

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：57101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05849

研究課題名(和文) 会合発光色素のレクチンへの可逆的な結合・解離に基づく生体蛍光検出

研究課題名(英文) Fluorescence Detection of Saccharide Based on a Complexation between Aggregate Emission Dye and Lectin

研究代表者

石井 努 (Ishi-i, Tsutomu)

久留米工業高等専門学校・生物応用化学科・教授

研究者番号：60346856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、会合発光性色素とレクチンとの複合体形成を鍵とする糖質の蛍光検出を検討した。糖質部を導入した会合発光性ドナー・アクセプター色素に対し、糖質結合タンパク質であるレクチンに結合させることで、会合発光からモノマー消光への変化が生じた。次に、標的糖質を添加することで、本レクチン複合体からドナー・アクセプター色素の解離が進行し、会合発光の回復に成功した。以上の成果より、会合からモノマーへの解離を経て会合体を再形成する系の構築に成功することで、大きな発光変化による糖質蛍光検出の可能性を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、レクチンを用いる糖質蛍光検出に、会合発光というアイデアを付与することで、単純で合理的な戦略を提案している。単純な色素基盤とレクチンとの複合体を用いて、蛍光 OFF-ON 変化で糖質を検出する基礎的な研究内容であるが、レクチン-糖質の組合せに留まらず、抗原-抗体等の様々な生体アフィニティー系での蛍光検出の可能性を秘めた研究でもあり、基礎から応用までの一貫した研究の基盤を確立できる。

研究成果の概要(英文)： In this study, we report fluorescence detection of saccharide based on a complexation between aggregate emission dye and lectin. The dye bearing a saccharide moiety, which is fluorescent in the aggregate state, indicates a fluorescence quenching in the monomer state after the complexation with lectin. In contrast, an emission recovery could be achieved by treatment with target saccharide, as a result of the dissociation of the complex between dye and lectin, and the subsequent aggregate formation of dye molecules. The present exchange between aggregate emission and monomer quenching can be applied to the fluorescence detection of target saccharide.

研究分野：有機機能物性化学 有機構造化学 有機光化学

キーワード：発光 会合 ドナー・アクセプター 糖質 レクチン 生体検出

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖質は生命活動で重要な役割を担っており、細胞表面に存在する糖質は細胞を見分けるための目印として機能し、また代表的な糖質であるグルコースは糖尿病診断のマーカーとなっている。このため、糖質を検出することは生命活動の解明に留まらず、疾病診断において非常に重要である。現在、糖質検出用のプラットフォームとして糖質結合タンパク質であるレクチンが注目されている。特に、レクチンを用いた蛍光検出は、迅速かつ高感度な糖質センシング技術となりえる。本蛍光検出への展開では、レクチンへの標的糖質の結合前後で、発光特性を大きく変化させることが必須のため、レクチンもしくは標的糖質に特殊な化学修飾を施し、光誘起電子移動や蛍光共鳴エネルギー移動を発現させる複雑な戦略がとられている¹。このため、化学修飾を回避し、単純で合理的な戦略が望まれる。

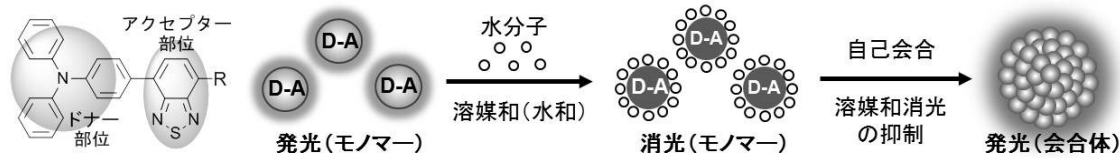


図1. ドナー・アクセプター色素 (D-A) の自己会合による水系発光システム

先に当研究室では、アクセプター性ベンゾチアジアゾールとドナー性トリフェニルアミンとを連結した一連のドナー・アクセプター色素群が、水系極性環境下で効率的な赤色発光を与えることを見出している² (図1)。本色素は、ドナー・アクセプター特性に起因して通常水系高極性環境下で溶媒和によりモノマー状態で消光しているが、疎水性相互作用を主な駆動力として会合体を形成することで溶媒和を抑制し発光を発現できる。この知見を発展させることで、レクチンと結合した時はモノマー消光状態で存在し、標的糖質がレクチンと結合し解離された後、発光性の会合体として存在するように変化するドナー・アクセプター会合発光色素を設計開発すれば、新たな糖質検出システムが誕生するはずである (図2)。

