

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05525

研究課題名(和文) 表面増強効果の相互補完により達成される変性/未変性アルブミン同時比色センシング

研究課題名(英文) Simultaneous Denatured/Udenatured Albumin Colorimetric Sensing Achieved by Surface-Enhanced Photochromic Phenomena

研究代表者

安達 健太 (Adachi, Kenta)

山口大学・大学院創成科学研究科 ・准教授

研究者番号：80535245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：金属酸化物半導体のひとつである酸化タングステン(WO₃)や酸化モリブデン(MoO₃)は、紫外光照射により無色から青色へと着色するフォトクロミズムを示す。今回我々は、WO₃、MoO₃コロイド粒子表面への種々 -アミノ酸化合物吸着に伴う特異的フォトクロミック特性変化を見出した。本研究では、種々条件を変化させ -アミノ酸化合物/WO₃コロイド水溶液、または -アミノ酸化合物/MoO₃コロイド水溶液のフォトクロミック特性に関して詳細に調査した。加えて、WO₃またはMoO₃水溶液にアルブミンタンパク質を添加しフォトクロミック特性を精査した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨今の急速な高齢化社会の進展と生活習慣病の増加を鑑みるに『生体試料中のタンパク質、そしてその基本構成単位である -アミノ酸を、選択的、かつ高感度に測定できる簡便・安価な新規分析法の開発』は、生体分析化学分野における喫緊の重要課題の一つである。本研究では、酸化タングステン、および酸化モリブデン微粒子の表面増強フォトクロミズムを用いたラベルフリーでのタンパク質、および -アミノ酸検出に関する定性・定量的な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Tungsten oxide (WO₃) and molybdenum oxide (MoO₃) are metal oxide semiconductors that exhibit photochromic phenomena under UV irradiation, ranging from colorless to blue. In this study, the surface-enhanced photochromic phenomena of various -amino acids adsorbed on WO₃ and MoO₃ nanoparticles in aqueous systems were investigated by UV-visible absorption spectroscopy. Derivatization of the -amino acids is not required, and eventually, highly accurate quantification is possible by photochromatic coloring with WO₃ and MoO₃ under UV light. The UV irradiation was not necessary for the derivatization of -amino acids. The naked eye can confirm the detection process during UV irradiation. Thus, a simple and unique approach for highly sensitive "label-free" colorimetric sensing of -amino acids is proposed. Furthermore, human serum albumin was added to WO₃ or MoO₃ nanoparticle aqueous solutions to characterize their photochromic properties.

研究分野：分析化学

キーワード：フォトクロミズム アルブミン アミノ酸 ナノ粒子 センシング 比色分析 吸着 分析化学

1. 研究開始当初の背景

自然科学の真たる目的が、様々な自然現象の中に隠れている法則性を明らかにしていくことであれば、現象を客観的に比較するために「測定」が必須となる。ここでいう「測定」とは、長さ・重さなどで定義された基本物理量の倍数、すなわち数字として表すことを指す。数値化することで、主観的な要素を排除し、自然現象の基本法則を客観的・定量的に評価することが可能となる。色を用いて物質を測定しようという試みは、古くより実施されてきた。測定したい物質との特異的な化学反応によって生じた着色化学種の溶液に光を当て、溶液の光吸収を観察する。その溶液の着色強度の差から物質の濃度を定量できる。着色の程度を目視で比較して行うため、この方法は比色分析と呼ばれる。

金属オキソ酸とは、前周期遷移金属の4～7族元素を含み、化学式 M_mO_n (M: 金属原子) で表される分子状金属酸化物を指す。通常、金属オキソ酸は、金属原子に酸素原子が4配位または6配位した四面体あるいは八面体を基本骨格として、これらが結合した構造を有しており、金属の種類、その結合様式の違いにより様々な構造、そして多種多様な化学的性質を示す。金属オキソ酸は、その特異な着色特性から古来より比色分析に用いられてきた。水溶液中のリン酸イオンの定量に用いられるモリブデンブルー法が有名である。酸性条件下、 $H_2PO_4^-$ の状態で存在するリン酸イオンは、12個のモリブデン酸イオン (MoO_4^{2-}) とリンモリブデン酸イオン ($[PMo_{12}O_{40}]^{3-}$: 図1左) を生成する。リンモリブデン酸イオンを含む水溶液に適当な還元剤を加えると、12個の Mo^{6+} の一部が Mo^{5+} に還元され、混合原子価化合物に変化し青色のモリブデンブルー ($[PMo_{12}O_{40}]^{n-}$; $n \geq 4$) となる。青色水溶液の色の濃さを調べることでリン酸イオンの濃度を定量できる (図1右)。



