

令和元年6月18日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K05534

研究課題名（和文）構造色変化に基づく生体分子のウェアラブルセンサーの開発

研究課題名（英文）Development of structural colored hydrogel to monitor biomolecules in living organisms.

研究代表者

菅野 憲 (KANNO, Akira)

富山大学・大学院理工学研究部（工学）・助教

研究者番号：60466795

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：生体内のエストロゲン濃度を検出するための構造発色性高分子ゲルの開発を行った。この高分子ゲルは、エストロゲン存在下で2量化することが知られているERを含むため、エストロゲン存在下でゲルが収縮し、結果、構造色変化を指標としてエストロゲンの定量が可能である。作製した機能的な高分子ゲルをエストロゲンの1つであるE2で刺激したところ、反射光強度の極大波長の短波長側シフトが観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、実施例としてエストロゲンの定量を行ったが、エストロゲン受容体をその他の生体分子受容体に変更することで、標的分子を生体分子一般に拡張可能である。また、本研究で開発するセンサーの生体適合化が実現できれば、ホルモンバランスが崩れたことに起因する子宮内膜からの不正出血や不妊の治療現場や日常的な家庭での検査の上で強力なツールになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed a structural colored hydrogel to monitor estrogens in living organisms. The hydrogel contains estrogen receptors whose dimerization is known to be triggered by estrogens. Upon stimulation with estrogen, the hydrogel is shrunk, resulting in the changes in its structural color.

研究分野：分析化学

キーワード：バイオセンサー ウェアラブルセンサー 構造発色性ゲル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年では、細胞間を浸す間質液中のグルコース濃度を光シグナルに変換して検出する、皮下埋め込み(インプラント)型の低侵襲オプティカル血糖値センサーの開発が報告されている。グルコースオキシダーゼと蛍光色素を含浸させたセンシングビーズや蛍光性ポロリン酸レセプターを固定化したポリアクリルアミドゲルなどである。しかし、相対的蛍光強度変化をエンドポイントとするこれらのセンサーでは、皮膚組織による光シグナルの光学的干渉の影響が大きい。したがって、皮下の蛍光色素を励起する光の強度を一定にする複雑な測定系の確立が求められる。さらに、励起光による体細胞への光毒性や蛍光色素の退色などの影響を考慮すると、限られた測定時間・回数でグルコースをモニターする必要があるため、検出の時間分解能が制限される。また、「構造色」の変化を利用したグルコースセンサーの開発も報告されている。規則正しく整列した細孔を有する逆オパール構造(IOS)のポリマーに白色光を照射すると、高分子の屈折率・格子定数・観測する角度に応じて、ブラッグの法則およびスネルの法則により説明される単色の反射光(構造色)を呈する。ここでポリマーとしてフェニルポロリン酸を固定化した*N*-イソプロピルアクリルアミド(NIPAM)のポリマーゲルを用いている。この高分子ゲルはグルコース濃度に応じて可逆的に膨潤/収縮するためゲルの格子定数が変化し、結果、構造色が変わる。また、フェニルポロリン酸固定化ポリNIPAMゲルを内包しているIOSポリスチレン(IOS-PS)のグルコースセンサーも報告されている。収縮状態のゲルは、おのこのIOS-PSの細孔内でランダムな位置に配置しているために周期構造が乱れ、照射光は非干渉性散乱する。グルコースを認識するとゲルが膨潤し細孔を充填することで周期構造が回復し、強い反射光が観察されるようになる。

### 2. 研究の目的

コロイド結晶を鋳型とした構造発色性高分子ゲルの構造色変化に基づくウェアラブルなステロイドホルモンセンサーを開発する。具体的には、アクリルアミド系モノマーにステロイドホルモンとその受容体タンパク質を化学的に結合させる。これらの化学修飾モノマーを重合させ、受容体タンパク質が架橋点となる機能的な高分子ゲルを作製する。この高分子ゲルが試料中のステロイドホルモンを認識すると、競争的にゲル中の受容体と架橋点を形成し、ゲルは膨潤する。この高分子ゲルの膨張による構造色変化を指標としたステロイドホルモンセンサーを開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 構造発色性高分子ゲルの調製と評価

