

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550166

研究課題名（和文） フッ素化合物を認識する人工レセプターの合成と応用

研究課題名（英文） Synthesis and Application of Artificial Receptors
That Recognize Fluorous Compounds

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

研究成果の概要（和文）：環境負荷物質として懸念されているフッ素化合物・パーフルオロオクタン酸（PFOA）を認識する人工レセプター高分子を、モレキュラーインプリンティング法により合成した。合成には、フッ素原子を含有するモノマー及び架橋剤が有用であることがわかった。同高分子は高速液体クロマトグラフィーの固定相として、また、反射型干渉分光センサーの分子認識素子として有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：An artificial receptor that recognizes a fluorosurfactant perfluorooctanoic acid (PFOA) was synthesized by a molecular imprinting technique, and was demonstrated to be useful as HPLC stationary phase and recognition element of a reflectometric interference spectroscopy (RIfS) sensor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生体機能関連化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：パーフルオロオクタン酸・PFOA・モレキュラーインプリンティング・分子認識・反射型干渉分光法・RIfS

1. 研究開始当初の背景

（1）近年、生体内の分子や金属イオンを認識・捕捉・検出する人工レセプターやケモセンサーなど、生体機構の解明や医療診断技術の開発などに役立つ分子・材料の創製が盛んに行われている。これらの人工レセプターやケモセンサーは、生体外の分子や金属イオンの認識・捕捉・検出にも有用であり、それを活かしたバイオセンサーやアフィニティークロマトグラフィーなどは、環境計測・品質管理など、多くの分野に欠かせない基盤技術と

なっている。人工レセプターやケモセンサーの設計については、ラショナル設計とランダム選択を中心に体系的に整理されており、また、その構築技術も、生体分子の合目的的な修飾技術から de novo 合成技術まで、数多くの選択肢が揃いつつある。一方、その材料については、核酸・ペプチド・糖などを中心とした生体関連化合物が主流であるものの、大胆に非生体系の材料を用いることで、極めて高機能な分子が得られる可能性がある。希土類金属を用いた人工酵素やフェニルボロン

酸による糖の認識などは、その好例である。特に、認識・捕捉・検出の対象が、一般的な生体分子とは著しく異なる物性をもつ場合には、生体関連の材料を使用することが必ずしも最適とは言えない。このような、生体関連の材料を用いた通常的设计・合成法では人工レセプター・ケモセンサーを得ることが難しいターゲットとして、フッ素化合物が知られている。フッ素化合物は医薬品、農薬、物性材料などとして、今や、多くの分野に欠かせない物質であるが、特定のフッ素化合物を認識する人工レセプターやケモセンサーは報告がない。

(2) フッ素化合物の分析法に関しては、パーフルオロアルキル基で修飾されたシリカゲル等が市販され、高速液体クロマトグラフィーや固相抽出の固定相として利用されている。これらの分析法では、試料分子と固定相の間のフッ素-フッ素相互作用が利用されていることから、これを分子認識の相互作用として用いることができれば、特定のフッ素化合物を認識する人工レセプター等が構築できると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 研究の目的

本研究では特定のフッ素化合物を認識・捕捉・検出する人工レセプター及びケモセンサーを設計・合成することを目的として研究を行った。ターゲットとなるフッ素化合物には、パーフルオロオクタン酸 (PFOA) 等の環境負荷物質を用いた。人工レセプター及びケモセンサーの構築には、モレキュラーインプリンティング法を用い、機能性高分子のかたちで人工レセプター及びケモセンサーを得ることを目指した。また、得られた人工レセプター及びケモセンサーは、高速液体クロマトグラフィーの固定相や反射型干渉分光装置 (RIFS) のセンサーチップとして応用することを検討した。

(2) フッ素化合物を認識する材料の設計戦略の確立

フッ素化合物の認識においては、通常の分子認識に見られるような水素結合、静電相互作用、疎水相互作用、スタッキング相互作用等に加えて、ターゲットの最も特徴的な官能基である炭化フッ素部位を認識することが重要となる。そこで本研究では、フッ素化合物間に働く相互作用として知られているフッ素-フッ素相互作用に着目し、この相互作用を利用した結合部位の構築法を確立することを目指した。

