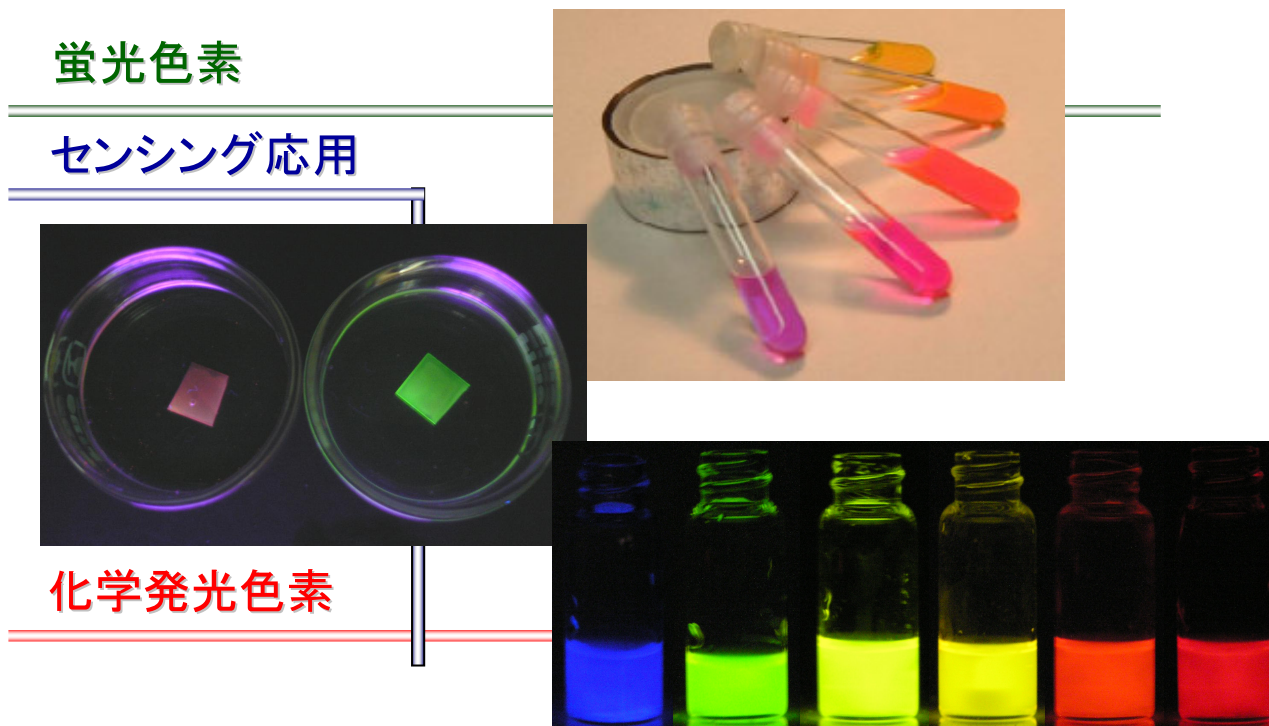


ボロンジピロメテン蛍光・化学発光色素の 設計・合成と光センシング応用



北海道大学大学院地球環境科学研究院
物質機能科学部門生体物質科学分野坂入研究室

山田 幸司

オプティカルセンサーの特徴

光源・センサー部位・受光素子から構成される簡単なセンサー

長所: **低コスト化**・高感度化が容易である

駆動部・材質的に脆い部分が少ないため**装置が壊れにくい**

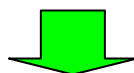
非接触・**低侵襲**

空間分解能・時間分解能が高い

短所: **観測対象を光学的なシグナルに変換する必要がある**

呈色色素の光安定性が低い

目視もしくは安価な分光器を用いて多検体(地点)を観測



身の回りにはあるさまざまな化学物質・化学反応に応答して光学特性の変わる光センサー物質(色素)を創製する。

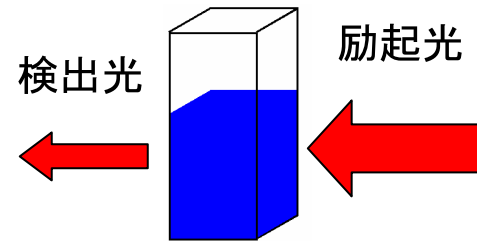
(できれば色素の耐久性も上げる)

センサー色素の種類

概念図

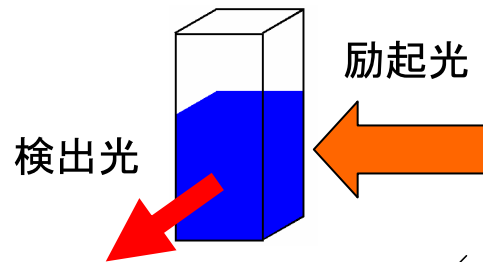
励起光ノイズを低減させる工夫

吸収



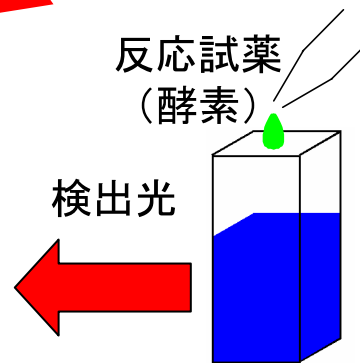
カラーアナリシス
偏光フィルター
光導波路

蛍光
(りん光)



共焦点レーザー
エバネセント励起
バンドパスフィルター
時間分解測定

化学発光
(生物発光)



下に行くほど感度(検出下限)はよくなるが、色素の種類は少なくなる

蛍光・化学発光センシングの特徴

蛍光

光電子倍增管が使える
ので**高感度**

波長・機能の多様な分子
があるので**汎用性**が高い

細胞内物質の
顕微鏡観察

耐久性がなく、長期モニ
タリングに向かない

多機能な分子は**設計と
合成が困難**

化学発光

励起光のノイズがないので
蛍光より**さらに高感度**

受光部のみで構成される
ので**装置が安価**

タンパク質・核酸など
の微量物質検出

化合物の種類が少ない
ので**多検体測定やイメー
ジングが困難**

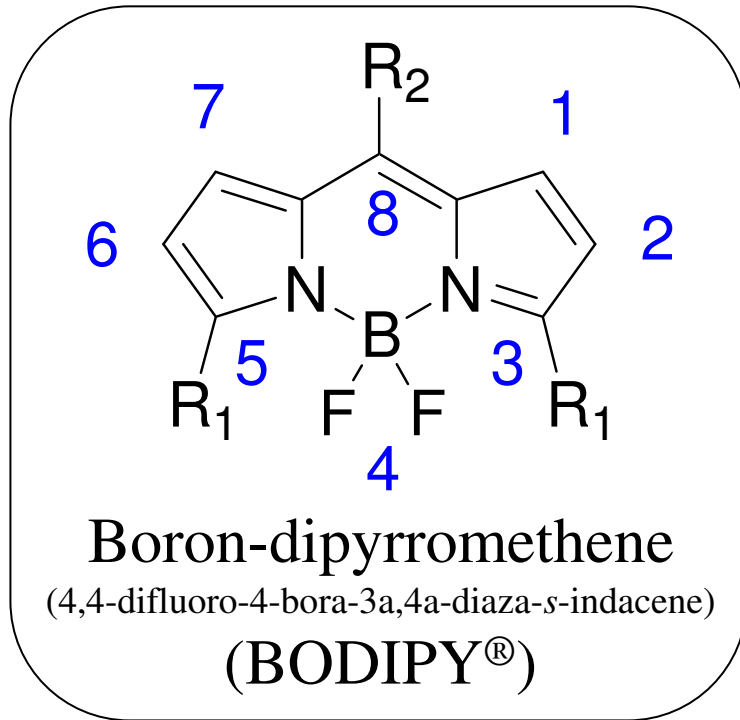
利点

主な用途

問題点

さらなる色素分子の改良が必要

ボロンジピロメテン色素の特長



高いモル吸光係数

($\sim 50,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)

高い蛍光量子収率

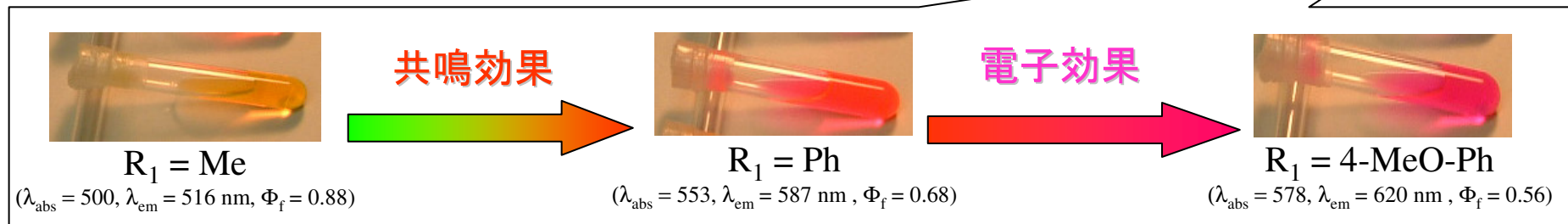
(誘導体によっては水中でもほぼ1)

鮮やかな色調

(吸収・発光のバンド幅がともに狭いため)

高い光や化学反応に対する安定性

官能基変換によって調整可能な吸収
および蛍光発光極大



環境によって波長が変化しない
(Invitrogen社のセールスポイント)



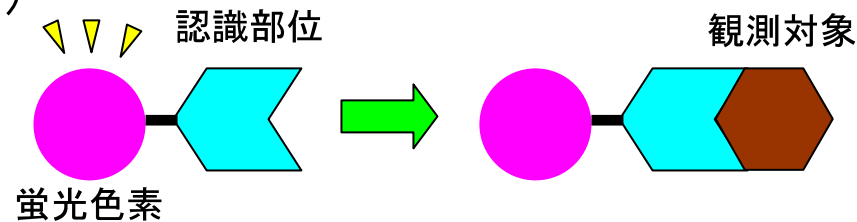
分子認識・化学反応によって
波長シフトするセンサー分子

蛍光シグナル変換機構の種類

シグナル変換機構
(強度変化・波長変化)

分析対象

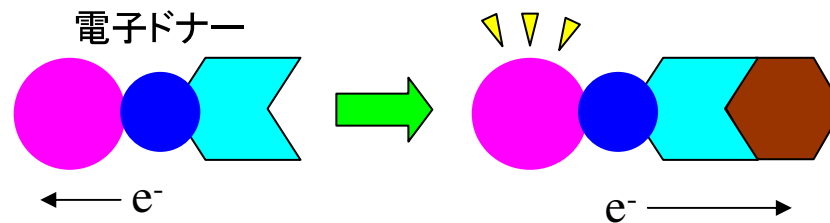
系間交差



重金属・酸素

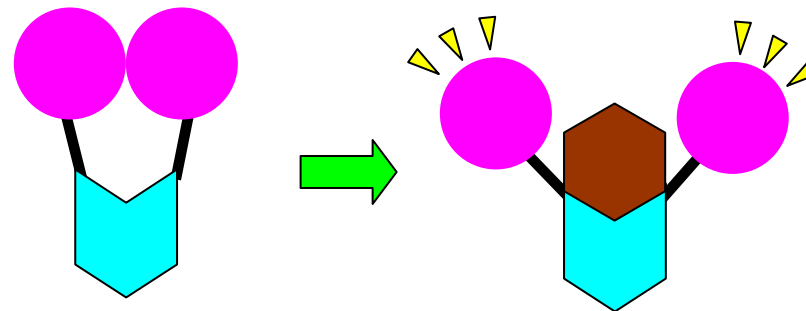
光誘起電子移動
(PET)