取扱いが簡便かつ安価な汎用型検査薬への応用を目指し、規則的構造を有する構造発色性高分子ゲルの調製を行った。図1に示すように、(1)粒径のそろった直径230 nmのポリスチレンビーズ(PS)を用い、最密充填型コロイド結晶を調製する、(2)結晶間隙に高分子のモノマー溶液を浸透させて重合させる、の2段階で構造発色性ゲルを調製した。直径230 nmのPSビーズを鋳型に用いることで、生体組織を透過しやすい近赤外領域の範囲内で構造色に変化するIOSが得られる。光ファイバー分光器を用い、調製した構造発色性ゲルの反射スペクトルを取得した。

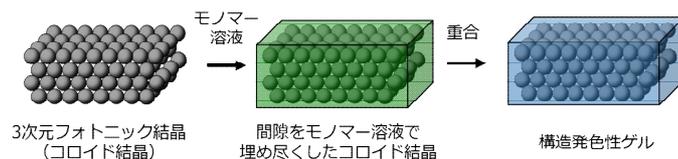


図1 構造発色性ゲルの調製法の模式図

#### (2) エストロゲン存在下で2量化するエストロゲン受容体を架橋点とした高分子ゲルの合成と評価

高分子ゲルの膨張/収縮は、(A)高分子を構成するポリマー鎖と溶媒との親和性、(B)ポリマー鎖の荷電状態、(C)ポリマー鎖同士の架橋点数、に支配されることが知られている。(C)における架橋点として、 $17\beta$ -エストラジオール(E2)存在下で2量化することが知られているエストロゲン受容体(ER)を利用した。すなわち、ERを遺伝子工学的手法に基づき合成した後、*N*-(アクロイルオキシ)スクシンイミド(NSA)と反応させた。この化学修飾ERとメタクリル酸2-ヒドロキシエチルの混合溶液を用い、前段で述べた構造発色性ゲルを調製した。光ファイバー分光器を用い、構造発色性ゲルのE2刺激後の反射スペクトル変化を観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) 構造発色性高分子ゲルの調製と評価

PSビーズのコロイド結晶を鋳型とした構造発色性高分子ゲルを調製した。10°ずつ入射光角を変えて乾燥させた高分子ゲルの透過スペクトルを取得したところ、入射光角度に応じて異なる

る極大透過光強度を有する反射スペクトルが観察された(図2A)。極大透過光強度から構造発色性ゲルの格子間隔を算出したところ約244 nmであり、鋳型に用いたPSビーズの平均粒径230 nmとほぼ一致した。一方、高分子ゲルを純水に浸して膨潤させた後に角度分解透過スペクトルを取得して格子間隔を算出したところ約267 nmであった(図2B)。以上のことから、調製した高分子ゲルは、膨潤度に応じて異なる構造色を呈することが分かった。

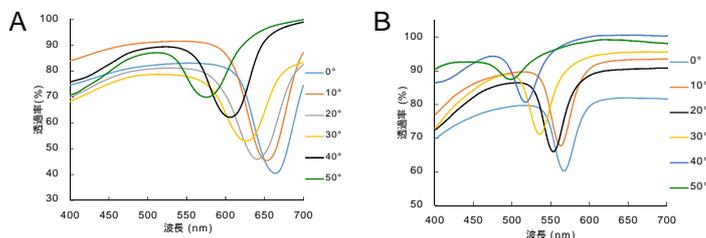


図2 構造発色性ゲルの(A) 湿潤時および(B) 乾燥時の角度分解スペクトル

### (2) エストロゲン存在下で2量化するエストロゲン受容体を架橋点とした高分子ゲルの合成と評価

NSAで修飾したERおよびHEMAの溶液を用い、構造発色性高分子ゲルを調製した。調製したゲルはERを含んでおり、エストロゲン存在下でER2量体形成に基づきゲルは収縮する。このとき、構造発色性ゲルの格子間隔が狭まるため、構造色が短波長側にシフトすることが期待できる(図3)。調製したゲルを、 $1.0 \times 10^{-6}$  ME2を含むPBS(-)で刺激したところ、反射光強度の極大波長の短波長側シフトが観察された(図4)。