図1 リンモリブデン酸イオン (左 [黒:P, 灰:Mo, 白:O]) とモリブデンブルー呈色反応 (右) リン酸イオン濃度増加に伴い、青色が濃くなっている。

タンパク質の基本構成成分であるアミノ酸は、動植物の生体活動において重要な役割を果たしている。例えば、人間成人における総血漿アミノ酸は約40種類のアミノ酸で構成されており、そのアミノ酸濃度は、摂取タンパクの分解、体内タンパクの分解、非必須アミノ酸合成とタンパク合成など常に動的平衡状態にある。種々アミノ酸濃度を敏速に分離・定量することで、生体内におけるアミノ酸の動態と平衡状態に関する情報を得ることができる。アミノ酸分析法としてニンヒドリン発色法やプレカラム誘導体化による高速液体クロマトグラフ分析法などが知られている。しかし、これら手法では煩雑な前処理が必要であるため、簡便・高感度な新規アミノ酸分離分析方法が要望されている。そこで本研究にて「酸化タングステン(WO_3)、または酸化モリブデン(MoO_3)ナノコロイド粒子の表面増強フォトクロミズム特性を利用した前処理を必要としない新規タンパク質、アミノ酸分離検出方法の開発」を実施する着想に到った。

2. 研究の目的

フォトクロミズムとは『単一の化学種が、光の作用により分子量を変えずに、色の異なる2つの状態間を可逆的に異性化する現象』を指す。金属酸化物のフォトクロミズム発現機構は以下の通りである。金属酸化物は半導体であり、その電子状態は価電子帯と伝導帯からなるエネルギーバンド構造を取る。この価電子帯と伝導帯のエネルギー差 (バンドギャップ: E_g) よりも大きなエネルギーを有する光が照射されると、正孔と励起電子が生成する。生成した正孔は、金属酸化物近傍に存在する水分子を酸化し、酸素分子と水素イオンを発生させる。一方、励起電子は、金属酸化物中の金属原子を還元する。還元された金属原子が生成することで、酸化数の異なる同種の金属原子が同時に存在する見かけ上の混合原子価化合物となり、金属酸化物は着色する。また還元された金属原子は、空気中の酸素分子により容易に酸化されるため暗所で退色する。前述のモリブデンブルー法では、還元剤の添加を必要とするが、光照射により発生した励起電子を金属酸化物自身の還元で活用できれば、比色分析手順の簡略化が図れる。酸化タングステン(WO_3)や酸化モリブデン(MoO_3)のフォトクロミズムは、特定の極性置換基を有する有機分子が表面に吸着することで増強すると報告されている。実際に、近年申請者は、 WO_3 コロイド粒子に種々アミノ酸化合物を複合化させることで WO_3 のフォトクロミズムが飛躍的に増強することを発見している。【K.Adachi et al. *Analyst*, 2013】本研究では、まずアミノ酸化合物表面吸着に伴う WO_3 、 MoO_3 表面増強フォトクロミズムに関する基礎的研究を推進する。得られた研究成果を展開することで、検出原理として WO_3 、または MoO_3 表面増強フォトクロミズム (比色検出)、そして新しいアミノ酸化合物、アルブミンに代表されるタンパク質類の分離分析法に関する開発指針を得るべく研究活動を実施する。

3. 研究の方法

酸化タングステン(WO₃)や酸化モリブデン(MoO₃)のフォトクロミズムを利用した前処理を必要としない新規アミノ酸分離検出方法の構築を研究目的とし、以下の【合成】・【計測】に分類される2つの基本計画を実施する。

【合成】高感度センシングに適した WO₃, MoO₃ コロイド粒子の合成・評価技術の確立

MoO₃コロイド粒子の形態(サイズ, 表面積, 形)や結晶(形, サイズ)の制御は、電気泳動時におけるアミノ酸の擬似固定相としての能力、そして表面増強フォトクロミズムに大きな影響を与える。アミノ酸高感度センシングに適した WO₃, MoO₃コロイド粒子の合成技術の確立に注力し、アミノ酸吸着に伴う表面増強フォトクロミズムの評価を実施する。

