

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05548

研究課題名(和文)熱応答性蛍光性ポリマーの蛍光ゆらぎ現象の解明とバイオポリマーの動き解析への応用

研究課題名(英文)Elucidation of fluorescence fluctuation of thermoresponsive fluorescent polymer and its application to analysis of motion of biopolymers

研究代表者

上原 伸夫 (Uehara, Nobuo)

宇都宮大学・工学部・教授

研究者番号：50203469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：汎用的な蛍光分光光度計を用いて観察される蛍光性高分子からのサブ秒から秒の周期を持つ蛍光強度のゆらぎについて検討した。環境応答性の1-フェニルナフチルアミン(PN)を蛍光団にもつ熱応答性高分子の水溶液は測定毎に異なる蛍光スペクトルを与えた。これは蛍光団から発する蛍光がサブ秒から秒の周期を持ってゆらぐことによる。波長スキャン中に蛍光強度がランダムに変動するため、持つスペクトル形状は測定毎に異なるゆがみを持つ。この蛍光ゆらぎは、単一の蛍光性分子や蛍光性粒子が示すブリンキングとは異なり、高分子鎖の運動により蛍光団の会合がランダムに生じる結果、引き起こされることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この課題研究により、室温において汎用的な蛍光光度計でも蛍光ゆらぎが観察されることを初めて明らかにした。この現象はこれまで報告されておらず、新規な現象である。すなわち、溶液内における分子の運動に関する新たなモードが存在することを明らかにした。蛍光ゆらぎを強度(振幅)と早さ(周期)とをパラメーターとして特徴づけることができた。これにより、これらのパラメーターを出力とする蛍光ゆらぎを原理とした新たな計測システムへの構築が期待される。この運動モードは永続的であることから、分子発振子としての可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：We firstly report fluorescence emitted from thermoresponsive fluorescent polymers fluctuates with periods of sub-seconds to seconds, which is observed with a conventional fluorescence spectrophotometer. Aqueous solutions of thermoresponsive polymers having an environmental responsive fluorophore, 1-phenyl naphthylamine (PN), gave different fluorescence spectra for each measurement. This is because the fluorescence emitted from the fluorophore in the polymers fluctuates with a period of sub-seconds to seconds. Since the fluorescence intensity fluctuates randomly during the wavelength scan, the spectral shape has a different distortion for each measurement. This fluorescence fluctuation is different from the blinking exhibited by a single fluorescent molecule or fluorescent particle, and can be observed in a solution state with a conventional fluorescence spectrophotometer equipped with a 1 cm four-sided transparent cell.

研究分野：分析化学

キーワード：蛍光 ゆらぎ 水溶性高分子

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゆらぎとは、平均値からの時間的あるいは空間的な変動であり、自然界において普遍的に観察される。蛍光測定においてもゆらぎが観察されることがある。典型的なものに、蛍光相関分光法と光アンチバンチングが知られている。蛍光相関分光法では、励起光源としてレーザー光が照射された微小空間内に存在する蛍光分子から発せられた蛍光強度の時間的な変動を観察する。この蛍光分子から発せられる蛍光の強度は蛍光分子の並進運動、回転運動および会合状態によって変化する。従って、この蛍光強度の時間的な変動を解析することにより微小空間内における分子の運動に関する様々な情報を得ることが出来る。一方、光アンチバンチングは、単一の蛍光分子や単一の蛍光性ナノ粒子を連続レーザー光源で励起する際に生じ、秒のオーダーで蛍光強度の段階的な変化が観察される。蛍光相関分光法では微小空間での分子の観察、光アンチバンチングでは、単一の発光性物質からの発光現象の観察といったいずれも特殊な測定条件下で蛍光を観察している。汎用的な蛍光分光光度計を用いる通常の蛍光測定ではこのような蛍光強度のゆらぎは観察されない。これが蛍光光度定量の基盤を提供している。

