

タンパク質・糖をベースとしたナノ構造体の自由な造形

1D Protein and Sugar Nanostructures by Single Particle Reactions

関 修平、高野勝昌、大道正明、麻野敦資、丸井裕美¹⁾ 杉本雅樹²⁾

Shu SEKI, Katuyoshi TAKANO, Masaaki OMICHI, Atsushi ASANO, Hiromi MARUI, Masaki SUGIMOTO

¹⁾大阪大学 ²⁾原子力機構

(概要)

生体高分子の一種として知られるタンパク質は、単純なアミノ酸を繰り返すことにより、生体内で要求される複雑な機能を発現させている。一方で単純な構造のため、タンパク質を任意に配列・集合させることは困難である¹⁰。そこで、タンパク質を複雑な化学・遺伝子学的な手法を用いることなくナノ構造化することができれば医学・生理学分野において多くの知見を得ることが期待できる。本章では複雑な操作、添加剤を一切用いずタンパク質のみから構成されるタンパク質ナノ構造体形成を目的とし、SPNTによる一次元タンパク質ナノ構造体の形成、およびナノ構造体の内部構造、表面上の機能性タンパク質の活性評価について述べる。

キーワード：

単一粒子ナノ加工法

2. 方法・結果及び考察

高分子に放射線を照射するとイオン化、励起をへて、分解や架橋が起こる。放射線照射によって生成した、イオン・ラジカルといった励起種は、イオン分子反応、ラジカル反応によって、共有結合の解離、結合の生成などが複雑な形で生じる。主な過程として、高分子鎖の切断、側鎖の解離、高分子鎖間での架橋が挙げられる。多くの高分子では、主鎖の切断と架橋が共に進行するが、切断が主として生じる分解型、架橋が主として生じる架橋型の高分子が存在する。照射に伴うエネルギー付与から引き起こされる化学反応は、多くの場合低分子化合物を用いたモデリングが良い近似を与えるが、高分子材料中では、溶解特性・強度などの巨視的物性も分子量に強く依存しているため、少ない架橋点や反応点が決定的な影響を与える。

高エネルギー荷電粒子は物質に侵入する際に大きな相互作用を示すことで知られており、重粒子線がん治療¹や品種改良²などに利用されている。また、放射線検出装置として利用される固体飛跡検出器は、荷電粒子の飛跡を高分子内で生じる単一粒子反応による材料の損傷を拡大・可視化している。LiF結晶内に生じたウラン核分裂片の飛跡の光学顕微鏡による観察³が行われたことに端を発し、化学エッチングによりマイカ内の核分裂片の飛跡に沿って腐食が進むことが明らかになった⁴。現在では荷電粒子に対して高い感度を示し、エッチングが容易なポリカーボネート系の高分子材料⁵を利用することにより、宇宙・銀河放射線の検出⁶などにも用いられている。また、単一粒子反応による材料の損傷を積極的に利用することにより孔径が50 nm～数 μ mの微細孔を有するイオン穿孔膜の作成は燃料電池などへの実応用に近い段階にある⁷。

荷電粒子の放射線化学ではターゲットを通過する際、イオントラックと呼ばれる粒子の飛跡に沿った円柱状の局所的な空間にエネルギーを付与する⁸ (Figure 1(a))。ターゲットとして放射線照射に対して架橋型の反応を示す高分子を選択した場合、付与されるエネルギーによりイオントラック内にイオン・ラジカルといった反応性の中間体を生成し、分子間架橋反応を介した高分子材料のゲル化を引き起こす。このようにエネルギー付与による励起種が

生じる限定空間における化学反応により、粒子の飛跡に沿ったナノ構造体を生成することができる。高エネルギー荷電粒子を利用した、単一粒子ナノ加工法 (single particle nano-fabrication technique, SPNT) は光や放射線を収束させて構造体を形成するのではなく、単一の粒子を用いて一つのナノ構造体を形成することが可能である⁹。

入射粒子によっては引き出された比較的高いエネルギーを有する2次電子によるエネルギー付与分布を示すペナンブラと呼ばれる領域内のエネルギー密度分布 ρ_p は、入射粒子飛跡中心からの距離 r の関数として、

$$\rho_p(r) = \frac{LET}{2} \left[2\pi r^2 \ln \left(e^{1/2} \frac{r_p}{r_c} \right) \right]^{-1} \quad r_c < r \leq r_p \quad (1)$$

