

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26620124

研究課題名(和文) 構造色を発する分子認識アクティブポリマーモノリスの創製

研究課題名(英文) Development of Molecular Recognition Active-Polymer Monolith with Structural Colour

研究代表者

梅村 知也 (Umemura, Tomonari)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：10312901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：鋳型コロイド微粒子を用いる従来技術とモノリスカラム技術を融合させ、ナノインプリント用モールドを鋳型に用いたモノリス薄膜作製法を確立し、フォトクロミック材料を簡便に作製することに成功した。また、作製したナノインプリンティング薄膜状モノリスに白色光を照射すると構造色を発することを確認するとともに、光透過・反射特性を詳細に調査して発色のメカニズムを考察した。その結果、今回観測した構造色は規則的なナノ構造によってもたらされる二次元光回折によるものと結論した。

研究成果の概要(英文)：By combining conventional colloidal template self-assembly technique with monolithic column technique, we established a simple and facile method for the preparation of a monolithic thin film with submicron structure and successfully produced photochromic materials, which exhibited structural color when irradiated with white light. The mechanism of the color emission was studied by examining the light transmission/reflection characteristics in detail. As a result, we concluded that the observed structural color was due to two-dimensional visible light diffraction generated by the periodic submicron structure.

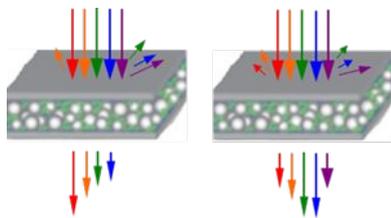
研究分野：分析化学

キーワード：モノリス 構造色 シスジオール 糖

1. 研究開始当初の背景

有機ポリマーは、分子インプリンティング法を用いて、標的分子を選択的に認識する空間を創り出すことができる。この技術を利用して、近年、人工レセプターの開発が進められている。なかでも、人工レセプターの基質結合部位近傍に蛍光分子を配置し、標的分子の結合によって蛍光スペクトルに変化を生じさせることで結合情報を可視化する(検出する)“情報発信型的人工レセプター”が注目を集めている(例えば、T. Takeuchi et. al., Biosens. Bioelectron., 2010, 26, 458-462)。

一方、申請者らはこれまで、高速かつ高性能な分離分析法の開発を目指して、構造の制御された有機ポリマー製のモノリスカラムの開発に取り組み、様々な骨格・空隙サイズのモノリス多孔体を作り分ける技術、ノウハウを蓄積してきた。その研究の中で、微粒子が三次元的に繋がったモノリス多孔体が、特定の溶媒中においてコロイド結晶のような構造色を発生し、さらに、その構造色には角度依存性がないことを見出した(Adv. Mater., 2011, 23, 884-888)。



このような背景の下、モノリス多孔体に分子認識能を付与し、さらにその分子を認識すると構造色を発生するように設計できれば、色素を使わずに可視化することが可能な、まさにラベルフリーで理想的な“情報発信型的人工レセプター”を構築できると着想した。通常であれば、光の当てる角度によって構造色は変化するが、アモルファス状のモノリス多孔体には角度依存性がほとんどなく、どの角度から見ても同じ色を発生する。このことは、目視観察を行う上で非常に大きなメリットとなる。

2. 研究の目的

本研究では、これまで培ってきたモノリスカラム技術(in situ 重合法)に分子インプリンティング法を融合させ、有機ポリマーの特長(空間・形状の記憶、可逆的な膨潤・収縮、フォトクロミック特性)をフルに活用した情報発信型人工レセプターの開発を試みる。具体的には、分子インプリンティング法によりモノリス多孔体に分子認識能を付与するとともに、その物質を認識すると構造色を発生するように設計して、分子認識能と情報発信機能を併せ持つ“情報発信型人工レセプター”を開発する。また、SEM画像や三次元CT画像等を収集して発色のメカニズムの考察も行う。

3. 研究の方法

本研究は、モノリス多孔体の構造制御技術の開発、分子認識能(選択性)の付与、および構造色の制御とメカニズムの解明で構成される。

(1) アモルファスなモノリス多孔体の骨格構造、サイズおよび空隙密度の制御

モノリス構造は、モノマー溶液の組成(架橋剤の割合や細孔形成剤の選択など)やプロセスパラメータ(温度や光の照射量)をわずかに変えるだけで多様に変化する。本研究ではこれらの最適化を図り、可視光の波長域で応答を示すサブミクロンレベルの周期的な構造を有する薄膜状および細管状のフォトクロミックポリマーの作製を試みた。なお、ポリマー骨格の太さはコロイド結晶のコロイドサイズに相当しており、このサイズを変えることによって、様々な色の構造色を引き出せる。また、空隙密度は膨潤度や構造変化、ひいては屈折率や色の変化を決定する重要な要因となる。