(3) 実応用に耐えうる認識能及び検出能をもつ材料の構築

フッ素化合物をターゲットとする人工レセプター及びケモセンサーの構築に際して、含フッ素環境負荷物質等をターゲットとし、

クロマトグラフィー分析、オプティカルセンシング、反射干渉分光 (RIFS) センシング等を通じて評価を行い、分析や検出などの実応用に耐える材料の構築を図った。

(4) 研究の学術的意義

このような特定のフッ素化合物を認識する含フッ素人工レセプターについてはこれまでに報告例がなく、本研究の新規性は極めて高い。また、その設計・合成に際しては、ターゲットのフッ化炭素部位に対して形状かつ化学的に相補的な結合部位を構築する必要があると考え、本研究ではその方法論を確立する計画である。申請者の知る限り、このような取り組みはこれまでに報告されておらず、本研究の独創性は高い。

また、フッ素化合物全般を吸着するクロマトグラフィー担体や固相合成担体については、市販のものが入手可能であるものの、分子認識能すなわち高い選択性を伴って特定のフッ素化合物を捕捉する材料が構築されれば、より迅速かつ簡便な環境分析法、医薬品分析法、及び、固相合成法など、多くの基礎研究及び産業分野において、低廃棄物かつ高効率な新規プロトコルが実現されるものと期待できる。

3. 研究の方法

(1) 人工レセプターの構築

人工レセプターの合成は、モレキュラーインプリンティング法を用いて、1) 架橋剤を含むモノマー混合溶液中にターゲット分子をテンプレートとして加え、2) ラジカル重合によって網目状高分子を合成し、3) 重合の後にテンプレートを抽出して除去することによって、ターゲット分子に対して相補的な結合部位空間を構築する、という考えに基づいて行った。その際、ターゲットのフッ素化合物の極性官能基との水素結合や静電的相互作用、及び、炭化フッ素部位とのフッ素-フッ素相互作用等を期待して、種々のモノマーについて検討を行った。得られたモノマーについて、含フッ素ターゲット分子との相互作用について調べ、人工レセプターのコンポーネントとしての適性を評価した。相互作用評価には、高速液体クロマトグラフィー装置を用いた。

(2) ケモセンサーの設計・合成

人工レセプターと同様の方法でケモセンサーを機能性高分子材料として合成することを検討した。なお、合成に際しては、フッ素化合物との結合を外部へシグナリングするためのナノコンポジット化について検討を行った。得られた高分子については、UV-Vis 分光光度計を用いてその感度やダイナミックレンジを評価した。また、あわせて、含フッ素化合物との結合に伴う高分子の体積変化 (膨潤や収縮) について調べた。

(3) フッ素化合物用センサーの構築

フッ素化合物を認識する高分子を、フッ素化合物との結合に伴って膨潤あるいは収縮するよう設計・調製し、反射干渉分光センサー (RIFS) の構築を図った。すなわち、あらかじめ反応性基を導入したチッ化ケイ素基板上で、フッ素化合物認識高分子を調製し、高分子固定化センサーチップを調製した。得られたチップを反射干渉分光センサー (RIFS) に装着して、高分子膜厚の変化による応答を検出した。

4. 研究成果

(1) PFOA のパーフルオロオクチル基とカルボキシル基をそれぞれフッ素化合物間相互作用および水素結合で認識することを想定し、含フッ素モノマーであるトリフルオロメチルアクリル酸、および水素結合形成性のモノマーであるメタクリル酸等について、比較検討を行った。また、架橋剤についても、ジメタクリル酸エチレングリコールや、リンカー部にフッ素をもつジメタクリル酸 2, 2, 3, 3, 4, 4, -ヘキサフルオロペンタン-1, 5-ジイル等を比較検討した。なお、高分子の評価は、得られた高分子を粒子状に粉碎し、液体クロマトグラフィー用カラムに充填して PFOA 等の保持を計測する方法により行った。その結果、モノマーと架橋剤の両方がフッ素を含む場合に、最も長く PFOA が保持され、溶離液にメタノール-水混合液 (44:55, v/v, 0.02%TFA) を用いた際の保持係数は約 30 であった。溶離液の水の比率を上げるにつれて保持が増大したことからフッ素化合物間相互作用の寄与が示唆され、また、PFOA がイオン型をとる pH 領域では保持が劇的に減少したことから水素結合の寄与が示唆された。PFOA の構造類似化合物の保持を調べることで選択性の評価を行ったところ、フッ素をもたないオクタン酸やフッ化炭素基が短いパーフルオロヘプタン酸などの保持は有為に小さく、モレキュラーインプリント高分子が PFOA に対して選択的保持能を有することが示唆された (図1)。

