

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19844

研究課題名（和文）水中のナノプラスチックならびに水溶性ポリマーを検出・同定するための技術基盤の創成

研究課題名（英文）Development of Technology Platform for Detection and Identification of Nanoplastics and Water-Soluble Polymers in Water

研究代表者

芹澤 武（Serizawa, Takeshi）

東京工業大学・物質理工学院・教授

研究者番号：30284904

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ナノプラスチックのモデルである高分子ナノ粒子や、水溶性ポリマーと相互作用し、特徴的で識別可能な蛍光シグナルを発するペプチドプローブを新たに設計・合成した。ペプチドプローブから得られた蛍光シグナル（訓練データ）を分類するための機械学習手法を見出した。また、その結果を指標として、仮想的な未知試料であるテスト用の高分子ナノ粒子や水溶性ポリマーを識別できた。このように、分子プローブ法と機械学習手法の融合により、水中のナノプラスチックや水溶性ポリマーを信頼性高く、短時間かつ少量で検出・同定するための技術基盤を創成することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

河川や海洋、排水等に含まれるポリマーの種類や量を調査あるいはモニタリングすることは、地球環境を保全し、安全・安心な社会を構築するうえで重要である。本研究では、環境汚染の原因となるポリマーのうち、従来法では検出・同定が煩雑で時間を要するナノプラスチックや水溶性ポリマーに着目し、それらを水に溶けたまま、信頼性高く、短時間かつ少量で検出・同定する簡便な手法を提案した点に意義がある。また、ポリマーと低分子化合物（分子プローブ）との相互作用に関する分子レベルでの知見を収集する基礎科学としての意義に加え、ポリマー検出・同定における機械学習の有用性を実証した点に意義がある。

研究成果の概要（英文）：New peptide probes that interact with polymeric nanoparticles, a model for nanoplastics, and with water-soluble polymers to emit characteristic and distinguishable fluorescent signals were designed and synthesized. A machine learning method was found to classify the fluorescent signals (training data) obtained from the peptide probes. Using the results as an indicator, it was able to identify the test polymeric nanoparticles and water-soluble polymers, which are virtual unknown samples. Thus, by combining molecular probing and machine learning methods, we succeeded in creating a technological basis for the reliable detection and identification of nanoplastics and water-soluble polymers in water in a short time and in small quantities.

研究分野：生体関連高分子材料

キーワード：ペプチド ナノプラスチック 水溶性ポリマー 検出・同定 機械学習

### 1. 研究開始当初の背景

現在、5 mm 以下の粒径をもつマイクロプラスチックによる海洋汚染が顕在化しており、環境や生態系への影響はもとより、食物や飲料水などを通じた人体への影響も懸念されている。また、持続可能な開発目標 (SDGs) 14 では、2025 年までにあらゆる種類の海洋汚染を防止し、汚染物質を大幅に削減することが掲げられている。この問題に対して対策を講じ、将来の解決に導くためには、河川や海洋、排水中に含まれるマイクロプラスチックの種類や量を調査あるいはモニタリングし、汚染や流出の状況を把握する必要がある。

マイクロプラスチックの検出や同定は、一般に、フィルター濾過やその後の精製操作で収集した粒子成分に対する顕微赤外あるいは顕微ラマン分光法により行われる。しかしながら、測定試料の準備が煩雑で時間を要するのに加え、フィルターを容易に通過する、100 nm 以下の粒径をもつナノプラスチックへの適用は困難である。ナノプラスチックを濃縮し、質量分析装置で同定する手法なども提案されているが、簡便性や汎用性に欠ける。ナノサイズのポリスチレン微粒子がマイクロサイズに比べて高い生物毒性を示すことも示唆されていることから、それらの検出・同定が今後、益々重要になる。

一方で、増粘剤や凝集剤などとして産業や日常生活で広く利用され、排水とともに環境流出する水溶性ポリマーもまた、環境や生体への影響が指摘されている。しかしながら、従来の検出・同定手法では、濃縮や固化などの煩雑で時間を要する試料準備が必要であることから、それらを回避した新たな手法の開発が望まれる。

### 2. 研究の目的

本研究では、分子プローブ法と機械学習手法の融合により、水中のナノプラスチックや水溶性ポリマーを信頼性高く、短時間かつ少量で検出・同定するための技術基盤を創成する。

