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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14341
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81757
Type	doctoral thesis
File Information	Yu_Otsuka.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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)

大塚　侑
Yu OTSUKA

北海道大学大学院環境科学院
環境物質科学専攻

2021 年

目次

第一章 緒論 1
1.1. オプティカルバイオセンシングデバイス 3
1.2. 生体分子認識 5
1.3. 固相合成法 6
1.4. 固相合成法の長所・短所 7
1.5. 固相合成法に用いられる樹脂・リンカー・開裂条件 8
1.5.1. 固相合成に利用される樹脂 8
1.5.2. 固相とのリンカー・開裂条件 9
1.6. 固相を利用した合成法について 10
1.6.1. ペプチド固相合成 10
1.6.2. オリゴヌクレオチド固相合成 11
1.6.3. 固相有機合成 12
1.7. 鈴木-宮浦クロスカップリングを利用した合成技術 12
1.7.1. 鈴木-宮浦クロスカップリング 12
1.7.2. ホウ素化合物の保護基 13
1.7.3. 鈴木-宮浦クロスカップリングを利用した固相有機合成 13
1.8. 蛍光ソルバトクロミック色素 14
1.9. 本論文の目的 15
References 17
第二章 蛍光ソルバトクロミックビーズの合成と光導波路分光装置を用いた表面の溶媒極性への応答性評価 24
2.1. 背景 25
2.2. 実験 27
2.2.1. 実験試薬・化合物同定に用いた機器 27
2.2.2. 吸収・蛍光スペクトル測定装置・測定条件 27
2.2.3. 蛍光ソルバトクロミックビーズの合成 29
2.2.4. ^{1}H NMR スペクトル 33
2.3. 結果・考察 36
2.3.1. 蛍光ソルバトクロミックビーズの合成 36
2.3.2. 蛍光ソルバトクロミックビーズの ATR-IR スペクトル 37
2.3.3. 光導波路分光装置による光物性測定 37
2.3.4. ビーズ上の基質濃度を変化した際の光物性への影響 40
2.3.5. 蛍光ソルバトクロミズム性能の特性評価 44
2.3.6. 二成分混合溶媒に対するレシオメトリック応答の評価 45
2.4. 総括 48
References 49
第三章 アビジン-ビオチン相互作用を追跡する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モニタリング技術の確立 52
3.1. 背景 53
3.2. 実験 55
3.2.1. 実験試薬・化合物同定に用いた機器 55
3.2.2. 蛍光スペクトル測定装置・測定条件 55
3.2.3. アビジン-ビオチン相互作用の測定 55
3.2.4. ビオチン化蛍光ソルバトクロミックビーズの合成 57
3.2.5. ^{1}H NMR スペクトル 62
3.3. 結果・考察 65

3.3.1. ビオチン化蛍光ソルバトクロミックビーズの合成.....65
3.3.2. PBS 溶液中における色素 10 と中性アビジンの相互作用による蛍光スペクトル変化の測定.....66
3.3.3. 光導波路分光装置を用いた中性アビジンに対するビーズ9の蛍光スペクトル変化.....66
3.3.4. 中性アビジン・ウシ血清アルブミン(BSA)を添加したビーズ 9 蛍光スペクトルの時間変化測定.....68
3.3.5. アビジン-ビオチン複合体の物性評価.....70
3.4. 総括.....73
References.....75
第四章 結論.....77
4.1. 結論.....78
謝辞.....80

第一章 緒論

バイオセンシングデバイスは、食品検査や抗体検査等の幅広い用途で利用される、生体分子認識を利用した分析装置である。一般的にバイオセンシングデバイスの検出部には生体分子認識を検知する為のセンシング材料とセンシング材料から得られるシグナルを電気信号へと変換するトランスデューサーで構成されている。光導波路分光装置は、光学的なシグナルを変換するトランスデューサーを利用し、分析物を検出するオプティカルセンシングデバイスの一つである。光導波路と呼ばれる光を伝送する性質を有する材料を利用し、光導波路に接している蛍光性の物質をエバネッセント波によって励起することで光学的に検出することが可能である [1-3]。エバネッセント波は全反射条件で生じる励起光であることからロスがほぼなく、エバネッセント波の届く光導波路境界面から数百ナノメートルの範囲を局所的に励起することからバックグラウンドの光ノイズが少なく、高感度に生体物質の相互作用や分子認識の追跡を可能にすることから、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、エバネッセント波を用いるバイオセンシングは、前処理として分析対象を蛍光色素等で標識化した上で、エバネッセント波で効率よく励起する為に、光導波路表面へ分析対象を固定しなければ十分なシグナルは得られない。以上の点から、エバネッセント波を用いたバイオセンシングは測定作業が煩雑になりやすい。その為、光導波路に固定する必要がなく、蛍光色素による分析対象の標識化をせずに生体分子認識を識別できる、ラベルフリーなバイオセンシングデバイスが望まれる。そこで本研究では、生体分子認識を蛍光色変化から識別することが可能な波長応答性の蛍光色素を導入した蛍光性センシング材料を合成し、光導波路分光装置と組み合わせた、ラベルフリーなバイオセンシングデバイスの構築を目的とした。生体分子認識を検出するセンシング材料として、生体分子認識を蛍光色変化から識別できる波長応答性蛍光色素が支持体に導入された構造を有する蛍光性センシング材料の合成を試みた。しかしながら目的の機能性を有する蛍光性センシング材料を、液相中にて多段階反応を経て合成することは容易ではないと予想された。そこで、固相合成法と呼ばれる合成手法を基に、蛍光性センシング材料の合成手法について検討した。固相合成法は、ポリスチレン等の高分子材料に基質分子を導入することで、合成反応及び精製を全てビーズ上で行うことができる効率的な合成技術の一つである。これまでに生物活性のあるペプチド、DNA 等生物活性を示すオリゴマーの合成に利用されるだけではなく、薬理活性のあるビアリール誘導体を始めとする低分子化合物のコンビナトリアル合成、π共役系化合物の合成等幅広い分野まで応用されていることに着目した[4-7]。この合成手法を用いることで、生体分子認識部位を導入した蛍光性センシング材料を容易に得られ、エバネッセント波による生体分子認識の識別に利用することが出来ると考えた。蛍光性センシング材料に導入する蛍光色素として、蛍光波長変化によって生体分子の動態をレシオメトリックに識別することが可能な蛍光ソルバトクロミック色素を選択した。蛍光ソルバトクロミック色素は、周囲の環境極性に応答し蛍光色変化による応答を示す機能性有機色素である。我々の研究室では、市販されている有機ホウ素化合物とハロゲン化アリールを鈴木-宮浦クロスカップリングによって直結す

ることで、容易に蛍光ソルバトクロミック色素誘導体を得られることを報告した[8, 9]。先述の固相合成法と、鈴木-宮浦クロスカップリングを利用することで、蛍光ソルバトクロミック色素が導入された蛍光ソルバトクロミックビーズを容易に得られ、生体分子認識の過程を蛍光色変化からレシオメトリックに追跡することが可能になると推察した。

合成したビーズの光物性評価には、先述のエバネッセント波を利用して測定を行う光導波路分光装置を用いた。光導波路分光装置は、光導波路にプローブ光を照射することで生じるエバネッセント波によって、迅速且つ非破壊で蛍光性の固体試料を励起し、吸収・蛍光スペクトルを一度に測定することが可能である[10]。さらに、励起から蛍光発光のサイクルはナノ秒オーダーである事から、経時変化測定にも応用することが可能である。よって、蛍光ソルバトクロミックビーズを用いるバイオアフィニティーセンシングデバイスに適した装置であると考えた。

本研究にて構築したバイオアフィニティーセンシングデバイスの性能を評価するために、高い親和性で知られる、アビジンとビオチンをモデル分子として選択した。アビジン-ビオチン相互作用や抗原-抗体反応のように親和性を示す生体物質は、標的となる生体物質の定量・単離や生体機能の解明、免疫検査等の生体環境を分析する手法に広く用いられ、多様な感染症が蔓延する近年急速な発展を続けている[11-13]。デモンストレーションとしてアビジン-ビオチン相互作用を本論文にて構築したセンシングデバイスによって、生体分子認識のセンシングデバイスとして有用性を示すことが出来ると考えた。

本論文では、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た、蛍光ソルバトクロミックビーズを合成する手法の確立、そして得られた蛍光ソルバトクロミックビーズが、蛍光色素による標識化を用いずに生体分子認識の追跡を可能にする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の構築について検討を行った。

1.1. オプティカルバイオセンシングデバイス

バイオセンシングデバイスは、分子認識を利用することで分析対象である生体関連物質を検出するセンシングデバイスである。一般的に、オプティカルバイオセンシングデバイスは光学的なシグナルを発するセンシング材料とそのシグナルを電気信号へと変換するトランスデューサーによって分析対象を検出することが知られている。代表的なオプティカルバイオセンシングデバイスとして、surface plasmon resonance (SPR)法に基づいたバイオセンシングデバイスが広く知られている。SPR 法は、金薄膜をセンシング材料として、その表面で生じるプラズモンの共鳴現象を利用し、センサー表面の微量な質量変化を検出することが可能な分析手法である[14]。分析対象と親和性を示す生体物質を金薄膜に修飾し、対象化合物との相互作用に伴う質量変化をセンサーグラムによって解析することが出来る。しかしながら、波長応答性による蛍光スペクトルシフトや時間変化測定等の多くの情報が得られる蛍光分光法を利用するセンシングデバイスと比較して、SPR 法は専ら質量的な情報から生体分子認識を検出する。そのため、SPR 法は生体分子認識の識別が困難であることが挙げられる。一方で、光

導波路分光装置はエバネッセント波を利用することで、蛍光性分子等を容易に励起し、その光学特性を測定することができる為、蛍光色素を用いるバイオセンシングデバイスとして利用される分析機器である。光導波路内に全反射条件下でプローブ光が伝播している際に、光導波路とサンプルとの境界面で発生するエバネッセント波によって、光導波路に接しているサンプルの吸収及び蛍光スペクトル等を即時測定することが可能な、蛍光性固体試料の光物性測定に有効なツールである[15]。エバネッセント波は、光導波路内に入射したプローブ光がスネルの法則を満たす際に発生する近接場光である。Figure1.2 にて光導波路、光導波路上のサンプルの屈折率をそれぞれ η_1、η_2 とすると、以下の式が成り立つ、

$$\mathrm{Sin}\ \theta_{critical} = \frac{\eta_2}{\eta_1} \quad (1)$$

この式の $\Theta_{critical}$ は臨界角(法線角)、η_1 は光導波路屈折率、η_2 はサンプルの屈折率である。この時求めた臨界角(Figure 1.2、赤丸)よりも大きな角度で光を入射することで全反射条件となり、エバネッセント波が光導波路に接している分析対象に滲み出し励起させることで測定が可能となる。また、入射角度を臨界角付近に設定することで、光導波路内の反復回数が増加し、測定感度が向上する。光導波路内は外部光の影響を受けない上に光導波路境界面から数百ナノメートルの範囲のみ励起する為、光導波路の表面に接している測定対象の光物性を高感度で測定することが可能である。これまでに光導波路分光装置を用いて色素化合物の固体状態での光物性、アクリジンオレンジを内包したラングミュアーブロジェット膜(LB 膜)の光物性評価、抗原抗体反応など光学材料の測定から光導波路表面で発生する生体物質の相互作用を光学的に検出した報告例が多数存在する[16-18]。これらの報告から、合成した蛍光ソルバトクロミックビーズの光物性評価、そして蛍光ソルバトクロミックビーズと組み合わせることで生体分子認識を識別することが可能なバイオアフィニティーセンシングデバイスとして適していると考えた。



Figure 1.1. The image of optical waveguide spectrometer.

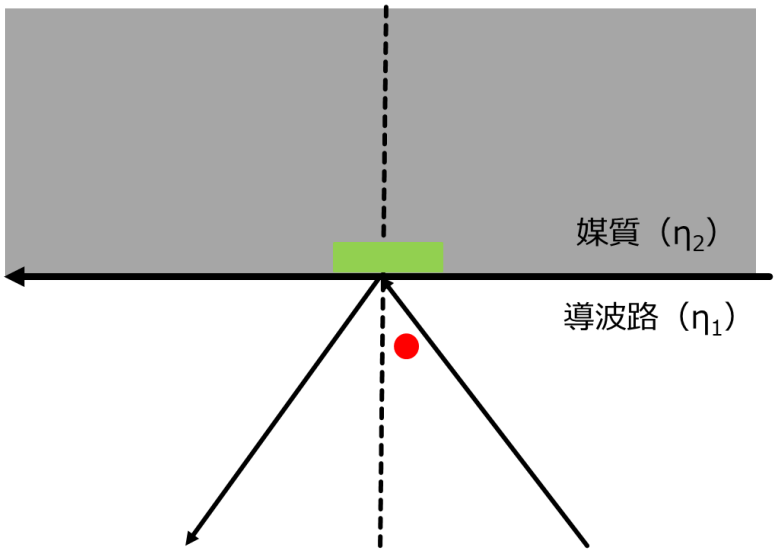


Figure 1.2. Schematic image of Snell’s law in optical waveguide.

1.2. 生体分子認識

生体分子認識は、生体内で発生する反応や免疫に関する反応等に重要な役割を持つ相互作用である。例えば免疫の有無を確認する抗体検査には抗原と抗体の相互作用が利用されている。このような親和性による相互作用は、生体分子間に共有結合を形成する反応ではないが、まるで鍵と鍵穴の様に特異的で強固に結合する組み合わせが存在することが知られている。他にもタンパク質-核酸、タンパク質-炭水化物、タンパク質-脂質、そしてタンパク質-溶媒の組み合わせが広く研究されている。近年の研究によってこの親和性は、イオン相互作用、疎水性相互作用、水素結合相互作用そして相互の形状に相補性が見られるかに起因することが明らかになっているが、分子認識のプロセスが完全に解明されているわけではない[19]。

本論文では、生体分子認識を追跡するバイオアフィニティーセンシングデバイスのデモンストレーションとして、アビジン-ビオチン相互作用の追跡を試みた。生体内中に含まれるビオチン(ビタミン B_7)は鶏卵の卵白中等に存在するアビジンと特異的な相互作用を示すことが知られている[20]。この相互作用は高い親和性を示し、非共有結合でありながら不可逆な結合を形成する。このアビジン-ビオチン相互作用は生体内でも起こり得る反応の為低毒性であり、常温でも速やかに反応が進行することから、抗原-抗体反応における抗体の標識化、ビオチンで標識化したタンパク質の精製(アフィニティクロマトグラフィー)、及び相互作用を利用した金薄膜表面への有機化合物の固定等、生体内物質による簡便な結合形成反応として多様な分野で利用され、特異的な分子認識のモデル化合物としても利用されてきた[21,22]。代表的なアビジンには鶏卵から得られるアビジンと、糖鎖の処理を行った中性アビジン、そしてグラム陽性細菌由来であり、中性アビジンよりも分子量が小さく取り扱いが容易なストレプトアビジンが挙げられる。アビジンは糖鎖が修飾されている為に、非特異的な吸着が起こり得る。対して、糖鎖が処理された中性アビジンとストレプトアビジンはアビジン

と比較して非特異吸着の可能性が低いことから、SPR 法を用いるバイオセンシングの分野では非特異吸着によるノイズの発生を低減するためにこれらのアビジン誘導体がよく用いられる[23]。

アビジンとビオチンの相互作用を追跡する際に、ビオチン化した蛍光色素やアビジンを蛍光色素によって標識化する手法が選ばれる。しかしながら、これらの測定プロセスは測定に利用する蛍光色素の機能性、標識化するためにどのような標識化部位を利用してアビジンに結合させるのか、前処理として標識化できなかった蛍光色素を精製で除く必要性など、測定には様々な検討事項が挙げられる。本研究では上記のようなプロセスを低減するために、蛍光ソルバトクロミックビーズをセンシング材料としたラベルフリーな蛍光センシングシステムの構築を目的とした。しかしながら、液相合成法による蛍光性センシング材料の合成は、多段階な合成、支持体の選択、反応点を支持体表面に露出させる工夫等が求められるため目的のセンシング材料を得ることは困難であることが予想された。そこで効率的にセンシング材料を合成できる手法として固相合成に基づいた蛍光性センシング材料の開発を試みた。

1.3. 固相合成法

固相合成法は 1959 年に R.B.Merrifield によってペプチド合成の効果的な手法として報告された[24]。Merrifield は血圧抑制に関わるオクタペプチドホルモンのイムノアッセイ法を開発するため、部分抗体又は抗体の合成を試みた[25]。しかし、液相合成法によるペプチドの合成は原料や反応物の物性が類似している為、クロマトグラフィーによる精製が非常に困難であり、多段階反応で得られる化合物は中間体の精製及び化合物の同定を必要とすることから液相合成による合成では十分な純度の目的物を一定量得ることは難しい。考案された固相合成法は用いる固相に基質分子が固定されているため溶媒に不溶であり、反応ごとにろ過および固相の洗浄によって樹脂上にある目的物を容易に精製することが可能である(Figure 1.3)。さらに反応物を過剰に用いることで反応効率を向上させることも可能となる。Merrifield は原料となるペプチドモノマーをジビニルベンゼンで架橋したポリスチレン樹脂に固定し、ジシクロヘキシルカルボジイミドを縮合剤として各アミノ酸の間にペプチド結合を形成することで、テトラペプチド鎖の合成に成功した(Scheme 1.4)。当時固相合成法は、一般的な合成法としては認知されなかったが、後に固相合成法に液相合成の技術を応用し、固相・リンカー・保護基・固相からの切り出し条件等固相合成法に適した合成手法が多数報告され、合成する目的物によって多様な合成戦略を適用できることから、ペプチド合成の分野において広く用いられる合成法となった[26-28]。昨今における固相合成法の技術は、ラボスケールからトン単位の工業スケールまで多様な規模で合成反応がかけられる柔軟性、そして機械制御による自動合成プロセスの開発等未だに発展を続けている有機合成分野の一つとなっている。

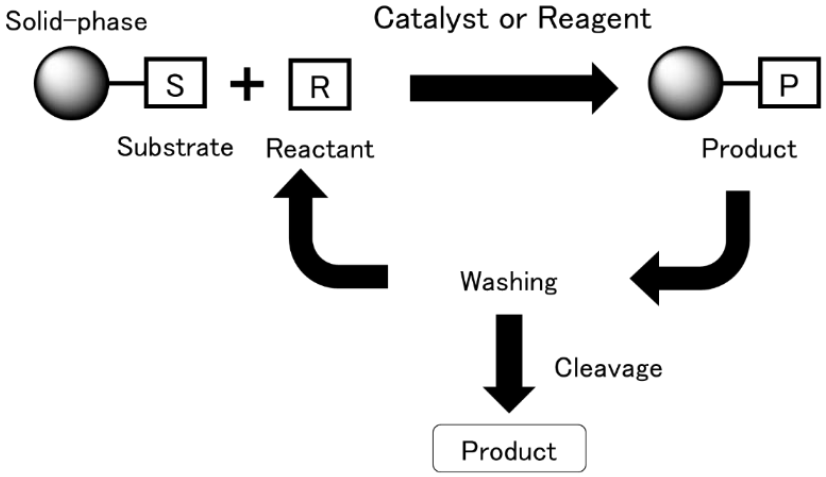
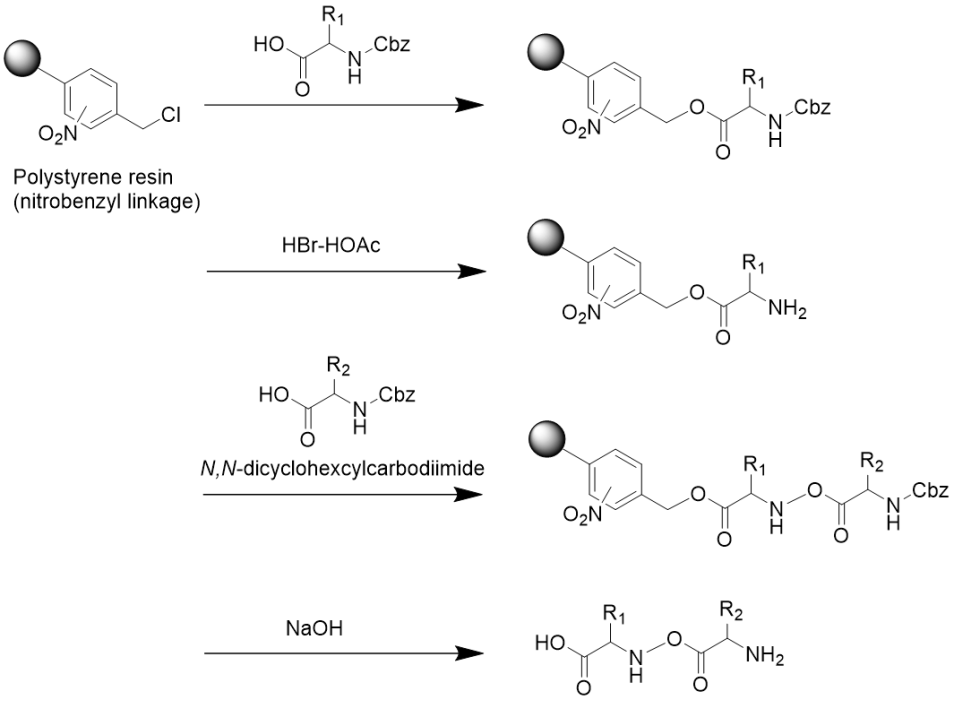


Figure 1.3. The process of solid-phase synthesis.



Scheme 1.4. General scheme of solid-phase peptide synthesis [24].

