

〈特別研究課題〉 簡便な住居環境センサーの開発に関する研究
助成研究者 名古屋工業大学 木下 隆利



簡便な住居環境センサーの開発に関する研究

木下 隆利
(名古屋工業大学)

1. はじめに

シリコン基板表面に形成したポリペプチド薄膜や二酸化シリコン薄膜が、均一な干渉色を呈し、微量の外部刺激による薄膜構造の変化が、色の変化として出力されることを見出した。今回は、この構造色変化を利用した新規センサーシステム構築の可能性について探る。

色素に由来しない発色として良く知られる構造色は、蝶や甲虫、熱帯魚の表皮のように精密に設計されたナノスケールの規則構造に基づいて、特定波長の光が効果的に反射・透過・回折され発色する現象に基づいている¹⁾。ネオンテトラやリスズメダイは、表皮の虹色素胞中にナノスケールで制御された多層構造を有しており、その構造が艶やかな青色を導き出している。また仲間とのコミュニケーションを図るために、交感神経伝達物質の刺激で層間隔を操作し構造色を合目的に変化させている分子機構は、工学的応用の立場からも非常に興味深い(図1)。現在、多くの研究者により、「外部刺激→構造変化→色変化」の図式に基づく新規光学素子の研究開発が進められている^{2~5)}。

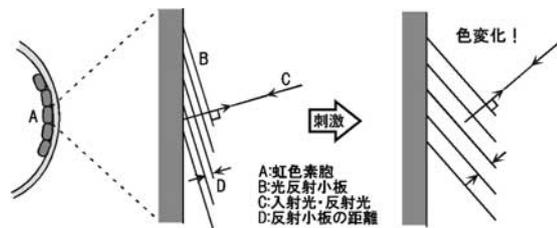


図1 交感神経伝達物質の刺激で操作されるネオンテトラの構造色変化

以下、構造色システムの新規センサーへの展開性を念頭に、最も単純な薄膜干渉に基づく基板の調製法、および環境ホルモンの収着や抗原-抗体反応に対する応答(色変化)の結果を本助成金の成果として報告する。

2. ポリペプチドを素材とした構造色基板の調製

α -ヘリックス性ポリペプチドのLB膜をシリコン基板上に多層累積することによって、シリコン基板表面にナノメートルオーダーで均一なLB膜を得た。ポリペプ

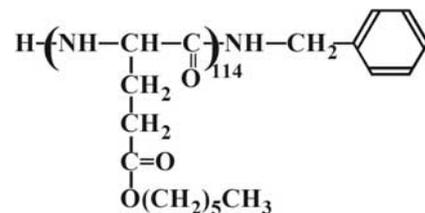


図2 PHeLGの構造式

チド層とシリコン基板との屈折率の差から光の干渉が誘起され、構造色が発現すると考えられる⁶⁾。α-ヘリックス性のポリペプチドとして、疎水性の高いポリ(n-ヘキシル-L-グルタメート)⁷⁾(以下PHeLG)を採用した(図2)。空気/水界面にPHeLGのクロロホルム/DMF(7:3)溶液を展開し、表面圧-面積測定を行うと、PHeLGが水面に長軸を横たえた形で、安定な単分子固体膜を形成することが確認された(図3)。そして、表面圧15mN/mにおいてシリコン基板上へ単分子固体膜の累積を行った⁸⁻⁹⁾。シリコン基板表面は、予めオクタデシル-トリエトキシシランとのカップリング反応で疎水化処理を施した。基板への累積は非常に良好であり、down及びupの各モードにおいて累積比は概ね1.0であった。

図4にPHeLGを40層、80層、120層、160層累積した結果を示す。肉眼で正面から観察すると、40層では濃茶、80層では青、120層では黄、160層では赤であり、観察角度によってその色は変化した。LB膜の厚さと色調との関係を定量的に扱うために各LB膜の反射スペクトル測定を行った。得られたスペクトルの極大・極小波長は、薄膜干渉の定義式(1),(2)式の予測と良い一致を示した。