【計測】アミノ酸・タンパク質吸着表面増強フォトクロミズムの定量的理解

WO₃、及び MoO₃のフォトクロミズムは、アミノ基、カルボキシル基などの極性置換基を有する有機分子が表面に吸着することで増強することが報告されているが、そのメカニズム、及び定量的理解は、未だ十分に得られていない。そこで本研究では、WO₃, MoO₃コロイド粒子表面への種々アミノ酸吸着・会合挙動と表面増強フォトクロミズムとの関連を紫外可視吸光度法、及び高速液体クロマトグラフィー法を用いて調査する。

4. 研究成果

【合成】高感度センシングに適した WO₃, MoO₃ コロイド粒子の合成・評価技術の確立

表面増強フォトクロミズムによる高感度センシングに適した WO₃, MoO₃コロイド粒子の合成・評価技術の確立を指向し、比較的安価なタングステン酸ナトリウム、モリブデン酸ナトリウムを出発材料とした WO₃, MoO₃ナノコロイド粒子の合成手法を確立した。WO₃または MoO₃ナノコロイド粒子の水溶液は、タングステン酸ナトリウム、またはモリブデン酸ナトリウム水溶液中に塩酸を加えて攪拌した後、その水溶液を半透膜チューブ中に封入して種々のイオンやクラスター (<20 Å) を透析除去しながら、オストワルド熟成を行うことで得られる(粒子サイズ排除透析法: 図2)。使用する半透膜の空孔サイズ(分画分子量)を変更すると、得られる金属酸化物ナノコロイド粒子のサイズをナノレベルで任意に調整することが可能であった。

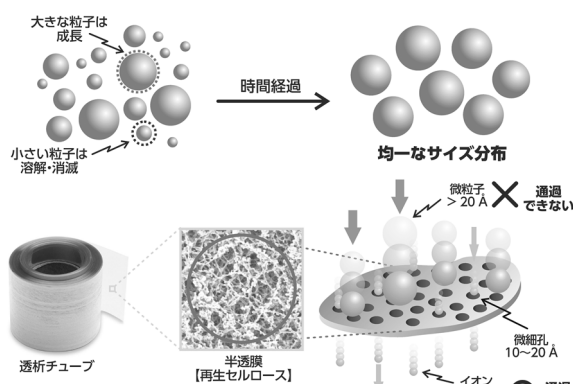


図2 オストワルド熟成(上)と粒子サイズ排除透析法(下)

今回合成したナノコロイド粒子のキャラクタリゼーションの結果、WO₃は、主として三酸化タングステン2水和物(WO₃·2H₂O: JCPDS 18-1420)から成る10-20 nmの球状粒子(平均粒径: ca. 18 nm)であり、MoO₃は、結晶斜方晶結晶(JCPDS 35-0609)を僅かに含む非晶質から成る4-10 nmの球状粒子(平均粒径: ca. 8 nm)であった。また、バンドギャップエネルギーは、WO₃が3.21 eVであり MoO₃が3.21 eVであり、この値は、結晶 WO₃·2H₂O と非晶質 MoO₃の文献値と一致した。

【計測】アミノ酸・タンパク質吸着表面増強フォトクロミズムの定量的理解

図3に紫外線照射に伴うフェニルアラニン(Phe)/WO₃ナノコロイド粒子水溶液の外観変化とその可視吸収スペクトル変化を示す。紫外線照射前の Phe/WO₃ナノコロイド粒子水溶液は無色透明であったが、紫外線照射に伴い青色に着色した。(図3(a))紫外線照射10分後における Phe/WO₃ナノコロイド粒子水溶液の最大吸収波長(775 nm)における吸光度(図3(b))は、Pheを含まない WO₃ナノコロイド粒子水溶液のそれ(図3(c))と比較して約8倍大きい。水溶液中のα-アミノ酸化合物の存在が WO₃のフォトクロミズムを増強しているのは明らかである。