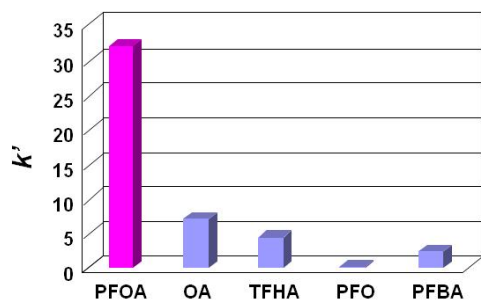


図1. 人工センサーの選択性:カラム温度は 24°C、溶離液はメタノール-水 (45:55, v/v) 0.02%トリフルオロ酢酸、流速 0.3 mL/min、試料はオクタン酸(OA)、パーフルオロヘプタン酸(TFHA)、パーフルオロオクタン酸(PFO)、パーフルオロ安息香酸(PFBA)。

(2) 分子認識素子としてモレキュラーインプリント高分子を用い、検出デバイスには反射型干渉分光測定装置 (RIFS) を用いて PFOA の検出に関する検討を行った。RIFS は基板表面に固定化した高分子膜の光学的膜厚を計測することができる装置である。モレキュラーインプリント高分子は、標的分子との結合に応じて膨潤もしくは収縮するので、この変化を観測することで標的分子の定量を試みた。モレキュラーインプリント高分子の合成においては、トリフルオロメチルアクリル酸

(PFOA のカルボキシ基を認識するためのモノマー) とジメタクリル酸 2, 2, 3, 3, 4, 4, -ヘキサフルオロペンタン-1, 5-ジイル (架橋剤) を用いる系に加えて、4-ビニルピリジン (カルボキシ基を認識するためのモノマー) とアクリル酸ペンタデカフルオロオクチル (フッ化炭素基を認識するためのモノマー) を用いる系等について検討を行った。チッ化ケイ素基板表面をアミノ基修飾し、さらにアクリル酸クロリドとの反応によってビニル基を導入した後、上記共重合高分子で被覆した。このモレキュラーインプリント高分子修飾基板を用いて、PFOA の検出を行ったところ、いずれの基板においても PFOA に対して応答を確認することができた。しかし、検出可能な濃度は数百 μ M から mM のレンジであり、高分子の膨潤・収縮特性の改善及びコンポジット化など、さらなる高感度化が必要と考えられる。

(3) モレキュラーインプリント高分子を、含フッ素モノマー (アクリル酸ペンタデカフルオロオクチルなど)、アクリル酸、*N*-イソプロピルアクリルアミド (NIPAM) などを用いて合成し、標的分子 PFOA に対する結合能と、結合に応じて収縮する性質をもたせた。この挙動を、静止画像の比較によって確認するとともに、モレキュラーインプリント高分子のナノコンポジット化 (金ナノ粒子の固定化) を図り、分光学的手法によって検出することもあわせて検討した。PFOA インプリント高分子の重合は直径 5mm のガラスチューブ内で行い、得られた高分子ロッドを切断してディスク状とし、十分な洗浄後、溶媒、温度、分析対象等に対する変化を観測した。その結果、メタノール中において直径が合成時の約 160%に膨潤し、PFOA の添加量に応じて、最大約 20%の直径の減少が見られた。また、直径約 5nm のメルカプトウンデカン酸修飾金ナノ粒子を重合系に加えて合成したモレキュラーインプリントナノコンポジットを用いて、分光光度計において PFOA に対する応答を確認したところ、プラズモン吸収帯のレッドシフトが確認され、本ナノコンポジットは PFOA オプティカルセンサーのプロブ素子として使用できる可能性が示唆された。

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 6 件)

① Tsuyoshi Nagata, Shou Goji, Kensuke Akamatsu, Hidemi, Nawafune, Jun Matsui, Monodispersed Molecularly Imprinted Polymer Beads with Enhanced Atrazine Retention Ability Synthesized with Polymeric Diluents, *Analytical Letters*, 査読有, 45, 2012, 印刷中.

