14),15)}、電気化学^{25)~27)}、光リソグラフィ^{19),20)}、傾斜浸漬^{16),17)}、光開始媒介光重合²⁸⁾、コロナ放電²⁹⁾、コンタクト・プリンティング³⁰⁾、マイクロ流路デバイス³¹⁾、そしてマイクロ構造³²⁾などさまざまな傾斜表面調製法が報告されてきた。表面性質の傾斜化だけでなく、タンパク質の濃度傾斜化も行われてきた^{33)~39)}。しかし、従来の方法は物質の拡散を使った傾斜作成のため、再現性よく定量的に傾斜表面を作成するには困難を要した。そこで、本研究では、この困難を克服するために、新しい調製法の開発を行い、親水・疎水の傾斜表面を調製し、その上での水滴の移動を定量的に評価することに成功した⁴⁰⁾。

2.1 傾斜表面の調製

Figure 1 に示すように、ガラス板の上にアルキルシランカップリング処理を行った後、真空 UV (VUV, 波長; 172 nm, ウシオ電機(株)製, モデル UER20-172V) を照射して光分解を行った⁴¹⁾。具体的には、まず購入したガラス板(カバーガラス, 18×18 mm²)にあらかじめ VUV を照射し、光洗浄した後、*n*-オクタデシルメトキシシラン [ODS, CH₃(CH₂)₁₇Si(OCH₃)₃] の脱水トルエン溶液に 80°C で 5 時間浸漬してシランカップリング処理を行い、最後に 4 時間、80°C で真空乾燥した。照射時間中にサンプルを移動できるような装置 (Figure 2) を開発し、得られたシランカップリング・ガラスを Figure 2 に示すような場所に装填した。そして、半分の面をクロムで不透明にした光マスクで覆い、試料台を移動 (50~100 μm/s) することにより、VUV の照射量を傾斜的に変化できるようにした。

VUV 照射による表面性質の変化を接触角により評価した (Figure 3)。照射強度、照射時間とともに単調に接触角が減少することがわかった。Figure 3b には、Figure 3a から得られたデータを元に親水・疎水の傾斜を照射時間を移動速度へ置き換えて計算した結果を示す。距離 6 mm にわたり、100° から約 25° までの疎水・親水傾斜が形成できたと考えた。

実際の傾斜表面の形成は、蛍光染色剤のフルオレセミン (FA) のカップリング反応によって定性的に確認した。クロロメチルフェニル自己集積単分子 (SAM) と COOH 末端 SAM の光化学についてはいくつかの報告がある^{41)~43)}。これらの場合、-CH₂Cl 基が UV 光を吸収し、酸素による酸化が起こる。一方、アルキルシラン基の VUV 分解では、軟 X 照射の場合のように、C-C、C-H、や C-Si 結合の分解が起こり、ラジカルが形成さ

*1 (独)理化学研究所 (☎351-0198 和光市広沢 2-1)

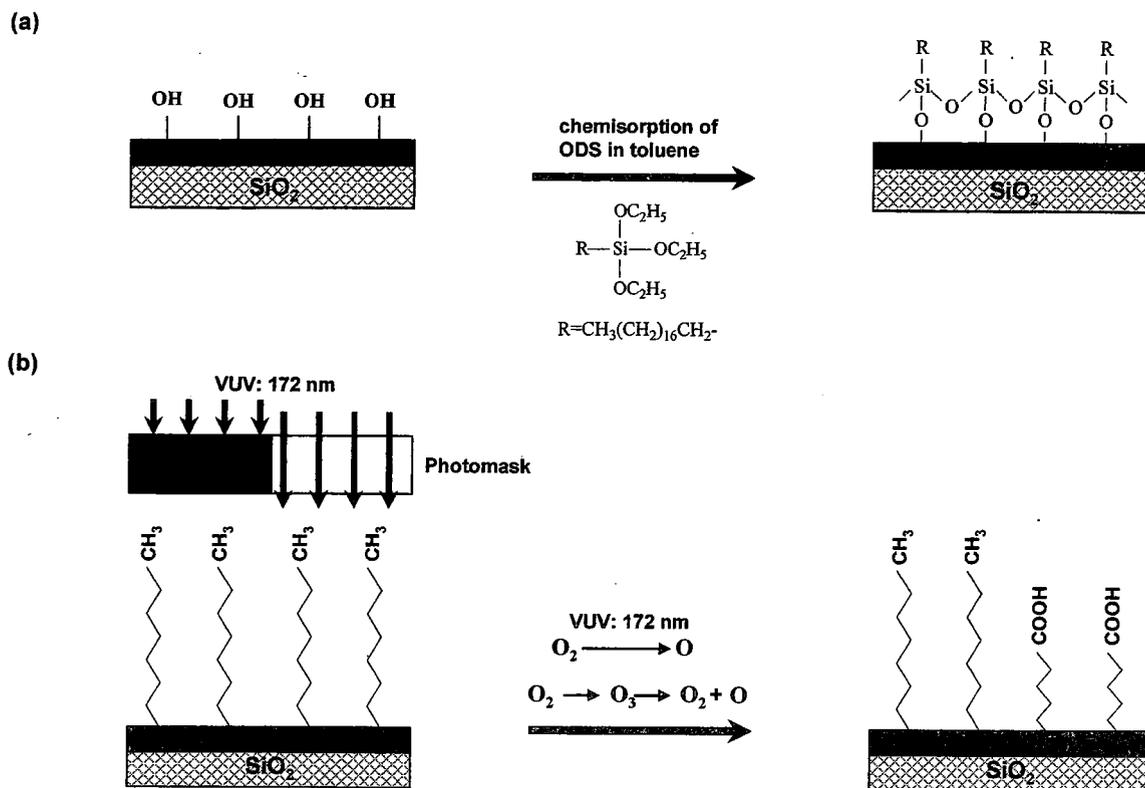


Figure 1. Preparation of a surface hydrophilicity gradient by photodegradation. (a) Surface treatment of glass plates with a silane coupling reagent. (b) Excitation of the surface molecules and oxygen by VUV irradiation and subsequent oxydation. Reproduced with permission from *Langmuir*, 23, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

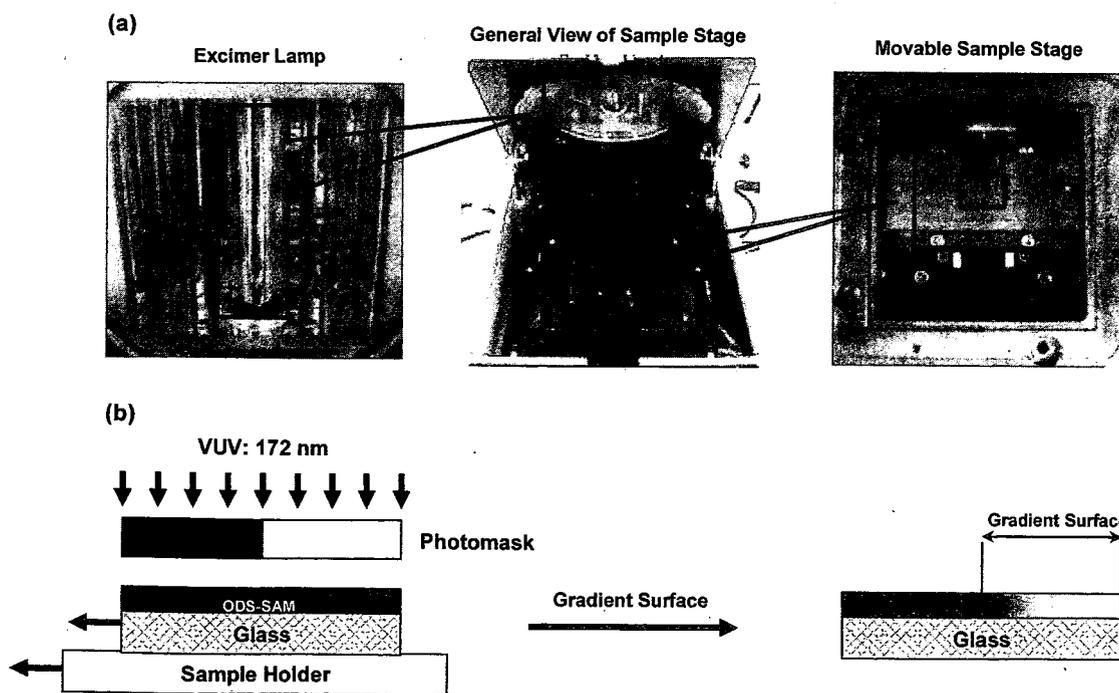


Figure 2. The photoirradiation apparatus used to prepare gradient surface. (a) A general view of the excimer device, (b) preparation of a gradient surface on an ODS-SAM surface using the VUV excimer device. The hydrophobicity and hydrophilicity of the SAM surface is shown by the gray and white colors. Reproduced with permission from *Langmuir*, 23, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