のように与えられる。ここで LET (eV nm⁻¹) は線エネルギー付与、 e はネイピア数、 r_p, r_c はエネルギー等分配則から見積もられるコア領域とペナンブラ領域の半径であり、後者はおおよそ2次電子の最大飛程を反映する。コア領域内のエネルギー付与 ρ_c は、これに比較してはるかに高く、

$$\rho_c = \frac{LET}{2} [\pi r_c^2]^{-1} + \frac{LET}{2} \left[2\pi r_c^2 \ln \left(e^{1/2} \frac{r_p}{r_c} \right) \right]^{-1} \quad r \leq r_c \quad (2)$$

全付与エネルギーの半分以上がこの領域に初期的には付与されると考えられる。

単一粒子ナノ加工法において鍵となる化学反応は、2次電子によって付与されたエネルギーのみを考えれば十分であり、(1)式による初期エネルギー分布を基礎とする。高分子架橋反応点は、当然、ペナンブラ全領域にわたって導入されるが、本手法ではゲル化に伴う溶媒への不溶化をもとに、この空間を1次元構造体として可視化している。したがって、観測される円筒状の空間の大きさは、高分子をゲル化できるぎりぎりの架橋点密度となる飛跡中心からの距離に限られるはずであり、(1)式に基づき、架橋反応効率 $G(x)$ を用いてこの空間の断面半径 r の満たすべき条件を求めれば⁶、

$$r^2 = \frac{LET \cdot G(x) m N}{400 \pi \rho A} \left[\ln \left(\frac{e^{1/2} r_p}{r_c} \right) \right]^{-1} \quad (3)$$

ここで A はアボガドロ数、 m, N はターゲットとなる分子の分子量と重合度(高分子の場合)、 ρ はターゲット材料の密度である。さらに対象を高分子材料に限定した場合、観測される空間領域は分子サイズのみではなく、分子の形状の影響を強く受けると予測される。

SPNTによるナノ構造体形成では、まず加速器により生成された高エネルギー荷電粒子を高分子薄膜に入射させる。粒子が通過した部分はエネルギーが付与され、局所的な架橋反応によりゲル化し一つの巨大分子となる。ゲル化していない部分を適切な溶媒で洗い流すことにより、ナノ構造体を単離することができる。形成したナノ構造体は乾燥過程において、基盤上に倒れるため、原子間力顕微鏡を用いて観察することが可能である (Figure 1(b))。このように本手法を利用したナノ構造体形成は、高エネルギー荷電粒子の照射、現像、観察と非常に単純な操作により実現される。またナノ構造体が粒子の飛跡に沿って形成されること、単一の粒子が対応したひとつの構造体を形成することから、高分子薄膜の膜厚・照射線量を制御すること

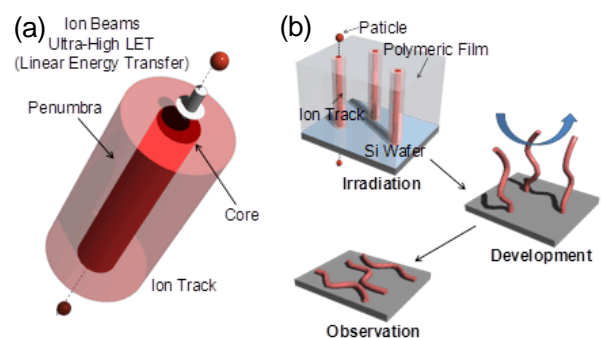


Figure 1. (a) Ion track model (b) fabrication scheme of the nanostructures by the SPNT

により構造体の長さ・単位面積当たりの本数を示す数密度といった要素を容易に制御することが可能である。

以上の背景のもと、本研究では、生体・合成高分子をベースとしたナノ構造体形成とその機能化を目的に、タンパク質・機能性材料からのナノ構造体形成に取り組み、生体高分子のみから構成されるナノ構造体、および機能性分子を内包したナノ構造体の形成を行った。さらに、化学反応を利用した表面修飾によるナノ構造体への機能性付与を目指し、分子内に反応点を有する高分子材料を設計・合成し、ナノ構造体の形成・表面の機能化に取り組んだ。