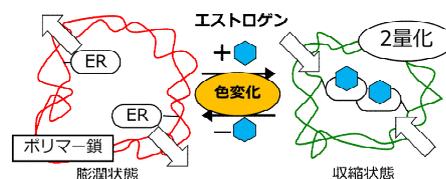


図3 エストロゲン検出の模式図

### (3) まとめ

生体内のエストロゲン濃度を検出するための構造発色性高分子ゲルの開発を行った。この高分子ゲルは、エストロゲン存在下で2量化することが知られているERを含むため、エストロゲン存在下でゲルが収縮し、結果、構造色変化を指標としてエストロゲンの定量が可能である。作製した機能的な高分子ゲルをエストロゲンの1つであるE2で刺激したところ、反射光強度の極大波長の短波長側シフトが観察された。本研究では、実施例としてエストロゲンの定量を行ったが、エストロゲン受容体をその他の生体分子受容体に変更することで、標的分子を生体分子一般に拡張可能である。また、本研究で開発するセンサーの生体適合化が実現できれば、ホルモンバランスが崩れたことに起因する子宮内膜からの不正出血や不妊の治療現場や日常的な家庭での検査の上で強力なツールになることが期待される。

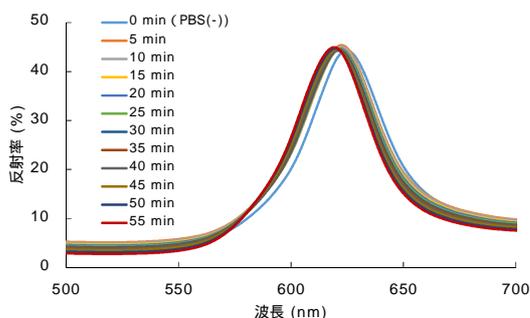


図4 エストロゲン刺激後の構造発色性ゲルの反射スペクトル変化

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

遠田浩司, 細川直樹, Thi Hong Nyung Dao, 菅野憲, 「液膜型イオン選択性電極の検出下限向上のための膜表面洗浄フローシステムの開発」, *分析化学*, **67**, 239-247 (2018). (査読有り)

DOI: <https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.67.239>

S. Haga, A. Kanno, T. Ozawa, N. Morita, M. Asano, M. Ozaki, “Detection of necroptosis in ligand-mediated and hypoxia-induced injury of hepatocytes using a novel optic probe detecting receptor-interacting protein (RIP)1/RIP3 binding”, *Oncol. Res.*, **26**, 503-513 (2018). (査読有り)

DOI: <https://doi.org/10.3727/096504017X15005102445191>

O. Takenouchi, A. Kanno, H. Takakura, M. Hattori, T. Ozawa, “Bioluminescent Indicator for Highly Sensitive Analysis of Estrogenic Activity in a Cell-based Format”, *Bioconjugate Chem.*, **27**, 2689-2694 (2016). (査読有り)

DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00466>

Y. Katsura, H. Kubota, K. Kunida, A. Kanno, S. Kuroda, T. Ozawa, "An optogenetic system for interrogating the temporal dynamics of Akt", *Sci. Rep.*, **5**, Article number: 14589 (2015)( 査読有り )

DOI: doi: 10.1038/srep14589 (2015)

〔学会発表〕(計 12 件)

鷹羽佑太, 菅野憲, 遠田浩司, 「酵素と近赤外吸収色素に基づくグルコースセンシングビーズの開発」, 日本分析化学会第 67 年会, 宮城県仙台市, 2018 年 9 月.

小竹俊哉, 津田翔平, 菅野憲, 遠田浩司, 「光リセット能を有するオプティカルグルコースセンサーの開発」, 日本分析化学会第 67 年会, 宮城県仙台市, 2018 年 9 月.