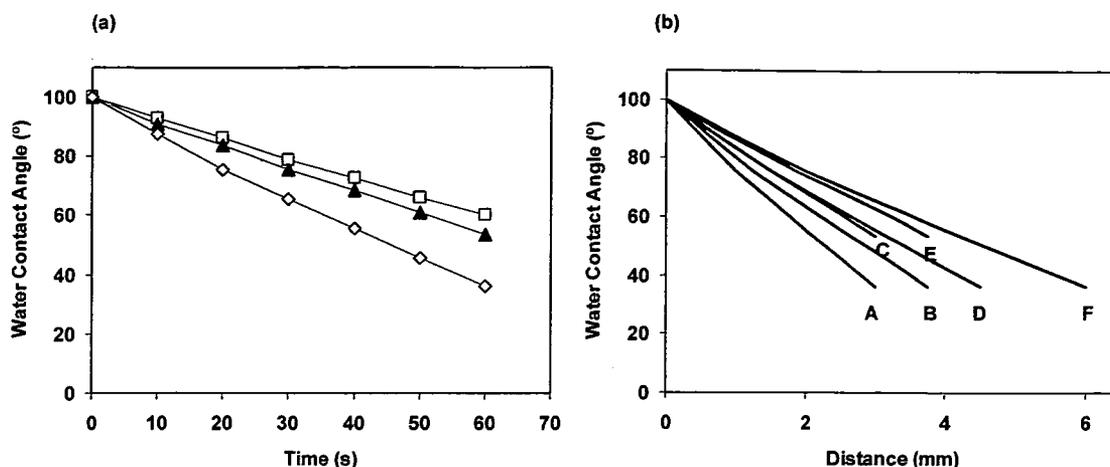


Figure 3. Water contact angle measurements. (a) Static water contact angles at different irradiation light intensities: \diamond ; 3.3 mW/cm², \blacktriangle ; 1.2 mW/cm², and \square ; 0.6 mW/cm². (b) The distance-dependent water contact angle is calculated using data from Figure 3(a). The irradiation energy and sliding rate were (A) 3.3 mW/cm² and 0.05 mm/s, (B) 3.3 mW/cm² and 0.0625 mm/s, (C) 1.2 mW/cm² and 0.05 mm/s, (D) 3.3 mW/cm² and 0.075 mm/s, (E) 1.2 mW/cm² and 0.0625 mm/s, and (F) 3.3 mW/cm² and 0.1 mm/s. Reproduced with permission from *Langmuir*, 23, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

れると考えられる⁴¹⁾。生成されたラジカルはさらに空気中の酸素や水分子と反応する。また同時に、VUVは酸素に吸収されて原子酸素も生み出す。これら活性酸素原子は非常に強い酸化作用があるため、VUVで励起・光分解された ODS-SAM から形成された有機ラジカル(過酸化ラジカル)は水分子と反応して-COOH 基となる。VUVの照射時間が長くなると ODS-SAM は揮発性の水や一酸化炭素、二酸化炭素になり、基材から消失する。VUV 照射によって形成されたカルボキシル基への FA を反応させ、蛍光顕微鏡で観察すると Figure 4 のような像が得られ、確かに傾斜表面が形成されていることがわかった。

2.2 水滴の移動

調製した親水・疎水傾斜表面に 2 μ L の水滴を滴下し、既に報告した方法で水滴の移動を観察した。すると、疎水領域から親水領域への移動が観測された (Figure 5)。VUV の照射時間や強度を変えることによりぬれ勾配を変化させると、ぬれ勾配が高いほど、水滴の移動速度が高いことがわかった。再現性高くぬれ勾配のある表面を作成できたことから、この勾配に依存した水滴移動について、いくつかの観点から考察した。

まず、異なった条件下での水滴移動速度を中島らの開発した装置⁴⁴⁾を用いて定量的に測定した (Figure 6)。そして、傾斜勾配との関係を求めたところ、Figure 7 に示すように、傾斜勾配に依存して平均速度 0.5~6 mm/s の範囲で傾斜表面上を移動することがわかった。より傾斜の高い表面で、水滴移動速度が速くなることが定量的にわかった。

水滴移動は、傾斜表面の接触角ヒステリシスに起因すると報告されている。Figure 8 は、移動中の水滴の前身接触角と後退接触角を示しており、ヒステリシスが存在していることがわかる。最近、Moumen ら¹⁴⁾は、「急な」勾配と「緩やかな」勾配を調製し、彼ら自身が作ったモデル¹²⁾に従って解析を報告している。

ここで筆者らは、水滴移動の原因にこのようなヒステリシス効果に加えて、新しくパーコレーション理論を加えることを提案する。Semal ら⁴⁵⁾は、アルカンチオール の混合単分子層の上を広がる有機物(スクアレン)の動力学を研究し、チオールの親水性と疎水性比を変え、スクアレンのぬれ転移が表面の水酸化が 70% 以上になって起こることを報告した。しかしながら、その表面は傾斜化されておらず、水滴移動に関してはこの種の研究はなかった。二次元表面でのパーコレーション閾値は約 0.45⁴⁶⁾であることが知られている。一方、Cassie の式⁴⁷⁾によると、複合固体表面の接触角は次式で表される。

$$\cos \theta = f_1 \cos \theta_1 + f_2 \cos \theta_2$$

ここで f_1 と f_2 は各々親水性と疎水性の比である。本研究では、最も親水性の VUV 照射表面は $\theta_1 = 0^\circ$ で、最も疎水性の ODS 修飾表面が $\theta_2 = 100^\circ$ 。 $f_1 = 0.45$ のとき、パーコレーション閾値の接触角 θ は、 69° と計算できる。Figure 9 は、水滴が動き始める地点の接触角を示す。図から明らかなように、前進接触角が 69° になる地点に水滴が接すると広がり始め動きが急速に増すことがわかる。このように、本研究では、親水性領域のパーコレーション構造の形成によるキャピラリーが水滴移動を

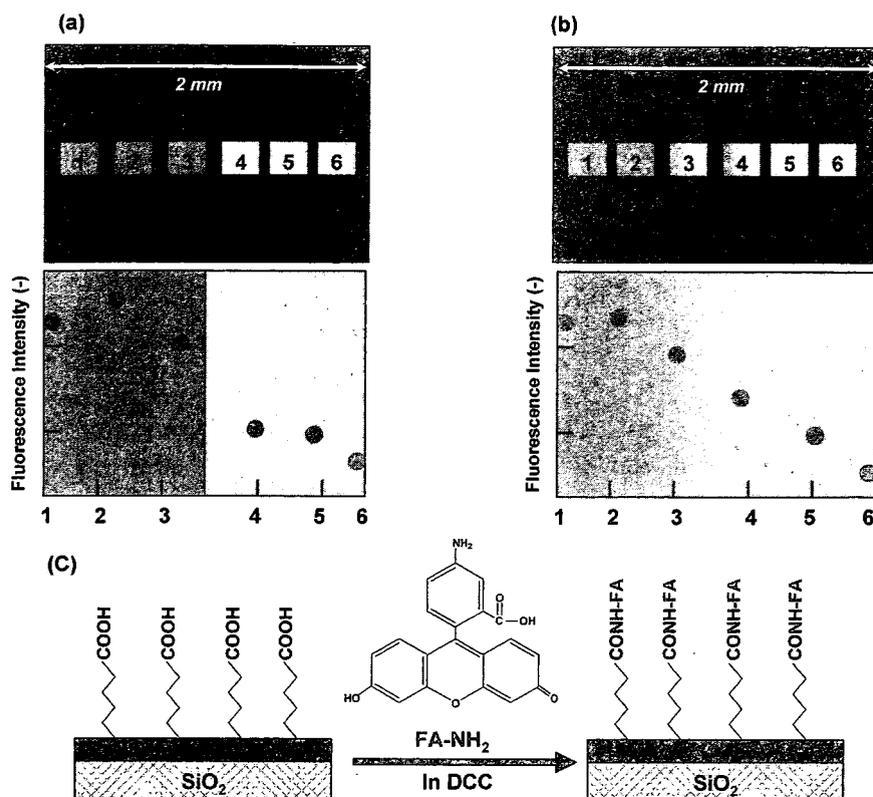


Figure 4. (a) Fluorescence microscopy of a patterned surface, and (b) a gradient surface. The surface was labeled with 5-aminofluorescein (FA-NH₂), which targeted the VUV irradiated regions on the surface. Luminance=1 mW/cm² and exposure time=20 s. Reproduced with permission from *Langmuir*, 23, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

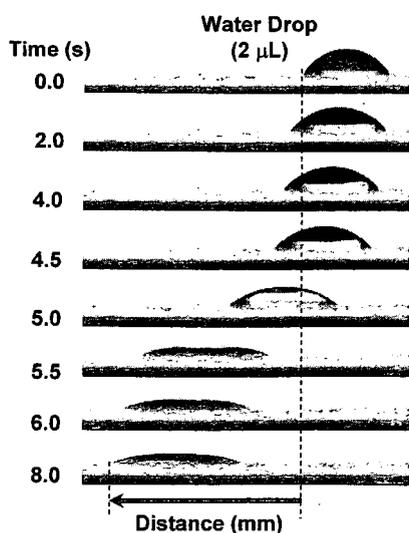


Figure 5. The movement of a water drop with a volume of 2 μL. Reproduced with permission from *Langmuir*, 23, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

大きく支配していることが示唆された。

ここでは光分解により再現性高く親水性・疎水性傾斜表面を調製でき、水滴移動を定量的に検証できることを示した。

3 振動ナノ表面

さまざまなナノサイズのデバイスや分子マシンが高分子、タンパク質、DNAを基盤に考案されている^{48)~52)}。最近では、Hugelら⁵³⁾が光応答性高分子を用いて一分子の光駆動サイクルを実現した。刺激応答性高分子ブラシの原子間力顕微鏡を用いた観察も筆者らを含めたいくつかの研究グループで行われてきた^{54)~57)}。しかしながら、ナノデバイスの自動運動を観察は報告されていない。そこで本研究では初めてナノスケールの Belousov-Zhabotinsky (BZ) 反応ポリマー(化学時計)の自動振動の観察を試みた。BZ 反応は、Ru(bpy)₃が触媒する自動振動現象である^{58),59)}。マロン酸のような有機酸の酸化が酸性条件下金属イオンの存在下で起こるプロセスで、反応の過程で中間体の反応サイクル・ネットワークが形成される。触媒イオンが周期的に還元状態と酸化状態を