2-1 タンパク質をベースとした一次元ナノ構造体の形成

生体高分子の一種として知られるタンパク質は、単純なアミノ酸を繰り返すことにより、生体内で要求される複雑な機能を発現させている。一方で単純な構造のため、タンパク質を任意に配列・集合させることは困難である¹⁰。そこで、タンパク質を複雑な化学・遺伝子学的な手法を用いることなくナノ構造化することができれば医学・生理学分野において多くの知見を得ることを期待して、SPNTによる一次元タンパク質ナノ構造体の形成、およびナノ構造体の内部構造、表面上の機能性タンパク質の活性評価を行った。

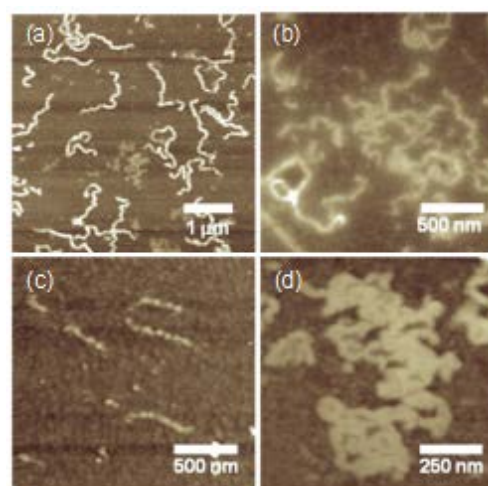


Figure 2. AFM micrographs of nanowires based on (a) HSA, (b) BSA, (c) ovalbumin, and (d) avidin.

タンパク質をベースとしたナノ構造体の形成

SPNT を用いて人由来血清アルブミン (human serum albumin, HSA) からナノ構造体形成を試みた結果、一次元ナノ構造体の AFM 画像が観察された。さらに、HSA 以外のタンパク質、牛由来血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA)、卵白アルブミン、アビジンからも同様にナノ構造体の形成が確認された (Figure 2)。この結果から SPNT は合成高分子だけでなく様々なタンパク質をベースとするナノ構造体形成が可能であることを明らかにした。SPNT で形成されるナノ構造体のサイズ、特に断面半径はターゲットとなる高分子材料の架橋効率に依存することが確認されており、式 (3) の理論モデルが提案されている。そこで BSA の架橋効率を算出し、タンパク質が SPNT を利用したナノ構造体形成の優れたベース材料になりうるかの評価を行った。形成されたナノ構造体は基板上で表面相互作用により変形していることから、楕円変形モデルを適用し断面半径: 12 nm を得た。BSA の放射線照射に対する架橋効率 $G(x)$ は $1.2 (100 \text{ eV})^{-1}$ と算出され、これは高い架橋効率を示すことが知られているポリ (4-ブロモスチレン) が示す $0.3 - 1.2 (100 \text{ eV})^{-1}$ に匹敵している。

タンパクナノ構造体の形状制御

合成高分子の場合と同様に HSA をベースとしたナノ構造体の形状制御を行った。膜厚が 350、560、1200 nm を示す HSA 薄膜からそれぞれナノ構造体形成を行い、形成されるタンパク質ナノ構造体の長さの比較を行った。AFM 観察により 350 nm の膜厚を示すサンプルからは、膜厚と等しい 350 nm の均一なナノ構造体形成が確認された (Figure 3(a))。同様に他のサンプルからも 560、1200 nm のナノ構造体を確認され、それぞれ対応した厚さをもつタンパク質薄膜から形成された (Figure 3(b,c))。これはタンパク質をターゲットとした場合にも構造体の長さの制御が可能であることを強く支持している。また薄膜の膜厚を 50 nm と極端に薄く形成しナノ構造体形成を行った場合、ワイヤー形状の構造体は観察されず、粒子状の構造体を確認された。高エネルギー荷電粒子が貫通する膜厚

であれば基板に固定されるため、塗布法から作製した薄膜からナノ構造体形成を行うと、最長 8 μm , Aspect ratio > 100 の非常に長いタンパクワイヤーを簡便に形成することが可能であった。

