

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：10106

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05526

研究課題名(和文) 多色変化型糖センサーアレイの高機能化と多検体同時検出システムへの展開

研究課題名(英文) Development of multicolor saccharide sensor array and its application for multi-target sensing systems

研究代表者

兼清 泰正 (Kanekiyo, Yasumasa)

北見工業大学・工学部・准教授

研究者番号：40435748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者が以前開発した糖センサーの高機能化に向けて、糖認識部位となるボロン酸基の分子構造を変化させた結果、ヒドロキシメチル基の導入により、グルコースに対する応答感度を向上させることができた。
糖以外のターゲットとして過酸化水素を取り上げ、新たなメカニズムによる色調変化型センサーの開発に取り組んだ。ボロン酸基とアミノ基を様々な比率で含有する薄膜を作製し、過酸化水素水溶液に浸漬した後に着色する手法を用いた結果、過酸化水素濃度に応じて多彩な変色パターンを実現できた。
さらに次亜塩素酸に対するセンサーの開発も行い、薄膜に含まれる官能基の種類や含有量に応じて、多様な色調変化が生じることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Molecular structure of the boronic acid monomer was modified to improve glucose sensitivity. Saccharide sensors were prepared on a pattern-printed microscope slide as a thin film containing newly synthesized boronic acid monomer units. By examining responsiveness against saccharides, it was found that introduction of hydroxymethyl group onto the aromatic ring of the boronic acid is effective for sensitivity improvement.
The boronic acid-containing thin film was applied for sensing of hydrogen peroxide. By changing monomer composition and dye, variety of color change was realized.
Hypochlorite sensors were also developed. After thoroughly tuning functionality of the thin film, distinct color change appeared.

研究分野：分子認識化学

キーワード：ボロン酸 センサ 過酸化水素 次亜塩素酸 薄膜

1. 研究開始当初の背景

我々の身の回りには様々な化学物質があふれており、健康や環境を害するものも少なくない。中でも、糖質の過剰摂取に起因する糖尿病の患者数が世界的に増加しており、糖尿病の予防や早期に向けて、体液中のグルコース濃度を低コストで簡便かつ正確に測定できる新たな手法の構築が求められている。

従来、グルコース検出法としては、グルコースオキシダーゼなどの酵素反応を利用した電気化学センサーや比色法が用いられてきたが、酵素は温度や湿度の変化によって容易に活性が低下するため、耐久性や再現性に乏しいという欠点を抱えている。そこで研究代表者は、安定な合成化合物であるポロン酸を用いた色調変化型センサーの開発に取り組み、明瞭な色調変化を示す糖センシングチップの実現に成功している。しかし、このセンサーを実用化するには、グルコースに対する応答感度や応答速度が不十分と考えられ、それらの課題点を克服するための新たな方法論の導入が必要である。

2. 研究の目的

まず、グルコースに対する応答感度の更なる向上に取り組む。そのために、従来とは異なる分子構造を有するポロン酸モノマーを合成し、これを用いて薄膜を作製して、得られたセンサーの応答特性を検討する。そして、どの分子構造がグルコースに対する応答感度の向上に最も効果的であるかを明らかにする。また、糖センサーの応答特性をより正確かつ詳細に評価するため、薄膜の色調変化を数値化し定量的に表示するための手法を確立する。

次に、糖に対する応答速度の向上を図る。従来の製膜法では、無孔性の緻密な構造を有する比表面積の低い膜が得られるため、糖や色素分子の膜内外の移動に大きな制約が生じ、応答速度の低下につながっているものと考えられる。そこで本研究では、ナノ構造体を活用して薄膜を多孔質化し、高い比表面積を有し迅速な応答を示すセンサーの作製を試みる。そして、多孔質化により糖に対する応答速度がどの程度向上するかを明らかにする。

さらに、糖類以外の化合物に対する応答メカニズムの新規導入を検討する。最終的に、様々なターゲットに対応した複数の薄膜を基板上に作製し、我々の身の回りに存在する多種類の測定対象物質を1枚のチップにより検出・定量できる多検体同時検出システムへの発展を目指す。