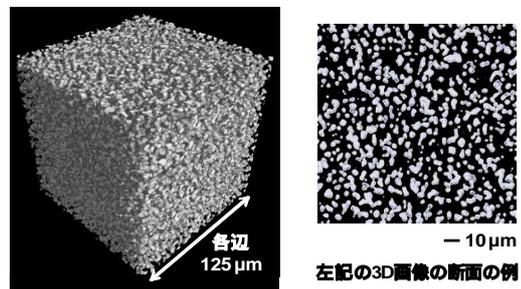
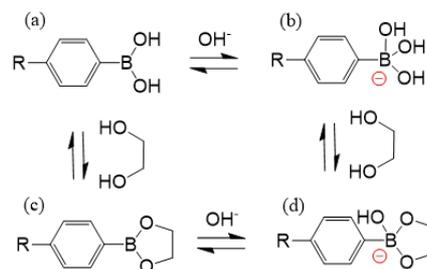


図1. モノリス多孔体のX線三次元CT画像

(2) フェニルボロン酸を利用する糖鎖捕捉(認識)ポリマーモノリスの開発

フェニルボロン酸はポリオール類と可逆的なエステル結合を形成するため、糖などを結合させることができる(M. Honda, K. Kataoka, T. Seki, Y. Takeoka, Langmuir, 25, 8349-8356 (2009))。



ジオールと環状のボロン酸エステルを形成(塩基性条件下で安定化)イオン性の増加による水分子の吸着により膨潤度が変化する可能性

図2. フェニルボロン酸によるジオール類の捕捉

図2に糖鎖の捕捉と可視化の原理を示す。フェニルボロン酸(a)は、弱塩基性条件下でイオン化した状態(b)となり、ここに糖を

加えていくと選択的に結合し、電荷を帯びた錯体 (d) が形成される。(d) は水和しやすく膨潤する。したがって、このフェニルボロン酸を構成単位に含む 4-ビニルフェニルボロン酸からなるポリマーモノリスを作製すれば、糖の濃度に応じてゲルは膨潤して大きくなり、濃度に依存した構造色を発すると期待される。そこで、糖鎖捕捉 (認識) ポリマーモノリスの作製に取り組んだ。

(3) 親水性化合物を対象とした分子インプリンティングポリマーの試作と評価

久保らは親水性化合物に対する分子インプリンティングポリマーの開発に取り組み、これまでに官能基間の距離を識別するポリマーの開発に成功している (*Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 84-88 (2004))。こうした分子認識ポリマーでは、カルボキシ基やアミノ基等のイオン性官能基が分子認識部位として配置されている。その認識部位に親水性化合物が取り込まれると、イオン性官能基に水和していた水が外れるのでポリマーの膨潤度に变化が生じると期待される。そこで、アミノ酸を分析対象 (鑄型分子) として選び、イオン性官能基を含む機能性モノマーとともに重合して分子インプリンティングポリマーを試作し、その認識能を評価した。

(4) 薄膜状モノリスの試作とその光透過・反射・屈折特性の評価

薄膜状モノリスをスライドガラス上に調製し、側面から白色光を照射しながら光透過・反射特性を詳細に調査し、構造色の発色のメカニズムを考察した。

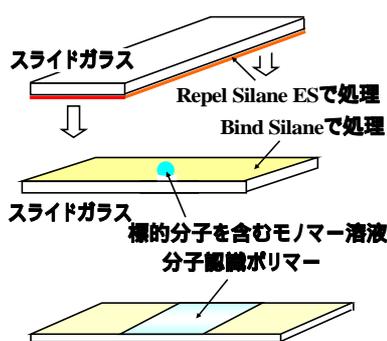


図 3. 薄膜状のポリマーモノリスの作製法

4. 研究成果

(1) 放射線重合を利用したモノリス多孔体の骨格構造及び空隙の制御

初年度において、まずはモノマー濃度や架橋剤割合、細孔形成剤の種類等を種々検討し、均一な構造体を得るために必要となる条件を見出し、ポリマー骨格や空隙サイズを制御する設計指針を得た。一方で、サブ-マイクロメートルオーダーの骨格を構築するためには新たなパラメータの必要性を実感した。そ

