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［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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士（環境科学）　　氏 名　大 塚 侑

審査委員	主査	准教授	山 田 幸 司
	副査	教 授	沖 野 龍 文
	副査	教 授	小 西 克 明
	副査	教 授	佐 藤 久（大学院工学研究院）

学 位 論 文 題 目

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）

バイオアフィニティーは，生体を構成する分子間で働く親和力の総称で，抗原－抗体反応，酵素－基質反応など生体内の反応において重要な役割を果たす。そのため，バイオアフィニティーを高感度に検出することは，生命科学の理解において必須の技術課題となっている。特に，分析対象物を標識することなく測定できるラベルフリーな分析法は，生体間の相互作用を阻害する要因が少ないため，生命科学分野で強く求められている。現在主流のラベルフリーなバイオアフィニティーセンシングデバイスは，表面プラズモン共鳴（SPR）分光器であるが，装置の構成が複雑で高価であること，原理的に小分子の検出には向かないこと，速度論的な解析が難しいことなどまだまだ解決すべき課題がある。

蛍光プローブは，本来蛍光を持たない生体分子に検出可能な蛍光シグナルを与える分子でラベルフリーとは相反する技術であるが，SPR と同様に検出装置の界面に強度もしくは波長の変化する機能性蛍光色素を修飾することで，分析対象物を標識することなく高感度な蛍光で検出することができるようになる。

本論文では，センシング材料として，ポリスチレンビーズ表面に溶媒の極性によって蛍光発光波長の変化する蛍光ソルバトクロミック色素を固定した蛍光ソルバトクロミックビーズを合成し，励起光ノイズがほとんど生じず基板表面の蛍光色素のフルスペクトルが高感度で測定できる光導波路分光装置を用いて，ラベルフリーでなおかつ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行った。

ビーズの原料としては，他の固相合成で用いられ，合成後に容易に合成した分子をビー

ズから切り離すことができる Wang resin を用いた。この Wang resin に脱水縮合で電子求引性部位である 4-ヨード安息香酸を連結し，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鈴木－宮浦クロスカップリング反応で連結することで，一段階の反応で目的の蛍光ソルバトクロミックビーズを合成した。このビーズから色素部分を切り離し，目的の分子が固相上で合成できていることを NMR スペクトルなどから同定した。この蛍光ソルバトクロミックビーズは，周囲の溶媒極性に対して蛍光発光波長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ことも分かった。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。

さらに本論文では，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し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。ビオチン化蛍光ソルバトクロミックビーズは，Wang resin に電子求引性部位の脱水縮合，芳香環部位の鈴木－宮浦クロスカップリング，芳香環部位のブロモ化，電子供与性部位の鈴木－宮浦クロスカップリング，脱保護，ビオチン部位の脱水縮合と複数回の固相合成を繰り返して合成された。この色素に関しても，ビーズから色素部分を切り離し，目的の分子が固相上で合成できていることを NMR スペクトルなどから同定した。このビーズに，ラベルフリーな中性アビジンを含むホスフェートバッファー（PBS）溶液を添加すると，速やかに蛍光スペクトルがブルーシフトし，蛍光強度が増加することが確認された。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。一方，非特異吸着しかしないウシ血清アルブミン（BSA）を添加したところ，蛍光スペクトルの変化速度は緩やかで，蛍光スペクトルの形状も中性アビジンと異なることが分かった。非特異吸着は弱い相互作用で，バッファー溶液で洗浄すると元の蛍光スペクトルに戻ることも明らかになった。

本論文で確立した蛍光ソルバトクロミックビーズと光導波路分光装置を用いたバイオアフィニティーセンシングデバイスは，熱力学的にも速度論的にも数多くのスペクトル情報を得ることができ，生命現象の解明に寄与できる分析法としてその実用応用が期待される。

審査員一同は，これらの成果を高く評価し，また研究者として誠実かつ熱心であり，大学院博士課程における研鑽や習得単位などもあわせ，申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。