

## 研究課題別評価

### 1. 研究課題名：生体膜表面に吸着する環境ホルモンの計測システム

### 2. 研究者氏名：叶 深

ポスドク研究員：野田浩之（研究期間：平成 13 年 4 月～平成 15 年 3 月）

ポスドク研究員：森田成昭（研究期間：平成 14 年 4 月～平成 15 年 9 月）

### 3. 研究の狙い：

内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）が極微量でも、生体の内分泌系に対して重大な影響を及ぼす恐れがあるが、その汚染の実態や生体系への影響と作用機構はまだ十分解明されていない現状である。本研究において、我々は環境ホルモンとして疑われているビスフェノール A (BPA) やアルキルフェノール類化合物の高感度その場計測法の開発や、擬似生体膜表面への環境ホルモン分子の吸着・侵入過程で起こる膜構造や配向の変化及び機能性の関連について分子レベルでの解明を目指している。

### 4. 研究結果：

#### (1) フェムト秒ブロードバンド和周波発生分光測定システムの構築

和周波発生(SFG)は二次非線形光学手法であり、同じ振動分光である赤外・ラマン分光と比較して、特に表面選択性と測定感度が著しく高いところに特徴がある。SFG の強度は入射光のエネルギー密度に比例するので、フェムト秒パルスレーザーのような超短パルス光を用いると、SFG の発生効率を著しく向上させることができると同時に、熱効果による試料へのダメージも低減することができるので、生体試料の界面分子構造研究に適するものと考えられる。一方、フェムト秒パルスの周波数帯域が数百  $\text{cm}^{-1}$  と広く、そのままでは振動分光法としての適用は困難とされてきた。本研究では、フェムト秒の可視光を狭帯域化させ、フェムト秒の広帯域赤外光と合わせ SFG を発生する手法で、この問題の解決を試みた。広い波数領域(約  $250 \text{ cm}^{-1}$ )の SFG スペクトルを、CCD 検出器によって同時に測定できるブロードバンドSFG 計測システムを開発した。このシステムに対して改良を重ねた結果、種々の環境(空気と水溶液)と基板温度( $5 \sim 100$ ) の条件下で、種々の擬似生体膜における界面分子構造の高感度計測に成功した。計測時間と信号 S/N も従来のシステムと比べると大きく改善している。

#### (2) 機能性高分子薄膜修飾

QCM 電極による BPA の高感度検出法の開発質量変化を高感度で測定できる水晶振動子マイクロバランス(QCM)法はナノグラムレベルで質量変化を測定できるが、分子選択性がないことが問題点である。本研究では、BPA/ やアルキルフェノール類化合物と種々の高分子薄膜との相互作用を詳細に調べた結果、BPA を特異的に吸着できるポリアクリレート系高分子のポリ  $\beta$ -メチルシエチルアクリレート(PMEA) 薄膜を QCM 電極に固定することで、BPA の 1ppb 以下の超微量検出に成功した。また、エタノールでリンスすることにより BPA を PMEA 薄膜から完全に溶出でき、PMEA 膜をセンサーとして再利用できることが確認された。将来、金属や高分子のナノ粒子表面に PMEA 薄膜を担持し、溶液中に分散し、環境ホルモン分子の吸着効率を一層高めると同時に、膜

内に吸収した高濃度の環境ホルモン物質を回収し、環境修復型再生システムの実現が期待できる。

### (3) 環境ホルモン分子吸着による生体高分子薄膜の界面分子構造変化の解明

PMEA の血液やタンパク質に対する生体適合性が優れていることが知られており、我々は SFG 分光法を用いて、BPA の特異的な吸収に伴う PMEA 界面を分子構造変化の視点から調べることを試みた。固体基板にポリスチレン(PS)及び PMEA の二層構造の膜厚制御により、選択的に PMEA/空気界面 (自由界面)または PMEA/PS 界面 (高分子界面)の分子構造を SFG により選択的にプローブできることを示した。生体適合性に優れた高分子材料である PMEA は、アモルファスであるバルクに比べ、自由界面及び基板界面で側鎖を垂直に配向させた秩序だった分子構造を持つことが分かった。PMEA 薄膜の界面における側鎖末端  $\text{OCH}_3$  基の配向角の分布について見積もったところ、自由界面では分布が広いのに対し、基板界面では若干分布が狭いことが分かり、また、BPA 吸着により両界面における配向分布が狭くなることが分かった。このような構造変化は、PMEA の側鎖カルボニル基と BPA のヒドロキシル基との水素結合及び高分子薄膜のガラス転移温度( $T_g$ )に強く依存することが分かった。一方、この手法をより一般的に高分子薄膜の界面分子構造の解析に適用すれば、高分子材料の分子設計と機能性の関係の解明に大きく貢献できるものと考えられる。

