

博士論文

Studies on Chemosensors utilizing Intermolecular Interactions

(分子間相互作用を用いたケモセンサに関する研究)

佐々木 由比

1. 緒言

ケモセンサは、分子間・分子内相互作用を合目的に設計することで、標的種の捕捉・認識に伴うミクロな情報を我々が知覚可能なレベルにまで増幅することができる。交差応答性を示す複数のケモセンサから構築されるセンサアレイは、パターン認識を駆使することにより、多成分の迅速かつ同時検出を可能にすることから、多岐に渡る分野での活用が期待されている。⁽¹⁾⁻⁽³⁾ しかし、従来のケモセンサアレイは、標的種の同時検出に必要な光学応答変化（分子認識に伴う波長や蛍光強度、吸光度変化を含むスペクトル変化）を多数のケモセンサを用いて作り出しているため、各ケモセンサ分子を一つ一つ合成する労力は多大となる。合成化学者の視点では、その労力は問題にはならない一方、分析化学者から見るとその難度は非常に高く、実分析へと展開する上での大きな障壁となっている。他方、アレイを構築する数多くのセンサ数に対し、実際に判別に寄与するセンサはそのうちのごく一部である。従って、ケモセンサ自体の機能を最大限に引き出し、並べたミニマムセンサアレイが構築できれば、上述の課題解決に繋がると考える。⁽⁴⁾

ミニマムセンサアレイの達成には、少ない構成分子数であっても多彩な光学応答パターンを創出するセンサ設計が必要となる。合成的労力を軽減したケモセンサの調製において、分子間相互作用は重要な役割を担う。⁽⁵⁾ 従って、分子間相互作用を基軸としたケモセンサの開発を指向し、動的共有結合及び配位結合に着目した。これらの結合が示す可逆性は、複数種の複合体形成を可能とするため、指示薬、認識部位、標的種間で生じる複合化に基づき、多彩な色調変化をもたらす。すなわち、当該分子間相互作用を活用したケモセンサを設計することが出来れば、比較的簡便にケモセンサが調製可能となるだけでなく、少数の分子数であってもその組み合わせによって指紋パターンが得られる。本論文では、それぞれの分子間相互作用を活用したミニマムセンサアレイを用いて、カチオン、アニオン、糖類の包括的検出を実証した。さらに当該アプローチを発展させ、ケモセンサの機能を最大限に引き出す取り組みに挑戦した。換言すると、1種のケモセンサから光学応答パターンを創出するアプローチによる「アレイを使わないパターン認識」の具現化である。その具体例として、動的共有結合と配位結合を一分子内に導入したケモセンサを設計し、分子認識化学における挑戦的課題であるキラルパターン認識及び光学純度の決定を1分子で達成した。本論文では、分子間相互作用によるケモセンサの機能化に関する具体的な指針とその効果を見出した内容を述べる。

2. カテコール色素でつくる金属カチオン類検出を指向した比色ケモセンサアレイ^[1]

本研究ではカテコール色素3種 (**1**, **2**, **3**) と当該色素の波長を変化させるマニピュレーター分子の3-ニトロフェニルボロン酸 (**4**) をそれぞれ混合し、環境汚染に係る金属イオン類に対する比色センサ群を調製した (図 1)。色素と **4** は動的共有結合に基づき、色調変化 (短波長シフト) を伴って自己組織的に複合体を形成する。**4** のニトロ基は電子求引性により、ボロン酸のルイス酸性度を高め、カテコール色素との複合化を促進させる働きを担う。続いて、金属イオンを添加すると競合応答により、色素と金属イオンが新たに結合し、同時に **4** が解離するため、更なる色調変化 (長波長シフト) が得られる (図 2A)。事実、中性条件下の緩衝溶液中で調製された **1** と **4** の複合体に金属イオン (例: Cu^{2+}) を添加した場合、大きな長波長シフトが観測されたのに対し (図 2B), **4** 非存在下で