ここで、図5に示すように h はペプチド層の膜厚、 n は膜の屈折率、 α は光の入射角、 m は自然数である。このことから、調製した基板の発色は構造色であることが確認された¹⁰⁻¹¹⁾。

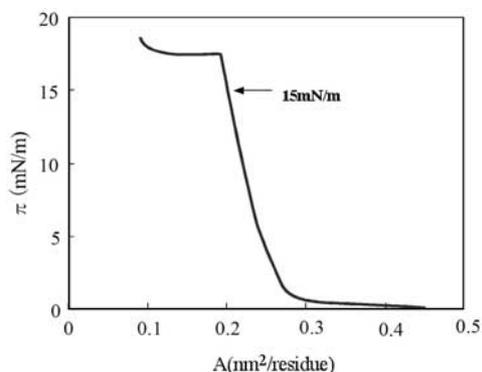


図3 PHeLGの表面圧-面積等温線

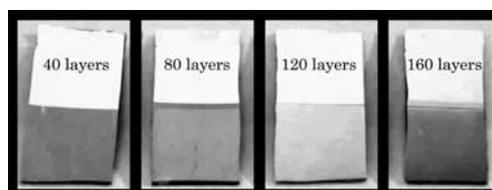
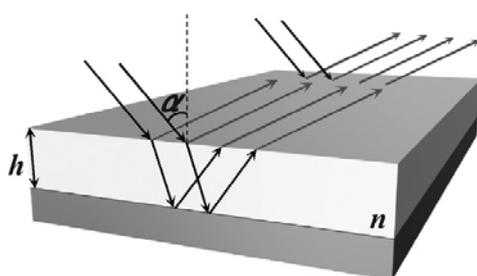


図4 PHeLGのLB膜から成る構造色基板



$$\lambda = \frac{4h}{m} \sqrt{n^2 - \sin^2 \alpha}$$

[maximum wavelength] $m=2k$
 [minimum wavelength] $m=2k-1$ ($k=1,2,3 \dots$)

図5 薄膜干渉基板の発色機構
 (光の入射角: α , ポリペプチド層の膜厚: h , ポリペプチド層の屈折率: n)

3. 化学物質の可視化

3-1. 有機溶媒蒸気

(1),(2)式より、構造色の色調は膜厚、屈折率、光の入射角の三要素で決定されていることがわかる。つまり、何らかの刺激が膜厚や屈折率に変化を与えれば、色調の変化が誘起されると考えることができる。そこで、薄膜への有機溶媒の取着が構造色に与える影響について検討した。

PHeLGを119層累積した黄色の基板を1,4-ジオキサン蒸気で満たしたバイアル中に挿入し反射スペクトル測定を行ったところ、415nmの極小波長が658nmに長波長シフトすることが確認された(図6)。1,4-ジオキサンの屈折率(1.42)がPHeLGの屈折率(～1.5)とほぼ等しいことから、この大きな色調変化は概ね膜厚の変化に起因したものと推測される。PHeLGの良溶媒である1,4-ジオキサンがLB膜に取着し、膜を膨潤させたためであろう。

また、1,4-ジオキサン以外の種々の有機溶媒を用いて同様の実験を行うと、溶媒の種類によって、色変化量は様々であった(図7)。得られた結果はPHeLGと各有機分子との相互作用パラメータの序列¹³⁾と対応し、構造色の変化量(LB膜の膨潤度の差)は、ポリペプチドと有機溶媒との親和性を反映したものであることがわかる。