分子内電荷移動
(ICT)



カチオンなど

自己消光
蛍光エネルギー移動
(FRET)
エキシマー形成

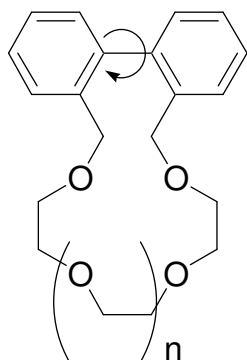


様々な分子
や化学反応

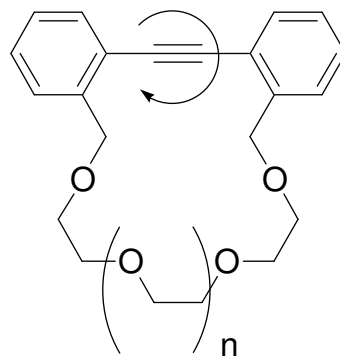
観測対象の種類が増えるほど、構成要素が増えるため
センサー分子の設計と合成が難しくなる

配向制御型蛍光イオンセンサー

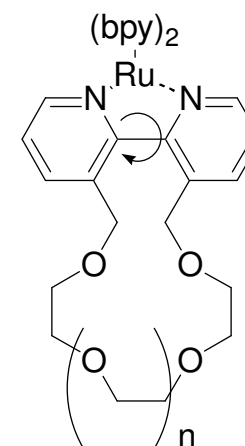
N. F. Finneyらによるシンプルなカチオンセンサー



$n = 1, 2, 3$



$n = 1, 2, 3$



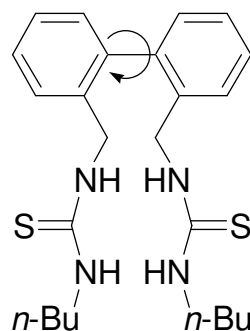
$n = 1, 2, 3$

J. Am. Chem. Soc. **2001**, 123, 1260.

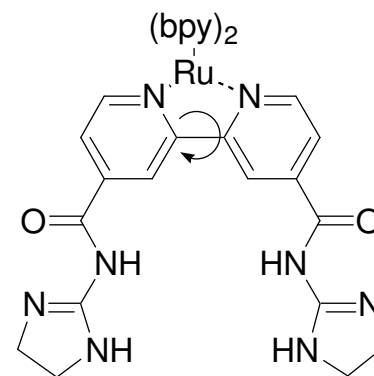
J. Am. Chem. Soc. **2002**, 124, 1178.

Chem. Commun. **2003**, 388.

シンプルなアニオンセンサー



F^-
Selective



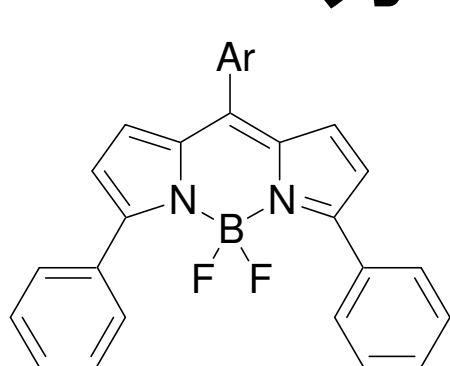
$(\text{RO})_2\text{PO}_2^-$
Selective

J. -I. Hong *et al.* *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 9637.

S. Watanabe *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 229.

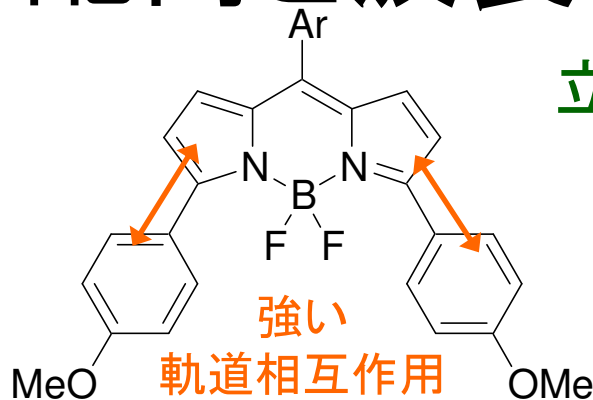
波長が短く、吸光係数と蛍光の量子収率が低いため実用的でない

分子配向と波長の相関



$$\lambda_{\text{abs}} = 558 \text{ nm}$$

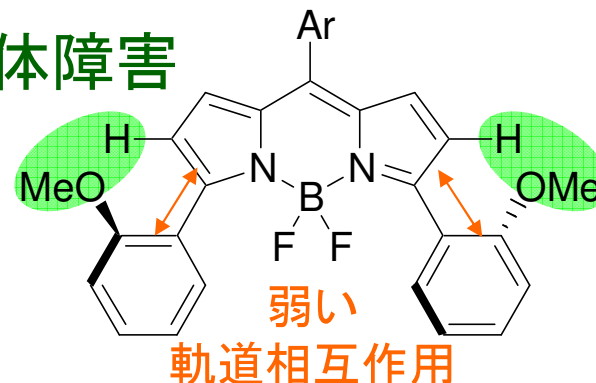
$$\lambda_{\text{em}} = 592 \text{ nm}$$



$$\lambda_{\text{abs}} = 585 \text{ nm}$$

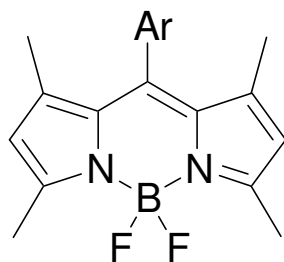
$$\lambda_{\text{em}} = 629 \text{ nm}$$

立体障害



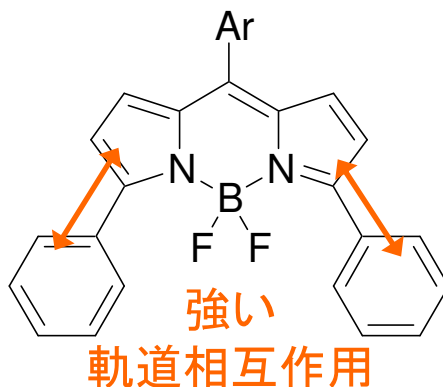
$$\lambda_{\text{abs}} = 549 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{em}} = 601 \text{ nm}$$



$$\lambda_{\text{abs}} = 504 \text{ nm}$$

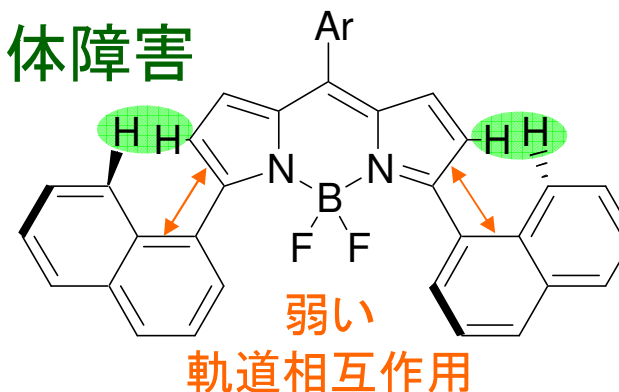
$$\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$$



$$\lambda_{\text{abs}} = 558 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{em}} = 592 \text{ nm}$$

立体障害



$$\lambda_{\text{abs}} = 550 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{em}} = 613 \text{ nm}$$

