

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32621

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24655069

研究課題名(和文) デンドリマーを基盤とする新規な分子認識界面の開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular recognition surface based on dendrimers

研究代表者

早下 隆士 (Hayashita, Takashi)

上智大学・理工学部・教授

研究者番号：70183564

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)：人工系での高度なイオン・分子識別の実現には、生体系のレクチンタンパクのような空間規制された多点認識サイトの設計が不可欠である。本研究では、樹木状高分子であるデンドリマー表面に、ボロン酸型プローブ、ジピコリルアミン型プローブを修飾することにより、糖、金属イオン、リン酸誘導体、細菌の選択的検出が可能となる、空間規制された多点認識サイトを有する分子認識界面を構築することに成功した。

研究成果の概要(英文)：For realizing highly selective ion and molecule recognition by artificial sensors, it is quite important to design a multipoint recognition site possessing spacial regulation such as lectin in the biological systems. In this study, selective recognition of sugars, metal ions, phosphate derivatives, and bacteria have been successfully performed by constructing the spacially regulated multipoint recognition sites of boronic acid probes and dipicolylamine probes on the surface of dendrimers known as the woody type polymer.

研究分野：分析化学

キーワード：分子認識 機能界面 フェニルボロン酸 ジピコリルアミン錯体 糖認識 アニオン認識 細菌認識 デンドリマ

1. 研究開始当初の背景

近年、国内外において、超分子の概念を導入した「動的分子認識機能」を持つ人工ホストの開発が進められている。これは、複数の分子が弱い相互作用によって結合した超分子複合体では、協同的な作用によって個々の構成分子の持つ機能の和を超えた新しい機能の発現が期待できるためである。我々は、ボロン酸型蛍光プローブ/シクロデキストリン (CD) 複合体を新規に設計し、CD内での光誘起電子移動反応を利用した発蛍光型の全く新しい糖認識システムを報告した。また、ボロン酸型アゾ色素プローブ/ β -CD 複合体においては、CD 空洞のキラリティーに基づくアゾ色素の誘起円二色性スペクトルや、色素の二量体形成に伴う吸収スペクトル変化を光情報として取り出すことに成功している。このように色素間の励起子相互作用に基づく吸収スペクトルは、その空間構造配置である H 会合や J 会合構造で大きく異なる。そこで本研究ではこの点に着目して、分子認識型の色素プローブを樹木状高分子として知られる dendrimer の表面に集積させた新しい応答原理のソフト界面の開発を提案した。

2. 研究の目的

人工のイオン・分子認識センサーとして、フェニルボロン酸と糖のエステル形成反応を利用した糖センサーや、ジピコリルアミン金属錯体とリン酸イオンの配位結合を利用したアニオンセンサーが、既に数多く報告されている。一方、多点認識を使って糖やリン酸誘導体への選択性を向上させる試みも数例あるが、有機合成による認識サイトの構築には限界があり、複雑な糖鎖を識別できる研究レベルには至っていない。人工系での高度なイオン・分子識別の実現には、生体系のレクチンタンパクのような空間規制された多点認識サイトの設計が不可欠である。そこで本研究では、複雑な生体分子を識別できる空間規制された多点認識サイトの実現を目的として、新規のソフトインターフェイスとなる様々な dendrimer 世代を用いる分子認識界面の構築を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

世代の異なる dendrimer 表面へ化学修飾するボロン酸型ルテニウム錯体 $[Ru^{II}(acac)_2(4-Bpy)(4-Cpy)](Ru-bpy-cpy)$ 、ジピコリルアミン型アゾプローブ (dpa-azo-Cb)、およびジピコリルアミン型蛍光プローブ (dpa-HCC) の分子設計を行った。プローブ合成の確認は、 1H -NMR 法、質量分析法、および元素分析法で行った。それぞれの dendrimer 複合体の機能評価には、紫外・可視吸光度法、蛍光光度法、および微分パルスボルタンメトリー (DPV) 法を用いた。凝集状態の確認には、動的光散乱法、共焦点蛍光顕微鏡、および走査型電子顕微鏡を用いた。