こで次年度は、ガンマ線を用いた放射線ラジカル重合によるモノリスの骨格と空隙の制御を検討した。試行錯誤の結果、ガンマ線の照射量や線量率、モノマー濃度、重合時間の最適化を図ることにより、骨格径や空隙サイズを可視光と同程度の数百ナノメートルにする条件を見出した (図 4)。

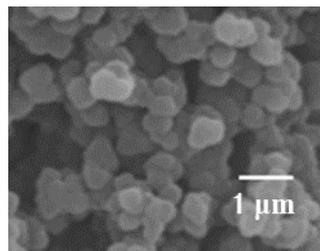


図 4. サブマイクロオーダーのモノリス骨格

(2) フェニルボロン酸型モノリスカラムの試作と評価

フェニルボロン酸は塩基性条件においてジオールと環状エステルを形成することが知られている。その性能を評価するために内径 1 mm × 長さ 10 cm の細管内でモノリス多孔体を合成し、フェニルボロン酸型モノリスカラムを作製した。まずは 3 種類のベンゼンジオール (1,2-, 1,3-, 1-4-ベンゼンジオール) を用いてその保持挙動を詳細に検討したところ、期待した通り、シス・ジオールを有する 1,2-ベンゼンジオールだけが塩基性条件下で選択的にモノリス多孔体に捕集されることを確認した (図 5)。

同様にして、グルコースやフルクトース等の単糖類、スクロースやマルトース等の二糖類、さらには多糖類や糖タンパク質に対する保持係数を系統的に調査してデータを収集した。

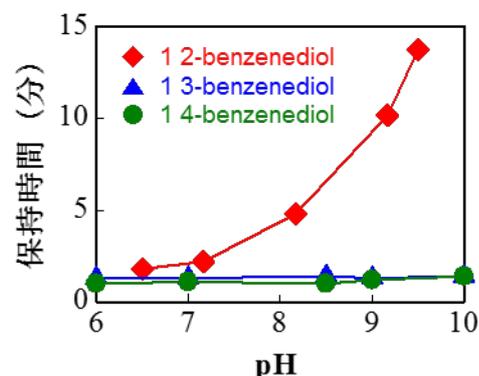


図 5. ベンゼンジオールに対する保持挙動

(3) フェニルボロン酸近傍にルイス塩基配位子を導入したモノリスカラムの試作と評価

前述の実験において、糖鎖の捕捉には pH12 以上の極めて高い塩基性条件が必要となることが分かった。そのような塩基性条件では

不安定な生体物質も多いため、中性領域に近いより温和な条件で捕集可能な抽出剤が望まれる。そこで、フェニルボロン酸型カラムの改良を図った。

まずは原理に関してであるが、フェニルボロン酸のホウ素原子の最外殻電子数は6個であり、空のp軌道を有するためルイス酸として働く。このルイス酸に水酸化物イオンが配位するとオクテッド則が満たされて安定な状態となるため、シス・ジオールと環状エステルを形成しやすくなると考えられている。この理由によるのであれば、必ずしも塩基性条件(OH⁻)は必要ではなく、ルイス塩基を配位させればよい。そこで、フェニルボロン酸近傍にルイス塩基配位子を導入したモノリス多孔体を試作し、シス・ジオール化合物に対する保持特性(エステル形成能)を詳細に調査した。期待した通り、フェニルボロン酸の近傍にエチルアミン基やブチルアミン基を導入すると、より温和なpH条件(2単位程度低い領域)で1,2-ベンゼンジオールや糖が保持されるようになることを確認した。この結果を通して、実用的な中性領域での糖鎖捕捉の可能性を示すことができた。

(4) アミノ酸を捕捉ターゲットとする分子インプリンティングポリマーモノリスの試作と評価

最終的な目標である分子認識フォトクロミックポリマーの作製に向けて、L-トリプトファンを鋳型分子として用いた分子インプリンティングポリマーモノリスを試作し、アミノ酸に対する分離選択性を調査した。その結果、アミノ酸の種類の違いだけでなく、トリプトファンのD体とL体に関してでもわずかではあるが保持に差異が認められ、光学分割の可能性を示すことにも成功した。