### 3. 研究の方法

ヒトをはじめとする哺乳類の嗅覚系には 400 種類ほどの嗅覚受容体が存在する。様々な臭い分子で構成される臭いの対象物がこれらの受容体に作用すると、対象物中の所定割合の臭い分子が対応する受容体と相互作用した状態 (すなわち、臭いをもつ固有の情報パターン) が得られる。このパターンを電気シグナルに変換することで、脳が臭いを識別している。このような嗅覚機構に見られるパターン認識を人工的に模倣することで、これまでにタンパク質や核酸などの生体高分子の検出・同定系が構築されてきた。つまり、標的の生体高分子と異なる強さや駆動力で相互作用する分子プローブをあらかじめ準備し、これらの分子プローブから得られるシグナルを当該生体高分子に固有な情報パターンとして検出・同定に利用するものである。この際、異なる生体高分子間の情報を分類するために機械学習手法が利用される。

本研究では、上記の手法をナノプラスチックや水溶性ポリマーの検出・同定に展開した。しかしながら、ポリマーを標的とした研究例はまったく見当たらなかった。よって、ポリマーとの相互作用により、特徴的なシグナルが得られる分子プローブを新たに設計・合成し、その機能を検証することからはじめた。その後、得られたシグナル (訓練データ) を分類するための最適な機械学習について検討し、その結果を指標としてポリマーの検出・同定を試みた。

検出・同定方法の一例を図 1 に模式的に示す。まず、検出・同定の標的となる複数の標的ポリマーと複数の分子プローブを様々な組合せで水に溶解し、蛍光スペクトルを測定した (ステップ①)。この際、温度や pH などの溶液条件を変化させることで相互作用を変調・制御し、組合せに応じた蛍光スペクトルを得た。次に、得られた蛍光スペクトルから蛍光強度や強度比などを抽出し、それぞれのポリマーに対して特徴的な多次元のシグナル情報とした (ステップ②)。それらを訓練データ

として、教師あり・なしの機械学習を実施した。例えば、教師ありの機械学習手法の一つである線形判別分析により、得られた多次元の情報に次元削減し、各ポリマーのシグナル情報を 2 次元プロット上で分類 (クラスタリング) した (ステップ③)。