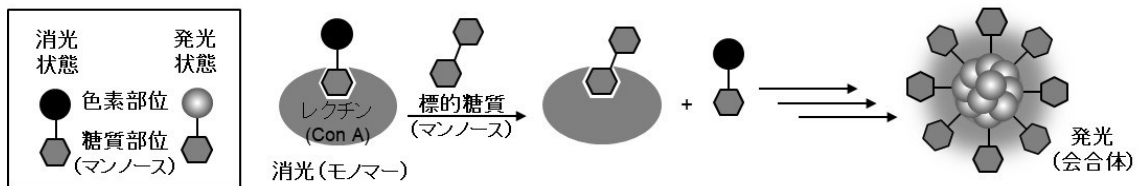


図2. ドナー・アクセプター色素の会合発光による糖質蛍光検出

2. 研究の目的

本研究では、モノマー状態で消光し、会合状態で発光するドナー・アクセプター蛍光色素に着目し、本色素のレクチン複合体を用いた糖質の蛍光検出を目的とした。まず、当研究グループが開発した会合発光性ドナー・アクセプター色素に糖質部を導入し、糖質結合タンパク質であるレクチンに結合させることで、モノマー消光状態を発現させる。次に、本レクチン複合体に対し標的糖質を結合させ、ドナー・アクセプター色素を解離させる。その結果、解離した色素がモノマー消光から会合発光に変わる「蛍光 OFF-ON 変化」を評価することで、糖質の蛍光検出に挑戦した。

3. 研究の方法

本研究では、会合発光色素のレクチンへの可逆的な結合・解離に基づく糖質の蛍光検出をする。検出対象として広く研究され情報収集が容易なコンカナバリン A (Con A) とマンノース誘導体との組合せに着目した (図2)。以下の項目に従い、研究を遂行する。

(1) マンノース部位を有するドナー・アクセプター色素の合成と発光特性評価: マンノース部位を導入した種々のドナー・アクセプター色素を合成し、それらのモノマー消光及び会合発光特性を評価し、以下の糖質蛍光検出の基礎データを収集する。

(2) コンカナバリン複合体の発光特性評価: 上記で合成したドナー・アクセプター色素と Con A との複合体を構築する。ここでは、Con A との複合体形成によりドナー・アクセプター色素部位の会合が抑制され、その結果、モノマー状態と同様に消光が発現することを確認する。

(3) マンノース誘導体の蛍光検出: 上記で構築した Con A 複合体に標的マンノースを作用させ、結合力の差に基づきマンノース部位を有するドナー・アクセプター色素を解離させる。解離後、疎水性向上により会合体が構築され、強い蛍光を発することを確認する。その結果、消光から発光に変わる「蛍光 OFF-ON 変化」により、標的マンノースを検出する。

4. 研究成果

マンノース部位を導入した種々の会合発光性ベンゾチアジアゾール・トリフェニルアミン蛍光色素を合成し、レクチン・Con A との複合体による糖質蛍光検出について検討した。これらの色素が、モノマー状態で消光を示し、一方会合状態で発光することを見出した。つまり、マンノース導入後も、母体蛍光色素固有の会合発光特性を維持しており、レクチンと複合体を形成させた後、目的糖質の蛍光検出に展開できる可能性を確認できた。

次に、マンノース特異性を有する Con A との複合体形成を検討した。色素 **1** では複合体を確認することはできなかった。マンノース部位と色素部位が接近しているため、立体障害により Con A 結合サイトへのマンノース部位の結合が難しいためである。そこで立体障害を回避するため、マンノース部位と色素部位の間にヘキサエチレングリコール・スパーサー部位を導入した色素 **2** を別途合成した。その結果、本色素 **2** と Con A とが結合した複合体の形成に成功した。しかしながら、予想に反して Con A との結合により、発光強度の向上が認められた。つまり、マンノース部位の結合により、色素部位はモノマー状態として親水性環境に放出されたのではなく、色素部位が自己集合した状態で Con A との結合が進行していた。色素部位の高い疎水性に起因した結果である。