4. 研究成果

(1) ボロン酸型ルテニウム錯体/dendrimer 複合体による糖認識

dendrimer は規則的に分岐を繰り返す樹木状の高分子である。このような特徴的な構造を有することから、dendrimer は以下に示すような他の高分子には見られない種々の特徴を持つ。高分子にもかかわらず、分子量分布が非常に狭い、均一な分子量をもつ分子である。末端に反応性の官能基を多数有していることから、dendrimer 末端を修飾することで多点認識機能を持った化学センサーの設計が期待できる。そこで、dendrimer 末端にアミノ基を有する polyamidoamine (PAMAM) dendrimer 表面に、結合部位としてカルボン酸基、分子認識部位としてフェニルボロン酸を有する電極反応活性ルテニウム錯体

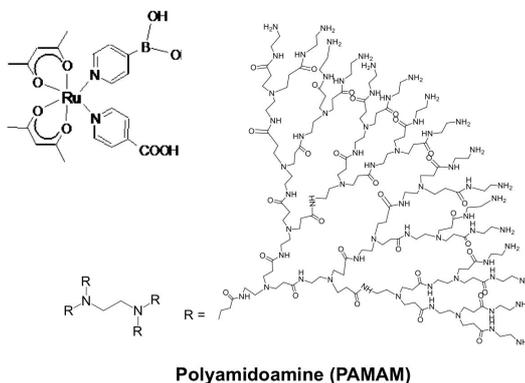


図1 Ru-bpy-cpy および PAMAM dendrimer の構造

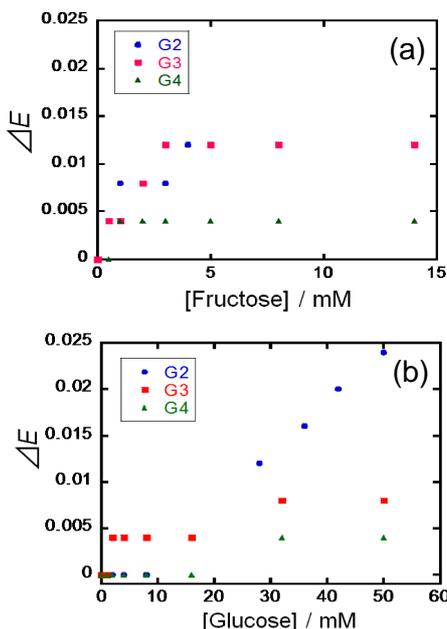


図2 糖の電位応答に及ぼす dendrimer の世代効果. Ru-bpy-cpy/PAMAM (G2, G3, G4) 複合体. 20% MeOH-80% water (v/v), pH 7.0 (リン酸緩衝液).

[Ru^{II}(acac)₂(4-Bpy)(4-Cpy)] (Hacac: acetylacetonate, 4-Bpy: 4-boronic pyridine, 4-Cpy: 4-carboxylic pyridine : **Ru-bpy-cpy**) を静電相互作用により集積させ、糖の電気化学的検出を行った(図1)。糖認識機能の評価には、高い電流感度と電位検出能を有する微分パルスボルタンメトリー(DPV)法を用いている。

フルクトースを **Ru-bpy-cpy/PAMAM-G2** 溶液に添加した時、元の **Ru-bpy-cpy/PAMAM-G2** の波の負電位側に新たなピークが生じる。グルコースやガラクトースを添加した時には電位シフトは小さく、電位シフトを見ることによって選択的にフルクトースを検出できることが明らかとなった。また、PAMAM デンドリマーの世代を変えて同様の測定を行ったところ、世代の低い方が糖に対する応答が高くなった(図2)。これは用いた錯体がシス型で、糖の認識部位であるフェニルボロン酸が PAMAM デンドリマーの内側に向いているため、ターゲットである糖分子がボロン酸部位に近接できる程度の間隙が必要であることを示している(図3)。

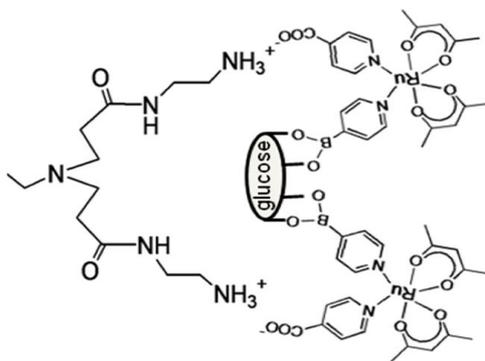


図3 **Ru-bpy-cpy/PAMAM (G2)** 複合体によるグルコース認識。

(2) ジピコリルアミン型アゾプロブ/デンドリマー複合体によるイオン認識

dpa-azo-Cb 単体, **dpa-azo-Cb/PAMAM₆₄(G4)** 複合体(図4)に Zn²⁺, Co²⁺を添加した際の吸収スペクトルを図5a に示した。金属錯体を形成することで、**dpa-azo-Cb** 単体、**dpa-azo-Cb/PAMAM₆₄** 複合体ともに大きな長波長シフトをした。デンドリマー複合体では Co²⁺添加による波長シフトが最も大きく、最大吸収波長が 366 nm から 422.5 nm へシフトした。また、Co²⁺添加時にのみ、長波長側に吸収帯が見られた。プローブ単体の波長シフトの大きさをまとめたグラフを図5b に、デンドリマー複合体のグラフを図5c に示した。波長シフトの大きさは、Co²⁺ > Cd²⁺ > Ni²⁺ > Cu²⁺ > Zn²⁺ > Pb²⁺の順となり、プローブ単体とは異なる結果となった(図5b)。金属錯体を形成する際の **dpa-azo-Cb/PAMAM₆₄** の水酸基の解離により、アゾプロブの吸収スペクトルの変化を確認することが出来た。**dpa-azo-Cb/PAMAM₆₄** を Zn²⁺, Co²⁺に配位さ

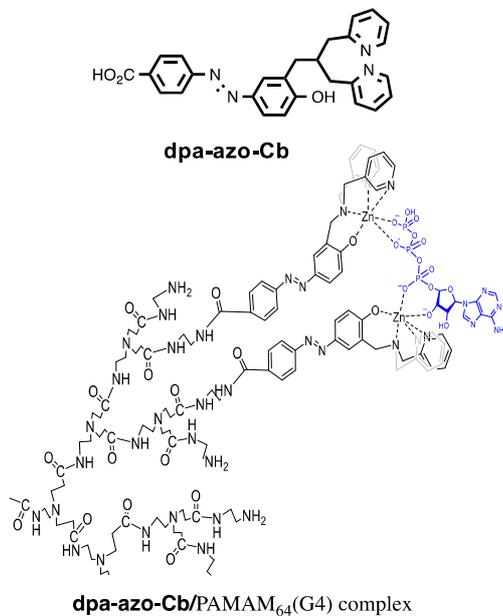


図4 **dpa-azo-Cb/PAMAM (G2)** 複合体の構造

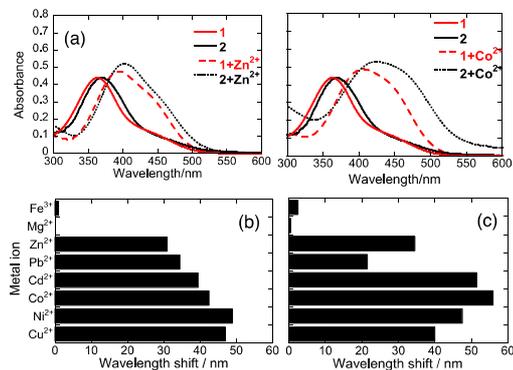


図5 **dpa-azo-Cb**および**dpa-azo-Cb/PAMAM₆₄**複合体の金属イオン応答. 1: **dpa-azo-Cb** [2% DMSO-98% water (v/v)], 2: **dpa-azo-Cb/PAMAM₆₄**複合体 [5% DMSO-95% water (v/v)], [dpa-azo-Cb] = 0.02 mM, [dpa-azo-Cb/PAMAM₆₄複合体] = 0.15 g/dm³, [MNO₃] = 0.02 mM.

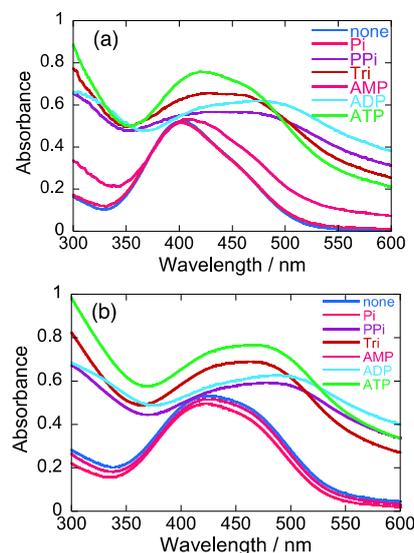
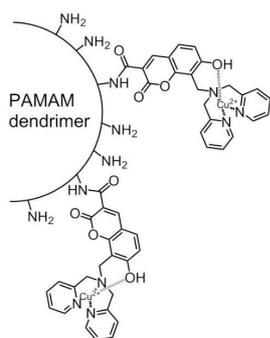


図6 **M-dpa-azo-Cb/PAMAM₆₄**複合体のアニオン応答. **dpa-azo-Cb/PAMAM₆₄**複合体 [5% DMSO-95% water (v/v)], [dpa-azo-Cb/PAMAM₆₄複合体] = 0.15 g/dm³, [MNO₃] = 0.02 mM. (a) Zn錯体, (b) Co錯体.

せ (**Zn-dpa-azo-Cb/PAMAM₆₄**, **Co-dpa-azo-Cb/PAMAM₆₄**)、各種リン酸誘導体 (トリリン酸 (Tri), ピロリン酸 (PPI), モノリン酸 (Pi), ATP, ADP, AMP) を添加した際の吸収スペクトル測定を行った (図 6) 。 **M-dpa-azo-Cb/ PAMAM₆₄** 複合体は、ポリリン酸類イオン添加によってスペクトルに変化を生じた。この超分子複合体に各種リン酸誘導体を添加すると、PPI、Tri、ADP、ATP に対して複合体の凝集が確認された。アゾ由来の吸光度は ATP、濁度としては ADP が最も高い値を示した。また DLS 測定からも凝集体形成に関する考察が得られた。超分子形成を行うことで各種リン酸イオンに対して特異的挙動を起こし、超分子センサーとしての機能を確認することができた。

(3) ジピコリルアミン型蛍光プローブ/ dendリマー複合体による細菌認識

近年、食品工場や病院において、安全・安心への注目が高まる中、衛生管理が課題となっている。国民の食中毒リスク低減を目的として、食品および調理器具等中の病原菌の迅速検出法の向上が望まれている。蛍光プローブは簡便で高感度、非破壊的であるので、簡便な安全衛生管理が可能となる細菌検出システムを実現することが期待されている。本研究では、蛍光団にクマリン誘導体を、金属イオン認識部位にジピコリルアミノ基を有する蛍光プローブを、生物学的適用性の高いポリアミドアミン (PAMAM) dendリマーに修飾させた細菌センサー (図 7) の開発を行った。



**Cu-dpa-HCC/
PAMAM dendrimer**

図 7 Cu-dpa-HCC/PAMAM dendリマーの構造

まず **dpa-HCC/PAMAM** dendリマー複合体の **dpa-HCC** の修飾数と dendリマーの世代の効果を調べるため、世代 2~5 の dendリマーを用い、表面修飾の割合を変えたプローブをそれぞれ縮合反応により合成した。pH 7.4 下で、**Cu-dpa-HCC/PAMAM** dendリマー複合体に、病原性細菌であるグラム陰性菌の大腸菌 (*E.coli*) 及びグラム陽性菌の黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*) を添加して、

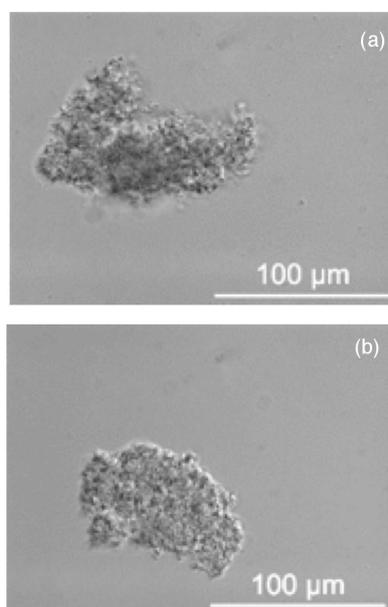


図 8 Cu-dpa-HCC/PAMAM dendリマーによる細菌検出. (a) Cu-dpa-HCC-17/PAMAM (G4) の *E.coli* に対する応答, (b) *S.aureus* に対する応答.