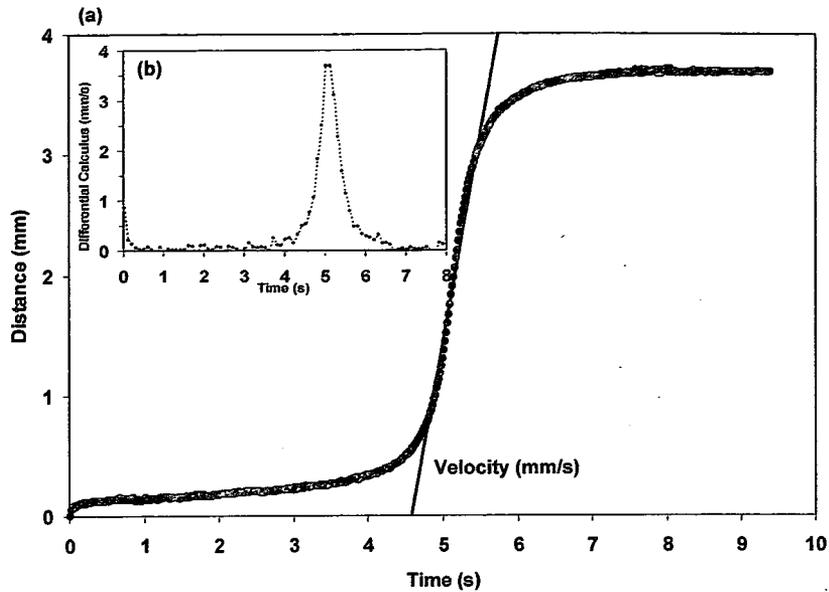


Figure 6. (a) Position of a droplet with a nominal volume of $2 \mu\text{L}$ plotted against the transverse time, on a surface prepared with a irradiation energy of $1.2 \text{ mW}/\text{cm}^2$ and a slide movement rate of $0.05 \text{ mm}/\text{s}$, respectively. The velocity of the water droplet was determined by the tangent of the curve. (b) Time dependence of the differential of (a). Reproduced with permission from *Langmuir*, **23**, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

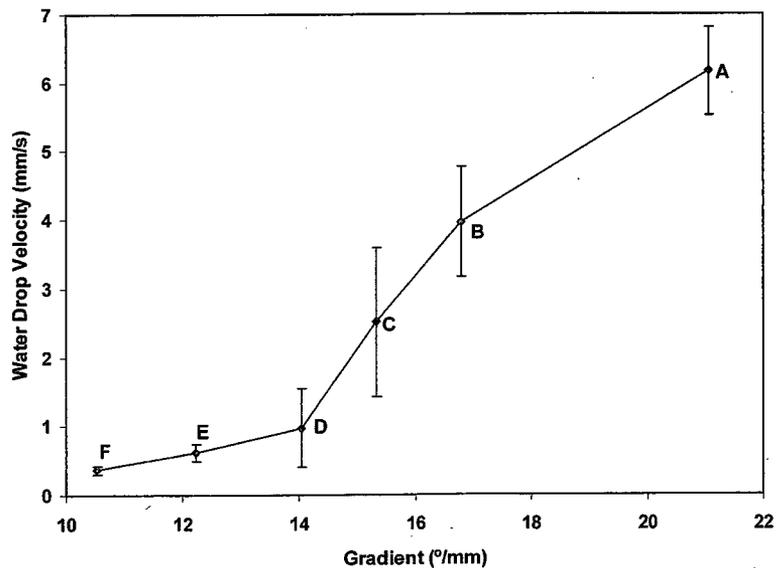


Figure 7. Relationship between the movement of a water droplet and the gradient of the contact angle with distance. A-F correspond to the data obtained from Figure 3b. Reproduced with permission from *Langmuir*, **23**, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

変化するため振動が起こる。

吉田と筆者らのグループでは、これまでにこの自励振動系を温度応答性高分子に導入し、その挙動を解析してきた^{60)~63)}。ここでは、その高分子を表面に共有結合固

定化し、その振動を走査プローブ顕微鏡 (SPM) で分子レベルの直接観察を行った⁶⁴⁾。振動化学反応を力学的な分子運動に変換し、これを観察しようとするものである。この自励振動デバイスは新しいナノマシンのコン

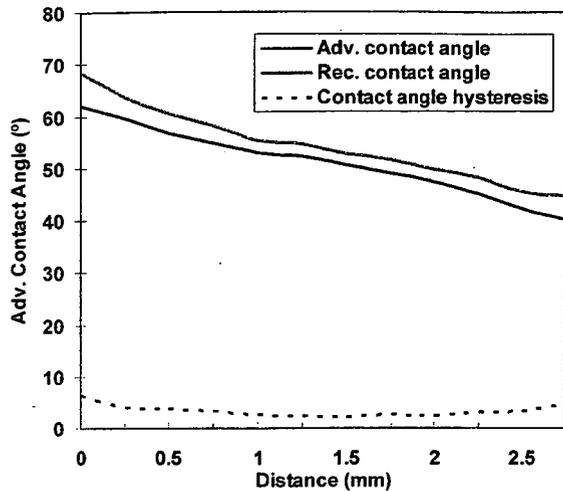


Figure 8. The time course of the movement of a water droplet on the surface (line A in Figure 3b). Reproduced with permission from *Langmuir*, 23, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

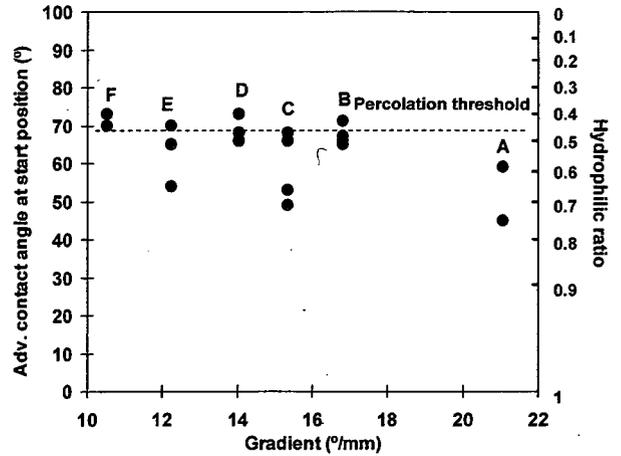


Figure 9. The relationship between the advancing contact angle of a water droplet at the position where it began to move (the hydrophilic ratio deduced from Cassie's equation) and the surface gradient. A-F correspond to the data in Figure 3b. Reproduced with permission from *Langmuir*, 23, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

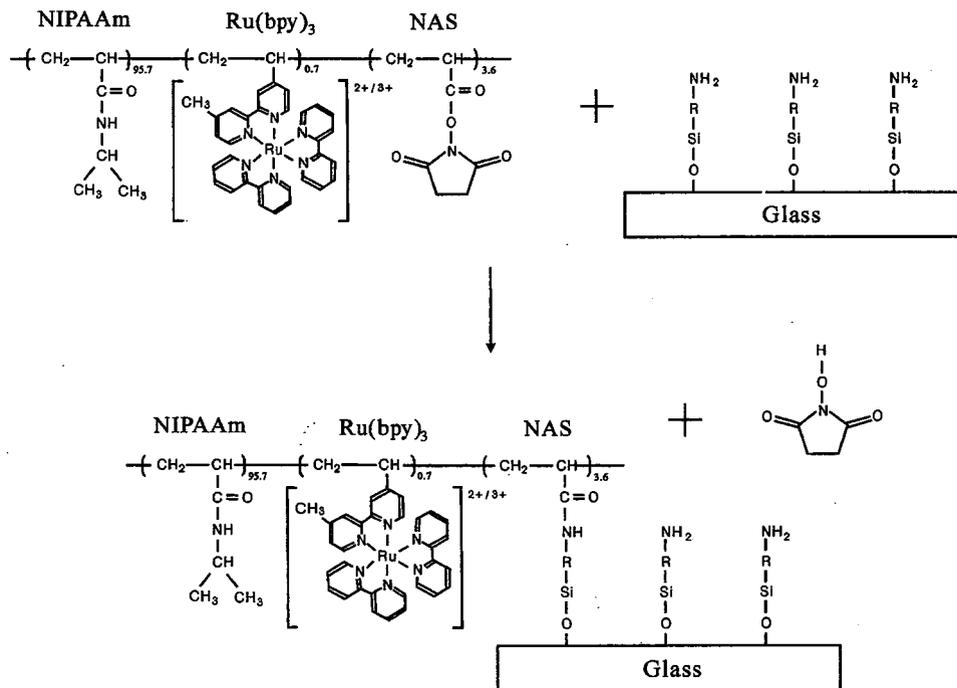


Figure 10. Preparation of self-oscillating polymer and its immobilization on a aminosilane-coupled glass surface. Reproduced with permission from *J. Phys. Chem. B*, 110, 5170 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

ポーネントとなると期待される。

3.1 自励振動高分子の合成

自励振動高分子は、Figure 10 に示すような BZ 反応の触媒であるルテニウム錯体 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ と、温度応答性高分子のモノマーとなる *N*-イソプロピルアクリルアミド (NIPAAm)、そしてカップリング用の *N*-スクシニミ

ジル基 (NAS) からなる、4-ビニル-4'-メチル-2,2'-ビスピリジンビス(2,2'-ビピリジン)ビス(ヘキサフルオロホスフェート) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3$)、*N*-イソプロピルアクリルアミド、*N*-スクシニミジルアクリル酸をメタノール中で、2,2'-アゾビスイソブチルニトリルを開始剤として共重合した。共重合は真空中 60°C で 1 日行った。反応物

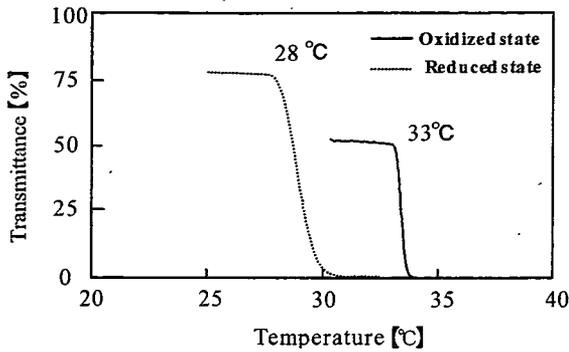


Figure 11. Optical property of the prepared polymer in solution. The concentration of polymer, HNO_3 , and $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$ or $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_2$, was 0.5 wt%, 0.3 M, and 1 mM, respectively. The temperature was raised at a rate of $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$. The solution was stirred with a magnetic stirrer. Reproduced with permission from *J. Phys. Chem. B*, **110**, 5170 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