3. 研究の方法

(1) 新規ポロン酸モノマーの合成

本研究では、従来の無置換のポロン酸モノマー(1)に加えて、分子構造の異なる6種類のモノマーを合成した。ヒドロキシメチル基を導入したポロン酸モノマー(2)は、5-

アミノ-2-ヒドロキシメチルフェニルポロン酸と塩化アクリロイルを塩基存在下で反応させて合成した。生成物の同定は、¹H NMR スペクトルの測定により行った。四級アンモニウム構造を有するモノマー(4, 5, 6)は、各々の異性体に対応したプロモメチルフェニルポロン酸をジメチルアミノプロピルメタクリルアミドと反応させることにより合成した。その他のモノマーは、2の場合と同様に合成した。

(2) 各種センサーの作製

ポロン酸モノマー、第三級アミンモノマー、アクリルアミドなどの各種モノマーと架橋剤であるメチレンビスアクリルアミドを所定の割合で含むモノマー溶液を調製し、凍結脱気を行った後に光重合開始剤を添加した。この溶液を、印刷スライドガラスの円形ガラス露出部(直径8mm)に滴下し、3時間紫外線を照射して重合を行った。その後、得られた薄膜を水で洗浄して乾燥した後、1スポットずつ分割してその後の測定に用いた。

(3) センサーの応答測定

糖センサーの場合、得られた薄膜を青色および黄色のアニオン性色素で着色した後、種々の濃度の糖水溶液に一定時間浸漬した。その後、糖に応答した色調変化を観測するため、積分球付きの紫外可視分光光度計を用いて薄膜の吸収スペクトルを測定した。過酸化水素センサーと次亜塩素酸センサーの場合は、未着色の薄膜を過酸化水素または次亜塩素酸を含む水溶液に一定時間浸漬し、取り出して水洗・乾燥した後、色素水溶液へ浸漬して、着色状況を観察した。

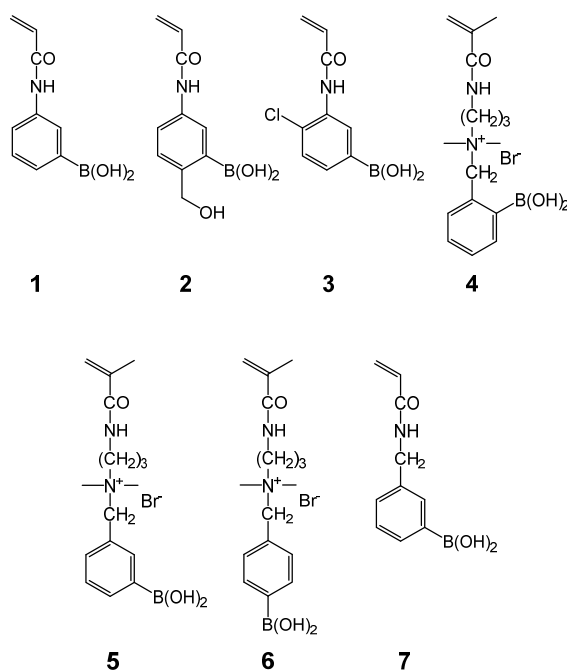


図1. ポロン酸モノマーの分子構造

4. 研究成果

(1) 新規ボロン酸モノマーによるグルコース応答感度向上

以前より用いている無置換のボロン酸モノマー(1)に加え、芳香環上にヒドロキシメチル基(2)や塩素基(3)を導入したモノマー、四級アンモニウム構造を有する3種類のモノマー(4, 5, 6), およびアクリルアミド基に隣接してメチレン基を有するモノマー(7)を合成することに成功した(図1)。これらのボロン酸モノマーを用いて薄膜を作製し、青色および黄色のアニオン性色素で着色した後、pH7.4のグルコース水溶液に浸漬して薄膜の色調変化を観察した(図2, 3)。その結果、従来の無置換ボロン酸モノマー(1)を用いたサンプル(B1-1)と比べ、ヒドロキシメチル基を導入したボロン酸モノマー(2)を用いたサンプル(HMB1-1)の方が、より低いグルコース濃度で色調変化を生