この色変化は可逆的であり、バイアル中から基板を取り出すと有機低分子は即座に脱離し、基板は瞬時に元の色を回復した(図8)。

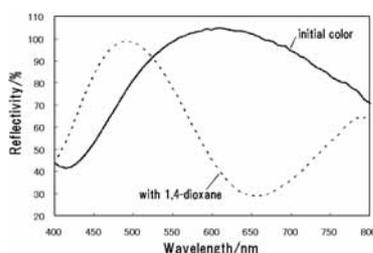


図6 ジオキサン取着に伴う構造色変化

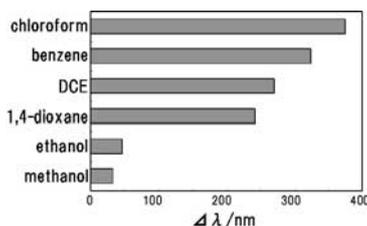


図7 各溶媒取着に伴うPHeLG構造色基板の色変化量

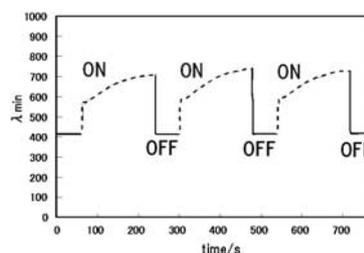


図8 ベンゼンの取着・脱離に伴う可逆的な色変化

3-2. 水溶液中の微量環境ホルモン

PHeLG膜への有機溶媒の取着が構造色を変化させることを確かめた後、環境ホルモンである*p*-*n*-ブチルフェノールによる色変化を観察した。微量の*p*-*n*-ブチルフェノールの水溶液(300ppm)を調製し、PHeLG構造色基板(120層)を一定時間浸漬すると、黄色であった基板の色は、鮮やか

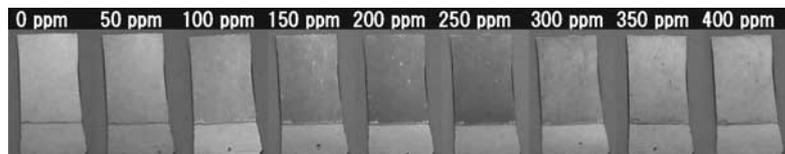


図9 *p*-*n*-ブチルフェノール濃度に依存した系統的な構造色変化

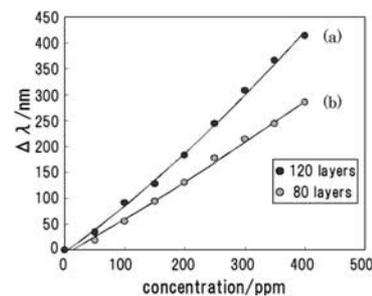


図10 *p*-*n*-ブチルフェノール濃度と構造色変化量の関係(120層および80層)

な青色へと劇的に変化した。浸漬前後の基板の反射スペクトルを比較すると、浸漬前の極小波長388.5nmが、浸漬後には593.5nmへシフトしていることがわかった。この場合も基板は、純水やメタノールでの洗浄によって元の色を回復した。

種々の濃度の*p*-*n*-ブチルフェノール水溶液を調製し同様の試験を行うと、濃度増加とともに系統的な色変化が肉眼で観察でき(図9)、濃度に対して $\Delta\lambda$ をプロットしたところ、直線関係を示すことが確認された(図10(a))。またPHeLGを80層累積した基板を用いて同様の試験を行った結果、120層の基板と同じく直線的な色変化を示し、その変化量($\Delta\lambda$)は膜厚比を反映した結果となった(図10(b))。これらの結果より、構造色基板は環境ホルモン濃度を色で表示できることや、その感度や測定限界はポリペプチド層の膜厚によって制御可能であることなどが示された。

3-3. 環境ホルモン異性体

構造色の変化量(LB膜の膨潤度の差)が、ポリペプチドと有機溶媒との親和性に直結することはすでに述べた。そこで、標的分子に対して高い親和性を有する部位をポリペプチド側鎖に意