1.4. 固相合成法の長所・短所

固相合成法に用いる固相の多くは、有機溶媒に対して不溶であり基質を共有結合によって化学的に固定することが可能な高分子樹脂である。その為、反応プロセスにおいて固相との結合が開裂するような極端な条件でない限りは、原料が失われず樹脂上で有機合成反応及び精製作業が可能である。また、合成された化合物は最終段階である固相から切り出すまで分離精製を行う必要がない為、精製作業による化合物の損失を低減することが可能である[29]。また、保護基を用いて基質及び反応物の反応点を制御することで望む構造の化合物を合成することが可能である[30]。これらの利点によって、オリゴペプチドやオリゴヌクレオチドなどのオリゴマー合成は液相合成法と比較して格段に容易となる。しか

しながら、固相合成においては反応後得られた化合物が目的の化合物であるか、多段階の反応であれば各合成段階の反応についても慎重に評価する必要がある。一般的に固相合成法では、中間体及び目的物の構造証明等は一度開裂反応によって固相から化合物を切り出し、精製した後化合物の同定を行う。その為、全体的な合成プロセスは液相合成法よりも煩雑になりやすい。この点が、固相合成法の最大の利点である合成プロセスの利便性を欠く原因となっている。固相有機合成の分野では、ビアリール等の π 共役系を有する構造が多く報告されている[31-33]。π共役系化合物は、光の吸収または蛍光発光などの光学特性を有していることから、固相上においても同様な光学特性を示すと考えた。本論文ではこの推察に基づき、固相表面で波長応答性の蛍光色素である蛍光ソルバトクロミック色素を合成した。そして、蛍光性センシング材料として用いることで、その表面で発生した環境変化あるいは生体分子相互作用を蛍光色変化からレシオメトリックに測定できると考えた。

1.5. 固相合成法に用いられる樹脂・リンカー・開裂条件

1.5.1. 固相合成に利用される樹脂

固相合成に用いることが可能な材料として、酸・塩基を含む薬品や高温に対して安定性がある材料が望ましい。加えて重要な要素として固相に用いる材料が、反応溶媒や反応に用いる化合物を良く浸透させるか検討する必要がある。なぜなら、十分に浸透せず膨潤しない材料を固相として用いると、反応点が露出しない為に反応効率の低下が懸念されるからである[34]。よって、これらの条件を満たす固相合成に適した材料として、薬品に対して高い安定性と膨潤率を示す高分子樹脂が第一選択として挙げられる。ポリスチレン樹脂は、スチレンをモノマーとして重合反応によって合成され、多くの有機溶媒に対する高い膨潤性を示し、分析化学の分野においてはイオン交換性樹脂としても用いられることから種々の薬品や高温環境に対しても比較的安定な材料であると言える(Figure 1.5)。固相合成法が開発された当初は、スチレンとジビニルベンゼンによる共重合体樹脂をクロロメチル化した Merrifield resin がペプチド合成に広く利用されてきた[35,36]。Merrifield resin はペプチド合成の反応条件下では変性する可能性も低く、アミノ酸基質をエステル結合によって固定することが可能であることから、固相合成法に適した材料である。他にも Merrifield resin のようにスチレンを材料とした樹脂は市販されており、*p*-Alkoxybenzyl alcohol が修飾された Wang resin, 低クロスリンクポリスチレンとポリエチレングリコールを含む側鎖による高い膨潤度が特徴の Tentagel、Novagel 等が例として挙げられる[37-39]。これらの樹脂は同じポリスチレン樹脂であってもゲル状で非常に高い膨潤性を有している。PEGA はポリエチレンとアクリルアミド-ポリエチレングリコールのコポリマーで構成されており、両親媒性であることから固相有機合成、ペプチド合成に用いる有機溶媒から水のような高極性溶媒まで幅広く対応している[40,41]。Chemmatrix resin も同様に固相有機合成、ペプチド合成に利用される樹脂であるが、特徴としてポリエチレングリコールを基に開発された樹脂である[42-45]。この特殊な樹脂の組成によって、良好な膨潤性とポリマ

ーの機械的安定性を有しており、マイクロウェーブを用いる合成にも利用できる利点がある[46,47]。

上記で述べた樹脂が一般的に固相合成法において利用されているが、樹脂の性質、コスト、目的化合物に応じて適切な樹脂を選択する必要がある。本研究では、主に有機溶媒を用いる合成ルートであり、加熱環境下で反応を進行させる為、これまでの過去の報告より固相有機合成に多く用いられている実績を鑑みて、ポリスチレン樹脂を選択した。

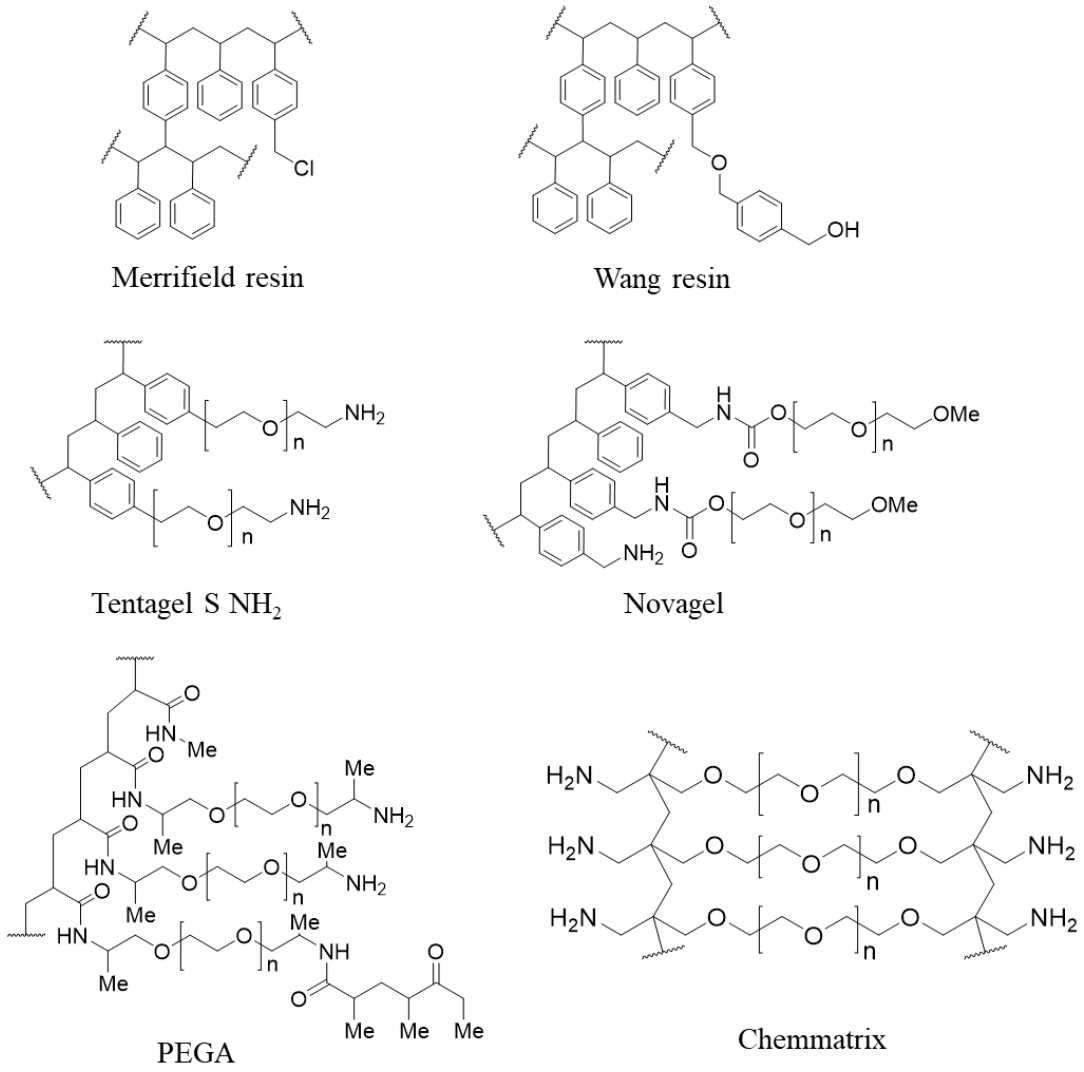


Figure 1.5. Structures of common resins for solid-phase synthesis.

1.5.2. 固相とのリンカー・開裂条件

固相合成法において、樹脂の選択と基質分子を固定する際のリンカーの選択は、目的物を効率良く得るための重要な要因である。合成反応条件によっては、樹脂は変性しないが、基質分子と固相の結合を切断してしまう事や、目的物の変性或いは副反応を引き起こす可能性もある。先述の Merrifield resin はリンカーとなるクロロメチル基に対して固定可能な官能基は幅広く、カルボン酸、アミン類、アミド等を固定することが可能である。しかしながら結合が非常に強固で

あり、開裂にはフッ化水素等の強酸を必要とすることから、合成された目的物が変性してしまうなどの懸念がある。この影響を低減するために、弱酸性条件でも開裂することが可能なリンカーが数多く開発されている。

Merrifield resin、は固定しているペプチドと強固なエステル結合を形成することから、固相から綺麗に切り出すには、フッ化水素などの強力な酸が必要となる[48]。後に開発された Wang resin、Methoxy-4-alkoxybenzyl alcohol が修飾された Sasrin(Super acid sensitive resin)等は開裂反応に微量のトリフルオロ酢酸(TFA)を用いることで容易に切り出せることからペプチドの合成のみならず、固相有機合成の分野においても利用される樹脂の一つである[37,49,50]。一方で、酸を使用せずに、求核性の試薬で切り出すことが可能なリンカーも開発されている。4-(hydroxymethyl)benzoic acid(HMBA)リンカーは水酸化ナトリウム等の塩基性試薬存在下で求核剤の種類によって切り出された末端の官能基が異なる特徴がある[51]。また、phenylacetamidomethyl(PAM)はテトラブチルアンモニウムフロリド(TBAF)の環境下でカルボン酸末端を有する化合物を切りだすことが可能である[52]。特に先述の Wang resin はカルボン酸を有する化合物を縮合反応によって固定することが可能で、トリフルオロ酢酸の条件ではカルボン酸のまま、金属アルコキシドとアルコールで還流することでエステルの状態でそれぞれ樹脂から切り出すことが可能である[53]。さらに様々な有機溶媒に対する膨潤率が平均的に高く、様々な溶媒を利用する合成経路にも対応可能で、他の固相合成に用いる樹脂と比べて比較的安価であることから Wang resin を用いた合成研究報告は数多く存在する[54,55]。

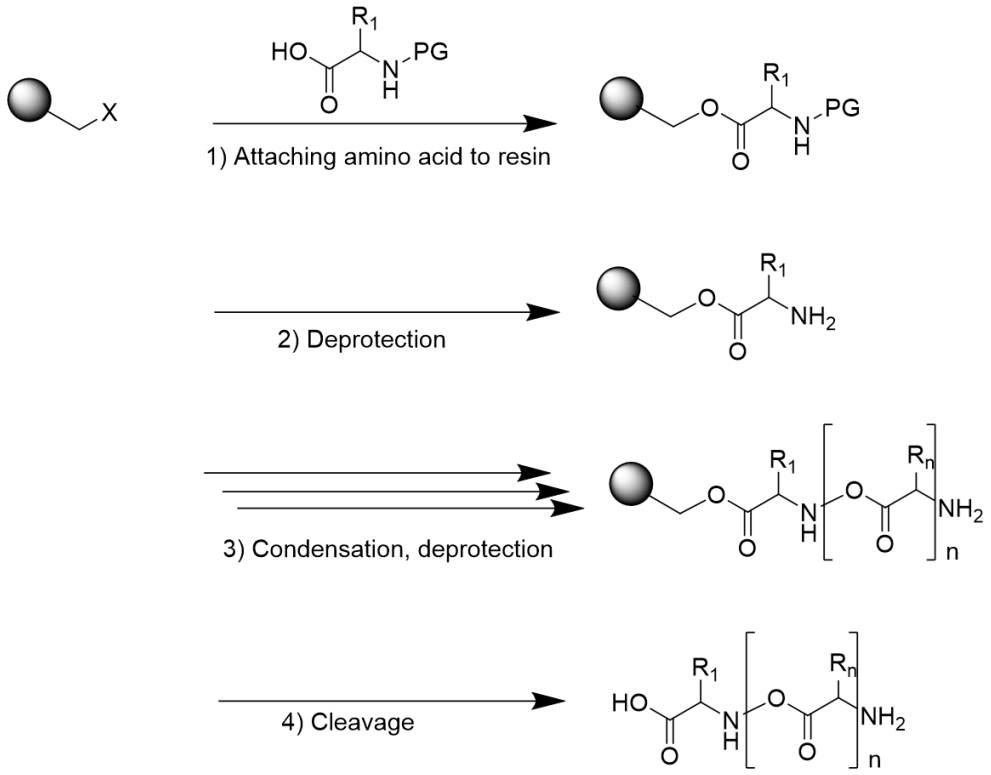
本研究においては、色素合成に様々な溶媒を用いる事に加え、実際に目的化合物が合成されたか切り離して同定する必要があること、種々の有機溶媒を用いて蛍光ソルバトクロミックビーズの光物性を観測する際に、膨潤率の差が光物性評価に影響を与える可能性も考慮し、Wang resin が本研究にて用いる固相として適当であると考えた。

1.6. 固相を利用した合成法について

1.6.1. ペプチド固相合成

ペプチドはアミノ酸を構成単位とする鎖状分子である。合成されたペプチドはアミノ酸配列によって特定の生体内分子との親和性を変化させることができるため、ターゲットとなる生体内物質を狙って作用させることができる[56]。加えて、ペプチドは生物を構成する要素として存在することから生体適合性が高く、毒性は低い。そのため、創薬分野などにおいては有機合成で得られるペプチド化合物がよく利用されている[57]。固相合成法の発展によって多くの企業からペプチド合成に用いる固相・保護基・保護基を導入したアミノ酸などが販売されており、多様な目的に沿った化合物を合成することも容易となった。これまでに、機能性タンパク質、非天然アミノ酸を導入した生物活性のあるペプチド鎖や抗体・部分抗体、環状ペプチド、複合体化合物(ペプチド-オリゴヌクレオチド、グリコペプチド)等数多くの機能性ペプチド化合物が固相合成法によって合成されている[58]。固相合成法によるペプチド合成手法は、原料のアミノ酸を固相に固定、脱保護、縮合、固相の洗浄のプロセスを繰り返すことで、目的の配列を

持ったペプチド化合物を段階的に合成することが可能である。ペプチドは任意のアミノ酸に存在するカルボニル基と第一級アミンの縮合によって得ることができる。反応点であるカルボニル基に *N*-hydroxysuccinimide を修飾する活性エステル法、又はカルボジイミドを有する縮合剤(*N*-dicyclohexylcarbodiimide:DCC, Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride:EDCI HCl) を用いることで、反応物のカルボン酸を活性化し第一級アミンとのカップリング反応を促進させることができる(Scheme 1.6)[59]。この活性エステルを用いる反応は高効率・高収率な反応であることから固相ペプチド合成ではよく利用される反応である。また、反応物であるアミノ酸は副反応の発生を防ぎ縮合反応の選択性を上げる為に、反応点以外の第一級アミンを保護する必要がある。代表的な保護基として酸処理によって脱保護が可能な tert-butoxycarbonyl (Boc)基と塩基を用いることで脱保護が可能な 9-fluorenylmet-hyloxycarbonyl (Fmoc)基が挙げられる[60,61]。



Scheme 1.6. Reaction process of solid-phase peptide synthesis.

1.6.2. オリゴヌクレオチド固相合成

ペプチドがアミノ酸を構成要素としているのに対し、オリゴヌクレオチドはヌクレオチドがモノマーとなり、糖に結合しているリン酸を介して鎖状分子を形成する生体高分子である。オリゴヌクレオチドは世界中の研究機関で多様な種類の誘導体が合成されており、一般的な応用例として、遺伝子工学分野におけるデオキシリボ核酸(DNA)を中心とする生体高分子として生物化学あるいは生物学の実験に利用されてきた[62]。オリゴヌクレオチドの合成には、ホスホロアミダイト法が良く利用される。5’末端の水酸基が 4,4’-Dimethoxytrityl(DMT)

基によって保護されたヌクレオチドモノマーの 3’末端を固相に固定し、5’末端を反応点として次のモノマーをカップリングにより伸長させる手法である[63]。この反応は、条件が良ければ 200 塩基もの塩基配列を合成することも可能である[64]。しかしこの合成手法で留意すべきは、カップリング反応が定量的ではなかった場合、未反応点が露出したまま次の反応段階へ進んでしまい、塩基配列の異なる化合物が発生してしまうことである。加えて、オリゴヌクレオチドは副生成物も構造や物性が類似していることから、目的物と副生成物を含むサンプルをクロマトグラフィー等で精製することは非常に困難であり、条件によっては目的物を多分に損失する可能性がある。そのため、反応毎に未反応部位をアセチル基等でキャッピングし不活性にすることで副生物の伸長を回避することができる。

1.6.3. 固相有機合成

固相合成法の技術は、液相合成では合成が困難な化合物を容易に高純度で合成可能であることや過剰な反応物を用いることで効率的に合成を進めることができる点等が注目され、先述にあるような生体物質の合成のみならず低分子化合物合成への応用も検討されてきた[65]。1990 年代から製薬分野において、機能性化合物を得るために固相合成法を応用したライブラリ合成の技術が注目された[66,67]。また固相有機合成分野の発展に伴い従来のオリゴマー合成に用いる縮合反応だけではなく固相合成に適応できる合成反応が数多く検討された[68,69]。これまでに述べたペプチドやオリゴヌクレオチドは一般的に非共役系化合物が母核の化合物であることに対し、固相有機合成の分野で合成される化合物はビアリールを始めとするπ共役系を有する化合物が多数挙げられる[70,71]。これらのπ共役化合物を得るためには芳香族化合物同士の結合を効率的に形成する必要がある。金属触媒を用いるカップリング反応は、異なる芳香族化合物の間に C-C 結合を形成することができる効率的な反応である上に、固相が変質してしまうような高温や厳しい反応条件を必要としない反応条件が開発されていることから、固相合成法に金属触媒を利用した合成例は現在でも数多く報告されている[72]。特にパラジウム触媒を用いる鈴木-宮浦クロスカップリング反応は、有機ホウ素化合物を反応に用いることから金属触媒反応の中でも比較的低毒性であり、塩基性条件という温和な条件で効率よく C-C 結合を形成し容易にπ共役化合物を得ることができる画期的な触媒反応である[73]。パラジウム触媒を用いたカップリング反応は医薬化合物の合成に用いられるほか太陽電池や有機 EL に用いられるような光学特性を有する化合物の固相合成にも用いられている[74,75]。

1.7. 鈴木-宮浦クロスカップリングを利用した合成技術

1.7.1. 鈴木-宮浦クロスカップリング

有機合成の分野において、遷移金属触媒を用いることでこれまで合成不可能であった化合物又は誘導体が得られるようになった例は数多く存在する。1980 年代から、触媒・配位子の開発又は組み合わせの検討が盛んに研究されるようになった。特に C-C 結合形成反応は、1985 年に辻らが発見したパラジウム触媒を

用いた最初のカップリング反応を皮切りに、溝呂木-Heck 反応、薗頭カップリング、根岸カップリングと次々に報告された[76,77]。そして鈴木-宮浦クロスカップリングが世界的に評価されてからは、カップリング反応に利用される多くの触媒、配位子、ビルディングブロックとなる誘導体、有機ホウ素化合物等が合成されている。この鈴木-宮浦クロスカップリングの最大の特徴は、これまでのカップリング反応と比べて塩基性条件下という比較的温和な条件で毒性、爆発性のある試薬を必要としないこと、反応系中には主に合成される目的物と副生物が脱離したホウ酸しか存在しない為、精製が容易であることが挙げられる。この特徴により、クロスカップリング反応を取り入れることで合成が困難な人工天然物や医薬品、光学材料の合成がより容易なものとなった。

1.7.2. ホウ素化合物の保護基

前項で述べた通り、鈴木-宮浦クロスカップリングによって、効率よく目的物を得るために、パラジウム触媒や配位子の研究が数多く報告されてきた[78]。一方で、反応物となる有機ホウ素化合物は、塩基性条件や水の存在下で加水分解によるホウ酸の脱離が発生することもある。そこでボロン酸の保護基を導入することで、加水分解を防ぎ、副反応等を制御することで収量を向上させることが可能である。ジオールを用いたボロン酸エステルは最も汎用性があり、ボロン酸よりも疎水性となる為安定性のある保護基である。さらに二量体のボロン酸エステルを用いることで、ハロゲン化アリールから有機ホウ素誘導体を得ることが可能である(宮浦-石山ホウ素化反応)[79]。ジオール保護基はボロン酸が任意のジオールによってエステル化されていることから、ボロン酸よりも加水分解の影響を受けにくくなる。Pinacol、2,2-dimethyl-1,3-propanediol がジオール保護基として良く利用されている。また、酸性条件下で脱保護される diaminonaphthalene、塩基性条件下で脱保護可能な *N*-methyliminodiacetic acid 等も、カップリング条件によっては保護したボロン酸は不活性を維持したまま、ボロン酸が脱離せず目的化合物を効果的に得ることが可能な保護基である[80,81]。特に、*N*-methyliminodiacetic acid は多段階反応で異なる芳香族化合物の合成、自動合成装置、ボロン酸を有する中間体を得るために非常に有用な保護基である[82-84]。

1.7.3. 鈴木-宮浦クロスカップリングを利用した固相有機合成

固相有機合成の分野では、1994 年に R. Frenette らによって樹脂上で鈴木-宮浦クロスカップリングを利用してビアリール誘導体が合成されることが報告されてから、様々な芳香族化合物の合成が報告されてきた[85]。樹脂上にハロゲン化アリール又は有機ホウ素化合物を固定しカップリング反応によって化合物を得ることが出来ることからシンプルな合成戦略を立てやすくなった[86]。これまでにライブラリ合成への応用だけに留まらず、ペプチドと芳香族官能基の複合体も合成されている。さらにマイクロウェーブを利用することでカップリング反応サイクルが効率よく短時間で目的物を得られる試みもなされてきた[87,88]。また、ハロゲン化アリールを固定した後にホウ素化反応を経てホウ素化合物に変換し、ハロゲン化アリールとカップリングすることで芳香族誘導体