これに対して、我々は、陰イオン性界面活性剤を測定するための蛍光プローブを開発する過程において、発蛍光型熱応答性高分子の中には、陰イオン性界面活性剤が存在しない状態において、蛍光強度が時間的に変動するものがあることを偶然見出した。この発蛍光型熱応答性高分子は、熱応答を示すイソプロピルアクリルアミド部位 (NIPAAm) とイオン性感応基としてポリアミノ基そして周囲の疎水環境に反応して蛍光特性を変化させる N-フェニル-1-ナフチルアミン (PN) が蛍光団から構成されている。この蛍光強度の時間変化は、1 cm 四面透過セルを装備した汎用的な蛍光分光光度計を用いて観察された。我々の知る限り、このような蛍光ゆらぎはこれまで報告されていない。

2. 研究の目的

環境応答型蛍光性高分子ポリマー自身が発する蛍光ゆらぎの発現機構の解明とそのバイオポリマー計測への応用について検討した。9種類の発蛍光型水溶性高分子を合成し、その蛍光ゆらぎ特性を様々な実験条件において検討した。

各ポリマーの 10 g/L 保存溶液を調製し、これを適宜希釈したのち、極大励起波長において蛍光スペクトルを測定するとともに、蛍光強度の経時変化を測定した。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、この研究では、次の二つの研究指針を立てた。

(1) 発蛍光型水溶性高分子の合成

反応容器に、0.05 mol に相当するモノマー固体あるいはモノマー溶液と少量の蛍光団 N-ナフチル-4-(1-ペンテノキシ)-アニリン (PN) を加えた後、メタノールあるいはジメチルスルホキシド溶液としてラジカル重合した。

1') 蛍光団 N-ナフチル-4-(1-ペンテノキシ)-アニリン (PN) 誘導体の合成
N-ナフチル-4-(1-ペンテノキシ)-アニリン (PN) 誘導体として

(2) 蛍光ゆらぎの測定と解析

合成したポリマーあるいは (PN) 誘導体を水に溶かして 0.01 wt% の水溶液を調製した。蛍光光度計を用いてこの溶液の励起及び蛍光スペクトルを測定した。また、波長を固定して蛍光強度を 0.05 秒ごとに 10 分間測定した。得られた蛍光強度の経時変化のデータを基に、振幅の相対標準偏差、周波数成分を算出してゆらぎの解析に用いた。

4. 研究成果

(1) ポリマー構造とゆらぎの関連性

9種類のポリマーを合成した。合成したポリマーの構造式の中に、それぞれのモノマーユニットが入る。検討の結果、これらのポリマーは、ゆらぎを発現するものと、発現しないものに分類された。モノマーユニットにエステル結合の構造を有するポリマーではゆらぎが見られない。一方で、アミド結合を有する多くのポリマーはゆらぎが発現する。極性基の違いがゆらぎの発現に関連しているということは、ゆらぎ発現のメカニズムの解明に重要な知見を与える。

(2) 蛍光ゆらぎの典型的な挙動

典型的な蛍光ゆらぎとして、0.01 wt% p(AAm-PN) 水溶液の蛍光スペクトルおよび蛍光強度の経時変化を観察した。得られた結果から測定毎に蛍光スペクトルの形状が変化していることがわかる。PN は周囲の環境に反応して蛍光特性を変えることから、この結果はポリマー中の PN 近傍の環境が経時的に変動していることを示唆している。蛍光強度の経時変化を示した内挿図から、ノイズ状の変動に加えて、パルス状のピークが観察された。

(3) 蛍光ゆらぎの温度応答性

分子の運動に直接影響する溶液温度について検討した。温度毎の蛍光強度の経時変化を検討した。温度が上昇するにつれて、高い周波数成分が増加し、より激しくゆらいでいることが観察できる。これは温度上昇によってポリマー鎖の運動がより活発になったためと考えられる。しかしながら、63 °C以上ではゆらぎが消失した。これは、この温度範囲で p(AAm-PN)がゆらぎを生じなくなる別の状態、すなわちポリマー鎖が伸張した状態に移行したことを示唆している。