図的に導入することで、センシングに選択性を付与することが可能であると考えられる。そこで、ポリペプチド側鎖に*p*-*t*-ブチルフェノール構造を導入した(γ -メチルLグルタメート/ γ -*t*-ブチルベンジルLグルタメート)共重合体(P(MLG/tBuBLG))(図11)を用いて構造色基板を調製した。この基板に対して三種の環境ホルモン異性体(*o*-*t*-ブチルフェノール、*m*-*t*-ブチルフェノール、*p*-*t*-ブチルフェノール)の収着試験を行い、色変化を評価した。P(MLG/tBuBLG)単分子膜のシリコン基板への累積は比較的良好であり、80層累積すると基板

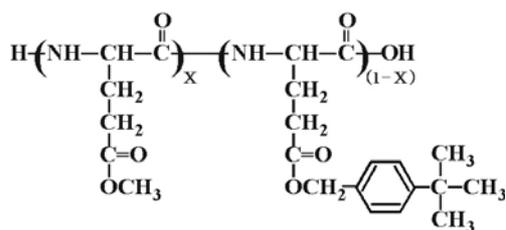


図11 P(MLG/tBuBLG)の構造式 (P(MLG/tBuBLG)の重合度は約1000、X=0.33)

は青色を呈した。得られた基板を*o*-*t*-ブチルフェノール、*m*-*t*-ブチルフェノール、*p*-*t*-ブチルフェノールの水溶液に5分間浸漬したところ、浸漬前後の基板の色変化量に大きな差異が生じた(図12)。各ブチルフェノールがペプチド側鎖との π - π スタッキング相互作用を介して収着していると考えられ、芳香環同士の面と面との重なり合いの際に生じる立体的な安定性の差異が、この収着量(色変化量)の差異を導いていることが推測される。PHeLG基板を用いた同様の試験において、各ブチルフェノール異性体の色変化量に大きな差が認められなかったことから、側鎖構造によって異性体が識別されていることが理解できる。

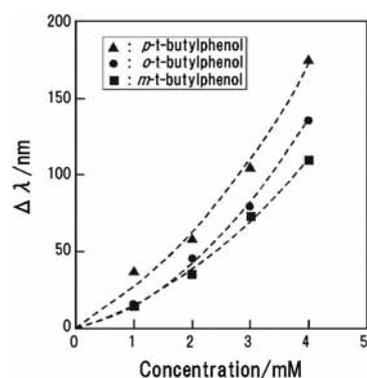


図12 *t*-ブチルフェノール異性体の水溶液濃度とP(MLG/tBuBLG)構造色基板の色変化との関係

4. 抗原-抗体反応の可視化

4-1. 表面にビオチンを有する構造色基板の調製

ELISA法やウェスタンブロット法に代表される多くの生体高分子の検出検査法がこれまでに確立されている。目的物を支持体にトラップし、標識と反応させた際の「一定波長の発光強度」で

目的物の有無・濃度を検出する手法が現在の主流である。しかしながら、蛍光分子や色素分子の代替として構造色を利用した検査法については、未だ充分に確立された例はない。構造色特有の仕組みを利用することで、「発光度」でなく「色相変化」で目的物の有無・濃度を検出できる簡便な検出法の構築が期待される。そこで我々は、生体高分子検出の基本的なモデルとして、アビジン（抗体）を対象に、ビオチン（抗原）をグラフトした薄膜干渉基板を調製した。

シリコン基板表面には、通常1nmほどの二酸化シリコン層が存在している。我々は、シリコン基板を酸素雰囲気下で高温処理することによって、この二酸化シリコン層の膜厚を均一に増大させた。可視光領域でのシリコンの屈折率 n が4~7と非常に大きな値であるのに対し、二酸化シリコンはポリペプチド等の有機分子とほぼ同等な値（1.5程度）である。二酸化シリコン層がある一定の厚みを超えると、その屈折率の大きな違いから構造色の発現が確認された。熱処理の時間を5時間に固定し、温度を様々に変えると、960℃では青色、1000℃では水色、1040℃では淡い緑色、1080℃では黄色、1120℃では赤色の基板が得られた(図13)。基板全体の発色が均一で、色ムラがないことから、厚さ方向に精密な二酸化シリコン層が形成できたことが示唆された。以下、この基板をプレカラー基板とする。

