

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655059

研究課題名(和文) デジタル型の応答曲線を示す蛍光性 pH センサーの開発

研究課題名(英文) Digital fluorescent pH sensors

研究代表者

内山 聖一 (Uchiyama, Seiichi)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10401225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000 円、(間接経費) 540,000 円

研究成果の概要(和文)：蛍光特性の変化によって周辺の pH 変化を知らせる蛍光性 pH センサーは、生細胞やマイクロ流路など微小空間の pH 計測に広く利用されている。本課題では、従来の蛍光性 pH センサーと比較して、極めて小さい pH 変化で蛍光応答が完了する、すなわち、デジタル型の応答曲線を示す蛍光性 pH センサー(以後、デジタル型蛍光性 pH センサーと略す)を開発し、その機能発現のメカニズムを解明するとともに一般性を実証した。この全く新しいデジタル型蛍光性 pH センサーによって、これまでに捉えることのできなかつたわずかな pH 変化の検出が可能となった。

研究成果の概要(英文)：An important challenge in developing new chemical ion sensors is to design them with the ability to generate a digital-type output signal that can be used in binary switching systems as highly sensitive ion indicators and in molecular devices. We created digital-type fluorescent pH sensors based on the incorporation of a water-sensitive fluorophore into a pH-responsive polymer and elucidated their functional mechanism.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：蛍光 センサー pH 高分子 機能性材料

### 1. 研究開始当初の背景

これまで申請者は、刺激応答性高分子と環境応答性蛍光団を組み合わせた化学センサーの開発に取り組んできた(内山聖一「ポリアクリルアミド系蛍光センサー」有機合成化学協会誌2010年2月号 p.153-159)。そしてその過程において、いくつかの蛍光性pHセンサーが、1ユニット以下という非常に狭いpH変化に対して鋭敏な蛍光応答曲線(図1)を示すことを偶然見出し、世界初のデジタル型蛍光性pHセンサーとして、その構造と機能を原著論文(S. Uchiyama and Y. Makino "Digital fluorescent pH sensors" *Chem. Commun.* 2009, 2646-2648)および国内外の学会で報告した。この発表は新規性の点から高い評価を得たものの、一方で「一般性が証明されていない」、「どのような場合にデジタル型の応答曲線となるのが不明である」という問題点を外部研究者より強く指摘されていた。そこで今回、平成24年度の1年間に集中的にこれらの問題に取り組み、その解答を得ることによって、デジタル型蛍光性pHセンサーの価値や有用性を広く提唱すべきであると考え、本研究を企画した。

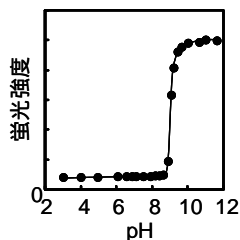


図1 デジタル型蛍光性pHセンサーの蛍光応答

### 2. 研究の目的

蛍光特性の変化によって周辺のpH変化を知らせる蛍光性pHセンサーは、生細胞やマイクロ流路など微小空間のpH計測に広く利用されている。本課題では、従来の蛍光性pHセンサーと比較して、極めて小さいpH変化で蛍光応答が完了する、すなわち、デジタル型の応答曲線を示す蛍光性pHセンサー(以後、デジタル型蛍光性pHセンサーと略す)を開発し、その機能発現のメカニズムを解明するとともに一般性を実証する。この全く新しいデジタル型蛍光性pHセンサーによって、これまでに捉えることのできなかったわずかなpH変化の検出が可能になる。

### 3. 研究の方法

デジタル型蛍光性pHセンサーのモデルとして、N-イソプロピルアクリルアミド(NIPAM)、pH感受性モノマー(ジメチルアミノプロピルアクリルアミド、DMAPAM)、蛍光性モノマー(DBD-AA)からなる共重合体を選択し、各ユニットの構成比が蛍光応答曲線に与える影響を検討する。さらに、機能メカニズムを解明するとともに、機能発現に必要な構造上の条件を明らかにする。続いて、pH感受性モノマーをDMAPAMから、様々な塩基性度(酸性度)を持つ別のモノマーに変更し、

異なったpHで機能するデジタル型蛍光性pHセンサーを揃える。

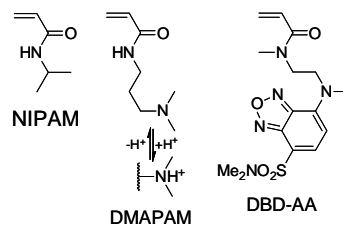


図2 デジタル型蛍光性pHセンサーの材料となるモノマー

具体的な研究法は以下に述べる通りである。

デジタル型蛍光性pHセンサーにおける構成ユニット比と応答曲線の関係解明

…モデルセンサーとして、様々なモル比のNIPAM, DMAPAM, DBD-AAからなる共重合体を合成し、pHを変化させた際の蛍光応答曲線を確認する。これまでに、NIPAMとDMAMの比が9:1であるときにデジタル型の蛍光応答を示すことのみが分かっており、この比を様々な変える事で、機能発現に必要な構造上の条件を明らかにする。