### (4) ラングミュア-プロジェクト超薄膜及びリン脂質二分子膜の界面分子の構造評価

ラングミュア-プロジェクト(LB)超薄膜は機能性分子を固体表面に累積する有効な手法として、種々の機能性材料の創製に用いられている。特に LB 法で作製されるリン脂質二分子膜は擬似生体膜の基本モデルとして用いられている。しかしながら、研究手法の欠如により、材料の性能と安定性を大きく左右する膜表面分子構造や表面欠陥に関する研究は非常に限られていた。本研究では、界面や表面を選択的に測定できる SFG 分光法を用い、飽和脂肪酸分子であるステアリン酸(SA)とリン脂質分子であるホスファチジルコリン(DPPC)とホスファチジルセリン(DPPS)の LB 超薄膜の界面分子構造を分子レベルで解明した上、擬似生体膜と環境ホルモンの相互作用の解明を目指す。二価金属イオンの  $\text{Cd}^{2+}$  が水溶液中に存在する場合にのみ、SA 二分子膜の最外層の構造の再配列が起こり、膜の最表面分子の一部が表面上に反転したことを、その場 SFG 測定で初めて明らかにした。偶数層累積を用いた最初の研究で、最外分子層が反転再配列することを示した。この分子再配列のドライビングフォースは、SA 末端  $\text{COO}^-$  基と  $\text{Cd}^{2+}$  の強い静電的キレート結合と考える。このような SA の偶数層膜を、水中から空気中に引き上げることで、最外層の分子構造の変化速度が一気に加速された。一方、二価カチオンに誘起される界面分子構造の変化は、リン脂質分子の DPPC の二分子膜構造では観測されてなかった。さらに、リン脂質二分子膜のコレステロールによる安定化構造や環境ホルモンとの相互作用による膜構造変化について、その場 SFG により調べ、興味深い結果が得られている。

## 5. 自己評価：

本研究は、環境ホルモンのその場計測法の開発や擬似生体膜表面で環境ホルモン分子の吸着・侵入に伴う膜構造や配向の変化の分子レベルでの解明を目指して取り組んできた。PMEA 修飾 QCM 電極により、環境ホルモンの一つとして疑われている BPA の高感度計測に成功した。セ

ンサーとして実用化する場合には、高分子合成の専門家と共同研究を行い、高分子薄膜の耐久性や選択性をさらに改善すべき点がまだ残されているが、従来のように莫大な装置を必要とする分析には、本研究のような安価簡便なシステムで、迅速なその場測定ができることには魅力がある。

本研究では、振動分光法へ適用が困難とされてきたフェムト秒レーザーの問題点を克服し、高い界面選択性と測定感度を有するブロードバンド和周波発生(SFG)分光システムの構築に成功した。フェムト秒レーザーの高いエネルギー密度を利用し、従来の振動分光法では選択的な観測が困難とされる種々の擬似生体膜である生体適合性高分子薄膜やLB超薄膜や脂質二分子膜における界面分子構造の分子レベルでの解明に実現した。有機薄膜の構造と膜厚を設計することにより、干渉効果を利用し、異なる高分子界面における分子構造の計測が実現した。さらに、基礎化学と材料化学で、非常に重要とされるLB薄膜の界面分子構造への分子レベルの認識を本研究により大きく実現できた。二価金属イオンが存在する水溶液中で、飽和脂肪酸やリン脂質分子二分子膜の界面分子構造の再配向過程を分子レベルで明らかにした結果は、まさにSFGによって初めてもたらされたものであり、教科書に示されているLB累積膜の構造はまさに概念図で、われわれの理解がまだ十分でなかったことが痛感させられる。この研究は将来、蛋白質や糖質などの機能性分子と生体膜の作用機構と機能性発現の理解に大いに役に立つものと考えられる。また、強力な界面研究手段となるブロードバンドSFG分光法は環境化学の界面計測のみならず、表面化学、表面物理や生物学などの広い研究分野の研究にも貢献できるものと考えている。