(4) 物理的刺激による蛍光ゆらぎの回復

一連の実験を行っていく際、p(AAm-PN)溶液に振動を与えるとゆらぎが回復することを偶然に発見した。このゆらぎの回復は発現のメカニズムに直接的に関与していると考え、昇温によりゆらぎが消失した p(AAm-PN)溶液を攪拌し、蛍光強度の経時変化を観察した。その結果、10 分間に 5 回程度、蛍光強度が強くなるパルス状のゆらぎが観察された。攪拌により、ポリマー鎖が畳み込まれるような現象、おそらくチキソトロピーに類似した現象が起こっているものと推測される。このポリマー鎖の畳み込みにより、p(AAm-PN)は蛍光ゆらぎを発現できる状態に戻るものと推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Nobuo Uehara, Mina Sasaki, Arinori Inagawa | 4. 巻 62 |
| 2. 論文標題 Extraction of MgO from steel-making slag with 2,2,2,-trichloroethanol | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 ISIJ International | 6. 最初と最後の頁 922-928 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2355/isijinternational.ISIJINT-2021-303 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Arinori Inagawa, Minami Maeda, Nobuo Uehara | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 In situ Quantitative Visualization of Dissolved Ferrous Iron from Pure Metal Iron into Freeze-Concentrated Solutions by Combination of Transmittance Microscopy and Image Processing | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Sensors and Materials | 6. 最初と最後の頁 915-925 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18494/SAM.2021.3448 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Arinori Inagawa, Kana Saito, Mao Fukuyama, Munenori Numata, Nobuo Uehara | 4. 巻 1182 |
| 2. 論文標題 Geometrical pH Mapping of Microfluids by Principal-Component-Analysis-based xyz-Spectrum Conversion Method | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta | 6. 最初と最後の頁 338952 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aca.2021.338952 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 門脇優人, 柳原木綿子, 稲川有徳, 上原伸夫 | 4. 巻 107 |
| 2. 論文標題 ニクロム酸カリウム滴定のための窒素雰囲気下における定量的な鉄の還元 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 鉄と鋼 | 6. 最初と最後の頁 566-576 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2355/tetsutohagane.TETSU-2021-019 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Nobuo Uehara, Yuki Masubuchi, A. Inagawa | 4. 巻 618 |
| 2. 論文標題 Manipulation of Aggregation-Induced Emission of a Thermoresponsive Fluorescent Polymers Having Au(I)-S Groups for a Fluorescent Chemosensor | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Coll. Surf., A | 6. 最初と最後の頁 126459 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfa.2021.126459 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kazutoshi Hanada, Shun-ichi Watanabe, Arinori Inagawa, Nobuo Uehara | 4. 巻 61 |
| 2. 論文標題 Sulfated steelmaking slags as Se(IV) adsorbents: Effects of preparation conditions on adsorption performance | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 ISIJ International | 6. 最初と最後の頁 506-512 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2355/isijinternational.ISIJINT-2020-420 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名 Nobuo Uehara, Natsumi Sonoda, Tsubasa Iwamatsu, Chikara Haneishi, Arinori Inagawa | 4. 巻 585 |
| 2. 論文標題 Spontaneous formation of gold nanoparticles from gold nanoclusters in the presence of highly-molecular-weight poly(ethyleneglycol) | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Coll. Surf. A | 6. 最初と最後の頁 124113-124113 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfa.2019.124113 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Arinori Inagawa, Nobuo Uehara, Tetsuo Okada | 4. 巻 1110 |
| 2. 論文標題 Interaction between Antifreeze Protein and Ice Crystal Facet Evaluated by Ice-Channel Electrophoretic Measurements of Threshold Electric Field Strength | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Anal. Chim. Acta | 6. 最初と最後の頁 122-130 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aca.2020.03.025 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名 Arinori Inagawa, Asuka Sasaki, Nobuo Uehara | 4. 巻 216 |
