

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25708023

研究課題名(和文)高機能化した蛍光センサーによる膜近傍のイオン濃度マッピング

研究課題名(英文)Measurement of local ion levels near membranes with fluorescent ion 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) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：新しい蛍光水素イオンセンサーを15種類、蛍光ナトリウムイオンセンサーを5種類合成し、種々のミセル膜近傍の水素イオン濃度、ナトリウムイオン濃度を計測した。その結果、アニオン性ミセルの親水基近傍では、静電効果により水素イオンやナトリウムイオンが局所的に最大約150倍程度濃縮されていることを見いだした。一方、水素イオン濃度については中性ミセルやカチオン性ミセルの親水基近傍や内部において、静電的および疎水的効果により希釈されていることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We synthesized 15 kinds of fluorescent proton sensors and 5 kinds of fluorescent sodium ion sensors having a benzofurazan or an anthracene structure as a fluorophore. Using these novel fluorescent sensors, we measured local ion levels near micelle surfaces. As a result, it was clarified that protons and sodium ions are concentrated near the head groups because of electric interactions in anionic micelles. On the other hand, protons are diluted near the head groups of neutral and cationic micelles due to electric and/or dielectric effects.

研究分野：化学

キーワード：分析試薬 蛍光 センサー 膜 イオン

1. 研究開始当初の背景

細胞膜に代表される膜構造は、独自のナノ環境を創り出す。そしてそのナノ環境を探ることは、生命現象の神秘を解き明かす上で不可避な課題である。例えばそれは、Peter Mitchell が化学浸透圧説によりノーベル化学賞を受賞した 1978 年から 30 年以上にもわたって、脂溶性膜近傍における H⁺イオン濃度勾配が生物エネルギー論の主たるテーマであり続けることにも表れている。また、膜近傍における Na⁺イオン濃度勾配や K⁺イオン濃度勾配の計測は、細胞膜の内外にて選択的な能動輸送を行うとされる Na⁺/K⁺ポンプや K⁺チャンネルの働きをナノメートルスケールの空間分解能で実証し、分子レベルでの機能メカニズムの解明に貢献する。しかしながら、膜近傍における位置依存的なナノ環境の報告は、蛍光プローブを利用した極性勾配に限られており、H⁺、Na⁺、K⁺のようなイオン種の濃度計測は不可能であった。

これに対して申請者らは、2008 年に報告した先行研究(Angew. Chem. Int. Ed., Vol. 47, 2008, pp. 4667-4669)において、膜近傍における位置調節部位を導入した蛍光イオンセンサーを 18 種類合成し、モデル膜であるアニオン性、中性、カチオン性の各ミセル近傍における H⁺イオン濃度計測に成功した。すなわち、中性ミセルではミセルの内部ほど H⁺イオン濃度が低くなること、カチオン性ミセルでは界面活性剤の親水基と H⁺イオンの斥力により中性ミセルよりも濃度勾配が大きいこと、逆にアニオン性ミセルでは界面活性剤の親水基と H⁺イオンの引力により、局所的に H⁺イオンが濃縮されることを見いだした。

一方現状では、関連する研究報告がこの論文に限られており、計測対象の膜・イオンが、ミセル・H⁺イオンの組み合わせに限定されていることや、アニオン性ミセルにおいて位置調節部位の機能性が不十分であったことから、発展研究の余地を大きく残しているといえた。そこでこれらの問題点の克服に取り組み、集中的に「膜近傍のイオン濃度マッピング」を行うことで、先行研究のインパクトを保ったまま本計測概念を大きく拡張したいと考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は、従来の蛍光イオンセンサーの機能に、三次元構造体近傍における位置調節能を付与し、存在位置の異なる複数の蛍光イオンセンサーを利用することにより、ナノメートルスケールの空間分解能で、膜近傍のイオン濃度マッピングを行うものである。本研究を通して、医療・環境・基礎研究等さまざまな分野で汎用されている蛍光イオンセンサーに、高機能化の方法論を提示し、その存在価値をさらに高めたい。また、今まで誰にも達成できなかった膜近傍のイオン濃度マッピングを実現した上で、膜を構成する分子の化学構造とイオン濃度分布の関係を詳細に

