

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17937

研究課題名(和文) 創発的分子認識を基盤とする蛍光センシング系の創成

研究課題名(英文) A fluorescence sensory system emerging through self-assembly

研究代表者

野口 誉夫 (NOGUCHI, TAKAO)

九州大学・工学研究院・学術研究員

研究者番号：00632431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：分子の自己集合を、分子構造情報を分子集合体(モルフォロジー)に変換する「分子情報変換システム」と発想を転換することで、Lock-and-Key結合に基づいた従来の分子認識とは一線を画す、自己集合の創発性を活用した分子認識系ならびに蛍光センシングシステムの創成に取り組んだ。その結果、蛍光センサ分子の組織化を利用したポリアニオンセンシング系の確立、並びに、ゲスト分子の分子構造情報(初期条件)によって蛍光センサの組織化経路が一義的に決定された結果として分子認識ならびに蛍光センシングが達成される「創発的分子認識に基づく蛍光センシング系」のコンセプト提示に至った。

研究成果の概要(英文)：A novel fluorescence (FL) sensory system orchestrated by self-assembly was offered: namely, the difference in the guest structural information at a molecular level directs distinct self-assembly modes (J-type or H-type) of newly developed FL chemosensors and consequently leads to the FL outputs characteristic of the initial guest information. This macroscopic expression of the initial microscopic difference in the guest structures exemplifies the emergent property of self-assembly for the application to the FL sensing, which is distinguishable from the conventional one based on molecular recognition through lock-and-key-type 1:1 binding. This study does emphasize that precise translation of guest structural information into FL output can be realized through the emergent property of self-assembly, and accordingly highlights self-assembly as a sensory system for molecular recognition.

研究分野：超分子化学

キーワード：蛍光センサ 自己集合 創発性 分子認識 ポリアニオンセンシング グリコサミノグリカン 臨床化学検査 環境分析

### 1. 研究開始当初の背景

生体内の重要な化学物質の働きを理解するためには、その量や変化を迅速・簡便・高感度に検出し、評価できる技術が必要不可欠である。報告者は、会合誘起発光を利用することで、細胞のエネルギー源であり、細胞内シグナル伝達においても重要な役割を担っている、アデノシン三リン酸(ATP)を選択的に検出する蛍光センサや、先天性代謝疾患のマーカーとなる高濃度ジカルボン酸群を検出する蛍光センサ開発を行ってきた。これら先行研究において、会合型蛍光センサは、ゲスト分子との co-assembly によりゲスト分子構造に特有の蛍光応答曲線を与える。このことから、報告者は、従来のボトムアップツールとしての自己集合を、分子固有の分子構造情報を蛍光応答に変換・増幅する「分子情報変換ツール」と捉え直すという発想の転換に至った。これにより、ゲスト分子のコンフォメーション(初期条件)の違いが、全く異なる蛍光応答を与えることで、分子認識が達成されるという、自己集合を利用する分子認識システムを提示した(図 1)。ここで報告者は、初期条件(ゲスト分子)が集合経路(ここでは J- or H-会合)を決定するという、自己集合の創発性に基いた分子認識という観点に気づき、「創発的分子認識」という着想に至った。

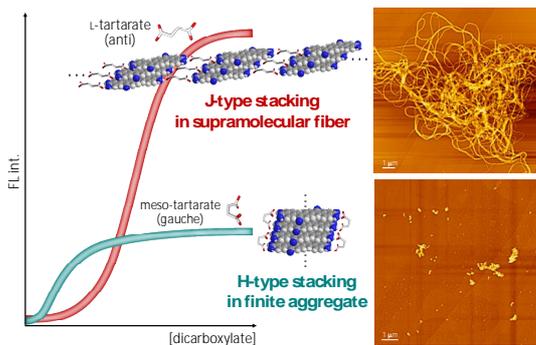


図 1. 自己集合を利用する分子認識システム

### 2. 研究の目的

分子の自己集合を利用する創発的分子認識システムでは、ゲスト分子構造の微視的な差異が巨視的アウトプットに反映されるため、精密分子認識が可能となる。本研究課題では、「創発的分子認識」という新概念を基軸とした分子認識システムを提示し、応用に向けた蛍光センシング系を創成する。これにより、Lock-and-Key 型の分子認識に基づいた蛍光センシング系では検出が困難であったバイオマーカーの精密認識・蛍光センシングを達成する。