はごくわずかな波長変化のみ示された (図 2C)。興味深いことに、当該センサはわずかに 3 種のケモセンサであっても金属イオンとの組み合わせにより様々な比色応答パターンが示された (図 2D)。そこで更なる展開として、自発的に調製される比色センサ群を用いてケモセンサアレイを作製し、11 種類の金属イオン類の同時検出を試みた。多変量解析モデルの一種である線形判別分析 (LDA) の結果、240 サンプルに対して 100% の精度で判別することに成功した (図 2E)。

4 非存在下ではその判別は達成されず、マニピュレーター分子はカテコール色素の光学特性変化に貢献し、分子間相互作用が本システムにおいて重要な役割を担うことが実証された。

3. オキソアニオン類検出を可能とする比色ケモセンサアレイ^[2]

水中でのオキソアニオン類の検出は、分子認識化学のみならず、環境化学や薬理学の観点からも興味深い課題である。とりわけ、除草剤グリホサート (GlyP) は 2015 年に国際がん研究機構により発がん性を有する疑いのある物質 (Group 2A) に認定されたことから、当該物質の運用にあたって適切な濃度管理が求められるようになった。そこで、カテコール色素群 (1, 2, 3, 5) に Zn^{2+} を添加し構築した金属錯体型比色センサを用いて、世界発となる除草剤グリホサート (GlyP) の比色ケモセンサアレイ開発へ展開した。当該ケモセンサの色調は、標的種の添加に伴う競合応答により変化する (図 3A)。4 種類の金属錯体型ケモセンサ群は、中性条件下の緩衝溶液中でオキソアニオン類に対して程よい選択性と交差応答性を示し、その結果、定性分析 (LDA) では全クラスター

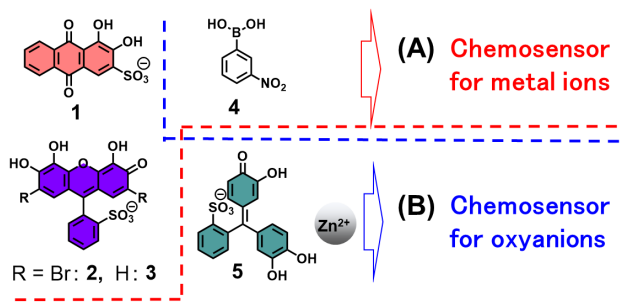


図 1. (A) 動的共有結合を活用した比色型金属センサアレイと (B) 配位結合を活用したオキソアニオンセンサアレイを構築するカテコール色素とボロン酸誘導体の分子構造。