解明し、膜近傍におけるナノ環境の多様性から細胞膜やミトコンドリア膜の巧妙な働きを論じたい。

3. 研究の方法

- (1) H⁺イオン濃度マッピング用蛍光センサーの合成とミセル近傍の H⁺イオン濃度計測
これまでに得られている 18 種類のベンゾフラザン骨格を有する蛍光 H⁺イオンセンサーに対して、さらに疎水性を増加させた新規センサーを 15 種類合成する。得られた蛍光 H⁺イオンセンサーの光物理特性(最大吸収波長・最大蛍光波長・蛍光量子収率)および H⁺イオン認識能を評価し、アニオン性ミセル sodium dodecyl sulfate、カチオン性ミセル cetyltrimethylammonium chloride 各水溶液中における酸性度 pKa と最大蛍光波長の関係から、これらの膜近傍における H⁺イオン濃度マッピングを行う。
- (2) H⁺イオン濃度マッピング用蛍光センサーを利用したベシクル近傍の H⁺イオン濃度計測
(1)で合成した蛍光 H⁺イオンセンサーを利用し、同様の手法にてカチオン性ベシクル dioctadecyl dimethylammonium chloride 近傍における H⁺イオン濃度マッピングを行う。
- (3) Na⁺イオン濃度マッピング用蛍光センサーの合成とミセル近傍の Na⁺イオン濃度計測

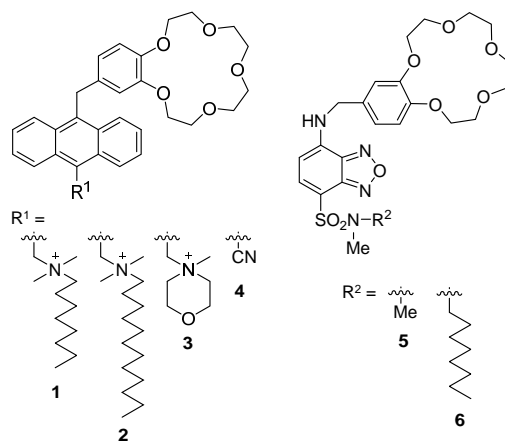


図 1 本研究にて合成する蛍光 Na⁺イオンセンサー

蛍光団としてアントラセン骨格を有する蛍光 Na⁺イオンセンサー 1~4 およびベンゾフラザン骨格を有する蛍光 Na⁺イオンセンサー 5, 6 を合成し(図 1)、4 種の界面活性剤 tetramethylammonium dodecyl sulfate (アニオン性)、cetyltrimethylammonium chloride (カチオン性)、Triton X-100 (中性) および octyl- β -glucopyranoside (中性) を用いて各種センサーのミセル溶液を調製する。塩化ナトリウムを用いてミセル溶液中のナトリウムイオン

ン濃度を 0~0.4 mol/l の範囲で段階的に変化させ、蛍光スペクトルを測定し、得られた蛍光強度(蛍光量子収率)変化より見かけの結合定数 \log を算出する。

4. 研究成果

(1) H⁺イオン濃度マッピング用蛍光センサーの合成とミセル近傍の H⁺イオン濃度計測
新規に合成した 15 種類の蛍光 H⁺イオンセンサーのうち、特に疎水性の高い 3 種類については、他の蛍光 H⁺イオンセンサーと異なりアニオン性ミセル sodium dodecylsulfate の内部に進入して存在できることが分かった。これらの蛍光 H⁺イオンセンサーの pKa 値は他のセンサーの pKa 値と比較して有意に低下しており、他の 30 種類の蛍光 H⁺イオンセンサーの結果と合わせ、sodium dodecylsulfate 近傍における H⁺イオン濃度マッピングを達成した。現在、カチオン性ミセル cetyltrimethylammonium chloride に対する測定結果に対して再現性の確認を行っており、これらの成果をすべて合わせて原著論文を執筆する予定である。

(2) H⁺イオン濃度マッピング用蛍光センサーを利用したベシクル近傍の H⁺イオン濃度計測

Diocetyl dimethylammonium chloride の作製段階において、分子の濃度・温度・超音波照射時間などの諸条件をどのように変えても、既報のような二重膜の生成を確認出来ず、H⁺イオン濃度測定の前段階であるベシクルの調製手順を確立し直す必要があることが分かった。動的光散乱測定によって直径数十ナノメートルの粒子が来ていることは確認出来ており、今後、電子顕微鏡による測定条件の最適化を含めて検討を進めていきたい。

(3) Na⁺イオン濃度マッピング用蛍光センサーの合成とミセル近傍の Na⁺イオン濃度計測

4 種の界面活性剤のうち、tetramethylammonium dodecyl sulfate 溶液でのみ Na⁺イオン濃度の増加に伴う蛍光応答が確認され、他のミセル溶液では応答が認められなかった(図 2)。Tetramethylammonium dodecyl sulfate 溶液について、添加した Na⁺イオン濃度と蛍光量子収率の関係から蛍光 Na⁺イオンセンサー 1~6 の見かけの結合定数 \log を求めたところ、1.3~2.6 であった。対象化合物である benzo-15-crown 5-ether の水中での \log 値は 0.4 と報告されており、それと比較すると 0.9~2.2 ユニット増加していた。この \log 値の正のシフトはミセル表面付近の Na⁺イオン濃度が実際に添加した Na⁺イオン濃度よりも $10^{0.9} \sim 10^{2.2}$ 倍高い事を示している。すなわち、アニオン性である tetramethylammonium dodecyl sulfate ミセル表面付近ではミセル外部と比べて

