

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14041

研究課題名(和文) 蛍光を利用した分子認識ゲート膜の高感度化およびアウトプットの可視化

研究課題名(英文) Fluorescence-based enhancement of sensitivity and visualization of output in molecular recognition gating membranes

研究代表者

菅原 勇貴 (Sugawara, Yuuki)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：10814791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シクロデキストリン(CD)を側鎖に有する感温性ポリマーに蛍光色素分子であるベンゾキサジアゾール(BD)を共重合することで、これまで知られていた分子認識による凝集温度のシフトではなく、ポリマー鎖の凝集抑制という新奇な現象を見出した。計算化学的解析により、CD内部へのBDの包接で架橋構造が形成したために当現象が発現したと推察された。さらに蛍光色素の認識を駆動力とする当現象を膜型センシング材料へと展開した。膜細孔内に2本鎖DNAを側鎖に有する感温性ポリマーを固定化し、DNAの塩基対間に蛍光色素を挿入しDNAの分子間反発を切り替えることで、膜細孔の開閉を誘起することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義として、CDを分子認識部位として有する感温性ポリマーにおいて、従来のような凝集温度のシフトではなく、分子認識による凝集抑制という新奇な現象を発見でき、当分野に新しい提案を行えた。また分子認識ゲート膜の系では、分子認識部位であるDNAの蛍光色素の認識により膜の透過性変化を誘起することに成功し、高感度センシングデバイスへの応用可能性を実証した。社会的意義としては、今後の更なる研究を通して、在宅医療で用いる簡便な検査キットへの応用が期待され、将来の医療問題の解決に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A novel phase transition phenomenon was uncovered by copolymerization of benzoxadiazole (BD) to a thermoresponsive polymer bearing cyclodextrin (CD). The novel phenomenon exhibited the inhibition of polymer aggregation by molecular recognition, whereas the conventional phenomenon induces the shift of aggregation temperature. Computational chemistry analysis indicated that the novel phenomenon resulted from formation of noncovalent cross-linking via inclusion of BD into CD cavity. Moreover, the fluorophore-driven polymer aggregation phenomenon was further applied to membrane-type sensing materials. A thermoresponsive polymer bearing double-stranded DNA as molecular recognition moiety was immobilized onto the surface inside of membrane pores. When DNA inside the membrane recognized intercalating fluorophores between DNA base pairs, the pores of the membrane opened because repulsion forces between DNA strands was rendered, leading to polymer aggregation.

研究分野：分子認識材料

キーワード：蛍光 感温性ポリマー 分子認識 シクロデキストリン 包接 DNA 凝集 エントロピー反発

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

少子超高齢化社会の到来による医療需要の増大や、高い感染性を有する新規ウイルス性感染症の流行などにより医療資源および医療人材の不足が懸念されている。従って今後の社会では診断や治療を医療機関ではなくできる限り自宅で行う分散医療・在宅医療が極めて重要となる。例えば、疾病の診断のための検査を在宅により被検者自らが実施することで、通院による院内感染を予防し、また医療人材の節減を期することが可能である。そのため、誰にでも簡単に扱うことが可能な、陽性/陰性を迅速に判定するための検査デバイスの開発が求められている。

「分子認識ゲート膜」は、特異的な分子認識により物質を選択的に透過させる生体膜から着想を得た人工膜である。当膜はアクチュエーターとして感温性ポリマーが多孔質基材の細孔内部に固定されており、そのポリマー分子内に組み込まれたレセプターが標的分子を認識することでアクチュエーターが膨潤/収縮の運動を起こし細孔が開閉する。その細孔開閉に要する時間はおよそ 30 秒であり、短時間で迅速な診断が可能である。したがって、分子認識ゲート膜は在宅医療で求められている誰にでも簡便に実施可能な検査デバイスとして有望である。