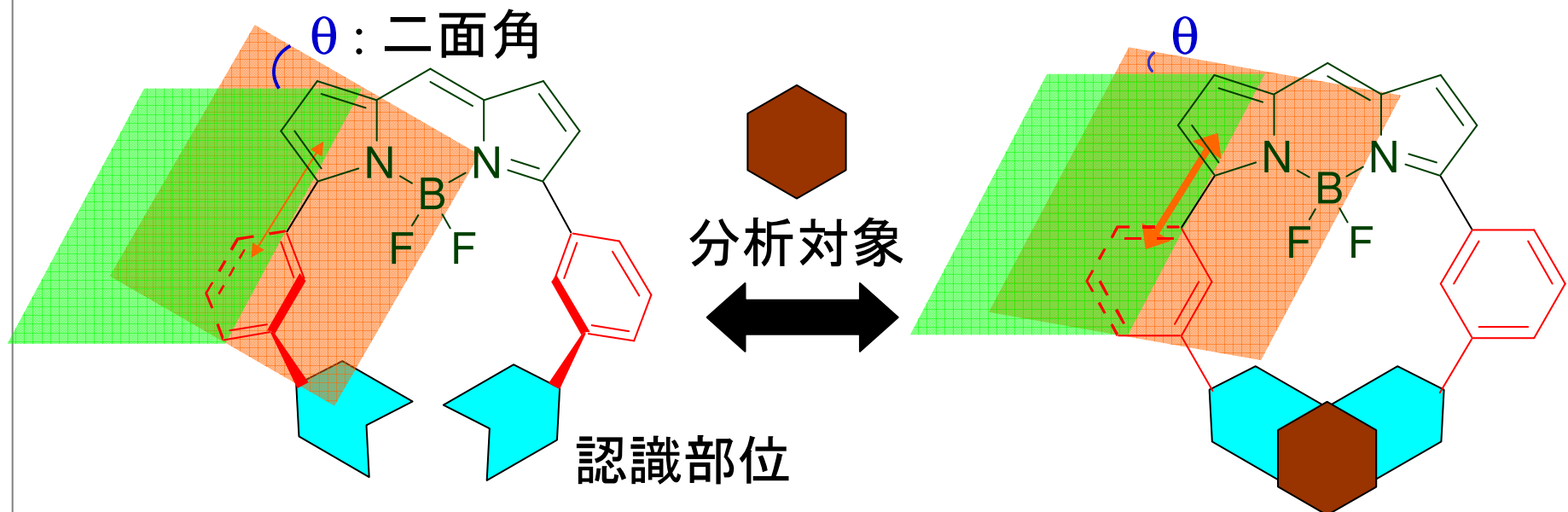
Ar = 4-iodophenyl

K. Burgess et al. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 7813.

吸収波長は、置換アリのールの配向によってもシフトする

配向制御型蛍光センサー分子

分子認識により二面角を制御する



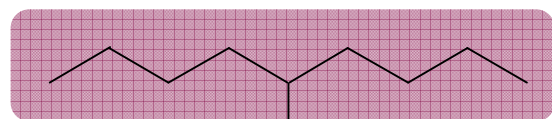
θ 大 = 弱い軌道相互作用
= 短い吸収波長

θ 小 = 強い軌道相互作用
= 長い吸収波長

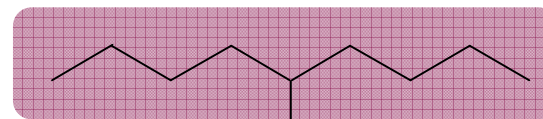
認識部位と色素の距離の制約がない

認識部位を付け替えるだけで様々なゲストに対応できる

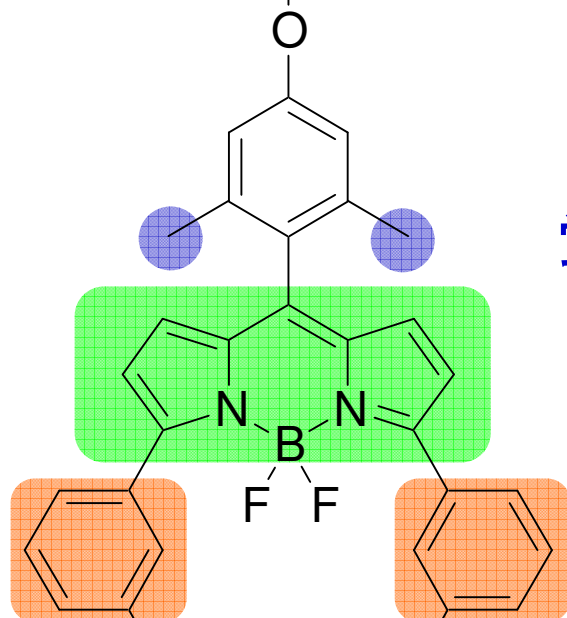
配向制御型カチオンセンサー



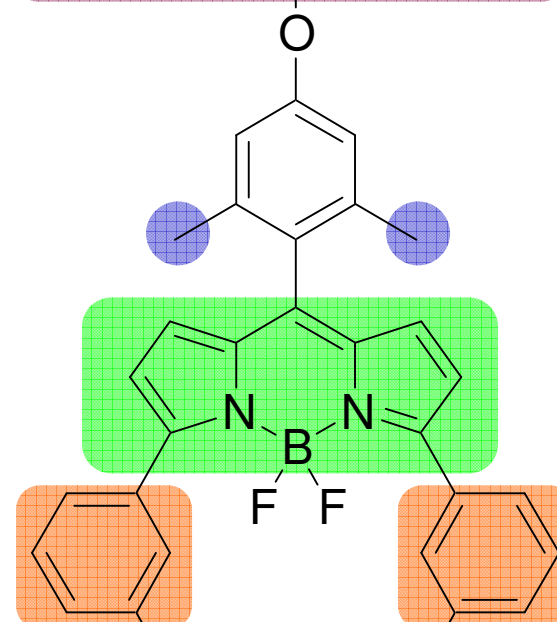
溶解性と合成
収率の向上



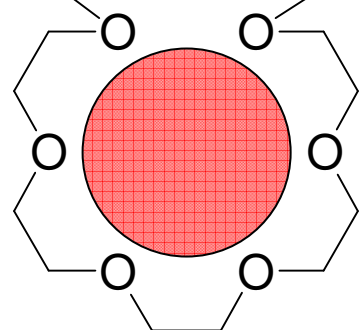
蛍光量子収率の向上



色素母骨格

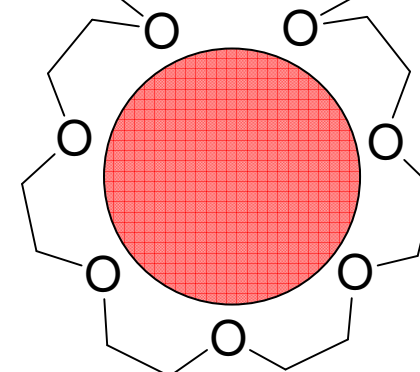


波長制御部位



KBBD-Na

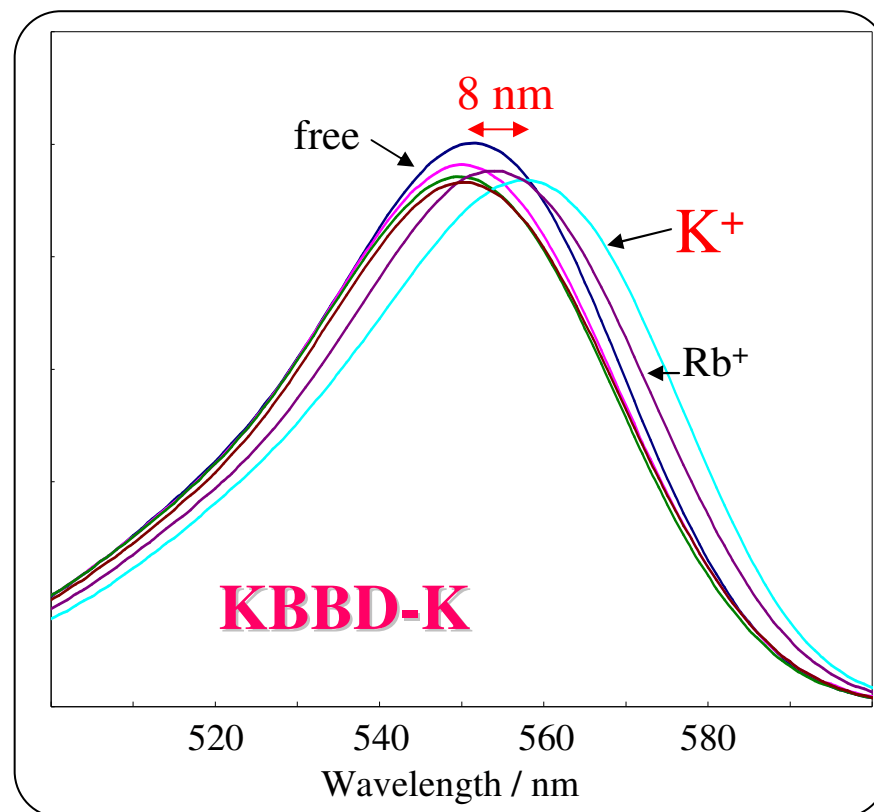
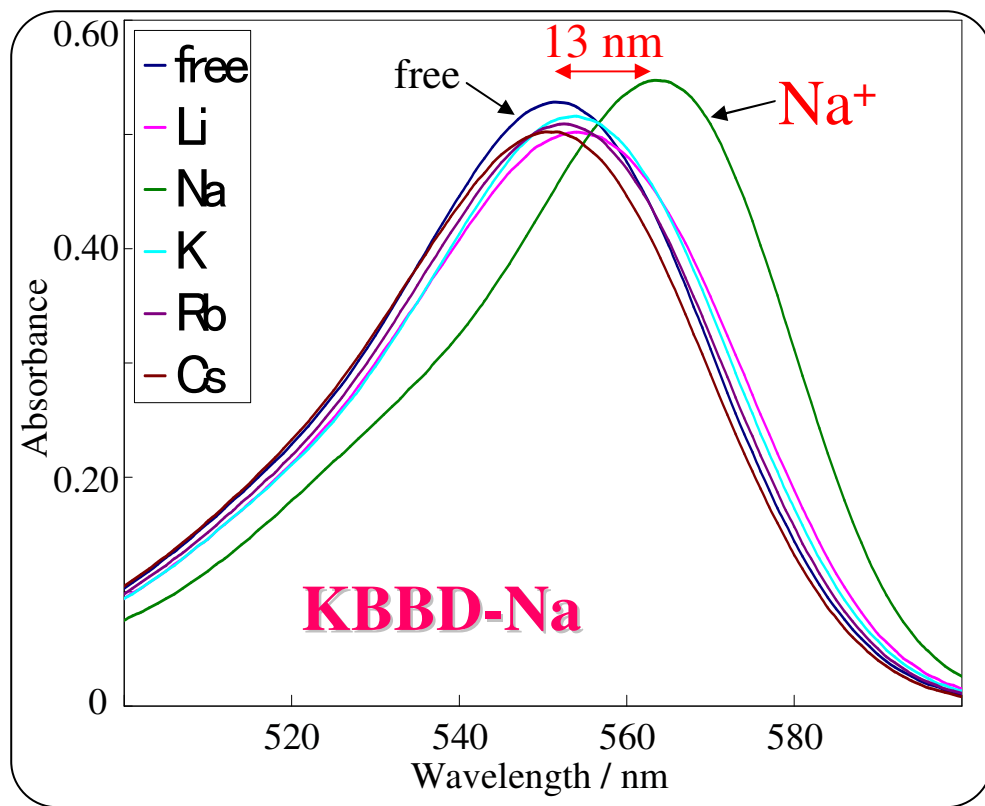
カチオン認識部位