最後に、仮想的な未知試料であるテスト用ポリマーの蛍光スペク

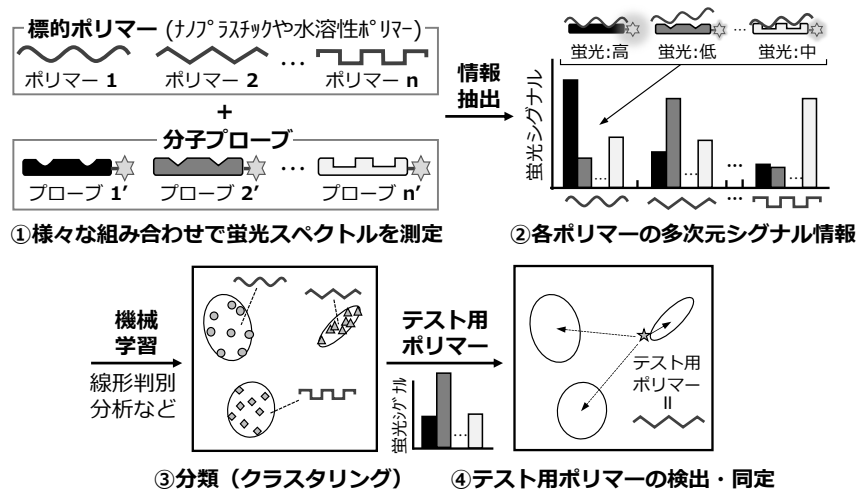


図 1 標的ポリマー (ナノプラスチックや水溶性ポリマー) の検出・同定の流れ

トルを測定し、得られたシグナルをステップ③で得た2次元プロットに当てはめて検出・同定した(ステップ④)。

#### 4. 研究成果

水溶性ポリマーと相互作用し、特徴的で識別可能な蛍光シグナルを発する分子プローブを新たに設計・合成した。その後、得られた蛍光シグナル(訓練データ)を分類するための最適な機械学習手法について検討した。また、その結果を指標として水溶性ポリマーの識別について検討した。本研究の分子プローブは、水中で非共有結合により水溶性ポリマーと相互作用する糊の部位と、その相互作用をシグナル情報へと高感度で変換するための蛍光部位とを有する設計とした。“糊”の部位として、短いペプチド鎖の可能性について検討した。ペプチドには、進化分子工学的手法によりこれまでに見出している、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)と強く相互作用するペプチド(アミノ酸配列: His-Gln-Ile-Ala-His-Lys-Ala-Glu-His-Arg-Leu-Arg)と、それぞれのヒスチジン残基をアラニン残基に置換した三つの変異体を用いた。また、蛍光部位には、ポリマーと相互作用した際に、分子内回転運動性の変化や周囲の誘電率の変化に応じて蛍光強度や極大蛍光波長が変化する環境応答性蛍光基であるアニリノナフチル基を用いた。得られた一連のペプチドプローブは、様々な水溶性ポリマーと異なる強さや様式で相互作用し、それぞれの水溶性ポリマーに応じて多様な蛍光スペクトルを示した。得られた蛍光スペクトルのピーク強度や特定の波長間における強度比などをそれぞれの水溶性ポリマーに対する特徴的な多次元の訓練データとし、教師あり・なしの機械学習を実施した。例えば、教師ありの多変量解析の一つである線形判別分析により、得られた多次元の蛍光強度データを次元削減したところ、各水溶性ポリマーのシグナルを二次元のスコアプロット上で分類(クラスタリング)することに成功した(図2)。仮想的な未知試料であるテスト用の水溶性ポリマーの蛍光スペクトルを測定し、得られたシグナルを上記のスコアプロットに当てはめることで様々な水溶性ポリマーを識別できることを見出した。

さらに、自然界に存在し、環境負荷が懸念されているナノプラスチックのモデルとして、粒径や組成が異なる複数種類の合成高分子ナノ粒子を用いた。ナノ粒子を構成する高分子として、化学構造の多様性からアクリレート系ならびにメタクリレート系高分子を主に選択した。高分子ナノ粒子を検出・同定するためのプローブ分子として、水溶性ポリマーの検出・同定で見出した、

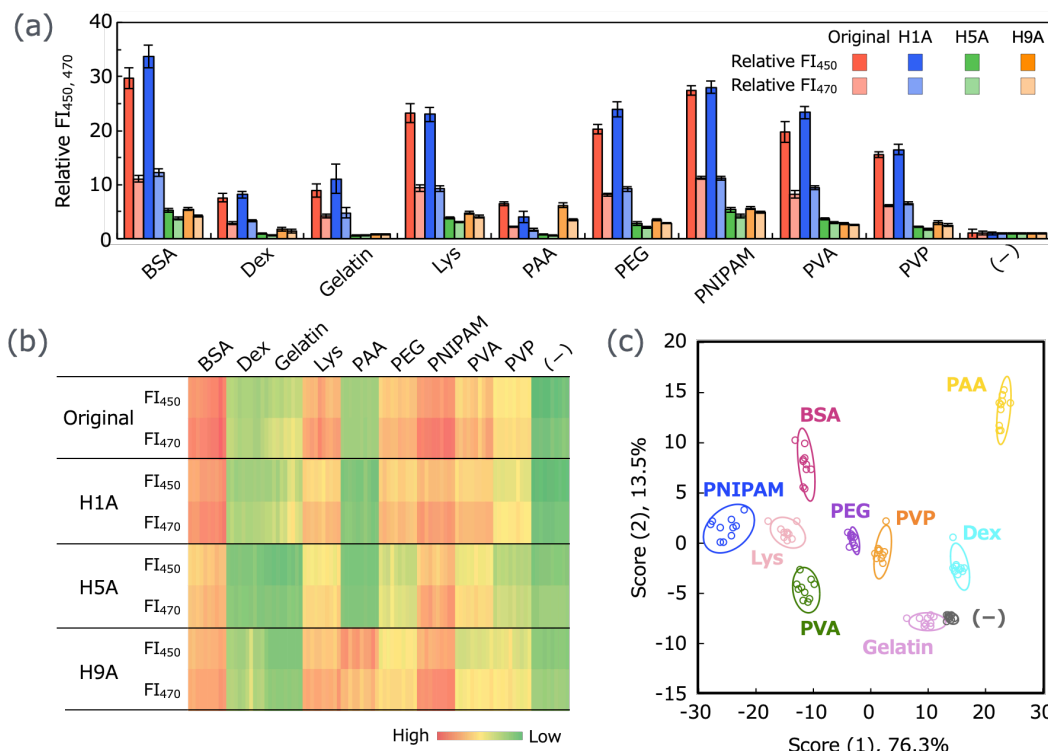


図2 四つのペプチドプローブを用いた水溶性ポリマーの検出・同定

(BSA: ウシ血清アルブミン; Dex: デキストラン; Lys: リゾチーム; PAA: ポリアクリル酸; PEG: ポリエチレングリコール; PNIPAM: ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド); PVA: ポリビニルアルコール; PVP: ポリ(N-ビニルピロリドン))

