

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05916

研究課題名(和文)人工抗体ポリマー・ナノコンポジットによる有機フッ素化合物の認識とセンシング

研究課題名(英文) Recognition and Sensing of Fluorous Organic Compounds Using Nanocomposite of Molecularly Imprinted Polymer as Artificial Antibody

研究代表者

松井 淳 (Matsui, Jun)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授

研究者番号：10264954

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)：PFOAやPFOS等は環境汚染物質として注目されているが、特定の有機フッ素化合物を認識する生体材料は知られていない。本研究では、分子インプリンティング法により、含フッ素モノマーを用いてPFOSを認識する人工抗体高分子を合成した。得られた高分子は非インプリント高分子と比較して約2.5倍の保持を示し、オクタンスルホン酸に対してはほとんど保持が見られなかったことから、保持にはフルオラス相互作用が関与していることが示唆された。また、含フッ素モノマーの比率を最適化させることにより、架橋剤を加えることなくハイドロゲルを作製したところ、PFCsの添加によりゲルが溶解するという応答を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、分子インプリンティング法により、PFOSと選択的に結合する高分子材料を合成した。これにより、これまで特定の有機フッ素化合物を認識する抗体等が存在しないため困難であった、バイオセンサーやバイオアッセイの開発に道が拓けたといえる。また、パーフルオロ化合物間の相互作用に基づくハイドロゲルを構築したが、同ゲルはPFCsの存在下で物理的变化を示し、将来的なPFCsセンサー材料への応用が期待される。このようにフルオラス相互作用を分子認識機構や材料構築に役立てた例はほとんどなく、学術的にも意義深い成果といえる。

研究成果の概要(英文)：Perfluorinated organic compounds (PFCs) have caused considerable concern as environmental pollutants. For separation of specific PFCs, however, no molecular-recognition material is available. In this study, we synthesized PFOS-selective polymer by a molecular imprinting technique using a fluorinated functional monomer. The imprinted polymer showed a significantly longer retention of PFOS than a non-imprint polymer, and exhibited almost no recognition of octanesulfonic acid, suggesting that fluorinated interaction was involved in the retention. Also, a combinatorial use of a monomer bearing a perfluorinated sidechain and that with a hydrocarbon sidechain allowed us to obtain hydrogel without chemical crosslinks, which dissolved upon the addition of PFOS. Although further optimization in selecting and designing monomers is necessary, the results suggest the potential utility of the fluorinated gel in detection of PFCs.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：分子インプリンティング法 パーフルオロ化合物 PFOA PFOS 分子認識 ハイドロゲル 金属ポルフィリン イタコン酸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

有機フッ素化合物 (PFCs) は、そのパーフルオロアルキル基に由来する撥水・撥油性、化学的安定性、熱安定性、非粘着性等の特異な性質から、半導体コーティング剤、繊維・紙・皮の表面加工剤、水性膜形成泡消化剤、航空機油圧作動液等、さまざまな用途に応用されている。しかし、これら材料の製造過程や使用後の分解によって環境中に放出される PFCs は、パーフルオロアルキル基の極めて高い安定性ゆえに環境中や生体内での長期残留性が確認されており、ヒトの健康への影響が懸念されている。したがって、環境計測や血液調査に有用な、PFCs に対する選択的なセンシング手法、及び、その開発に欠かせない抗体やアプタマー等のバイオ素子が必要とされているが、生体分子にとって相互作用性に乏しいパーフルオロアルキル基を認識することは容易ではなく、PFCs に対する抗体やアプタマー等の報告例はない。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、分子インプリンティング法 (図1) により種々の PFCs に対して人工抗体高分子を作製することを目的として研究を行った。さらに、PFCs に対して物理的に応答する機能 (膨潤・崩壊等) をもたせることにより、形状変化や色変化を通じて視覚的に PFCs を検出できる機能性人工抗体高分子を作製することを目的とした。

分子インプリンティング法では、認識したい PFCs をテンプレートとして、モノマーや架橋剤と混合し、共重合を行う。その結果得られた網目状高分子からテンプレートを除去することによって、テンプレートに対する相補的空間 (分子認識部位) を高分子内に得る。本手法では、生体分子では認識することが困難なパーフルオロアルキル基を、フルオラス相互作用を介して含フッ素モノマーにより認識することが期待できる (図 2B)。さらに静電相互作用性モノマーや水素結合性モノマーの併用により (図 2A)、多点で PFCs を認識できる人工抗体高分子の構築を目指す。