本研究では、研究費の支援に加え、ポストドクター(PD)を雇えることが実に素晴らしい制度である。どんな大きな研究装置であっても、操作する人間がいないと、無駄となってしまふ。有効に研究費を利用するために、人的な資源の確保は非常に大事である。自分の研究グループでは、二名のPDが約2年間研究に参加でき、研究の推進に重要な役割を果たした。PDらの次の進路も心配されるので、結局三年の研究期間中で、安心して研究できる期間は、多くても二年しかないことは、少し残念なことでもある。

## 6. 研究総括の見解：

本課題は、新しい環境ホルモンの計測システムとして社会的ニーズの高いことから採択された。高度の分光学的手法である和周波発生法を用いることで鋭い表面選択性と高い感度を実現しようとしたものである。

当初は環境ホルモンへの適用をターゲットとしていたが、環境ホルモンの作用機序は複雑であり、一般化した広い視点での検討にシフトすることになった。すなわち生体膜表面の分子レベルでの高感度計測である。この方針変更は適切であり、測定法として広い概念のもとに研究を進めており、成果も十分評価できる。今後本法をさらに発展させ、実際の生体表面・界面構造解析法として完成させることを期待する。この方法によって得られる表面・界面構造変化の情報は、多くの界面現象に関する非常に貴重なものである。

## 7. 主な論文等：

### 原著論文

1. Li, G.; Morita, S.; Ye, S.; Tanaka, M.; Osawa, M. Quartz Crystal Microbalance and Infrared Reflection Absorption Spectroscopy Characterization of Bisphenol A Absorption in the

Poly(acrylate) Thin Films, Anal Chem., 2004, 76, 788 ? 795.

2. Ye, S.; Noda, H.; Nishida, T.; Morita, S.; Osawa, M. Cd<sup>2+</sup>-Induced Interfacial Structural Changes of Langmuir-Blodgett Films of Stearic Acid on Solid Substrates: A Sum Frequency Generation Study, Langmuir, 2004, 20, 357 ? 365.
3. Morita, S.; Ye, S.; Li, G.; Osawa, M. Effect of Glass Transition Temperature on the Absorption of Bisphenol A in Poly(acrylate)s Thin films, Vibrational Spectroscopy, 2004, 35, 15-19.
4. Miki, A.; Ye, S.; Senzaki, T.; Osawa, M. Surface-enhanced infrared study of catalytic electro-oxidation of formaldehyde, methyl formate, and dimethoxy-methane on platinum electrodes in acidic solution, J. Electroanal. Chem., 2004, 563, 23-31.
5. Ye, S.; Morita, S.; Li, G.; Noda, H.; Tanaka, M.; Uosaki, K.; Osawa, M. Structural Changes in Poly(2-methoxyethyl acrylate) Thin Films Induced by Absorption of Bisphenol A: an Infrared and Sum Frequency Generation (SFG) Study, Macromolecules, 2003, 36, 5694 - 5703.
6. Abe, M.; Michi, T.; Sato, A.; Kondo, T.; Zhou, W.; Ye, S.; Uosaki, K.; Sasaki, Y. Electrochemically Controlled Layer-by-Layer Deposition of Metal Cluster Molecular Multilayers on Gold, Angew. Chem. Int. Ed., 2003, 42, 2912-2915.
7. Chen, Y.X.; Miki, A.; Ye, S.; Sakai, H.; Osawa, M. Formate, an Active Intermediate for Direct Oxidation of Methanol on Pt Electrode, J. Am. Chem. Soc., 2003, 125, 3680-3681.
8. Ye, S.; Li, G.; Noda, H.; Uosaki, K.; Osawa, M. Characterization of Self-Assembled Monolayers of Alkanethiol on GaAs Surface by Contact Angle and Angle-resolved XPS Measurements, Surf. Sci., 2003, 529, 163-170
9. Ye, S.; Noda, H.; Morita, S.; Uosaki, K.; Osawa, M. Surface Molecular Structures of Langmuir-Blodgett Films of Stearic Acid on the Solid Substrate Studied by Sum Frequency Generation Spectroscopy, Langmuir, 2003, 19, 2238-2242.
10. Quayum, M. E.; Ye, S.; Uosaki, K. Mechanism for Nucleation and Growth of Electrochemical Palladium Deposition on an Au (111) Electrode, J. Electroanal. Chem., 2002, 520, 126-131
11. Miyake, H.; Ye, S.; Osawa, M. Electroless deposition of gold thin films on silicon for surface-enhanced infrared spectroelectrochemistry, Electrochem. Comm., 2002, 4, 973-977
12. Miki, A.; Ye, S.; Osawa, M. Surface-enhanced IR absorption on Pt nanoparticles: an application to real-time monitoring of electrocatalytic reactions, Chem. Commun., 2002, 1500-1501