### 3. 研究の方法

大きなダイポールを有する蛍光性色素は、その積層様式(例えば J-type, H-type)によって発光色を大きく変化させることが知られている。本研究課題では、(1)ダイポールを

有するオリゴフェニレンビニレン(OPV)基本骨格とする蛍光センサ(OPV-G1, OPV-G2, 図 2a)を合成し、ゲスト分子としてポリアクリル酸(PA, Mw.5000, 図 2b)を用いることで、ポリアニオンのセンシングメカニズムを明らかにする。(2)病態の指標となる天然多糖系ポリアニオンであるグリコサミノグリカン(ヘパリン, コンドロイチン硫酸, ヒアルロン酸, 図 2c)の蛍光センシングを検討する。

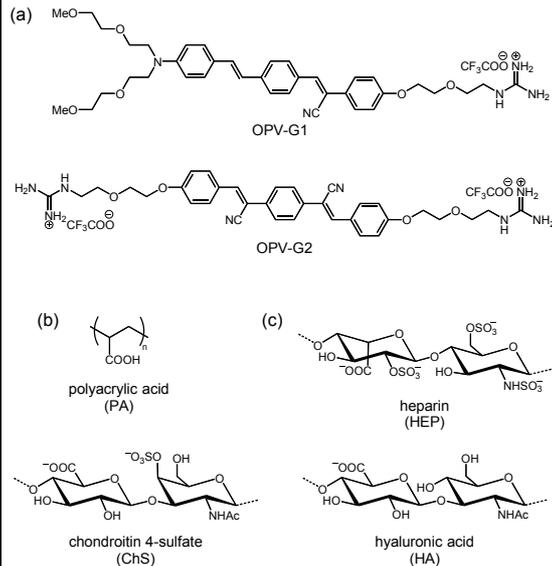


図 2. 蛍光センサ(a), ポリアクリル酸(b), グリコサミノグリカン(c)の化学構造

### 4. 研究成果

#### (1) ポリアニオンセンシング系の確立

センシングメカニズムを検討するために、結合サイトとしてグアニジウム基を1つ有する OPV-G1 を合成した(図 2a)。OPV-G1 は、PA の添加により、604 nm の蛍光強度を増加させた(図 3a)。詳細な蛍光滴定実験を行った結果、PA の濃度増加に伴い、OPV-G1 (30  $\mu$ M) の蛍光強度は直線的に増加し、約 1 等量(30  $\mu$ M, ユニット濃度)で飽和することが分かった(図 3b)。UV-Vis 滴定により、PA の濃度