これまでに本研究グループでは、アビジン-ビオチン間の分子認識を利用した分子認識ゲート膜による蛋白質の検出に初めて成功し^[1]、また DNA とタンパク質の特異的な認識を利用した血管に関わる疾患のマーカー蛋白質の検出にも成功したが^[2]、現状では検出感度が低いことが課題である。また、これまでは分子認識ゲート膜細孔の開閉状態を膜の水透過性として観測しており、透過装置に圧力計や流速計といった機器が必要で、さらに検査に長時間を要した。そのため、分子認識ゲート膜の高感度化と簡便なアウトプット法の開発が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究課題は、分子認識ゲート膜の高感度化と検出の簡便化を蛍光色素によって行う。当蛍光色素は分子近傍の環境が親水性から疎水性に変化することで蛍光強度が増加する性質を持ち、膜細孔内に固定化したアクチュエーターである感温性ポリマーの膨潤/収縮挙動を追跡可能である。細孔の開閉を蛍光の強度変化としてアウトプットすることで、標的分子の有無の情報を蛍光で高感度に、また目視で簡便に検出可能であることを実証する。

3. 研究の方法

本研究課題では、以下の 2 種類の系において、分子認識と蛍光色素を利用した感温性ポリマーの膨潤/収縮挙動の調査研究を実施した。

(1) シクロデキストリンをレセプターとしたアクチュエーター/レセプター/蛍光色素ターポリマーの標的分子認識挙動

まず溶液中の直鎖ポリマーにおいて、分子認識による感温性ポリマーの応答に対する蛍光色素の効果を調査するため、レセプターと蛍光色素分子がアクチュエーターである感温性ポリマーと共重合されているターポリマーを用いることにした。レセプターとして、アダマンタン誘導体やナフタレン誘導体などの脂肪族および芳香族低分子化合物を疎水性空洞内に包接することが可能な環状オリゴ糖である β -シクロデキストリン (CD) を選択し、蛍光色素として 4-*N*-(2-acryloyloxyethyl)-*N*-methylamino-7-*N,N*-dimethylaminosulfonyl-2,1,3-benzoxadiazole (BD) を選択した。感温性ポリマーとして *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) のポリマーを用いて Figure 1 に示すようなターポリマーを設計し、標的分子を添加した際のターポリマーの示す挙動を分析することでポリマーの膨潤/収縮挙動への蛍光色素の効果を考察した。

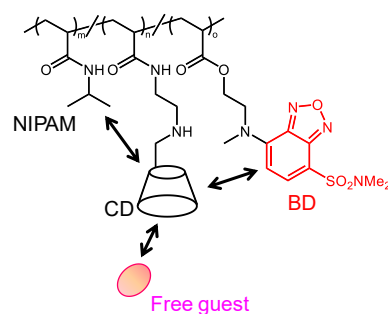


Figure 1 NIPAM, CD, BD から成るターポリマー。

(2) DNA をレセプターとした分子認識ゲート膜の蛍光色素分子認識挙動

さらに、上記の溶液中でのリニアポリマーでの調査研究に続いて、蛍光色素分子とレセプターを利用した現象を分子認識ゲート膜のナノ細孔内ポリマーの系へと展開した。ここでは将来的な検査ツールとしての応用を考慮し、感温性ポリマーと組み合わせるレセプターとして、CD と比較してより多様な標的分子を捕捉することが可能なデオキシリボ核酸 (DNA) に着目した。そして DNA と蛍光色素の分子認識を利用した膜細孔ゲートの開閉および蛍光色素の検出を目指し、Figure 2 に示すような 2 本鎖 DNA をポリマー鎖

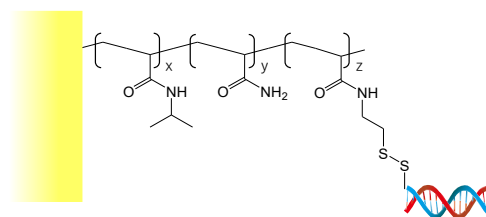


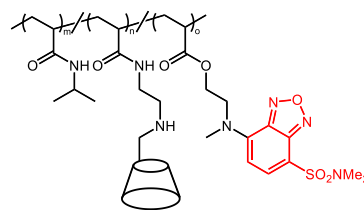
Figure 2 膜細孔内に固定化した 2 本鎖 DNA グラフト感温性ポリマー。

