

研究終了報告書

「光学出力を増幅できるアロステリック計測」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：福原 学

1. 研究のねらい

超分子センシングは、弱い相互作用が協同的に働く生体内において精密に設計されているタンパク質や酵素(センサー分子)が特定の糖や抗原など(検体分子)を精緻に識別していることを模倣・補完・代替する人工的手法として注目を浴び、急速に発展しつつある新領域である。本さがけ提案では、この進展著しい分野において、福原が提唱している「Supramolecular Allosteric Signal-amplification Sensing (SASS; 超分子アロステリックシグナル増幅センシング)」という新規なセンシング手法を出発点に、極微細な光学出力を能動的かつ積極的、そして「如何にしてアロステリズムによってシグナルを増幅することができるのか?」というこれまでの光学計測科学への提起とともに、革新的な光学センサーの開発とそのデバイス化を通して、光が介在する計測科学の限界を極限まで追求することを目的としている。

2. 研究成果

(1) 概要

SASS手法は2015年に初めて *Polym. J.*にて提唱したが、最近、*J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2019**, *93*, 127., *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2020**, *42*, 100340.や *Polym. J.* **2021**, accepted.においても改めて詳細に執筆し、これはさがけ期間中の大きな成果である。この概念は、(i)精密に設計された超分子空間での検体の包接に伴う認識部位自身の逐次的構造変化により、(ii)アロステリズム機構によってシグナル増幅高分子への認識情報の伝播を誘起し、(iii)そこから増幅されたシグナルを得るという一連のプロセスを確立し、様々な系において実践してきたので下記にて詳述する。

(2) 詳細

研究テーマ A「ポリチオフェン増幅センサーの構築ならびに機構解明」

本項目では、SASSを発現するポリチオフェンセンサーの構築を目的とし、チオウレア基を有するビチオフェンモノマー(BBB; 図1左)およびBBBを繰り返し単位として有するポリチオフェン(BBP; 図1右)を設計した。モデル検体としてフタル酸類およびその塩を用いてこれらの包接に伴い、(1)ビチオフェン骨格がねじれ、(2)このねじれがポリチオフェン主鎖全体に伝播し、(3)それが化学センシングにどのような影響を及

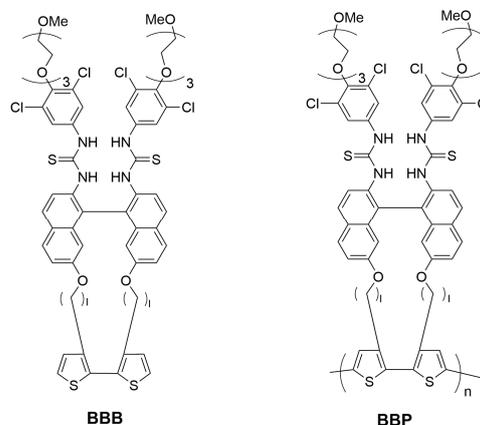


図1. ポリチオフェン化学センサー

ぼすのか：以上 3 点の機構解明をモノマーと比較することで行った。

BBB のビチオフェンとビナフチルを結ぶアルキル鎖の長さ(l)の違いによる S-C-C-S 二面角を量子化学計算から求めた。 $l = 3$ のときに二面角は 59° と最も小さく、より *syn* に近い構造となった。各フタル酸類を包接させたとき、二面角は 120° 以上に開き *anti* 構造となった。この結果を基に l が 3 の BBB を合成し、クロロホルム溶液中で各種検体の滴定実験を行った。検体の滴下に伴い、吸収末端は長波長へ裾を引いた。このスペクトル変化は、ビスチオウレア部位にカルボキシレートが錯形成していることを示すものであった。錯形成量論比を Job プロットから求めた結果、BBB とイソフタレートは 1:1 の錯体を形成していることが明らかとなった。次に BBP の滴定では、検体の滴下に伴い 260–360 nm のチオフェン主鎖の π - π^* 遷移を含む吸収帯が短波長にシフトした。この結果から BBP は検体の錯形成に伴い二面角が *syn* からより *syn* にねじれたことが示唆された。また錯形成定数は BBB と比較して 5~15 倍に増幅しており、正のホモロピックアロステリズムが働いていることが明らかとなった。以上要するに、より高分子量体の BBP を用いてセンシングを行うことで、ポリチオフェン主鎖のねじれと化学センシング・増幅機構の相関を包括的に解明した。