dpa-HCC の修飾数と dendリマー世代の違いにより凝集体形成にどのような影響を与えるか、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、*E.coli* 及び *S.aureus* を添加したところ、両細菌と **Cu-dpa-HCC-17/PAMAM** dendリマー複合体の凝集を確認することができた (図 8) 。 この凝集体の大きさは、**Cu-dpa-HCC/PAMAM** dendリマー複合体の **dpa-HCC** の修飾数によって違いは見られなかったが、 dendリマーの世代が高いものほど、凝集体が大きくなることが明らかとなった。

以上の研究成果に加え、ボロン酸を化学修飾した dendリマー複合体が、細菌の中のグラム陽性菌とグラム陰性菌を識別できることも分かってきた。また dendリマー以外のナノ粒子として、蛍光性シリカナノ粒子上に、**Cu-dpa-HCC** を化学修飾した複合体でも、細菌を凝集識別できることを見出している。これらの成果は、「構造体ならびにこれを用いた細菌の捕集および検出方法」として特許出願を行うことができた (特願 2013-191926) 。この様に、 dendリマー粒子界面に多点で働く分子認識サイトを構築することによって、高度な分子認識システムを構築できることを明らかにできたことが、本萌芽研究の大きな成果と言えるだろう。最後に、一緒に研究を頑張ってくれた研究室の学生諸氏に、心より感謝申し上げたい。

5 . 主な発表論文等 <2012-2014 年度 >

[雑誌論文] (計 17 件)

- (1) Y. Tsuchido, Y. Sakai, K. Aimu, T. Hashimoto, K. Akiyoshi, and T. Hayashita, Design of phenylboronic acid azoprobe/polyamidoamine

- dendrimer complexes as a supramolecular sensor for saccharide recognition in water, *New J. Chem.*, 査読有, **39**, 2015, 2620-2626. DOI: [10.1039/C4NJ01309C](https://doi.org/10.1039/C4NJ01309C)
- (2) Y. Tsuchido, K. Aimu, Y. Toda, T. Hashimoto, and T. Hayashita, Preparation of Saccharide Exchange Membrane Modified by Phenylboronic Acid Azoprobe/Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimer, *J. Ion Exchange*, 査読有, **25**(4), 2014, 146-150. DOI: [10.5182/jaie.25.146](https://doi.org/10.5182/jaie.25.146)
- (3) A. Endo, M. Kimura, T. Hashimoto, and T. Hayashita, Novel electrochemical sugar recognition system using ruthenium complex and phenylboronic acid assembled on gold nanoparticles, *Anal. Methods*, 査読有, **6**, 2014, 8874-8877. DOI: [10.1039/C4AY01716A](https://doi.org/10.1039/C4AY01716A)
- (4) K. Nonaka, M. Yamaguchi, M. Yasui, S. Fujiwara, T. Hashimoto, and T. Hayashita, Guest-induced supramolecular chirality in a ditopic azoprobe-cyclodextrin complex in water, *Chem. Commun.*, 査読有, **50**, 2014, 10059-10061. DOI: [10.1039/c4cc04227a](https://doi.org/10.1039/c4cc04227a)
- (5) H. Kobayashi, K. Katano, T. Hashimoto, and T. Hayashita, Solvent Effect on Fluorescence Response of Hydroxycoumarin Bearing Dipicolylamine Binding Site to Metal Ions, *Anal. Sci.*, 査読有, **30**(11), 2014, 1045-1050. DOI: [10.2116/analsci.30.1045](https://doi.org/10.2116/analsci.30.1045)
- (6) T. Hashimoto, M. Yamazaki, H. Ishii, T. Yamada, and T. Hayashita, "Design and Evaluation of Selective Recognition on Supramolecular Gel Using Soft Molecular Template Effect", *Chem. Lett.*, 査読有, **43**(2), 2014, 228-230. DOI: [10.1246/cl.130902](https://doi.org/10.1246/cl.130902)
- (7) A. A. Kiswandono, D. Siswanta, N. H. Aprilita, S. J. Santosa, and T. Hayashita, Extending the Life Time of Polymer Inclusion Membrane Containing Copoly(Eugenol-DVB) as Carrier for Phenol Transport, *Indo. J. Chem.*, 査読無, **13**(3), 2013, 254-261.
- (8) R. Ariadi Lusiana, D. Siswanta, Mudasir, and T. Hayashita, The Influence of PVA.citric acid/chitosan membrane hydrophilicity on the transport of creatinine and urea, *Indo. J. Chem.*, 査読無, **13**(3), 2013, 262-270.
- (9) D. Mandal, S. M. T. Abtab, A. Audhya, E. R. T. Tiekink, A. Endo, R. Clérac, and M. Chaudhury, Targeted syntheses of homo- and heterotrinary complexes involving M^{II} - Ni^{II} - M^{II} ($M = Ni, Cu, \text{ and } Pd$) nonlinear core: Structure, spectroscopy, magnetic and redox studies, *Polyhedron*, 査読有, **52**, 2013, 355-363. DOI: [10.1016/j.poly.2012.09.006](https://doi.org/10.1016/j.poly.2012.09.006)
- (10) 早下隆士, "シクロデキストリンを用いる糖認識センサーの開発", *オレオサイエンス*, 査読無, **13**(3), 117-122 (2013).
- (11) A. Endo, H. Minesaka, T. Hashimoto, and T. Hayashita, Electrochemical sugar recognition using a ruthenium complex with boronic acid assembled on polyamidoamine (PAMAM) dendrimer, *Anal. Methods*, 査読有, **4**, 2012, 2657-2660. DOI: [10.1039/c2ay25518a](https://doi.org/10.1039/c2ay25518a)
- (12) K. Bhattacharya, M. Maity, D. Mondal, A. Endo, and M. Chaudhury, Targeted Synthesis of Heterobimetallic Compounds Containing a Discrete Vanadium(V)- μ -Oxygen-Iron(III) Core, *Inorg. Chem.*, 査読有, **51**(14), 2012, 7454-7456. DOI: [10.1021/ic301054r](https://doi.org/10.1021/ic301054r)
- (13) T. Hashimoto, S. Oyaidu, and T. Hayashita, Design and Function of Novel Azoprobe Possessing Multipoint Binding Sites for Dopamine Recognition, *Bunseki Kagaku*, 査読有, **61**, 2012, 213-219. DOI: [10.2116/bunsekikagaku.61.213](https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.61.213)
- (14) P. Anitha, R. Manikandan, A. Endo, T. Hashimoto, P. Viswanathamurthi, Ruthenium(II) complexes containing quinone based ligands: Synthesis, characterization, catalytic applications and DNA interaction, *Spectrochim. Acta Part A*, 査読有, **99**, 2012, 174-180. DOI: [10.1016/j.saa.2012.09.019](https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.09.019)
- (15) S. Priyarega, D. S. Raja, S. G. Babu, R. Karvembu, T. Hashimoto, A. Endo, and K. Natarajan, Novel binuclear palladium(II) complexes of 2-oxoquinoline-3- carbaldehyde Schiff bases: Synthesis, structure and catalytic applications, *Polyhedron*, 査読有, **34**, 2012, 143-148. DOI: [10.1016/j.poly.2011.12.017](https://doi.org/10.1016/j.poly.2011.12.017)
- (16) M. Kumai, S. Kozuka, M. Samizo, T. Hashimoto, I. Suzuki, and T. Hayashita, Glucose Recognition by a Supramolecular Complex of Boronic Acid Fluorophore with Boronic Acid-Modified Cyclodextrin in Water, *Anal. Sci.*, 査読有, **28**, 2012, 121-126. DOI: [10.2116/analsci.28.121](https://doi.org/10.2116/analsci.28.121)
- (17) N. Kundu, S. M. T. Abtab, S. Kundu, A. Endo, S. J. Teat, and M. Chaudhury, Triple-Stranded helicates of Zinc(II) and Cadmium(II) involving a new redox-active multiring nitrogenous heterocyclic ligand: Synthesis, structure, and electrochemical and photophysical properties, *Inorg. Chem.*, 査読有, **51**(4), 2012, 2652-2661. DOI: [10.1021/ic202595p](https://doi.org/10.1021/ic202595p)