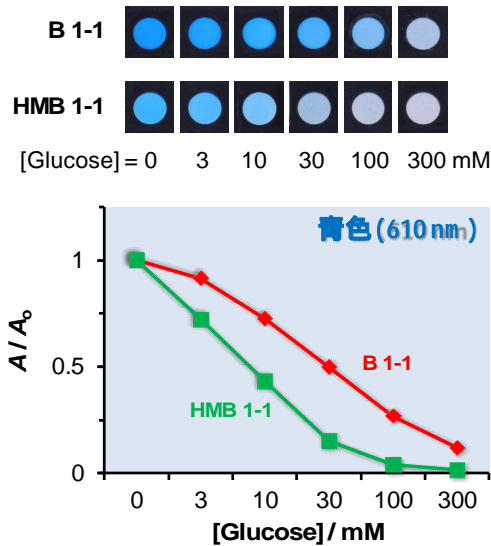


図2. グルコースに応答した色調変化(青色)

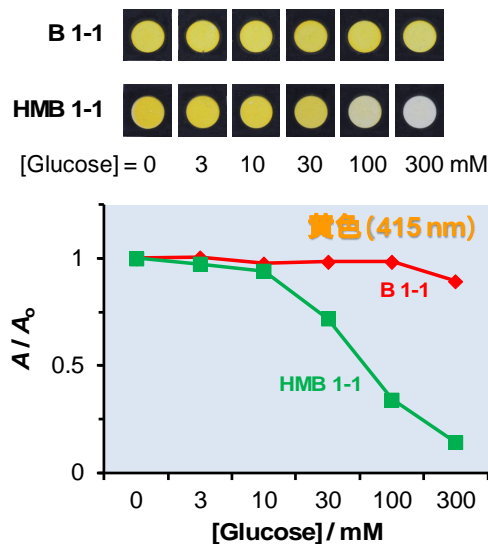


図3. グルコースに応答した色調変化(黄色)

じることがわかった。これは、ヒドロキシメチル基を導入することによりボロン酸の酸性度が増加し、糖に対する親和性が増大したことによるものと考えられる。その他のモノマーについても検討を行ったが、従来よりも高い感度を示すものは見出せなかった。以上の結果、ヒドロキシメチル基を導入した新規ボロン酸モノマーを薄膜作製に用いることにより、グルコースに対する応答感度を大幅に向上可能であることが明らかになった。

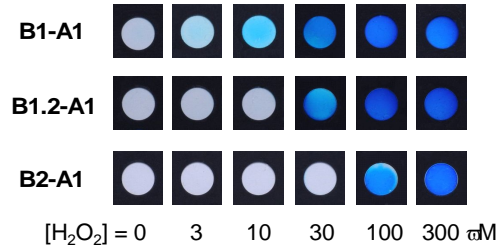


図4. 過酸化水素に応答した色調変化(青色)

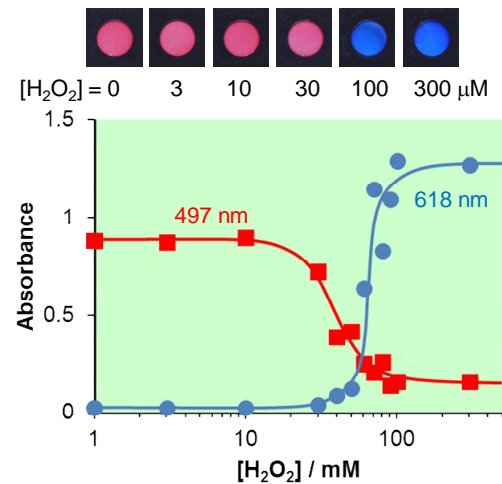


図5. 過酸化水素に応答した色調変化(青色+赤色)

