

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25810051

研究課題名(和文) 分子認識による会合誘起発光を基盤とする分子情報センシング

研究課題名(英文) Translation of molecular structural information into fluorescence optical output via self-assembly

研究代表者

野口 誉夫 (Noguchi, Takao)

九州大学・工学(系)研究科(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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：会合誘起発光性色素を用いた蛍光センサ開発により、ATPやNADPH等のヌクレオチド類や代謝疾患のマーカーとなるジカルボン酸群固有の化学構造情報が、自己集合過程を経て、蛍光応答に変換される、自己集合を利用する分子情報変換システムを確立した。これは、自己集合を、分子組織体を構築するための「ボトムアップツール」から、分子構造情報を分子組織体に変換する「変換システム」と捉え直すことで達成され、従来の1:1ホスト-ゲスト結合に基づいたメカニズムとは異なる、自己集合という変換システムを活用した蛍光センシング系の提示に至った。

研究成果の概要(英文)：A new perspective of self-assembly was offered, in which self-assembly works as a functional system to translate the structural information on the target, via self-assembly morphology, eventually into the FL optical output. This cascade realized the fluorometric readout of a subtle difference in the target structures such as nucleotides and dicarboxylates. This study unveiled the potential ability of self-assembly as a sensory system, thus demonstrating a new fluorescence sensing system utilizing self-assembly phenomena.

研究分野：超分子化学

キーワード：蛍光センサ 会合誘起発光 自己集合 分子情報変換 ATP ジカルボン酸 代謝疾患 スクリーニング

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、その量や変化を鋭敏に検出し、評価できる技術が必要不可欠である。これまでに、標的分子固有の化学構造情報を検出可能なシグナルに変換するシステムとして、1:1 ホスト-ゲスト結合に基づく分子認識を利用した蛍光センシングシステムが開発され、細胞内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)や代謝疾患のマーカーとなるジカルボン酸を選択的に検出する蛍光センサが報告されてきた。しかしながら、この従来型の蛍光センサは、ATP 選択性が低い。ジカルボン酸に対しては、逆に、選択性が高いが故に、代謝疾患のマーカーとなる「ジカルボン酸群」の網羅的検出には不適といった問題がある。ATP 等のヌクレオチド類やジカルボン酸群といったバイオマーカーを迅速・簡便・高感度に検出できる蛍光センサ開発は、いまだ報告されていない。

その一方で報告者は、会合誘起発光を利用した蛍光センサを開発し、ATP と選択的に自己集合体を形成し蛍光応答を示すことを見出した。この ATP 選択性は、自己集合現象の利用によって初めて得られたものである。したがって、自己集合を、分子組織体を構築するための「ボトムアップツール」という従来の概念から、分子構造情報を分子組織体に変換する「変換システム」と捉え直すことで、分子情報の精密センシングが実現されるものと考え、本研究に取り組んだ。

2. 研究の目的

病態や疾患の指標となる生体由来アニオンの迅速・簡便・高感度検出を実現する、会合誘起発光に基づく蛍光センシングシステムを構築する。具体的には、図 1 に示す会合誘起発光性蛍光センサを合成し、

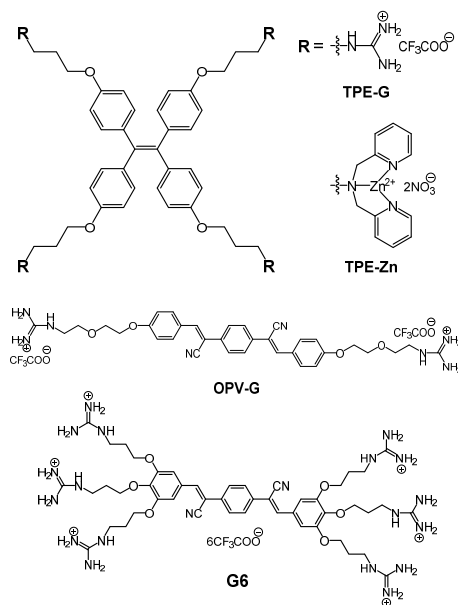


図 1. 蛍光センサの化学構造

- (1) 代謝活性や酸化ストレスの指標となる NADPH の選択的検出
 - (2) 代謝疾患のマーカーとなるジカルボン酸群の蛍光検出
 - (3) 自己集合を利用する分子情報変換システムの提示
 - (4) ATP の蛍光センシング
- を検討し、生細胞アッセイや臨床化学検査への応用に向けた基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) NADPH の選択的検出

NADPH を選択的に検出するには、図 2 に示す類似構造体の中から、リン酸基の数(=負電荷数)の差異を識別しなければならない。ここでは、TPE-G を用いた自己集合現象を利用することで、NADPH の選択的検出をおこなう。

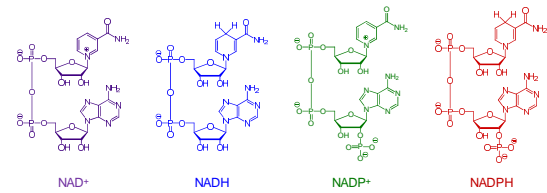


図 2. 代謝関連補酵素群(NAD+, NADH, NADP+, NADPH)の化学構造

(2) ジカルボン酸群の蛍光検出

ジカルボン酸尿症は、物質代謝経路の機能不全により、尿中に高濃度(mM オーダー)のジカルボン酸が排出される先天性代謝疾患であり、尿中の高濃度ジカルボン酸が代謝疾患のマーカーとなる。尿中に排出されるジカルボン酸の種類は、代謝経路または代謝に関わる酵素に依存するため、従来のような、標的ジカルボン酸の選択的検出では、この代謝疾患の診断は困難である。代謝疾患の迅速診断のためには、ジカルボン酸を網羅的に検出できる蛍光センサ開発が必要となる。ここでは、TPE-Zn とジカルボン酸との会合を利用することで、ジカルボン酸群(図 3)の網羅的蛍光検出をおこない、代謝疾患診断への応用可能性を探る。

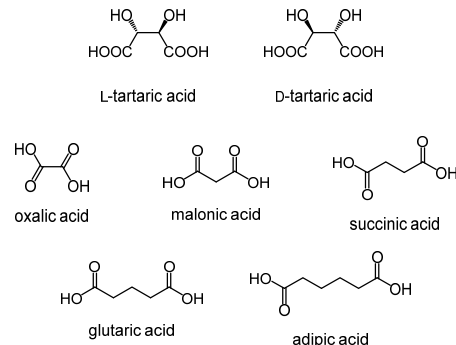


図 3. ジカルボン酸の化学構造

(3) 自己集合を利用する分子情報変換システムの提示

OPV-G を用い、酒石酸(L-体・meso-体)固有の分子構造情報が、自己集合過程を経て、蛍光応答にどう反映されるのかを検討するこ

とで、自己集合の「分子情報変換システム」としての側面を明らかにし、自己集合を利用する蛍光センシング系構築のための足掛かりとする。

(4) ATP の蛍光センシングに向けて

ATP を選択的に検出するには、図 4 に示す類似構造体の中から、リン酸基の数(=負電荷数)の差異を識別しなければならない。ここでは、G6 を用い、生理的塩濃度条件下での ATP センシングを検討し、臨床化学検査への応用展開を図る。

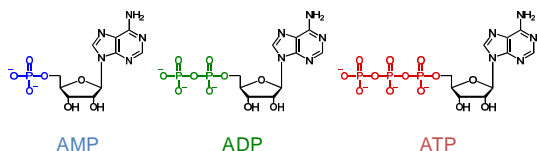


図 4. AMP, ADP, ATP の化学構造

4. 研究成果

(1) NADPH の選択的検出

TPE-G を用いて、化学構造が類似した 4 種の代謝関連補酵素(NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH) に対する蛍光応答を調査した(図 5)。蛍光応答が観測された、NADH 及び NADPH に関して、NADH は、TPE-G と会合体を形成せずに、NADH 自身の自家蛍光により直線的な蛍光応答を示していることが分かった。これに対して、NADPH は、TPE-G と会合体を形成し S 字型の turn-on 応答を示していることが明らかとなった。本結果は、TPE-G による NADPH の高 S/N 比検出と捉えることができ、細胞代謝活性のハイスループットスクリーニングへの応用が期待される。

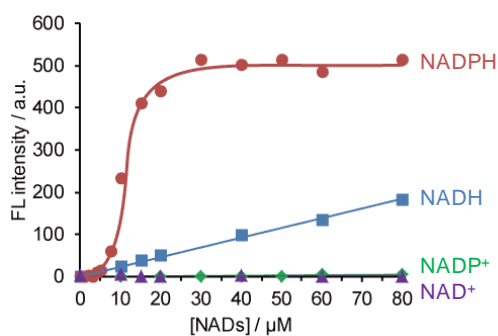


図 5. 代謝関連補酵素群に対する蛍光応答

(2) ジカルボン酸群の蛍光検出

TPE-Zn を用いて、酒石酸に対する蛍光応答を調査したところ、予想に反し、会合体を形成せずに蛍光を発することを見出した。種々の分光学的測定により、TPE-Zn は、酒石酸と環を形成するように「結合」した結果、TPE 骨格の運動性が低下し蛍光を発すると結論付け、ジカルボン酸センシングに応用可能な「Cyclization-induced emission (CIE)」として提示した。また、この CIE メカニズムにより、「ジカルボン酸応答性」を示したことから(図 6)、先天性代謝疾患のスクリーニ

ング検査に有用であることを提案した。

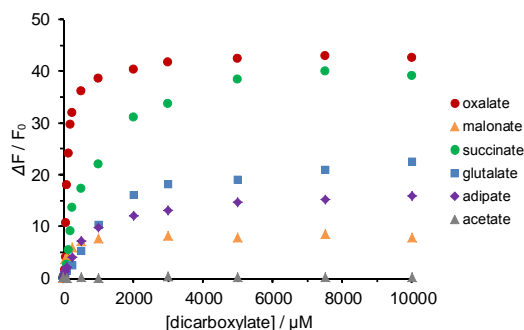


図 6. ジカルボン酸に対する蛍光応答

(3) 自己集合を利用する分子情報変換システムの提示

OPV-G を用い、酒石酸(L-体および meso-体) に対する蛍光応答を調査したところ、L-体添加により最大で 45 倍の蛍光増大を示したのに対し、meso-体では 18 倍に留まった。また、蛍光応答の立ち上がり濃度(濃度閾値)も L-体、meso-体で異なるという結果が得られた。OPV-G の集合挙動を UV 滴定により追跡したところ、L-体添加により J-会合体、meso-体添加では H-会合体を形成することが分かった。この会合体の違いは巨視的モルフォロジーにも現れ、L-体添加ではファイバー、meso-体添加では粒子状の集合体を形成することが AFM 観察により明らかとなった。このような、異なる集合挙動・蛍光応答を与える要因は、L-体と meso-体の安定配座の違い(L-体: anti, meso-体: gauche)であることが示唆された。

以上の結果から、OPV-G は、酒石酸構造(L-体: anti, meso-体: gauche)にアダプティブな集合過程・モルフォロジーをとることで、結果として酒石酸構造に固有な蛍光応答を与えたと言える(図 7)。これは、1:1 ホストゲスト結合に基づく分子認識を利用した蛍光センシングとは、全く異なるセンシングメカニズムである。本研究により、分子固有の化学構造情報が自己集合過程を経て蛍光応答に変換・増幅されるという、自己集合を利用する新たな分子情報変換システムの提示に至った。

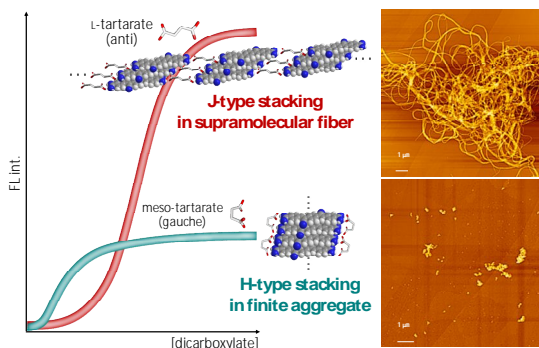


図 7. 自己集合を利用する分子情報変換システムの模式図

(4) ATP の蛍光センシングに向けて

会合誘起発光に基づく蛍光センサを応用するには、塩強度条件下でも自己会合せず、つまり発光せず、且つ、標的分子に対して選択的に自己集合して発光する蛍光センサ開発が必要となる。報告者は、新規蛍光センサ開発し、G6 が上記要件を満たすことを見出した。G6 は、生理的塩濃度条件下でも、自己会合しないことを確認した。次に、ヌクレオチド(AMP, ADP, ATP)に対する蛍光応答を調査した結果、ATP に対して選択的に蛍光応答を示すことが分かった(図 8)。また、この ATP 選択性のため、G6 は ATP 加水分解酵素の酵素活性評価にも応用可能であることも確認できた。

以上の結果から、蛍光センシングへの応用に向けた基礎的知見は得られた。今後、この知見を蛍光センサの分子設計にフィードバックし、臨床化学検査への応用展開を図る。

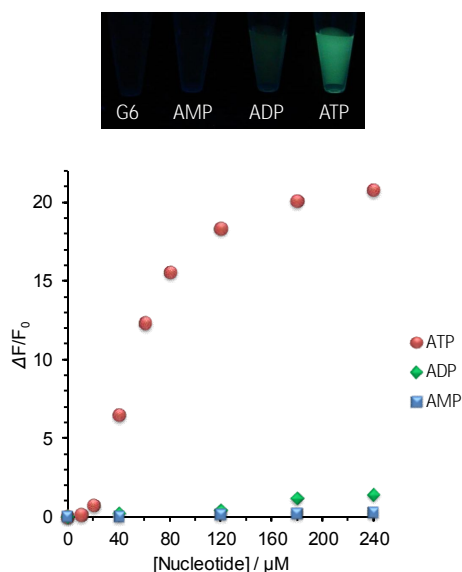


図 8. ATP に対する蛍光応答

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 4 件)

T. Noguchi, B. Roy, D. Yoshihara, Y. Tsuchiya, T. Yamamoto, S. Shinkai, Tailoring of the desired selectivity and the turn-on detection range in a self-assembly-based fluorescence sensory system. *Chemical Science*, 査読有, Vol. 5, 2015, in press, DOI: 10.1039/C5SC00863H.

T. Noguchi, B. Roy, D. Yoshihara, Y. Tsuchiya, T. Yamamoto, S. Shinkai, Translation of dicarboxylate structural information to fluorometric optical signals through self-assembly of guanidinium-tethered oligophenylenevinylene. *Chem. Eur. J.*, 査読有, Vol. 20, 2014, pp. 13938–13944, DOI: 10.1002/chem.201404028.

T. Noguchi, B. Roy, D. Yoshihara, Y. Tsuchiya, T. Yamamoto, S. Shinkai, Cyclization-induced

turn-on fluorescence system applicable to dicarboxylate sensing. *Chem. Eur. J.*, 査読有, Vol. 20, 2014, pp. 381–384, DOI: 10.1002/chem.201304031.

T. Noguchi, A. Dawn, D. Yoshihara, Y. Tsuchiya, T. Yamamoto, S. Shinkai, Selective detection of NADPH among four pyridine-nucleotide cofactors by a fluorescent probe based on aggregation-induced emission. *Macromol. Rapid Commun.*, 査読有, Vol. 34, 2013, pp. 779–784, DOI: 10.1002/marc.201300015.

[学会発表](計 6 件)

野口 誉夫, 新海 征治; 自己集合を基盤とする分子認識系の構築: ジカルボン酸の蛍光識別, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年 3 月 28 日, 日本大学(千葉県)

T. Noguchi, S. Shinkai, Fluorometric translation of dicarboxylates orchestrated by self-assembly, The 4th international conference on molecular sensors and molecular logic gates, 2014 年 11 月 10 日, Shanghai (China)

野口 誉夫, 新海 征治; 会合誘起発光性分子の自己集合を利用する分子認識化学: ジカルボン酸の蛍光検出, 第 8 回バイオ関連化学シンポジウム 2014 年 9 月 11 日, 岡山大学(岡山県)

野口 誉夫, 新海 征治; 環形成による分子運動差を利用するジカルボン酸の非線形型蛍光検出, 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 3 月 28 日, 名古屋大学(愛知県)

野口 誉夫; 自己集合を利用する分子認識化学の新展開 分子情報を精密に読み取る蛍光センサ開発, 第 4 回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, 2013 年 11 月 22 日, 九州先端科学技術研究所(福岡県)

T. Noguchi, S. Shinkai, Self-assembly as a tool for fluorescence sensing of ATP, International symposium on macrocyclic and supramolecular chemistry (8-ISMSC), 2013 年 7 月 8 日, Crystal Gateway Marriott, Arlington (USA)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 発蛍光性化合物またはその塩、及びイオン性化合物の検出剤

発明者: 野口 誉夫・新海 征治

権利者: 九州大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-048832

出願年月日: 平成 27 年 3 月 11 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

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

<http://www.materialsviews.com/synergistic-marriage-of-fluorescence-sensing-and-molecular-self-assembly/>
(Materials Views, March 18, 2013)

http://www.chemistryviews.org/details/ezone/5600591/Fluorescent_Sensor_for_Rapid_Metabolic_Disorder_Screening.html
(Chemistry Views, January 3, 2014)

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