(5) ナノインプリント用モールドを使用した薄膜状モノリスの作製と構造色発色能の評価

鋳型コロイド微粒子を用いる従来法とモノリスカラム技術を融合させた折衷的なフォトクロミックポリマー作製法として、ナノインプリント用モールド(数百ナノメートルの凹凸を有するシート)を鋳型に用いてモノリスを作製した。具体的には、ナノインプリントが施されたシートとスライドガラスの間にフェニルボロン酸モノマーを垂らし、挟み込んだ間で重合させることにより、薄膜状

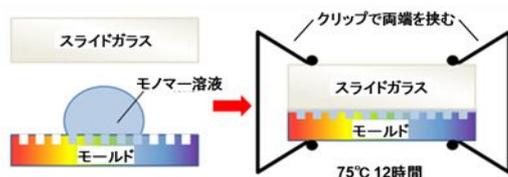


図 6. ナノインプリント用モールドを使用した薄膜状モノリス作製の概念図

のモノリス多孔体を作製した。このスライドガラス上のモノリスに様々な入射角で白色光を照射したところ、図7に示すように角度によって様々な色の構造色が観察された。

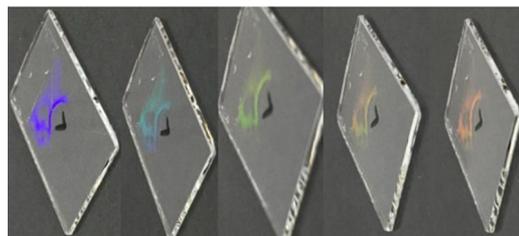


図 7. モノリスが発する構造色

また、原子間力顕微鏡(AFM)によりモノリスの表面構造を観察したところ、数百ナノメートルの凹凸がモノリスに転写されていることが確認できた。

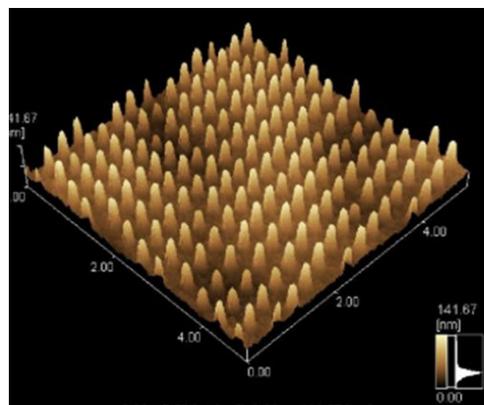


図 8. モノリス表面の三次元 AFM 画像

(6) ナノインプリンティング薄膜状モノリスの光透過・反射・屈折特性の評価

スライドガラス上に作製したビニルフェニルボロン酸ベースの薄膜状のモノリスに側面から白色光を照射したところ、薄膜上面に玉虫色の構造色が観察された。一方、薄膜の側面からは構造色を確認することはできず、観察される構造色が照射光の進行と観察方向に大きく依存していることが分かった。そこで、観察角度を変えつつ構造色の分光計測を試みた。薄膜の法線方向から構造色を観測したところ、極大波長 560 nm、半値幅およそ 50 nm のスペクトルが得られた。このスペクトルの極大波長は入射方向側から観測すると青色シフトし、出射方向側から観測すると赤色シフトすることが分かった。本研究で観測される構造色は、白色光が分光されつつ一定の方向に屈折されていることから、インプリント薄膜の規則的なナノ構造に起因する回折光であることが強く示唆された。

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 1 件)

Sakai, Y., Kotani, A., Umamura, T., Mori, Y., Kusu, F., Yamamoto, K., Hakamata, H., Electrochemical Determination of Synephrine by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Using a Zwitterionic Monolith Column, *Electroanalysis*, **28**, 1947-1951 (2016) 査読有り

〔学会発表〕(計 14 件)

森 宥貴子, 青木 元秀, 熊田 英峰, 内田 達也, 梅村 知也, 小谷 明, 楠 文代, マイクロ電気化学検出 HPLC によるカテコールアミン類の迅速・高感度分離計測, 第 74 回分析化学討論会, 2014/5/24-25, 日本大学工学部, 郡山(福島)

和田 堯之, 土方 めぐみ, 青木 元秀, 熊田 英峰, 内田 達也, 梅村 知也, ボロン酸型モノリスの作製と構造色発色のための基礎検討, 第 22 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2015/5/28-30, 近畿大学, 東大阪