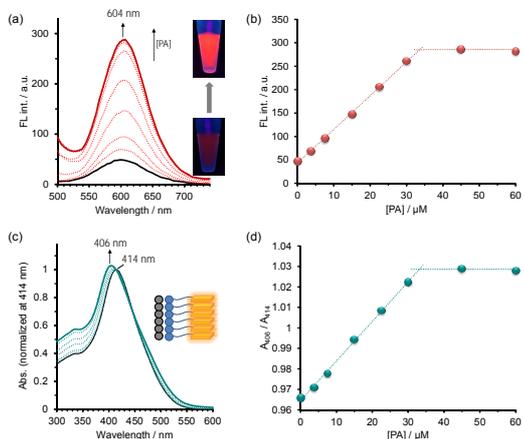


図 3. 蛍光滴定(a,b)と UV-Vis 滴定(c,d)結果

増加に伴う、OPV-G1 の集合挙動を追跡した。PA の濃度増加に伴い、406 nm の吸光度が相対的に増加した(図 3c)。このことから、G1 は PA との静電相互作用により会合し、 $\pi$ -スタック構造を形成することが示唆された。増加する 406 nm の吸光度を PA 濃度に対してプロットしたところ、約 1 等量で飽和する直線的な吸光度変化が確認された(図 3d)。注目すべきは、この直線的な吸光度変化は、図 3b で示した、蛍光強度の直線の変化と相関していることである。したがって、図 3b で示した、蛍光強度の直線の変化は、G1 が  $\pi$ -スタックした会合形成に伴うものであるといえる。

ここで、PA に対し OPV-G1 がどういう会合挙動をとるのかを調べ、会合定数を見積もるために、PA 濃度を 30  $\mu\text{M}$  に固定し OPV-G1 濃度を変化させた。参照として、PA が存在しない場合は、OPV-G1 濃度に比例した蛍光増大を示した(図 4 の without PA)。これに対し、PA 存在下では、非線形的な蛍光増大を示した(図 4 の with PA)。さらに重要なことは、蛍光増大が PA に対して 1 等量の OPV-G1 濃度

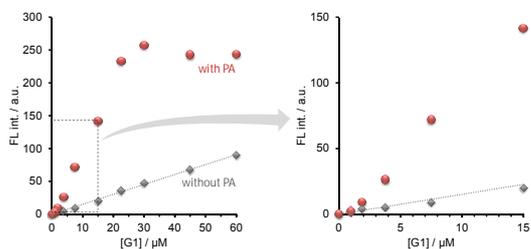


図 4. PA に対する OPV-G1 の会合挙動

(30  $\mu\text{M}$ )で飽和したということである。このことは、OPV-G1 は PA 鎖に対して、協同的 (cooperative) に会合し積層構造を形成することで蛍光を発するというを示している(図 5a)。Hill の式から、見かけの会合定数( $K_a$ )は、 $\text{Log}K_a = 8.65$  と見積もられた。

以上の結果より、PA センシングのメカニズムをまとめる。OPV-G1 は PA に対して、協同的に集積することにより、定量的に 1:1 複合体(G1/PA)を形成する(図 5a)。このことから、

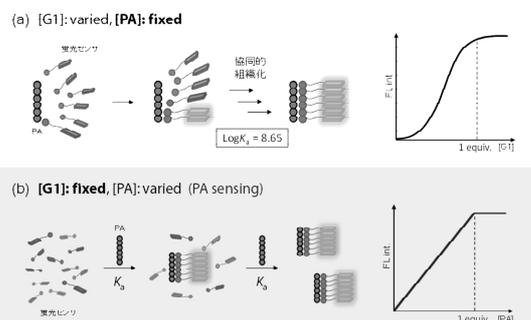


図 5. (a) PA に対する OPV-G1 の会合挙動と会合定数の算出 (b) 直線的な蛍光応答を示すセンシングメカニズム

PA センシングの条件(OPV-G1 濃度を固定した条件)においては、図 5b に示したスキームに従い、OPV-G1 は PA 濃度に比例した直線型の蛍光応答を示すと説明づけることができる。この直線性により、PA の検出濃度範囲は OPV-G1 の初期濃度に依存することが確認された。以上により、蛍光センサの分子組織化を活用したポリアニオンセンシング系を提示することができた。

## (2) グリコサミノグリカンの蛍光センシング

次に、グリコサミノグリカン(GAG、図 2c) センシングへの応用を検討した。OPV-G1(30  $\mu\text{M}$ )を用い、GAG に対する蛍光応答を調べた。その結果、選択性としては、負電荷密度の高い順に HEP>ChS>HA であった(図 6)。UV-Vis スペクトル測定により、HEP に対し顕著な短波長シフトを示したことから、最も負電荷密度の高い HEP と安定な会合体を形成しやすいことが分かった。この UV-Vis スペクトルの結果からも、HEP 選択性が支持された。