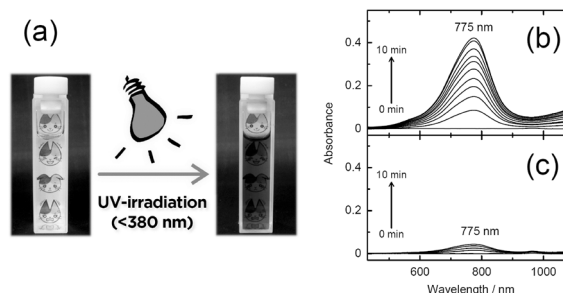


図3 紫外線照射に伴う WO₃ナノコロイド粒子水溶液の外観変化(左図)と可視吸収スペクトル変化(右図)

(a),(b): フェニルアラニンあり (c): フェニルアラニンなし

α-アミノ酸化合物存在下の MoO₃ナノコロイド粒子水溶液においても同様のフォトクロミズムの増強を示す。WO₃ナノコロイド粒子、または MoO₃ナノコロイド粒子のフォトクロミズムによる青色水溶液の色の濃さを調べることで水溶液中のα-アミノ酸化合物濃度を高感度に定量できると判明した。

タンパク質としてヒト血清アルブミン (HSA) の WO_3 、及び MoO_3 ナノコロイド粒子表面吸着挙動と表面増強フォトクロミズムとの関係の調査を試みたが、HSA をナノコロイド粒子水溶液に添加することで、沈殿が生じてしまうため定量的な評価の実施には至っていない。しかし、沈殿物のフォトクロミズムは確認しており、コロイド粒子のサイズ・形状の制御、各種金属酸化物との複合化、溶媒変更による誘電率最適化などを行うことで、表面増強フォトクロミズムを用いた HSA の比色センシングへの可能性は十分に残されている。

