

令和元年6月17日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05817

研究課題名(和文) 表面増強フォトクロミズムを利用した生体試料微量アルブミン高感度センシングへの試み

研究課題名(英文) Colorimetric Sensing of Trace Amounts of Albumin/Amino Acids using 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：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、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/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、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)：Due to the biological importance of -amino acids and their derivatives, the development of novel colorimetric probes for these molecules has been an active research area in recent years. In this study, the surface-enhanced photochromic phenomena by various -amino acids adsorbed on molybdenum(VI) oxide (MoO₃) nanoparticles in the aqueous system have been investigated by means of UV-vis absorption spectrometry. No derivatization of -amino acids is required, and eventually high-accuracy determination is obtained from the UV-induced MoO₃ photochromic coloration. During UV irradiation, the detection process could be visually observed by naked eyes. A simple and unique approach to explore sensitive "label-free" colorimetric sensing toward -amino acids is proposed. Additionally, human serum albumin was added to tungsten(VI) oxide (WO₃) and/or MoO₃ nanoparticle aqueous solution to probe the photochromic properties.

研究分野：分析化学

キーワード：タンパク質 アミノ酸 ナノ粒子 フォトクロミズム 吸着 比色分析 ポリオキシメタレート

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

金属オキソ酸（ポリオキソメタレート）は、前周期遷移金属の4-7族元素を含み、化学式 M_mO_n ($M = W, Mo, V, Ti, Al, Nb, Ta$ など) で表される金属酸化物集合体である。通常、金属オキソ酸は、金属原子中心に酸素原子が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、これが稜または頂点を介して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。なかでも水溶液中のりん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。その測定原理は以下の通りである。酸性条件下、主として $H_2PO_4^-$ の状態で存在するりん酸イオンは、12個のモリブデン酸イオン (MoO_4^{2-}) と黄色のりんモリブデン酸イオン ($[PMo_{12}O_{40}]^{3-}$) を生成する。りんモリブデン酸イオンを含む水溶液に還元剤を加えると、12個の Mo^{6+} の一部が Mo^{5+} に還元された青色のモリブデンブルー ($[PMo_{12}O_{40}]^n; n \geq 4$) に変化する。青色水溶液の色の濃さを調べることでりん酸イオンの濃度を定量できる。このモリブデンブルー法では、金属オキソ酸の還元還元剤の添加を必要とするが、金属オキソ酸への光照射により発生する励起電子を金属オキソ酸自身の還元還元剤に直接に活用できれば、分析手順の簡略化が図れ、金属オキソ酸を用いた比色分析の多様性が増す。

生体試料中のタンパク質を測定することは、病理学的診断において重要である。例えば、肝臓機能が低下した場合には、血清アルブミンの量が減少する。アルブミンは、血流中では膠質浸透圧維持のほか、各種内因性・外因性物質（脂肪酸・ヘミン・ホルモン・薬物など）を包接できるため運搬・貯蔵などの役割を担っている生命の維持に不可欠なタンパク質のひとつである。近年では、生活習慣病である糖尿病・肥満・高血圧、あるいは動脈硬化に起因する心筋梗塞や脳梗塞等の危険性のある患者において、尿中のアルブミンの量が増加することが指摘されている。一方、その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、または酸化モリブデン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

無機半導体材料のひとつである酸化タングステン (WO_3) や酸化モリブデン (MoO_3) は、自身のバンドギャップ以上の光エネルギーの照射 (< 400 nm) により、励起電子とホールを生成する。その後の特定カチオン種と励起電子の共挿入により、可逆的な色調変化、いわゆる、フォトクロミズム特性を示す。 WO_3 、及び 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、近年申請者らは、 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 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した。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 (WO_3) や酸化モリブデン (MoO_3) 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 MoO_3 コロイド粒子の合成・評価技術の確立

MoO_3 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 MoO_3 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

WO_3 、及び MoO_3 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、 MoO_3 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 MoO_3 コロイド粒子の合成・評価技術の確立