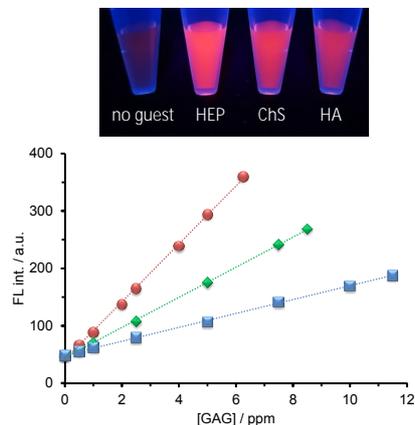


図 6. GAG に対する OPV-G1 の蛍光応答

次に、蛍光センサとして OPV-G2(図 2a)を用い、GAG に対する蛍光応答を調べた。驚くべきことに、選択性が完全に逆転した HEP<ChS<HA という結果が得られた(図 7)。

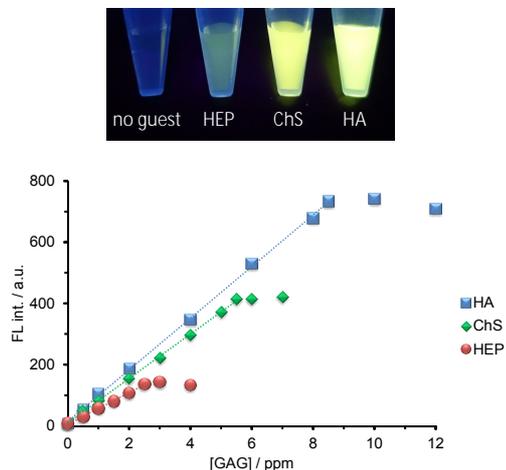


図 7. GAG に対する OPV-G2 の蛍光応答

なぜこのような結果が得られたのか、UV-Vis 測定により OPV-G2 の集合挙動を追跡した。結果として、OPV-G2 は HEP 添加により H-会合体形成に特徴的なスペクトル変化を示したのに対して、ChS、HA 添加では、J-会合体形成に特徴的な 430 nm のシヨルダピークが増加した。このことから、OPV-G2 は HEP に対し H-会合体を形成し弱蛍光発光、HA に対して J-会合体を形成し強蛍光発光を示すことで、HA 選択性を発現したといえる。

本結果で注目すべきは、負電荷密度の小さな GAG ほど、OPV-G2 の J-会合を誘起し、強発光を与えるということである。ここで、GAG ユニット構造中の負電荷を中和することを考える。ユニット構造中には硫酸イオンとカルボン酸イオンが存在している(図 2c)。それらの  $pK_a$  の違いを利用すると、カルボン酸イオンを優先的に中和することができる。系の pH を 1.5 に調製し、GAG に対する蛍光応答を調べた結果、HA に対する蛍光応答は完全にバックグラウンドに到達した。結果として、ChS 選択性が発現した(図 8)。このことから、負

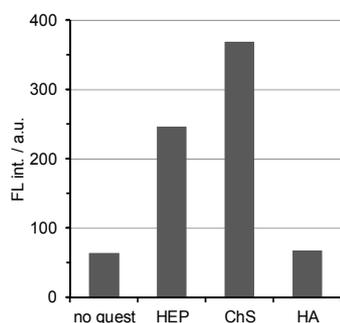


図 8. ChS 選択性の発現

電荷密度の小さな GAG ほど OPV-G2 の J-会合を誘起し強発光を与えるということが支持された。さらに重要なのは、前述した OPV-G1 センサの HEP 選択性と併せると、望みの選択性での GAG センシングが可能となったということである。