にグラフトしたポリマーを設計し、膜基材細孔の内壁に固体化した。そして当膜細孔内に2本鎖DNAの塩基対間に挿入される性質を持つ蛍光色素である臭化エチジウム (EtBr)を透過させ、ポリマーにグラフトしたDNAがEtBrを分子認識することで誘起される膜細孔の開閉挙動を観察した。

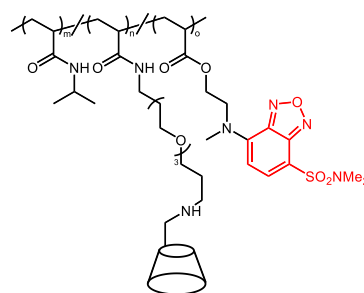
4. 研究成果

(1) シクロデキストリンをレセプターとしたアクチュエーター/レセプター/蛍光色素ターポリマーの標的分子認識挙動

今回は主鎖からCDまでのスペーサー長さの異なる2種類のターポリマーを用いた。Figure 3に構造を示す2種類のターポリマーをフリーラジカル重合により合成し、GPC、NMRで評価した。Table 1にそれぞれのキャラクタリゼーション結果を示す。また、合成したターポリマーの溶液に365nmの光を照射するとFigure 4に示すような緑色蛍光が観察されたことから、蛍光色素BDが共重合されていることが確認された。



1



2

Table 1 ターポリマー1と2のキャラクタリゼーション結果

Terpolymer	Copolymerized monomer ratio ^a (mol%)			M_n^b (g mol ⁻¹)	D^b
	NIPAM	CD	BD		
1	95.1	2.7	2.2	9.8×10^3	1.8
2	90.2	4.7	5.1	1.2×10^4	1.9

^aNMRにより決定。^bGPCにより測定。

続いて合成したターポリマーの分子認識挙動を観察した。レセプターであるCDの空洞内部に包接される性質を持つ2-naphthalenesulfonate (2-NS)を添加しターポリマー内のCDに包接させた。そして水溶液中でのターポリマーの膨潤/収縮挙動を吸光度測定により調査した。その結果をFigure 5に示す。ターポリマーは低温では膨潤し溶解しており水溶液は透明である。温度を上昇させることでターポリマーが収縮し溶液に不溶となり、ポリマー分子同士の凝集が起こり溶液は濁るため吸光度は増加する。Figure 5aに示すターポリマー1では、標的分子である2-NSの添加により高温領域での吸光度の増加が見られなくなり、ポリマーの凝集が抑制された。またFigure 5bに示すターポリマー2の場合も同様に2-NSの添加により凝集が抑制された。当CDおよびBDを有する感温性ターポリマーは、Figure 6aに示したような