機能メカニズムの解明

…現在のところ、デジタル型蛍光性pHセンサーの機能メカニズムとして次の仮説を立てている。すなわち、pH感受性ユニットにおけるH<sup>+</sup>イオンの結合(解離)によってセンサーの三次元構造が変化し、それとともにpH感受性ユニットの塩基性度(酸性度)が共同的に変化するためだと考えている。そこで、pH感受性ユニット周辺の機能に伴う微環境変化を、環境応答性蛍光団の最大蛍光波長変化(ならびに蛍光寿命変化)から評価し、この仮説を実験的に証明する。

機能能pHの異なるデジタル型蛍光性pHセンサーの網羅的开发

…デジタル型蛍光性pHセンサーを調製する際のpH感受性モノマーをDMAPAMから図3に示すモノマーに変更し、異なるpHで機能を示すデジタル型蛍光性pHセンサーを多数開発する。この際、各モノマーはアクリル酸クロライドと対応するアミンより合成する。本検討により、多用途に適したデジタル型蛍光性pHセンサーの備蓄が可能となり、将来の発展研究に備えることができる。

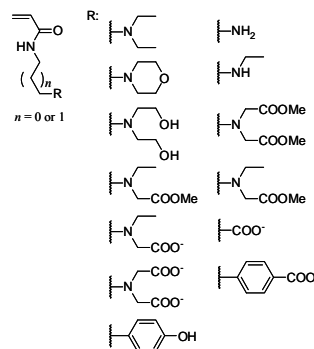
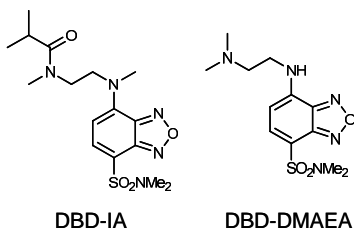


図3 塩基性度(酸性度)の異なるpH感受性モノマーの候補

#### 4. 研究成果

すべての蛍光性 pH センサーは、NIPAM、H<sup>+</sup>イオン認識部位を有するモノマー各種、および蛍光団 DBD-AA を原料として、ラジカル重合法により合成した。pH 変化に対する蛍光性 pH センサーの蛍光応答は、Britton-Robinson 緩衝液を用いて確認した。また、蛍光団のモデル化合物 DBD-IA の蛍光スペクトルを、水と 1,4-ジオキサンの混合液中にて混合比を変えながら測定した。さらに、H<sup>+</sup>イオン認識部位の塩基性を評価するために、類似のジメチルアルキルアミン構造を有する DBD-DMAEA の蛍光強度を、水、メタノール、およびエタノールの混合液中にて、pH を変化させながら測定し、pK<sub>a</sub> 値を算出した。



DBD-IA DBD-DMAEA

図4 モデル化合物の化学構造

はじめに、NIPAM と DMAPAM の原料比を 100 : 0, 95 : 5, 90 : 10, 85 : 15, 80 : 20, 70 : 30, 60 : 40, 50 : 50, 0 : 100 に変化させて共重合体を調整した。得られた共重合体の水溶液に対して pH を変化させながら蛍光応答を確認したところ、pH 感受性モノマーである DMAPAM の原料比が多すぎても、少なすぎても pH の応答性が低下し、原料比 NIPAM : DMAPAM = 90 : 10 の場合に、最も鋭敏な蛍光応答が得られることが分かった(このときに得られる pH センサーを 1 とし、図 5 に示す)。よって以後の検討において、蛍光性 pH センサーを調整する際の原料比は NIPAM : pH 感受性モノマー = 90 : 10 に固定することとした。

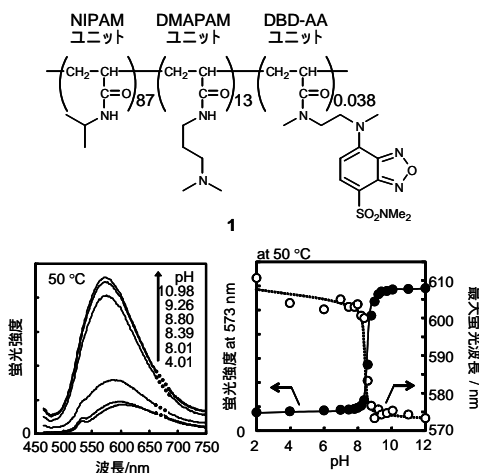


図5 蛍光性pHセンサー1の化学構造と蛍光応答。  
[1] = 0.01 w/v%, Excitation: 450 nm.