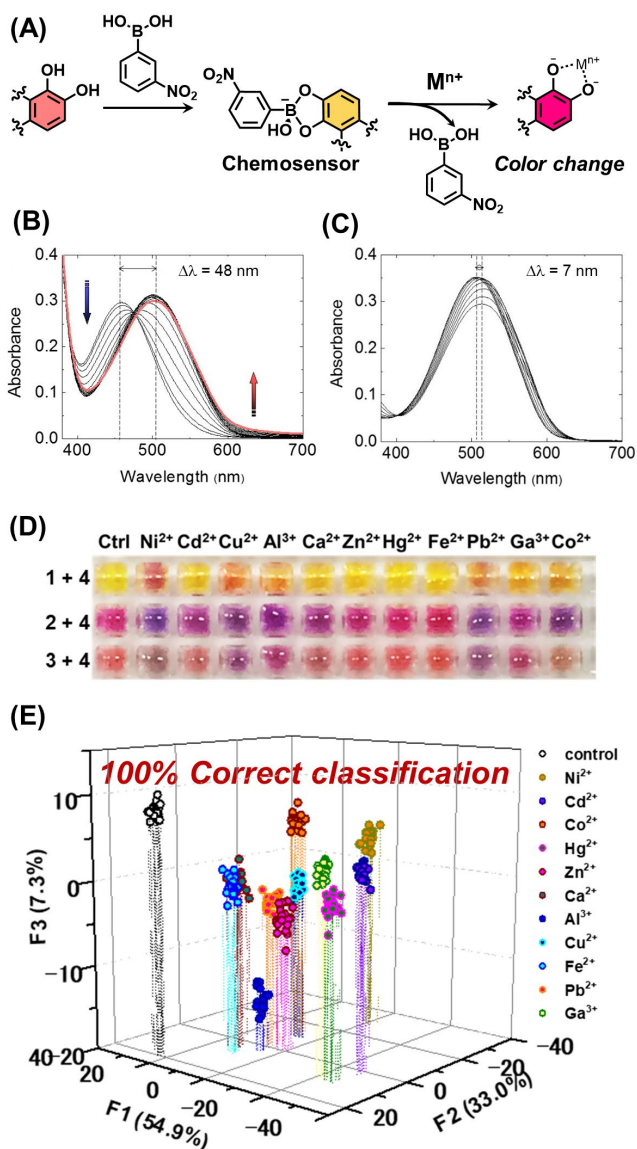


図 2. (A) 動的共有結合を活用した比色ケモセンサによる金属イオンの検出。(B) 4 存在下、(C) 4 存在下での 1 に対する Cu^{2+} 添加に伴う紫外可視吸収スペクトルの変化。(D) 金属イオン種に対する比色応答パターン。(E) 11 種の金属イオン種に対する線形判別分析 (LDA) の結果。

を 100%の精度で判別し、さらに標的種の分子構造を反映したグループ分けも達成した (図 3B)。続いて、当該比色ケモセンサアレイを用いてグリホサートに対する半定量分析及び定量分析を試みた。図 3C に示す LDA を用いた半定量分析結果より、GlyP の類縁体であるグルホシネート共存下においても各クラスターは濃度依存性を示して正しく分類された。さらに、機械学習 (人工ニューラルネットワーク, ANN) を導入し、実際に市販されている除草剤に含まれる GlyP 濃度の予測を達成した (図 3D)。本章では、配位結合を活用し、数少ない分子数で構築した金属錯体型比色ケモセンサを用いて、オキソアニオン類の検出を達成した。本取り組みでは、適切な分子を選定することで目的の標的種に合わせたケモセンサアレイを簡便に調製し、さらにパターン学習アルゴリズムとの組み合わせにより、当該システムが実サンプル中の正確な分析にも貢献し得ることを見出した。