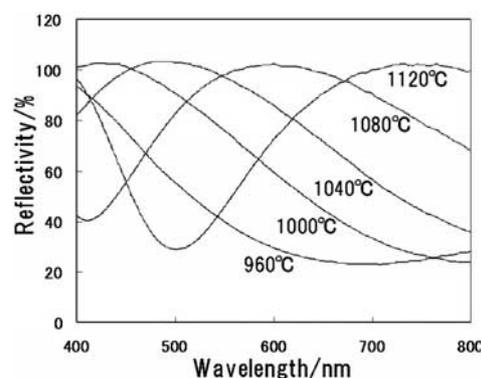


図13 二酸化シリコン薄膜形成によって得られた構造色基板の反射スペクトル

0.5wt%のアミノプロピル-トリエトキシシラン (KBM) 水溶液及びスクシンイミド基を有したビオチン(スルフォスクシニミジル-N-(D-ビオチニル)-6-アミノヘキサノエート)(Biotin-AC₅ Sulfo-OSu)の phosphate buffer 溶液 (pH=7.4) (3.0mM) を準備した。まず、1080℃の熱処理で作成した黄色のプレカラー基板を、KBM水溶液に30分浸漬した後、110℃で20分間熱処理し、基板表面にアミノ基を固定化させた。そして、その基板を Biotin-AC₅ Sulfo-OSu 溶液に90分浸漬させることによって表面にビオチンをグラフトしたビオチン基板を得た(図14)¹³⁾。

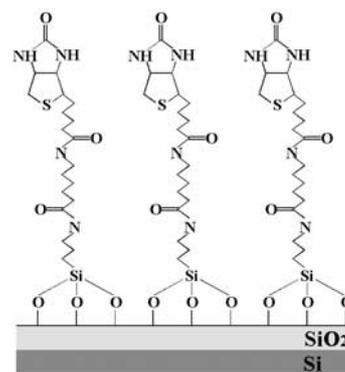


図14 構造色基板表面のビオチングラフト鎖構造

4-2. アビジン分子

この段階での、ビオチン基板の反射スペクトルを測定した結果、429nmに $m=2$ の極小波長が確認された。そして、この基板を各濃度のアビジンの phosphate buffer 溶液 (pH=7.4) ($1.0 \times 10^{-10}M$ 、 $1.0 \times 10^{-9}M$ 、 $1.0 \times 10^{-8}M$ 、 $1.0 \times 10^{-7}M$ 、 $1.0 \times 10^{-6}M$ 、 $1.0 \times 10^{-5}M$) に3h浸漬し、純水洗浄した後、反射スペクトルを測定し、 $\Delta\lambda$ を評価した(図15, 16)。

アビジン濃度 1.0×10^{-10} 、 $1.0 \times 10^{-9}M$ では $\Delta\lambda = 0$ であったが、濃度増加とともにスペクトルは長波長シフトを示した。 $1.0 \times 10^{-8}M$ では $\Delta\lambda = 3.0nm$ 、 $1.0 \times 10^{-7}M$ では $\Delta\lambda = 8.0nm$ とスペクトルがシフトし、 $1.0 \times 10^{-7}M$ 以上の濃度で、 $\Delta\lambda$ は頭打ちとなった。(1)式から逆算すると、この8.0nmのシフトは4.0nm程度の膜厚の増加に相当する。アビジン分子のサイズが $5.6 \times 5.0 \times 4.0nm$ である