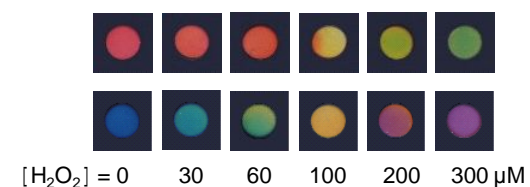


図6. 過酸化水素に応答した多彩な色調変化

(2) 過酸化水素センサーの創製

ボロン酸は、過酸化水素のような活性酸素種と反応してフェノールへと変化することが知られている。そこで本研究では、このようなボロン酸の反応を活かした新規センシングシステムを開拓すべく、検討を行った。ボロン酸基と第三級アミノ基を含有する薄膜を作製し、過酸化水素水溶液に一定時間浸漬した後、色素水溶液に浸漬して着色を行った。青色アニオン性色素により着色した場合、薄膜は過酸化水素濃度の増大とともに無色から青色へ変化した。また、薄膜のモノマー組成によって応答挙動が変化し、ボロン酸基とアミノ基のモル比が 1:1 の場合 (B1-A1) は 3 μM から着色が生じたのに対し、2:1 のサンプル (B2-A1) では 100 μM から着色が生じた (図 4)。青色アニオン色素と赤色カチオン色素を混合して着色を行った場合は、過酸化水素の濃度が低い領域では赤色を呈し、高濃度領域では青色へ変化する挙動が観察された (図 5)。以上の結果から、過酸化水素との反応前の薄膜は無電荷または負電荷を帯びた状態であり、アニオン色素を吸着せずカチオン色素を吸着するのに対し、過酸化水素との反応より正電荷を帯びた状態へ変化し、結果としてアニオン色素の静電的な吸着が生じたものと考えられる。さらに、種々の色素を組み合わせることで、過酸化水素濃度に依存した多彩な色調変化を実現できた (図 6)。

(3) 次亜塩素酸センサーの創製

当初は、過酸化水素センサーと同様に、ボロン酸基と第三級アミノ基を含有する薄膜を用いて測定を試みた。しかし、次亜塩素酸に反応した色調変化はほとんど現れなかったため、種々検討を加えた結果、次亜塩素酸の示す高い反応性のため、ボロン酸以外の官能基にも化学反応が生じていることが判明した。そこではじめに、ボロン酸やアミンなどの機能性官能基を含まない薄膜の応答挙動を調査した (図 7)。その結果、アクリルアミドと架橋剤のみから成るサンプル (B0T0-1) を青色カチオン色素により着色した場合、次亜塩素酸濃度の増大につれて薄膜は無色から青色へ変化していった。また、アクリルアミドに代えてヒドロキシエチルアクリルアミドを用いたサンプル (B0T0-3) の場合、応答濃度領域が大幅に高濃度側へシフトした。このような応答挙動が生じたことから、薄膜中のアミド基が次亜塩素酸と反応することにより負に帯電した官能基へ変化しているものと考えられるが、そのメカニズムについては今後の検討課題である。つぎに、第三級アミノ基を含有する薄膜を用いて検討を行った結果、赤色アニオン色素を用いて着色した場合は赤色から無色へ、青色カチオン色素を用いて着色した場合は無色から青色へと変化した (図 8)。この場合、次亜塩素酸との反応前は、アミノ基がプロトン付加に

より正電荷を帯びているためアニオン色素を静電的に吸着するが、次亜塩素酸との反応によりアミノ基が無電荷または負電荷を有する官能基へと変化すると、アニオン色素の代わりにカチオン色素を吸着するようになるものと考えられる。この詳細な応答メカニズムについても今後明らかにしていきたいと考えている。