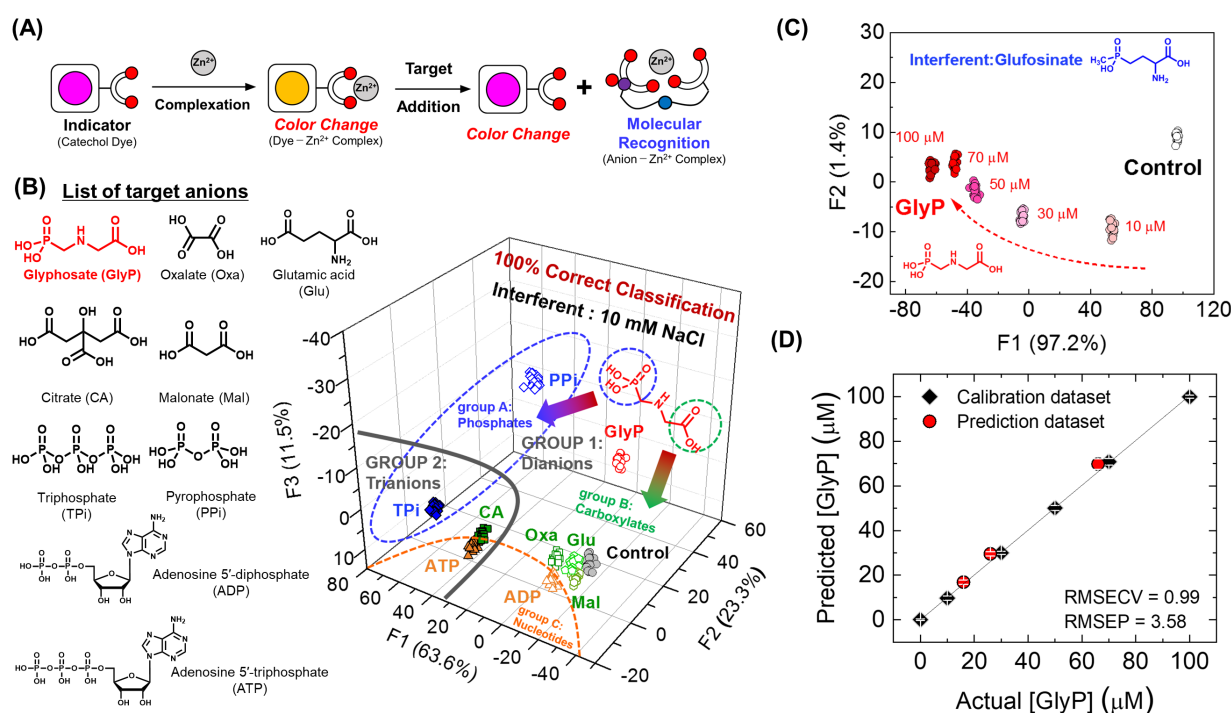


図 3. (A) 金属錯体型比色ケモセンサによるオキソアニオン類の検出機構。(B)標的オキソアニオン類の分子構造と線形判別分析の結果。(C) 干渉物質グルホシネート存在下でのグリホサートの半定量分析結果 (LDA)。(D) 人工ニューラルネットワークを用いた市販除草剤に含まれるグリホサートの濃度予測の結果 ((RMSECV と RMSEP はそれぞれ Calibration と Prediction の二乗平均平方根誤差 (root-mean-square errors of calibration, RMSE) を示す)。

4. 2つのケモセンサで14種の糖を検出する蛍光ケモセンサアレイシステム^[3]

蛍光センサを設計する際に、標的種の捕捉に伴う Turn-ON 型の蛍光応答は、ノイズ応答と分子認識に基づく応答を区別するため重要な項目の一つであるが、その作製には合成的労力を要する。

そこで本章では動的共有結合を活用した Turn-ON 型の蛍光センサを作製し、さらに環境ファクターと併用して合成的労力を要せずに、14種の糖類の同時検出を試みた。蛍光色素には、クマリン誘導体 (6, 7) を、糖の認識部位には 4 を採用した (図 4A)。4 の二トロ基は、蛍光団との自己組織的複合体形成において、光誘起電子移動に基づく蛍光消光をもたらす。一方、糖の添加に伴う競合応答では、当該複合体の開裂と糖とフェニルボロン酸の複合体形成に起因した Turn-ON 型の応答が得られる。さらに、本センサが Turn-ON 応答を示す pH 範囲 (7-9) において pH を変化させるこ

とで、結合能の変化に伴う多彩な光学パターンを得た。その結果、2種の蛍光ケモセンサで14種の単糖類に対する正確な判別を達成した(図4B)。続いて、当該システムをバイオ分析へと展開させ、ヒトiPS細胞の培養液を用いた糖代謝モニタリングを試みた(図4C)。本章では、pH変化をセンシングシステムに加えることで少ないセンサ数から多彩な指紋パターンを作り出し、バイオ分析における当該システムの有用性を証明した。