KBBD-K

吸収スペクトルのカチオン応答

KBBD (10^{-5} M) + alkali perchlorate (10^{-2} M) in CH_3CN

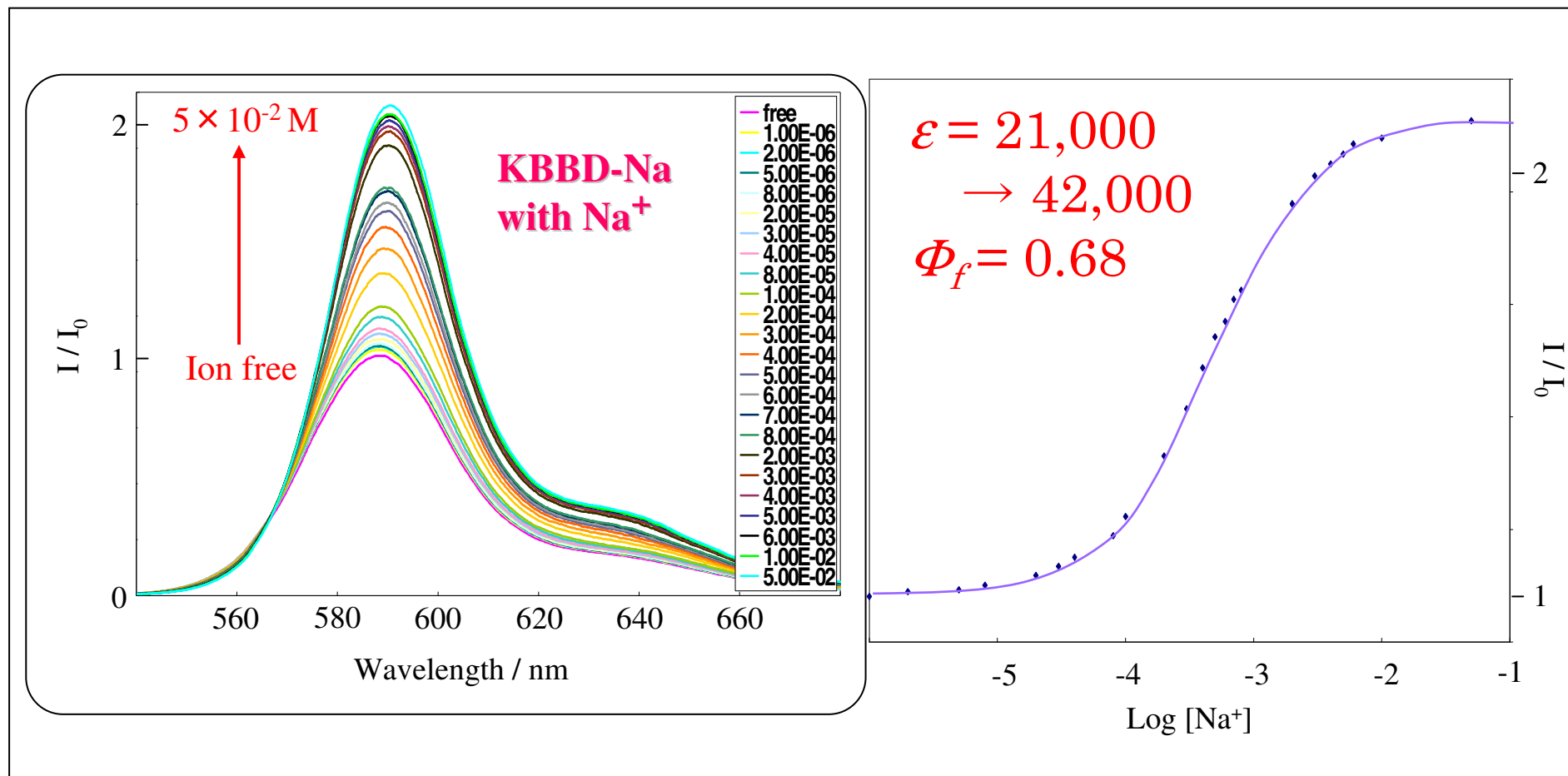


会合定数 K / mol ⁻¹ dm ³	Na ⁺ K ⁺	
	KBBD-Na	1,560
KBBD-K	560	1,290

会合定数の違いではなく会合体の特異的なコンホメーションによってスペクトルのシフトが起こる

蛍光を用いたNa⁺濃度の定量

吸光度の変化の最も大きい575nmで励起すると



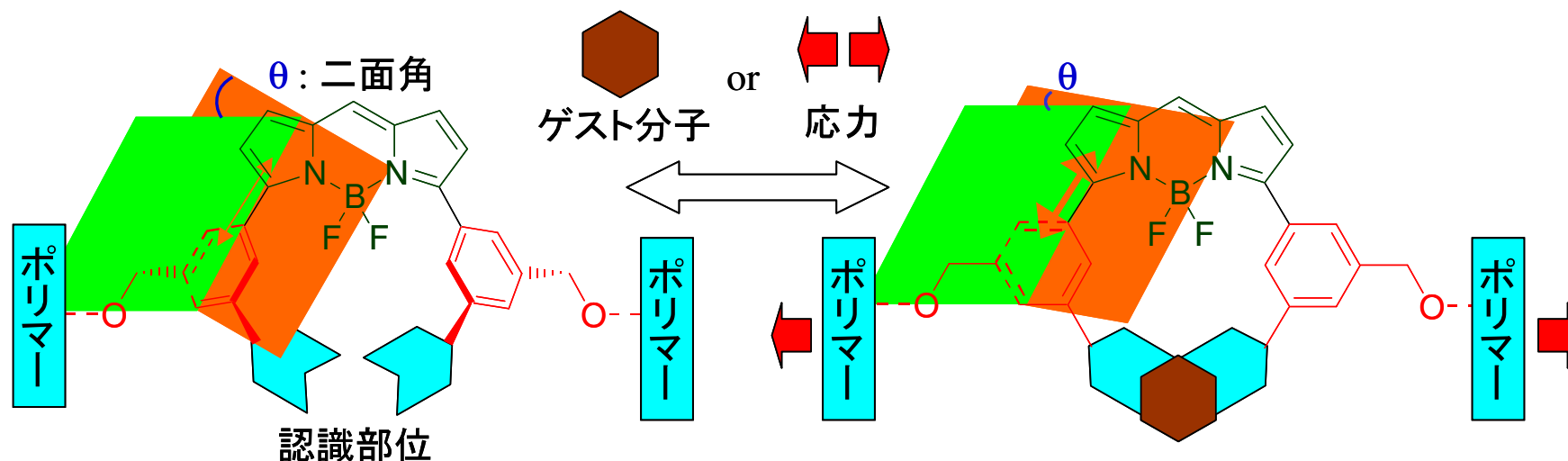
きれいなシグモイド状の検量線が得られ、
高感度にNa⁺濃度が定量できることが分かった

配向制御型のバイオ応用

現在の問題点: 観測対象を選択的に捕捉するわけではないので、妨害物質の影響が大きい



ポリマーに組み込むことで、自己消光を防ぎつつ選択性を高めたセンサーデバイスにする

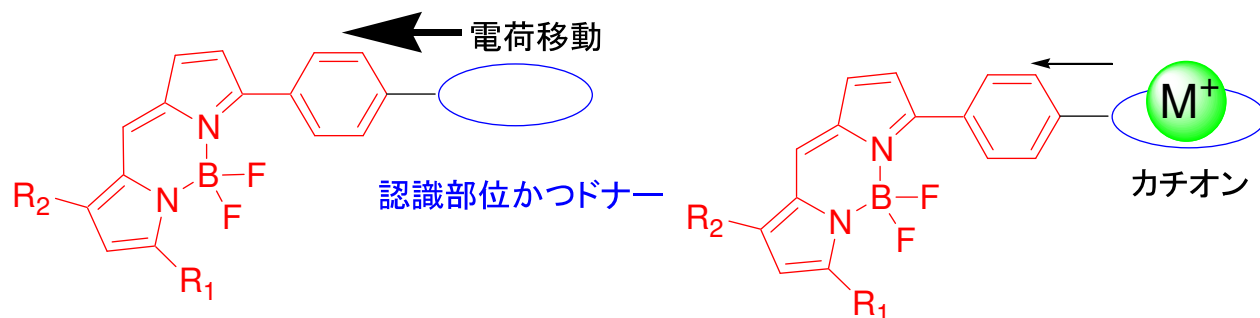


θ 大 = 軌道相互作用小 = 短波長

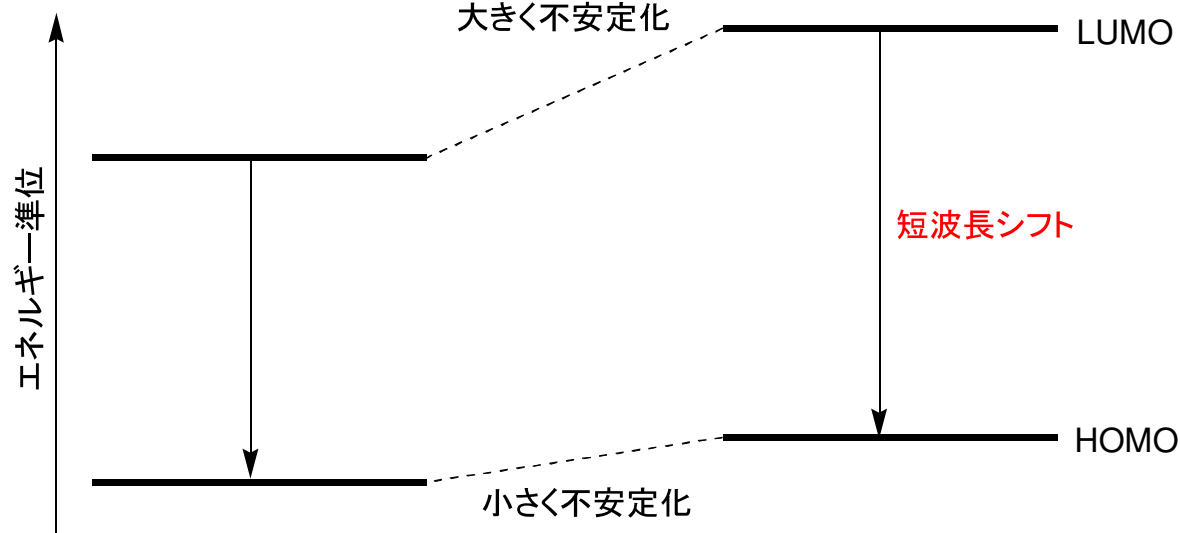
θ 小 = 軌道相互作用大 = 長波長

認識部位	センシング対象	
ボロン酸	糖	⇒ 糖鎖配列の解析
ポリマー	センシング対象	
核酸ポリマー	核酸ポリマー	⇒ SNPsの検出
分子インプリンティングポリマー	タンパク質	⇒ 抗原抗体反応の検出
刺激応答性ポリマー	物理パラメータ	⇒ 微小領域の温度センサ

分子内電荷移動型センサー分子

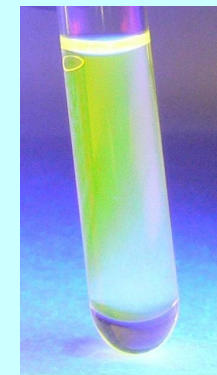
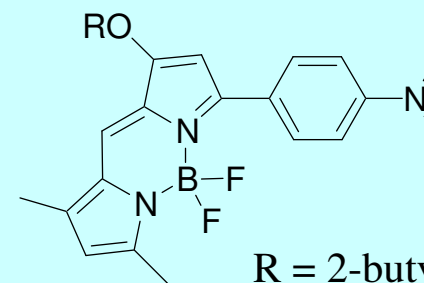