#### 解説 総説

1. Ye, S.; Uosaki, K. "Atomically Controlled Electrochemical Deposition and Dissolution of Noble Metals" in Encyclopedia of Electrochemistry (ed. Bard, A. J.), Vol. 1, (eds. Gileadi, E.; Urbakh, M.), Wiley-VCH, Weinheim, 471-512, 2002.
2. 叶深、魚崎浩平、SFG計測、ナノテクノロジーハンドブック、II編 観る、3章 短パルスナノ光で観る、69-74、オーム社、2003年
3. 叶深、大澤雅俊、和周波発生(SFG)による有機薄膜の界面分子構造の研究、表面科学, 2003, 24, 740-746.
4. 叶深、大澤雅俊、魚崎浩平、和周波発生(SFG)による水素終端 Si 表面の研究、真空、印刷中
5. 魚崎浩平、叶深、和周波発生(SFG)による固液界面における水分子の構造評価、真空、印刷

中

#### 招待講演

##### 国際

1. Ye, S.; Noda, H.; Morita, S.; Nishida, T.; Osawa, M. Interfacial Structure and Stability of Langmuir-Blodgett Films on Solid Substrates Studied by Sum Frequency Generation (SFG), The 10th International Conference on Organized Molecular Film, Beijing, 2003/10/6 ~ 11 (キーノート講演)

##### 国内

1. 叶 深、ブロードバンドSFG 分光測定による LB 膜の界面分子構造の解析、名大物質国際研ワークショップ 和周波混合分光法、名古屋、2003/3/13 ~ 14 (講演)
2. 叶 深、和周波発生法による H-Si(111)の Si-H 結合の安定性の研究、2003 年日本物理学会年会、仙台、2003/3/28 ~ 30 (依頼講演)
3. 叶 深、和周波発生(SFG)分光法による超親水 TiO<sub>2</sub>表面における分子構造の研究、第3回光触媒研究討論会、東京、2003/7/7 (招待講演)
4. 叶 深、非線形振動分光法による界面分子構造の研究、2003 年電気化学秋季大会、札幌、2003/9/11 ~ 12 (依頼講演)
5. 叶 深、和周波発生 (SFG) 分光法による固液界面分子構造に関する研究の進展、2003 年電気化学秋季大会、札幌、2003/9/11 ~ 12 (招待講演)

#### 学会発表

##### 国際

1. Ye, S.; Noda, H.; Morita, S.; Nishida, T.; Osawa, M. Outmost Layer Structure of Langmuir-Blodgett Films on the Solid Substrate Investigated by SFG, The 2nd International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS-2), 2003/8/24 ~ 29, Nottingham, UK (口頭発表)
2. Morita, S.; Noda, H.; Ye, S.; Osawa, M.; Uosaki, K. Sum Frequency Generation (SFG) Study on the Surface Molecular Structures of Poly(acrylate)s Thin Films, IUPAC World Polymer Congress 2002, 2002/7/7 ~ 12, Beijing, China (ポスター発表)

ほか 9 件

##### 国内

1. 叶 深、野田浩之、森田成昭、大澤雅俊、ブロードバンド和周波発生 (SFG) 分光測定による固体表面に構築する有機単分子層の構造研究、2001 年分子構造総合討論会、2001/9/24、札幌 (口頭発表)
2. 森田成昭、野田浩之、田中賢、叶 深、下村政嗣、大澤雅俊、和周波発生(SFG)分光法を用いた poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) 薄膜の表面分子構造研究、第 51 回高分子学会年次大会、2002/5/30、横浜 (口頭発表)

ほか 25 件

特許出願

1. 叶 深、森田成昭、簡易ビスフェノールA センサーおよび微量ビスフェノールA の検出方法、  
出願日 2003/11/19、出願番号 特願 2003-389078