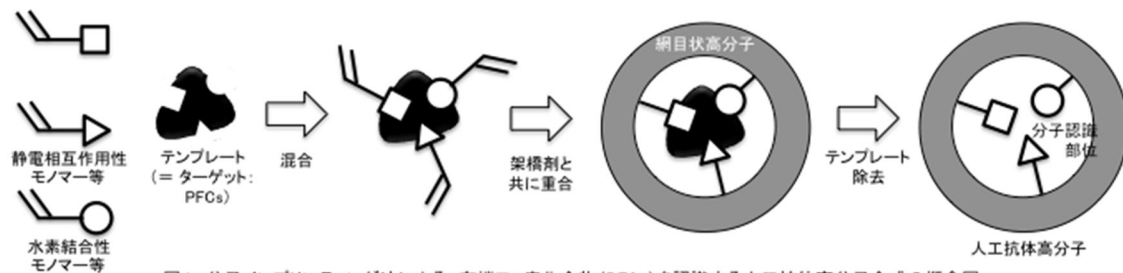


図1. 分子インプリンティング法による、有機フッ素化合物(PFCs)を認識する人工抗体高分子合成の概念図

### 3. 研究の方法

(1) PFCsに認識する人工抗体高分子 分子インプリンティング法の概念 (図1) に基づいて、人工抗体高分子をビニルモノマーの共重合により合成することを検討した。その際、ターゲットであるPFCs (有機フッ素化合物) の極性官能基に対しては水素結合や静電相互作用、芳香環に対してはスタッキング相互作用、パーフルオロアルキル基に対してはフルオラス相互作用を介してターゲット (テンプレート) とモノマーが複合体を形成するよう、それぞれ、カチオン性あるいはアニオン性官能基、芳香属官能基、パーフルオロアルキル基等をもつ各種メタクリレートモノマーの使用を検討した。人工抗体高分子は、分子インプリンティング法 (図1) によって合成した。すなわち、1) 架橋剤を含むモノマー混合溶液中にターゲットであるPFCsをテンプレートとして加え、2) ラジカル重合等によって網目状高分子を合成、3) 重合後にテンプレートを除去することによって、ターゲットに対して相補的な結合部位空間を得る、と

いう戦略である。このようにして得られた人工抗体高分子のターゲット（PFCs）に対する結合能は、微粒子状にした高分子をカラムに充填し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて各種PFCsに対する保持を測定する方法により評価した。

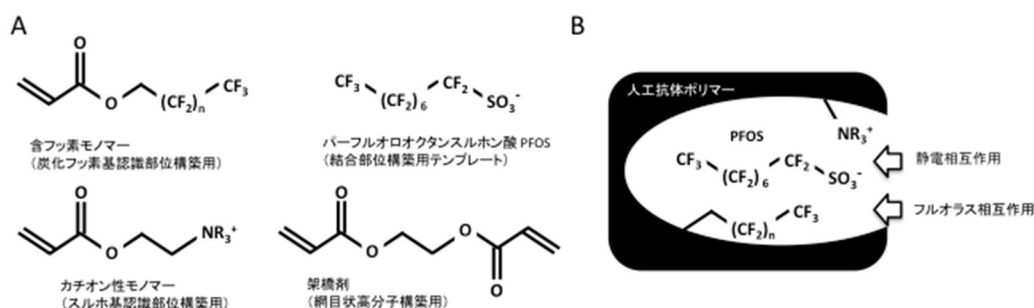


図2. 分子インプリンティング法に用いるモノマーの構造(A)と、有機フッ素化合物(PFCs)に対する結合部位の概念図(B)

(2) PFCsに応答する高分子ゲル 人工抗体高分子が水系溶媒中でゲルとなるよう、また、PFCsに対する刺激応答性を獲得するよう、高分子系の設計を行った。架橋方法として、共有結合による架橋をもたらす*N,N*-メチレンビスアクリルアミド等の架橋剤を検討するとともに、含フッ素モノマー等のフルオラス相互作用による物理的架橋についても検討を行った。フルオラス相互作用による架橋では、基質として取り込んだPFCsのパーフルオロアルキル鎖が架橋を阻害あるいは促進することを期待し、PFCsに応答した体積変化や形状変化について試験を行った。