を概ね高収率で得られることを報告した例もある[89]。このように液相合成で広く使われる技術を固相合成に応用することで、液相合成では容易に得られない化合物が得られることも、汎用性の高さが評価される鈴木-宮浦クロスカップリングの利点である。このカップリング反応を利用し、樹脂上で容易に本研究のセンシングに利用できる蛍光ソルバトクロミック色素誘導体を得られると考えた。

1.8. 蛍光ソルバトクロミック色素

蛍光ソルバトクロミック色素は、芳香環部位(aromatic moiety)に電子供与性部位(electron-donating moiety)及び電子求引性部位(electron-withdrawing moiety)が直結した構造を有しており、これらの官能基によって色素分子内に双極子モーメントが生じる。特定の波長の光を吸収し色素分子が励起されると、色素分子の双極子モーメントが大きくなる。この時励起された色素分子は励起時の双極子モーメントと周囲に配向する溶媒分子との相互作用(solvent relaxation)によって励起エネルギーが緩和され、基底状態へと遷移する際に蛍光を放出する[90]。例えば極性溶媒中にて色素分子が放出する蛍光は、溶媒和によって色素分子の有するエネルギーが励起時よりも低くなることから、蛍光スペクトルは低極性溶媒中より長波長域にシフトすることになる(Figure 1.7)。

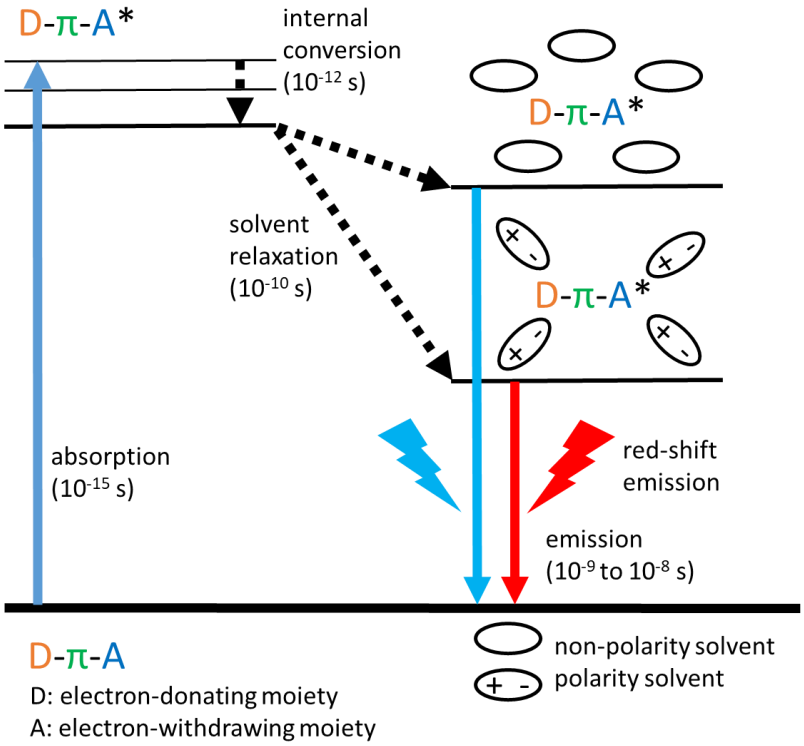


Figure 1.7. The process of solvatochromic effects on fluorescence.

この蛍光ソルバトクロミック色素の特性は、溶媒分子に限らず、DNA へのインターカレーション、タンパク質の構造変化、リン脂質膜のダイナミクス解明など極性変化を伴う生体分子の反応・環境の変化をカラーメトリックで高感度分析す

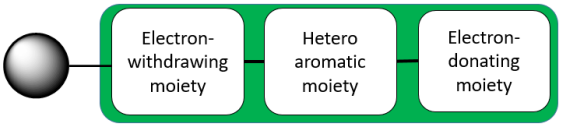
ることができる強力なツールである[91-93]。従来の市販されている蛍光ソルバトクロミック色素である 1-Anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS)、Prodan 等はナフタレンを芳香族部位として電子求引性部位と電子供与性部位が修飾された構造を有している[94,95]。これらの色素は紫外領域光に吸収を示すことから、生体物質の分析に用いる際には、励起光による生体物質へのダメージ、自家蛍光によるノイズの発生が懸念される。我々の研究室では、芳香族ヘテロ環であるチオフェンを芳香環部位として電子求引性部位および電子供与性部位となる芳香族誘導体を鈴木-宮浦クロスカップリングで直結することで蛍光ソルバトクロミック色素を容易に得られることを報告している[9]。既報の蛍光ソルバトクロミック色素は、可視光領域に吸収を示しており、高い光量子収率(Φ_f ~ 0.5)とモル吸光係数(ε ~ 30,000 $cm^{-1}M^{-1}$)が特徴である。その上、チオフェンに修飾する官能基を鈴木-宮浦クロスカップリングで組み替えることが可能で、色素の吸収・蛍光波長の調節や両親媒性などの特性を付与することができる[9,96]。これらの蛍光ソルバトクロミック色素は固相合成法と鈴木-宮浦クロスカップリングの技術を用いて合成することが可能で、樹脂上においても機能性を失うことなく特徴的な光物性から合成された色素の同定及び極性変化を伴う生体物質相互作用に応答するバイオセンシングデバイスとして利用可能であると推察した。

1.9. 本論文の目的

本論文では、バイオセンシングに係る前処理を必要としない、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の構築を目的とした。バイオアフィニティーセンシングデバイスを構築するために、波長応答性の蛍光色素である蛍光ソルバトクロミック色素が導入された蛍光ソルバトクロミックビーズを合成し、蛍光センシング材料として利用した。また、蛍光センシング材料表面の光学特性を検出するために、エバネッセント波による励起及び光学的シグナルの検出が可能な、光導波路分光装置と組み合わせたセンシングデバイスを構築した。そしてこのセンシングデバイスを用いた、ラベルフリーで分析対象を検出する手法の確立、及び分析対象による生体分子認識を蛍光色変化から光学的に分析する手法について検討を行った。次章では固相合成法と鈴木-宮浦クロスカップリングを利用した蛍光ソルバトクロミックビーズの合成及び表面の溶媒極性への応答性を光導波路分光装置によって評価した結果を示す。また、第三章では第二章で示した蛍光センシング材料の合成と光導波路分光装置による測定手法に基づき、ビーズ表面にて発生した生体分子認識を蛍光スペクトルの変化からレシオメトリックに追跡し分析する手法の確立を試みた。生体分子認識の測定対象には、特異的な相互作用を示すことで知られるアビジン-ビオチン相互作用をモデル化合物とした。これらの結果によって、本論文にて示す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の有用性を評価した(Figure 1.8)。

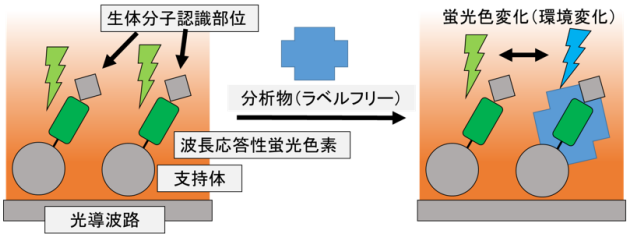
本論文の目的

1, 蛍光ソルバトクロミックビーズの合成及び極性溶媒への応答性評価



鈴木-宮浦クロスカップリングで蛍光色素部位を合成

2, エバネッセント波を利用したバイオアフィニティーセンシングデバイスの構築



生体分子認識を蛍光色変化から識別

Figure 1.8. The aim of this thesis.

References

1. Khansili, N.; Rattu, G.; Krishna, P.M. Label-free optical biosensors for food and biological sensor applications. *Sensors Actuators, B Chem.* **2018**, 265, 35-49, doi:10.1016/j.snb.2018.03.004.
2. Tutkus, M.; Marciulionis, T.; Sasnauskas, G.; Rutkauskas, D. DNA-Endonuclease Complex Dynamics by Simultaneous FRET and Fluorophore Intensity in Evanescent Field. *Biophys. J.* **2017**, 112, 850-858, doi:10.1016/j.bpj.2017.01.017.
3. Taitt, C.R.; Anderson, G.P.; Ligler, F.S. Evanescent wave fluorescence biosensors: Advances of the last decade. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 76, 103-112, doi:10.1016/j.bios.2015.07.040.
4. Lönnberg, H. Solid-phase synthesis of oligonucleotide conjugates useful for delivery and targeting of potential nucleic acid therapeutics. *Bioconjug. Chem.* **2009**, 20, 1065-1094, doi:10.1021/bc800406a.
5. Matteucci, M.D.; Caruthers, M.H. Synthesis of Deoxyoligonucleotides on a Polymer Support. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 3185-3191, doi:10.1021/ja00401a041.
6. Venna, S.; Eckstein, F. Modified oligonucleotides: Synthesis and strategy for users. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 99-134, doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.99.
7. Kirschbaum, T.; Briehn, C.A.; Bäuerle, P. Efficient solid-phase synthesis of regioregular head-to-tail-coupled oligo(3-alkylthiophene)s up to a dodecamer. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 1211-1216, doi:10.1039/b000123f.
8. Klymchenko, A.S. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Acc. Chem. Res.* **2017**, 50, 366-375, doi:10.1021/acs.accounts.6b00517.
9. Son, S.H.; Abe, Y.; Yuasa, M.; Yamagishi, Y.; Sakai, N.; Ayabe, T.; Yamada, K. A systematic analysis of aromatic heterocyclic rings in solvatochromic fluorophores. *Chem. Lett.* **2011**, 40, 378-380, doi:10.1246/cl.2011.378.
10. Haruta, O.; Matsuo, Y.; Ijiro, K. Photo-induced fluorescence emission enhancement of azobenzene thin films. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, 313-314, 595-599, doi:10.1016/j.colsurfa.2007.05.050.
11. Farka, Z.; Mickert, M.J.; Pastucha, M.; Mikušová, Z.; Skládal, P.; Gorris, H.H. Advances in Optical Single-Molecule Detection: En Route to Supersensitive Bioaffinity Assays. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2020**, 59, 10746-10773, doi:10.1002/anie.201913924.
12. Ribeiro, B.V.; Cordeiro, T.A.R.; Oliveira e Freitas, G.R.; Ferreira, L.F.; Franco, D.L. Biosensors for the detection of respiratory viruses: A review. *Talanta Open* **2020**, *2*, 100007, doi:10.1016/j.talo.2020.100007.
13. Du, X.; Li, Y.; Xia, Y.L.; Ai, S.M.; Liang, J.; Sang, P.; Ji, X.L.; Liu, S.Q. Insights into protein-ligand interactions: Mechanisms, models, and methods. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 1-34, doi:10.3390/ijms17020144.
14. Souto, D.E.P.; Volpe, J.; Gonçalves, C. de C.; Ramos, C.H.I.; Kubota, L.T. A brief review on the strategy of developing SPR-based biosensors for application to the diagnosis of neglected tropical diseases. *Talanta* **2019**, 205, 120122, doi:10.1016/j.talanta.2019.120122.

15. Ohno, H.; Yoneyama, S.; Nakamura, F.; Fukuda, K.; Hara, M.; Shimomura, M. Optical waveguide spectrometry of acridine orange in monolayer and Langmuir-Blodgett film. *Langmuir* **2002**, 18, 1661-1665, doi:10.1021/la0112864.
16. Abudukeremu, H.; Kari, N.; Zhang, Y.; Wang, J.; Nizamidin, P.; Abliz, S.; Yimit, A. Highly sensitive free-base-porphyrin-based thin-film optical waveguide sensor for detection of low concentration NO_2 gas at ambient temperature. *J. Mater. Sci.* **2018**, 53, 10822-10834, doi:10.1007/s10853-018-2374-5.
17. Benito-Peña, E.; Valdés, M.G.; Glahn-Martínez, B.; Moreno-Bondi, M.C. Fluorescence based fiber optic and planar waveguide biosensors. A review. *Anal. Chim. Acta* **2016**, 943, 17-40, doi:10.1016/j.aca.2016.08.049.
18. Yu, H.W.; Kim, B.S.; Matsumoto, S. Effect of alkoxy side chain length on the solid-state fluorescence behaviour of bisazomethine dyes possessing dipropylamino terminal group. *Dye. Pigment.* **2017**, 136, 131-139, doi:10.1016/j.dyepig.2016.08.043.
19. Wilchek, M.; Bayer, E.A.; Livnah, O. Essentials of biorecognition: The (strept)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction. *Immunol. Lett.* **2006**, 103, 27-32, doi:10.1016/j.imlet.2005.10.022.
20. Jain, A.; Cheng, K. The Principles and Applications of Avidin-Based Nanoparticles in Drug Delivery and Diagnosis. *Physiol. Behav.* **2017**, 176, 139-148, doi:10.1016/j.jconrel.2016.11.016.
21. Luong, J.H.T.; Male, K.B.; Glennon, J.D. Biotin interference in immunoassays based on biotin-strept(avidin) chemistry: An emerging threat. *Biotechnol. Adv.* **2019**, 37, 634-641, doi:10.1016/j.biotechadv.2019.03.007.
22. Pollheimer, P.; Taskinen, B.; Scherfler, A.; Gusenkov, S.; Creus, M.; Wiesauer, P.; Zauner, D.; Schöfberger, W.; Schwarzinger, C.; Ebner, A. Reversible biofunctionalization of surfaces with a switchable mutant of avidin. *Bioconjug. Chem.* **2013**, 24, 1656-1668, doi:10.1021/bc400087e.
23. Mauriz, E.; García-Fernández, M.C.; Lechuga, L.M. Towards the design of universal immunosurfaces for SPR-based assays: A review. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2016**, 79, 191-198, doi:10.1016/j.trac.2016.02.006.
24. Merrifield, R.B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154, doi:10.1021/ja00897a025.
25. Marshall, G.R. Solid-phase synthesis: A paradigm shift. *J. Pept. Sci.* **2003**, 9, 534-544, doi:10.1002/psc.478.
26. Robinson, N.E.; Robinson, A.B. Use of Merrifield solid phase peptide synthesis in investigations of biological deamidation of peptides and proteins. *Biopolym. - Pept. Sci. Sect.* **2008**, 90, 297-306, doi:10.1002/bip.20852.
27. Amblard, M.; Fehrentz, J.A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Mol. Biotechnol.* **2006**, 33, 239-254, doi:10.1385/MB:33:3:239.
28. Alsina, J.; Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F. Solid-phase synthesis of 「head-to-tail」 cyclic peptides via lysine side-chain anchoring. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9633-9636, doi:10.1016/0040-4039(94)88531-1.
29. Bayer E., M.M. Liquid Phase Peptide Synthesis. *Nature* **1972**, 237, 512-513.

30. Jaradat, D.M.M. Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation, *Amino Acids*, **2018**, 50, 39-68, doi: 10.1007/s00726-017-2516-0.
31. Briehn, C.A.; Schiedel, M.S.; Bonsen, E.M.; Schuhmann, W.; Bäuerle, P. Single-compound libraries of organic materials: From the combinatorial synthesis of conjugated oligomers to structure-property relationships. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2001**, 40, 4680-4683, doi:10.1002/1521-3773(20011217)40:24<4680::AID-ANIE4680>3.0.CO;2-X.
32. Ruhland, B.; Bombrun, A.; Gallop, M.A. Solid-Phase Synthesis of 4-Arylazetidin-2-ones via Suzuki and Heck Cross-Coupling Reactions. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7820-7826, doi:10.1021/jo9711854.
33. Vanier, C.; Wagner, A.; Mioskowski, C. Preparation of new functionalized hydrocarbon linkers via Suzuki cross coupling reaction. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 4335-4338, doi:10.1016/S0040-4039(99)00788-1.
34. Vaino, A.R.; Janda, K.D. Solid-phase organic synthesis: a critical understanding of the resin. *J. Comb. Chem.* **2000**, 2, 579-596, doi:10.1021/cc000046o.
35. Varnava, K.G.; Sarojini, V. Making Solid-Phase Peptide Synthesis Greener: A Review of the Literature. *Chem. - An Asian J.* **2019**, 14, 1088-1097, doi:10.1002/asia.201801807.
36. Hou, W.; Zhang, X.; Liu, C.F. Progress in Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Trans. Tianjin Univ.* **2017**, 23, 401-419, doi:10.1007/s12209-017-0068-8.
37. Wang, S.-S. p -Alkoxybenzyl Alcohol Resin and p -Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 1328-1333, doi:10.1021/ja00785a602.
38. Quarrell, R.; Claridge, T.D.W.; Weaver, G.W.; Lowe, G. Structure and properties of TentaGel resin beads: Implications for combinatorial library chemistry. *Mol. Divers.* **1996**, 1, 223-232, doi:10.1007/BF01715526.
39. Kates, S.A.; Mcguinness, B.F.; Blackburn, C.; Griffin, G.W.; Barany, G.; Albericio, F. “ High-Load ” Polyethylene Glycol - Polystyrene (PEG - PS) Graft Supports for Solid- Phase Synthesis. **1999**, 47, 365-380.
40. Kuramochi, K.; Miyano, Y.; Enomoto, Y.; Takeuchi, R.; Ishi, K.; Takakusagi, Y.; Saitoh, T.; Fukudome, K.; Manita, D.; Takeda, Y.; Kobayashi, S.; Sakaguchi, K.; Sugawara, F. Identification of small molecule binding molecules by affinity purification using a specific ligand immobilized on PEGA resin. *Bioconjug. Chem.* **2008**, 19, 2417-2426, doi:10.1021/bc8002716.
41. Steinhagen, M.; Zunker, K.; Nordsieck, K.; Beck-Sickinger, A.G. Large scale modification of biomolecules using immobilized sortase A from Staphylococcus aureus. *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, 21, 3504-3510, doi:10.1016/j.bmc.2013.03.039.
42. Mazzini, S.; García-Martin, F.; Alvira, M.; Aviñó, A.; Manning, B.; Albericio, F.; Eritja, R. Synthesis of oligonucleotide derivatives using ChemMatrix supports. *Chem. Biodivers.* **2008**, 5, 209-218, doi:10.1002/cbdv.200890012.
43. García-Martín, F.; Quintanar-Audelo, M.; García-Ramos, Y.; Cruz, L.J.; Gravel, C.; Furic, R.; Côté, S.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. ChemMatrix,

a poly(ethylene glycol)-based support for the solid-phase synthesis of complex peptides. *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 213-220, doi:10.1021/cc0600019.
44. Fabani, M.M.; Abreu-Goodger, C.; Williams, D.; Lyons, P.A.; Torres, A.G.; Smith, K.G.C.; Enright, A.J.; Gait, M.J.; Vigorito, E. Efficient inhibition of miR-155 function in vivo by peptide nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, 4466-4475, doi:10.1093/nar/gkq160.
45. García-Ramos, Y.; Paradís-Bas, M.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. ChemMatrix® for complex peptides and combinatorial chemistry. *J. Pept. Sci.* **2010**, 16, 675-678, doi:10.1002/psc.1282.
46. Bacsa, B.; Bösze, S.; Kappe, C.O. Direct solid-phase synthesis of the β-amyloid (1-42) peptide using controlled microwave heating. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 2103-2106, doi:10.1021/jo100136r.
47. Galanis, A.S.; Albericio, F.; Grøtli, M. Solid-phase peptide synthesis in water using microwave-assisted heating. *Org. Lett.* **2009**, 11, 4488-4491, doi:10.1021/ol901893p.
48. Mergler, M.; Nyfeler, R.; Tanner, R.; Gosteli, J.; Grogg, P. Peptide synthesis by a combination of solid-phase and solution methods II synthesis of fully protected peptide fragments on 2-methoxy-4-alkoxy-benzyl alcohol resin. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4009-4012, doi:10.1016/S0040-4039(00)80406-2.
49. Katritzky, A.R.; Toader, D.; Watson, K.; Kiely, J.S. New synthesis of SASRIN(TM) resin. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7849-7850, doi:10.1016/s0040-4039(97)10132-0.
50. Hansen, J.; Diness, F.; Meldal, M. C-Terminally modified peptides via cleavage of the HMBA linker by O-, N- or S-nucleophiles. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 3238-3245, doi:10.1039/c6ob00213g.
51. Ueki, M.; Kai, K.; Amemiya, M.; Horino, H.; Oyamada, H. Facile removal of a peptide chain from a solid phase resin support by hydrolysis using tetrabutylammonium fluoride trihydrate in N,N-dimethylformamide. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 414-415, doi:10.1039/C39880000414.
52. Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2091-2157, doi:10.1021/cr980040+.
53. Santini, R.; Griffith, M.C.; Qi, M. A measure of solvent effects on swelling of resins for solid phase organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8951-8954, doi:10.1016/S0040-4039(98)02069-3.
54. Deepshikha, V.; Rajasekharan, P.V.N. Synthesis and Characterization of Kalata B2 Cyclotide (GLPVCGETCFGGTCNTPGCSCTWPICTRD) on Wang Resin, as Solid Support. *Open J. Med. Chem.* **2020**, 10, 46-55, doi:10.4236/ojmc.2020.102004.
55. Abdalla, M.A.; McGaw, L.J. Natural cyclic peptides as an attractive modality for therapeutics: A mini review. *Molecules* **2018**, 23, doi:10.3390/molecules23082080.
56. Nuijens, T.; Toplak, A.; van de Meulenreek, M.B.A.C.; Schmidt, M.; Goldbach, M.; Quaedflieg, P.J.L.M. Improved solid phase synthesis of peptide carboxyamidomethyl (Cam) esters for enzymatic segment condensation. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57, 3635-3638, doi:10.1016/j.tetlet.2016.06.132.