表面増強フォトリソリズムによる高感度センシングに適した MoO_3 コロイド粒子の合成・評価技術の確立を指向し、比較的安価なモリブデン酸ナトリウムを出発材料とした MoO_3 ナノコロイド粒子の合成手法を確立した。合成した MoO_3 ナノコロイド粒子のキャラクタリゼーションの結果、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、3.21 eV であり、この値は非晶質 MoO_3 の文献値と一致した。(図 1) しかし、BET 表面積が、0.279 m^2/g と小さいため、今後 MoO_3 ナノコロイド粒子の表面積向上に関する新たな検討が必要であると考えている。

【計測】表面増強フォトリソリズムの定量的理解

高速液体クロマトグラフィー法を用いて、移動相溶媒の極性、溶媒の MoO_3 への配位能の変化に伴うアミノ酸吸着・会合挙動の変化、及びフォトリソリズム挙動への影響を定量的に観察した。

上記の合成した MoO_3 ナノコロイド粒子を用いて、ナノコロイド粒子表面へのアミノ酸吸着挙動と表面増強フォトリソリズムとの関係を調査した。まず、親水性と疎水性のバランスを考慮し天然アミノ酸化合物群の中から酸性、中性、塩基性 α -アミノ酸として、それぞれ L-アスパラギン酸 (Asp), L-ロイシン (Leu), L-リシン (Lys) を選択した。Asp, Leu, Lys は静電的相互作用を駆動力として MoO_3 ナノコロイド粒子表面に単分子吸着することが判明した。興味深いことに、 MoO_3 ナノコロイド粒子水溶液のフォトリソリズム強度と粒子表面に吸着した α -アミノ酸量との間に、直線関係が確認された。(図 3)。この結果は、高感度なアミノ酸化合物比色センシングを達成するうえで極めて重要な知見であった。

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リソリ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、沈殿物のフォトリソリ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、表面増強フォトリソリズムを用いた HSA の比色センシングへの可能性は十分に残されている。

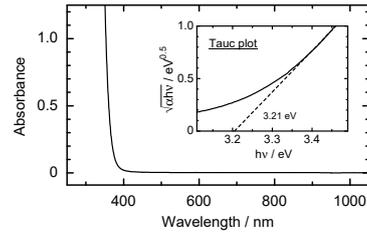


図 1 UV-Vis absorption spectrum of as-prepared MoO_3 colloid aqueous solution. The inset shows the corresponding Tauc plot around the absorption edge for estimating the optical band gap energy.

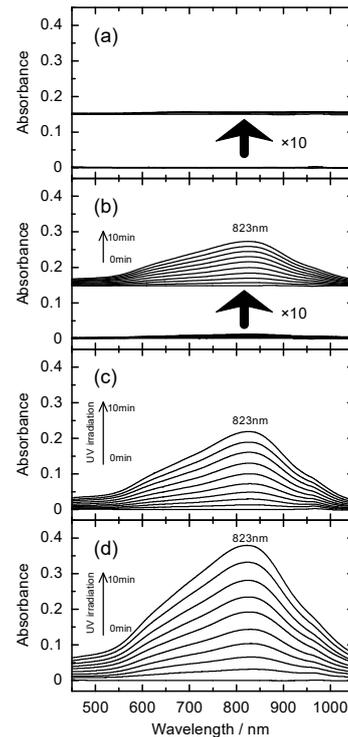


図 2 Typical absorption spectral changes of (a) as-prepared MoO_3 , (b) Asp/ MoO_3 , (c) Leu/ MoO_3 , and (d) Lys/ MoO_3 binary aqueous solution under UV light irradiation. Insets in (a) and (b) are enlarged spectra ($\times 10$). Concentration conditions: $[\text{MoO}_3] = 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{AA}] = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 3.3 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$, pH 2.1.