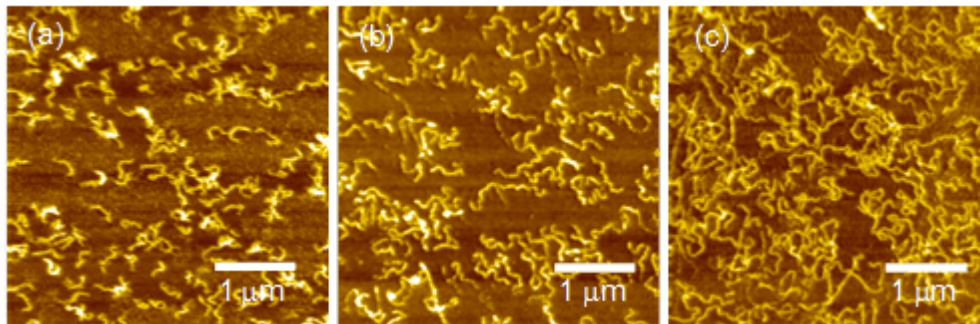


Figure 3. AFM micrographs of nanowires based on HSA prepared by exposing films of (a)250, (b)560, and (c)1200 nm thickness to 470 MeV $^{192}\text{Os}^{30+}$ particles at 1.0×10^9 ions cm^{-2} .

照射線量を 1.0×10^8 、 3.0×10^8 、 5.0×10^8 ions cm^{-2} と制御し、形成されるタンパクナノ構造体の数密度の比較を行った。AFM 観察より 1.0×10^8 ions cm^{-2} の照射線量を示すサンプルからは、23 個のナノ構造体が確認され、照射線量から計算される $25 \mu\text{m}^2$ あたりの 25 個とほぼ一致した (Figure 4(a))。同様に他のサンプルからもそれぞれの照射線量に対応した表面数密度のナノ構造体を確認された (Figure 4(b,c))。この結果からタンパク質を対象とした場

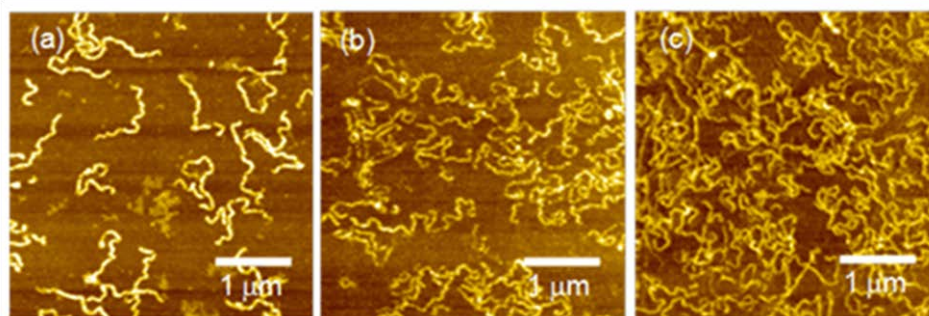


Figure 4. AFM micrographs of nanowires based on HSA prepared by exposing films of 1200 nm thickness to 490 MeV $^{192}\text{Os}^{30+}$ particles at of (a) 1.0×10^8 , (b) 3.0×10^8 , and (c) 5.0×10^8 ions cm^{-2}

合にも照射線量により構造体の数密度の制御が可能であり、ナノ構造体の基板との一端固定が有効に作用していることが確認された。

さらに、異なるエネルギー付与率を示す重イオンによる構造体形成では、形成されるタンパクナノ構造体の断面半径の変調が可能である。イオン種として異なる LET を示す Os, Xe, Ru を用いた場合、断面半径はそれぞれ $^{102}\text{Ru}^{18+}$ (320 MeV): 11 nm, $^{129}\text{Xe}^{25+}$ (450 MeV): 12 nm, $^{192}\text{Os}^{30+}$ (490 MeV): 15 nm を示した。LET の値が増加するにつれて構造体の断面半径が増加を示したことから、主として入射粒子の LET 値がタンパクナノワイヤーの断面半径を支配していることを示している。