は水とメタノールで各々4日間と3日間透析し、最後に凍結乾燥した。光散乱法で分子量を求めると、約31万であった。

振動高分子の固定化のためにアミノシラン処理したガラス板を用いた。板を振動高分子の5%水溶液中に浸漬し、18時間室温で反応させ、最後に純水で洗浄し、以降の実験に供した。

3.2 自励振動の観察

高分子溶液の濁度変化を測定したところ、下限臨界溶液温度(LCST)が観測された(Figure 11)。還元状態と酸化状態の最大吸収が各々453 nmと421 nmに観測されるため、濁度測定は、574 nmで行った。 Ce^{3+} と Ce^{4+} を添加することにより還元、酸化を行った。還元状態でのLCSTは 28°C で、NIPAAmのホモポリマーより低かった。疎水性のモノマーRu(bpy)₃との共重合によりLCSTが低下した。筆者らは、これまでNIPAAmポリマーにフェニル基を導入することにより、LCSTが低下することを報告した⁶⁰。一方、酸化状態でのLCSTは 33°C で、NIPAAmホモポリマーのそれより少し高かった。この結果は、共重合体中のRu(bpy)₃部分の酸化によりカチオンの増加が水分子の吸着の促進を招いたことを示唆する。

Figure 12は、高分子溶液の振動を示す。BZ反応中、還元状態($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$)と酸化状態($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$)で色、濁度ともに周期的に変化した。これはBZ反応によりこの酸化還元状態が周期的に変化し、このことにより、上述の高分子のLCSTの変化、すなわちコンホメーション変化を周期的に招いたものと考えられる。振動の振幅と周期は、N-スクニイミド(NAS)の含まない高分子で報告⁶¹されたように、反応物濃度、温度によって

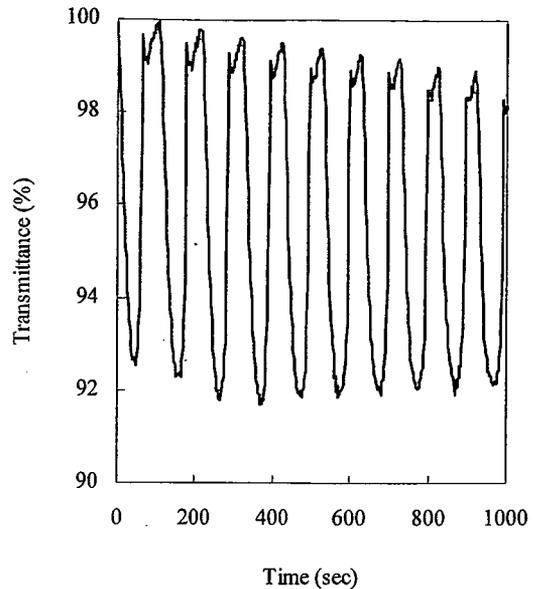


Figure 12. Self-oscillating behaviour in solution. The concentration of polymer, malonic acid, NaBrO_3 , and HNO_3 was 0.25 wt%, 0.1 M, 0.2 M and 0.3 M, respectively. The solution was stirred with a magnetic stirrer at 20°C . Reproduced with permission from *J. Phys. Chem. B*, **110**, 5170 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

制御できた。

$\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$ と $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ を含む硝酸の高分子希薄水溶液の動的散乱を測定すると分子直径は各々23.9 nmと59.6 nmであった。これは、還元状態と酸化状態で分子のコンホメーション変化が起こっていることを示している。合成した高分子をアミノシラン結合ガラス板へ固定化し、表面をXPSとTOF-SIMSを測定した。XPSでは、280.5 eVにRuの弱いピークが観測された。一方、TOF-SIMSではRuの二次陽性イオンが観測された。これらのことより、ガラス板上にRuを含む高分子が存在することが確認された。固定化された共重合体をSPMでタッピング・モードで測定した。板をマロン酸水溶液に浸漬し、臭素酸と硝酸を加え、SPMのカンチレバーを板の上におき、カンチレバーのz軸の動きをモニターし、その結果をFigure 13に示す。

純水中では振動は観測されなかったが、マロン酸、臭素酸、硝酸からなるBZ反応液に浸漬するとナノスケールの振動が観測された。不規則な挙動があるものの、振幅は、10~15 nmで、周期は70秒であった。高分子水溶液ではFigure 12のような規則的な振動挙動を観測するためには、かくはんが重要である。かくはんがないと規則的な振動は観測されない。しかしながら、SPM測定ではカンチレバーに影響を与えないようにかくはんはできない。かくはんしない状態でのBZ反応は非常に複雑になることが予測される。しかしかくはんがなくても

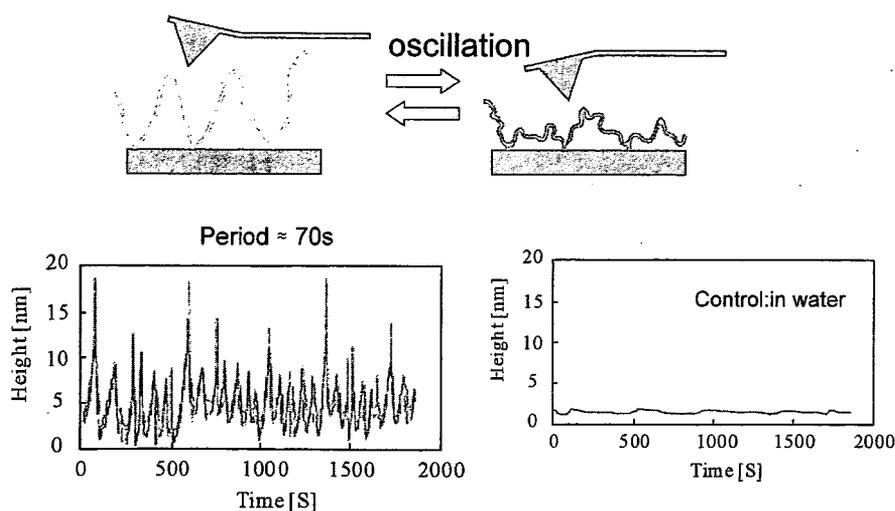


Figure 13. Self-oscillating behaviour of the immobilized polymer in a BZ reaction solution. The concentration of malonic acid, NaBrO_3 , and HNO_3 was 0.1 M, 0.3 M and 0.3 M, respectively. Reproduced with permission from *J. Phys. Chem. B*, **110**, 5170 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

板上の高分子は再現性高く振動した。周期70秒は、均一系の水溶液の場合とほとんど同じであった。ただ、固定化高分子の振動振幅は10~15 nmと動的光散乱の結果(23.9と59.6 nm)より小さかった。これは、固定化高分子がガラス板表面に末端だけで結合しているわけではなく、Figure 13下に示すようにループ状になっている領域もあるためと考えられる。加えて、カンチレバーによって付加される力も振幅を減らす効果をもつものと思われる。この振幅や周期は、反応物濃度によっても制御できた。

振動反応は、時間経過とともに分子間の凝集が起これ、長時間は継続しない⁶⁵⁾。これに対し、固定化高分子では際立った減衰もなく2,000秒以上の長期化が可能であった。これは、固定化されることにより分子間の凝集が抑制されるためと考えられる。ここでは、初めてナノレベルでの振動観察に成功した。振動高分子は、今後さまざまなナノ時計やナノセンサーへの応用が期待される。

4 生体不活性表面

人工臓器や医療器具の材料には生体適合性が求められる。その生体適合性には、生体活性化型と生体不活性型がある^{66),67)}。前者は、組織や細胞との接着性や増殖性を促進できるもので、筆者らはこれまでさまざまな生理活性材料をサイトカインや成長因子タンパク質の固定化によって開発してきた⁶⁸⁾。これに対し、後者の生体不活性型は、できるだけ組織や細胞との相互作用を少なくして、異物認識されずに材料としての機能を発揮するものである。ここでは、これら生体不活性型高分子材料に光反応性を付与し、金属、無機材料も含むさまざまな基材

表面を修飾可能にした。

生体不活性型高分子の素材として、両性イオン型のホスファチジルコリン基(PC)⁶⁹⁾およびノニオン型のポリエチレングリコール(PEG)⁷⁰⁾を側鎖にもつ高分子と、ノニオン型多糖であるプルラン⁷¹⁾を用いた。これらの高分子を光固定化した表面は、タンパク質吸着の抑制や細胞接着の阻害をすることが可能となった。

4.1 PC修飾生体不活性表面

4.1.1 PCをもつ光反応性高分子(Az-PMAc)の合成

光反応性ホスファチジルコリンメタクリレート90%とメタクリル酸10%からなる高分子(PMAc)の合成方法をFigure 14に示す。PMAcとアジドアニリンを、水溶性カルボジイミドを縮合剤として加えて反応させた。反応後、透析により未反応のアジドアニリンを除去した。その後、凍結乾燥して目的のAz-PMAcを得た。PMAcに導入されたアジドフェニル基の吸収は長波長にシフトすることがわかった。また、紫外吸収スペクトルの測定結果から、アジドフェニル基の導入率は6 mol%と算出された。

4.1.2 Az-PMAcの評価

調製したAz-PMAc水溶液を細胞培養用基材上に塗布した後、乾燥し、光マスクの存在下で紫外線照射を行い固定化した。光マスクと固定化されたAz-PMAcをFigure 15に示す。光マスクのパターンに従って固定化されていることが確認された。

Figure 16には、Az-PMAcをマイクロパターン状に固定化した基材上でタンパク質吸着評価を行った結果を示す。血液中の主要なタンパク質であるアルブミン、免疫グロブリン、フィブリノーゲンをAz-PMAc固定化基材