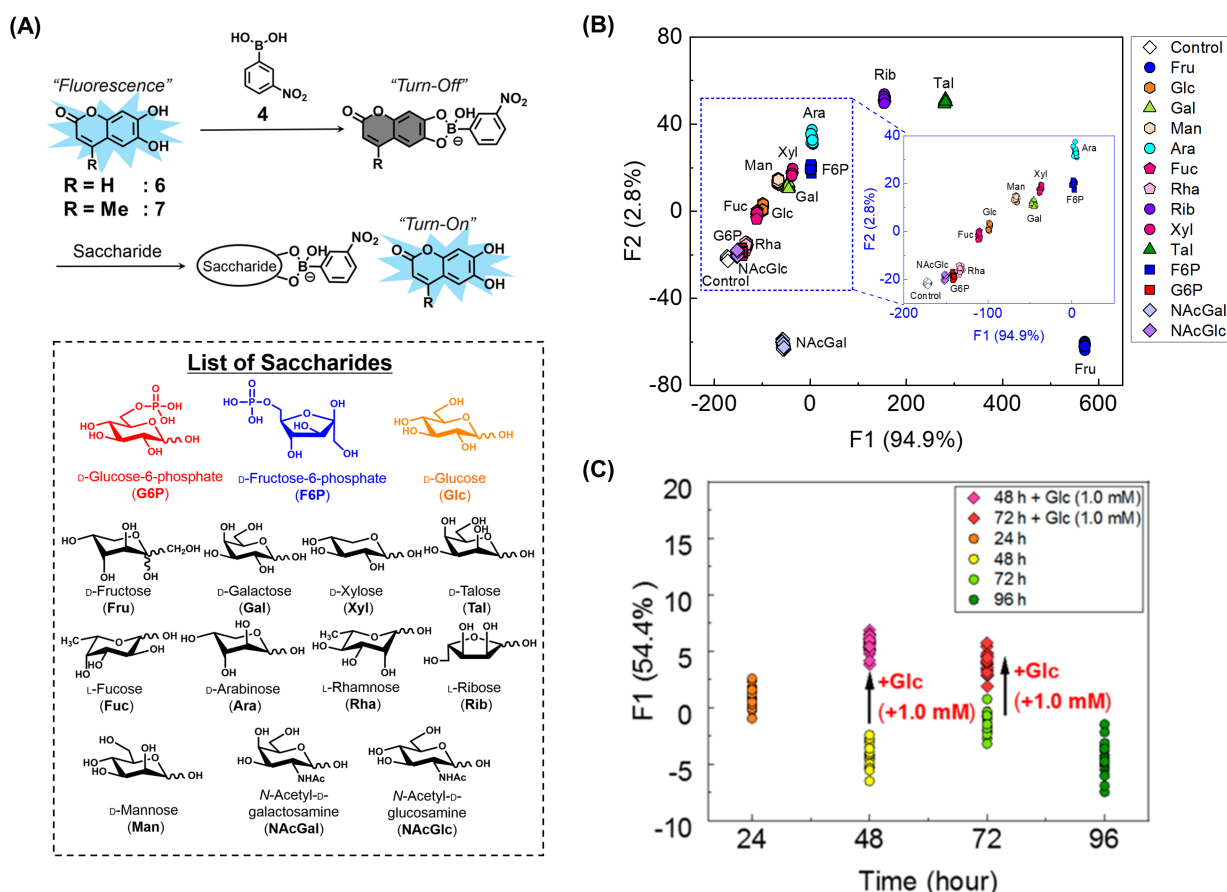


図4. (A) 光誘起電子移動を活用した Turn-ON 型蛍光ケモセンサによる糖検出の機構と、クマリン誘導体 (6, 7) 及び標的単糖類の分子構造。(B) 14 種の単糖類の線形判別分析結果 (LDA) (2 chemosensors \times 14 saccharides \times 5 pH conditions (pH 7, 7.5, 8, 8.5, 9) \times 10 wavelengths \times 20 repetitions = 28,000 をインセットデータとした。)(C) ヒト iPS 細胞の培養液を用いた間接的な糖代謝モニタリングの結果 (LDA) (iPS 細胞培養液に対し、人工的に 1.0 mM の Glc をスパイクした。スパイク後のクラスターの位置変化はその糖代謝を示唆している。)

