

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 29 日現在

機関番号：57101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410105

研究課題名(和文)ドナー・アクセプター蛍光色素の自己会合を鍵とした生体蛍光検出

研究課題名(英文)Biological Fluorescence Detection Based on Aggregation of Donor-acceptor Dyes

研究代表者

石井 努 (ISHI-I, Tsutomu)

久留米工業高等専門学校・生物応用化学科・教授

研究者番号：60346856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ドナー・アクセプター色素を基盤とした生体蛍光検出について検討した。水溶性ベンゾチアジアゾール・トリフェニルアミン分子にガラクトース・糖質部を導入し、水溶性向上により蛍光度を低下させた後に、ガラクトシダーゼ・糖質分解酵素を添加したところ、蛍光強度の向上が認められた。酵素の触媒作用により色素母体より糖質部位が切断されることで、疎水性向上に基づきドナー・アクセプター色素が発光性の会合体に変化した結果である。本研究結果より、蛍光 OFF-ON 変化により生体蛍光検出の可能性を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Fluorescence detection of glycosidase was investigated on the basis of aggregate emission of benzothiadiazole-triphenylamine donor-acceptor dyes. The parent donor-acceptor dye, which is fluorescent only in the aggregate state, indicated a decrease of emission intensity by introducing galactopyranoside moiety. In contrast, the emission intensity was recovered and enhanced upon addition of galactosidase, which reacted with the galactopyranoside moiety to release the fluorescent parent donor-acceptor dye, leading to the emission enhancement in the aggregate state. As a result of the emission enhancement, the galactosidase detection can be achieved.

研究分野：化学

キーワード：発光 生体検出 ドナー・アクセプター 糖質分解酵素

1. 研究開始当初の背景

生体蛍光検出では、水系で高い発光特性を示す有機蛍光色素の簡便で普遍的な開発が不可欠である。特に、組織浸透性と透過性の観点から、光学窓領域の赤色から近赤外領域の長波長発光に注目が集まる。我々は、赤色及び近赤外有機蛍光色素の最も単純な分子設計が、ドナー部位とアクセプター部位の連結であると認識している。ドナー・アクセプター型分極構造に起因して、発光帯が長波長側に移動することで赤色～近赤外発光が発現する。しかし、本ドナー・アクセプター構造は、水系高極性環境下で溶媒和により励起状態が大きく分極し、消光失活過程が有利になる溶媒和消光の問題点を残している。

先に当研究室では、アクセプター性ベンゾチアジアゾールにドナー性トリフェニルアミンを導入した色素が、ドナー・アクセプター構造にも関わらず、水系極性環境下で効率的な赤色発光を与えることを見出している。本ドナー・アクセプター色素は、生体水系において疎水性相互作用を主な駆動力として会合体を形成している。つまり、本会合構造の内部空間は外界の水分子から遮蔽されるため、水分子の溶媒和消光が効果的に抑制され、強い発光を示すことができている。この知見を発展させることで、観測対象分子との反応前はモノマー消光状態で存在し、これが観測対象分子との反応により、発光性の会合体として存在するように変化する分子を設計開発すれば、新たな生体検出システムが誕生するはずである。

2. 研究の目的

本研究では、ドナー・アクセプター分子を基盤とした生体蛍光検出の可能性を探求する。生体検出対象としては、広く研究され情報収集が容易な糖質分解酵素に着目した。

まず、当研究グループが開発した会合発光性ドナー・アクセプター分子に水溶性を付与することで 100% 水系で発光システムを構築する。次に、本水溶性ドナー・アクセプター分子に糖質部を導入することで、水溶性向上によりモノマー消光状態を発現させる。最後に、消光したドナー・アクセプター分子に糖質分解酵素を作用させ、糖質部の切断前後でのモノマー消光から会合発光に変わる「蛍光 OFF-ON 変化」を評価することで、糖質分解酵素の蛍光検出に挑戦する (図 1)。