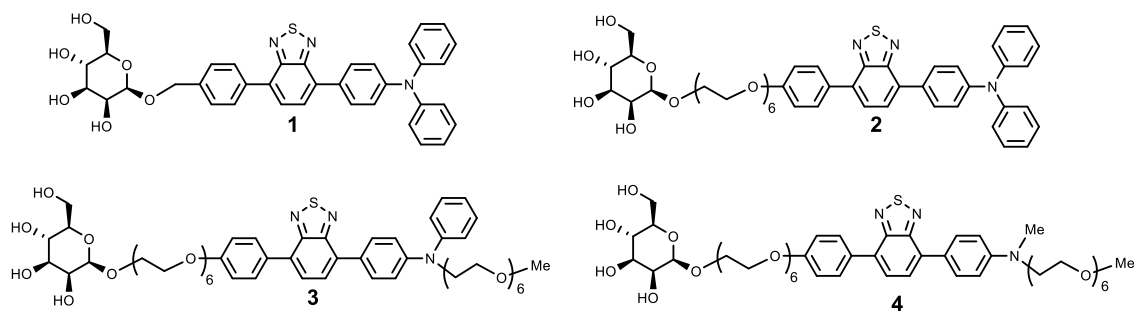


図3. マンノース部位を有するドナー・アクセプター蛍光色素

次に、色素の親水性向上により、会合体の安定性を低下させることで、レクチンとの結合によりモノマーへの解離を促進させる戦略を実施した。ドナー性アミン部位ヘキサエチレングリコール鎖を導入した色素 **3** を検討し、Con A 添加により蛍光強度の低下を示すことを見出した。更に、マンノース誘導体の添加により、蛍光強度の向上が確認できた。本結果は、Con A との複合体形成により会合体の解離が進行した後、マンノース誘導体が Con A と結合することで、遊離された色素が会合し発光したことを示唆している。しかし、一連の発光変化での顕著な発光変化は達成できなかった。そこで、親水性及び疎水性の調整に基づく戦略で、大きな発光変化を示す糖質蛍光検出システムの構築について検討した。

色素 **3** に対し、アミン部位のフェニル基をメチル基に置換した色素 **4** を合成した。本系では、Con A 添加により蛍光強度の大きな低下を示し、本強度低下は色素 **3** と比較して1桁以上大きな値を示した。更に、マンノース誘導体の添加により、蛍光強度の回復も認められた。以上の結果より、立体的に小さなドナー部位に起因した会合体形成能力の低下により、Con A 及びマンノース単量体の一連の添加過程において、会合体からモノマーへの解離を経て会合体を再形成する系の構築に成功した。その結果、大きな発光変化による糖質蛍光検出の可能性を見出すことができた。本系は母体色素固有の発光特性が低いという短所を有しているが、今後高い発光特性を有する母体色素の開発により、糖質蛍光検出が大きく前進できると確信する。

<引用文献>

- 1 Y. Koshi, E. Nakata, H. Yamane, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10413
- 2 T. Ishi-i, K. Ikeda, Y. Kichise, M. Ogawa, *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 1553; T. Ishi-i, I. Kitahara, S. Yamada, Y. Sanada, K. Sakurai, A. Tanaka, N. Hasebe, T. Yoshihara, S. Tobita, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 1818; T. Ishi-i, K. Ikeda, M. Ogawa, Y. Kusakaki, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 89171; 石井努, 有機合成化学協会誌, **2016**, *74*(8), 781.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsutomu Ishi-i, Taishi Nakanishi	4. 巻 9
2. 論文標題 pH-Responsive Fluorescence Change Based on Dynamic Exchange between Emitting Aggregate and Quenching Monomer in Donor-Acceptor Dyes bearing Carboxylic Groups	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 1165-1173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） org/10.1002/ejoc.201800025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤智紀・古賀早和子・石井努
2. 発表標題 ドナー・アクセプター型蛍光色素のレクチン複合体形成と会合発光特性変化
3. 学会等名 日本化学会第 99 春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井努
2. 発表標題 ドナー・アクセプター共役分子における発光特性の探索
3. 学会等名 先端有機化学講演会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石井努
2. 発表標題 ドナー・アクセプター型蛍光色素の新規特性を探索する
3. 学会等名 2nd Symposium on New Trends of Nano- or Bio-Materials Design in Supramolecular Chemistry（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 樋口壘也斗・古賀早和子・石井努
2. 発表標題 ドナー・アクセプター型蛍光色素のレクチン複合体形成による発光特性変化
3. 学会等名 日本化学会第 98 春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井努
2. 発表標題 超分子会合による水系長波長発光システムの構築
3. 学会等名 有機合成化学協会中国四国支部パネル討論会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤智紀・古賀早和子・石井努
2. 発表標題 会合性ドナー・アクセプター型蛍光色素によるレクチン検出システムの構築
3. 学会等名 第 60 回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

久留米工業高等専門学校生物応用化学科石井研究室ホームページ
<http://www.cc.kurume-nct.ac.jp/~ishi-i/world/index.html>

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
連携 研究者	萩原 義徳 (Hagiwara Yoshinori) (10628548)	久留米工業高等専門学校・生物応用化学科・准教授 (57101)	