5. 1 分子で達成する光学純度決定法の創成^[4]

ケモセンサの機能を最大限に引き出した「アレイを使わないパターン認識」を具現化するために、1種のケモセンサの中に波長及び強度変化を含むスペクトル変化を引き起こすセンサ設計が必要となる。本研究では、ピリジン環を有する新規ビナフチル誘導体 (8) と Zn^{2+} から構成される金属錯体型蛍光ケモセンサを採用し、アミノアルコール及びジアミン類に対するキラル認識能の調査とタミフルの母骨格となるシクロヘキサンジアミン (CHDA) に対する光学純度決定 (ee 決定) を試みた(図5A)。当該錯体は、標的アミン非存在下では蛍光発光を示さないが、アミンの添加に伴うイミノ化反応が進行すると、シッフ塩基型複合体の剛直性が増大し、ビナフチル誘導体の無輻射失活抑制に基づく Turn-ON 応答を示す。興味深いことに、CHDA のエナンチオマー間では 2,500 倍の蛍光

強度比が生じただけでなく、 Zn^{2+} の分子内電荷移動に起因した蛍光波長と剛直性の増大・減少に由来する蛍光強度変化 (OFF-ON 及び ON-OFF) が観測された (図 5B, C)。他方、アミノアルコールの場合には蛍光強度のみ変化し、ジアミンで観測された複雑な応答は示さなかった。エナンチオマー間では、シッフ塩基形成における相補性の差が起因して異なる蛍光応答を示す。また、ジアミンの場合 Zn^{2+} の引き抜きが生じるため、過剰量存在下 (1.5 当量以上の CHDA) で ON-OFF の挙動を示したのに対し、塩基性度が異なるアミノアルコールでは当該応答は観測されなかった。当該応答から、動的共有結合及び配位結合を適切に組み合わせることで、たった 1 種のケモセンサであっても多彩な光学応答パターンを作り出すことができる、という知見を得た。本現象を活用し、1 種のケモセンサで 10 種類のキラルアミン類を同時判別及び ANN による ee 決定を達成した (図 5D, E)。