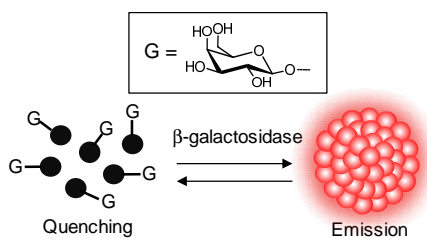


図 1 . 会合発光による糖質蛍光検出

3. 研究の方法

本研究は、以下の 3 段階に沿って遂行する。

(1) 100% 水中での会合発光の評価：ベンゾチアジアゾール・トリフェニルアミンを基盤としたドナー・アクセプター分子に水溶性を付与し、100% 水中で会合発光特性を評価する。

(2) 糖質部の導入によるモノマー消光の評価：上記 (1) の水溶性ドナー・アクセプター分子に糖質部を導入し、モノマー消光特性を評価する。

(3) 会合発光による糖質部切断の蛍光検出：上記 (2) の消光したドナー・アクセプター分子に糖質分解酵素を作用し、糖質部を切断する。切断前後での、モノマー消光から会合発光に変わる「蛍光 OFF-ON 変化」を評価することで、糖質分解酵素の蛍光検出の可能性を探求する。

4. 研究成果

まず、水溶性官能基を導入した種々のドナー・アクセプター分子を合成し、100% 水系で会合発光システムを構築した。トリフェニルアミン・ベンゾチアジアゾールを基盤としたドナー・アクセプター分子に対し、水溶性付与を目的としてヘキサエチレングリコール鎖の導入を行った。1本のヘキサエチレングリコール鎖を導入した分子 1 では、極性溶媒への溶解度が向上しメタノールへの可溶を示したが、水には不溶であった。100% 水中への溶解は、2分岐のヘキサエチレングリコール鎖を導入した色素 2 で達成できた。更に、色素母体の疎水性を低下した 1本鎖色素 3 でも水溶性が発現できた (図 2)。

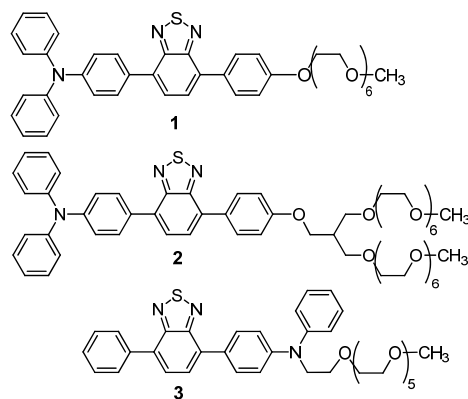


図 2 . 水溶性蛍光色素

これらの水溶性色素 2 及び 3 は 100% 水中で赤色発光を発現し、メタノール中での消光状態と比べて発光が著しく向上している。メタノール中で溶媒和により消光していた分子が、会合体を形成し発光性に变化した結果である。本会合体形成は、吸収帯の長波長シフトと発光帯の短波長シフトから支持され、更に電子顕微鏡観察において 3-5 nm サイズの球状会合体の形成が確認できた。蛍光寿命測定に基づく速度論的解析の結果よ