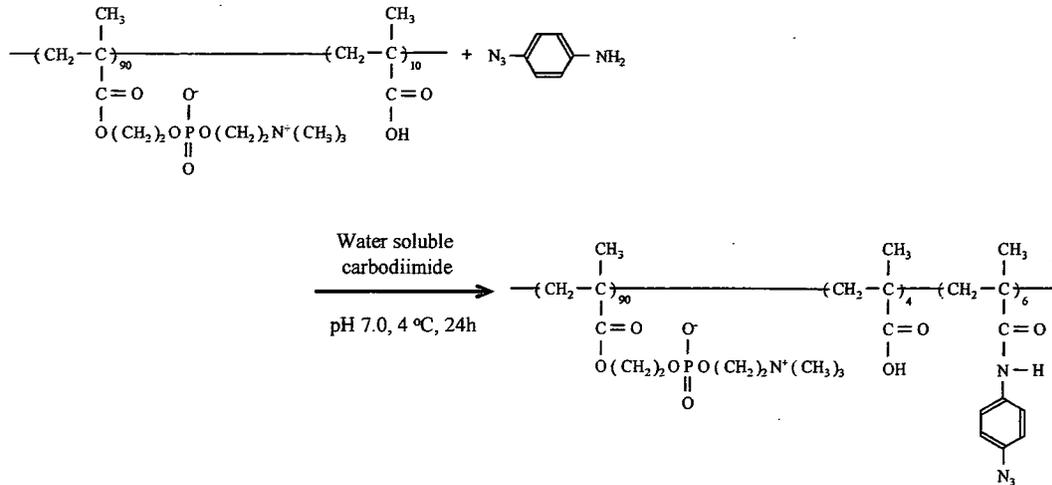


Figure 14. Synthesis of a photo-reactive phosphatidylcholine-containing polymer (Az-PMAC). Reproduced with permission from *Biomaterials*, 26, 1381 (2005). Copyright 2005 Elsevir.

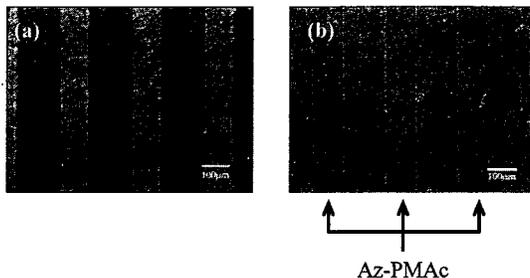


Figure 15. Microscopic image of (a) photo-mask and (b) immobilized Az-PMAC. Reproduced with permission from *Biomaterials*, 26, 1381 (2005). Copyright 2005 Elsevir.

に吸着させてから洗浄して観察を行った。吸着に用いたタンパク質は蛍光標識されており、吸着したタンパク質を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、Az-PMAC 固定化領域ではタンパク質の吸着が抑制されており、Az-PMAC 非固定化領域でのみタンパク質の吸着が観察された。

RAW 264 細胞(マウス白血病単球細胞)の接着評価を行った結果を Figure 17 に示す。細胞を播種した直後は、Az-PMAC 固定化領域が明瞭ではないが、時間経過に従い Az-PMAC 固定化領域には細胞がほとんど接着しておらず、接着できない細胞どうして凝集しており、培養皿を軽くふるだけで容易にはがすことができた。Az-PMAC は、細胞培養用基材に固定化でき、細胞接着やタンパク質吸着の抑制効果を持ち、生体適合性の高い表面改質剤として機能した。

4.2 プルラン修飾生体不活性表面

4.2.1 光反応性プルランの合成

Figure 14 と同様の反応で、プルランに *N*-(4-アジドベンゾイルオキシ)スクシンイミドを反応させ、アジドフェニル化プルラン(Az-pullulan)を得た。Az-pullulan

はゲルろ過カラムクロマトグラフィー(GPC)および紫外吸収スペクトル測定を行った。Az-pullulan へのアジドフェニル基の導入率は、アジドアニリン塩酸塩の吸収から算出した結果は 1.1 wt% であった。トリス緩衝液(pH 8.2)での測定の結果、Az-pullulan とプルランの溶出挙動が同じパターンを示したが、純水(pH 7.3)での溶出パターンは Az-pullulan とプルランでは溶出挙動がかなり変化した。

4.2.2 光固定化プルランの評価

Table 1 には、Az-pullulan 固定化前後の静的接触角変化を示す。固定化前は、基材表面の固有の接触角であったが、Az-pullulan 固定化により表面の接触角がほぼ同一の結果となった。この結果、Az-pullulan によって基材表面が被覆されることがわかった。

Figure 18 には、マイクロパターン状固定化した上で RAW 264 細胞を培養した結果を示す。Az-pullulan 固定化領域では細胞はほとんど接着が観察されず、Az-pullulan 非固定化領域に細胞の接着が観察された。

4.3 PEG 修飾生体不活性表面

4.3.1 光反応性 PEG(Az-PEG)の合成

光反応性 PEG は、光反応性基をもつモノマーと、PEG 基をもつモノマーとの共重合によって得た。光反応性のモノマーは、次のように得た。アジドアニリン塩酸塩を純水に溶解した後、炭酸ナトリウムを加えて pH 10.0 に調整した。塩化メタクリロイルの 1,4-ジオキサン希釈溶液をアジドアニリン水溶液にゆっくりと滴下してかくはんしながら反応を開始した。反応終了後、目的の光反応性基をもつモノマー、4-アジドフェニルメタクリルアミドを得た。

次に、(ポリエチレングリコール)メタクリレートと 4-アジドフェニルメタクリルアミド共重合体(Az-PEG)



Figure 16. Protein (albumin, immunoglobulin, and fibrinogen) adsorption on a micropattern of immobilized Az-PMAC. Reproduced with permission from *Biomaterials*, **26**, 1381 (2005). Copyright 2005 Elsevir.

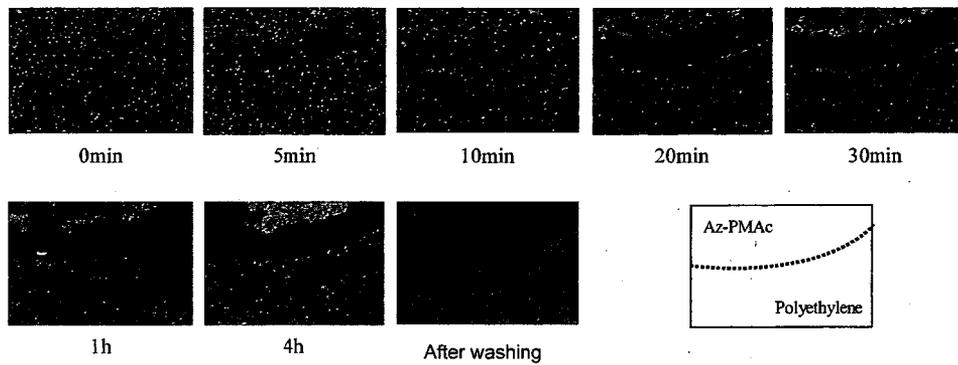


Figure 17. Time course of cell adhesion on polyethylene partially covered with immobilized with Az-PMAC. Reproduced with permission from *Biomaterials*, **26**, 1381 (2005). Copyright 2005 Elsevir.

Table 1. Contact Angles of Az-pullulan-modified surfaces

Surface	Contact angle (°)
Polystyrene	90.3 ± 0.4
Polystyrene modified Az-pullulan	73.0 ± 1.6
Polyethylene	66.7 ± 1.3
Polyethylene modified Az-pullulan	72.2 ± 1.9
Aminosilane-coupled glass	50.8 ± 1.0
Aminosilane-coupled glass modified Az-pullulan	72.4 ± 2.0

の合成方法を Figure 19 に示す。(ポリエチレングリコール)メタクリレート、4-アジドフェニルメタクリルアミド、2,2'-アソピス(イソブチロニトリル)のエタノール溶液を窒素雰囲気下、60°Cで反応した。反応後、透析により精製を行い目的の Az-PEG を得た。

Az-PEG の分子量は GPC を用いて測定を行った。その結果、ポリエチレンオキシド換算で分子量約 8100 であり、(ポリエチレングリコール)メタクリレートの分子量と比較して高分子化されていることが確認された。また、紫外吸収スペクトルを測定した結果、光反応性ユニットは 5 mol% 導入された Az-PEG が合成された。

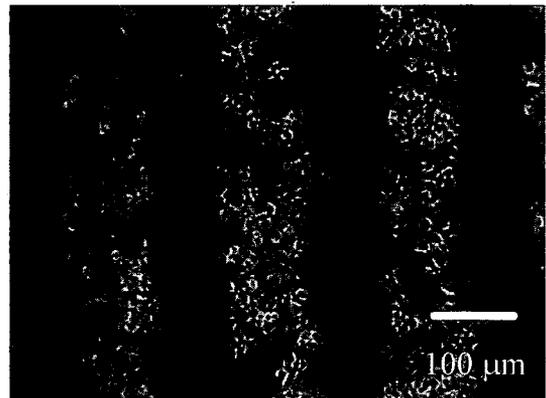


Figure 18. Cell adhesion on a micropattern of immobilized Az-pullulan. Reproduced with permission from *Biomaterials*, **26**, 2401 (2005). Copyright 2005 Elsevir.

4.3.2 Az-PEG の評価

合成した Az-PEG を光リソグラフィ法を用いてチタン蒸着ガラス、ガラス、サーマノックス™(細胞培養用プラスチック)表面上に固定化を行い、位相差顕微鏡で観察した(Figure 20)。Az-PEG 固定化表面を TOF-SIMS, AFM 解析および静的接触角の測定を行うことで固定化表面を評価した。

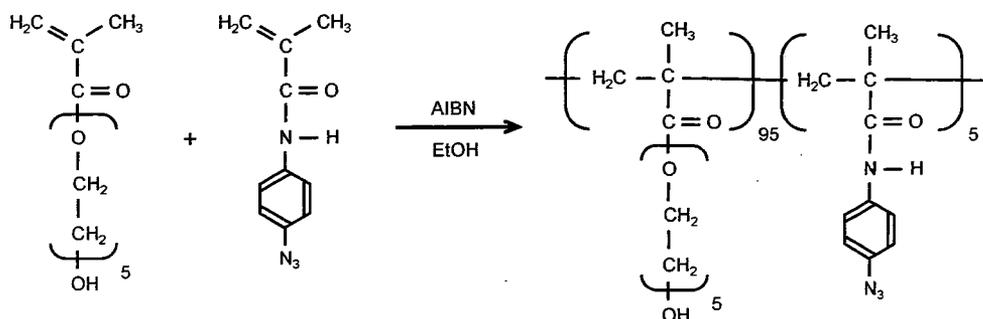


Figure 19. Synthesis of a photo-reactive polyethylene glycol-containing polymer (Az-PEG). Reproduced with permission from *Acta Biomaterialia*, 3, 1024 (2007). Copyright 2007 Elsevir.