研究テーマ B「グルカンセンサーの開発」

福原らは、天然に豊富に存在する多糖であるグルカンの一種であるカードラン(Cur)誘導体が、水溶液中でオリゴ糖を選択的に認識できることを見いだしている(Fukuhara, G. *et al. Chem. Commun.* **2010**, 46, 9128.; *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 768.)。Cur は DMSO に溶解すると一本鎖のランダムコイル構造となるが、水添加により三重螺旋を再形成する可逆的螺旋形成能を有する特徴的な多糖である。分光リポーターとしてジメチルアミノベンゾエートを導入した DABz-Cur (図 2a)は、円二色性(CD)スペクトルの紫外部の励起子カップリングの減少から、四糖であるアカルボース(図 2b)の認識が可能であった。アカルボースは生体内で糖分解酵素を抑制する働きを持つ四糖で、II 型糖尿病や肥満の治療薬として使用されており、その血中濃度のモニタリングは重要な課題である。

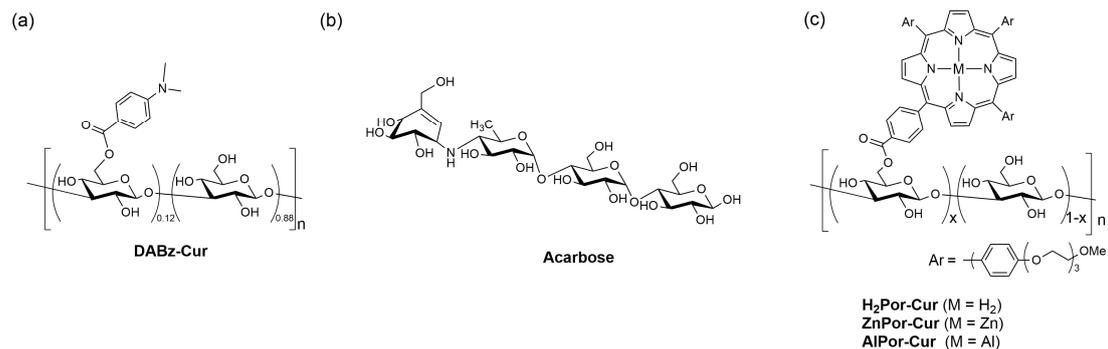


図 2. グルカン化学センサーおよび標的アカルボース

本項目では、分光リポーターとして生体系での利用に適した可視部に強い吸収を持つポルフィリンを導入した 3 種の Cur 誘導体(図 2c)を合成し、AFM ならびに分光学的手法を用いて各ポルフィリン修飾 Cur の構造とキロプティカル特性を明らかにするとともに、CD スペクトルにより水溶液中における選択的糖認識能を明らかにした。DMSO 中では 420 nm 付近にポルフィリン特有の鋭い Soret 帯が見られるが、10% DMSO 水溶液中では全ての Cur 誘導体において淡

色効果およびブロードニングが観測されたことから、修飾ポルフィリン同士がスタックしていると考えられた。また、10% DMSO 水溶液中中で比較的弱い CD カップレットしか示さないことから、発色団同士がランダムな配向であり、Cur の三重螺旋形性能が損なわれていることが示唆された。実際、マイカ基板上で AFM 測定を行うと、修飾 Cur は globule 構造であることが示された。これらを踏まえ、10% DMSO 水溶液中での糖認識能を検討した。ZnPor-Cur はアカルボース添加時の CD 強度の変化は小さかった。一方、H₂Por-Cur および AlPor-Cur では、アカルボース濃度に対して CD カップレットの振幅が直線的に増加し、検出下限は 100 μM であった。標的アカルボースの包接メカニズムにおいて、比較的大きな Hill 係数(～10)が観測されたことから、正の協同性が働いていることが明らかとなった。従って、オリゴ糖センシングにおいて正のアロステリズムによる増幅センシングが可能であった。

研究テーマ C「感圧センサーの開発」

分子認識やセンシングにおいて圧力を変数とした場合はエンタルピー・エントロピー補償則とは異なる熱力学式に従う。このような考えに基づき、福原はこれまでに圧力を変数とする化学センシングを行ってきた。本項目では、さきがけ研究期間内で数多く報告してきた感圧発光センサーの中でも、凝集誘起発光(AIE)を示すテトラフェニルエチレンを修飾したポリエチレン誘導体(図 3)の蛍光応答を静水圧により制御した。加圧に伴い、450 nm より長波長側でのスタックに基づく発光と 380 nm の光反応により生じたモノマー発光からの蛍光強度比が大きく変化することを見出した。これらは、静水圧下での吸収、蛍光、励起スペクトルならびに時間相関単一光子計測により明らかにした。

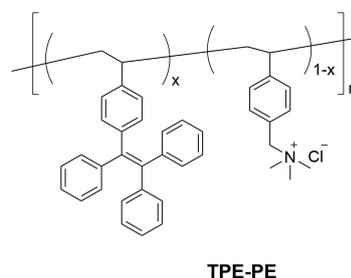


図 3. 感圧センサーの一例

3. 今後の展開

本さきがけ期間で得られて成果は、種々の化学センサーを用いるシグナル増幅センシングの実証と、それを静水圧によって如何に制御できるか、というものである。今後、これまでの化学センサーの戦略では困難と言われている「夾雑系」を標的にするためには、本さきがけで得られた極微小な光学出力の積極的な制御、さらに「如何にしてアロステリズムによって増幅できるのか？」ということに帰結した。今後のさらなる展開として、本法が汎用性の高い分析手法として拡大・展開されていけば、より困難と言われている夾雑系のセンシングも可能である。

4. 自己評価

これら本さきがけの成果を学会会報誌の化学と工業、分析化学誌で発表したところ大きな反響があり、①化粧品メーカーから特定波長光が生体に及ぼす影響の相談、②一般社団法人からマイクロプラスチック(MP)の分析に応用したい、という申し出があったことから、SASS 機構を基盤とした高分子センサーが学術的な範疇を超えて、社会的にも波及効果の高いセンシング手法として脚光を浴びてきている。実際に、最近話題となっている MP 問題において、福原と上記一般社団法人が共同で国内外での河川の MP を分析したところ(②)、浮揚している物質

として一般的なポリプロピレンやポリエチレンの他にも特定の高分子も含まれることを突き止め、これらは多くのマスメディアに取り上げられ、関連自治体や政府関連団体に大きな影響を及ぼした。研究成果については、そのあまりにも高い波及効果と社会全体を取り巻く事情(人類が今後解決すべき課題)の観点からオープンアクセスにしている。平成31年2月12日にはJST 東京本部別館において、「マイクロプラスチック問題に分析化学の目でアプローチする～STI for SDGs の具体的な事例として～」という講演題目にて幅広く広報した。

学術的な観点からは、従来法に付きまっていた補償エントロピー損失という本質的な問題点を考慮しなくて良く、シグナルを増幅させて計測すれば良いというブレークスルーとなり得る成果が発表できたと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 33件

1. Sasaki, M.; Ryoson, Y.; Numata, M.; Fukuhara, G.*: Oligosaccharide Sensing in Aqueous Media Using Porphyrin-Curdlan Conjugates: An Allosteric Signal-Amplification System, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 6017-6027.

水溶液中でのオリゴ糖鎖の分光シグナル増幅センシングを達成した。分光リポーターとして種々のポルフィリン誘導体をレセプターであるカードラン(Cur)に連結した。水溶液中でのオリゴ糖センシングを円二色性スペクトルで測定したところ、四糖であるアカルボース(II型糖尿病治療薬)濃度に対してシグモイド曲線が得られた。Hill 係数(n)が 10.2 とヘモグロビンを遥かに凌駕する正のアロステリズムが観測された。

2. Tsuchiya, T.; Fukuhara, G.*: Allosteric Signal Amplification Sensing Using a Bisthiourea-Binaphthyl-Polythiophene Conjugate: A Positive Homotropic Allosterism Case, *J. Org. Chem.* in press. (doi: 10.1021/acs.joc.0c01326)

シグナル増幅センシング機構解明のため、ビスチオウレア-ビナフチル-ポリチオフェン(BBP)と対応する繰返しユニット(BBB)を設計・合成した。BBBの平衡定数とBBPを比較すると、5~15倍に増幅しており分光シグナルの増幅が観測された。BBPのセンシング機構において正のホモトロピックアロステリズムが発現していると示唆された。

3. Nakasha, K.; Fukuhara, G.*: Aggregation-Induced Emission-Based Polymer Materials: Ratiometric Fluorescence Responses Controlled by Hydrostatic Pressure, *ACS Appl. Polym. Mater.* **2020**, *2*, 2303-2310.

シグナル増幅センシングの外部因子制御として静水圧に着目した代表論文である。凝集誘起発光(AIE)を示すテトラフェニルエチレンを修飾したポリエチレンに光照射を行うと、AIE発光帯以外にも光反応物からの発光も観測され、結果としてレシオ型センサーになることを見出した。このポリマーに静水圧を印加すると、そのレシオ比の制御を達成することができた成果である。

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件(特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な発表

- 1) 福原学, “マイクロプラスチック問題に分析化学の目でアプローチする～STI for SDGsの具体的な事例として～”, JST 広報カフェ, 2019/2/12
- 2) 福原学, “光学出力を増幅するアロステリック計測”, 第 8 回 CSJ 化学フェスタ 2018, 2018/10/23
- 3) 福原学, “光学シグナル増幅が可能な化学センサーの開発”, 革新的フォトニクス基盤の創成, 2018/10/11

受賞

- 4) SHGSC Japan Award of Excellence 2018 (ホスト—ゲスト・超分子研究会(2018))
- 5) 2020 年度高分子学会日立化成賞 (高分子学会 2020 年)
- 6) 2020 年度新世紀賞 (日本分析化学会関東支部 2021 年)