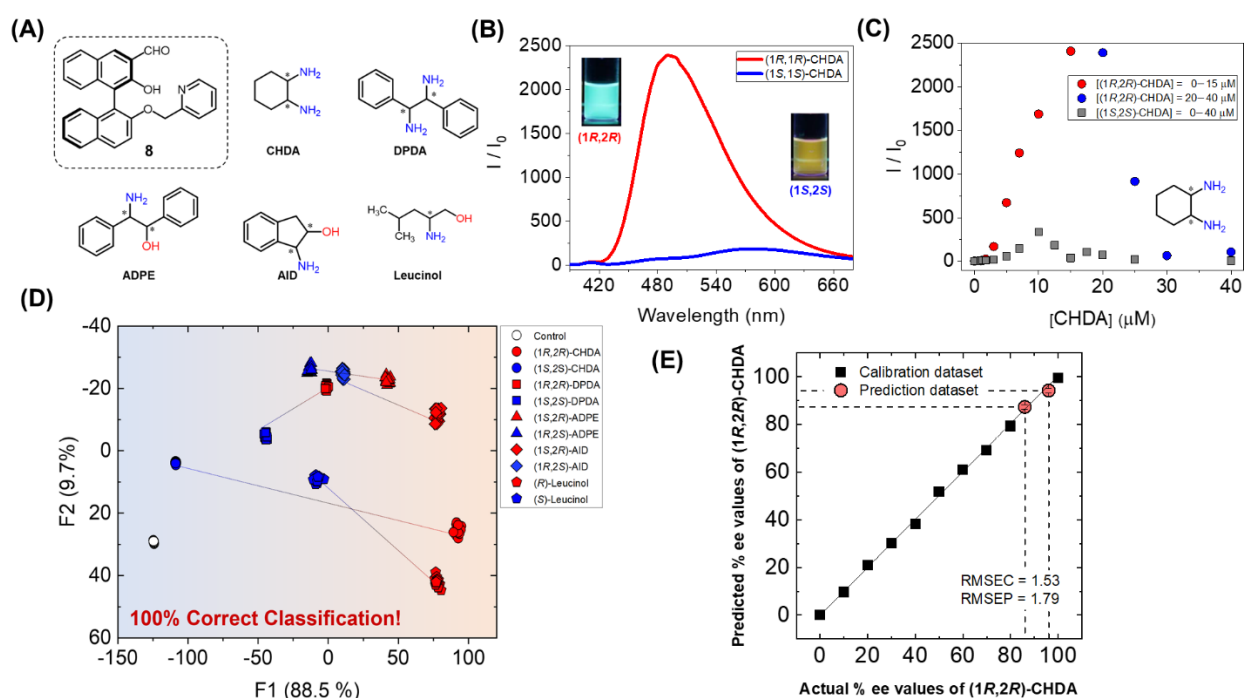


図 5. (A) ピナコチル誘導体 (**8**) と標的キラルアミン類の分子構造。(B) メタノール中での CHDA に対する **8** と Zn^{2+} のキラル蛍光選択性 ($[8] = [Zn(OAc)_2] = 10 \mu M$, $[CHDA] = 20 \mu M$, $\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$.) と(C) CHDA の蛍光滴定結果。(D) 10 種のキラルアミン類に対する線形判別分析結果 (LDA)。(E) 人工ニューラルネットワークによる(1R,2R)-CHDA の光学純度決定 (86% ee と 96% ee に対して行われた。)

6. 結言

本論文では、分子間相互作用を基軸とし、数少ない構成分子で作製したミニマムセンサアレイによるカチオン、アニオン、糖類の包括的検出から、本研究の主目的である「1 種のケモセンサから創出される光学応答パターン」を用いたキラル認識及び光学純度決定の達成法を述べた。本成果より提唱された、「アレイを使わないパターン認識」というセンサシステムにおける新概念は、今後のケモセンサ研究に波及効果を与え得ると期待できる。

7. 参考文献

- (1) N. A. Rakow and K. S. Suslick, *Nature*, **2000**, 406, 710.
- (2) P. Anzenbacher, Jr. et al., *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 395.
- (3) K. L. Diehl and E. V. Anslyn, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 8596.
- (4) P. Anzenbacher, Jr. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 7705.
- (5) E. V. Anslyn et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 649.