57. Virta, P.; Katajisto, J.; Niittymäki, T.; Lönnberg, H. Solid-supported synthesis of oligomeric bioconjugates. *Tetrahedron* **2003**, 59, 5137-5174, doi:10.1016/S0040-4020(03)00704-X.
58. Houghten, R.A. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, 82, 5131-5135, doi:10.1073/pnas.82.15.5131.
59. Merrifield, B. Solid Phase Synthesis. *Science* **1986**, 232, 341-347.
60. Orain, D.; Ellard, J.; Bradley, M. Protecting groups in solid-phase organic synthesis. *J. Comb. Chem.* **2002**, 4, 1-16, doi:10.1021/cc0001093.
61. Lönnberg, H. Synthesis of oligonucleotides on a soluble support. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, 13, 1368-1387, doi:10.3762/bjoc.13.134.
62. Kostov, O.; Liboska, R.; Páv, O.; Novák, P.; Rosenberg, I. Solid-phase synthesis of phosphorothioate/ phosphonothioate and phosphoramidate/ phosphonamidate oligonucleotides. *Molecules* **2019**, 24, doi:10.3390/molecules24101872.
63. Pengpumkiat, S.; Koesdjojo, M.; Rowley, E.R.; Mockler, T.C.; Remcho, V.T. Rapid synthesis of a long double-stranded oligonucleotide from a single-stranded nucleotide using magnetic beads and an oligo library. *PLoS One* **2016**, 11, 1-10, doi:10.1371/journal.pone.0149774.
64. Yu, G.W.; Kang, Y.H. Solid-phase synthesis of 2′;-O-methoxyethyl oligonucleotides using dimeric phosphoramidite blocks. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2016**, 37, 1754-1759, doi:10.1002/bkcs.10962.
65. Brown, R.C.D. Recent developments in solid-phase organic synthesis. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, 3293-3320, doi:10.1039/co9970400216.
66. Ley, S. V.; Baxendale, I.R.; Bream, R.N.; Jackson, P.S.; Leach, A.G.; Longbottom, D.A.; Nesi, M.; Scott, J.S.; Storer, R.I.; Taylor, S.J. Multi-step organic synthesis using solid-supported reagents and scavengers: A new paradigm in chemical library generation. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2000**, 3815-4195, doi:10.1039/b006588i.
67. Ha, J.E.; Yang, S.J.; Gong, Y.D. Construction of 1,3,4-Oxadiazole and 1,3,4-Thiadiazole Library with a High Level of Skeletal Diversity Based on Branching Diversity-Oriented Synthesis on Solid-Phase Supports. *ACS Comb. Sci.* **2018**, 20, 82-97, doi:10.1021/acscombsci.7b00174.
68. Hermkens, P.H.H.; Ottenheijm, H.C.J.; Rees, D. Solid-phase organic reactions: A review of the recent literature. *Tetrahedron* **1996**, 52, 4527-4554, doi:10.1016/0040-4020(96)00216-5.
69. Booth, S.; Hermkens, P.H.H.; Ottenheijm, H.C.J.; Rees, D.C. Solid-phase organic reactions III[1,2]: A review of the literature Nov 96-Dec 97. *Tetrahedron* **1998**, 54, 15385-15443, doi:10.1016/S0040-4020(98)00968-5.
70. Backes, B.J.; Ellman, J.A. Carbon-Carbon Bond-Forming Methods on Solid Support. Utilization of Kenner's "Safety-Catch" Linker. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11171-11172, doi:10.1021/ja00103a048.
71. Baudoin, O.; Cesario, M.; Guénard, D.; Guéritte, F. Application of the palladium-catalyzed borylation/Suzuki coupling (BSC) reaction to the synthesis of biologically active biaryl lactams. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 1199-1207, doi:10.1021/jo0160726.

72. Forman, F.W.; Sucholeiki, I. Solid-Phase Synthesis of Biaryls via the Stille Reaction. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 523-528, doi:10.1021/jo00108a010.
73. Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483, doi:10.1021/cr00039a007.
74. Bräse, S.; Kirchhoff, J.H.; Köbberling, J. Palladium-catalysed reactions in solid phase organic synthesis. *Tetrahedron* **2003**, 59, 885-939, doi:10.1016/S0040-4020(02)01425-4.
75. Malenfant, P.R.L.; Fréchet, J.M.J. The first solid-phase synthesis of oligothiophenes The solid-phase synthesis of asymmetric oligothiophenes on a chloromethylated macroporous resin, using an alternating sequence of bromination and Stille coupling reactions, has been used to afford oligo. *Chem. Commun.* **1998**, 2657-2658.
76. Tsuji, J. Organic Syntheses by Means of Noble Metal Compounds. *Nippon kagaku zassi* **1967**, 88, 687-706, doi:10.1246/nikkashi1948.88.7_687.
77. Biffis, A.; Zecca, M.; Basato, M. Palladium metal catalysts in Heck C-C coupling reactions. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2001**, 173, 249-274, doi:10.1016/S1381-1169(01)00153-4.
78. Phan, N.T.S.; Van Der Sluys, M.; Jones, C.W. On the nature of the active species in palladium catalyzed Mizoroki-Heck and Suzuki-Miyaura couplings - Homogeneous or heterogeneous catalysis, a critical review. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 609-679, doi:10.1002/adsc.200505473.
79. Ishiyama, T.; Murata, M.; Miyaura, N. Palladium(0)-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Alkoxydiboron with Haloarenes: A Direct Procedure for Arylboronic Esters. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7508-7510, doi:10.1021/jo00128a024.
80. Mutoh, Y.; Yamamoto, K.; Saito, S. Suzuki-miyaura cross-coupling of 1,8-diaminonaphthalene (dan)-protected arylboronic acids. *ACS Catal.* **2020**, 10, 352-357, doi:10.1021/acscatal.9b03667.
81. Gillis, E. P.; Burke, M. D. Iterative Cross-Coupling with MIDA Boronates: Towards a General Platform for Small Molecule Synthesis. *Aldrichimica Acta.* **2009**, 42, 17-27, PMID: 22523433.
82. Fyfe, J.W.B.; Valverde, E.; Seath, C.P.; Kennedy, A.R.; Redmond, J.M.; Anderson, N.A.; Watson, A.J.B. Speciation control during Suzuki-Miyaura cross-coupling of haloaryl and haloalkenyl MIDA boronic esters. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, 21, 8951-8964, doi:10.1002/chem.201500970.
83. Li, J.; Ballmer, S.G.; Gillis, E.P.; Fujii, S.; Schmidt, M.J.; Palazzolo, A.M.E.; Lehmann, J.W.; Morehouse, G.F.; Burke, M.D. Automated Process. **2015**, 347, 1221-1226.
84. Close, A.J.; Kemmitt, P.; Mark Roe, S.; Spencer, J. Regioselective routes to orthogonally-substituted aromatic MIDA boronates. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 6751-6756, doi:10.1039/c6ob01141a.
85. Frenette, R.; Friesen, R.W. Biaryl synthesis via suzuki coupling on a solid support. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9177-9180, doi:10.1016/0040-4039(94)88458-7.
86. Lorsbach, B.A.; Kurth, M.J. Carbon-carbon bond forming solid-phase reactions. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1549-1581, doi:10.1021/cr970109y.

87. Larhed, M.; Lindeberg, G.; Hallberg, A. Rapid microwave-assisted Suzuki coupling on solid-phase. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 8219-8222, doi:10.1016/0040-4039(96)01872-2.
88. Afonso, A.; Feliu, L.; Planas, M. Solid-phase synthesis of biaryl cyclic peptides by borylation and microwave-assisted intramolecular Suzuki-Miyaura reaction. *Tetrahedron* **2011**, 67, 2238-2245, doi:10.1016/j.tet.2011.01.084.
89. Piettre, S.R.; Baltzer, S. A new approach to the solid-phase Suzuki coupling reaction. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 1197-1200, doi:10.1016/S0040-4039(97)00063-4.
90. Loving, G.S.; Sainlos, M.; Imperiali, B. Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores. *Trends Biotechnol.* **2010**, 28, 73-83, doi:10.1016/j.tibtech.2009.11.002.
91. Dziuba, D.; Pospíšil, P.; Matyašovský, J.; Brynda, J.; Nachtigallová, D.; Rulíšek, L.; Pohl, R.; Hof, M.; Hocek, M. Solvatochromic fluorene-linked nucleoside and DNA as color-changing fluorescent probes for sensing interactions. *Chem. Sci.* **2016**, 7, 5775-5785, doi:10.1039/c6sc02548j.
92. Liu, B.; Bi, X.; McDonald, L.; Pang, Y.; Liu, D.; Pan, C.; Wang, L. Solvatochromic fluorescent probes for recognition of human serum albumin in aqueous solution: Insights into structure-property relationship. *Sensors Actuators, B Chem.* **2016**, 236, 668-674, doi:10.1016/j.snb.2016.06.056.
93. Sot, J.; Esnal, I.; Monasterio, B.G.; León-Irra, R.; Niko, Y.; Goñi, F.M.; Klymchenko, A.; Alonso, A. Phase-selective staining of model and cell membranes, lipid droplets and lipoproteins with fluorescent solvatochromic pyrene probes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2021**, 1863, 183470, doi:10.1016/j.bbamem.2020.183470.
94. Slavík, J. Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *BBA - Rev. Biomembr.* **1982**, 694, 1-25, doi:10.1016/0304-4157(82)90012-0.
95. Weber, G.; Farris, F.J. Synthesis and Spectral Properties of a Hydrophobic Fluorescent Probe: 6-Propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. *Biochemistry* **1979**, 18, 3075-3078, doi:10.1021/bi00581a025.
96. Son, S.H.; Yamagishi, Y.; Tani, M.; Yuasa, M.; Yamada, K. Spectral shifts of the environment-sensitive fluorophore POLARIC™ in heterogeneous interfaces. *Chem. Lett.* **2011**, 40, 989-991, doi:10.1246/cl.2011.989.

第二章 蛍光ソルバトクロミックビーズの合成と光導波路分光装置を用いた表面の溶媒極性への応答性評価

2.1. 背景

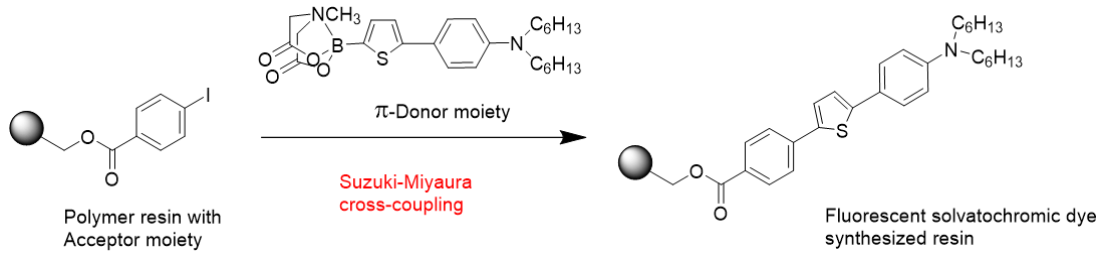
固相合成法は 1959 年に R.B.Merrifield によってテトラペプチドを合成するために開発された合成手法である[1]。この手法の最も大きな利点は、有機溶媒に不溶な樹脂に化合物を固定することで、精製作業は濾過と固相の洗浄で済むことである[2]。一般的に、オリゴヌクレオチド、ペプチド、オリゴ糖のような生物活性を示す生体物質の固相合成では、phosphoramidite や carbodiimide 等高い反応性の活性剤を用いるカップリング反応によって反応物の間に非共役結合を形成し目的物を得る[3-5]。鈴木-宮浦クロスカップリングは異なる芳香族化合物の間にπ共役結合を効率的に形成することができる画期的な反応である[6-8]。固相合成の分野においても危険性・毒性が低いことや固相との結合部位を切断するなどの影響を与えないことから、鈴木-宮浦クロスカップリング反応は創薬研究やコンビナトリアル合成の分野でよく利用されている[9-11]。

一般的に固相合成法で合成された非共役系化合物は固相から切り離し、液相合成と同様にシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製され、核磁気共鳴法(NMR)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、質量分析法(MS)などによって化合物の構造を同定する必要がある[12]。これらの同定法は、化合物の同定に時間を要することから、固相合成法の利点である合成効率の高さを十分に発揮できないと考えられる。これまでに、目的化合物を切り離さず直接同定する為に固体 NMR、MS、赤外分光法(IR)等を利用した分析手法がいくつか検討されているが、固相に由来するシグナルが目的化合物由来のシグナルと混在してしまい目的物の同定を阻害することや、特殊な測定条件を整える必要があり、結果的に固相合成法の利便性を十分に活かしているとは言えない[13]。鈴木-宮浦クロスカップリングを用いて合成されたπ共役系化合物は特徴的な光物性を示すことから、固相から切り離すことなく高感度な化合物同定等の分析に用いることができる[14,15]。よって、我々は樹脂上で目的物が合成されたことを高感度に分析することのできる手法を確立する為に、蛍光色素が合成された固相表面の光物性を分析する手法の確立を試みた。我々が過去に報告した蛍光ソルバトクロミック色素は、電子供与性部位・芳香族ヘテロ環・電子求引性部位を鈴木-宮浦クロスカップリングによって直結させることで容易に得られ、可視領域に強い蛍光と吸収を持ち、色素周囲の溶媒極性に応答し蛍光色変化を示す機能性蛍光色素である[16-18]。これらの特性から、ビーズ上で蛍光ソルバトクロミック色素が合成された事をビーズ表面の光物性変化から分析し、切り離すことなく目的化合物が合成されたことを確認することができる。

合成に用いる固相には Wang resin を選択した。Wang resin はπ共役化合物の固相合成に広く用いられていること、取り扱いの容易さ、酸触媒による開裂または塩基性条件下のエステル交換の比較的温和な条件で切り離せることができる[19-22]。合成した色素が切り離せることで、化合物の同定及びビーズと色素溶液との光物性を比較する際の参照化合物を得ることが可能であると考えた。さらに、樹脂上で色素を合成する利点として、色素化合物が溶液中に分散することなく一定の強度で測定することが可能であること、色素が高分子鎖に固定されていることから、色素同士の過度な凝集を防ぐことも見込まれる。

蛍光ソルバトクロミックビーズの光物性測定には光導波路分光装置を用いた。

光導波路分光装置は、両端に光学研磨を施した光導波路に光を照射すると、全反射条件下では光導波路表面にエバネッセント波が発生する、このエバネッセント波が測定対象に伝搬することで励起されたサンプルの吸収スペクトル・蛍光スペクトルなどの光物性をリアルタイム且つ非破壊で測定することができる強力なツールである[23]。光学特性を有する有機化合物の固体状態での蛍光スペクトルや光導波路表面に光学的機能を有する化合物を塗分散させ、ガスセンサーに利用するなどの応用例から、樹脂表面の光学変化を測定する目的に適していると考えた[24-28]。本章では、固相合成法による蛍光ソルバトクロミックビーズの合成と光導波路分光装置を用いた光物性の評価そしてビーズ表面の溶媒極性に対する応答性について検討を行った(Scheme 2.1)。



Scheme 2.1. Synthetic strategy of fluorescent solvatochromic resin.

2.2. 実験

2.2.1. 実験試薬・化合物同定に用いた機器

市販の溶媒・化合物は全て試薬グレードを使用した。多くの実験試薬は富士フィルム和光純薬株式会社(大阪府大阪市)から購入した。いくつかの実験試薬に関しては下記の通りである。Wang resin (渡辺化学工業株式会社、広島県広島市) *N*-methyliminodiacetic acid、bis(pinacolato)diboron(東京化成工業株式会社、東京都)、 2-dicyclohexylphosphino-2',6'-dimethoxybiphenyl (SPhos)、*N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (DMAP) (Sigma-Aldrich Japan Co., LLC、 Tokyo, Japan)、5-bromothiophene-2-boronic acid(Combi-Blocks Inc., San Diego, CA, USA).

合成反応は薄層クロマトグラフィー60F_{254} (layer thickness, 0.25 mm; E. Merck, Darmstadt, Germany)によって反応の進行を確認した。目的化合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製した。精製に使用したシリカゲルはWakosil® C-300 (0.04-0.06 mm,富士フィルム和光純薬株式会社)を用いた。目的化合物の同定は日本電子株式会社(東京都)製の400MHz核磁気共鳴装置(JNM-EX400)を用いた。核磁気共鳴(NMR)スペクトルを測定する為に以下の重溶媒を用いた。リファレンスとしてトリメチルシリル(TMS)が含まれる$CDCl_3$と acetone-d_6を用いた。また、目的化合物の同定にはエレクトロスプレーイオン化法(ESI)を用いた質量分析装置(Thermo Scientific Exactive spectrometer, Thermo Fisher Scientific、Waltham, MA, USA)による精密質量スペクトルの測定も実施した。未修飾の樹脂、合成した樹脂、及び切り出した色素化合物の赤外スペクトルの測定にはNicolet iS10 FT-IR spectrometer (Thermo Fisher Scientific)を用いた。

2.2.2. 吸収・蛍光スペクトル測定装置・測定条件

全てのスペクトル測定は、富士フィルム和光純薬工業株式会社から販売されているスペクトルグレードの溶媒を用いた。合成した蛍光ソルバトクロミックビーズの吸収・蛍光スペクトル測定は光導波路分光装置(PLT-5000SLC, システム・インスツルメンツ株式会社、東京都)を用いた。光源は 150WXe ランプを測定に用いた。光導波路分光装置による測定には両端が光学研磨された高屈折率ガラス導波路(65 × 20 mm、厚み 400 μm、屈折率 1.81) を使用した。光導波路分光装置による測定条件は以下の通りである。トルエンを測定溶媒に使用した測定は入射光の法線角を 56.5° に検出角は 46.2° で設定し測定した。その他の溶媒は入射光の法線角を 53.6° に検出角は 44.0° に設定し測定した。色素溶液の吸収スペクトル測定には JASCO V-560 spectrometer(日本分光株式会社、東京都)、蛍光スペクトルの測定には F-4500(日立ハイテクサイエンス、東京都)をそれぞれ用いた。吸収スペクトル測定用の色素溶液は 50 μmol L^{-1}、蛍光スペクトル測定用の色素溶液は 5 μmol L^{-1}の濃度でそれぞれ調製し、測定用の試料とした。1 × 1 cm のクオーツセルを使用し、Xe アークランプを光源として、スリット幅は 5 nm で測定した。合成した蛍光ビーズの顕微鏡画像は Nikon eclipse 50i fluorescence microscope、DS-Fi2-L3 microscope camera (Nikon)を使用し、395 nm UV ハンドランプを照射した状態で蛍光発光の様子を撮影し

た。光量子収率の測定は絶対量子収率計 Quantaurus-QY（浜松ホトニクス、静岡県浜松市)を用いた。

2.2.3. 蛍光ソルバトクロミックビーズの合成

2.2.3.1. Wang Resin への 4-iodobenzoic Acid の固定 (1)

Wang resin (0.500 g, 0.790 mmol g^{-1}, 0.395 mmol) を 15 mL のスクリューバイアル中に分取し、脱水 dichloromethane (DCM, 7.50 mL)を加えビーズを浸潤させた。4-iodobenzoic acid (0.294 g, 1.19 mmol) と *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (0.245 g, 1.19 mmol) を混合溶液に加えた。その後、少量の DCM に溶かした DMAP (5.00 mg, 0.0409 mmol) を滴下、振蕩機を使用し 24 時間 250 RPM で振盪した。ビーズをろ過で回収し、DCM、tetrahydrofuran (THF)、 *N,N*-dimethylformamide (DMF)、 methanol でそれぞれ 3 度洗浄した。洗浄後のビーズは真空乾燥で乾燥させた。基質固定量を確認するために 10% TFA/DCM 混合溶媒で開裂したところ、基質がビーズに固定されており、 0.545 mmol g^{-1} の基質が固定されていることをビーズの開裂前後の重量から求めた。

2.2.3.2. *N,N*-dihexyl-4-iodoaniline の合成 (2)

50 mL ナスフラスコに 4-iodoaniline (2.00 g, 9.13 mmol)、1-iodohexane (6.39 g, 30.1 mmol)、Na_2CO_3 (1.74 g, 16.4 mmol) と DMF 25.0 mL を加え混合した、そして窒素ガス雰囲気下 95 ℃で加熱し、20 時間反応させた。その後、反応溶液を室温まで冷却し、100 mL の H_2O へ加えた。混合溶液を ethyl acetate (50.0 mL×3)で抽出し、油層を 50.0 mL の H_2O で 2 度洗浄した。回収した油層を硫酸ナトリウムで脱水し、エバポレーターで濃縮した。粗精製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane)で精製し目的物の油状物質 **2** を得た(2.56 g, 72.4%)。 ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.39 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 6.40 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 3.20 (t, 4H, J = 7.5 Hz), 1.52 (m, 4H), 1.30 (m, 12H), 0.89 (t, 6H, J = 6.8 Hz); ESI-HRMS (m/z) $[M+H]^+$ calcd for $C_{18}H_{31}IN$ 388.14957, found: 388.14943.

2.2.3.3. *N,N*-dihexyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline の合成 (3)

30 mL ナスフラスコに化合物 **2** (1.00 g, 2.58 mmol), KOAc (1.27 g, 12.9 mmol), bis(pinacolato)diboron (1.31 g, 5.16 mmol)、$PdCl_2(dppf)CH_2Cl_2$ (0.105 g, 0.129 mmol) を加え DMF 11.0 mL に溶解させた。窒素ガス雰囲気下 90 ° C に加熱し、21 時間反応させた。反応溶液を室温まで冷却し、1N aq. HCl で中和した。その後、20.0 mL の ethyl acetate で抽出し、油層を sat. aq. NaCl と sat. aq. $NaHCO_3$ で洗浄した。回収した油層を硫酸ナトリウムで脱水し、エバポレーターで濃縮した。粗精製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1% ethyl acetate in hexane)で精製し目的物の油状物質 3 を得た(0.461 g, 46.1%)。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.64 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 6.59 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 3.27 (t, 4H, J = 7.8 Hz), 1.56 (m, 4H), 1.31 (m, 12H), 0.89 (t, 6H, J = 6.8 Hz); ESI-HRMS (m/z) $[M+H]^+$ calcd for $C_{24}H_{43}{}^{10}BNO_2$: 387.34177, found: 387.34206.