(3) 人工抗体高分子を構成するモノマーの再検討 PFCs に物理的応答を示す高分子ゲルの結合能と化合物選択性の向上を目的として、人工抗体高分子を構成するモノマーについて再検討を行った。先述の静電相互作用を期待したモノマーに代えて、水中での強固な結合が期待できる金属ポルフィリン型モノマーによる配位結合を利用することを検討した。ポルフィリンは中心金属の種類によって結合能が大きく異なることから、種々のポルフィリン金属錯体型モノマーを調製し、同モノマーの結合性に関する基礎的知見を得るため、カフェインやポリフェノール類をモデルテンプレートとして分子インプリント人工抗体高分子を合成し水系溶媒中での結合性について高速液体クロマトグラフィーを用いて評価した。また、水素結合サイトとフルオラス相互作用サイトをあわせもつ二官能性モノマーの設計を志向し、2つのカルボキシ基を有するイタコン酸を用いた分子インプリンティング系について検討を行った。イタコン酸の反応性について知見を得るため、重合時間や重合位置が、得られる高分子の認識能へ与える影響を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 人工抗体高分子の創製 分子インプリンティング法の概念(図1)に基づいてパーフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)に対する人工抗体高分子すなわちPFOSインプリント高分子(PFOS-IP)の合成には、テンプレート分子としてPFOS、機能性モノマーとしてフルオラス相互作用が期待できる含フッ素モノマー(ヘプタデカフルオロデシルアクリレート, HFA)、及び、静電相互作用が期待できるカチオン性モノマー(*N,N*-ジメチルアミノエチルメタクリレート, DMAEMA)を用いた。架橋剤(エチレングリコールジメタクリレート)と、PFOS、HFA、DMAEMA、重合開始剤AIBNを混合し、60℃で17時間加熱することにより重合を行った。得られた塊状の網目状高分子をメタノールで洗浄してテンプレートを除去することにより、PFOS-IPを得た。また、比較のため、テンプレートを加えずに重合した非インプリント高分子(NIP)の合成も行っ

た。これらの高分子をすりつぶし、ふるいにかけて分取された 32-63 マイクロメートルの粒子をカラムに充填し、蒸発光散乱検出器を取り付けた高速液体クロマトグラフィー装置を用いて PFOS の保持時間を測定した。その結果、PFOS-IP では NIP と比較して約 2.5 倍、PFOS の保持時間が長いことがわかった。これは、高分子内に PFOS の結合部位が構築されていることを示唆している。さらに比較のため、フッ素をもたないオクタンスルホン酸の測定を行ったところ、ほとんど保持は見られず、PFOS-IP による PFOS の保持にはフルオラス相互作用が関与していることが示唆された。

(2) PFCs に応答する高分子ゲルの合成と評価 人工抗体高分子が水系溶媒中でゲルとなるように作製し、PFCs に対する刺激応答性を評価した。人工抗体高分子(ゲル)の作製は、分子インプリンティング法に基づいて行い、使用する機能性モノマー、骨格構築用モノマー及び架橋剤を変えることにより、種々の高分子合成を行った。その中で、パーフルオロオクチルアクリレートとオクチルアクリレートの比率を変えて合成した高分子系では、比率の最適化を行うことにより、架橋剤を加えることなく水中でゲルを形成することを見出した。パーフルオロオクチルアクリレートの比率が低い場合にはゲル化は起こらず、また、高い場合には高分子の凝集によると考えられる固体が生じることから、このゲルにおける架橋は、パーフルオロオクチル基同士のフルオラス相互作用による物理架橋であると考えられる。水の代わりに種々の有機溶媒を用いたところ、親フッ素性溶媒においては高分子が溶解してしまい、やはりゲル化が起こらなかったことから、フルオラス相互作用による架橋が示唆された。PFCs に対する刺激応答性を評価したところ、サブ mM オーダーの高濃度の PFOA や PFOS に対して、ゲルが膨潤、さらには溶解するという応答を確認することができた。しかし、環境汚染で問題となるような低濃度に対しては応答は見られず、今後、感度の向上ならびに選択性の付与について検討を行っていく必要が確認された。