② Megumi Takayose, Kenji Nishimoto, Jun Matsui, A Fluorous Synthetic Receptor That Recognizes Perfluorooctanoic Acid (PFOA) via Fluorous Interaction Obtained by Molecular Imprinting, *Analyst*, 査読有, 137, 2012, pp. 2762-2765.

③ Smritimoy Pramanik, Kaori Nakamura, Kenji Usui, Shu-ichi Nakano, Sarika Saxena, Jun Matsui, Daisuke Miyoshi, Naoki Sugimoto, Thermodynamic stability of Hoogsteen and Watson-Crick base pairs in the presence of histone H3-mimicking peptide, *Chem. Commun.*, 査読有, 47, 2011, pp. 2790-2792.

④ Shou Goji, Jun Matsui, Direct Detection of Thrombin Binding to 8-Bromodeoxyguanosine-modified Aptamer: Effects of Modification on Affinity and Kinetics, *Journal of Nucleic Acids*, 査読有, 2011.

DOI:10.4061/2011/316079

⑤ Jun Matsui, Takuji Sodeyama, Yumi Saiki, Toshifumi Miyazawa, Takashi Yamada, Katsuyuki Tamaki, Takashi Murashima, Face-to-face Porphyrin Moieties Assembled with Spacing for Pyrazine Recognition in Molecularly Imprinted Polymers, *Biosensors and Bioelectronics*, 査読有, 25, 2009, pp. 635-639.

⑥ Jun Matsui, Junji Nagano, Daisuke Miyoshi, Katsuyuki Tamaki, Naoki Sugimoto, An Approach to Peptide-based ATP Receptors by a Combination of Random Selection, Rational Design, and Molecular Imprinting, *Biosensors and Bioelectronics*, 査読有, 25, 2009, pp. 563-567.

[学会発表] (計 10 件)

①中堀祐真、櫻井健志、中川雄市、松井淳、

分子インプリント高分子によるフッ素化合物の認識とセンシング、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 25 日、慶応義塾大学 (横浜市)

② 郷司翔、松井淳、反射干渉分光法によるプロモ基修飾トロンビンアプタマーの結合能評価、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011 年 9 月 13 日、つくば国際会議場 (つくば市)

③ 太田安則、松井淳、アドレナリンインプリント高分子を用いる反射干渉分光センサー用チップの構築、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011 年 9 月 13 日、つくば国際会議場 (つくば市)

④ 山口大輔、中野修一、松井淳、アガロースゲル内における DNA 二重鎖構造の形成・解離反応、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月 28 日、神奈川大学 (横浜市)

⑤ 中野修一、山口大輔、三好大輔、松井淳、杉本直己、生命分子の挙動に及ぼす分子環境の効果 (21) 人工核酸を使った DNA 構造の水和研究、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月 27 日、神奈川大学 (横浜市)

⑥ 郷司翔、松井淳、アプタマー固定化反射干渉分光センサーによるトロンビン検出、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月 26 日、神奈川大学 (横浜市)

⑦ 太田安則、松井淳、分子インプリント高分子を用いる反射干渉分光用センサーチップの構築、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月 26 日、神奈川大学 (横浜市)

⑧ 郷司翔、松井淳、8-プロモデオキシグアノシンの導入によるトロンビン結合アプタマーの高次構造安定性及び親和性の向上、日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月 28 日、近畿大学 (東大阪市)

⑨ 高寄めぐみ、松井淳、含フッ素インプリントポリマーによるパーフルオロオクタン酸 (PFOA) の認識、日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月 28 日、近畿大学 (東大阪市)

⑩ Megumi Takayose, Jun Matsui, Synthetic Receptor for a Fluorosurfactant PFOA Obtained by Molecular Imprinting, *The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy*, 2010 年 3 月 1 日、オーランド (米国)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし