

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：24405

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18986

研究課題名(和文)高機能化液化色素ナノ油滴に基づく超高感度1ステップ診断デバイスの新原理創発

研究課題名(英文) Development of a new principle for an ultra-sensitive one-step diagnostic device based on highly functional dye liquid nano-oil droplets

研究代表者

久本 秀明 (Hisamoto, Hideaki)

大阪公立大学・大学院工学研究科 教授

研究者番号：00286642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はいままで、固体色素自身を液状化させた色素液体の開発によって、色素の極限濃度化を達成した酵素応答性色素液体ナノエマルジョン(NE)型オプトードを開発し、高感度な酵素応答を実現した。しかし、酵素応答性色素液体NEでは、一分子中に酵素基質部位と蛍光部位をもつ蛍光基質を用いるため、さらなる高感度化に有効と考えられる基質部位・蛍光部位の比率の検討は原理的に困難であった。本研究では、一般的な蛍光基質を用いずに基質部位と蛍光部位を分子として独立させてNEの油滴中に含ませた全く新しい応答機構の酵素応答性NE型オプトードの提案・実証を行い、基質・蛍光部位の比率の検討から高感度化できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、従来の蛍光基質を使用せず、基質部位と蛍光部位を分子として独立させた全く新しい応答機構の酵素応答性ナノエマルジョン型オプトードを初めて提案・実証した。学術的には、従来にない新しい応答機構が初めて示され、将来の生体分析やバイオセンシング分野での基礎研究に貢献する。社会的には、この新しいオプトードは生物学的分析や環境モニタリングなどの実用的な応用に役立つ可能性がある。さらに、色素の疎水性と色素比率の調整によってALP応答性を向上させる方法論は、医療診断や環境汚染監視などの分野において、より高感度で信頼性の高いセンシング技術の開発に寄与する。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to propose and demonstrate an enzyme-responsive nanoemulsion (NE)-type optode in which the substrate site and the fluorescent site are introduced into NE as independent molecules. In this study, naphthol AS-TR phosphate was used as an alkaline phosphatase(ALP) substrate and acridine orange (AO) derivative, which is a cationic dye that emits strong fluorescence in a hydrophobic environment, was used as a fluorescent dye. In this case, naphthol AS-TR phosphate was dephosphorylated by the enzymatic reaction at the oil-water interface, and the cationic dye AO moved to NE/aq. interface to balance the electrical charge in NE. Furthermore, it was found that it was possible to increase the sensitivity by examining the mixing ratio of the molecules. Based on these results, the development of an enzyme-responsive NE-type optode with a new response mechanism was successfully demonstrated for the first time.

研究分野：分析化学

キーワード：イオン液体 色素液体 アルカリフォスファターゼ ナノエマルジョン 機能性色素

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、化学センシングで使われる「変色性色素分子」を、溶媒に溶解することなく完全液化できれば、「色素分子が密集した極限濃度の変色液体」を実現でき、液膜センサー超高度化のブレークスルーとなり、化学センシングのパラダイムシフトが実現できると考え、2017年頃からこの研究に取り組んできた。申請者らは実際に、色素分子の液化・薄膜化で、従来比約200倍量という劇的に大量な色素の液状安定保持に初めて成功し、アニオン・カチオンのみならず、疎水性蛍光基質分子の液化で油水界面酵素反応に基づくアルカリフォスファターゼ(ALP)検出(Anal.Sci. 2020, 36, 143.)でも高感度応答を実現した。

ここでは2価のリン酸アニオンが水相に放出される際、有機相中電荷バランスを保つために水相中アニオンが取り込まれ、蛍光増強に強く寄与していることを初めて明らかにした。この知見はわざわざ蛍光基質分子を合成しなくても疎水性のリン酸誘導体さえ有機相中に保持させれば反応前後の電荷バランス変化によって、有機相に共存する疎水性色素の変色を容易に誘起できることを示唆している。

これは油水界面酵素反応を油水間電荷バランス変色に変換する全く新しい変色機構と考え、挑戦的研究として本研究構想を提案するに至った。

2. 研究の目的

近年我々が見出した油水界面酵素反応(Analyst 2015, 140, 1459., Anal. Sci. 2020, 36, 143.)と高機能化色素液体ナノ油滴で、超高度1ステップタンパク検出の新原理に直結する酵素検出用新規超高度変色原理を開拓する。

本研究では、アルカリフォスファターゼ(ALP)をターゲットとし、一般的な蛍光基質を用いずに基質部位と蛍光部位を分子として独立させてNEの油滴に含ませた全く新しい応答機構の酵素応答性NE型オプトードの提案・実証を目的とした。応答機構の知見を得るため、ALP基質分子として比較的短波長の発色ALP基質として知られるNaphthol AS-TR Phosphate, 蛍光色素として疎水性環境下で強い蛍光を発生し、親水性環境下では消光するカチオン性色素のN-アルキル化アクリジンオレンジ(AO)誘導体を用いた。想定される応答機構をFig. 1に示す。まず、ALPとの油水界面酵素反応により、有機相であるNE中に大量に含まれるnaphthol AS-TR phosphateが脱リン酸化され、2価アニオンが1価に変換される。それに伴いNE中の電荷バランスを保つためにカチオン性蛍光色素であるAOがNEのバルクから油水界面の水相付近へ移動し、消光すると想定される。本論文では、基質部位と蛍光部位を分子として独立させた全く新しい応答機構の酵素応答性NE型オプトード実証において得られた知見を報告する。

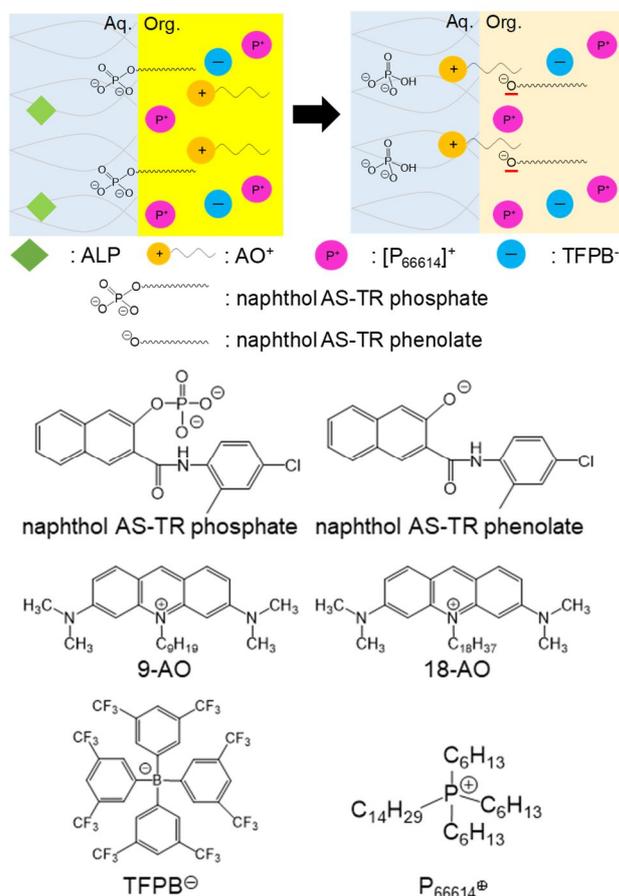


Fig. 1 Concept of new response mechanism for ALP and molecular structures of reagents used.

3. 研究の方法

3 - 1 基質および蛍光色素イオン対の調製

[P₆₆₆₁₄]₂[naphthol AS-TR phosphate], [P₆₆₆₁₄]₂[naphthol AS-TR phenolate]Cl, [9-AO][TFPB], [18-AO][TFPB]を溶媒抽出法にて調製した。組成比はプロトン NMR 測定の積分値から確認した。

3 - 2 ナノエマルジョン(NE)作製

3 - 1で調製したイオン対を用いて NE を作製した。[P₆₆₆₁₄]₂[naphthol AS-TR phosphate]製 NE を P-NE, [P₆₆₆₁₄]₂[naphthol AS-TR phenolate]Cl 製 NE を O-NE, [18-AO][TFPB]と[P₆₆₆₁₄]₂[naphthol AS-TR phosphate]製 NE を 18-AO/P-NE, [9-AO][TFPB]と[P₆₆₆₁₄]₂[naphthol AS-TR phosphate]製 NE を 9-AO/P-NE とそれぞれ表記した。Table 1 ~ 3 の組成の NE 材料(8 mg)と界面活性剤 F-127(10 mg)をメタノール 1.5 mL に溶解させ、NE プレ溶液を調製した。NE プレ溶液 1 mL をそれぞれ超純水 9 mL と混和し、超音波を 5 分かけ攪拌した。その後、窒素置換によりメタノールを除去し、NE を作製した。DLS

測定の結果, 粒子径は約 160-180 nm 程度であった。

Table 1 18-AO/P-NE composition

	[P ₆₆₆₁₄] ₂ [naphthol AS-TR phosphate]	[18-AO][TFPB]
P-NE	100 wt%	0 wt%
18-AO(0.5)/P-NE	99.5 wt%	0.5 wt%
18-AO(1)/P-NE	99 wt%	1 wt%
18-AO(3)/P-NE	97 wt%	3 wt%
18-AO(5)/P-NE	95 wt%	5 wt%
18-AO(10)/P-NE	90 wt%	10 wt%
18-AO(15)/P-NE	85 wt%	15 wt%
18-AO(20)/P-NE	80 wt%	20 wt%

Table 2 O-NE composition

	[P ₆₆₆₁₄] ₂ [naphthol AS-TR phenolate]Cl
O-NE	100 wt%

Table 3 9-AO(1)/P-NE composition

	[P ₆₆₆₁₄] ₂ [naphthol AS-TR phosphate]	[9-AO][TFPB]
9-AO(1)/P-NE	99 wt%	1 wt%

3 - 3 試料溶液調製と ALP 応答性評価

緩衝溶液(Buffer)は 10 mM HEPES-NaOH pH 9.0 を使用した。ALP 試料溶液の調製方法は次の通りである。19.7 U/μL の ALP(原液)を 2 μL とり, 998 μL の Buffer で希釈して 40000 U/L の ALP 試料溶液を調製した。40000 U/L の ALP 試料溶液を Buffer で 10 倍希釈し, 4000 U/L の ALP 試料溶液を調製した。同様にして, 400 U/L, 40 U/L, 4 U/L の ALP 試料溶液を調製した。

これらを各 NE 溶液と混和し, 吸光度測定あるいは蛍光強度測定で評価した。

4 . 研究成果

4 - 1 ALP 応答性評価

P-NE を用いた ALP 応答性確認では, 用いる蛍光色素の励起・蛍光波長とのオーバーラップの少ない比較的短波長の発色 ALP 基質である市販の naphthol AS-TR phosphate と疎水性 4 級ホスホニウムカチオン(P₆₆₆₁₄)のイオン対(液体)([P₆₆₆₁₄]₂[naphthol AS-TR phosphate])を ALP 応答分子として用いた。初めに, NE 中のリン酸化合物(naphthol AS-TR phosphate)と水相中の ALP が油水界面で酵素反応を起こすことを確認するために, [P₆₆₆₁₄]₂[naphthol AS-TR phosphate]含有 NE(P-NE)を用いて ALP 応答性評価を行った。また, NE 中の naphthol AS-TR phosphate が ALP により脱リン酸化された際にどのようなスペクトルが得られるか考察するために, [P₆₆₆₁₄]₂[naphthol AS-TR phenolate]Cl 含有 NE(O-NE)を用いて酸塩基応答を確認した。その結果, P-NE の場合は Buffer 混和時にバックグラウンドがわずかに上がるもののスペクトル変化がほぼないのに対し, ALP 混和時は時間経過とともに 415 nm 付近のスペクトルの増加がみられた(Fig. 2 左)。一方, O-NE の場合は naphthol AS-TR phenolate が NaOH によって脱プロトン化していると考えられる際は 415 nm 付近にピークが確認される(Fig. 2 右)ことと併せて考えると, Fig. 2 左の結果は, NE 中の naphthol AS-TR phosphate が ALP との酵素反応により脱リン酸化され, naphthol AS-TR phenolate となったため

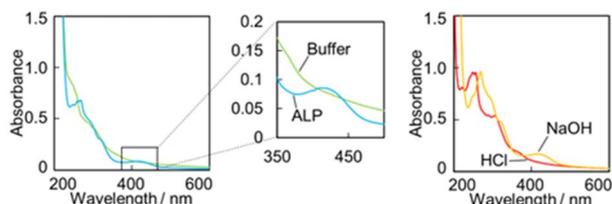


Fig. 2 Absorption spectra of P-NE (left) with or without ALP, and those of O-NE in acid or base solutions (right).

であると考えられる。以上のことより、NE 中の naphthol AS-TR phosphate が水相中の ALP と油水界面酵素反応を起こすことが確認できた。

続いて基質部位・蛍光部位を分子として独立させた新しい発色機構の ALP 応答性 NE 実証のために、まず色素を 10 wt% 含む 18-AO(10)/P-NE で NE を作製し、ALP 応答性を評価した (Fig. 3)。その結果、Buffer 混和時の蛍光強度より、ALP 混和時の蛍光強度が小さくなった。これは NE 中の naphthol AS-TR phosphate が ALP との酵素反応により脱リン酸化された際、NE 中の電荷バランスを保つためにカチオン性色素である 18-AO が NE バルクから油水界面に移動したためと考えられる。この結果から、基質部位・蛍光部位を分子として独立させた NE の油水界面酵素反応に伴う全く新しい ALP 応答機構を確認した。

4 - 2 NE 組成の最適化

想定している応答機構では AO の疎水性の違いで ALP 応答時の AO の水相側への移動しやすさが変わると考えられる。そこで、18-AO と 9-AO での ALP 応答性の違いを調べ、本法における AO アルキル鎖長の ALP 応答性への影響を調べた (Fig. 4)。さらに、疎水性の高いカチオンである tetrabutylammonium ion (TBA⁺) を ALP 応答後の試料溶液に過剰量添加して蛍光強度を測定し、NE 中 AO を強制的に油水界面へ移動させた際の蛍光強度を調べた。まず Buffer 混和時と TBA⁺ 混和時の蛍光強度差をみると、18-AO に比べて 9-AO は蛍光強度差がほとんどなかった。これは臭素塩の分子としては水溶性を示す 9-AO の場合、NE 作製時にすでに水相側へ移動してしまっているためと考えられる。続いて Buffer 混和時と ALP 混和時の蛍光強度差をみると 18-AO のほうが、9-AO に比べて大きくなった。また ALP 混和時の蛍光強度の経時変化をみると、18-AO は酵素反応の時間スケールで徐々に蛍光強度が下がっているのに対し、9-AO は変化があまり見られなかった。これは、上記同様 9-AO が NE 作製時に油水界面あるいは水相側へすでに移動してしまっているため、酵素反応が起こっても環境が変化しないためだと考えた。以上の結果から、AO の疎水性は本法において重要な要素であり、また今回の検討では 18-AO のほうが 9-AO に対して適当であることがわかった。今後の検討は 18-AO を用いて行った。

ALP 応答性を向上させるために、基質部位 ([P₆₆₆₁₄]₂[naphthol AS-TR phosphate]) に対する蛍光部位 ([18-AO][TFPB]) 比率を検討し、ALP 応答性にどのような違いがみられるか調べた (Fig. 5)。検討した比率は [P₆₆₆₁₄]₂[naphthol AS-TR phosphate] : [18-AO][TFPB] = 99.5 : 0.5, 99 : 1, 97 : 3, 95 : 5, 90 : 10, 85 : 15, 80 : 20 である。また、感度を比較するため、Buffer 混和時と ALP 混和時の蛍光強度差を縦軸にとりグラフを作成した。まず [18-AO][TFPB] 比率 0.5 wt% と 1 wt% を比較すると、1 wt% のほうが蛍光強度差が大きくなることがわかった。これは NE 中の AO 濃度増加に従って蛍光強度が増加するため、ALP 混和時と Buffer 混和時の相対的な変化量も増加したと考えられる。