Figure 3 本研究で調査したターポリマー1および2の構造。

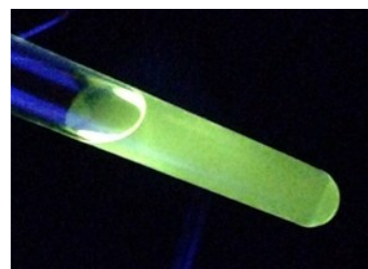


Figure 4 ターポリマー1溶液の蛍光。

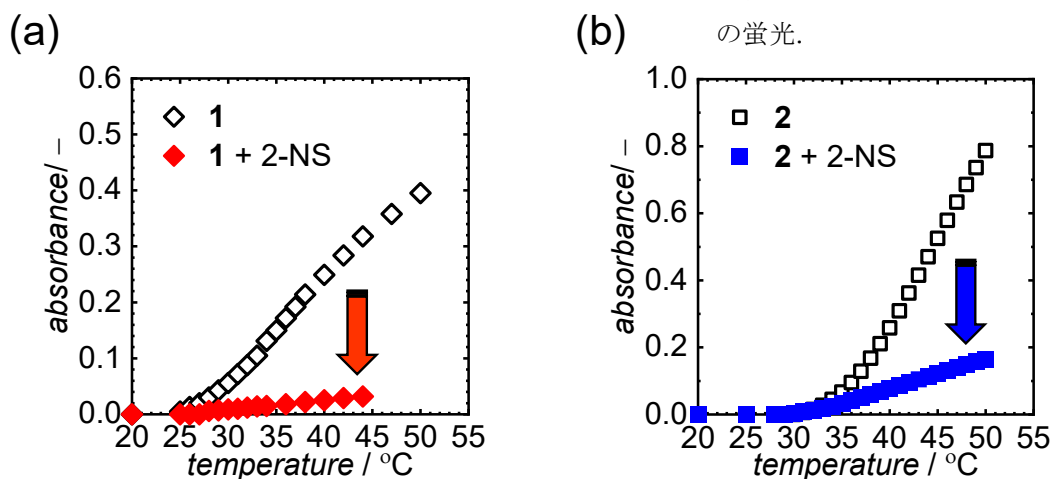


Figure 5 ターポリマー(a) 1および(b) 2の分子認識挙動。

従来の CD 含有感温性ポリマーが見せた分子認識による凝集温度のシフト^[3]ではなく、ポリマー鎖の凝集抑制という前例のない分子認識挙動を発現した。以上のように本研究課題では、CD および BD を有する感温性ターポリマーが見せる新現象を見出した。