蛍光色素かつアクセプター



分子内電荷移動 (Intramolecular Charge Transfer; ICT) センサーの原理

H⁺応答性変色蛍光色素



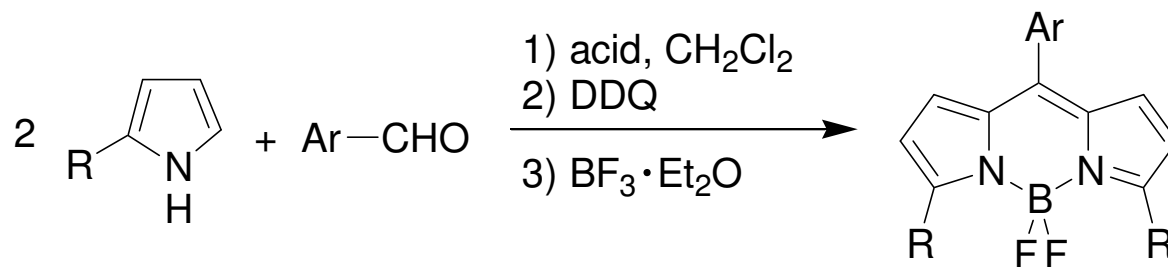
+CF₃COOH

in CHCl₃

耐久性の高い蛍光pH指示薬

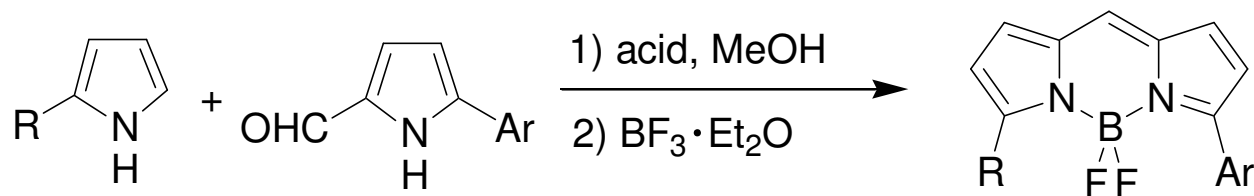
従来のボロンジピロメテンの合成法

対称型分子の合成法



認識部位 (8位のAr) が蛍光波長に影響を与えにくい

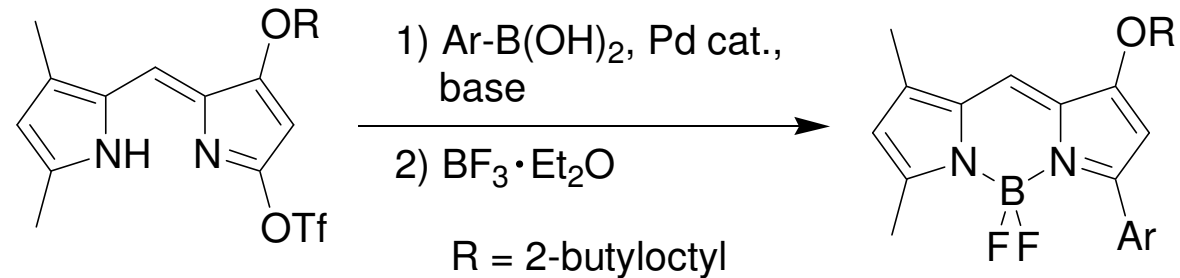
非対称型分子の合成法



認識部位を持った置換ピロールの合成が困難

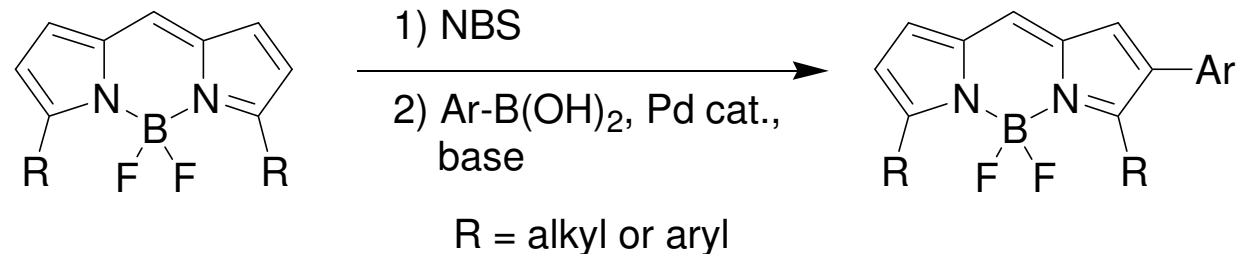
新規に開発した合成法

ジピロメントリフラートへの鈴木カップリング



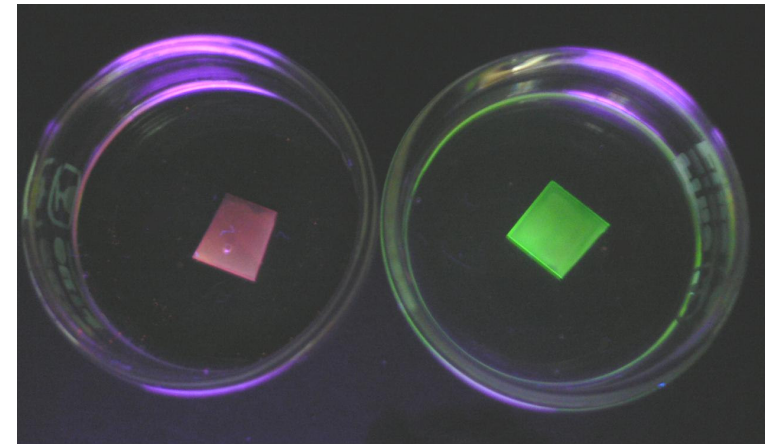
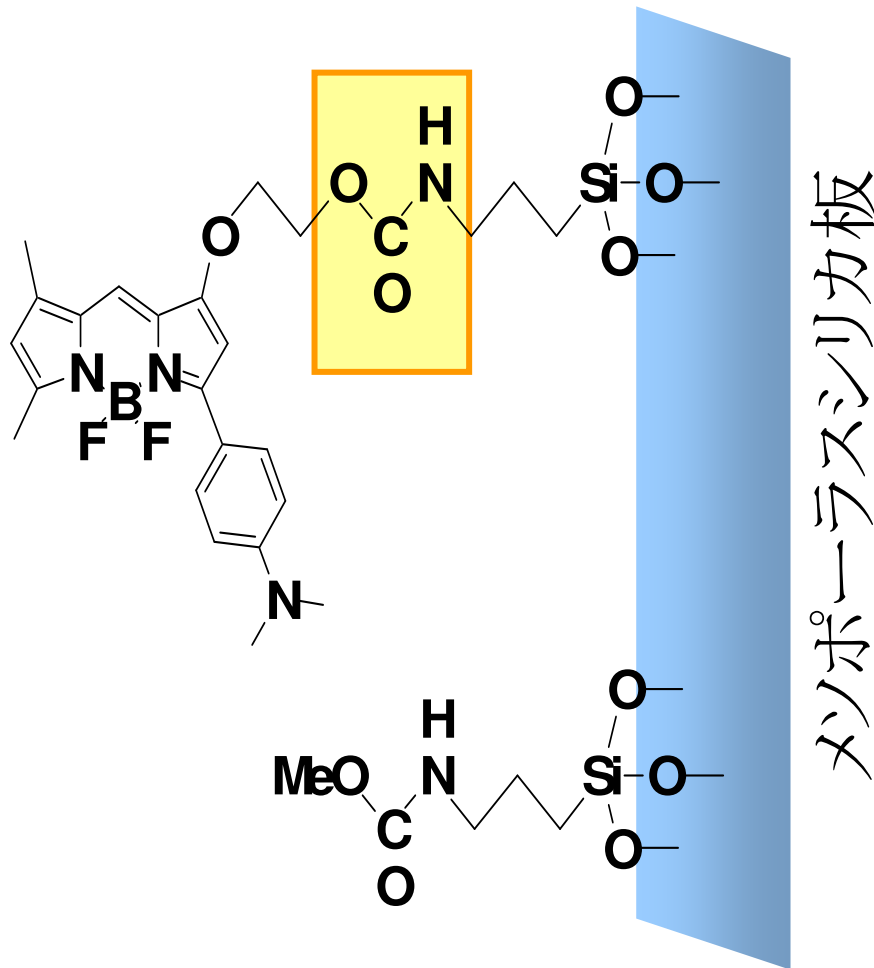
共通の原料から用途に合わせて2段階で作り分けが可能

ボロンジピロメテンへの鈴木カップリング



色素骨格形成後にラベル化・化学発光部位が付与できる

分子内電荷移動型の水溶液測定



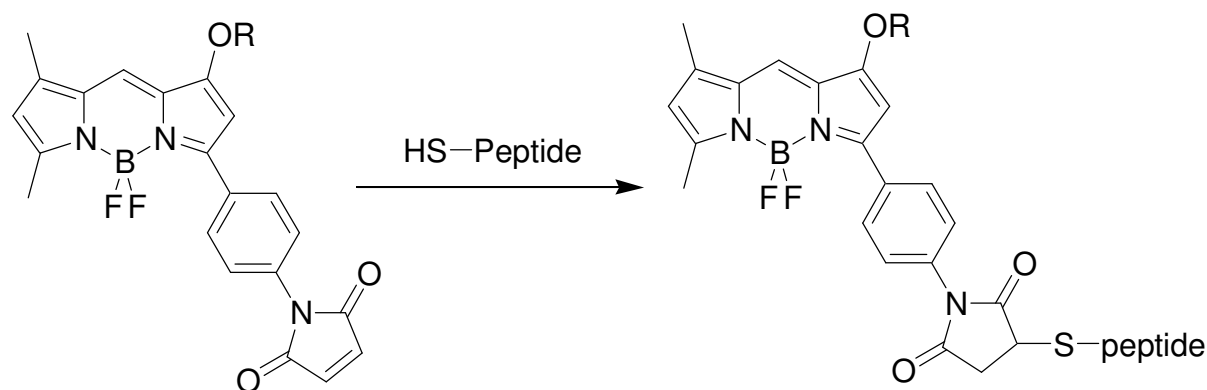
pH 7

pH 4

疎水性の高いボロンジピロメテンも親水性の基板表面に固定化することで、水溶液測定も可能となる

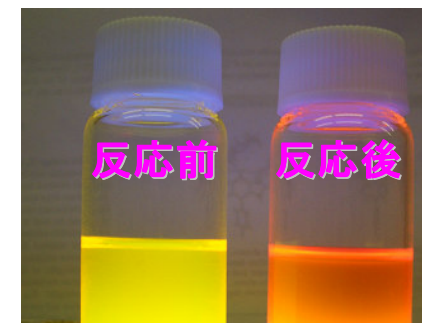
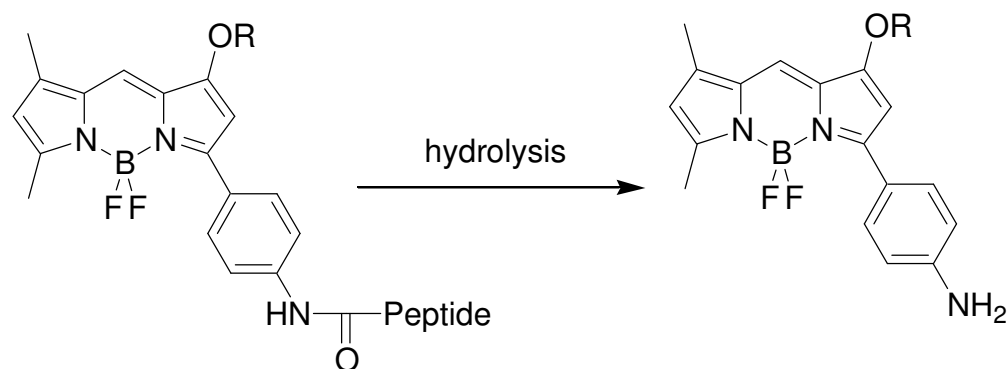
分子内電荷移動型のバイオ応用

タンパク質のラベル化



色素が無い状態・物理吸着と化学結合の識別が可能

アミド結合の加水分解

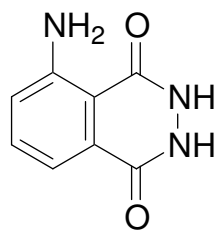


加水分解酵素反応の追跡

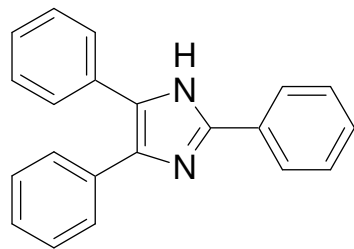
化学発光とは

化学反応により励起された色素分子から光が放出される現象

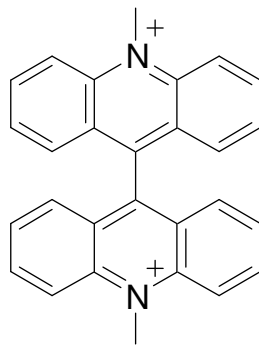
代表的な化学発光色素



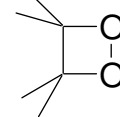
ルミノール



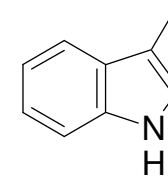
ロフィン



ルシゲニン



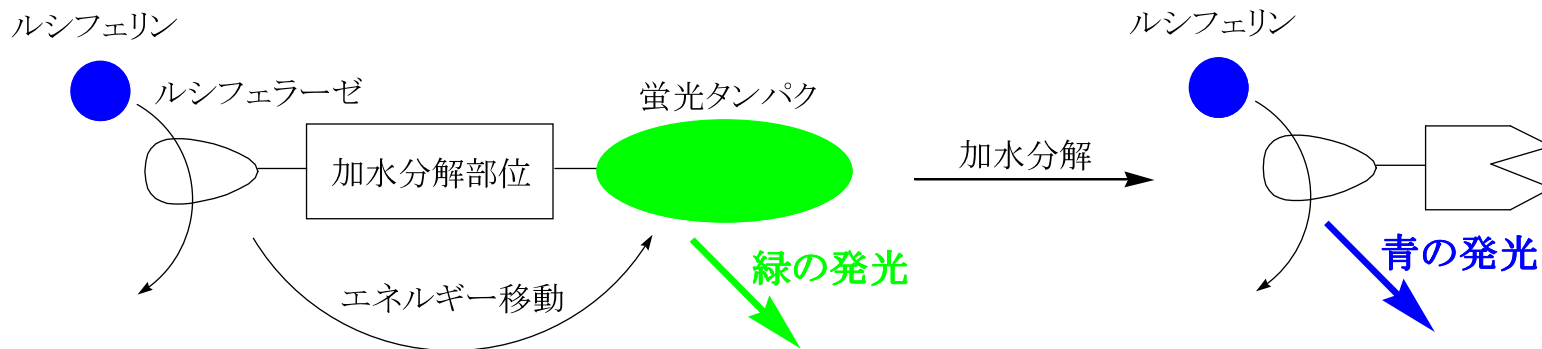
ジオキセタン



スカトール

最適な化学発光反応条件がバラバラで同時定量が難しい

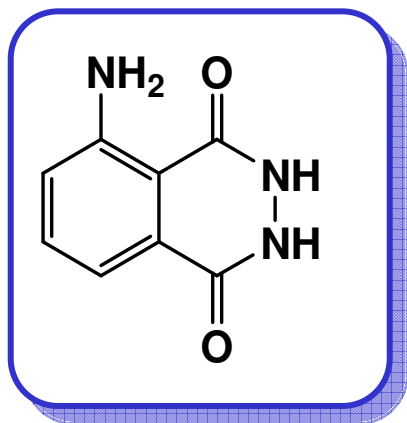
生物発光プローブ (BRETプローブ)