タンパクナノ構造体の内部・表面構造の考察

SPNT により形成されたナノ構造体の内部構造の評価について、酵素反応によるタンパクナノ構造体の加水分解反応の適用を試みた。酵素反応にはアミノ酸の一種であるリジン・アルギニン残基の C 末端側のペプチド結合を選択的に切断するトリプシンを用いた。反応時間の経過とともにナノ構造体の断片化が進行し、酵素反応開始 20 分後ではナノ構造体は完全に消失した (Figure 5)。これは、SPNT で形成されるタンパクナノ構造体はタンパク質の

基本構造であるペプチド結合を保持した状態でナノ構造化していることを示唆している。

SPNTにより形成されるタンパク質ナノ構造体の表面活性評価について以下の検証を行った。蛋白質分子であるアビジンはビオチン分子と高い相互作用 ($K_d \approx 10^{-15}$ M) を示すことが知られている¹¹。アビジン由来のナノ構造体形成後、両末端にビオチン分子を持つリンカー化合物を利用し、アビジンとリンカー化合物溶液に交互に浸漬した場合に生じるナノ構造体の断面半径の変化を確認した。操作を3回繰り返した場合、構造体の一部に断面半径が修飾前の1.4倍に達する20 nmのナノ構造体を確認された。この結果から、SPNTでは、ビオチン-アビジンの相互作用といった単純タンパク質機能であれば十分に保持したまま構造体を形成可能であることを明らかとした。

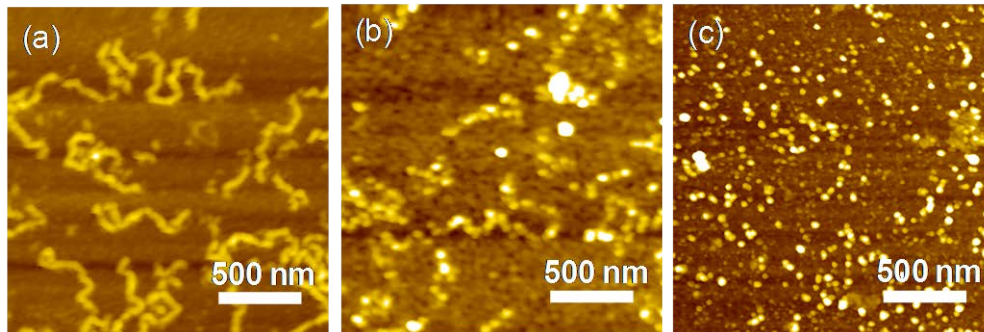


Figure 5. (a) AFM micrographs of nanowires based on HSA prepared by exposing films to 450 MeV $^{129}\text{Xe}^{25+}$ particles at 3.0×10^8 ions cm^{-2} . AFM micrographs of the hydrolysis process of nanowires with immersing into 0.5 w/v% trypsin - 1 mM EDTA·4Na aqueous solution at 37°C for 5 and 20 min, respectively.

2-2 合成高分子をベースとしたナノ構造体の機能化および形状制御

前項では、タンパク質の機能を維持したナノ構造体の形成に成功した。一方で SPNT は機能を示しても放射線照射に対して分解型の材料や分子量が極端に小さい単分子からのナノ構造形成は困難である。しかし、SPNT 法では粒子の飛跡に沿った構造体が形成されるため、自由に材料を選択して薄膜を形成し、ナノ構造体とすることが可能である。また材料により放射線架橋の効率は大きく異なり形成されるナノ構造体の形状、特に断面半径に大きな影響を与える。ここでは、合成高分子をベースとしたナノ構造体の機能化を目的とし、単体では構造体形成が困難な機能性材料と構造体形成が可能な高分子材料との混合によるナノ構造体への機能付与について述べる。また、より緻密な構造体の形状制御を目指し、 γ 線照射・高分子材料への官能基導入が構造体の断面半径に与える効果について報告する。