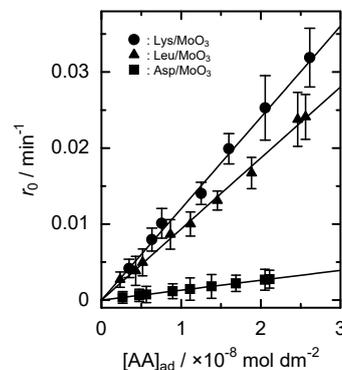


図 3 Dependence of the coloration rate (r^0) on the concentration of α -amino acid adsorbed on the MoO_3 colloid surface ($[\text{AA}]_{\text{ad}}$). The straight line indicates the best fitting curves obtained by the least-squares method. The magnitude of the error bars was calculated from the uncertainty given by five independent measurements with the other batch aqueous solutions.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

(1) Morphological Analysis of Self-assembled Structures of Merbromin Molecules Adsorbed on Titanium(IV) Oxide Nanoparticles

K. Adachi, N. Tsuru

Bunseki Kagaku, 2018, 67, 719-726. 査読有り

DOI : 10.2116/bunsekikagaku.67.719

(2) Stimuli-Triggered Reversible Switching Mechanism between H- and J-Type Supramolecular Assemblies of Cationic Porphyrins Adsorbed on Tungsten(VI) Oxide Surface

K. Adachi, Y. Ura, N. Kanetada

J. Porphyrins Phthalocyanines, 2018, 22, 658-669. 査読有り

DOI : 10.1142/S1088424618500372

(3) Label-free Colorimetric Sensing of α -Amino Acids Based on Surface-enhanced Photochromic Phenomena of Molybdenum(VI) Oxide Nanoparticles

A. Yamamoto, K. Adachi

Bunseki Kagaku., 2017, 9, 639-646. 査読有り

DOI : 10.2116/bunsekikagaku.66.639

(4) Crosslinked Polyolefins for Automotive and Housing Sector : Nontoxic and Efficient Catalysts for Water-Crosslinking Reaction in the Alkoxysilane-Grafted Polyolefin System

K. Adachi

Material Stage, 2017, 17 (4), 49-52. 査読無し

(5) Kinetics of Coloration in Photochromic Tungsten(VI) Oxide/Silicon Oxycarbide/Silica Hybrid Xerogel: Insight into Cation Self-diffusion Mechanisms

K. Adachi, M. Tokushige, K. Omata, S. Yamazaki, Y. Iwadate

ACS Appl. Mater. Interfaces, 2016, 8, 14019-14028. 査読有り

DOI : 10.1021/acsami.6b04115

(6) Factors Affecting Oxygen Evolution through Water Oxidation on Polycrystalline Titanium Dioxide

Y. Nishimoto, Y. Hasegawa, K. Adachi, S. Yamazaki

RSC Adv., 2016, 6, 46994-47000. 査読有り

DOI : 10.1039/c6ra06151f

〔学会発表〕 (計 19 件)

(1) 安達健太 (他 1 名、2 番目)

シラングラフトポリオレフィン水-架橋反応:アセチルアセトン銅(II)錯体のアミン軸配位子が触媒活性に及ぼす影響、第 19 回 MRS-J 山口大学支部研究発表会、2019 年 1 月 26 日、山口大学 (山口県、宇部市)

(2) 安達健太 (他 1 名、2 番目)

Morphological Analysis of Porphyrin Derivatives Self-Assembled on Tungsten(VI) Oxide Nanoparticles、The 28th annual meeting of MRS-J、2018 年 12 月 9 日、北九州国際会議場 (福岡県、北九州市)

(3) 安達健太

身の回りの表面・界面を科学する、山口県高教教研理化部会研究大会、2018 年 11 月 30 日、山口セミナーパーク (山口県、山口市)

(4) 安達健太 (他 2 名、3 番目)

Accelerated Silane Water Cross-Linking Behaviors in Ethylene-Propylene Copolymer by Bis(acetylacetonato)copper(II)/n-Octadecylamine Axial-Ligand Coordinated Catalyst、16th Meeting, The Japanese Sol-Gel Society、2018 年 8 月 6 日、関西大学 (大阪府、吹田市)

(5) 安達健太 (他 1 名、2 番目)

水溶性ポルフィリン誘導体による金粒子の粒径制御:末梢置換基ルイス塩基性の視点から、日本化学会中国四国支部大会、2017 年 11 月 12 日、鳥取大学 (鳥取県、鳥取市)

(6) 安達健太 (他 2 名、3 番目)

WO₃微粒子プローブを用いたシルクフィブロインの特異的二次構造転移の検出、日本化学会中国四国支部大会、2017 年 11 月 12 日、鳥取大学 (鳥取県、鳥取市)

(7) 安達健太 (他 1 名、2 番目)