2.2.3.4. 5-bromo-2-thienylboronic Acid *N*-methyliminodiacetic Acid Ester の合成 (**4**)

100 mL ナスフラスコに 5-bromothiophene-2-boronic acid (1.40 g, 6.77 mmol)、 *N*-methyliminodiacetic acid (*N*-MIDA, 1.05 g, 7.14 mmol) を加え、トルエン 50 mL と DMSO 5 mL の混合溶媒に溶かした。混合溶液を Dean-Stark trap に接続し、95 ° C で 24 時間加熱を行った。 反応溶液をエバポレーターで濃縮し、H_2O を加えると、白色固体が析出した。析出した固体を吸引ろ過で回収し、H_2O と diethyl ester で洗浄した。その後、回収した固体を真空乾燥させ、白色固体 **4** を得た(1.76 g, 80.9%)。^{1}H NMR (400 MHz, acetone-d_6) δ (ppm) 7.19 (d, 1H, J = 3.5 Hz), 7.13 (d, 1H, J = 3.5 Hz), 4.39 (d, 2H, J = 17 Hz), 4.20 (d, 2H, J = 17 Hz), 2.92 (s, 3H); ESI-HRMS (m/z) $[M+Na]^+$ calcd for $C_9H_9{}^{10}BBrNNaO_4S$: 338.94572, found: 338.94590.

2.2.3.5. 5-[4-(*N,N*-dihexylamino)phenyl]-2-thienylboronic Acid MIDA Ester の合成 (**5**)

10 mL ナスフラスコに化合物 3 (71.5 mg, 0.185 mmol)、化合物 4 (40.0 mg, 0.126 mmol)、 K_3PO_4 (80.0 mg, 0.377 mmol) 、$PdCl_2(dppf)CH_2Cl_2$ (4.00 mg, 4.90 μmol) を加え、THF 2.00 mL と H_2O 0.0110 mL の混合溶液に溶かした。混合溶液を窒素ガス雰囲気下で 20 ° C、24 時間撹拌した。その後、反応溶液に H_2O 10.0 mL を加え、ethyl acetate (20.0 mL×3)で抽出した。油層を H_2O (10.0 mL×2)で洗浄し、回収した油層を硫酸ナトリウムで脱水した。粗精製物をエバポレーターで濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(45% acetone in hexane)で精製を行い、黄色油状物質 5 を得た(29.3 mg, 46.7%)。 ^{1}H NMR (400 MHz, acetone-d_6) δ (ppm) 7.48 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.21 (d, 1H, J = 3.5

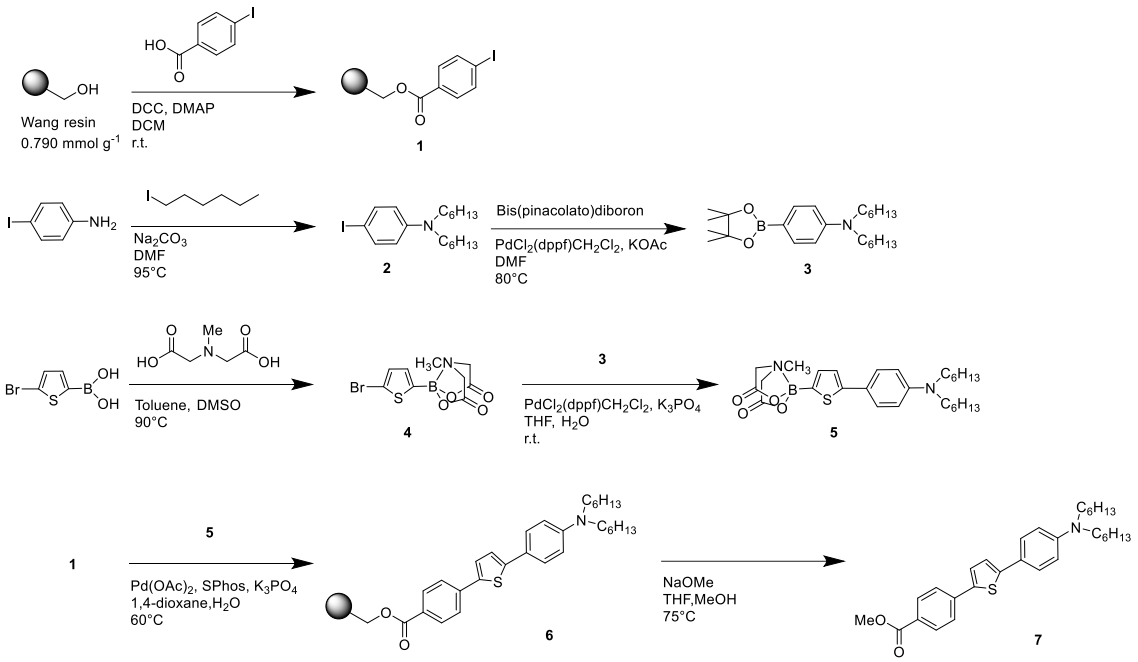
Hz), 7.14 (d, 1H, J = 3.5 Hz), 6.70(d, 2H, J = 8.8 Hz), 4.35 (d, 2H, J = 17 Hz), 4.15 (d, 2H, J = 17 Hz), 3.35 (t, 4H, J = 7.6 Hz), 2.86 (s, 3H), 1.68-1.53 (m, 4H), 1.34 (m, 12H), 0.89 (t, 6H, J = 7.0 Hz); ESI-HRMS (m/z) $[M+H]^+$ calcd for $C_{27}H_{40}{}^{10}BN_2O_4S$: 498.28327, found: 498.28364

2.2.3.6. ビーズ6の合成 (**6**)

0.150 gのビーズ**1** (0.545 mmol g^{-1}, 81.8 μmol)を15 mLナスフラスコに分取し、 dioxane 3.00 mL を加えてビーズを浸潤させた。化合物 **5** (59.0 mg, 0.118 μmol)、SPhos (2.00 mg, 4.87 μmol)、$Pd(OAc)_2$ (0.600 mg, 2.67 μmol)をそれぞれナスフラスコに加えた。窒素ガス雰囲気下、室温で10分撹拌した。その後、3 M aq. K_3PO_4 0.400 mLを加え、反応溶液を60° Cまで加熱し、24時間撹拌した。反応後のビーズをろ過で回収し、DCM、 THF、 DMF、methanolでそれぞれ3度洗浄した。回収したビーズを真空乾燥させ、ビーズ6(156 mg)を得た。

2.2.3.7. Methyl 1-[4-[5-[4-(*N,N*-dihexhylamino)phenyl]-2-thienyl]-phenyl]-carboxylate の合成 (**7**)

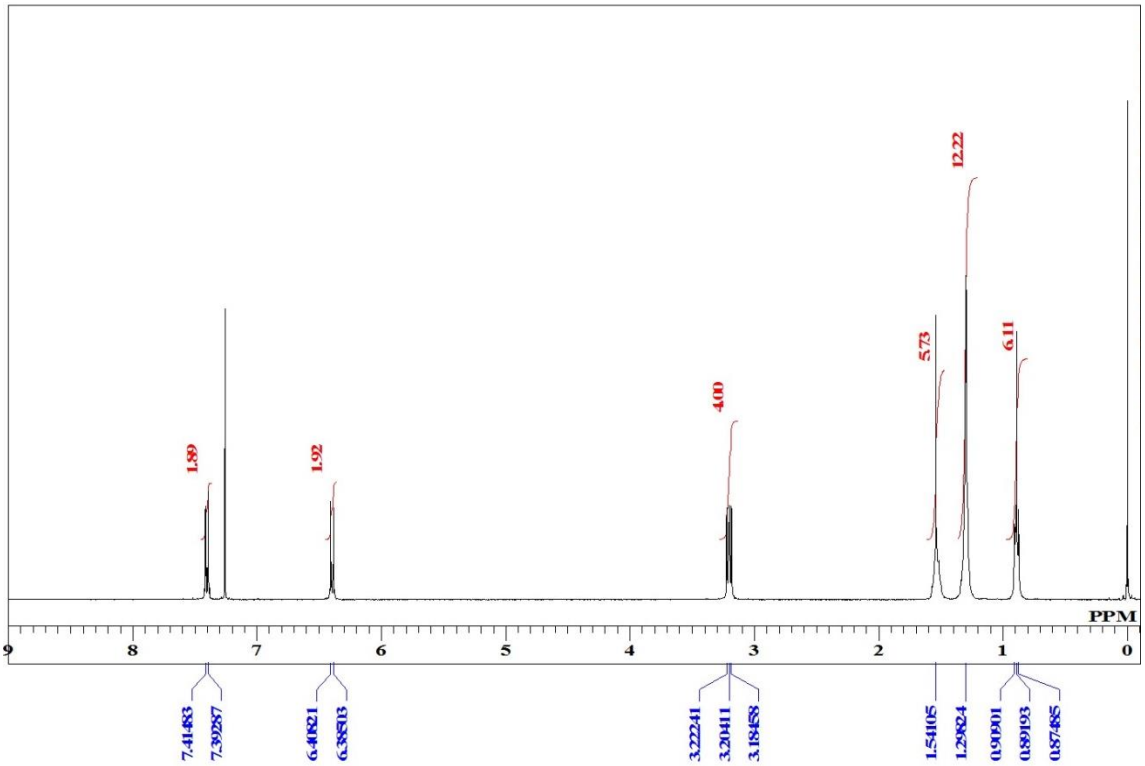
15 mLナスフラスコにビーズ**6** (28.9 mg)を分取し、THF 2.40 mL、methanol 0.600 mL の混合溶媒でビーズを浸潤させた。その後 NaOMe (4.00 mg, 74.0 μmol)を加え、窒素雰囲気下で一晩還流した。その後、反応溶液から吸引ろ過によってビーズを除去し、DCM、THF、methanol でビーズを洗浄した。ろ液をエバポレーターで濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(10% ethyl acetate in hexane)で精製、目的物の黄色固体7(1.60 mg, 21.3%)を得た。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.02 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 7.66 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.48 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.36 (d, 1H, J = 3.9 Hz), 7.14 (d, 1H, J = 3.7 Hz), 6.64 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 3.93 (s, 3H), 3.30 (t, 4H, J = 7.6 Hz), 1.57 (m, 4H), 1.33 (m, 12H), 0.91 (t, 6H, J = 6.8 Hz); ESI-HRMS (m/z) $[M+H]^+$ calcd for $C_{30}H_{40}NO_2S$: 478.27743 ; found: 478.27721.



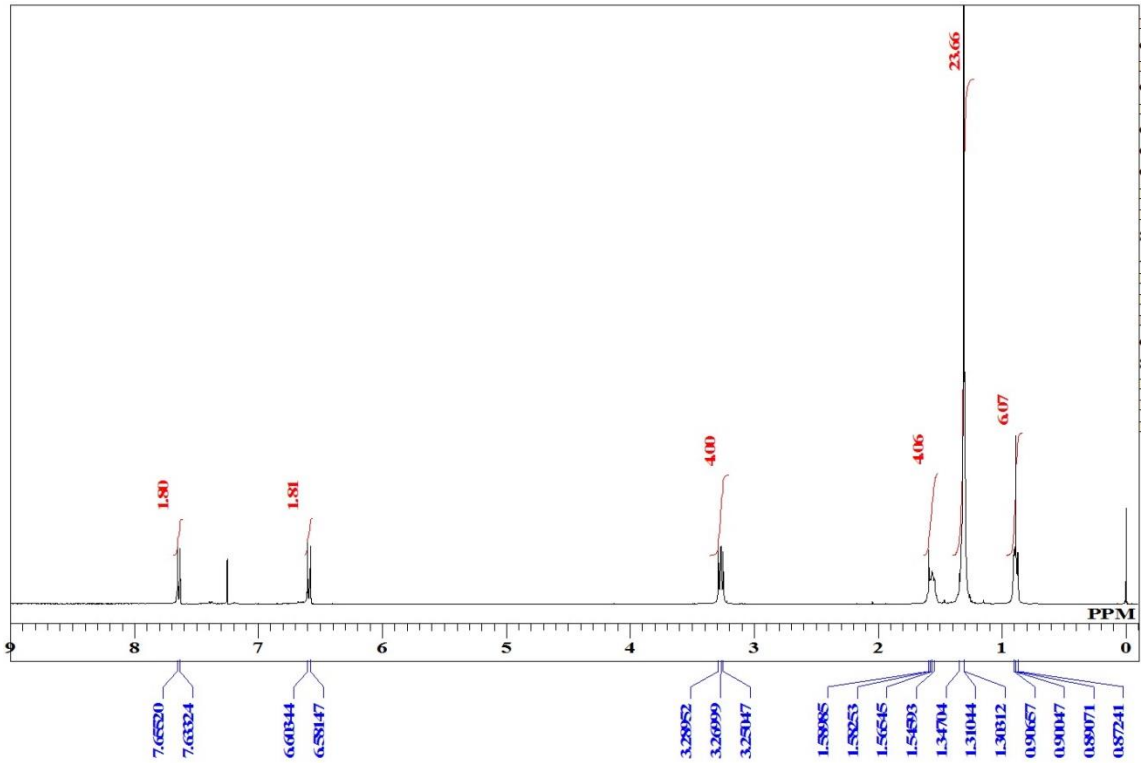
Scheme 2.2. Synthetic schemes for fluorescent solvatochromic beads **6** and dye **7**.

2.2.4. ^{1}H NMR スペクトル

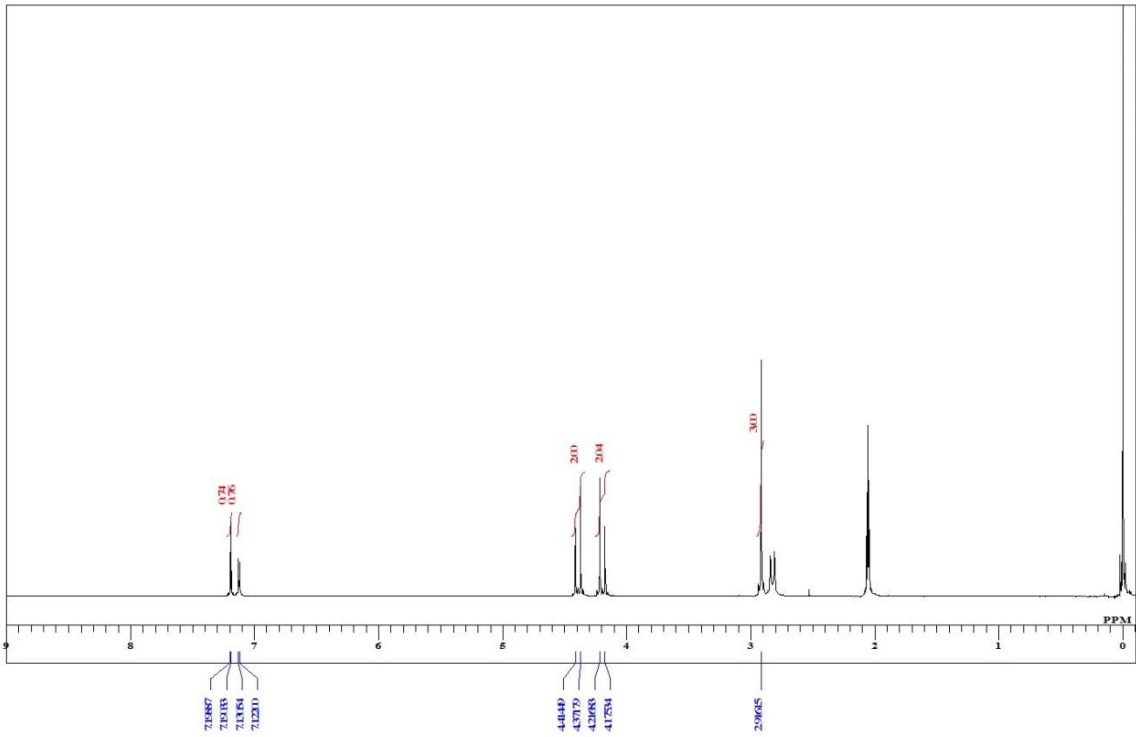
^{1}H NMR of compound **2** measured in $CDCl_3$ at 400 MHz



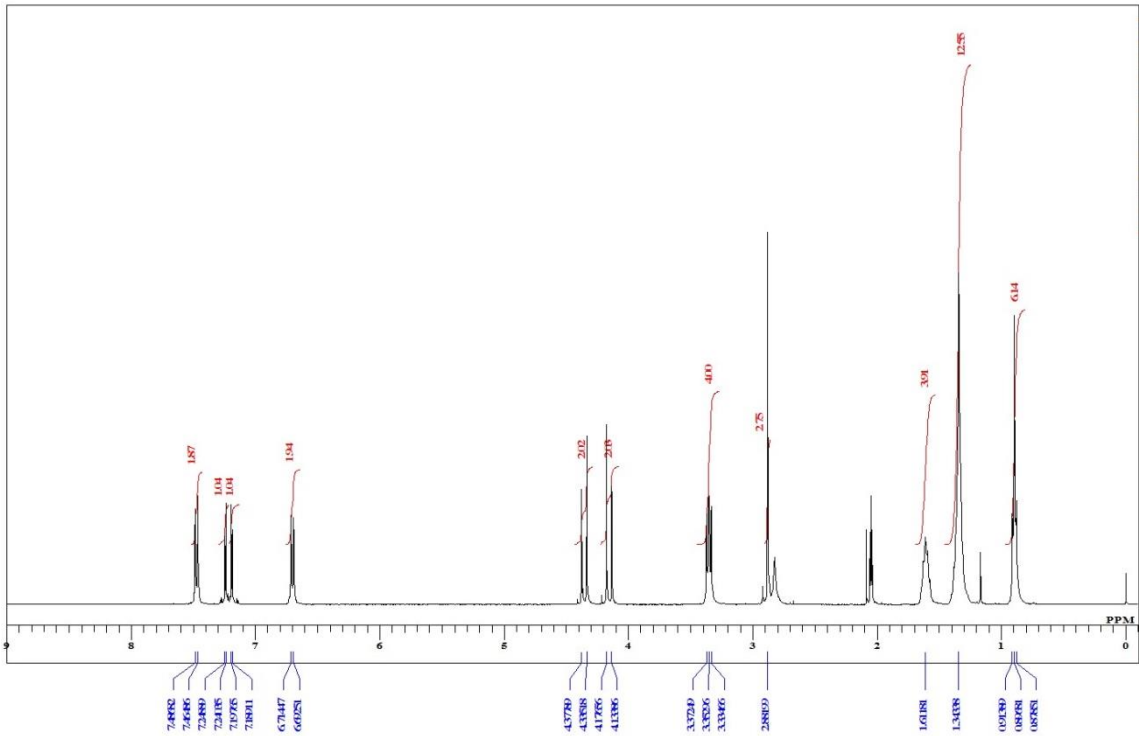
^{1}H NMR of compound **3** measured in $CDCl_3$ at 400 MHz



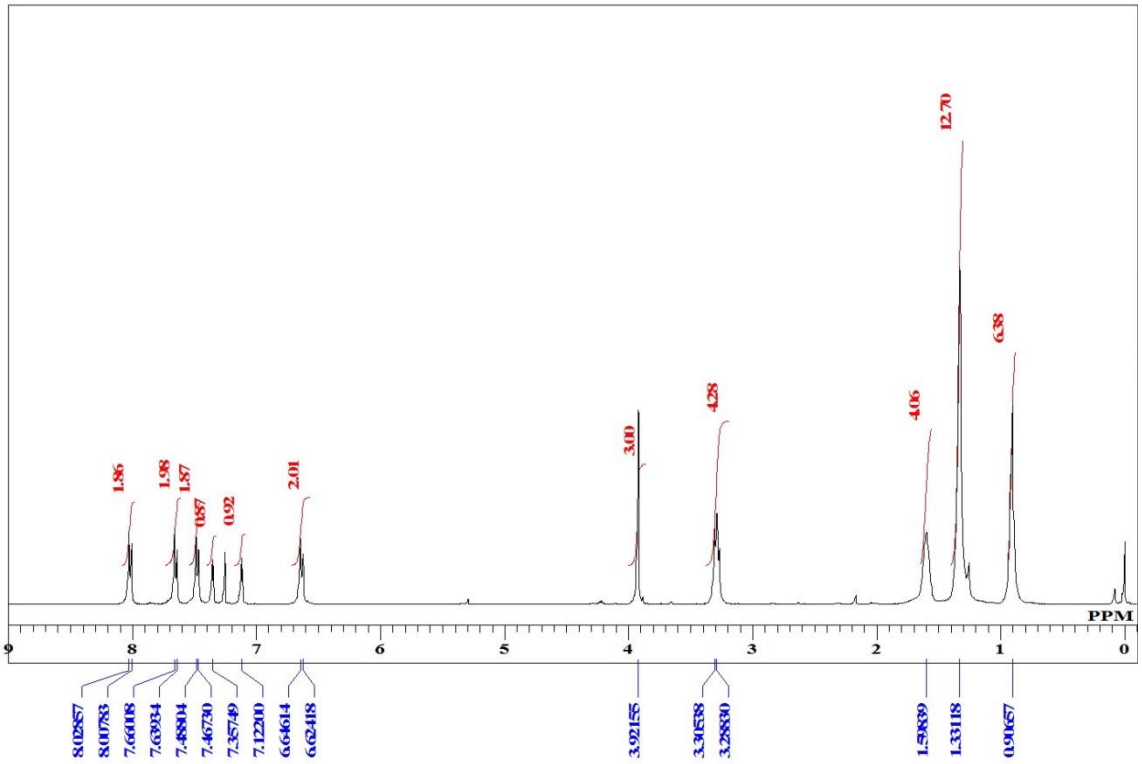
^{1}H NMR of compound **4** measured in acetone-d_6 at 400 MHz



^{1}H NMR of compound **5** measured in acetone-d_6 at 400 MHz



^{1}H NMR of compound **7** measured in $CDCl_3$ at 400 MHz



2.3. 結果・考察

2.3.1. 蛍光ソルバトクロミックビーズの合成

Wang resin に電子求引基となる 4-iodobenzoic acid を DCC / DMAP を用いて縮合反応により固定した。蛍光ソルバトクロミックビーズの合成は、ビーズ上での反応の様子を容易に把握するため、芳香族部位となるチオフェンに電子供与基が修飾された有機ホウ素中間体を用意し一工程で蛍光ソルバトクロミックビーズを合成することを計画した。しかし、有機ホウ素中間体を合成する際に、チオフェンボロン酸が水の存在下で容易に加水分解される事や、電子供与基をカップリング反応で直結する際に望まない副反応を引き起こす事が懸念された。そのため、ボロン酸を加水分解やカップリング反応に対し不活性化する必要がある。そこで我々は、ボロン酸 *N*-methyliminodiacetic acid(MIDA)エステルが、高温でも加水分解されず、カップリング反応が進行しない特徴を有しており、強塩基性水溶液の存在下で容易に脱保護できることに着目し、効率的に有機ホウ素中間体を得ることができると期待した。原料となる 5-bromo-2-thienylboronic acid *N*-methyliminodiacetic acid ester (**4**)と *N*,*N*-dihexyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline (**3**)をカップリング反応で直結することで目的の化合物 **5** の合成に成功した。中間体 **5** のボロン酸 MIDA エステルが脱保護される条件下でパラジウム触媒とビーズ **1** を混合し、カップリング反応によってビーズ上に蛍光ソルバトクロミック色素が合成されたビーズ **6** を合成することに成功した(Scheme 2.2)。合成されたビーズ **6** は、浸潤した有機溶媒によって蛍光色が変化する蛍光ソルバトクロミズムの特性を有していることが確認された。また、核磁気共鳴法による化合物同定の為、NaOMe を用いたエステル交換反応により固相から切り離し、色素 **7** をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製した。色素 **7** が合成されたことを NMR チャートから同定し目的物であることを同定した。また、色素 **7** はビーズ上の色素と光物性挙動を比較するために参照物質として、種々の有機溶媒に溶解させた溶液を用意した(Figure 2.1)。

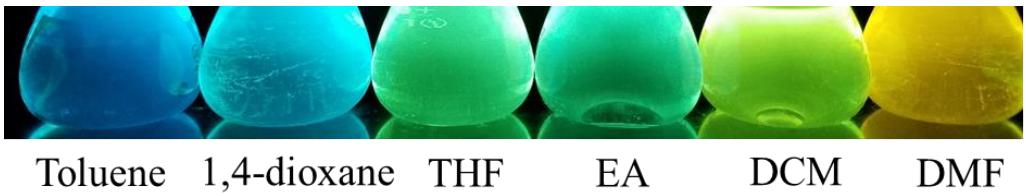


Figure 2.1. Fluorescent image of dye **7** in various polarity solvents.