金ナノ粒子・シクロデキストリンを利用したナノ構造体の機能化

ゾル-ゲル法を用いることにより、高分子溶液中に金属ナノ粒子¹²を均一に分散させることが可能である。そこで、ゾル-ゲル法により金属ナノ粒子を分散させた高分子薄膜から、内部に金属ナノ粒子を含む構造体形成を行った。ポリヒドロキシステレン (PHS) 中に金ナノ粒子を分散させた薄膜から金ナノ粒子含有ナノ構造体を形成した (Figure 6)。形成されたナノ構造体の断面半径が、PHS のみから形成された場合と比較して小さな値を示したことから、金ナノ粒子が PHS 中に均一に分散しており、構造体形成過程で金ナノ粒子が架橋反応を阻害していると予測される。また、ナノ構造体内部に分散する金ナノ粒子は透過型電子顕微鏡観察から直接確認された。この結果から金属粒子の高分子薄膜中分散体から、表面積を極大化させた金属ナノ粒子内包ナノ構造体の形成を行う手法として適用可能であると考えられる。

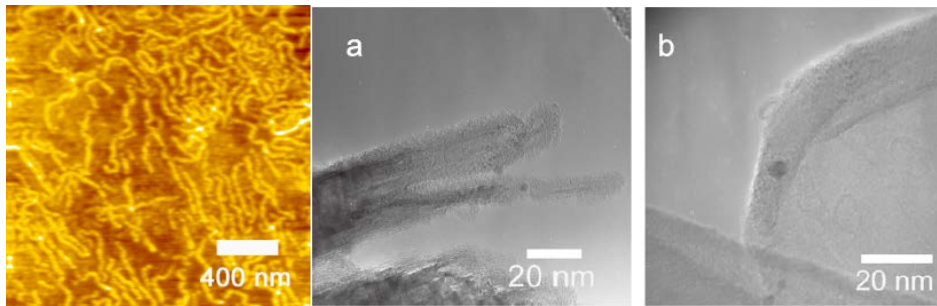


Figure 6. AFM and TEM micrographs of nanowires formed by 490 MeV Os ion beam irradiation to PHS included Au nano-particles thin films at the fluence of 1.0×10^{10} ions cm^{-2} .

また、機能性分子として知られるシクロデキストリン (CD) ¹³ を高分子材料に混合することによりナノ構造体の形成を行った。トルエン溶媒中でポリブロモスチレン (PBrS) 中にアセチル化した β -CD を混合した薄膜から、図に示す CD 含有ナノ構造体の形成が確認された (Figure 7(a))。そこで、水晶振動子 (Quartz Crystal Microbalance, QCM) 上に同様の手法で CD 含有ナノ構造体を形成し、気体分子に対する応答性の評価を行った。ギ酸に対しての応答では、CD を含まないナノ構造体を用いた場合と比較して 80 倍に、ポリブロモスチレン薄膜と比較した場合 320 倍に向上することが示された (Figure 7(b))。金ナノ粒子や CD といった、単一粒子ナノ加工法では放射線照射に対する反応や分子量の観点からナノ構造化が困難な機能性材料であっても、架橋効率の高い高分子材料中に分散させることにより、ナノ構造体自体に直接機能を付与することが可能であることを明らかとした。

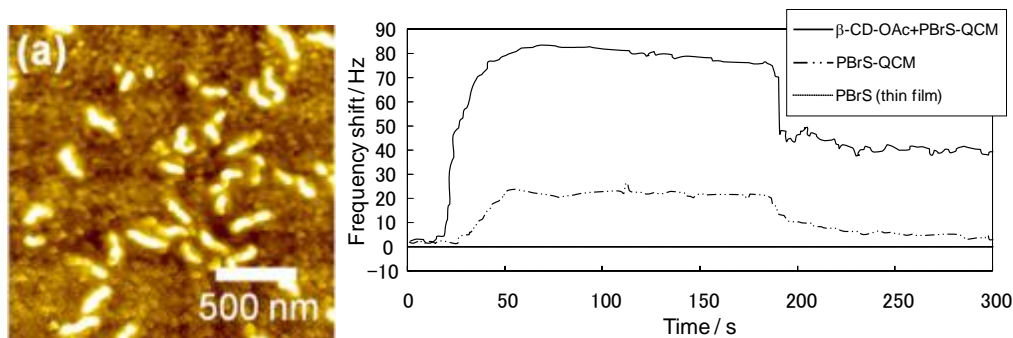


Figure 7. (a) AFM micrograph of nanowires on a QCM plate surface produced by SPNT for 200 nm thick films of PBrS blended with per(6-acetyl)- β -CD. (b) Comparison of sensor responses of QCMs with β -CD-OAc+poly(4-bromostyrene) nanowires (β -CD-OAc+PBrS-QCM), poly(4-bromostyrene) nanowires (PBrS-QCM), and thin film of poly(4-bromostyrene) to formic acid vapor at 2.5 mL in an 800 mL chamber.