図 5 に示すように、蛍光 pH センサー 1 の蛍光

強度は pH8 ~ 9 の範囲で急激に変化した。この蛍光応答を、Henderson-Hasselbalch 式から派生した  $-\log[(FI_{\max}-FI)/(FI-FI_{\min})] = a(pH-pK_a)$  (ただし FI は蛍光強度、添え字は最大値および最小値を表す) に近似したところ、 $a = 3.8 \pm 0.3$  ( $pK_a = 8.7 \pm 0.1$ ) が得られた。通常の  $a = 1$  である蛍光性 pH センサーと比較すると、蛍光性 pH センサー 1 は、H<sup>+</sup>イオン濃度の変化に対して約 20 倍高感度であった。また、pH の上昇に対して、蛍光性 pH センサー 1 の最大蛍光波長は 604 から 573 nm へと大きく短波長シフトした。DBD-IA の蛍光スペクトル測定より、この蛍光波長のシフトは、誘電率に換算して 58 から 7 の変化に相当していた。すなわち、蛍光性 pH センサー 1 は、pH 上昇に伴って三次元構造が変化し、蛍光団近傍の親水性が大幅に低下することを表している。さらに、DBD-DMAEA の三級アミン部位の pK<sub>a</sub> 値は、水中で 8.4 であったのに対し、メタノール 50% 溶液では 7.4、エタノール 50% 溶液では 7.1 まで低下していた(図 6 参照)。これより蛍光性 pH センサー 1 では、蛍光応答に伴う構造変化によって、H<sup>+</sup>イオン認識部位の塩基性も低下していることが裏付けられた。

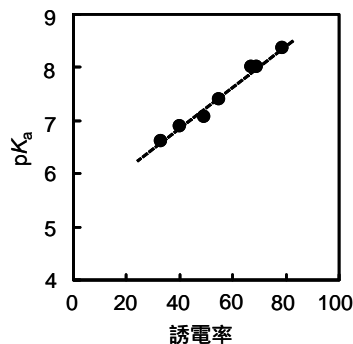


図6 誘電率とDBD-DMAEA の酸性度の関係

次に、異なる pH 応答域を備えた蛍光センサーとして感受性ユニットの異なる 2-6 (図 7) を調整し、蛍光応答を確認した(図 8)。期待通り、わずかな pH 範囲において鋭敏に蛍光強度が変化する蛍光性 pH センサーが得られた。

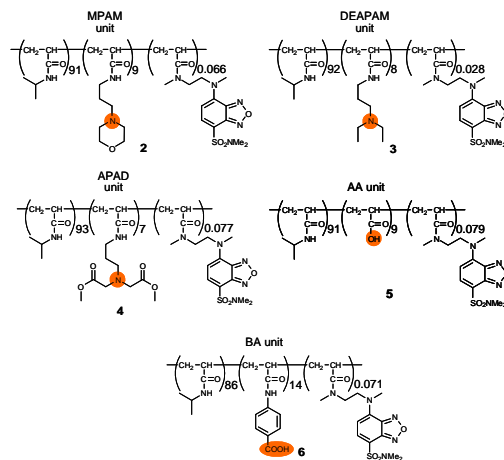


図7 蛍光性pHセンサー2-6の化学構造

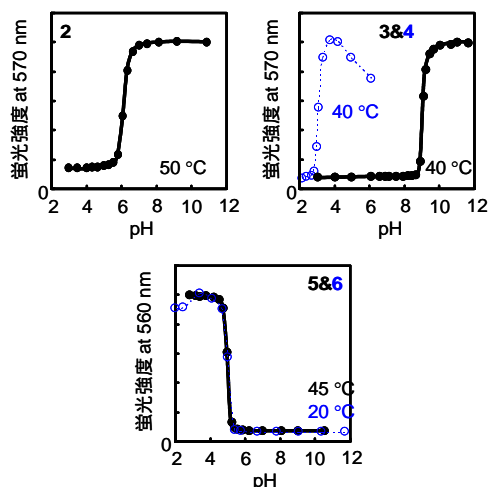


図8 蛍光性pHセンサー2-6の化学構造と蛍光応答.  
[2-6] = 0.01 w/v%, Excitation: 450 nm.

本課題において開発したデジタル型蛍光性 pH センサーは、超高感度な pH 計測に応用できるほか、わずかな化学刺激に大きく応答する観点から分子デバイスとしての利用も考えられる。またその概念は、 $H^+$ の検出に限定するものではなく、 $Na^+$ や  $Ca^{2+}$ イオンなど他のイオンに拡張していくことも可能である。このように分析科学に限らず幅広い研究分野の起点となり得ることも、本研究成果の意義といえる。

#### 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0件)

現在までに論文発表は行っていないが、既に予定していた全実験の遂行、実験データのまとめ・解析が終了しているので、順番を待って論文の執筆を開始する。

〔学会発表〕(計2件)

内山聖一, 片桐嘉美, デジタル型蛍光性 pH センサーの開発, 2013 年光化学討論会, 2013 年 9 月 13 日, 愛媛大学

Seiichi Uchiyama, Yoshimi Katagiri, Digital fluorescent pH sensors: Chemical structure and functional mechanism, International Conference on Photochemistry 2013, 21-26/Jul/2013, Leuven, Belgium

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

内山 聖一 (Uchiyama, Seiichi)  
東京大学・大学院薬学系研究科・助教  
研究者番号：10401225

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：