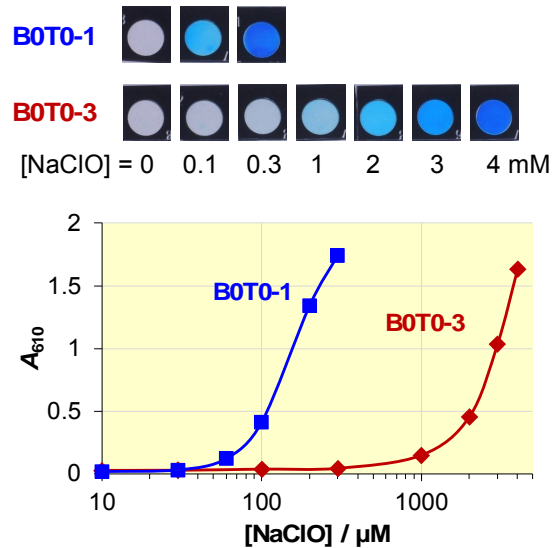


図 7. 次亜塩素酸に反応した色調変化 (機能性官能基なし)

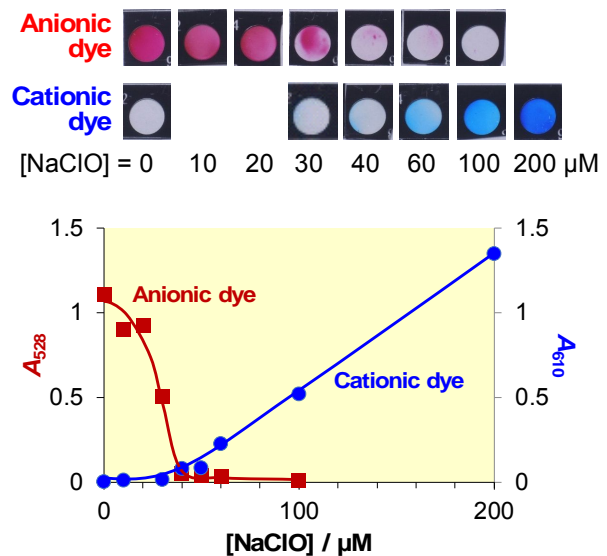


図 8. 次亜塩素酸に反応した色調変化 (第三級アミノ基含有)

(4) 結論

ボロン酸の分子構造を変化させた種々のモノマーを合成し、薄膜作製に用いて糖に対する応答特性を検討した結果、ボロン酸のオルト位にヒドロキシメチル基を導入したボロン酸モノマーが応答の高感度化に有効であることが明らかになり、従来のモノマー

を用いた場合と比較して大幅なグルコース応答感度の向上を達成できた。また、過酸化水素や次亜塩素酸のような活性酸素種に対する応答メカニズムを創出し、各々の化学種に対して明瞭かつ多彩な色調変化を示すセンサーの開発に向けた新規方法論を確立した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

K. Takeshima, K. Mizuno, H. Nakahashi, H. Aoki, Y. Kanekiyo, "Ratiometric sensing of hydrogen peroxide utilizing conformational change in fluorescent boronic acid polymers", *J. Anal. Methods Chem.*, **2017**, 7829438 (査読あり)
DOI: 10.1155/2017/7829438

H. Tani, J. Takeshita, H. Aoki, K. Nakamura, R. Abe, A. Toyoda, Y. Endo, S. Miyamoto, M. Gamo, H. Sato, M. Torimura, "Identification of RNA biomarkers for chemical safety screening in mouse embryonic stem cells using RNA deep sequencing analysis", *PLoS One*, **2017**, 12, e0182032 (査読あり)
DOI: 10.1371/journal.pone.0182032

T. Denda, R. Mizutani, M. Iijima, H. Nakahashi, H. Yamamoto, Y. Kanekiyo, "Thin films exhibiting multicolor changes induced by formaldehyde-responsive release of anionic dyes", *Talanta*, **2015**, 144, 816-822 (査読あり)
DOI: 10.1016/j.talanta.2015.06.012

Y. Iwami, T. Yokozawa, H. Yamamoto, Y. Kanekiyo, "Boronic acid-based thin films that show saccharide-responsive multicolor changes", *J. Appl. Polym. Sci.*, **2015**, 132, 42679 (査読あり)
DOI: 10.1002/app.42679