2.3.2. 蛍光ソルバトクロミックビーズの ATR-IR スペクトル

ビーズ上に基質となる 4-iodobenzoic acid が固定され、蛍光ソルバトクロミック色素が合成されたか確認する為、固相の ATR-IR スペクトルを測定した。4-iodobenzoic acid が固定されたビーズ **1** は Wang resin と比較して 1720 cm^{-1} にエステル由来の C=O ストレッチングピークが確認されたため、縮合反応が進行していることが確認された。また、カップリング反応後のビーズ **6** は 1714 cm^{-1}, 1694 cm^{-1}, 1600 cm^{-1}, 1006 cm^{-1} に色素 **7** と類似したフェニル基由来のピークが認められた。加えてビーズ 6 及び色素 7 では 769 cm^{-1} にチエニル基に由来するピークが確認された。チエニル基のピークはカップリング後に観測されたことから、目的化合物がカップリング反応によって合成されたと判断した(Figure 2.2)。

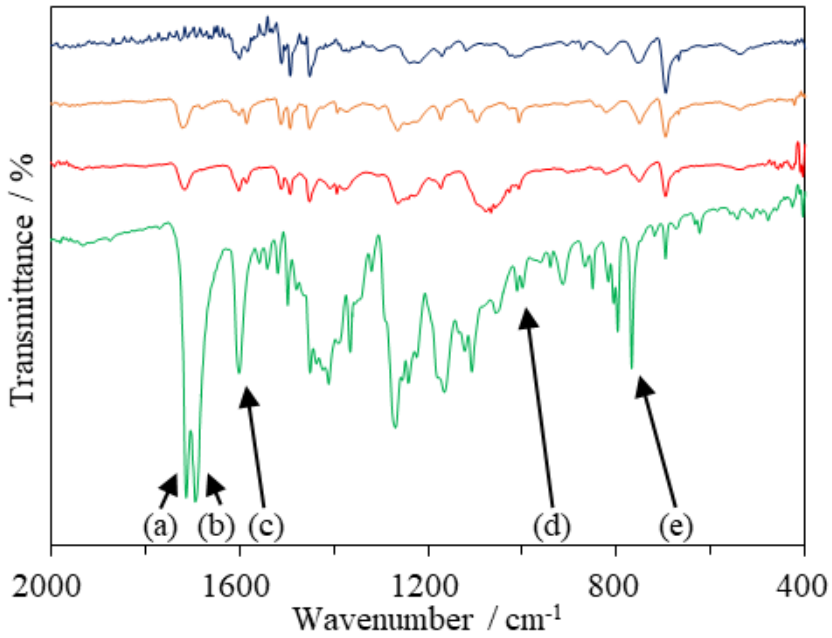


Figure 2.2. ATR-IR spectra of Wang resin (blue), beads **1** (orange), beads **6** (red), and dye **7** (green) in the dry state. (**a**): 1714 cm^{-1}; (**b**): 1694 cm^{-1}; (**c**): 1600 cm^{-1}; (**d**): 1006 cm^{-1}; (e): 769 cm^{-1}.

2.3.3. 光導波路分光装置による光物性測定

ビーズ上に蛍光ソルバトクロミック色素が合成されたことをビーズの光物性から同定及び評価する為に、光導波路分光装置を用いた測定を試みた。

光導波路上に乗せたビーズ **6** に有機溶媒を加えたところ、光導波路表面から浮き上がり分散してしまい、十分なシグナルが得られなかった。ビーズ **6** を導波路に密着させる為、有機溶媒を添加する前にマイクロメーターを使い上から押さえることでビーズの分散を防ぎ、効率よくエバネッセント波による励起が発生し良好なシグナルを得ることに成功した(Figure 2.3)。

光導波路分光装置によって得られた酢酸エチル(EA)環境下でのビーズ **6** 吸収スペクトルは反応前のビーズ **1** と比較して 400 nm 周辺に極大吸収を示し、長波長側に若干のブロードが見られる特徴的な吸収スペクトルが確認された。我々

が過去に報告した蛍光ソルバトクロミック色素の吸収スペクトルと類似しており、色素 **7** の溶液も約 400 nm に吸収帯が存在していることから、目的の色素がビーズ上で合成され、特異な吸収特性を示していることが認められた(Figure 2.4)。ビーズ **6** の各溶媒中における蛍光スペクトルは 525-565 nm の範囲で極大蛍光波長が変化するソルバトクロミズムの応答が確認された。しかし、色素 **7** の各溶媒中における蛍光スペクトルは 473-551 nm の範囲で極大蛍光波長が変化することが確認された(Table 2.1, Figure 2.5)。このことから、溶液中の色素 **7** と比較してビーズ **6** はいずれの溶媒においても、より長波長な蛍光が発生していることが認められた。また、それぞれの蛍光量子収率を測定したところ、色素 **7** の溶液と比べて平均して約 3 割程度の値まで低下していることが確認され、蛍光量子収率の低下に伴いストークスシフトも大きな値を示していた(Table 2.1)。これらの結果から、ブロードした吸収スペクトルと蛍光変化領域がレッドシフトした理由として、ビーズ上の色素濃度がビーズの光物性に影響を与えているのではないかと推察した。この仮説を確認するために、ビーズ上に固定する原料濃度を変化させた際に光物性への影響がどのように現れるか検討を行った。

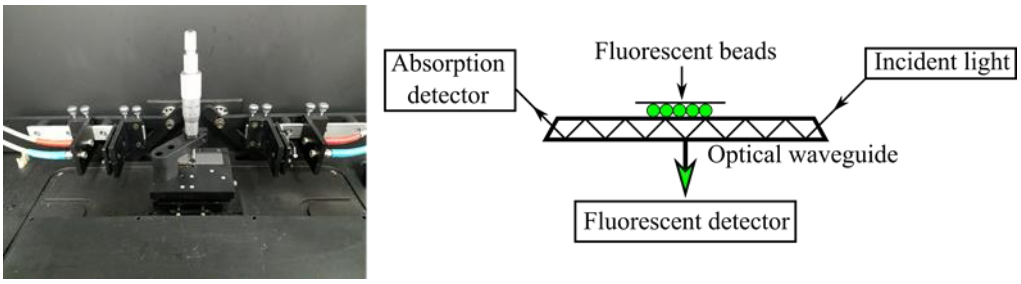


Figure 2.3. A Schematic view of the optical waveguide spectrometer with micrometer (left) and measurement process of optical waveguide spectrometry (right).

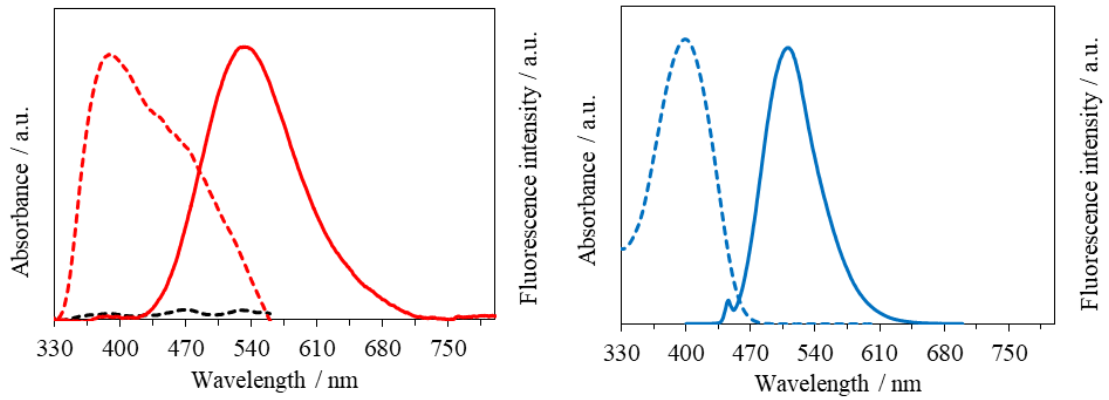


Figure 2.4. Normalized absorbance (dashed lines) and fluorescence spectra (solid lines) of beads **1** (black), beads **6** (red), and dye **7** (blue) in EA solution.

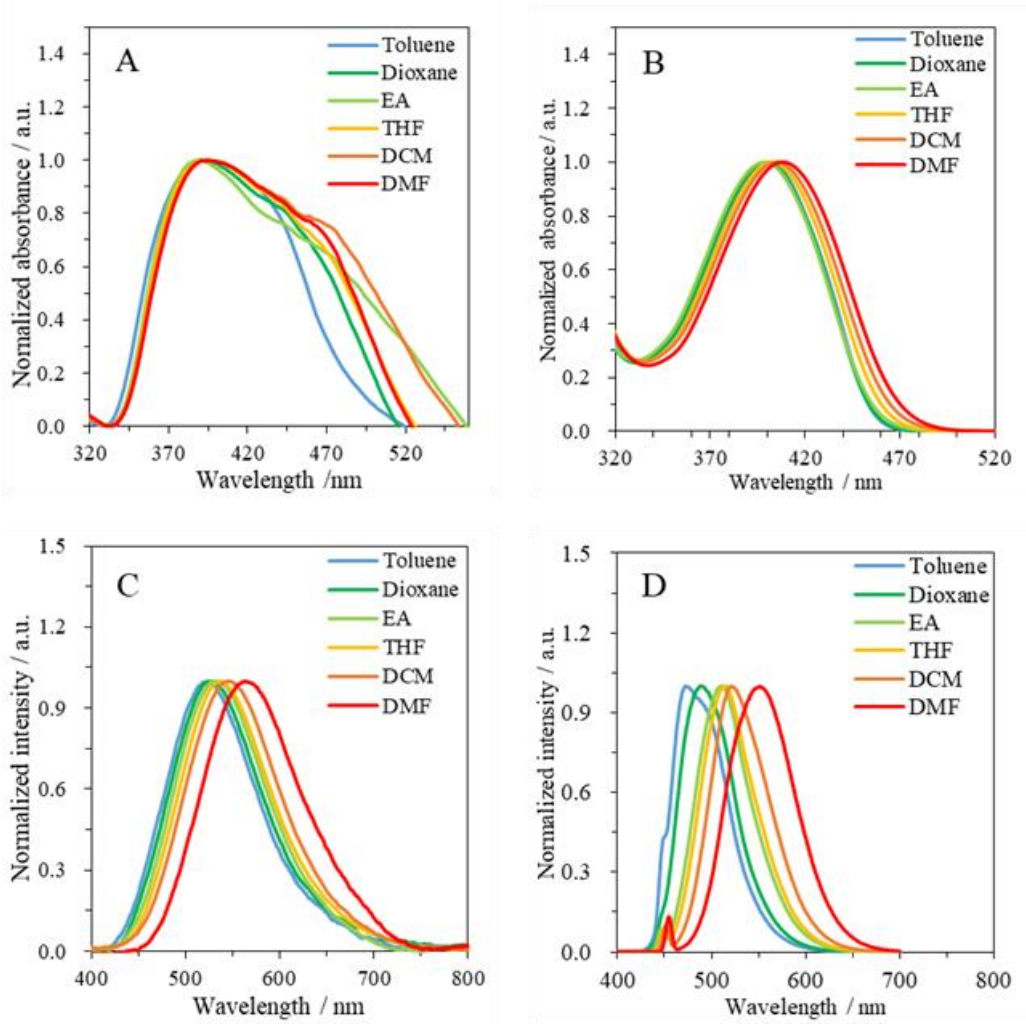


Figure 2.5. The absorption spectra of beads **6** (A), dye **7** (B), the emission spectra of beads **6** (C), and dye **7** (D) in various solvents.

Table 2.1. Photophysical properties of beads **6** and dye **7** in various solvents.

Solvent	$E_T(30)$[1] / kcal mol^{-1}	**6**				**7**				
		λ_{abs}[2] / nm	λ_{em}[3] / nm	Stokes shift / $10^3 cm^{-1}$	Φ_{fl}[4]	λ_{abs}[2] / nm	λ_{em}[3] / nm	Stokes shift / $10^3 cm^{-1}$	Φ_{fl}[4]	ε[5] / 10^4 M^{-1} cm^{-1}
Toluene	33.9	401	525	5.88	0.22	401	473	3.80	0.97	4.19
1,4-Dioxane	36.0	398	529	6.21	0.30	400	489	4.53	0.83	4.47
THF	37.4	401	533	6.20	0.38	403	516	5.42	0.97	4.19
EA[6]	38.1	394	532	6.61	0.28	399	511	5.47	0.88	4.48
DCM[7]	40.7	404	548	6.52	0.37	405	521	5.50	1.00	4.14
DMF[8]	43.2	403	565	7.12	0.36	408	551	6.36	0.91	4.20

[1] The solvent polarity parameter [29]. [2] λ_{abs} represents the absorption maximum. [3] λ_{em} represents the emission maximum. [4] Φ_{fl} represents the fluorescent quantum yield. [5] ε represents the molar extinction coefficient. [6] EA represents ethyl acetate. [7] DCM represents the dichloromethane. [8] DMF represents the *N,N*-dimethylformamide.

2.3.4. ビーズ上の基質濃度を変化した際の光物性への影響

ビーズ表面に固定された基質濃度によって合成された蛍光ソルバトクロミックビーズの光物性へどのような影響を与えるかを確認するために、原料となる4-iodobenzoic acidを異なる濃度で固定したWang resinを用意した。5.5 mgの原料と0.1 gのWang resinを反応させ0.222 mmol g^{-1}のビーズ**1**を、8.5 mgの原料と0.1 gのWang resinを反応させ0.342 mmol g^{-1}のビーズ**1**を、0.545 mmol g^{-1}のビーズ**1**は実験項にて述べた合成法と同じ比率でそれぞれ用意し、同様の合成スキームで濃度の異なるビーズ **6** を合成した。それぞれの光物性について比較を行った。乾燥時のビーズ**6** (0.222 mmol g^{-1}, 0.545 mmol g^{-1})を紫外光下で観察したところ、基質固定量の違いが明らかな蛍光色の変化として見られた(Figure 2.6, left)。また蛍光顕微鏡による各溶媒中のビーズ**6**はいずれの溶媒でも蛍光波長のレッドシフトが確認され、固定量増加に伴いソルバトクロミズムによる蛍光色変化領域も長波長化していることが目視でも確認された(Figure 2.6, right)。前項と同様に、光導波路分光装置による測定を行った結果、吸収スペクトルはいずれも同様な吸収帯を示した。加えて、ビーズ上の 4-iodobenzoic acidの固定量増加に伴い合成されたビーズ**6**の吸収スペクトルからブロードを示すことも確認された(Figure 2.7)。また、目視で確認した通り蛍光極大波長の変化領域がそれぞれの基質固定量で異なることが確認された(Figure 2.8)。そして、0.222 mmol g^{-1}と0.545 mmol g^{-1}の蛍光量子収率を比較したところ、0.545 mmol g^{-1}は0.222 mmol g^{-1}、色素**7**と比較して最も低い値を示すことが確認された(Table 2.3)。また、絶対量子収率計を用いて測定されたビーズ **6** の光量子収率の値は、基質固定量の増加に伴い減少する傾向が見られた。

これらの結果から、基質固定量によって合成された蛍光ソルバトクロミックビーズの蛍光発光特性が大きく変化することが確認され、低固定量であってもシグナルの検出に十分な蛍光発光が見られることが確認された。

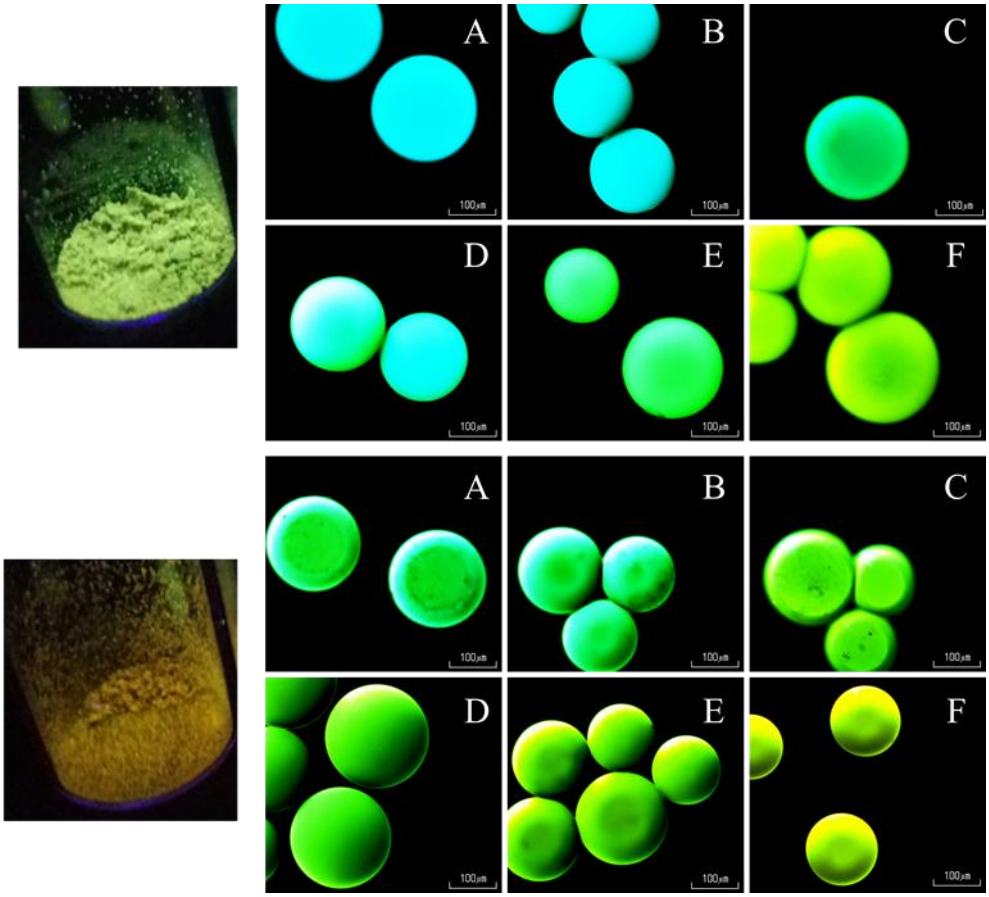


Figure 2.6. Fluorescence images of beads **6** (above: 0.222 mmol g^{-1}, below: 0.545 mmol g^{-1}) at the dry state (left) and with various solvents (right). **A**: toluene; **B**: 1,4-dioxane; **C**: ethyl acetate (EA); **D**: THF; **E**: DCM; **F**: DMF.

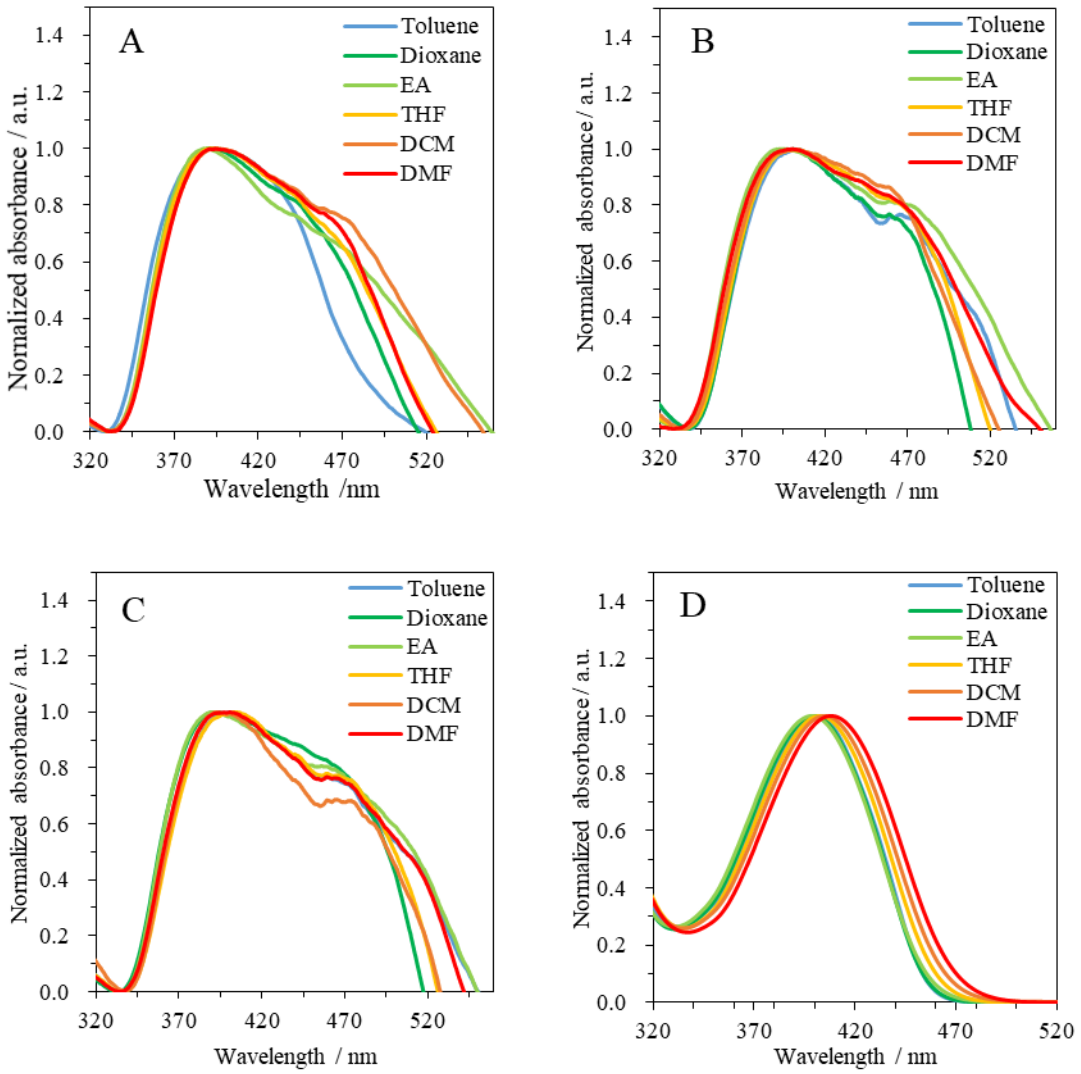


Figure 2.7. Absorption spectra of beads **6** (**A**: 0.222 mmol g^{-1}, **B**: 0.342 mmol g^{-1}, **C**: 0.545 mmol g^{-1}) and **D**: dye **7**.

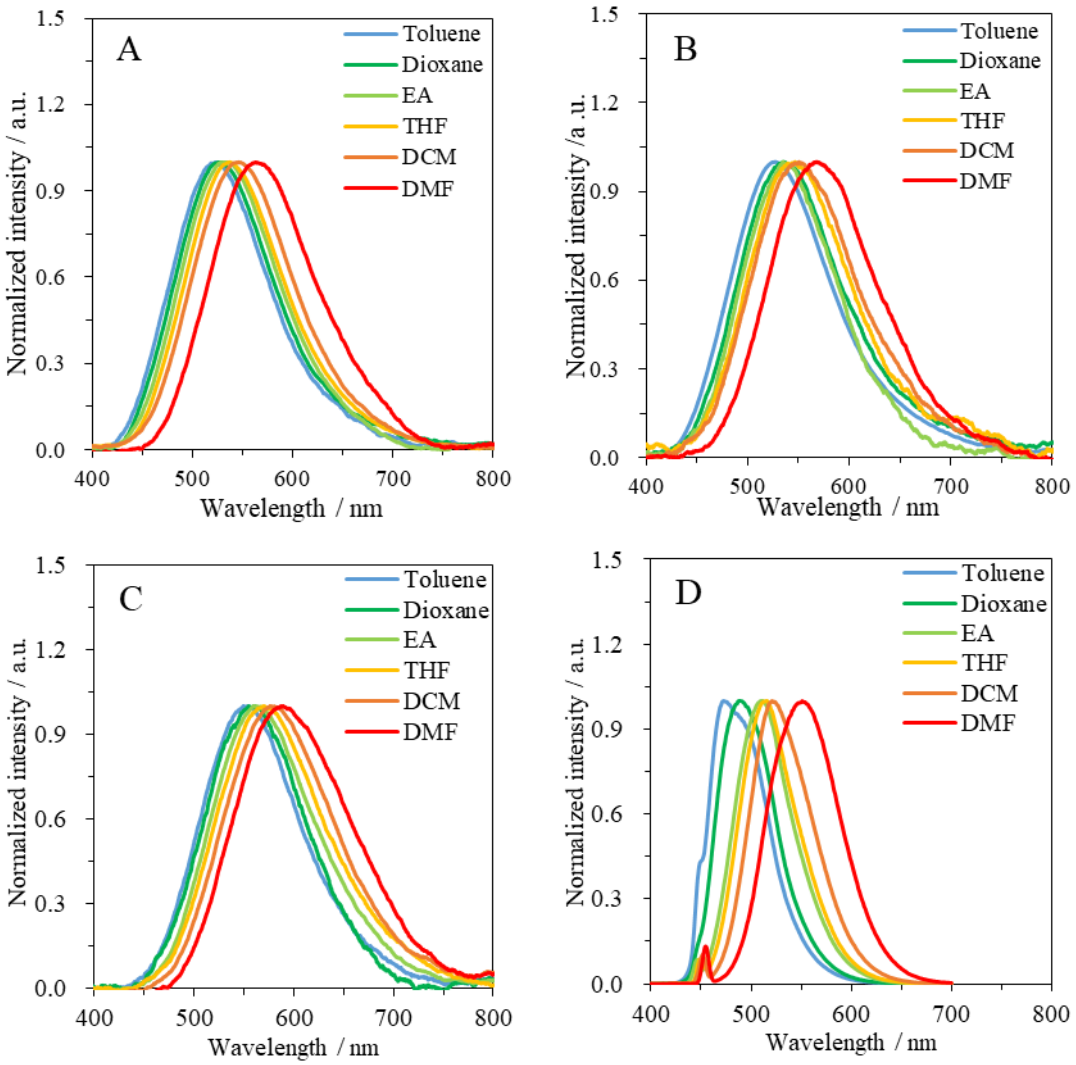


Figure 2.8. The emission spectra of beads **6** (**A**: 0.222 mmol g^{-1}, **B**: 0.342 mmol g^{-1}, **C**: 0.545 mmol g^{-1}) and **D**: dye **7**.

Table 2.2. Photophysical properties of beads **6** (0.222 mmol g^{-1}, 0.342 mmol g^{-1}, 0.545 mmol g^{-1}) in various solvents.

Solvent	$E_T(30)$[a] / kcal mol^{-1}	0.222 mmol g^{-1}			0.342 mmol g^{-1}			0.545 mmol g^{-1}		
		λ_{abs}[b] / nm	λ_{em}[c] / nm	Stokes shift / 10^3 cm^{-1}	λ_{abs}[b] / nm	λ_{em}[c] / nm	Stokes shift / 10^3 cm^{-1}	λ_{abs}[b] / nm	λ_{em}[c] / nm	Stokes shift / 10^3 cm^{-1}
Toluene	33.9	401	525	5.88	404	530	5.87	404	548	6.51
1,4-dioxane	36.0	398	529	6.21	403	531	5.99	399	550	6.88
THF	37.4	401	533	6.20	410	546	6.10	405	559	6.82
EA[d]	38.1	394	532	6.61	404	544	6.38	401	561	7.13
DCM[e]	40.7	404	548	6.52	407	552	6.48	399	568	7.44
DMF[f]	43.2	403	565	7.12	401	566	7.26	403	583	7.69

[1] The solvent polarity parameter [29]. [2] λ_{abs} represents the absorption maximum. [3] λ_{em} represents the emission maximum. [4] Φ_{fl} represents the fluorescent quantum yield. [5] ε represents the molar extinction coefficient. [6] EA represents ethyl acetate. [7] DCM represents the dichloromethane. [8] DMF represents the *N,N*-dimethylformamide.

Table 2.3. Fluorescence quantum yield of beads **6** (0.222 mmol g^{-1}, 0.545 mmol g^{-1}) and dye **7** in various solvents.

Solvent	0.222 mmol g^{-1}	0.545 mmol g^{-1}	**7**
Toluene	0.22	0.10	0.97
1,4-Dioxane	0.30	0.20	0.83
THF	0.38	0.16	0.97
EA[a]	0.28	0.08	0.88
DCM[b]	0.37	0.25	1.00
DMF[c]	0.36	0.08	0.91

[a] EA represents ethyl acetate. [b] DCM represents the dichloromethane. [c] DMF represents the *N,N*-dimethylformamide.

2.3.5. 蛍光ソルバトクロミズム性能の特性評価

これまでに、蛍光ソルバトクロミック色素が周囲の極性に対し蛍光色応答を示すことを、溶液中の色素 **7** と有機溶媒中におけるビーズ **6** のソルバトクロミズムの様子や蛍光スペクトルから議論した。蛍光ソルバトクロミックビーズのソルバトクロミズム特性を評価するために、先行研究に基づいた色素 **7** とビーズ **6** のソルバトクロミズム性能の評価及び比較を行った[16]。溶媒極性と極大蛍光波数の相関をとり、回帰直線から色素分子と溶媒分子の溶媒和効率や極性に対する感度を評価することを試みた。相関に用いる溶媒極性パラメーターには$E_T(30)$の値を用いた。$E_T(30)$値はReichardt's dyeと呼ばれるベタイン構造を有する色素を用いて種々の溶媒中での色相変化を分光測色法によって数値化した経験的なパラメーターである[29]。Figure 2.9 に示すように、$E_T(30)$と各試料の溶媒中における蛍光極大波数の相関をプロットしたところ、どの試料も溶媒極性に応じておおよそ直線的な蛍光スペクトルシフトを示していることが確認された。特に、色素 **7** の相関と比較してビーズ **6** はいずれも回帰直線の傾きがやや緩やかであるものの、色素 **7** よりも直線性があることも示された(Table

2.4)。これはビーズに色素分子が固定されていることから、色素同士の凝集を防ぎ効率的な溶媒和が促進され、結果的に溶媒極性に対して高感度に応答していると考えられる。加えて、各濃度のビーズ 6 を比較したところ、ビーズ上の基質量増加に伴い回帰直線が低波数側へシフトする傾向が見られた。この傾向からも、各有機溶媒に対する発光波長のレッドシフト及びソルバトクロミズムによる波長応答範囲が長波長化していることが認められた。

蛍光ソルバトクロミックビーズは色素溶液に劣らず周囲の極性に対して蛍光波長応答を示すことが実証された。また、これらの光物性評価から蛍光ソルバトクロミックビーズが、ビーズ表面に合成された色素分子を切り離すことなく環境応答型の蛍光センシングデバイスとして応用できる可能性が示唆された。

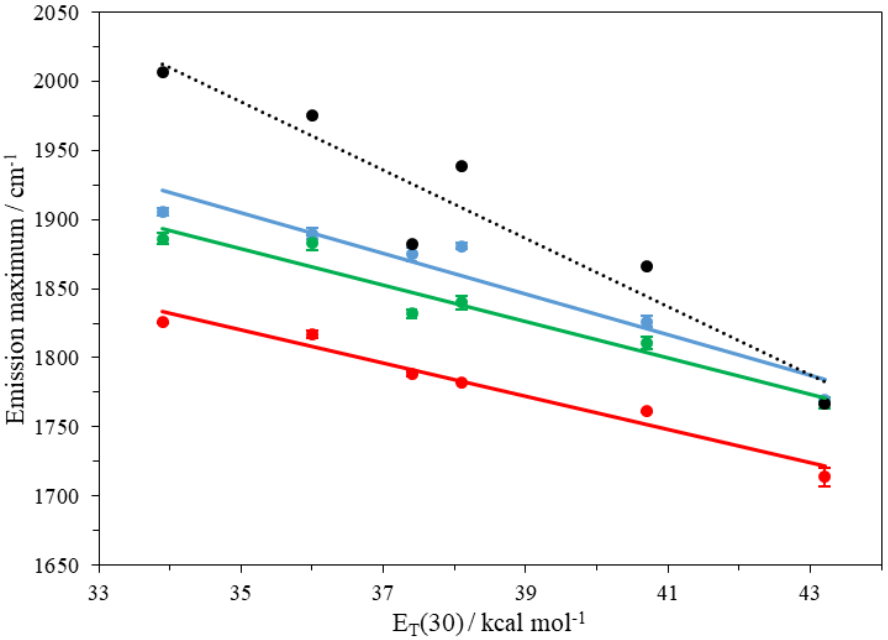


Figure 2.9. Correlation diagram of the emission maximum vs. solvent polarity parameter for beads **6** (●: 0.222 mmol g^{-1}, ●: 0.342 mmol g^{-1}, ●: 0.545 mmol g^{-1}) and dye **7**(●).

Table2.4. Correlation properties of the emission maximum vs. solvent polarity parameter for resin **6** and dye **7**.

	0.222 mmol g^{-1}	0.342 mmol g^{-1}	0.545 mmol g^{-1}	**7**
Slope	y = -14.698x + 2419.5	y = -13.115x + 2337.7	y = -11.987x + 2239.5	y = -24.755x + 2851.9
R^2	0.9253	0.9359	0.9629	0.9008

2.3.6. 二成分混合溶媒に対するレシオメトリック応答の評価

本項ではビーズ **6** が示すソルバトクロミズムの性能を詳細に評価するため、二種類の極性が異なる有機溶媒の混合溶液に対する蛍光レシオメトリック応答について検討を行った。検討に用いる有機溶媒には、前項にて測定した最も極性に差がある THF と DMF を混合した溶媒を使用した。THF に 10-90 %の比率で DMF を混合した溶媒をビーズ **6** に添加し、光導波路分光装置で測定を行った。得ら

れた蛍光スペクトルによると DMF 混合比率の上昇に伴い蛍光スペクトルがレッドシフトする様子が確認された(Figure 2.10)。よって、DMF の含有率に伴い混合溶媒の極性が上昇したことが蛍光応答から確認された。また、蛍光極大波数と DMF 混合比率はほぼ直線性のある相関がみられた(Figure 2.11)。よってビーズ 6 は、溶媒種に依存することなく、レシオメトリック応答を示すことが認められた。

本項にて示したビーズ表面における極性応答性は、抗原-抗体反応やリガンド-プロテイン反応等、生体親和性相互作用のように極性環境の変化を伴う反応をモニタリングする際に有効な性質であり、光導波路分光装置と組み合わせることで、高感度且つ迅速に測定結果を得ることが可能な蛍光センシングデバイスとして用いる事が期待される[30]。また、本章における蛍光ソルバトクロミックビーズの合成手法は、ビーズ上で機能性蛍光色素を容易に合成することが可能であり、合成に鈴木 - 宮浦クロスカップリングを用いていることから、色素に修飾されている官能基の組み換えが容易である。例えば、色素骨格にイオンを認識できる官能基を導入しているイオン応答型蛍光色素のように、既報の蛍光プローブ合成技術を応用することで、多様な測定対象に応答する新規蛍光センシング材料を開発できる基礎的な合成戦略として本合成手法は効果的で汎用性のある手法であると言える[31]。

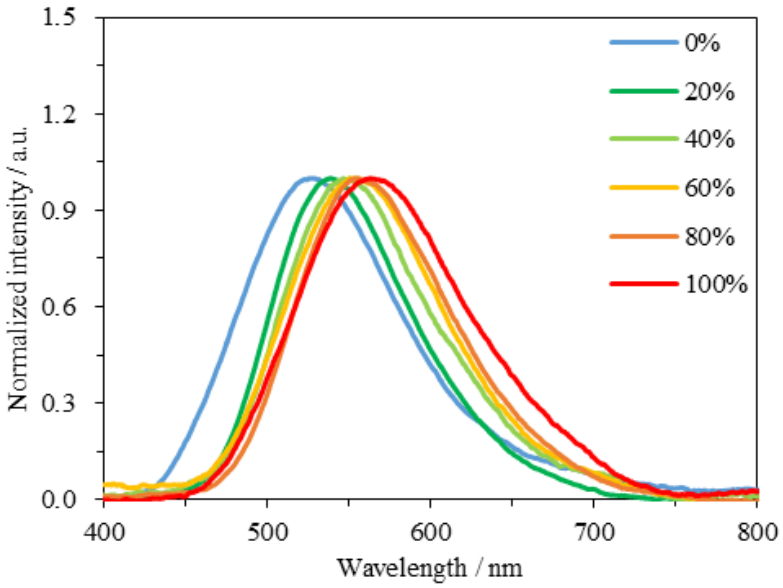


Figure 2.10. The fluorescence spectra of beads **6** in 1,4-dioxane with different concentrations of the DMF solvent mixture (Concentration of DMF: 0, 20, 40, 60, 80, and 100%).

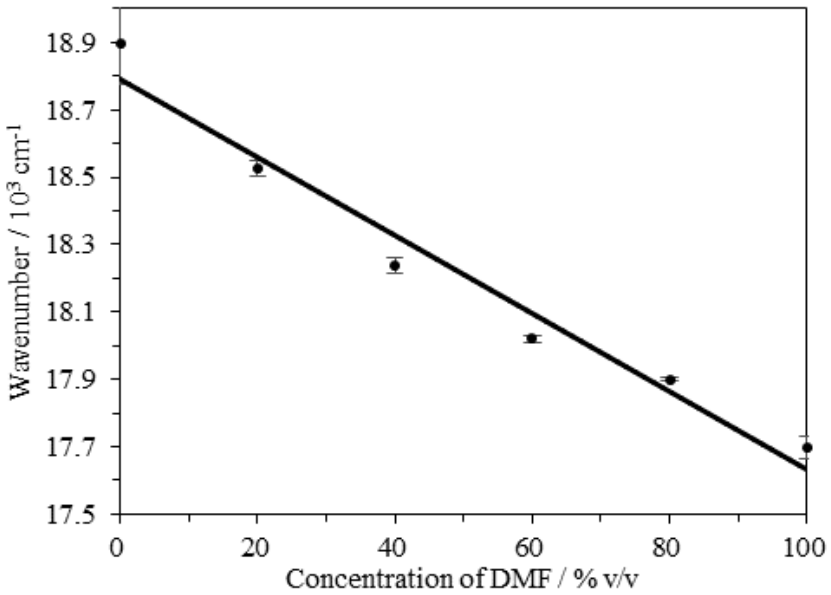


Figure 2.11. Correlation of the emission maxima of beads **6** in 1,4-dioxane with different concentrations of the DMF solvent mixture (Concentration of DMF: 0, 20, 40, 60, 80, and 100%, r^2 = 0.9671).