芳賀早苗, 菅野憲, 小澤岳昌, 森田直樹, 浅野真未, 伊敏, 尾崎倫孝, 「肝細胞におけるレドックス依存性ネクロプトーシスの動態解析」, ConBio2017, 兵庫県神戸市, 2017 年 12 月.

松本浩平, 菅野憲, 遠田浩司, 「構造色変化に基づく生体分子を可視化検出するセンサーの開発」, 日本分析化学会第 66 年会, 東京都葛飾区, 2017 年 9 月.

北山和志, 日下部智陽, 菅野憲, 遠田浩司, 「レセプター/色素錯体を高分子架橋点とするオプティカルグルコースセンシングフィルムの開発」日本分析化学会第 66 年会, 東京都葛飾区, 2017 年 9 月.

DAO THI HONG NHUNG, 細川直樹, 菅野憲, 遠田浩司, 「イオン選択性液膜表面からのキレート試薬によるイオンの引き抜きに伴う過渡的電位応答」, 日本分析化学会第 65 年会, 北海道札幌市, 2016 年 9 月.

日下部智陽, 山川翔平, 菅野憲, 遠田浩司, 「高分子ゲルの膨潤をシグナル増幅の原理とするオプティカルグルコースセンシングフィルムの開発」, 日本分析化学会第 65 年会, 北海道札幌市, 2016 年 9 月.

山岸星諭, 河崎屋光司, 菅野憲, 遠田浩司, 「酵素と近赤外吸収 BODIPY 色素を用いた薄膜型グルコースセンサーの開発」, 日本分析化学会第 65 年会, 北海道札幌市, 2016 年 9 月.

山川翔平, 吉川慧, 菅野憲, 遠田浩司, 「重合性官能基を有するビスベンゾポロキソール型レセプターに基づくグルコースセンシングフィルムの構築」, 日本分析化学会第 64 年会, 福岡県福岡市, 2015 年 9 月.

久保木博子, 菅野憲, 遠田浩司, 「インドール型 BODIPY 色素の合成とオプティカルセンサーへの応用」, 日本分析化学会第 64 年会, 福岡県福岡市, 2015 年 9 月.

川上創平, 詠智寛, 菅野憲, 遠田浩司, 「オプティカルセンサー用 BODIPY 色素の開発: 分子構造と吸収スペクトル及び pKa の相関」, 日本分析化学会第 64 年会, 福岡県福岡市, 2015 年 9 月.

河崎屋光司, 菅野憲, 遠田浩司, 「表面修飾ガラス基板を用いたオプティカルグルコースセンサーの構築」, 日本分析化学会第 64 年会, 福岡県福岡市, 2015 年 9 月.

〔図書〕(計 1 件)

木下修一・太田信廣・永井健治・南不二雄 編, 「発光の事典 —基礎からイメージングまで—」, 朝倉書店, (2015).

a) 菅野憲, 小澤岳昌, 6. 生物の発光, 6.1. 生物発光現象, 6.1.1. 化学発光概説, pp 482–488.

b) 菅野憲, 小澤岳昌, 6. 生物の発光, 6.1. 生物発光現象, 6.1.2. 液相化学発光反応, pp 488–493.

c) 菅野憲, 小澤岳昌, 7. 蛍光イメージング, 7.1. 蛍光イメージングの基礎, 7.1.6. 化学発光, pp 561–570.

d) 菅野憲, 小澤岳昌, 7. 蛍光イメージング, 7.2. 蛍光イメージングの実際, 7.2.2. イメージングの対象, 7.2.2.2. 機能イメージング, 7.2.2.2.2. 再構成法, pp 616–623.

〔その他〕

ホームページ等

<http://enghp.eng.u-toyama.ac.jp/labs/ac06/>

6. 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名: 遠田 浩司・富山大学大学院理工学研究部(工学)・教授

ローマ字氏名:( TOHDA, koji )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。