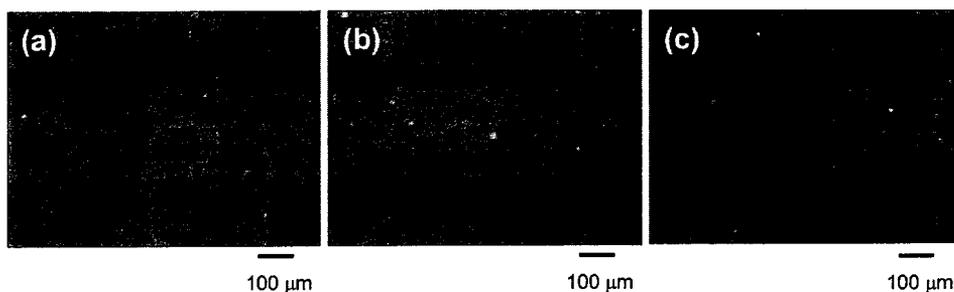


Figure 20. Phase contrast microscopic image of a micropattern of immobilized Az-PEG on (a) titanium, (b) glass, and (c) Thermanox™. Reproduced with permission from *Acta Biomaterialia*, 3, 1024 (2007). Copyright 2007 Elsevir.

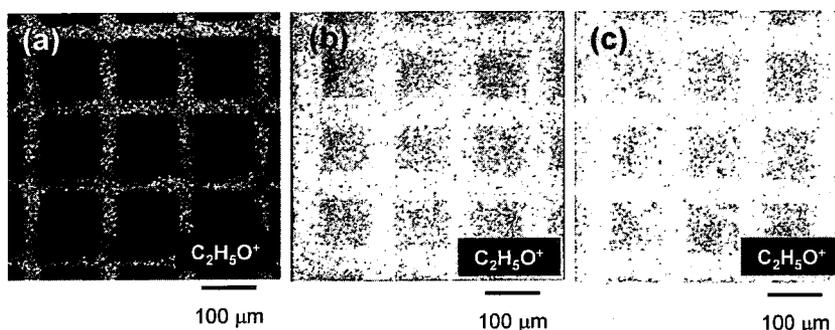


Figure 21. Secondary ion image (TOF-SIMS) of a micropattern of immobilized Az-PEG on (a) titanium, (b) glass, and (c) Thermanox™. Reproduced with permission from *Acta Biomaterialia*, 3, 1024 (2007). Copyright 2007 Elsevir.

各種表面に固定化した Az-PEG の TOF-SIMS による分析では, Az-PEG の固定化領域からポリエチレングリコールに由来する $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}^+$ の二次イオン像が観察され, 非固定化領域からは Az-PEG に由来するイオンピークは観測されなかった (Figure 21). 次に AFM の測定を行った結果, Az-PEG 固定化領域の厚みは約 300 nm であり, 基材の違いによる Az-PEG 固定化層の厚みは特に違いがなかった (Figure 22). 静的接触角の測定は, 各種表面の全面に Az-PEG を固定化した表面を用いて行った. その結果, Az-PEG 固定化後の各種表面は接触

角が約 40° となり基材を選ばずに表面の改質に成功した (Table 2).

次にタンパク質の吸着と細胞の接着について評価した. タンパク質の吸着は, ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリンを吸着させた後, TMB 染色を行い評価した (Figure 23). その結果, Az-PEG 固定化領域にはタンパク質が吸着せずに非固定化領域のみでタンパク質の吸着が見られた. また, COS 7 細胞を用いた細胞接着評価でも, Az-PEG の固定化領域には細胞が接着せず, 非固定化領域でのみ細胞の接着が

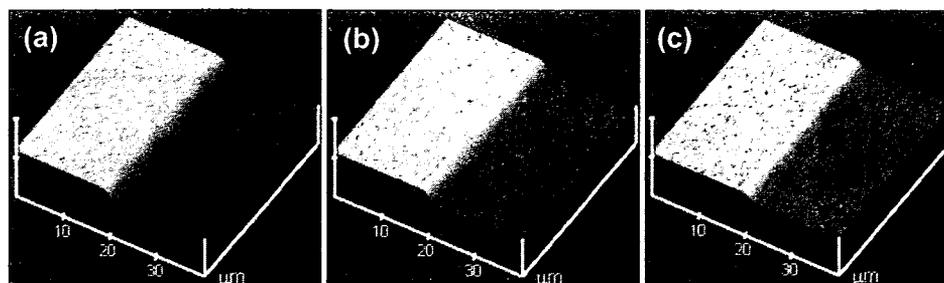


Figure 22. Atomic force microscopic image of immobilized Az-PEG on (a) titanium, (b) glass, and (c) Thermanox™. Reproduced with permission from *Acta Biomaterialia*, 3, 1024 (2007). Copyright 2007 Elsevir.

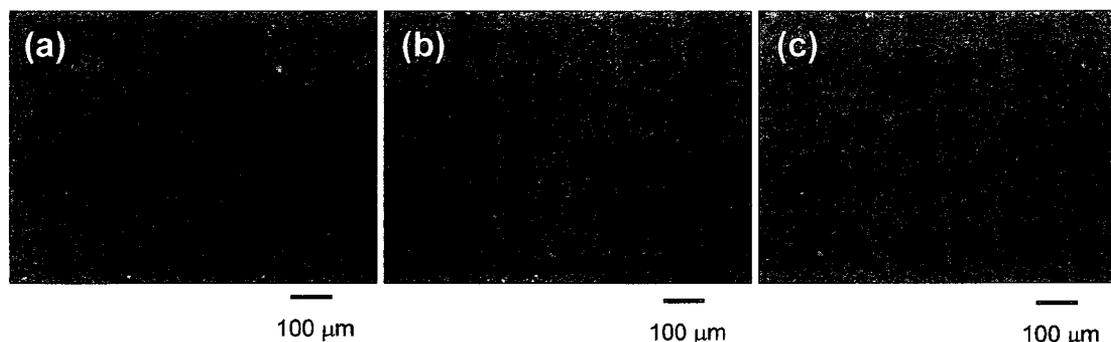


Figure 23. Protein adsorption on a micropattern of immobilized Az-PEG on (a) titanium, (b) glass, and (c) Thermanox™. Reproduced with permission from *Acta Biomaterialia*, 3, 1024 (2007). Copyright 2007 Elsevir.

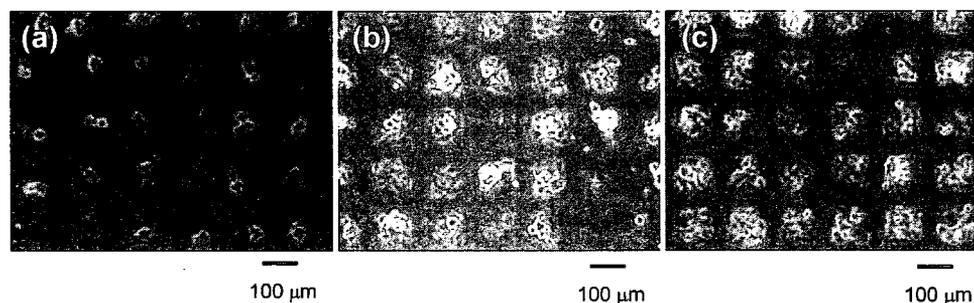


Figure 24. Cell adhesion on a micropattern of immobilized Az-PEG on (a) titanium, (b) glass, and (c) Thermanox™. Reproduced with permission from *Acta Biomaterialia*, 3, 1024 (2007). Copyright 2007 Elsevir.

Table 2. Contact angle of Az-PEG-modified surfaces

Surface	Contact angle (°)
Titanium	40.3 ± 1.5
Titanium modified with PEG	39.2 ± 1.3
Glass	6.4 ± 1.2
Glass modified with PEG	40.9 ± 0.7
Thermanox	78.8 ± 0.7
Thermanox modified with PEG	41.0 ± 2.7

観察された (Figure 24).