一方、[18-AO][TFPB] 比率 1 wt% から 20 wt% までを比較すると、[18-AO][TFPB] 比率が上がるにつれて ALP 応答性が下がることがわかった。これは、NE 中の AO 濃度上昇で濃度消光により初期蛍光強度が下がるため、ALP 混和時と Buffer 混和時の相対的な変化量が小さくなったと考えている。以上のことから、今回提案した NE では基質部位・蛍光部位の比率の検討から高感度化できることが示唆された。また次の検討では最も大きな蛍光強度差が得られた [P₆₆₆₁₄]₂[naphthol AS-TR phosphate] : [18-

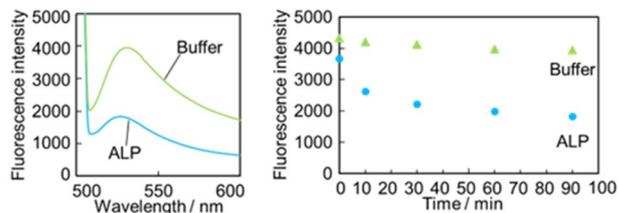


Fig. 3 Fluorescence spectra of 18-AO(10)/P-NE (left) and response profiles (right).

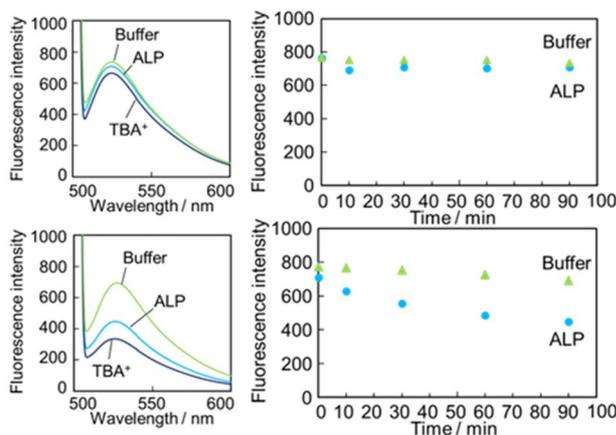


Fig. 4 Fluorescence spectra and time response profiles of 9-AO/P-NE (top) and 18-AO/P-NE (bottom).

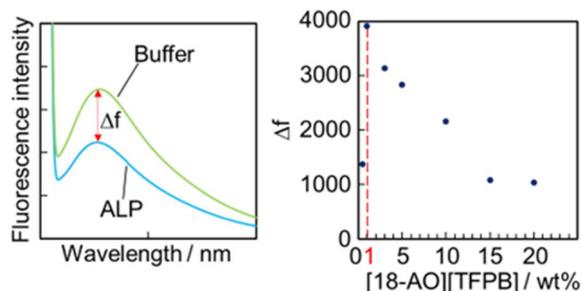


Fig. 5 Definition of fluorescence intensity difference (left) and change in fluorescence intensity difference for ALP response to composition ratio of fluorescent dye in NE (right).

AO][TFPB] = 99 : 1 を採用した.

4 - 3 ALP 濃度依存性確認

最後に新規 ALP 応答性 NE の ALP 濃度依存性を調べた(Fig. 6). その結果, ALP の増加に従って, 蛍光強度が低下し, ALP 濃度依存性を示すことがわかった. また, 応答範囲は 20-2000 U/L であった. この応答範囲は過去に蛍光基質を用いて行った研究と比較して 1 桁高濃度であった. 応答機構が異なるため, 同等の比較は困難であるが, 酵素反応に伴う NE 内電荷バランスの変化だけで NE 中蛍光分子の存在位置を偏らせるアプローチであるため, 水相中のイオン強度等も影響していると考えられる. この点はさらなる検討が必要である.

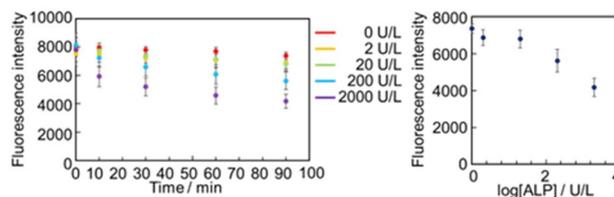


Fig. 6. Time response profiles (left) and calibration curve (right) of 18-AO(1)/P-NE for various concentration of ALP.