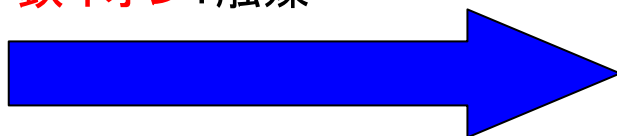
発光の分野では遺伝子組み換えによる生物発光プローブがリード

ルミノールの特徴

ルミノールの化学発光反応条件

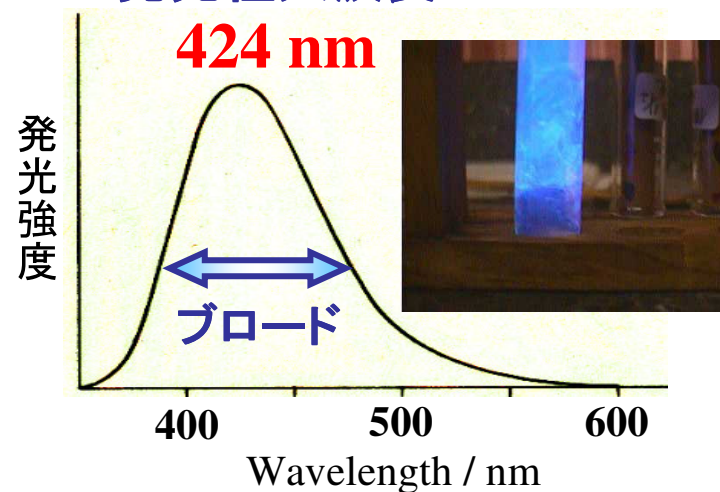


過酸化水素: エネルギー源
水酸化ナトリウム: アルカリ性
鉄イオン: 触媒

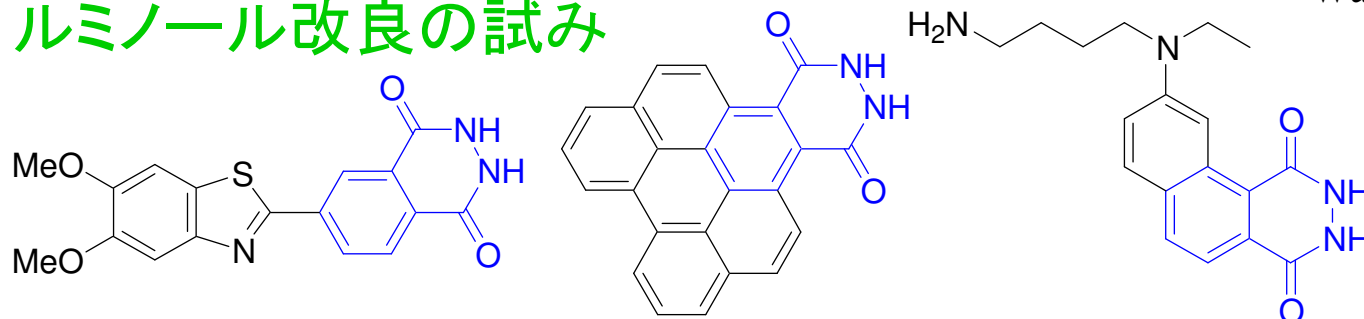


発光極大波長

424 nm

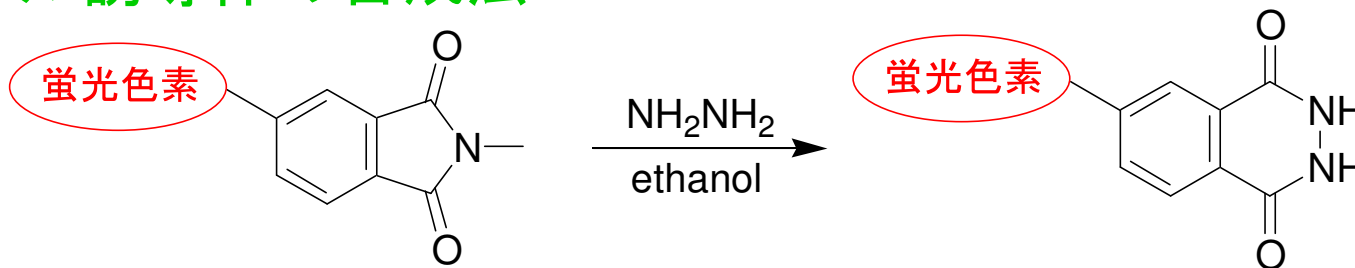


ルミノール改良の試み

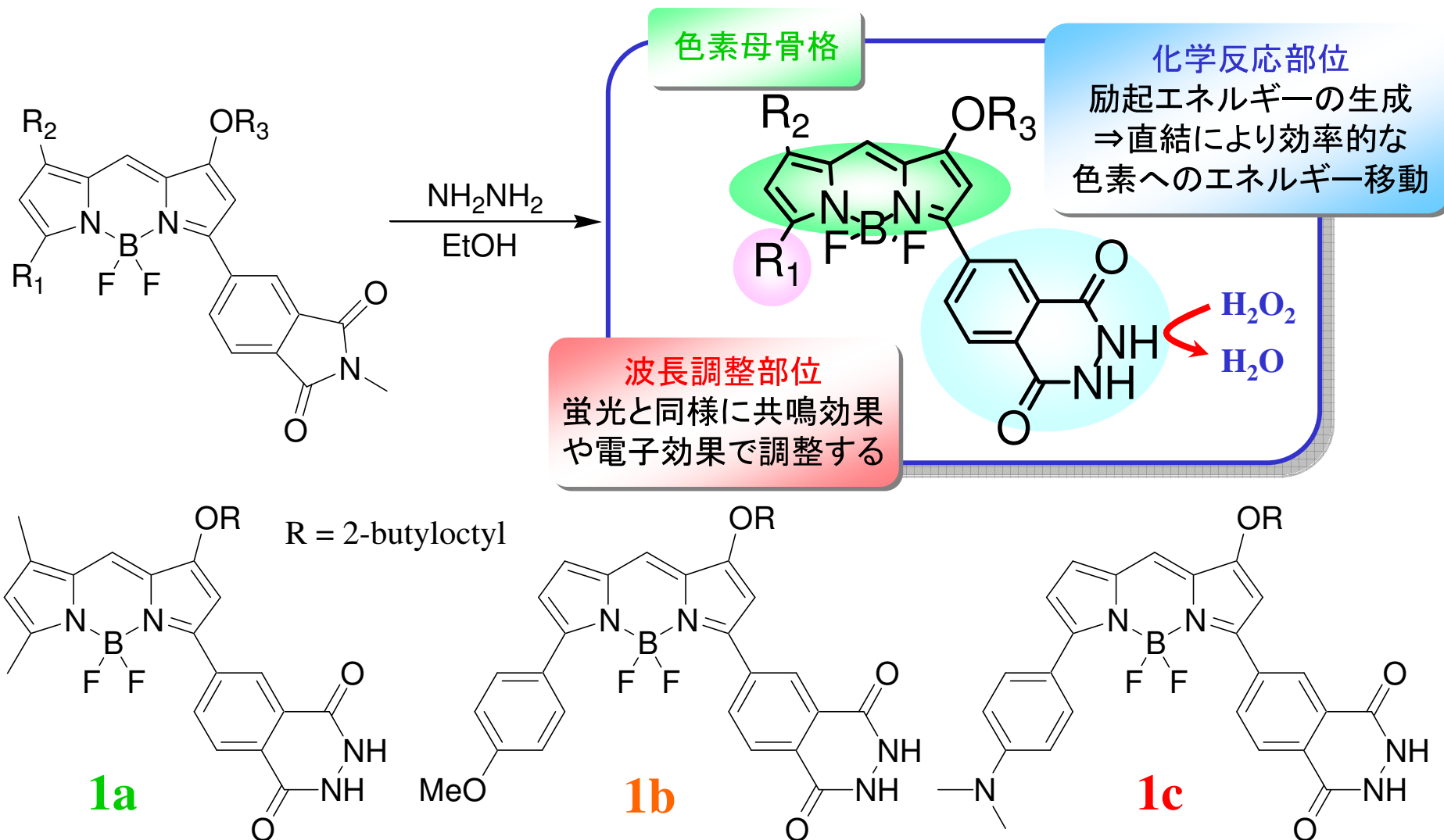


発光強度は向上したものの、発光波長はほとんど変わらない。

ルミノール誘導体の合成法



マルチカラー化学発光色素



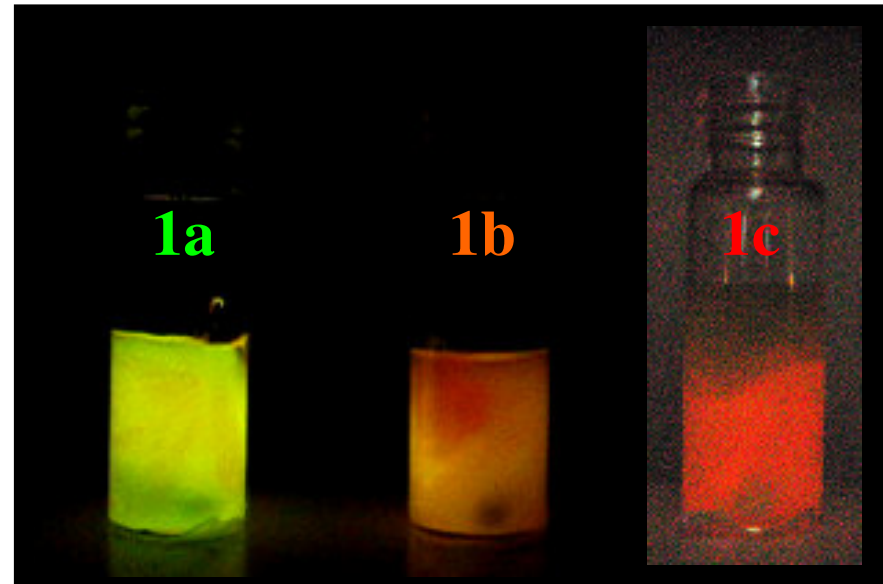
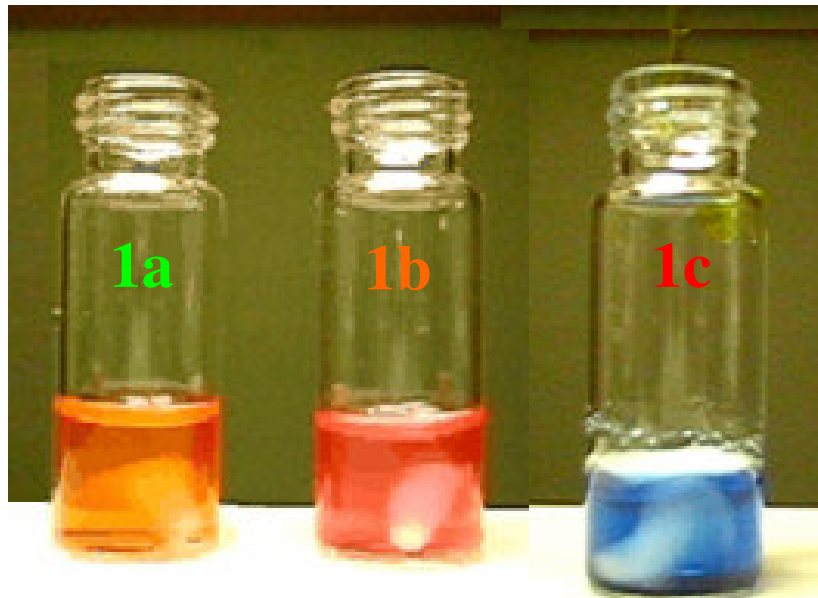
優れた化学的安定性により、複数のルミノール誘導体が合成できた

化学発光実験

1のエタノール溶液に
水酸化ナトリウム溶液を
加えた。



エネルギー源として3%過酸化
水素水、反応触媒としてフェリシ
アン化カリウム ($K_3[Fe(CN)_6]$)
を加えると...