り、発光発現のメカニズムが会合体形成に起因した溶媒和消光過程の抑制であることが判明している。

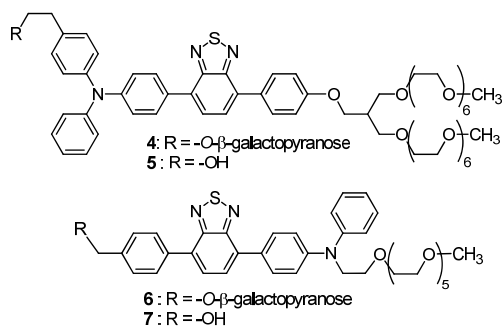


図3．糖質部を有する水溶性蛍光色素

次に、合成した水溶性蛍光色素にガラクトピラノース・糖質部を導入し、水溶性向上によるモノマー消光発現を検討した(図3)。糖質部を導入した色素4及び6は溶媒の極性増大に伴い発光帯の長波長シフトと蛍光量子収率の低下を示し、特にメタノール中では著しい消光が発現した。糖質部導入においても、母体色素部位のドナー・アクセプター特性が維持された結果である。水中では、糖質部の導入前と比較しての蛍光量子収率の大きな低下が認められたが、完全な消光を与えなかった。本結果は、糖質部導入により完全なモノマー解離は進行していないが、会合体の安定性は大きく低下したことを示唆している。電子顕微鏡観察及び光散乱測定において、明確な会合体の形成が確認できなかった結果からも、会合体の安定性低下が支持されている。以上の結果より、水中においてはモノマー消光を示さなかったが、発光強度の差よりが識別可能であることが示された。

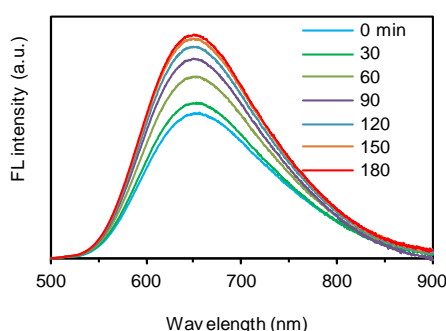


図4．色素4の酵素添加後の蛍光スペクトル時間変化

最後に、上記の知見を基に -galactosidase・ガラクトース分解酵素の蛍光検出を検討した。色素4のPBS溶液に -galactosidaseを添加したところ、蛍光スペクトルの時間変化が認められた(図4)。蛍光強度が増大し、蛍光量子収率は0.05から0.08まで向上した(図5上)。飽和した発光スペクトルがガラクトース部を有しな

い5と一致したこと、更に発光帯が短波長側にシフトしたことより(図5下)、ガラクトース部が切断されたことが示唆された。更に、色素6を用いた -galactosidaseの蛍光検出では、量子収率が0.03から0.10まで約3倍に向上することに成功した。以上の結果より、蛍光強度の変化による -galactosidaseの蛍光検出の可能性を見出すことができた。

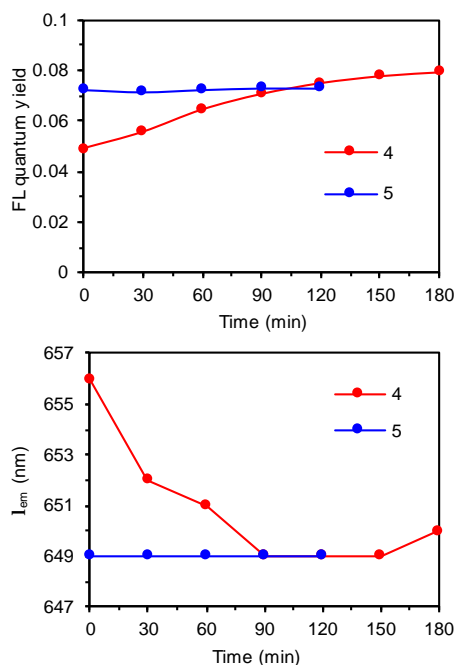


図5．色素4の酵素添加後の量子収率と蛍光波長の時間変化

今後は色素の疎水性と親水性の調整により、酵素添加前では顕著なモノマー消光を示し、酵素添加による糖質部位の切断後には発光性の会合体に変化できる系を見出すことで、糖質分解酵素の蛍光検出に繋がる。本研究は、単純な色素基盤を用いて、「蛍光OFF-ON変化」で糖質分解酵素を検出する基礎的な研究内容であるが、糖質分解酵素に留まらず様々な生体蛍光検出への応用可能性を秘めた研究でもあり、基礎から応用までの一貫した研究の基盤を確立できると考える。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Tsutomu Ishi-i, Yuriko Moriyama, Yutarou Kusakaki; Turn-on-type Emission Enhancement and Ratiometric Emission Color Change Based on the Combination Effect of Aggregation and TICT Found in the Hexaazatriphenylene-triphenylamine Dye in an Aqueous Environment; RSC Advances, 査読有, Vol. 6, No. 90, pages 86301-86308 (2016).

DOI: 10.1039/C6RA18320D

石井努、水の中でドナー・アクセプター分子を光らせる：ドナー・アクセプター分子の会合に基づく水系発光システムの構築、有機合成化学協会誌、査読有、74 巻、8 号、781-791 ページ（平成 28 年）

Tsutomu Ishi-i, Kei Ikeda, Michiaki Ogawa, Yutarou Kusakaki; Light-emitting Properties of Donor-acceptor and Donor-acceptor-donor Dyes in Solution, Solid, and Aggregated States: Structure-property Relationship of Emission Behavior; RSC Advances, 査読有, Vol. 5, No. 108, pages 89171-89187 (2015).

DOI: 10.1039/c5ra18231j

Tsutomu Ishi-i, Ikumi Kitahara, Shimpei Yamada, Yusuke Sanada, Kazuo Sakurai, Asami Tanaka, Naoya Hasebe, Toshitada Yoshihara, Seiji Tobita; Amphiphilic Benzothiadiazole-triphenylamine-based Aggregates That Emit Red Light in Water; Organic and Biomolecular Chemistry, 査読有, Vol. 15, No. 6, pages 1818-1828 (2015).

DOI: 10.1039/C4OB02181A

[学会発表](計 10 件)

石井努、発光性ナノ会合体による水系長波長発光システムの構築、信州大学繊維学部講演会（平成 28 年 9 月 7 日、上田）

稲員惇士・白井祐弥・川井一輝・北原いくみ・石井努、会合発光性ドナー・アクセプター型色素による糖質分解酵素の蛍光検出、2016 年光化学討論会（平成 28 年 9 月 6 日、東京）

Tsutomu Ishi-i, Ikumi Kitahara, Asami Tanaka, Naoya Hasebe, Toshitada Yoshihara, Seiji Tobita; Amphiphilic Donor-acceptor-based Aggregates That Emit Red Light in Water; 10th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry (June 27-July 2, 2015, Strasbourg/France)

石井努・守山由理子・草垣祐太郎、6 分岐スター型ドナー・アクセプター分子の会合による発光色と発光強度変化、2014 年光化学討論会（平成 27 年 9 月 11 日、大阪市立大学（大阪））

石井努、水の中でドナー・アクセプター分子を光らせる：会合を鍵とする水系発光システムの構築、崇城大学応用化学専攻講演会（平成 27 年 11 月 4 日、崇城大学（熊本））

石井努、会合性ナノ構造体による高効率水系発光システムの構築、有機合成化学協会九州山口支部講演会（平成 27 年 11 月 26 日、住友化学大分工場（大分））

稲員惇士・築地真也・石井努、イオン性官能基を有するドナー・アクセプター分子の

会合発光特性、第 55 回化学関連支部合同九州大会（平成 27 年 6 月 27 日、北九州、北九州国際会議場）

稲員惇士・築地真也・石井努、イオン性官能基を有するドナー・アクセプター分子の会合による赤色発光発現、日本化学会第 95 春季年会（平成 27 年 3 月 28 日、船橋、日本大学・船橋キャンパス）

北原いくみ・田中亜沙美・長谷部直哉・吉原利忠・飛田成史・石井努、水中で赤色発光を示す水溶性ベンゾチアジアゾール・トリフェニルアミン会合体、日本化学会第 95 春季年会（平成 27 年 3 月 29 日、船橋、日本大学・船橋キャンパス）

石井努、機能性ドナー・アクセプター分子、平成 26 年度 崇城大学 有機エレクトロニクス講演会（平成 26 年 12 月 13 日、熊本・崇城大学）

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://apollo.cc.kurume-nct.ac.jp/~ishi-i/research/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 努 (ISHII Tsutomu)

独立行政法人国立高等専門学校機構・久留米工業高等専門学校・生物応用化学科・教授

研究者番号：60346856

(4) 研究協力者

飛田 成史 (TOBITA Seiji)