本研究では、光反応性で生体との相互作用が少ない新しい表面修飾高分子の合成とその評価を行った。Az-PMAC および Az-PEG は有機合成高分子で、Az-pullulan は天然物高分子であり、これらに光反応性を導入することにより表面の改質を簡便に行える光反応性高分子を得ることができた。この技術を用いると、これまでの吸着による表面改質と比較して、共有結合により高分子を固定化することになり、構造的に安定で強固な表面改質が行われることが期待できる。実際に、合成された高

分子によっていずれもタンパク質や細胞とほとんど相互作用しない表面を得ることができたことから、長期間安定に生体不活性を保つには、非常に優れているものと考えられる。また、金属材料や無機材料の表面も生体機能化することができた。金属や無機材料への安定的な結合の理由は、表面ヒドロキシル基などへの化学的応答あるいは表面凹凸への物理的アンカーリング効果と考えられるが、詳細は明らかでない。これについては、今後、表面のさらに詳細な解析を行うことが必要である。

5 おわりに

本報では、単分子層レベルあるいはナノレベルでの表面修飾によりさまざまな材料の機能化の付与(水滴移動, 自動振動, 生体適合性)が可能であることを示した。今後、さらにこれらの機能や、これまでに生み出されてきた機能性^{72)~76)}を複合化することにより、新しい界面ナノテクノロジーが発展してゆくものと期待される。

謝辞 本研究は、財団法人神奈川科学技術アカデミーのプロジェクト(平成14~18年度)で行われた。財団ならびに共同研究者の方々に感謝します。

文 献

- 1) 伊藤嘉浩, 高分子論文集, **54**, 596 (1997).
- 2) 伊藤嘉浩, 高分子論文集, **55**, 171 (1998).
- 3) 伊藤嘉浩, 高分子論文集, **56**, 617 (1999).
- 4) M. K. Chaudhury and G. M. Whitesides, *Science*, **256**, 1539 (1992).
- 5) K. Ichimura, S.-K. Oh, and M. Nakagawa, *Science*, **288**, 1624 (2000).
- 6) R. Rosario, D. Gust, A. A. Garcia, M. Hayes, J. L. Taraci, T. Clement, J. W. Dailey, and S. T. Picraux, *J. Phys. Chem. B*, **108**, 12640 (2004).
- 7) S. Daniel and M. J. Chaudhury, *Langmuir*, **18**, 3404 (2002).
- 8) S. Daniel, M. J. Chaudhury, and J. C. Chen, *Science*, **291**, 633 (2003).
- 9) H. Suda and S. Yamada, *Langmuir*, **19**, 529 (2003).
- 10) S. Daniel, S. Sircar, J. Gilem, and M. K. Chaudhury, *Langmuir*, **20**, 4085 (2004).
- 11) R. J. Petrie, T. Bailey, C. B. Gorman, and J. Genzer, *Langmuir*, **20**, 9893 (2004).
- 12) R. S. Subramanian, N. Moumen, and J. B. McLaughlin, *Langmuir*, **21**, 11844 (2005).
- 13) K. A. Wier, L. Gao, and T. J. McCarthy, *Langmuir*, **22**, 4914 (2006).
- 14) N. Moumen, R. S. Subramanian, and J. B. McLaughlin, *Langmuir*, **22**, 2682 (2006).
- 15) B. H. Clare, K. Efimenko, D. A. Fischer, J. Genzer, and N. L. Abbott, *Chem. Mater.*, **18**, 2357 (2006).
- 16) T. Ueda-Yukoshi and T. Matsuda, *Langmuir*, **11**, 4135 (1995).
- 17) X. Yu, Z. Wang, Y. Jiang, and X. Zhang, *Langmuir*, **22**, 4483 (2006).
- 18) G. Chen and Y. Ito, *Biomaterials*, **22**, 24583 (2000).
- 19) Y. Ito, M. Hayashi, and Y. Imanishi, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **12**, 367 (2001).
- 20) H. Liu and Y. Ito, *J. Biomed. Mater. Res.*, **67A**, 1424 (2003).
- 21) J. Y. Wong, A. Velasco, P. Rajagopalan, and Q. Pham, *Langmuir*, **19**, 1908 (2003).
- 22) B. P. Harris, J. K. Kutty, E. W. Fritz, C. K. Webb, K. J. L. Burg, and A. T. Metters, *Langmuir*, **22**, 4467 (2006).
- 23) R. C. Gunawan, J. Silvestre, H. R. Gaskins, P. J. A. Kenis, and D. E. Leckband, *Langmuir*, **22**, 4250 (2006).
- 24) A. M. Cazabat, F. Heslot, S. M. Troian, and P. Carles, *Nature*, **346**, 824 (1990).
- 25) B. S. Gallardo, V. K. Gupta, F. D. Eagerton, L. I. Jong, V. S. Craig, R. R. Shah, and N. L. Abbott, *Science*, **283**, 57 (1999).
- 26) R. H. Terrill, K. M. Z. Y. Balss, and P. W. Bohn, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 988 (2000).
- 27) T. Sehayek, A. Vaskevich, and I. Rubinstein, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4718 (2003).
- 28) B. P. Harris and A. T. Metters, *Macromolecules*, **39**, 2764 (2006).
- 29) M. S. Kim, K. S. Seo, G. Khang, and H. B. Lee, *Bioconj. Chem.*, **16**, 245 (2005).
- 30) S.-H. Choi and B. Z. Newby, *Langmuir*, **19**, 7427 (2003).
- 31) X. Jiang, Q. Xu, S. K. W. Dertinger, A. D. Stroock, T. Fu, and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, **77**, 2338 (2005).
- 32) A. Shastry, M. J. Case, and K. F. Bohringer, *Langmuir*, **22**, 6161 (2006).
- 33) C. Chen, D. Hirdes, and A. Folch, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **100**, 1499 (2003).
- 34) M.-H. Wu, C. Park, and G. M. Whitesides, *Langmuir*, **18**, 9312 (2002).
- 35) C. L. Hypolite, T. L. McLernon, D. N. Adams, K. E. Chapman, C. B. Herbert, C. C. Huang, M. D. Distefano, and W.-S. Hu, *Bioconj. Chem.*, **8**, 658 (1997).
- 36) M. B. J. Wijesundara, E. Fuoco, and L. Hanley, *Langmuir*, **17**, 5721 (2001).
- 37) N. L. Jeon, S. K. W. Dertinger, D. T. Chiu, I. S. Choi, A. D. Stroock, and G. M. Whitesides, *Langmuir*, **16**, 8311 (2000).
- 38) I. Caelen, A. Bernand, D. Juncker, B. Michel, H. Heinzelmann, and E. Delamarche, *Langmuir*, **16**, 9125 (2000).
- 39) I. Caelen, H. Gao, and H. Sigrüst, *Langmuir*, **18**, 2463 (2002).
- 40) Y. Ito, M. Heydari, A. Hashimoto, T. Konno, A. Hirasawa, S. Hori, K. Kurita, and A. Nakajima, *Langmuir*, **23**, 1845 (2007).
- 41) H. Sugimura, K. Ushiyama, A. Hozumi, and O. Takai, *Langmuir*, **16**, 885 (2000).
- 42) L. Hong, H. Sugimura, T. Furukawa, and O. Takai, *Langmuir*, **19**, 1966 (2003).
- 43) Y. Ito, M. Nogawa, H. Sugimura, and O. Takai, *Langmuir*, **21**, 4299 (2004).
- 44) M. Sakai, J.-H. Song, N. Yoshida, S. Suzuki, Y. Kameshima, and A. Nakajima, *Langmuir*, **22**, 4906 (2006).
- 45) S. Semal, C. Bauthier, M. Voue, J. J. Vanden Eynde, R. Gouttebaron, and J. De Coninck, *J. Phys. Chem. B*, **104**, 6225 (2000).
- 46) R. Zallen, *The Physics of Amorphous Solids*, John Wiley & Sons, New York (1983) pp. 135-204.
- 47) A. B. D. Cassie, S. Baxtor, *Trans. Faraday Soc.*, **40**, 546 (1944).
- 48) J. D. Badjic, V. Balzani, A. Credi, S. Silvi, and J. F. Stoddart, *Science*, **303**, 1845 (2004).

- 49) B. C. Regan, S. Aloni, R. O. Ritchie, U. Dahmen, and A. Zettl, *Nature*, **428**, 924 (2004).
- 50) R. K. Soong, G. D. Bachand, H. P. Neves, A. G. Olkhovets, H. G. Craighead, and C. D. Montemagno, *Science*, **290**, 1555 (2000).
- 51) B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, Jr., F. C. Simmel, and J. L. Neumann, *Nature*, **406**, 605 (2000).
- 52) J. J. Li and W. Tan, *Nano Lett.*, **2**, 315 (2002).
- 53) T. Hugel, N. B. Holland, A. Cattani, L. Moroder, M. Seitz, and H. E. Gaub, *Science*, **296**, 1103 (2002).
- 54) Y. Ito, Y. S. Park, and Y. Imanishi, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 2739 (1997).
- 55) G. Chen, Y. Imanishi, and Y. Ito, *Langmuir*, **14**, 6610 (1998).
- 56) Y. Ito, Y. S. Park, and Y. Imanishi, *Langmuir*, **16**, 5376 (2000).
- 57) A. J. Ryan, C. J. Crook, J. R. Howes, P. Topham, R. A. L. Jones, M. Geoghegan, A. J. Parnell, L. Ruiz-Perez, S. J. Martin, A. Cadby, A. Menelle, J. R. P. Webster, A. J. Gleeson, and W. Bras, *Faraday Discuss.*, **128**, 55 (2005).
- 58) A. N. Zaikin and A. M. Zhabotinsky, *Nature*, **225**, 535 (1979).
- 59) R. J. Field and M. Burger, Eds., *Oscillations and Traveling Waves in Chemical Systems*, John Wiley & Sons, New York (1985).
- 60) Y. Ito, G. Chen, Y. Guan, and Y. Imanishi, *Langmuir*, **13**, 2756 (1997).
- 61) Y. Ito, M. Nogawa, and R. Yoshida, *Langmuir*, **19**, 9577 (2003).
- 62) R. Yoshida, T. Sakai, S. Ito, and T. Yamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 8095 (2002).
- 63) R. Yoshida, T. Takahashi, T. Yamaguchi, and H. Ichijo, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 5134 (1996).
- 64) Y. Ito, Y. Hara, H. Uetsuka, H. Hasuda, H. Onishi, H. Arakawa, A. Ikai, and R. Yoshida, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 5170 (2006).
- 65) M. Ueda, Y. Hara, T. Sakai, R. Yoshida, M. Takai, and Y. Ito, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, **45**, 1578 (2007).
- 66) Y. Ito, H. Hasuda, N. Yamauchi, N. Komatsu, and K. Ikebuchi, *Biomaterials*, **25**, 2293 (2004).
- 67) 伊藤嘉浩, *繊維と工業*, **45**, 432 (1989).
- 68) Y. Ito, *Soft Matter*, **4**, 46 (2008).
- 69) T. Konno, H. Hasuda, K. Ishihara, and Y. Ito, *Biomaterials*, **26**, 1381 (2005).
- 70) Y. Ito, H. Hasuda, M. Sakuragi, and S. Tsuzuki, *Acta Biomater.*, **3**, 1024 (2007).
- 71) H. Hasuda, O. H. Kwon, I.-K. Kang, and Y. Ito, *Biomaterials*, **26**, 2401 (2005).
- 72) Y. Ito, *J. Biomat. Sci., Polym. Ed.*, **10**, 1237 (1999).
- 73) Y. Ito and E. Fukusaki, *J. Mol. Catal. Enz.*, **B28**, 155 (2004).
- 74) Y. Ito and Y. S. Park, *Polym. Adv. Technol.*, **11**, 136 (2000).
- 75) G. Chen, N. Kawazoe, Y. Fan, Y. Ito, and T. Tateishi, *Langmuir*, **23**, 5864 (2007).
- 76) H. Zhang and Y. Ito, *Langmuir*, **17**, 8336 (2001).