| 2. 論文標題 Reproducing Absorption Spectra of pH Indicators from RGB Values of Microscopic Images | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Talanta | 6. 最初と最後の頁 120952-120962 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.talanta.2020.120952 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Arinori Inagawa, Nozomi Masuda, Toshiyuki Nikata, Nobuo Uehara | 4. 巻 49 |
| 2. 論文標題 Sample enrichment for microchip electrophoresis by target-selective extraction induced by phase separation of aqueous ionic liquids | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Chem Lett. | 6. 最初と最後の頁 974-977 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.200330 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 上原伸夫 |
| 2. 発表標題 製鉄プロセスを下支えする湿式化学分析 |
| 3. 学会等名 第81回分析化学討論会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 稲川有徳・上原 伸夫 |
| 2. 発表標題 RGB-スペクトル変換法によるスマートフォン画像を利用した比色分析法の開発 |
| 3. 学会等名 日本分析化学会第70年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Arinori Inagawa and Nobuo Uehara |
| 2. 発表標題 Development of colorimetric analysis procedure with smartphone-captured images based on RGB-spectrumconversion methods |
| 3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2020 Program Number 32886 (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hisana Shimazu, Arinori Inagawa and Nobuo Uehara |
| 2. 発表標題 Effect of molecular structure on fluorescence fluctuation of water-soluble polymer incorporating fluorophore |
| 3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2020 Program number 33049 (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuuki Awaya, Arinori Inagawa and Nobuo Uehara |
| 2. 発表標題 Development of Near-Infrared Fluorescent Organic-Inorganic Hybrids for Polysaccharide Sensors |
| 3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2020 Program number 33045 (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Asahi Yasuda, Nobuo Uehara, Arinori Inagawa |
| 2. 発表標題 Selective detection of acidic amino acids using aggregation of cationic stimuli-responsive polymer |
| 3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2020 Program number 33008 (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 上原伸夫・佐々木美奈 |
| 2. 発表標題 2,2,2-トリクロロエタノールを用いる製鋼スラグからのフリーMgOの抽出と定量 |
| 3. 学会等名 日本鉄鋼協会第179回春季講演大会 講演番号293 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 門脇優人・上原伸夫・稲川有徳 |
| 2. 発表標題 鉄鉱石中の全鉄定量に用いられるニクロム酸カリウム滴定法における予備還元操作の検討 |
| 3. 学会等名 日本鉄鋼協会第179回春季講演大会 講演番号PS-60 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 門脇 優人・稲川 有徳・上原 伸夫 |
| 2. 発表標題 鉄鉱石中の全鉄定量法(JIS M 8212)における予備還元 操作 のポテンシオメトリー による検討 |
| 3. 学会等名 日本鉄鋼協会第180回秋季講演大会 講演番号PS-53 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 稲川有徳・上原伸夫 |
| 2. 発表標題 RGB- スペクトル変換法によるスマートフォン画像を利用した比色分析法の開発 |
| 3. 学会等名 令和2年度分析イノベーション交流会、講演番号：W-2 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 保田あさ陽・上原伸夫・稲川有徳 |
| 2. 発表標題 カチオン性刺激応答性高分子の静電相互作用を利用した呈味性アミノ酸の検出 |
| 3. 学会等名 第80回分析化学討論会、講演番号：Y1131 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 増田望実・上原伸夫・稲川有徳 |
| 2. 発表標題 イオン液体/水系の相分離を利用したマイクロチップ電気泳動の高感度化 |
| 3. 学会等名 第80回分析化学討論会、講演番号：Y1068 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐々木明日香・上原伸夫・稲川有徳 |
| 2. 発表標題 透過顕微画像のRGB値を用いた微小空間における吸収スペクトルの再現 |
| 3. 学会等名 第80回分析化学討論会、講演番号：Y1015 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 稲川有徳・高山俊也・上原伸夫 |
| 2. 発表標題 氷表面のダングリングバンドとガリウム(III)錯体との配位子交換反応 |
| 3. 学会等名 第80回分析化学討論会、講演番号：F2008 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔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 |
|-----------|--|----------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 稲川 有徳 (Inagawa Arinori) (30828489) | 宇都宮大学・工学部・助教 (12201) | |
| 研究 分担者 | 伊藤 智志 (Ito Satoshi) (60361359) | 宇都宮大学・工学部・准教授 (12201) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|