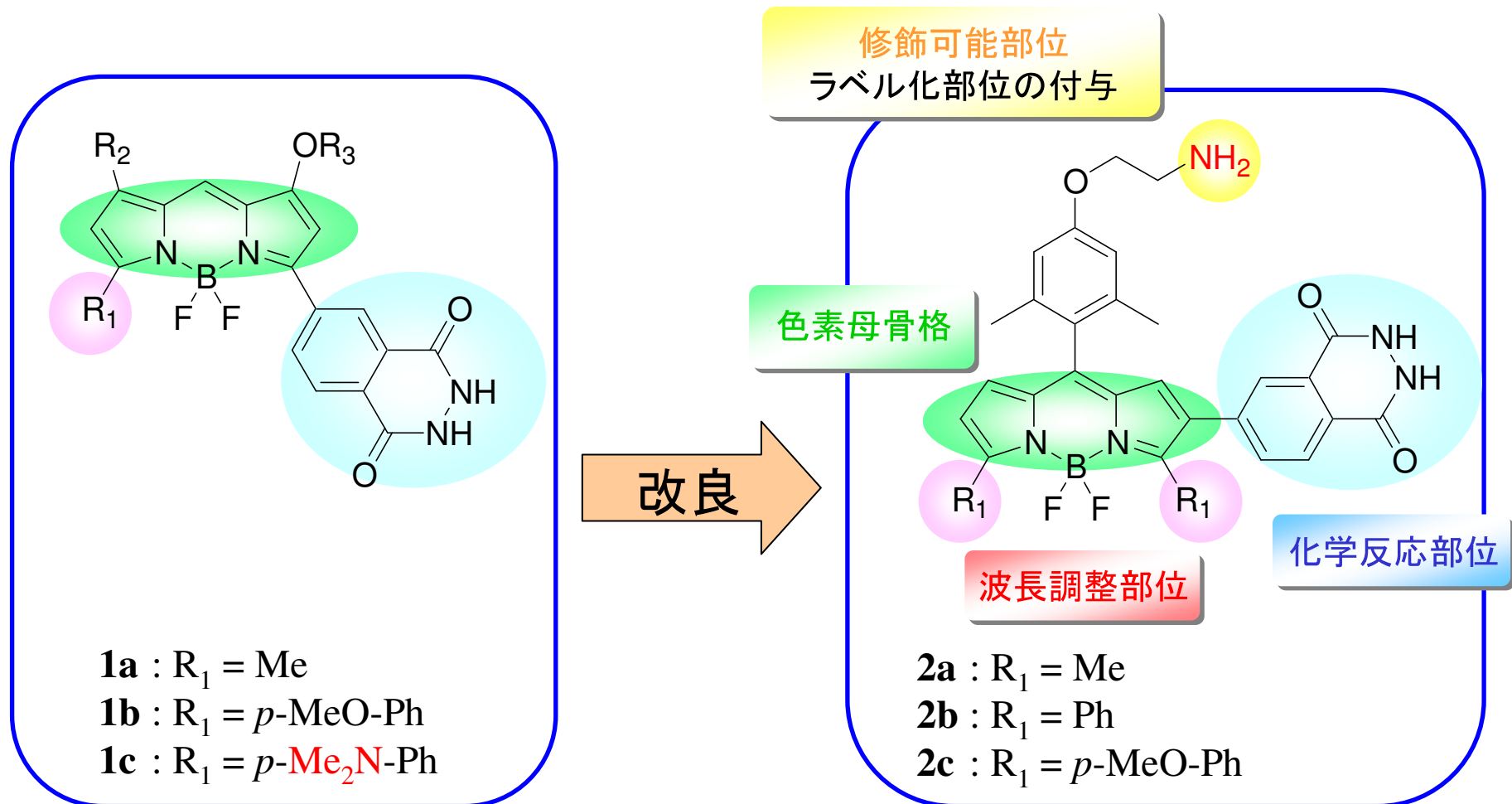


見た目でも判別できるほど色の異なる強い発光が観測できた
(1cは発光バンドが広く、発光強度も低下した)