松本 七虹, 青木 元秀, 熊田 秀峰, 内田 達也, 梅村 知也, ボロン酸型固相抽出モノリスカラムによる糖脂質の選択的捕集と LC-MS/MS による検出, 第 22 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2015/5/28-30, 近畿大学, 東大阪

代継 正和, 青木 元秀, 内田 達也, 梅村 知也, 熊田 英峰, エトキシカルボニル/エチルエステル誘導体化を用いた皮膚角質中の遊離アミノ酸の GC-MS 分析, 第 22 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2015/5/28-30, 近畿大学, 東大阪

梅村 知也(依頼講演), オミックス研究を支援するモノリス型マイクロデバイス・システムの構築, 第 4 回医薬工 3 大学包括連携推進シンポジウム 医学薬学工学連携で広がる新しい世界, 2015/6/20, 工学院大学アーバンテックホール

青木 元秀, 梅村 知也, 糖脂質のボロン酸型固相抽出モノリスカラムによる精製前処理と ESI-MS/MS による検出, 日本分析化学会第 64 年会, 2015/9/9-11, 九州大学, 伊都キャンパス

和田 堯之, 土方 めぐみ, 青木 元秀, 熊田 英峰, 内田 達也, 梅村 知也, 須藤 康夫, 構造色を発色するボロン酸型モノリスの作製と評価, 第 52 回フローインジェクション分析講演会, 2015/11/27, 桐生地域地場産業振興センター, 群馬

梅村 知也(依頼講演), モノリス型キャピラリーデバイスを利用した核酸の精密分離分析技術の開発, 第 76 回分析化学討論会 ~ 分析化学の未来を展望する ~ (ノンコーディング RNA の最先端分析手法にせ

まる), 2016/5/28-29, 岐阜大学, 岐阜
代継 正和, 中原 千聡, 高橋 耕平, 青木 元秀, 内田 達也, 梅村 知也, 熊田 英峰, エトキシカルボニル/エチルエステル誘導体化法を用いたアミノ酸 GC 分析の定量性の評価と応用, 新アミノ酸分析研究会第 6 回学術講演会, 2016/11/4, 東京大学武田先端知ビル, 東京

別所 夏歩, 青木 元秀, 松本 七虹, 熊田 秀峰, 内田 達也, 梅村 知也, 糖鎖を選択的に捕捉する有機ポリマー製フェニルボロン酸型モノリスの試作と評価, 第 27 回クロマトグラフィー科学会議, 2016/11/16-18, 慶応大学薬学部, 東京

Yotsugi, M., Nakahara, C., Aoki, M., Kumata, H., Uchida, T., Umamura, T., Development of Solid-Phase Derivatization of Amino Acid for Diastereomeric Separation on an Achiral Capillary GC Column, RSC Tokyo International Conference 2016, 2016/9/8-9, Makuhari Messe, Chiba

松本 七虹, 青木 元秀, 熊田 英峰, 内田 達也, 梅村 知也, ボロン酸型有機ポリマーモノリスによる糖複合体の固相抽出・濃縮デバイスの開発, 日本分析化学会第 65 年会, 2016/9/14-16, 北海道大学工学部, 札幌

中村 知世, 山口 斐香, 阿保 渚, 青木 元秀, 熊田 英峰, 梅村 知也, 内田 達也, 水晶振動子マイクロバランス法を用いたオンチップ生体組織シグナル計測, 日本分析化学会第 65 年会, 2016/9/14-16, 北海道大学工学部, 札幌

Aoki, M., Matsumoto, N., Bessho, K., Kumata, H., Uchida, T., Umamura, T., Preparation and Characterization of Organic Polymer-Based Adsorbent with Phenylboronic Acid Functionality for Capturing Biological cis-Diol-Containing Compounds, the 13th Asian Conference on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XIII), 2016/12/8-11, The Empress International Convention Center, Chiang Mai, Thailand.

〔図書〕(計 1 件)

梅村 知也, 機器分析(エキスパート応用化学テキストシリーズ), 講談社(分担執筆 13 章 液体クロマトグラフィー, pp. 171-184) 2015

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ls.toyaku.ac.jp/~bioanalchem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅村 知也(UMEMURA, Tomonari)
東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：10312901

(2)研究分担者

内田 達也(UCHIDA, Tatsuya)

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：30261548