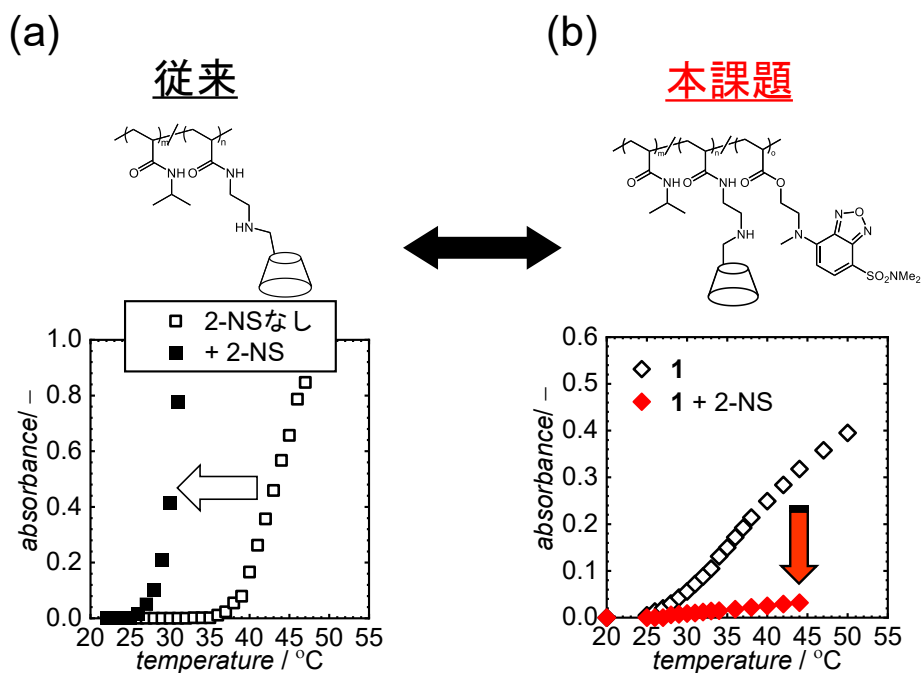


Figure 6 従来の現象(a)^[4]と本研究課題で発見した新現象(b)の比較。

上記のような前例のない新現象を見出したため、当初の計画を変更し、続いて上記の新現象の分子認識挙動に関して、凝集温度のシフトではなく凝集抑制を誘起する主要因を解明するための調査を行った。まず蛍光偏光法を用いた分子間相互作用の分析により、CD と BD の分子間で非共有結合性の相互作用が働いていることが示され、その結合定数は $6 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ と推算された。そして BD の疎水的な芳香環と水素結合可能な N, O, などのヘテロ原子を含む化学構造から、CD の疎水的空洞内に BD が包接されており錯体を形成している可能性が推察された。そこで、計算化学的手法を用いて CD と BD の錯体の再安定構造を推測した。ソフトウェア Gaussian を用いて分子軌道法と密度汎関数法による構造最適化計算を実施した結果、Figure 7 に示すように BD 分子が CD 内部に包接され、BD のトシル基の酸素原子と CD の 2 位の OH 基が水素結合で相互作用し構造が安定化していることが示唆された。以上のことから、ターポリマーに共重合された CD と BD との分子認識により、非共有結合的にターポリマー分子内や分子間で架橋構造が形成されると考えられる^[4]。そして標的分子 2-NS の存在しない状態での架橋構造の形成により、ターポリマーの溶解性ないし運動性が低下して容易に凝集しやすい環境にあると推測される(Figure 5 ◇および□)。一方 2-NS を添加すると、標的分子 2-NS と CD との錯体定数が $2 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ で BD より値が大きく CD とより強く相互作用する。よって 2-NS の添加により錯体の交換反応が起こり、CD に 2-NS が包接されると同時に BD は CD から脱着することで架橋構造は解消されると考えられ、分子の運動性ないし溶解性が增大すると考えられ、凝集がしにくくなる(Figure 5 ◆および■)。以上のように、蛍光色素 BD の存在に起因する架橋構造の形成が要因となって従来とは異なる分子認識現象が発現したと推察される。

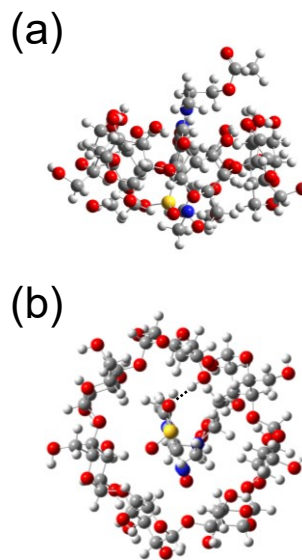


Figure 7 構造最適化計算で得られた CD-BD 包接錯体の再安定構造。(a) Side view and (b) top view. 原子はそれぞれ灰:炭素, 白:水素, 赤:酸素, 青:窒素, 黄:硫黄を表す。

(2) DNA をレセプターとした分子認識ゲート膜の蛍光色素分子認識挙動

続いて、レセプターによる蛍光色素分子認識を利用した現象を分子認識ゲート膜の細孔内

リマーの系へと展開した。プラズマ重合によりポリエチレン基材細孔内部にNIPAMから成るポリマーを固定化し、レセプターとして11塩基対からなる2本鎖DNA分子をgrafting to法により上記細孔内ポリマーにグラフトすることで、分子認識ゲート膜を作製した。当膜の細孔にDNAの塩基対間に挿入される性質を有する蛍光色素であるEtBrを透過させ、温度を変化させながら膜の水透過性を測定し細孔の開閉状態を観察した。その結果、Figure 8に示すように低温ではEtBrの有無で細孔の水透過性に差は見られなかったが、32℃まで昇温させるとEtBrを添加した場合に透過性が大きく増加した。