γ 線照射・高分子材料への官能基導入による構造体の形状制御

放射線に対する架橋効率が低く構造体の断片化が主導的な高分子材料や、機能性分子などを混合した薄膜からナノ構造体を形成する場合、SPNT法の適用による均一な構造体の形成は困難である。そこで、架橋反応を補填、より高い架橋効率を示すベース材料の探索を目的に、 γ 線照射・高分子材料への官能基導入による構造体の形状制御を行った。

γ 線照射による構造体の形状制御として、ポリスチレン薄膜へ高エネルギー荷電粒子照射後、現像前に γ 線照射を行い、照射線量の違いによるナノ構造体の形状変化を観察した。それぞれの線量から形成されたナノ構造体の断面半径を評価した場合、 γ 線の照射線量の増大に伴い、形成されたナノ構造体の断面半径が増大することが明らかとなった (Table 1)。これは、 γ 線照射が薄膜全体で架橋反応を引き起こし、ナノ構造体内部・表面における架橋反応点の増大による。

Table 1. The radii of PS nanowires fabricated by the SPNT and γ ray irradiation.

	Dose (kGy)			
	0	22.4	52.2	171.7
$r(\text{PS})$ nm	5.1	8.6	9.1	10.2

次に、官能基導入による構造体の形状制御として、ニトロキシドを介したラジカル重合¹⁴から得られたポリスチレン (PS) およびクロロメチル、アジド、アダマンタン基を分子鎖内にもつポリスチレン誘導体からナノ構造体形成を行った。すべてのポリスチレン誘導体から良好なナノ構造体形成が観察され、架橋効率の算出の結果、効率的な架橋反応の進行が確認された (Table 2)。架橋効率は官能基に強く依存

し、アジド、クロロメチル、アダマンタン基の順に高い効率を示した。特に分子内にアダマンタンを修飾したポリスチレン誘導体は、著しく高い架橋効率を示し、形成されたナノ構造体は、さまざまな条件下 (良溶媒・長時間・加熱) においても構造体の崩壊・数密度の変化が観察されなかった。また電子線描画で一般的に使用されるネガ型レジスト (SU-8) を用いた場合¹⁵に匹敵するアスペクト比が 750 に達するナノ構造体の形成が可能であった。これは安定性の高いアダマンチルラジカル¹⁶が飛跡内に高密度に生じ、2次架橋反応をすることによる。この結果から、ポリスチレン骨格への官能基導入は、架橋効率の制御にきわめて有効であり、望むサイズを有するナノ構造体を選択的に形成できることが示された。同時に、高い架橋効率はナノ構造体に高い機械的強度を与え、表面修飾反応に代表されるさまざまな条件下での機能化にとって有効である。

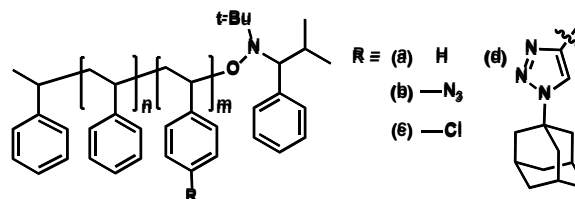


Figure 10. Chemical structures of polystyrene derivatives; (a) PS ($M_n = 17200$, PDI = 1.18), (b) PSCIS ($M_n = 13900$, PDI = 1.82, $m = 0.37$), (c) PSAS ($M_n = 14500$, PDI = 1.81, $m = 0.35$), and (d) PSAdS ($M_n = 16200$, PDI = 1.85, $m = 0.25$)

Table 2. The values of cross-linking efficiency and radius of nanowires based on polystyrene derivatives fabricated by the SPNT.