ことを考慮すると、アビジンが基板表面のビオチン部位に固定化され、その際の膜厚変化が8.0nmの波長シフトを導いたと考えられる。そして、高い濃度領域において $\Delta\lambda$ が頭打ちとなったことから、 $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ の濃度でアビジンがビオチンサイトに飽和吸着したことが推察できる。事実AFMによる直接観察からも、 $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ において、基板表面をアビジンが密に占有した表面構造が確認された(図17)。

また、 $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ のアビジン溶液にビオチンモノマーを添加し($5.0 \times 10^{-5} \text{M}$)、1.5時間攪拌することでビオチンを事前に結合したアビジンを調製した。このアビジンの溶液を用いて同様の色変化試験を行い、その際の極小波長位置の時間変化をプロットした(図18)。その結果、事前にビオチンモノマーと反応しているアビジンの溶液中では基板は色変化せず、その後、通常のアビジン溶液に基板を移し変えると、即座に8nmの色変化応答を示した。このことから、アビジンはそのビオチン結合サイトによって基板表面のビオチンを認識し、基板表面に捕捉されていることが示された。

これらの結果から、ターゲットに対して高い結合定数を示す特異反応部位を、プレカラー基板表面に設けることによって、その表面での特異的・空間的反応を可視光領域で認識できることが示された。このシステムを用いることで、種々の生体分子の有無・濃度を色相変化で検出できる新たな検出法の構築が期待される。

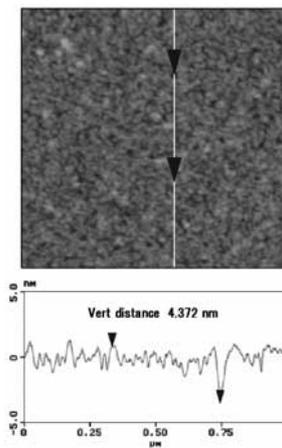


図17 $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ アビジン溶液へ浸漬後のビオチン基板表面のAFM像

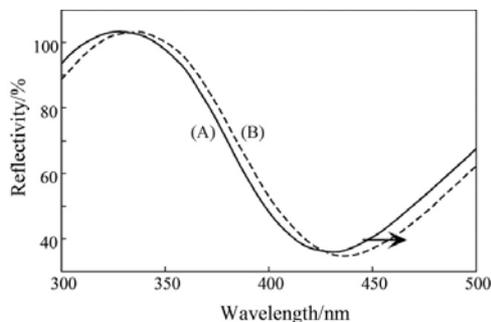


図15 $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ アビジン溶液へ浸漬前(A)後(B)のビオチン基板の反射スペクトル

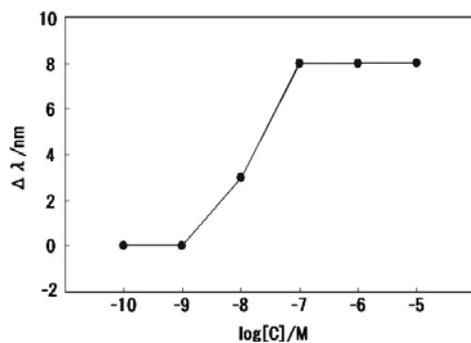


図16 ビオチン基板色変化量のアビジン濃度依存性

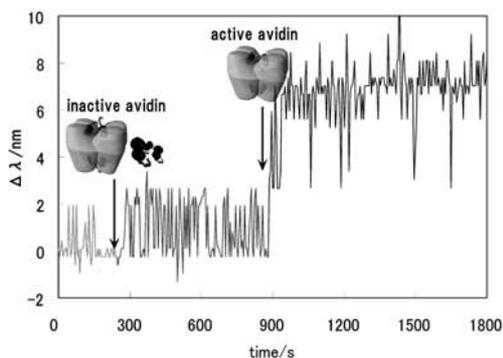


図18 ビオチンを含んだアビジン溶液、およびアビジンのみの溶液にビオチン基板を浸漬した際の色変化

5. まとめ

ポリペプチドLB膜をシリコン基板上に多層累積すること、もしくは酸素雰囲気下でのシリコン基板の熱処理による二酸化シリコン層形成によって、膜厚を制御した異屈折率層の調製が可能であった。このペプチド層、及び二酸化シリコン層とシリコン層との屈折率の差から、光の干渉効果が