[Comprehensive Papers]

Creation of Functional Surfaces by Nano Interface Technology

Yoshihiro Iro*¹

*¹RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research) (2-1 Hirosawa, Wako 351-0198, Japan)

Some types of functional surfaces were created by surface modification at the nano-scale level; that is called nano interface technology. First, a surface with a hydrophilicity gradient was reproducibly prepared and the movement of a water droplet on such a surface was observed. Secondly, a self-oscillating polymer was immobilized on a solid surface and the oscillation phenomenon was observed by scanning probe microscopy. Thirdly, biononfouling surfaces were prepared by immobilization of newly developed photo-reactive natural or synthetic polymers.

KEY WORDS Gradient Surface / Droplet Movement / Self-oscillation / Scanning Probe Microscope / Biononfouling Surface /

(Received August 22, 2007; Accepted October 22, 2007)

[*Kobunshi Ronbunshu*, **65**, 6—19 (2008)]

Positional Effect of Amino Acid Replacement on Peptide Antigens for the Increased IFN- γ Production from CD4T Cells

Tianyi Liu¹, Hitoshi Kohsaka², Motoharu Suzuki¹, Rie Takagi¹, Kumiko Hashimoto¹, Yasushi Uemura¹, Hideki Ohyama¹ and Sho Matsushita¹

ABSTRACT

Background: Based on the fact that site-specific amino acid replacement on peptide antigens stimulated T cell clones to produce increased amount of IFN- γ , we investigated this structure-function relationship, using various peptide analogues.

Methods: We used three human Th0 clones (BC20.7, BC33.5 and BC42.1) that express distinct TCR α and TCR β chains, but recognize the same TCR ligand; *i.e.*, the same framework of peptide antigen BCGa p84-100 in the context of DRB1*1405. These T cells were stimulated with various peptide analogues, followed by determination of proliferative responses and IFN- γ production.

Results: Replacement of Leu at peptide position 2 (P2) by amino acids which are less hydrophobic than the wild type (Val, Ala) or those with similar structural or neutral charge (Thr, Ser), induced increased IFN- γ production from T cells. This phenomenon was associated with structural features of TCR, especially the length of CDR3 region of TCR α . Amino acid replacement at the other positions did not induce increased IFN- γ production.

Conclusions: Amino acid substitution at P2 frequently induces increased IFN- γ production in a clone-specific manner, which is associated with the structure of CDR3 in TCRV α chains.

KEY WORDS

analogue peptide, complementarity determining region 3, interferon gamma, peptide antigens, T-cell antigen receptor

INTRODUCTION

Recent studies showed that T cell activation is not an all-or-none type of event; rather, qualitative changes in T cell responses can be induced by amino acid substitutions by either MHC molecules or antigenic peptides, *i.e.*, TCR ligands. Flexibility in recognition results in T-cell activation in the absence of a proliferative response, which is designated by the following terminology as demonstrated in previous studies by our group and others: partial agonism,¹ TCR antagonism,² anergy,³ survival⁴ and cytokine-specific up-regulation.^{5,6}

Amino acid residues on antigenic peptides have been roughly divided into two groups; one that is important for binding to TCR (T cell epitope), and the other that is important for binding to MHC (MHC anchor). However, the crystal structure of the human class II HLA-DR1 complexed with the influenza peptide reported by Stern *et al.*⁷ demonstrated that all the amino acid residues of the influenza virus peptide physically made contact with both HLA and TCR, with the exception of only one residue at the amino terminus which is buried deeply in the groove of class II, hence, there is no possibility for interaction with TCR.

¹Department of Allergy and Immunology, Saitama Medical School, Moroyama and ²Department of Bioregulatory Medicine and Rheumatology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.
Correspondence: Sho Matsushita, Department of Allergy and Im-

munology, Saitama Medical School, 38 Morohongo, Moroyama, Saitama 350-0495, Japan.
Email: shomat@saitama-med.ac.jp
Received 5 May 2004. Accepted for publication 9 April 2004.
©2005 Japanese Society of Allergology

In our previous studies, single amino acid substitutions on a group I allergen in the *Cryptomeria japonica*-derived peptide resulted in a significant increase in IFN- γ production, with no remarkable changes either in proliferative response or IL-4 production.⁵ In this study, by using various analogue peptide species, we stimulated three human Th0 clones that express distinct TCR α and TCR β chains, but recognize the same TCR ligand, and tried to determine the structure-function relationship that leads to increased IFN- γ production from T cells.

METHODS

SYNTHESIS OF PEPTIDES

The wild-type BCGa p 84-100 (EEYLILSARD-VLAVVSK) and its analogue were synthesized using a solid-phase simultaneous multiple peptide synthesizer PSSM-8 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), and were purified by C18 reverse-phase HPLC (Millipore).

T CELL CLONES

BCGa p84-100-specific T cell lines were established as described.⁸ Three human CD4⁺ T cell clones (BC 20.7, BC33.5 and BC42.1) specific to BCGa p84-100+ DRA/DRB1*1405, yet bearing distinct TCR β (BV13S3, BV6S1 and BV5S4, respectively ;)⁸ established from PBMC of a BCG-primed healthy individual as described elsewhere,⁴ were used throughout the study. T cells were fed 50 U/ml human rIL-2 and irradiated autologous PBMC prepulsed with the wild-type BCGa p84-100 on a weekly basis.

ASSESSMENT OF T-CELL RESPONSES

Antigen-induced proliferation of the T cell clones were assayed by culturing the T cells (3×10^4 /well) in 96-well flat-bottomed culture plates in the presence of a peptide(s) and irradiated PBMC (1.5×10^5 /well), using RPMI 1640 medium (Gibco, Grand Island, N.Y.) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 units/ml of penicillin, 100 μ g/ml of streptomycin, and 10% heat-inactivated autologous plasma. For the proliferation assay, cells were cultured for 72 hr in the presence of 1 μ Ci/well of [³H]thymidine during the final 16 hrs. Culture supernatants collected immediately before the addition of [³H]thymidine were used to determine lymphokine concentrations, using hGM-CSF ELISA kits (R&D systems) and hIFN- γ ELISA kits (Otsuka, Tokyo, Japan).

DETERMINATION OF TCRA GENE USAGE BY T CELL CLONES

To determine TCRA gene usage of the T cell clones that were cultured with irradiated autologous PBMC, RNA were extracted from the cell mixture, and converted to cDNA. TCRA variable region cDNA were amplified with anchored PCR as described previously for amplification of TCRA variable region cDNA.⁹ A

Table 1 A panel of labeled TCRAV-specific oligonucleotide probes

AV gene	sequence	pool
AV4, 20	TGCTAAGACCACA/CCAGCC	A
AV11	TCTTCAGAGGGAGCTGTG	A
AV2	ATCCTTGAGAGTTTTACT	B
AV8a	CCATTTCGAGCTGTATTTA	B
AV8b	GCATTTCGAGCTTTATTTA	B
AV15	CATTTGCTGGATTTTCGT	B
AV17	GATCTTAGGAGCATCATT	B
AV21	TGGGGGCATCAGTGCTGA	B
AV3	GAGAAGAGGATCCTCAGG	C
AV5	ACTATTCTCCAGCATACT	C
AV10	CCGTGTCCATTCTTTGGA	C
AV13	GAGAGGAATACAAGTGGA	C
AV19	CAATTTTTGTTGGCTATT	C
AV24	AGCATCTGACGACCTTCT	C
AV25	TCCTTGAACATTTATTAA	C
AV26	CCTAGGGATATTGGGGTT	C
AV27	GAAAAAACTATACCATCT	C
AV29	CAGGCACCTTGTGTGGC	C
AV32	ACTCATCACATCAATGTT	C
AV18	CTTTGGCAGCCCCATTAC	D
AV23	GAGACCCTCTTGGGCCTG	D
AV28	ACTAACTTTTCGAAGCCTA	D
AV30	GGAGTGTGCATTCATAGT	D
AV7	GGAGGCACTA/GCAGGACAA	E
AV6	ACAGCTTCACTGTGGCTA	F
AV12	TGCCAGCCTGTTGAGGGC	F
AV14	GTGA/GTCTCCACCTGTCTT	F
AV1a	CTCCTGTTGCTCATACCA	G
AV1b	CTCCTGCTGCTCGTCCCA	G
AV1c	CTCCTGGAGCTTATCCCA	G
AV9	AAGCCCACCCTCATCTCA	G
AV16	GCCTCTGCACCCATCTCG	G
AV22	CTGATACTCTTACTGCTT	G
AV31	CCTCTCTGGACTTTCTAA	G

Oligonucleotide probes specific to TCRAV family genes. Degenerated probes were used to specify AV4 and AV20, AV7, and AV14 families. Three probes for AV1 family, and two probes for AV8 family were required to specify all members of each family. These probes were grouped into seven pools (pool A to G) depending on sequence similarity.

primary PCR was followed by two sequential nested PCR. TCRAV-specific primers used for primary PCR, nested PCR, and final PCR were CA4 (5'-CAG AAT CCT TAC TTT GTG AC), CA3 (5'-ATC GGT GAA TAG GCA GAC AG), and biotinylated CA5 (5'-CAC