本成果は、積層様式により蛍光応答を大きく変化させる蛍光センサの開発により初めて実現されたものである。「結合の強さに基づく選択性」という Lock-and-Key 結合に基づいた従来の分子認識とはコンセプトを異にする、「積層様式に基づく選択性」という新たな分子認識コンセプトの創成を意味する。加えて、ポリアニオン化合物について、見かけ上 1:1 結合に基づいた直線的蛍光応答を示すことを明らかにし、センシングメカニズムを提示することで、ポリアニオンセンシング系の確立に至った。

以上により、本研究課題の主目的である、ゲスト分子の分子構造情報(初期条件)によって蛍光センサの自己組織化経路が一義的に決定された結果、分子認識ならびに蛍光センシングが達成されるという、創発的分子認識に基づく蛍光センシング系を提示することができた。

## 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 3 件)

Takao NOGUCHI, Bappaditya ROY, Daisuke YOSHIHARA, Junji SAKAMOTO, Tatsuhiro YAMAMOTO, Seiji SHINKAI; A Chiral Recognition System Orchestrated by Self-Assembly: Molecular Chirality, Self-Assembly Morphology, and Fluorescence Response. *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有, Vol. 56, 2017, pp. 12518-12522, DOI: 10.1002/anie.201706142.

野口 誉夫, 吉原大輔, 新海征治; 分子組織化を変換ツールとする蛍光センシング系, 有機合成化学協会誌総合論文, 査読有, Vol. 75, 2017, pp. 49-61.

Takao NOGUCHI, Bappaditya ROY, Daisuke YOSHIHARA, Junji SAKAMOTO, Tatsuhiro YAMAMOTO, Seiji SHINKAI; Emergent Molecular Recognition through Self-Assembly: Unexpected Selectivity for Hyaluronic Acid among Glycosaminoglycans. *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有, Vol. 55, 2016, pp. 5708-5712, DOI:10.1002/anie.201511564.

〔学会発表〕(計 4 件)

野口 誉夫; 分子の自己組織化を変換ツールとする蛍光センシング系: lock-and-key binding vs. guest-induced self-assembly, 第 2 回メディカルイノベーションワークショップ(招待講演), 2017 年 3 月 9 日 埼玉大学

野口 誉夫; 分子組織化により創発される蛍光センシング系, 九州大学高等研究院 - 九州先端科学技術研究所研究交流会, 2016 年 12 月 26 日 九州大学

野口 誉夫; 分子の自己組織化を利用する簡便・高感度な蛍光センシング, JST 九州大学新技術説明会, 2016 年 10 月 13 日 JST

Takao NOGUCHI, Seiji SHINKAI; Emerging Molecular Recognition System via Self-Assembly: Unexpected Selectivity for Hyaluronic Acid among Glycosaminoglycans. International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry (ISMSC-2016) (国際学会), 2016 年 7 月 10 日 ~ 2016 年 7 月 14 日 The K-hotel Seoul, Korea

〔図書〕(計 1 件)

Takao NOGUCHI, Daisuke YOSHIHARA, Seiji SHINKAI; Principles and Applications of Aggregation-Induced Emission, Chapter 16, Applications of AIE to Molecular Recognition: Why Is It Superior to Unimolecular Recognition? Springer, 2018, in press.

〔その他〕

・公財 九州先端科学技術研究所ナノテク研究室ホームページ

(<http://www.isit.or.jp/lab4/>)

・日刊工業新聞 2016年5月19日

・国際ナノテクノロジー総合展・技術会議 (nano tech 2017)に参加(公財 九州大学学術研究都市推進機構ブース)。

・九州大学プレスリリース、公開日 2017年9月22日

(<http://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/173>)

・日刊工業新聞(2017年9月26日)

・本研究課題に係る特許について、企業1社と実施許諾契約を締結。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野口 誉夫 (NOGUCHI, Takao)

九州大学・大学院工学研究院・学術研究員

研究者番号：00632431