- (a) 各ペプチドプローブから得られた450 nmと470 nmにおける蛍光強度
- (b) 蛍光強度のヒートマップ
- (c) 線形判別分析により得られた二次元のスコアプロット

特徴的で識別可能な蛍光シグナルを発する環境応答性蛍光基導入ペプチドを同様に用いた。ペプチドプローブと高分子ナノ粒子それぞれの水溶液を混合し、所定時間、相互作用させた後に蛍光スペクトルを測定した結果、高分子ナノ粒子の種類に応じて多様な蛍光スペクトルを示すことが分かった。すなわち、水溶性ポリマーの検出・同定に有用であったペプチドプローブが高分子ナノ粒子からの情報獲得にも有用であることが示された。そこで、水溶性ポリマーの際と同様に、得られた蛍光スペクトルのピーク強度や所定の波長間における蛍光強度比などをそれぞれの高分子ナノ粒子に対する特徴的なシグナル情報（訓練データ）として、教師あり・なしの機械学習を実施した。その結果、水溶性ポリマーの場合と同様に、それぞれの高分子ナノ粒子のシグナルを 2 次元のスコアプロット上でクラスタリングすることに成功し、これを用いることにより、仮想的な未知試料であるテスト用の高分子ナノ粒子を識別できることを見出した。

以上より、分子プローブ法と機械学習手法の融合により、水中のナノプラスチックや水溶性ポリマーを信頼性高く、短時間かつ少量で検出・同定するための技術基盤を創成することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hasegawa Shion, Sawada Toshiki, Serizawa Takeshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Identification of Water-Soluble Polymers through Machine Learning of Fluorescence Signals from Multiple Peptide Sensors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 4598 ~ 4602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsabm.3c00736	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川史穂, 澤田敏樹, 北沢侑造, 金田拓也, 芹澤武
2. 発表標題 蛍光標識ペプチドを利用した高分子ナノ粒子の検出と多変量解析による識別
3. 学会等名 第72回高分子年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shion Hasegawa, Toshiki Sawada, Yuzo Kitazawa, Takuya Kaneda, Takeshi Serizawa
2. 発表標題 Discrimination of polymer nanoparticles based on multivariate analysis of fluorescence signals obtained using polymer-binding peptides
3. 学会等名 13th SPSJ International Polymer Conference (IPC2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長谷川史穂, 澤田敏樹, 芹澤武
2. 発表標題 ペプチドセンサーから得られるシグナルの機械学習による水溶性高分子の分類と同定
3. 学会等名 第33回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長谷川史穂, 澤田敏樹, 北沢侑造, 金田拓也, 芹澤武
2. 発表標題 ペプチドセンサーと機械学習を利用した高分子ナノ粒子の識別と分類
3. 学会等名 第72回高分子討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shion Hasegawa, Toshiki Sawada, Takeshi Serizawa
2. 発表標題 Classification and Identification of water-soluble polymers by machine learning using fluorescence signals from multiple peptide sensors
3. 学会等名 MRM2023/IUMRS-ICA2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 芹澤 武
2. 発表標題 生体の分子機構を利用してつくる機能材料
3. 学会等名 日本学術振興会R041委員会 第3回研究会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 芹澤 武
2. 発表標題 ペプチド界面化学と機械学習手法の融合による合成高分子の識別
3. 学会等名 日本化学会コロイド界面化学部会_技術シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 長谷川史穂, 鈴木星冴, 澤田敏樹, 芹澤 武
2. 発表標題 ペプチドを用いた水溶性高分子の蛍光検出と機械学習による識別
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ <a href="http://www.serizawa-cap.mac.titech.ac.jp/">http://www.serizawa-cap.mac.titech.ac.jp/</a> 東京工業大学リサーチリポジトリ <a href="http://t2r2.star.titech.ac.jp/">http://t2r2.star.titech.ac.jp/</a>
--

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
---------	---------