H. Aoki, "Electrochemical Label-Free Nucleotide Sensors", *Chem. Asian J.*, **2015**, 10, 2560-2573 (査読あり)
DOI: 10.1002/asia.201500449

[学会発表](計 33 件)

兼清泰正 他、種々の官能基を導入した薄膜の次亜塩素酸に応答した色調変化挙動、第 78 回分析化学討論会、2018 年
Y. Kanekiyo, Novel Strategies for colorimetric sensing of reactive

oxygen species, 9th International Conference on Analytical Chemistry, 2018

Y. Kanekiyo, *et al.*, Response characteristics of novel colorimetric sensors for hypochlorite, 日本化学会第 98 春季年会、2018 年

Y. Kanekiyo, *et al.*, Colorimetric polyanion sensors utilizing the dye-displacement strategy, 日本化学会第 98 春季年会、2018 年

兼清泰正 他、色調変化型次亜塩素酸センサーの応答特性に及ぼす官能基の影響、化学系学協会北海道支部 2018 年冬季研究発表会、2018 年

兼清泰正 他、生体高分子に応答して明瞭多彩な色調変化を示す薄膜型センサーの創製、日本分析化学会第 67 年会、2017 年

兼清泰正 他、新規メカニズムに基づく次亜塩素酸応答性薄膜の色調変化挙動、日本分析化学会第 67 年会、2017 年

兼清泰正 他、多様な分子刺激に応答するヒドロゲルの設計と特性解析、第 66 回高分子討論会、2017 年

兼清泰正 他、ポロン酸含有薄膜を用いた色調変化型糖センサーの酵素機能による高感度化、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017 年

兼清泰正 他、ポロン酸含有薄膜と酵素との組み合わせによる高感度高選択の色調変化型センサーの開発、日本化学会北海道支部 2017 年夏季研究発表会、2017 年

兼清泰正 他、新規メカニズムによる色調変化型次亜塩素酸センサーの応答特性、日本化学会北海道支部 2017 年夏季研究発表会、2017 年

兼清泰正 他、刺激応答性アミロースのヨウ素包摂錯体形成機能を利用した新規センシング法、第 17 回リング・チューブ超分子研究会シンポジウム、2017 年

兼清泰正 他、ポリアニオンに応答して明瞭な色調変化を示す薄膜型センサーの創製、第 77 回分析化学討論会、2017 年

Y. Kanekiyo, Novel colorimetric sensors for hypochlorite, 日本化学会第 97 春季年会、2017 年

Y. Kanekiyo, *et al.*, Colorimetric polyanion sensors utilizing interactions at thin film surface, 日本化学会第 97 春季年会、2017 年

Y. Kanekiyo, *et al.*, Stimuli-responsive hydrogels that exhibit responsiveness against various molecules, 日本化学会第 97 春季年会、2017 年

兼清泰正 他、新規応答メカニズムに基

づく色調変化型次亜塩素酸センサーの
作製、化学系学協会北海道支部 2017 年
冬季研究発表会、2017 年

Y. Kanekiyo, Dye-displacement
strategies for colorimetric sensing
against various compounds, 2016
International Symposium for Advanced
Materials Research, 2016

Y. Kanekiyo, *et al.*, Molecular
recognition of reactive oxygen
species and nucleotides by
fluorescent boronic acid polymers,
2016 International Symposium for
Advanced Materials Research, 2016

Y. Kanekiyo, *et al.*, Highly sensitive
glucose sensors created by combining
boronic acid-containing thin film
with enzymes, 2016 International
Symposium for Advanced Materials
Research, 2016

〔図書〕(計 1 件)

Y. Kanekiyo, *et al.*, RSC Publishing,
Boron: Sensing, Synthesis and
Supramolecular Self-Assembly, 2015,
pp. 1-43

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼清 泰正 (KANEKIYO, Yasumasa)

北見工業大学・工学部・准教授

研究者番号：40435748

(2) 研究分担者

青木 寛 (AOKI, Hiroshi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・工
ネルギー・環境領域・主任研究員

研究者番号：00392580