誘起され、構造色の発現が確認された。構造色の色調は、ポリペプチドLB膜の累積層数や熱処理の温度によって変化した。異屈折率層の膜厚と屈折率が、その色調を支配しているからである。

PHeLG構造色基板を有機低分子蒸気にさらすと、有機低分子がポリペプチド層に収着することによって、膜の膨潤とともに劇的な色調の変化が観察された。有機溶媒の種類によってこの色変化量は様々であり、ポリペプチドと各有機溶媒との親和性を反映した結果であった。

環境ホルモン*p*-*n*-ブチルフェノールのような難揮発性分子においても、その水溶液にPHeLG構造色基板を浸漬すると大きな色の変化が確認された。*p*-*n*-ブチルフェノールの濃度に対し、色の変化量は直線的な依存性を示し、色の変化量から濃度を定量化することができた。*p*-*n*-ブチルフェノール濃度を色相の変化として可視化したといえる。また、PHeLGの累積層数の選択によって、色変化量の制御が可能であった。

ポリペプチド側鎖に*p*-*n*-ブチルフェノールの類似構造を組み込んだP(MLG/tBuBLG)を用いて構造色基板を調製した。同基板は三種の*n*-ブチルフェノール異性体に対して異なる色変化を示した。意図的に設計された側鎖構造と各異性体との親和性の差が反映された結果であり、異性体を可視的に識別できることが示唆された。

また、表面に、ビオチンを固定したプレカラー基板を調製し、その基板をアビジンの水溶液に浸漬すると、反射スペクトルは長波長シフトを示した。この波長シフトは、基板表面のビオチン部位へのアビジンの選択的な固定化に起因したものであり、アビジン - ビオチン間との特異的相互作用を、可視化することに成功したと言える。固体表面におけるホスト-ゲスト化学の可視化の図式がさらに拡大されることを期待する。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、平成17年度 研究開発助成（特別研究課題）を賜った財団法人日比科学技術振興財団に心から厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] H. Tabata, K. Kumazawa, M. Funakawa, J. Takimoto, and M. Akimoto, *Optical Review*, 3, 139, (1996).
- [2] Y. Takeoka, and M. Watanabe, *Langmuir*, 19, 9104, (2003).
- [3] C. E. Reese, M. E. Baltusavich, J. P. Keim, and S. A. Asher, *Anal. Chem.*, 73, 5038, (2001).
- [4] A. G. Mayes, J. Blyth, R. B. Millington, and C. R. Lowe, *Anal. Chem.*, 74, 3649, (2002).
- [5] H. Fudouzi, and Y. Xia, *Langmuir*, 19, 9653, (2003).
- [6] E. Hecht and A. Zajac, *Optics*; Addison-Wesley: Reading, Mass., (1974).
- [7] M. Higuchi, A. Takizawa, T. Kinoshita, Y. Tsujita, and K. Okochi, *Macromolecules*, 23, 361 (1990).
- [8] K. B. Blodgett, *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 1007 (1935).
- [9] K. B. Blodgett and I. Langmuir, *Phys. Rev.*, 51, 964 (1937).
- [10] T. Kinoshita, S. Hayashi, and Y. Yokogawa, *J. Photochem. Photobiol. A*, 145, 101 (2001).
- [11] S. Hayashi, Y. Yokogawa, and T. Kinoshita, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 75, 867 (2002).
- [12] T. Kinoshita, N. Okazaki, A. Takizawa, and Y. Tsujita, *Polymer*, 20, 791, (1979).
- [13] B. Steiger, C. Padeste, A. Grubelnik, L. Tiefenauer, *Electrochimica Acta*, 48, 761 (2003).