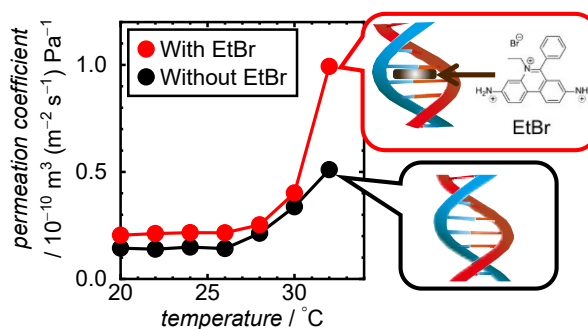


Figure 8 グラフト DNA の EtBr 認識による分子認識ゲート膜の透過性変化。

当結果は以下のように説明される。この透過性の増加は細孔内の固定化ポリマーの凝集に起因しており、ポリマー鎖同士の反発力の変化で凝集に差が生じたためと考えられる。32℃以下の温度ではグラフト DNA のリン酸基の荷電に由来する静電反発のため凝集が抑えられているが、EtBr が DNA の塩基対間に挿入されていると、DNA の荷電が遮蔽され静電反発が低下すると同時に DNA 鎖の自由度に由来するエントロピー反発がより効くようになる。そして昇温によりエントロピーの寄与が徐々に有利になり、32℃付近に達すると凝集抑制の駆動力が静電反発からエントロピー反発に切り替わる。2本鎖 DNA のエントロピー反発は弱くポリマーの凝集を抑えられないため細孔内固定化ポリマーは凝集し細孔の透過性は上昇した。上記の静電反発からエントロピー反発へと現象の駆動力が切り替わる温度は、溶液中の DNA 固定化リニアポリマーの系で観察された温度と完全に一致している^[5]。以上のように、DNA による蛍光色素分子の認識と分子間反発の駆動力の切り替えを利用し透過性を変化させる新規な分子認識ゲート膜の開発に成功した。

以上の本研究課題の遂行により、CD をレセプターとして有する感温性ポリマーにおいて、CD の分子認識によるポリマーの凝集抑制という従来の現象とは異なる新奇な現象を発見でき、当分野に新しい提案を行えた。また分子認識ゲート膜の系では、レセプターである DNA の蛍光色素分子の認識により膜の透過性変化を誘起することに成功し、高感度センシングデバイスへの応用可能性を実証した。今後の更なる研究を通して、在宅医療で用いる簡便な検査デバイスへの応用が期待され、将来の医療問題の解決に貢献できると考えられる。

<引用文献>

- [1] H. Kuroki *et al.* *Anal. Chem.*, 83, 9226–9229, (2011); [2] Y. Sugawara *et al.* *Polymer*, 62, 86–93, (2015); [3] H. Ohashi *et al.* *Macromolecules*, 45, 9742–9750 (2012); [4] Y. Sugawara *et al.* *Macromolecules*, 52, 8551–8562, (2019); [5] Y. Sugawara *et al.* *Polym. Chem.*, 5, 4612–4616, (2014).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 菅原勇貴	4. 巻 73
2. 論文標題 光で簡単！ 表面パターンニング-光誘起ニトロキシドラジカル前駆体の開発-	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学	6. 最初と最後の頁 61-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 菅原勇貴	4. 巻 83
2. 論文標題 精密ラジカル重合後末端修飾の最新動向	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学工学	6. 最初と最後の頁 150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Yuuki Sugawara, Takei Toshiki, Hidenori Ohashi, Hidenori Kuroki, Shoji Miyanishi, Takeo Yamaguchi	4. 巻 52
2. 論文標題 Autonomous Shrinking/Swelling Phenomenon driven by Macromolecular Interchain Cross-linking via -Cyclodextrin-Triazole Complexation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Macromolecules	6. 最初と最後の頁 8552-8562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.macromol.9b01627	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 広瀬敏之、菅原勇貴、山口猛央
2. 発表標題 シクロデキストリンと蛍光色素を用いた分子認識ゲート膜の開発
3. 学会等名 日本膜学会第41年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiyuki Hirose, Yuuki Sugawara, Takeo Yamaguchi
2. 発表標題 Molecular recognition property of a thermoresponsive polymer bearing cyclodextrin and hydrophilicity sensitive fluorophore
3. 学会等名 Asian Pacific Conference of Chemical Engineering (APChE2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 菅原勇貴、山口猛央	4. 発行年 2018年
2. 出版社 株式会社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 525 (714-722)
3. 書名 刺激応答性高分子ハンドブック、第5章 第6節 分子認識ゲート膜とその展開	

1. 著者名 Yuuki sugawara and Takeo Yamaguchi	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 25
3. 書名 Biomolecule-recognition Smart Gating Membranes, RSC Smart Materials Series No 35, Smart Membranes	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----