(3) 人工抗体高分子を構成するモノマーの再検討 新たに金属ポルフィリン型モノマー及びイタコン酸について分子インプリンティング法への適用性を検討した。金属ポルフィリン型モノマーの合成は、4-ヒドロキシベンズアルデヒドとピロールからフェノール性ヒドロキシ基を4つ有するポルフィリンを合成し、その後、中心金属を配位させ、さらに塩化アクリロイルと反応させる方法により行った。機能性モノマーとしてポルフィリン金属錯体型モノマー、モデルプレートとしてケルセチン、架橋剤としてエチレングリコールジメタクリレート(EDMA)、希釈剤に DMF を用いて 60 °C で 16 時間加熱し、分子インプリント高分子(IP-Fe)を得た。また、テンプレートを加えずに重合することでブランク高分子(BP-Fe)を得た。高分子をすり潰してステンレス製カラムに充填し、HPLC を用いてケルセチン、及び、ケルセチンの構造類似体の保持時間を測定した(図3)。その結果、中心金属としては Fe(II) を配位させたモノマーがプレートに対して高い結合能を示すことが明らかとなった。また、IP-Fe の保持能の方が BP-Fe よりも高いことから、高分子内でヒドロキシ基に対する認識部位が構築されているもの

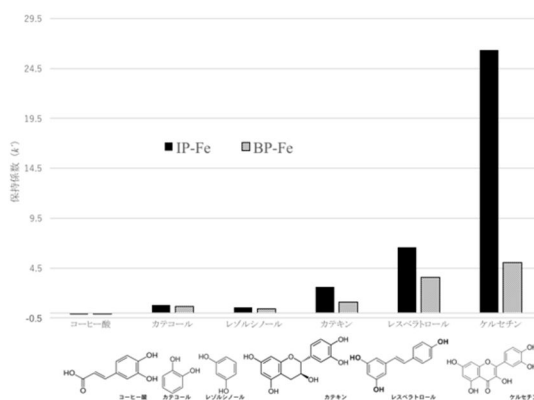


図3. 各ポリマーにおけるケルセチン構造類似体の保持係数(選択性評価), 溶離液: アセトニトリル - 10mM リン酸緩衝溶液(pH7) (7:3,v/v) .

と考えられ、PFOA や PFOS の酸素原子の認識にも同高分子が有用である可能性が示唆された。

また、分子インプリンティング系におけるイタコン酸の反応性について検討するため、重合時間や重合場所が異なる高分子を作製して認識能の評価を行った。重合容器の縦方向に位置が異なる分子インプリント高分子の比較では、底部分の高分子が最も高い親和性を示すことがわかった。この結果は、センサーゲルを合成する際にも重合位置別に高分子を取り出すことによって、結合能や膨潤性が異なるゲルを一度に入手しうることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田将平、松井淳
2. 発表標題 ポルフィリン金属錯体を機能性モノマーに用いたポリフェノール認識高分子の合成
3. 学会等名 第25回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田将平、松井淳
2. 発表標題 鉄ポルフィリンを機能性モノマーに用いたケルセチン・インプリントポリマーの選択性評価
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野上 晴加、松井 淳
2. 発表標題 15N NMR滴定実験による複数の機能性モノマーを使用したニコチンインプリント高分子の設計
3. 学会等名 第24回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西村彩, 福田将平, 村嶋貴之, 松井淳
2. 発表標題 ポルフィリン残基を有する分子インプリントポリマーにおける中心金属の保持挙動への影響
3. 学会等名 第26回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田 将平, 村嶋貴之, 松井淳
2. 発表標題 鉄ポルフィリンを機能性モノマーに用いた ポリフェノールインプリントポリマーの 分子認識様式に関する検討
3. 学会等名 第30回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田美穂, 松井淳
2. 発表標題 発酵食品中の5-ALA分析-蛍光誘導体化法の比較とテーラーメイド前処理法の検討-
3. 学会等名 第30回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田 将平, 松井 淳
2. 発表標題 Quercetin extraction method using molecular imprinting polymer with the iron porphyrin
3. 学会等名 49th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2019)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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