本研究では, 一般的な蛍光基質を用いずに基質部位と蛍光部位を分子として独立させた全く新しい応答機構の酵素応答性 NE 型オプトードの提案・実証を行った. はじめに, 新しい応答機構の酵素応答性 NE に用いるリン酸化合物(naphthol AS-TR phosphate)が ALP と油水界面酵素反応を起こすことを確認した. 次に, 基質部位と蛍光部位を分子として独立させた全く新しい応答機構の酵素応答性 NE 型オプトードの ALP 応答評価を行い, ALP 試料混和時の蛍光強度が時間とともに低下することが確認できた. これは NE 中の naphthol AS-TR phosphate が油水界面での酵素反応により脱リン酸化された際, NE 中の電荷バランスを保つためにカチオン性色素である AO が NE のバルクから油水界面へ移動したためと考えられる. このことから, 基質部位・蛍光部位を分子として独立させた新しい応答機構の ALP 応答性 NE が実現できることを実証した. さらに色素の疎水性が ALP 応答性に寄与することや, NE 中の色素比率の検討により濃度消光を抑え, ALP 応答性を向上できることがわかった.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kaho Maki, Ryoutarou Oishi, Tatsumi Mizuta, Kenji Sueyoshi, Tatsuro Endo and Hideaki Hisamoto	4. 巻 147
2. 論文標題 Chloride ion-selective dye liquid nanoemulsion: improved sensor performance due to intermolecular interactions between dye and ionophore	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analyst	6. 最初と最後の頁 1529-1533
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2AN00115B	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 -

1. 著者名 和田 奈由子, 末吉 健志, 遠藤 達郎, 久本 秀明	4. 巻 in press
2. 論文標題 基質部位・蛍光部位を独立させる新規応答機構の酵素応答性 ナノエマルジョン型オプトードの開発	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BUNSEKI KAGAKU	6. 最初と最後の頁 in press
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 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9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 和田奈由子, 末吉健志, 遠藤達郎, 久本秀明
2. 発表標題 酵素基質・色素液体に基づく酵素応答性オプトードの基礎検討
3. 学会等名 日本分析化学会 第82回分析化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧佳穂, 大石綾太郎, 水田巽, 末吉健志, 遠藤達郎, 久本秀明
2. 発表標題 アニオン選択性色素液体ナノエマルジョンの開発：エマルジョン内色素 - イオノフォア間相互作用による応答性能向上
3. 学会等名 日本分析化学会 第82回分析化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久本秀明
2. 発表標題 高機能センシング材料・多機能集積マイクロ分析デバイスの基盤技術開発研究
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久本秀明
2. 発表標題 疎水性極限濃度色素液体材料の開発と 高性能化学センシング系・デバイスへの展開
3. 学会等名 第98回 化学センサー研究会（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧佳穂，末吉健志，遠藤達郎，久本秀明
2. 発表標題 高感度イオン検出を志向した色素液体ナノエマルジョンの開発とマイクロ分析デバイスへの応用
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第44回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kaho Maki, Kenji Sueyoshi, Tatsuro Endo, Hideaki Hisamoto
2. 発表標題 Ionic liquid-based dye (IL-Dye) nanoemulsion (NE) as a high-sensitivity ion sensing component of micro analytical devices
3. 学会等名 The 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田奈由子、末吉健志、遠藤達郎、久本秀明
2. 発表標題 基質部位・発光部位を独立させた新規酵素応答性ナノエマルジョンセンサー開発の基礎検討
3. 学会等名 日本分析化学会第72年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安田悠一郎、末吉健志、遠藤達郎、真栄城正寿、渡慶次学、久本秀明
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスによる色素液体ナノエマルジョン作製方法の検討
3. 学会等名 第83回分析化学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yu Koizumi, Shuto Oka, Kenji Sueyoshi, Tatsuro Endo, Hideaki Hisamoto
2. 発表標題 Ionic liquid-based dye nanoemulsion using merocyanine dye: highly-sensitive and rapidly-responsive ion-sensing component of hydrogel-based microanalytical devices
3. 学会等名 The 27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------