Na⁺イオンが少なくとも 8~160 倍に濃縮されていることが明らかになった。

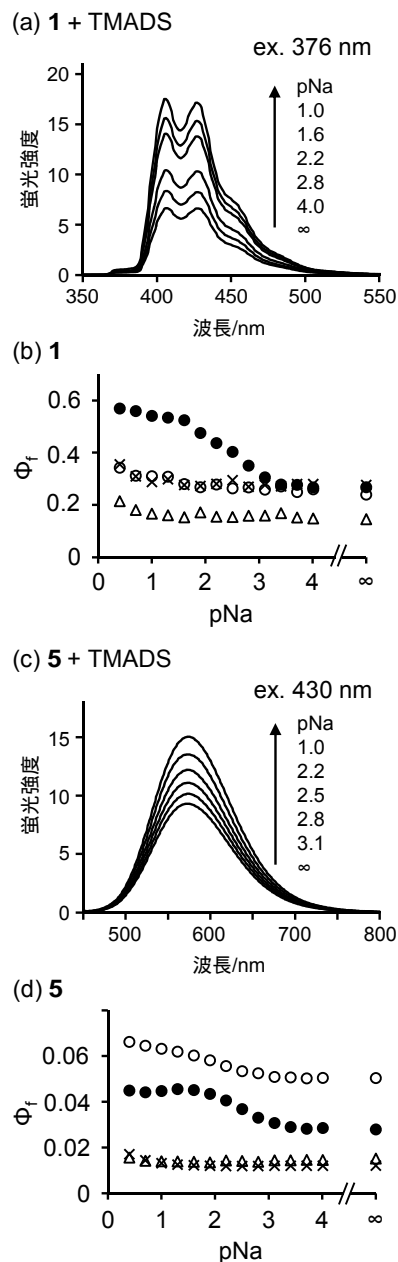


図 2 代表的な蛍光 Na⁺イオンセンサーの蛍光応答。(a, c) Tetramethylammonium dodecyl sulfate (TMADS, 20 mM) 溶液中における蛍光 Na⁺イオンセンサー 1 および 5 の蛍光スペクトル変化。(b, d) 各種ミセル溶液中における蛍光 Na⁺イオンセンサー 1 および 5 の蛍光量子収率 (ϕ_f) と Na⁺イオン濃度(pNa)の関係。TMADS (20 mM, ○), cetyltrimethylammonium chloride (5 mM, ●), Triton X-100 (0.52 mM, △), octyl- β -glucopyranoside (34 mM, ×)。

この成果を Angew. Chem. Int. Ed. 誌に原著論文として公表した。この論文はエディターにより重要な論文であると認定され、Hot Paper として選出されている。

(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

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1件)

- (1) Seiichi Uchiyama, Eiko Fukatsu, Gareth D. McClean, A. Prasanna de Silva, Measurement of local sodium ion levels near micelle surfaces with fluorescent photoinduced-electron-transfer sensors, Angew. Chem. Int. Ed., 査読有, Vol. 55, 2016, pp. 768-771. Selected as a hot paper.

〔学会発表〕(計4件)

- (1) Seiichi Uchiyama, Eiko Fukatsu, Gareth D. McClean, A. Prasanna de Silva, Measurement of local sodium ion levels near micelle surfaces with fluorescent photoinduced-electron-transfer sensors, 5th International Conference on Molecular Sensors and Molecular Logic Gates (MSMLG2016), 24-28/07/2016, Chancellor 's Building, University of Bath (Bath, UK).
- (2) Seiichi Uchiyama, Eiko Fukatsu, Gareth D. McClean, A. Prasanna de Silva, Measurement of local sodium ion levels near micelle surfaces with fluorescent photoinduced-electron-transfer sensors, 26th IUPAC International Symposium on Photochemistry, 07/04/2016, Osaka City Central Public Hall (Osaka).
- (3) 深津英子、内山聖一、Gareth D. McClean, A. Prasanna de Silva, 光誘起電子移動の制御を利用した蛍光センサーによるミセル表面付近のナトリウムイオン濃度測定、第75回分析化学討論会、2015年5月24日、山梨大学甲府キャンパス(山梨県甲府市)。
- (4) 深津英子、内山聖一、Gareth D. McClean, A. Prasanna de Silva, 光誘起電子移動の制御を利用した蛍光センサーによるミセル表面付近のナトリウムイオン濃度測定、日本化学会第95春季年会、2015年3月26日、日本大学理工学部船橋キャンパス(千葉県船橋市)。

〔図書〕(計1件)

- (1) A. Prasanna de Silva, 内山聖一、講談社、分子論理ゲート - 情報処理のできる機能性分子 -、2014、総ページ数 219。

6. 研究組織