〔学会発表〕(計 58 件)

- (1) 堀内良介・土戸優志・小林広幸・橋本剛・早下隆士, "細菌検出能を有するフェニルボロン酸/デンドリマー複合体の開発", 日本化学会第95春季年会, 日本大学理工学部, 2015年3月26日~29日(千葉県船橋市).
- (2) T. Hashimoto, K. Katano, H. Kobayashi, K. Ogura, T. Hayashita, "Development of Supramolecular Fluorescent Probe/Cyclodextrin Complex Sensors Possessing Dipicolylamine Unit as Recognition Site (招待講演)", 6th International Conference of Ion Exchange, (ICIE2014), 沖縄コンベンションセンター, 2014年11月9日~12日(沖縄県宜野湾市)
- (3) 土戸優志・川名陽方・橋本剛・早下隆士, "PAMAM デンドリマーを用いた分子認識", 第74回分析化学討論会, 日本大学郡山キャンパ

ス, 2014年5月24日~25日(福島県郡山市)
他 10件 (2014年度)

- (14) 松田涼・遠藤明・橋本剛・早下隆士, “デンドリマー/ボロン酸ルテニウム錯体を用いた電気化学的糖認識”, 錯体化学会第63回討論会, 琉球大学千原キャンパス, 2013年11月2日~4日(沖縄県中頭郡)
- (15) A. Koshino, Y. Hattori, T. Hashimoto, and T. Hayashita, “Development of Chromogenic Sugar Sensor Using Molecular Imprinting on the Surface of Dendrimer”, The Twelfth Asian Conference on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XII), 九州大学病院キャンパス, 2013年8月22日-24日(福岡県博多市).
他 12件 (2013年)
- (28) 竹下 尚貴・橋本 剛・早下 隆士, “ジピコリルアミノ型アゾプローブ/シクロデキストリン複合体センサーの水中でのイオン認識機能”, 第28回日本イオン交換学会, 東京工業大学大岡山キャンパス, 2012年10月18日~19日(東京都目黒区)
- (29) 早下隆士, “超分子形成に基づく分離分析試薬の設計”, 第29回シクロデキストリンシンポジウム, 星薬科大学, 2012年9月6日~7日(東京).
他 29件 (2012年)

〔図書〕(計 4件)

- (1) 橋本剛, 早下隆士, “シクロデキストリンの科学と技術”, 第3編第9章「シクロデキストリン複合体を用いる糖認識センサーの開発」, シーエムシー(寺尾 啓二, 池田 宰 監修), pp.90-97, 2013年12月.
- (2) 岡田哲男, 早下隆士編, 「トコトンやさしいイオン交換の本」, (株)日刊工業新聞社, 160頁, 2013年6月.
- (3) 遠藤明, 立間徹, 青木幸一他, “電気化学/インピーダンス測定ノウハウと正しいデータ解釈”, 第3章第1節[2] 「In situ測定-電気化学との同時測定法と電極表面の評価方法」, pp.102-105(全632頁), (株)技術情報協会, 2013年5月31日
- (4) 早下隆士, 遠藤明, 橋本剛他, 「分析化学用語辞典(日本分析化学会編)〔分担執筆〕」, 全451頁, オーム社, 2012年10月.

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称: 構造体ならびにこれを用いた細菌の捕集および検出方法
発明者: 早下 隆士, 神澤 信行, 小林 広幸
権利者: 学校法人上智学院
種類: 特許
番号: 特願2013-191926
出願年月日: 2013年9月17日
国内外の別: 国内

〔その他〕

研究室ホームページ:

<http://www.mls.sophia.ac.jp/analysis/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早下 隆士 (HAYASHITA Takashi)
上智大学・理工学部・教授
研究者番号: 70183564

(2) 研究分担者

遠藤 明 (ENDO Akira)
上智大学・理工学部・准教授
研究者番号: 00119124

橋本 剛 (HASHIMOTO Takeshi)
上智大学・理工学部・助教
研究者番号: 20333049