Ion beams	G(x) and (r / nm)			
	PS	PSCIS	PSAS	PSAdS
450 MeV $^{129}\text{Xe}^{23+}$	—	4.6 (13.0)	2.1 (8.9)	—
490 MeV $^{192}\text{Os}^{30+}$	0.60 (4.5)	—	—	9.2 (19.6)

3. 引用 (参照) 文献等

- Wilson, R. R. *Radiology* **1946**, *47*, 487–491.
- a) Stadler, L. J. *Science* **1928**, *68*, 186–187. b) Goodhead, D. T. *Radiat. Environ. Biophys.* **1995**, *34*, 67–72.
- Young, D. A. *Nature* **1958**, *182*, 375–377
- a) Fleisher, R. L.; Price, P.B.; Walker, R.M. *Annu. Rev. Nucl. Sci.* **1965**, *15*, 1–28. b) Silk, E. C. H.; Barnes, R. S. *Phil. Mag.* **1959**, *4*, 970–972.
- Cartwright, B. G.; Sirk, E. K.; Price, P. B. *Nucl. Instrum. and Meth.* **1978**, *153*, 457–460
- Kinoshita, K.; Price, P.B., *Phys. Rev. D* **1981**, *24*, 1707–1717.
- Peng, L.; Apel, P.; Maekawa, Y.; Yoshida, M. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **2000**, *168*, 527–532.
- Price, P. B.; Walker, R. M. *Nature* **1962**, *196*, 732–733.
- a) Seki, S.; Maeda, K.; Tagawa, S.; Kudoh, H.; Sugimoto, M.; Morita, Y.; Shibata, H. *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 1663–1665. b) Seki, S.; Tsukuda, S.; Maeda, K.; Matsui, Y.; Saeki, A.; Tagawa, S. *Phys. Rev. B* **2004**, *70*, 144203–1–8. c) Seki, S.; Tsukuda, S.; Maeda, K.; Tagawa, S.; Shibata, H.; Sugimoto, M.; Jimbo, K.; Hashitomi, I.; Kohyama, A. *Macromolecules*

- 2005, 38, 10164–10170. d) Seki, S.; Tagawa, S. *Polym. J.* **2007**, 39, 277–293. e) Tsukuda, S.; Seki, S.; Tagawa, S.; Sugimoto, M.; Idesaki, A.; Tanaka, S.; Oshima, A. *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 3407–3409. f) Tsukuda, S.; Seki, S.; Tagawa, S.; Sugimoto, M. *Appl. Phys. Lett.* **2005**, 87, 233119–1–3.
- 10) a) Burazerovic, S.; Gradinaru, J.; Pierron, J.; Ward, T. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 5510–5514. b) Men, D.; Guo, Y.-C.; Zhang, Z.-P.; Wei, H. P.; Zhou, Y.-F.; Cui, Z.-Q.; Liang, X.-S.; Li, K.; Leng, Y.; You, X.-Y.; Zhang, X.-E. *Nano Lett.* **2009**, 9, 2246–2250.
- 11) a) Green, N. *Biochem. J.* **1963**, 89, 585–591. b) Bayer, E. A.; de Meester, F.; Kulik, T.; Wilchek, M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1995**, 53, 1–9.
- 12) a) Kerker, M. *J. Colloid Interface Sci.*, **1986**, 112, 302. b) Fujiwara, T.; Richie, K.; Murakoshi, H.; Jacobson, K.; Kusumi, A. *J. Cell. Biol.* **2002**, 157, 1071.
- 13) Wishnia, A.; Lappi, S.J. *J. Mol. Biol.*, **1974**, 82, 77–89. b) Rekharsky, M.; Yamamura, H.; Kawai, M.; Inoue, Y. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 5360–5361.
- 14) a) Hawker, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11185. b) Benoit, D.; Chaplinski, V.; Braslau, R.; Hawker, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3904.
- 15) Seki, S.; Watanabe, S.; Sugimoto, M.; Tagawa, S.; Tsukuda, S. *J. Photopolym. Sci. Technol.* **2008**, 21, 541–543.
- 16) Lloyd, R. V.; DiGregorio, S.; DiMauro, L.; Wood, D. E. *J. Phys Chem.*, **1980**, 84, 2891.