



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	表面での鈴木-宮浦クロスカップリングを用いた蛍光溶バトクロミックビーズの合成及び光導波路分光装置によるバイオアフィニティーセンシングデバイスの構築 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	大塚, 侑
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第14341号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81754
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yu_Otsuka_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士（環境科学）

氏 名 大塚 侑

学 位 論 文 題 名

表面での鈴木-宮浦クロスカップリングを用いた蛍光ソルバトクロミックビーズの合成及び光導波路分光装置によるバイオアフィニティーセンシングデバイスの構築

(Synthesis of fluorescent solvatochromic beads via Suzuki-Miyaura cross-coupling on the surface and its optical waveguide spectra to fabrication of bio-affinity sensing device)

バイオセンシングデバイスは、対象となる分析物を光学的・電気化学的或いは磁気等のシグナルに変換し、検出する分析装置である。光導波路分光装置は、励起光を全反射条件でほぼロスすることなく伝搬し、光導波路に接している蛍光分子をエバネッセント波によって励起し、その吸収および蛍光発光スペクトルを非破壊且つ迅速に測定することができる光学測定装置である。エバネッセント波は導波路境界面数百ナノメートルに存在する蛍光分子を励起することから、バックグラウンドの光ノイズが非常に少なく、生体物質の相互作用や分子認識を高感度に検出することができるため、全反射照明（TIRF; Total Internal Reflection Fluorescence）を用いる蛍光顕微鏡やバイオセンシングデバイスに利用されている。しかし、エバネッセント波は導波路境界面の近傍のみ励起することから、観測対象に蛍光色素をラベル化した上で界面に近接する必要がある為、分析対象を導波路表面へ固定せずバイオセンシングに十分なシグナルを得ることは難しい。

本論文では、分析対象の直接の標識化（以下ラベルフリーという）を必要とせず、なおかつエバネッセント波を用いることで生体分子認識をレシオメトリック測定することが可能な蛍光センシングデバイスの構築を試みた。センシングに用いる材料として、固相合成法及び鈴木-宮浦クロスカップリングの技術を用いて、表面近傍の溶媒の極性変化に応答する性質を示す蛍光ソルバトクロミックビーズを合成した。そして、このビーズにビオチンを導入することで、ラベルフリーなアビジン類を検出し、生体分子認識の過程を蛍光色変化で追跡するラベルフリーな蛍光バイオアフィニティーセンシングデバイスとしての有用性を評価した。

第一章では、エバネッセント波を用いる光導波路分光装置の利点、ラベルフリーな蛍光バイオアフィニティーセンシングデバイスを構築する為に利用した固相合成法の概要及び利点を示し、本論文の計画を示した。

第二章では、蛍光ソルバトクロミックビーズを鈴木-宮浦クロスカップリングによって合成する手法を示し、光導波路分光装置を用いた光物性の測定手法について検討を行った。電子求引性部位となる4-ヨード安息香酸を固相であるWang resinに固定し、芳香族部位であるチオフェンと電子供与性部位のジヘキシルアミノフェニル基が直結したボロン酸エステル中間体を用いて、一段階の反応で目的のビーズが合成されることを述べた。そして、合成されたビーズの表面が周囲の溶媒極性に対

して蛍光発光で応答することが光導波路分光装置による測定で確認された。さらに、合成されたビーズは1,4-dioxaneとDMFの二種混合溶媒に対してもほぼ線形的な蛍光スペクトルシフトが見られ、レシオメトリック応答を示していると考えられる。この結果から、光導波路分光装置と組み合わせることで、極性変化を伴う反応をビーズ上で追跡することが可能な蛍光センシングデバイスとしての応用が可能であることが示された。

第三章では、生物分子認識として知られるアビジン-ビオチン相互作用をエバネッセント波によって光学的に追跡、その親和性を分析する為に、ビオチン化蛍光ソルバトクロミックビーズを合成し、光導波路分光装置による測定から分子認識を追跡することに成功した。本章では、前章の様に中間体を用いることなく、蛍光ソルバトクロミック色素誘導体を多段階反応によってビーズ上で合成し、アビジンに対して分子認識を示すビオチンを導入した蛍光ソルバトクロミックビーズが得られる合成手法を示した。ビオチン化蛍光ソルバトクロミックビーズは中性アビジンを含むホスフェートバッファー (PBS) 溶液に対して蛍光スペクトルのブルーシフト及び蛍光強度の増加が確認された。これは中性アビジンが形成する疎水場にビーズ上の色素分子が取り込まれたことによる現象であると考えられる。また、添加する中性アビジン量に比例した蛍光強度の増加が見られたことから、分子認識の過程を蛍光強度から追跡可能であることが示された。中性アビジンを添加した際の、経時変化による蛍光スペクトル変化を測定したところ、約100秒で蛍光強度の変化しない平衡状態に至ることが確認された。対して、非特異吸着の一例としてウシ血清アルブミン (BSA) を添加したところ、中性アビジンよりも緩やかに蛍光強度が増加することが確認された。中性アビジンとBSAそれぞれの反応初期では、中性アビジンがBSAよりも蛍光強度の増加速度に約8倍の差が見られた。よって、ビーズは中性アビジンに親和性を示すことが確認された。また、中性アビジン又はBSAを添加したビーズを、PBS溶液で洗浄したところ、BSAを添加したビーズは洗浄によって蛍光強度は大幅に減少し、中性アビジンを添加したビーズは蛍光強度が減少することがなかった。よって、中性アビジンがビーズ表面の色素分子に修飾されているビオチンと不可逆な結合を形成している明確な証拠であり、本測定システムは形成した複合体の物理的性質を分析する事も可能であることが示された。さらに、中性アビジン、BSA、アビジンの3種を添加した際の蛍光スペクトルを測定した結果、中性アビジンの添加されたビーズは、BSA添加時よりもわずかに短波長に極大蛍光波長を示した。アビジンは最も蛍光強度が高く、極大蛍光波長も短波長であった。これは未処理の糖鎖が存在することで中性アビジンよりも結合サイトが疎水的な環境であることが理由であると考えられる。このように、合成されたビーズは生体分子認識の特異性を評価するのみならず、吸着した生体物質の性質を蛍光発光から類推できる可能性が示唆された。本章にて示した蛍光バイオアフィニティーセンシングデバイスは、ビーズ表面の蛍光ソルバトクロミック色素誘導体に修飾する生体親和性のある官能基を自由に組み替えることで、多様な生体分子認識を光学的に分析することのできる有用な蛍光バイオアフィニティーセンシングデバイスとして利用できる可能性を示している。

結果として、合成した蛍光ソルバトクロミックビーズは、光導波路分光装置と組み合わせることで、ラベルフリーで生物分子認識を追跡することが可能な蛍光バイオアフィニティーセンシングデバイスとして利用できることをアビジン-ビオチン相互作用によって示した。本論文にて報告した合成と測定手法は、汎用性のあるラベルフリーな蛍光バイオアフィニティーセンシングデバイスを創製できる技術として期待される