8. 査読付き原著論文

- [1] **Y. Sasaki**, T. Minamiki, S. Tokito, T. Minami, *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 6561.
- [2] V. Hamedpour[†], **Y. Sasaki**[†], Z. Zhang[†], R. Kubota, T. Minami, *Anal. Chem.*, **2019**, 91, 13627. ([†]Co-first author)
- [3] **Y. Sasaki**, É. Leclerc, V. Hamedpour, R. Kubota, S. Takizawa, Y. Sakai, T. Minami, *Anal. Chem.*, **2019**, 91, 15570.
- [4] **Y. Sasaki**, S. Kojima, V. Hamedpour, R. Kubota, S. Takizawa, I. Yoshikawa, H. Houjou, Y. Kubo, T. Minami, *Chem. Sci.*, **2020**, 11, 3790.
- [5] **Y. Sasaki**, K. Asano, T. Minamiki, Z. Zhang, S. Takizawa, R. Kubota, T. Minami, *Chem. -Eur. J.*, in press.
- [6] **Y. Sasaki**, S. Ito, Z. Zhang, X. Lyu, S. Takizawa, R. Kubota, T. Minami, *Chem. -Eur. J.*, in press.
- [7] **Y. Sasaki**, V. Hamedpour, R. Kubota, Y. He, Y. Torii, T. Minami, *Chem. Lett.*, **2019**, 48, 1368.
- [8] **Y. Sasaki**, Z. Zhang, T. Minami, *Front. Chem.*, **2019**, 7, 49.
- [9] **Y. Sasaki**, T. Minami, T. Minamiki, S. Tokito, *Electrochemistry*, **2017**, 85, 775.
- [10] T. Minamiki[†], **Y. Sasaki**[†], S. Tokito, T. Minami, *ChemistryOpen*, **2017**, 6, 472. ([†]Co-first author)
- [11] T. Minamiki, Y. Hashima, **Y. Sasaki**, T. Minami, *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 6907.
- [12] T. Minami, **Y. Sasaki**, T. Minamiki, P. Koutnik, P. Anzenbacher Jr., S. Tokito, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 17666
- [13] T. Minami, **Y. Sasaki**, T. Minamiki, S. Wakida, R. Kurita, O. Niwa, S. Tokito, *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, 81, 87.
- [14] T. Minamiki, T. Minami, **Y. Sasaki**, R. Kurita, O. Niwa, S. Wakida, S. Tokito, *Anal. Sci.*, **2015**, 31, 725.
- [15] K. Asano, M. Aiko, Y. Yamanashi, **Y. Sasaki**, K. Nakahara, T. Minamiki, T. Koike, T. Minami, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **2020**, 59, SGGG07.
- [16] P. Didier, N. Lobato-Dauzier, N. Clément, A. J. Genot, **Y. Sasaki**, É. Leclerc, T. Minamiki, Y. Sakai, T. Fujii, T. Minami, *ChemElectroChem*, **2020**, 7, 1332.
- [17] Z. Cao, Y. Cao, R. Kubota, **Y. Sasaki**, K. Asano, X. Lyu, Z. Zhang, Q. Zhou, X. Zhao, X. Xu, S. Wu, T. Minami, Y. Liu, *Front. Chem.*, **2020**, 4, 414.
- [18] H. Lee, G. Bonfante, **Y. Sasaki**, N. Takama, T. Minami, B. Kim, *Med. Devices Sens.* **2020**, 3, e10109.

9. 総説・解説

- [1] **佐々木由比**, 南豪, 分析化学, **2018**, 67, 519.
- [2] **佐々木由比**, 南木創, 南豪, 有機合成化学協会誌, **2018**, 76, 1086.
- [3] 南木創, 浅野康一郎, **佐々木由比**, 窪田陸, 南豪, *Chemical Sensors*, **2019**, 35, 131.
- [4] R. Kubota, **Y. Sasaki**, T. Minamiki, T. Minami, *ACS Sens.*, **2019**, 4, 2571.
- [5] T. Minamiki, **Y. Sasaki**, S. Shiwei, T. Minami, *Polym. J.*, **2019**, 51, 1.
- [6] T. Minami, T. Minamiki, **Y. Sasaki**, *Electrochemistry*, **2018**, 86, 303.
- [7] T. Minamiki, R. Kubota, **Y. Sasaki**, K. Asano, T. Minami, *ChemistryOpen*, **2020**, 9, 573.

10. 受賞歴

- [1] 学生講演賞, 日本化学会第 99 春季年会, 2019 年 3 月
- [2] 発明大賞, 第 12 回東京大学学生発明コンテスト, 2019 年 2 月
- [3] Poster Award, The 9th Shanghai International Symposium on Analytical Chemistry, 2018 年 11 月
- [4] 学生発表会・交流会優秀ポスター発表賞, 関東高分子若手研究会, 2018 年 3 月
- [5] 産業界シンポジウム若手ポスター賞, 第 77 回分析化学討論会, 2017 年 5 月
- [6] 第 5 回 Poster Award, 第 62 回応用物理学会春季学術講演会, 2015 年 7 月