今後、光照射による金属オキソ酸の特異な着色特性を利用した定量分析法の更なる発展に寄与すべく、「表面増強フォトクロミズム」現象の定性・定量的理解を醸成していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shohei Tanaka, Mina Imamura, Kenta Adachi	4. 巻 102
2. 論文標題 Enhancing Catalytic Activity of Copper (II) Complexes by Curcuminoid as Electron-Withdrawing Ligand for Silane Water-Crosslinking Reaction: A Joint Experimental and Theoretical Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Sol-Gel Science and Technology	6. 最初と最後の頁 322-334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10971-022-05773-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shohei Tanaka, Kenta Adachi	4. 巻 -
2. 論文標題 Kinetic Insights into Metaphosphoric Acid-Catalyzed Water-Crosslinking Reactions in Silane-Grafted Polyolefin System	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10426507.2022.2046573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shohei Tanaka, Kenta Adachi	4. 巻 8
2. 論文標題 Origin of catalytic activity differences between phosphine and phosphine oxide-based structures in the water-crosslinkable polyalkoxysilane composition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Polyolefins Journal	6. 最初と最後の頁 49-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.22063/poj.2020.2813.1171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ryotaro Miyake, Zenya Nagata, Kenta Adachi, Yusuke Hayashi, Tetsuya Tohei, Akira Sakai	4. 巻 4
2. 論文標題 Versatile Functionality of Four-Terminal TiO ₂ -x Memristive Devices as Artificial Synapses for Neuromorphic Computing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Electronic Materials	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsaem.2c00161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 安達健太	4. 巻 68
2. 論文標題 微粒子に"光"を当てると"色々"見える (色彩の化学)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と教育	6. 最初と最後の頁 428-429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20665/kakyoshi.68.10_428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shohei Tanaka, Kenta Adachi	4. 巻 21
2. 論文標題 A novel efficient catalyst for water-crosslinking reaction of silane-grafted polyolefin system: Specific influence of axially coordinated n-alkylamine ligand on catalytic abilities of metal acetylacetonate complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials Today Communications	6. 最初と最後の頁 100584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mtcomm.2019.100584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 今村美那, 安達健太
2. 発表標題 クルクミノイドのメタクロマジー: 種々水系ミセル反応場における金属イオン配位と立体構造の視点から
3. 学会等名 第27回中国四国支部分析化学若手セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青野可世子, 安達健太
2. 発表標題 高周波超音波を利用した金ナノ粒子合成
3. 学会等名 第27回中国四国支部分析化学若手セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中祥平, 安達健太
2. 発表標題 “カレー”で”華麗”なポリアルコキシラン樹脂用触媒の設計・開発：天然物由来成分のクルクミノイド・金属キレート錯体
3. 学会等名 第27回中国四国支部分析化学若手セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村美那・安達健太
2. 発表標題 金属クルクミン誘導体：タンパク質との特異的相互作用とメタクロマジー
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青野可世子・安達健太
2. 発表標題 高周波超音波を利用した金ナノ粒子合成：無機塩・無機酸化物微粒子添加の効果
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中祥平・安達健太
2. 発表標題 ホスホリル化合物とホスフィン化合物：ポリアルコキシラン水-架橋反応触媒【C3003】
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有馬悠輔・安達健太
2. 発表標題 ポリオレフィン/直鎖アルキルアミン複合体: 表面における分子集合幾何学模様【G3005】
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今村美那・田中祥平・安達健太
2. 発表標題 荷電性ミセル溶液におけるクルクミノイド誘導体と遷移金属イオンとの特異的相互作用とメタクロマジー【AN11】
3. 学会等名 2020日本化学会中国四国支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有馬悠輔・安達健太
2. 発表標題 N-アルキルカルバミン酸エステル形成を起点とする幾何学凹凸構造の創成【AN13】
3. 学会等名 2020日本化学会中国四国支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金山将聡・安達健太
2. 発表標題 キサントン色素誘導体/クラスb金属イオン錯体の血清アルブミンとのメタクロマジー【AN16】
3. 学会等名 2020日本化学会中国四国支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有馬悠輔・安達健太
2. 発表標題 ポリオレフィン/直鎖アルキルアミン複合体:表面における分子集合幾何学模様
3. 学会等名 山口大学研究推進体「先端的計測・分析基盤技術の創出」×物質構造解析研究会 ジョイントセミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金山将聡・安達健太
2. 発表標題 配位能を有するキサンテン色素誘導体/クラスb金属イオン錯体のメタクロマジー：たんぱく質との相互作用
3. 学会等名 山口大学研究推進体「先端的計測・分析基盤技術の創出」×物質構造解析研究会 ジョイントセミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中祥平, 安達健太
2. 発表標題 架橋速度制御を指向したシラングラフトポリオレフィン水架橋反応触媒の開発:アミン軸位配位子によるアセチルアセトン金属(II)の触媒活性への影響
3. 学会等名 日本接着学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達健太, 津留のど佳
2. 発表標題 酸化チタン微粒子表面に吸着したメルプロミン色素分子の自己会合構造解析
3. 学会等名 分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中祥平, 安達健太
2. 発表標題 種々アルキルアミン軸配位子を有するアセチルアセトン金属(II)錯体のシラングラフトポリオレフィンの水架橋反応に対する速度論的触媒能評価
3. 学会等名 分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenta ADACHI, Nodoka TSURU
2. 発表標題 Morphological Analysis of Self-assembled Structures of Merbromin Molecules Adsorbed on Titanium(IV) Oxide Nanoparticles
3. 学会等名 17th Meeting, The Japanese Sol-Gel Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森隆太郎, 安達健太
2. 発表標題 酸化タングステン(VI)未修飾単層ナノシートの超音波合成と分析化学的活用: 層状水和物結晶を出発物質として
3. 学会等名 日本分析化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金山将聡・安達健太
2. 発表標題 血清アルブミン変性を見極める: 酸化モリブデンのフォトクロミズムの視点から
3. 学会等名 バイオオプティクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤綾香・山野水静・有馬悠輔・安達健太
2. 発表標題 ポリオレフィン/長鎖アルキルアミン組成物：表面における特異的分子集合幾何学構造
3. 学会等名 バイオオプティクス研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 安達健太・山崎鈴子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 321
3. 書名 ゾル-ゲル法の最新応用と展望《普及版》	

1. 著者名 安達健太	4. 発行年 2019年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 514
3. 書名 自動車内装材とインテリアの快適性向上	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 固体潤滑性構造体及びその製造方法	発明者 安達健太, 安藤綾香, 山野水静	権利者 国立大学法人山口大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-154790	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 分析方法、及び分析装置	発明者 安達健太・河野誠	権利者 国立大学法人山口大学・株式会社カワノラボ
産業財産権の種類、番号 特許、6842060	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

山口大学・理学部・化学コース・機能物質科学研究室
<http://www.materchem.sci.yamaguchi-u.ac.jp/>
山口大学研究推進体「先端的計測・分析基盤技術の創出」
<http://www.analtech.sci.yamaguchi-u.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		