μ -oxo 型二核鉄錯体を添加したエチレン-酢酸ビニル共重合体/オルトケイ酸テトラエチル複合体の溶媒不溶分形成メカニズムの検討、バイオマス利用技術研究発表会、2017 年 9 月 15 日、静岡大学 (静岡県, 浜松市)

(9) 安達健太 (他 1 名、2 番目)

酸化タングステンナノ粒子のフォトクロミック現象とシクロデキストリン誘導体のキラル包接能を組み合わせたラベルフリー α -アミノ酸エナンチオ分析、分析化学会第 66 回年会、2017 年 9 月 10 日、東京理科大学 (東京都, 葛飾区)

(10) 安達健太 (他 1 名、2 番目)

ヒト血清アルブミンの薬物結合サイト別相互作用評価: キサンテン色素誘導体のサイト I・II 結合能、分析化学会第 66 回年会、2017 年 9 月 10 日、東京理科大学 (東京都, 葛飾区)

(11) 安達健太

自動車部材・電子材料開発に資するシーズ技術紹介【湿気反応性高速硬化型樹脂化合物】【単一微粒子体積磁化率測定】、電子デバイス事業化フォーラム、2017 年 9 月 2 日、福山商工会議所 (広島県, 福山市)

(12) 安達健太 (他 1 名、2 番目)

Vortex Flow-Assisted Synthesis of Helical Silica Fibrils via Sol-Gel Process Effect of Alkoxysilane Coupling Agent, Catalyst, Surfactant, and Temperature on the Twisted Silica Structure, 15th Meeting, The Japanese Sol-Gel Society, 2017 年 8 月 8 日、大阪市立大学 (大阪府, 浪速区)

(13) 安達健太 (他 5 名、1 番目)

Volume Magnetic Susceptibility Measurement of Crystalline Tungsten Oxide Single Particle for Detailed Understanding “Surface-Enhanced Photochromic Phenomenon”, 15th Meeting, The Japanese Sol-Gel Society, 2017 年 8 月 8 日、大阪市立大学 (大阪府, 浪速区)

(14) 安達健太 (他 2 名、2 番目)

酸化タングステンナノ粒子表面におけるカチオン性ポルフィリン色素の吸着・自己組織化: メソ位置換基のアンカー効果、日本分析化学会第 77 回分析化学討論会、2017 年 5 月 27 日、龍谷大学 (京都府, 京都市)

(15) 安達健太

酸化タングステンナノ粒子の表面特異性を利用したセンシング技術の開発、中四国熱科学工学研究会。2016 年 11 月 1 日、山口大学 (山口県, 宇部市)

(16) 安達健太 (他 2 名、2 番目)

水溶性ポルフィリン誘導体存在下でのエタノールによる Au(III) \rightarrow Au(0) 還元反応速度論、日本分析化学会第 65 年会、2016 年 9 月 14 日、北海道大学 (北海道, 札幌市)

(17) 安達健太 (他 2 名、3 番目)

Spectroscopic and Photochromic Properties of Tungsten (VI) Oxide Nanoparticles Immobilized in Electrospun Silk Fibroin Xerogel Nanofibers, 14th Meeting, The Japanese Sol-Gel Society, 2016 年 8 月 8 日、早稲田大学 (東京都, 新宿区)

(18) 安達健太 (他 2 名、3 番目)

Kinetic Analysis for Catalytic Performance of Various β -Diketone Copper(II) Complexes on Water-Crosslinking Reaction in Alkoxysilane Grafted Polyolefin System, 14th Meeting, The Japanese Sol-Gel Society, 2016 年 8 月 8 日、早稲田大学 (東京都, 新宿区)

(19) 安達健太 (他 2 名、2 番目)

β -シクロデキストリン/酸化タングステン複合系のフォトクロミック特性を利用したアミノ酸光学異性体検出、日本分析化学会第 76 回分析化学討論会、2016 年 5 月 28 日、岐阜薬科大学・岐阜大学 (岐阜県, 岐阜市)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：分析方法、及び分析装置

発明者：河野誠，安達健太

権利者：同上

種類：特許

番号：特開 2017-015159

出願年：平成 2 9 年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.materchem.sci.yamaguchi-u.ac.jp/>

※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。