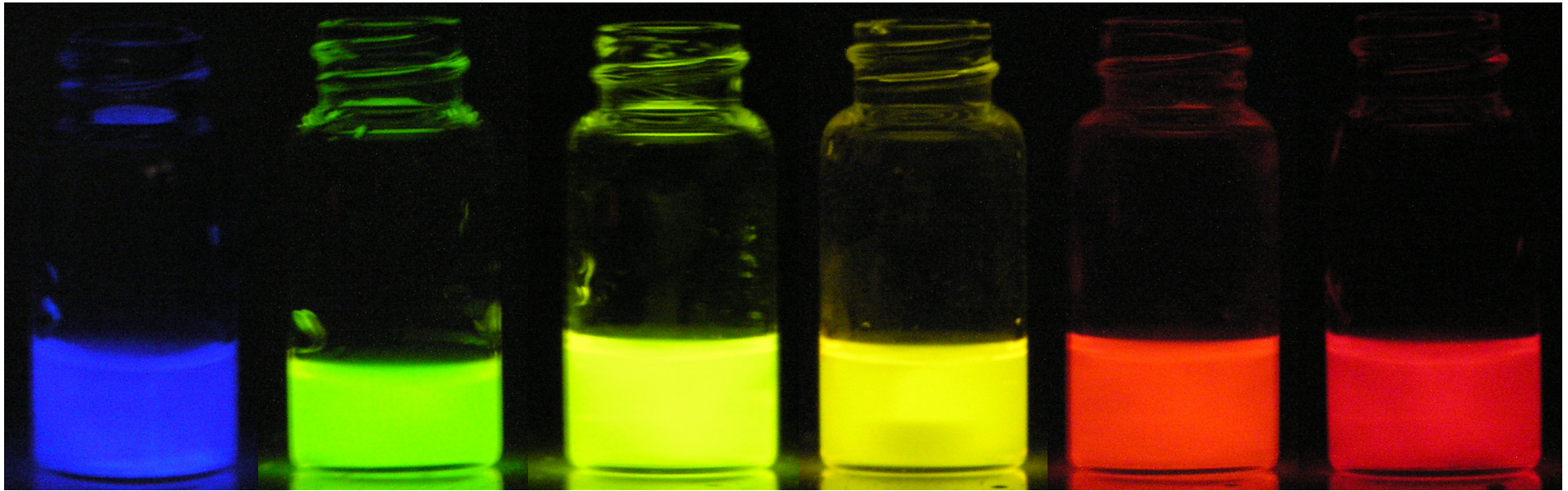
分子構造の改良

赤色の発光強度を向上 ⇒ ジメチルアミノ基 ($\text{Me}_2\text{N}-$)を使わない
波長調整部位を2ヶ所にする

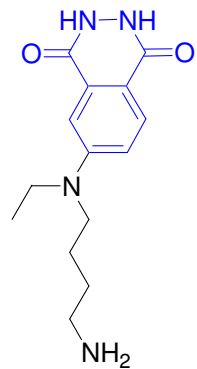
タンパク質などのラベル化 ⇒ 反応性の高いアミノ基を導入する



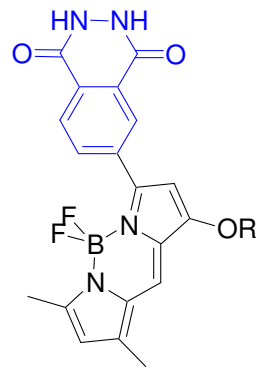
化学発光色素の構造と発光色



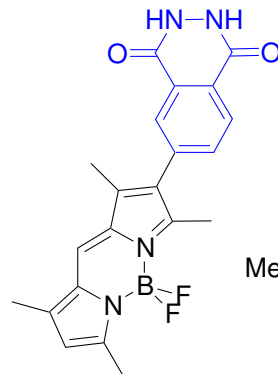
ABEI



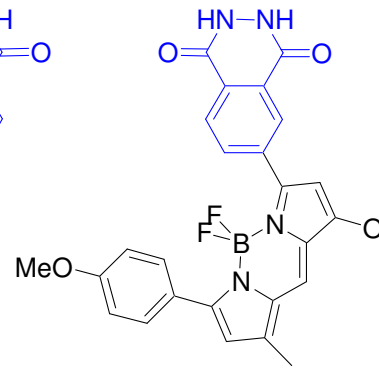
1a



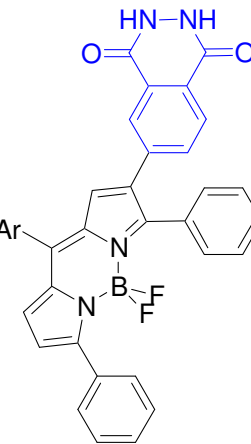
2a



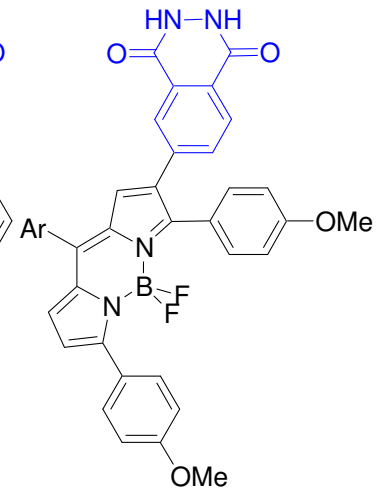
1b



2b



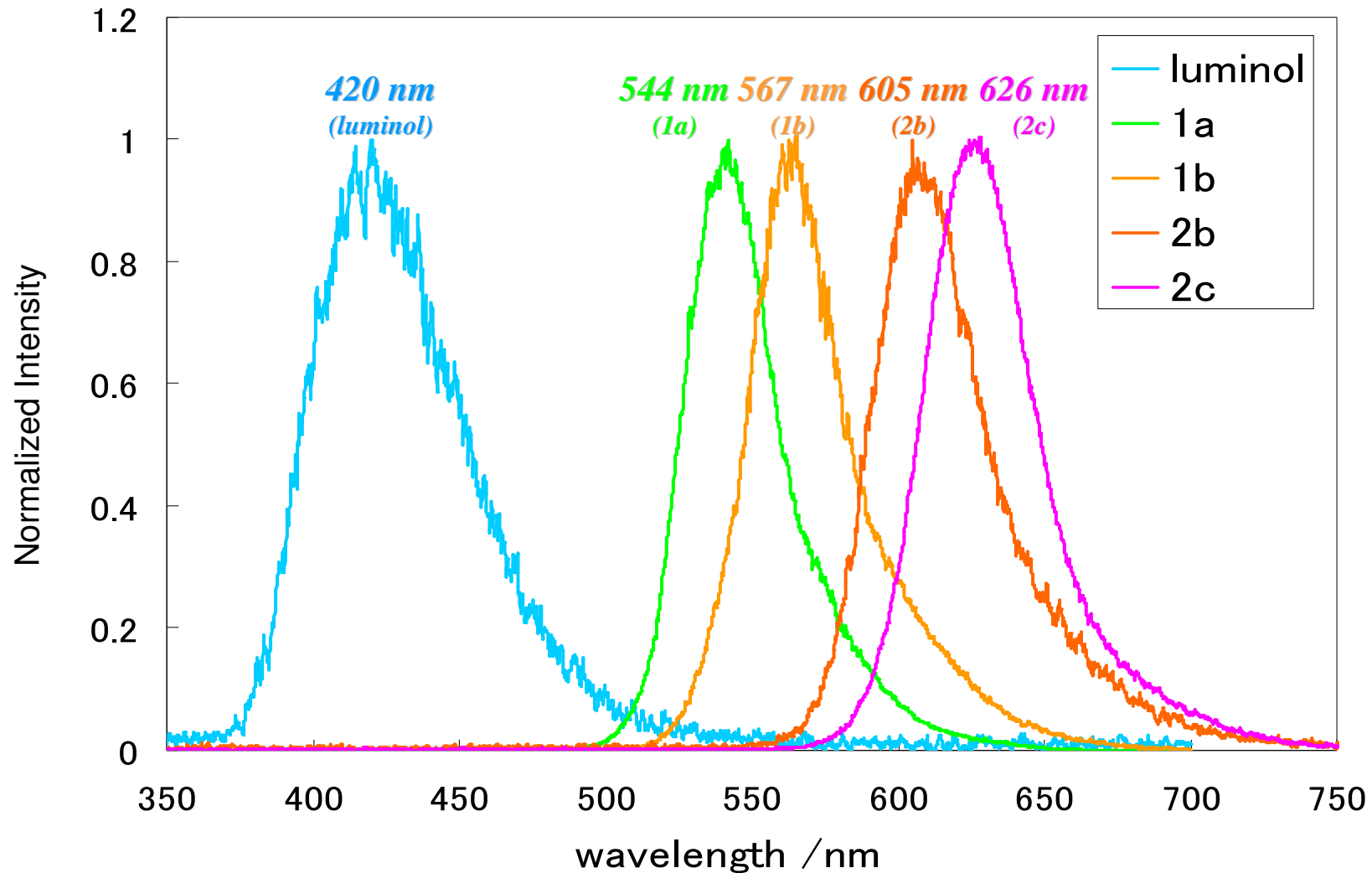
2c



R = 2-butyloctyl

Ar = Cc1cc(C)c(OCCN)cc1C

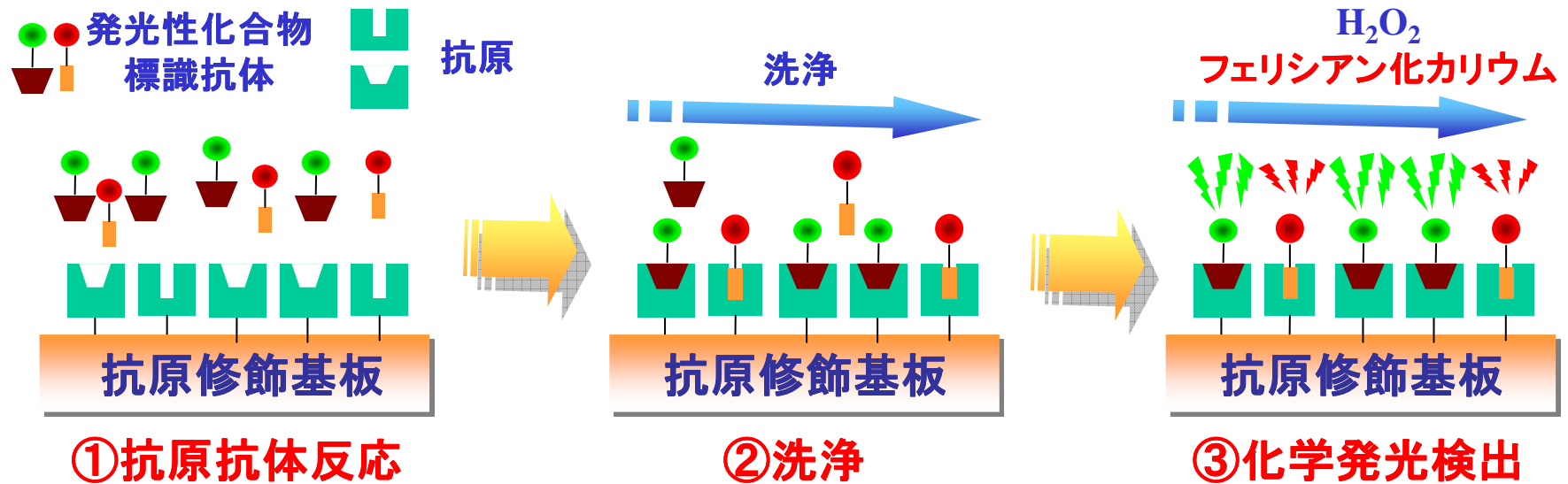
化学発光スペクトル



蛍光色素並みにバンド幅が狭く波長のバリエーションのある化学発光が、同一の反応条件で実現できた

マルチカラー化学発光色素のバイオ応用

レシオメトリックな手法を用いた定量性の高いイムノアッセイ

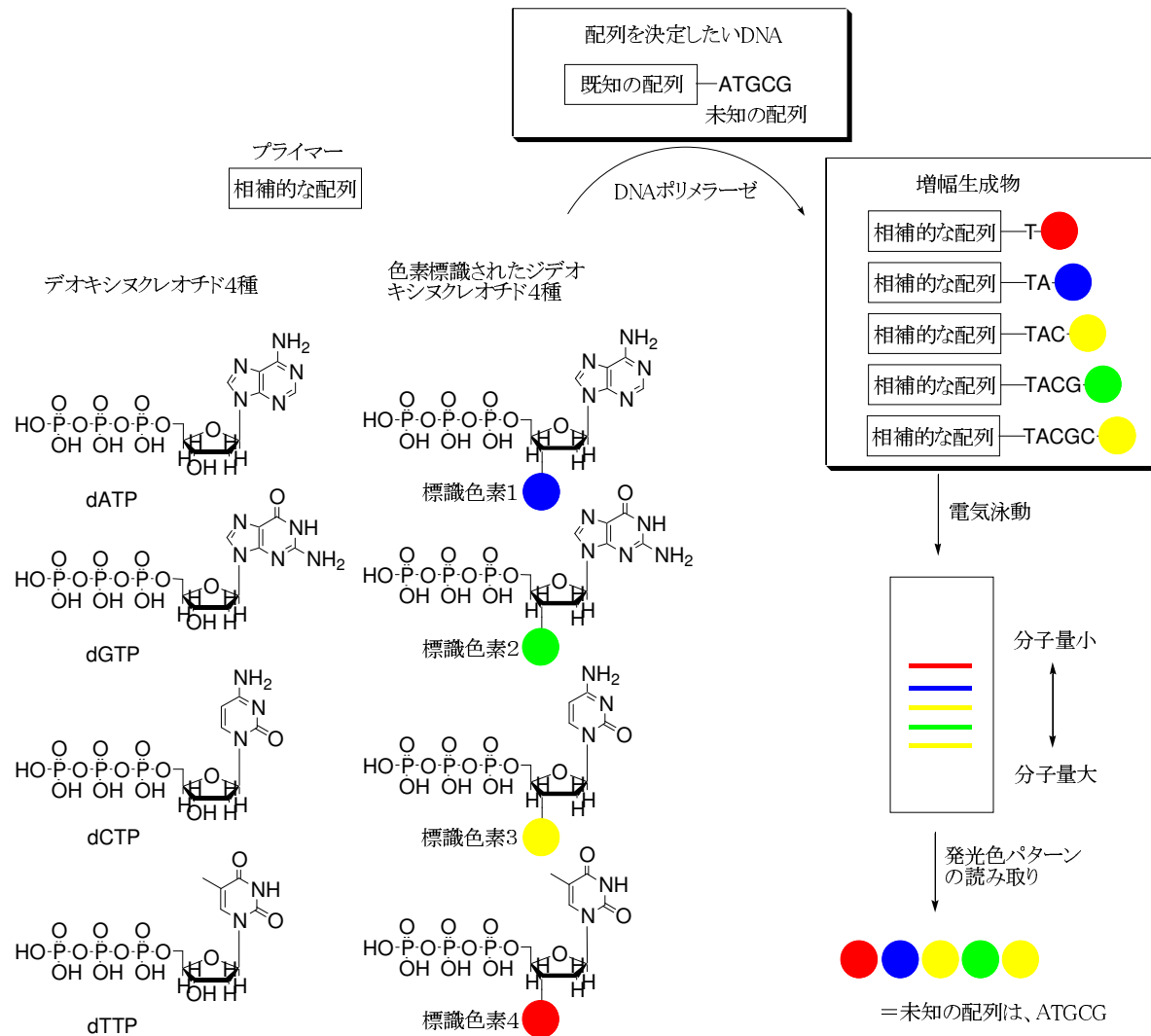


2波長の発光強度比を算出することで、単波長の時よりも定量性が向上する。

化学発光イメージング

分子内電荷移動型・配向制御型蛍光色素に化学発光部位(ルシフェリン)を付与して、細胞内の微量物質の濃度変化をリアルタイムに超高感度観測する。

Sanger法のマルチカラー化学発光検出化



蛍光ラベルの代わりに化学発光ラベルを用いて、プライマーが少量で済み、高速で、レーザー光源を必要としない手法を確立する。

バイオセンシング応用への展望

これまでの蛍光分子プローブでは観測が難しかった糖・核酸・タンパク質の識別を、構造有機化学・高分子化学・生化学の手法を組み合わせ、高感度で定量性が高く実用的なバイオセンサーの創製を目指す。

糖 配向制御型センサーを複数作成し、数理解析して特定する

核酸 SNPs解析 ⇒ 核酸配列に組み込んだ配向制御型センサー

配列解析 ⇒ Sanger法のマルチカラー化学発光ラベル化

タンパク質

ラベル化 ⇒ 蛍光波長が変化する分子内電荷移動センサー

抗原抗体反応 ⇒ マルチカラー化学発光イムノアッセイ

有害物質

酸性雨・重金属 ⇒ 分子内電荷移動型センサー＋水溶性基板

何かターゲットとして面白いものがありましたら、目的にあった色素を設計・合成しますので、yamada@ees.hokudai.ac.jpまでご相談下さい。

謝辞

慶応大学応用化学科鈴木研究室

- 飯野 真史 (分子内電荷移動型センサー分子の開発)
野村 友紀 (配向制御型センサー分子の開発)
小川 証 (蛍光バイオセンサー分子の開発)
安藤 洋介 (水溶液センサーデバイスの開発)
佐藤 朱美 (マルチカラー化学発光色素の開発)

東京大学大学院総合文化研究科菅原研究室

- 豊田 太郎 (ジャイアントベシクルの生物類似の形態変化)