2.4. 総括

本章では、固相有機合成で広く用いられる鈴木 - 宮浦クロスカップリングを利用することで、表面上に蛍光ソルバトクロミック色素が合成されたビーズを得ることに成功した。そして合成されたビーズ表面に目的物が修飾されているか光導波路分光装置による光物性の評価を試みた。合成したビーズ **6** は、既報の蛍光ソルバトクロミック色素や参照化合物である色素 **7** と類似した可視光域(約 400 nm)に特徴的な吸収、浸透した有機溶媒の極性に応答した蛍光ソルバトクロミズムを示した。ビーズ **6** は色素 **7** と比較して、長波長側にレッドシフトした蛍光スペクトルを示した。さらにビーズ上の基質固定量増加に伴い合成反応後のビーズ **6** は吸収スペクトルのブロード、蛍光波長のレッドシフトが見られた。加えて、光量子収率の低下及びストークスシフトの増加も認められた為、これらの測定結果から、ビーズ上の色素分子量が光物性に影響を与える傾向が見られた。ビーズ **6** は、溶媒極性パラメーターE_T(30)と極大蛍光波長の波数に相関があることを示し、その直線性は色素 **7** の溶液よりも直線的であることから、表面の極性環境に対する高い応答性が確認された。1,4-dioxane と DMF の二種混合溶媒に対する蛍光応答を確認したところ、混合溶媒の極性が高くなっていくにつれ、ビーズ **6** の蛍光スペクトルが長波長側へシフトする様子が観察された。この蛍光スペクトルのレッドシフトは溶媒極性に対してほぼ直線的に応答することから、ビーズ **6** は色素分子がビーズに固定されていることで、溶媒種に対する選択的な溶媒和を低減し、レシオメトリック応答を示していると考えられる。

結果として、合成した蛍光ソルバトクロミックビーズは、光導波路分光装置を用いる事で高感度にビーズ表面に合成された色素化合物の光物性及び極性の変化を蛍光色応答で示す様子が測定された。

本章にて示した蛍光ソルバトクロミックビーズの合成手法は、鈴木 - 宮浦クロスカップリングを用いて任意の官能基を色素骨格に組み込むことで、分析対象に応じて容易に色素の機能性を変化させることができる蛍光センシング材料としての応用が期待される。さらに、光導波路分光装置と組み合わせることで、色素溶液では観察することが困難な極性変化が伴う反応を、ビーズから切り離さずに観察できる蛍光センシングデバイスとして応用できる可能性が示された。

References

1. Merrifield, R.B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154, doi:10.1021/ja00897a025.
2. Palomo, J.M. Solid-phase peptide synthesis: An overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. *RSC Adv.* **2014**, 4, 32658-32672, doi:10.1039/c4ra02458c.
3. Virta, P.; Katajisto, J.; Niittymäki, T.; Lönnberg, H. Solid-supported synthesis of oligomeric bioconjugates. *Tetrahedron* **2003**, 59, 5137-5174, doi:10.1016/S0040-4020(03)00704-X.
4. Lönnberg, H. Synthesis of oligonucleotides on a soluble support. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, 13, 1368-1387, doi:10.3762/bjoc.13.134.
5. Da'san Jaradat, M.M. Thirteen decades of peptide synthesis: Key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation. *Amino Acids* **2018**, 50, 39-68, doi:10.1007/s00726-017-2516-0.
6. Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483, doi:10.1021/cr00039a007.
7. Kotha, S.; Lahiri, K.; Kashinath, D. Recent applications of the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction in organic synthesis. *Tetrahedron* **2002**, 58, 9633-9695, doi:10.1016/S0040-4020(02)01188-2.
8. Maluenda, I.; Navarro, O. Recent developments in the Suzuki-Miyaura reaction: 2010-2014. *Molecules* **2015**, 20, 7528-7557, doi:10.3390/molecules20057528.
9. Frenette, R.; Friesen, R.W. Biaryl Synthesis via Suzuki Coupling on a Solid Support. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9177-9180, doi:10.1016/0040-4039(94)88458-7.
10. Fernàndez, J.C.; Solé-Feu, L.; Fernández-Forner, D.; de la Figuera, N.; Forns, P.; Albericio, F. Suzuki coupling reaction for the solid-phase preparation of 5-substituted nicotinic acid derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 581-585, doi:10.1016/j.tetlet.2004.11.153.
11. Gravel, M.; Bérubé, C.D.; Hall, D.G. Resin-to-resin Suzuki coupling of solid supported arylboronic acids. *J. Comb. Chem.* **2000**, 2, 228-231, doi:10.1021/cc990082r.
12. Solé, N.A.; Barany, G. Optimization of Solid-Phase Synthesis of [Ala8]-dynorphin A. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 5399-5403, doi:10.1021/jo00046a022.
13. Keifer, P.A.; Baltusis, L; Rice, D. M.; Tymiak, A. A.; Shoolery, J. N. A comparison of NMR spectra obtained for solid-phase-synthesis resins using conventional high-resolution, magic-angle-spinning, and high-resolution magic-angle-spinning probes. *J. Magn. Reson* 1996, 119, 65-75, doi: 10.1006/jmra.1996.0052.
14. Wagner, S.; Bell, J.; Biyikal, M.; Gawlitza, K.; Rurack, K. Integrating fluorescent molecularly imprinted polymer (MIP) sensor particles with a modular microfluidic platform for nanomolar small-molecule detection directly in aqueous samples. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, 99, 244-250, doi:10.1016/j.bios.2017.07.053.
15. Imhof, A.; Megens, M.; Engelberts, J.J.; de Lang, D.T.N.; Sprik, R.; Vos, W.L. Spectroscopy of fluorescein (FITC) dyed colloidal silica spheres. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 1408-1415, doi:10.1021/jp983241q.

16. Son, S.H.; Abe, Y.; Yuasa, M.; Yamagishi, Y.; Sakai, N.; Ayabe, T.; Yamada, K. A Systematic Analysis of Aromatic Heterocyclic Rings in Solvatochromic Fluorophores. *Chem. Lett.* **2011**, 40, 378-380, doi:10.1246/cl.2011.378.
17. Loving, G.S.; Sainlos, M.; Imperiali, B. Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores. *Trends Biotechnol.* **2010**, 28, 73-83, doi:10.1016/j.tibtech.2009.11.002.
18. Klymchenko, A.S. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Acc. Chem. Res.* **2017**, 50, 366-375, doi:10.1021/acs.accounts.6b00517.
19. Guiles, J.W.; Johnson, S.G.; Murray, W.V. Solid-Phase Suzuki Coupling for C-C Bond Formation. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 5169-5171, doi:10.1021/jo9604301.
20. Salives, R.; Dupas, G.; Plé, N.; Quéguiner, G.; Turck, A.; George, P.; Sevrin, M.; Frost, J.; Almario, A.; Li, A. Solid-phase syntheses of 6-arylpyridazin-3(2H)-ones. *ACS Comb. Sci.* **2005**, 7, 414-420, doi:10.1021/cc049845n.
21. Martinez-Amezaga, M.; Delpiccolo, C.M.L.; Mata, E.G. Immobilized boronic acid for Suzuki-Miyaura coupling: Application to the generation of pharmacologically relevant molecules. *RSC Adv.* **2017**, 7, 34994-35003, doi:10.1039/c7ra06662g.
22. Santini, R.; Griffith, M.C.; Qi, M. A measure of solvent effects on swelling of resins for solid phase organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8951-8954, doi:10.1016/S0040-4039(98)02069-3.
23. Ohno, H.; Yoneyama, S.; Nakamura, F.; Fukuda, K.; Hara, M.; Shimomura, M. Optical Waveguide Spectrometry of Acridine Orange in Monolayer and Langmuir-Blodgett Film. *Langmuir* **2002**, 18, 1661-1665, doi:10.1021/la0112864.
24. Akune, Y.; Hirosawa, R.; Endo, N.; Hatano, S.; Hosokai, T.; Sato, H.; Matsumoto, S. Tuning of fluorescence efficiency via local modification of the crystal structure by benzyl groups in polymorphs of a pyrazine dye. *CrystEngComm* **2017**, 19, 1947-1952, doi:10.1039/c7ce00164a.
25. Lee, J.Y.; Aoyama, T.; Uchiyama, M.; Matsumoto, S. Synthesis and properties of liquid pyrazine dyes. *Dyes Pigm.* **2020**, 174, 108030, doi:10.1016/j.dyepig.2019.108030.
26. Chen, P.Z.; Zhang, H.; Niu, L.Y.; Zhang, Y.; Chen, Y.Z.; Fu, H.B.; Yang, Q.Z. A Solid-State Fluorescent Material Based on Carbazole-Containing Difluoroboron β-Diketonate: Multiple Chromisms, the Self-Assembly Behavior, and Optical Waveguides. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, 27, 1-10, doi:10.1002/adfm.201700332.
27. Liu, L.; Zhou, X.; Wilkinson, J.S.; Hua, P.; Song, B.; Shi, H. Integrated optical waveguide-based fluorescent immunosensor for fast and sensitive detection of microcystin-LR in lakes: Optimization and Analysis. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 1-9, doi:10.1038/s41598-017-03939-8.
28. Abudukeremu, H.; Kari, N.; Zhang, Y.; Wang, J.; Nizamidin, P.; Abliz, S.; Yimit, A. Highly sensitive free-base-porphyrin-based thin-film optical waveguide sensor for detection of low concentration NO_2 gas at ambient temperature. *J. Mater. Sci.* **2018**, 53, 10822-10834, doi:10.1007/s10853-018-2374-5.
29. Reichardt, C. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chem. Rev.* **1994**, 94, 2319-2358, doi:10.1021/cr00032a005.

30. Benito-Peña, E.; Valdés, M.G.; Glahn-Martínez, B.; Moreno-Bondi, M.C. Fluorescence based fiber optic and planar waveguide biosensors. A review. *Anal. Chim. Acta.* **2016**, 943, 17-40, doi:10.1016/j.aca.2016.08.049.
31. Liu, Z.; He, W.; Guo, Z. Metal coordination in photoluminescent sensing. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 1568-1600, doi:10.1039/c2cs35363f.

第三章 アビジン-ビオチン相互作用を追跡する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モニタリング技術の確立

3.1. 背景

生体分子認識として知られるアビジン-ビオチン相互作用は、高い親和性（K_a ～10^5 M^{-1}）による特異的な結合を形成することが知られている[1]。さらにアビジンとビオチンの結合は非共有結合であるにもかかわらず不可逆的に強固な結合を形成することや、アビジン-ビオチン複合体に結合した生体物質はその性質を損なわないなどの特徴から、タンパク質の標識化、抗原抗体イムノアッセイ、アフィニティークロマトグラフィー、など多様なバイオセンシングやアフィニティー精製を用いる生物学の分野において非常に有用な相互作用であることが知られている[2-4]。さらに、バイオセンシングデバイスの研究においてアビジン-ビオチン相互作用は、電極、金薄膜、リン脂質分子膜などのビオチンが修飾された固相への生体物質の固定化としても用いられる有用なツールであることが知られている[5-7]。これまでに、アビジン-ビオチン相互作用をモニタリングする手法として、表面をビオチンで修飾した電極を用いることで、蛍光標識化したアビジンとの生体分子認識を光学的に検出したバイオセンシングデバイスの報告例が存在する[8]。このように蛍光分光法を利用するセンシングシステムは、高感度で応答が迅速であることから、生物学的プロセスの有用なモニタリング手法として知られている。特に有機色素化合物を用いる蛍光光度法は分析物に対する応答が非常に早く、高感度で非破壊的な分析手法であることから、生体内物質の標識化や生体物質の動態を追跡することに有用な分析手法である[9,11]。しかし、既報の手法では蛍光検出の為に分析対象であるアビジンを蛍光色素で標識化し精製する必要がある為、測定作業は煩雑になりやすい。そこで、より簡便に生体分子認識を識別し分析することが可能なラベルフリーなバイオセンシングデバイスの開発が望まれる。

前章にて示したように、我々が開発した蛍光ソルバトクロミックビーズは、周囲の極性環境に応答した蛍光色応答を示す蛍光性高分子材料である[12]。この蛍光ソルバトクロミックビーズに担持されている蛍光ソルバトクロミック色素誘導体は、タンパク質の構造変化等、極性及び周囲の環境変化を伴う生物学プロセスを分析することができる強力なツールとして生物分野に広く用いられている[13,14]。その上、蛍光ソルバトクロミックビーズの合成手法は、生体物質に親和性を示す官能基を導入することが容易であり、尚且つビーズ表面にてアビジン-ビオチン相互作用の過程を蛍光色応答からレシオメトリックに追跡することが可能なセンサー材料であると推察した。

本章では、ビオチンを修飾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組み合わせたアビジン-ビオチン相互作用を追跡する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の構築を検討した。ビーズの光物性測定には、前章と同様に光導波路分光装置を用いた。光導波路分光装置は、蛍光光度計の様に測定波長を移動させず迅速に可視光領域のフルスペクトル測定が可能なことから、生体物質相互作用の経時変化測定に多用されており、アビジン-ビオチン相互作用を経時変化で測定することが可能であると考えた[15-19]。

ビオチン化蛍光ソルバトクロミックビーズの合成において、前章にて報告した蛍光ソルバトクロミックビーズは、電子供与基にアルキル鎖が修飾された構造であることから、分析対象であるアビジンとの相互作用は示さないと考えら

れる。よって、アビジン-ビオチン相互作用を追跡する為には、ビオチンをビーズ表面の色素部位へ修飾する必要がある。しかし、電子供与基となるアミノフェニル基に直接ビオチンを縮合させてしまうと、カルボアミド形成による C=O 結合に由来する電子求引基によって電子供与性が低下し、ソルバトクロミズムの性能が低くなる。そこで我々は、鈴木-宮浦クロスカップリングを用いることで、ピペラジン骨格を有する電子供与性部位を色素部位に導入し、ビオチンが修飾する為のリンカーとして用いる事を計画した(Figure 3.1)。本章では、合成したビオチン化蛍光ソルバトクロミックビーズとアビジン類の相互作用に伴う光物性変化を光導波路分光装置による測定で分析し、生体分子認識をレシオメトリックに追跡することが可能な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結果を示す。

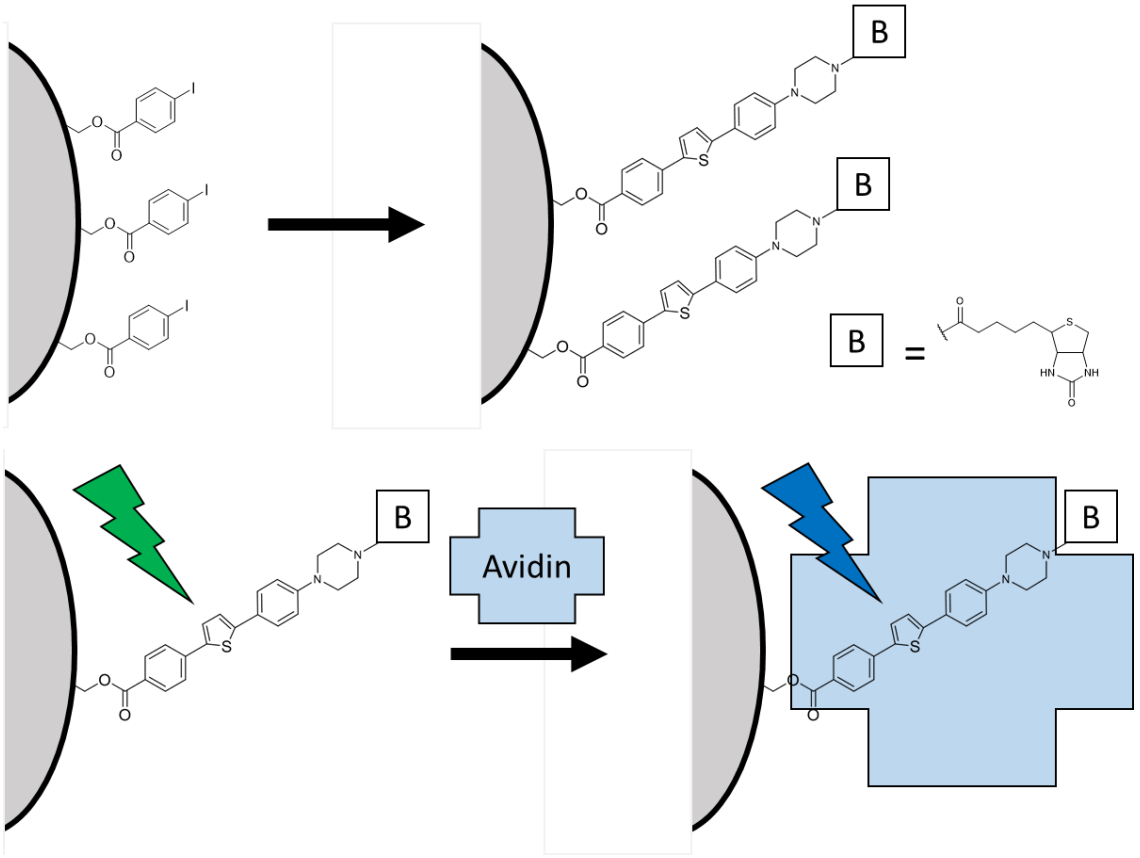


Figure 3.1. Determination strategy of avidin-biotin interaction.

3.2. 実験

3.2.1. 実験試薬・化合物同定に用いた機器

市販の溶媒・化合物は全て試薬グレードを使用した。多くの実験試薬は富士フィルム和光純薬株式会社(大阪府大阪市)から購入した。いくつかの実験試薬に関しては下記の通りである。Wang resin (渡辺化学工業株式会社、広島県広島市) *N*-methyliminodiacetic acid、bis(pinacolato)diboron(東京化成工業株式会社、東京都)、 2-dicyclohexylphosphino-2',6'-dimethoxybiphenyl (SPhos)、*N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (DMAP) (Sigma-Aldrich Japan Co., LLC、 Tokyo, Japan)、5-bromothiophene-2-boronic acid(Combi-Blocks Inc., San Diego, CA, USA).

合成反応は薄層クロマトグラフィー$60F_{254}$ (layer thickness, 0.25 mm; E. Merck, Darmstadt, Germany)によって反応の進行を確認した。目的化合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製した。精製に使用したシリカゲルはWakosil® C-300 (0.04-0.06 mm,富士フィルム和光純薬株式会社)を用いた。目的化合物の同定は日本電子株式会社(東京都)製の400MHz核磁気共鳴装置(JNM-EX400)を用いた。核磁気共鳴(NMR)スペクトルを測定する為に以下の重溶媒を用いた。リファレンスとしてトリメチルシラン(TMS)が含まれる$CDCl_3$と$DMSO\text{-}d_6$を用いた。また、目的化合物の同定にはエレクトロスプレーイオン化法(ESI)を用いた質量分析装置(Thermo Scientific Exactive spectrometer, Thermo Fisher Scientific、Waltham, MA, USA)による精密質量スペクトルの測定も実施した。

3.2.2. 蛍光スペクトル測定装置・測定条件

全てのスペクトル測定は、富士フィルム和光純薬工業株式会社から販売されているスペクトルグレードの溶媒を用いた。合成した蛍光ソルバトクロミックビーズの吸収・蛍光スペクトル測定は光導波路分光装置(PLT-5000SLC, システム・インスツルメンツ株式会社、東京都)を用いた。光源は150WXeランプを測定に用いた。光導波路分光装置による測定には両端が光学研磨された高屈折率ガラス導波路(65 × 20 mm、厚み 400 μm、屈折率 1.81) を使用した。光導波路分光装置による測定条件は、入射光の法線角を63.8°に検出角は59.4°で設定し測定した。色素溶液の蛍光スペクトルの測定にはF-4500(日立ハイテクサイエンス、東京都)をそれぞれ用いた。蛍光スペクトル測定用の色素溶液は3 μmol L^{-1}の濃度でそれぞれ調製し、測定用の試料とした。1 × 1 cmのクオーツセルを使用し、Xeアークランプを光源として、スリット幅は5 nmで測定した。

3.2.3. アビジン-ビオチン相互作用の測定

アビジン-ビオチン相互作用を測定するために、卵白由来中性アビジン(neutravidin,60.0 kDa)とウシ血清アルブミン(BSA, 66.5 kDa)を富士フィルム和光純薬工業株式会社から購入した。糖鎖が処理されていないアビジン(67.0 kDa)はナカライテスク株式会社(京都府京都市)から購入した。実験に用いるリン酸バッファー(PBS)は研究室で調製したものを使用した。PBSはSunらの報告を参考に同様の組成で調製した[20]。PBS (pH7.5): 100 mM NaCl, 50 mM

NaH_2SO_4, 1mM EDTA

溶液中における、切り出した色素 **10** とアビジンの相互作用の測定には、Sun らの手法を参考に、色素 **10** を DMSO に溶解させ 3 μM に調製したストック溶液と 1.5 μM の中性アビジン PBS 溶液を用いて測定を行った。

測定に用いたビーズは前章の手法を基に、基質固定量を 0.0309 mmol g^{-1} に調製したビーズから、同様の方法でビオチン化蛍光ソルバトクロミックビーズを合成したものを使用した。測定ごとに高屈折率ガラス導波路上へビーズを約 1 mg 乗せ、マイクロメーターでビーズを固定した後、10 μL の DMF でビーズを浸潤させた。浸潤したビーズに試料の溶解した 60 μL の PBS 溶液を添加し、蛍光スペクトル測定を行った。

経時変化測定は、光導波路分光装置を制御するソフトウェアの設定により、約 30 分間で 10 秒毎に可視領域のフルスペクトル及び試料添加後の極大蛍光波長の蛍光強度を記録するように設定した。

3.2.4. ビオチン化蛍光ソルバトクロミックビーズの合成

・電子供与性部位中間体(3)の合成

3.2.4.1. 4-phenylpiperazine-1-carboxylic acid tert-butyl ester の合成 (1)

100 mL ナスフラスコに di-tert-butyl dicarbonate (3.77 g, 17.3 mmol)、DMAP (0.46 g, 3.77 mmol)を加え、DCM 42 mL に溶解させた。1-phenylpiperazine (2 g, 12.3 mmol) と triethylamine (TEA, 2.5 mL, 17.9 mmol)をそれぞれ反応溶液へ滴下し、窒素雰囲気下で 2 時間、室温で撹拌した。反応溶液に H_2O 40 mL を加え、chloroform (15 mL×3)で抽出した。回収した油層は硫酸ナトリウムで脱水し、エバポレーターで濃縮した。粗精製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(10% ethyl acetate in hexane)で精製し、白色結晶 **1**(3.21 g, 99.1%)を得た。^{1}H NMR (400 MHz,$CDCl_3$) δ (ppm) 7.29 (m,2H), 6.93 (m, 3H), 3.59 (t,4H,J = 5.1 Hz), 3.14 (t,4H, J = 5.1 Hz), 1.49 (s, 9H); ESI-HRMS (m/z) $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_{23}N_2O_2$: 263.17540 ; found: 263.17538.

3.2.4.2. 4-(4-bromophenyl)-piperazine-1-carboxylic acid tert-butyl ester の合成 (2)

100 mL ナスフラスコに化合物 **1** (3g, 11.4 mmol)と DMF 10 mL を加え、その混合溶液に *N*-bromosuccinimide (NBS, 2.10 g, 11.8 mmol)の DMF 10 mL 溶液を 15 分以上かけて滴下した。混合溶液を遮光し、室温で 24 時間撹拌した。その後反応溶液に H_2O 30 mL を加え chloroform (15 mL×3)で抽出した。その後、油層を sat. aq. $NaHCO_3$ (30 mL)、sat. aq. NaCl (30 mL)で洗浄し、回収した油層を硫酸ナトリウムで脱水、エバポレーターで濃縮した。粗精製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(10% ethyl acetate in hexane)で精製し、白色結晶 **2**(3.28 g, 84.0%)を得た。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.35 (dd, 2H, J = 7.0, 2.3 Hz), 6.79 (dd, 2H, J = 7.0, 2.3 Hz), 3.57 (t, 4H, J = 5.1 Hz), 3.10 (t, J = 5.1 Hz, 4H), 1.48 (s, 9H); ESI-HRMS (m/z) $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_{22}BrN_2O_2$: 341.08592 ; found: 341.08586.

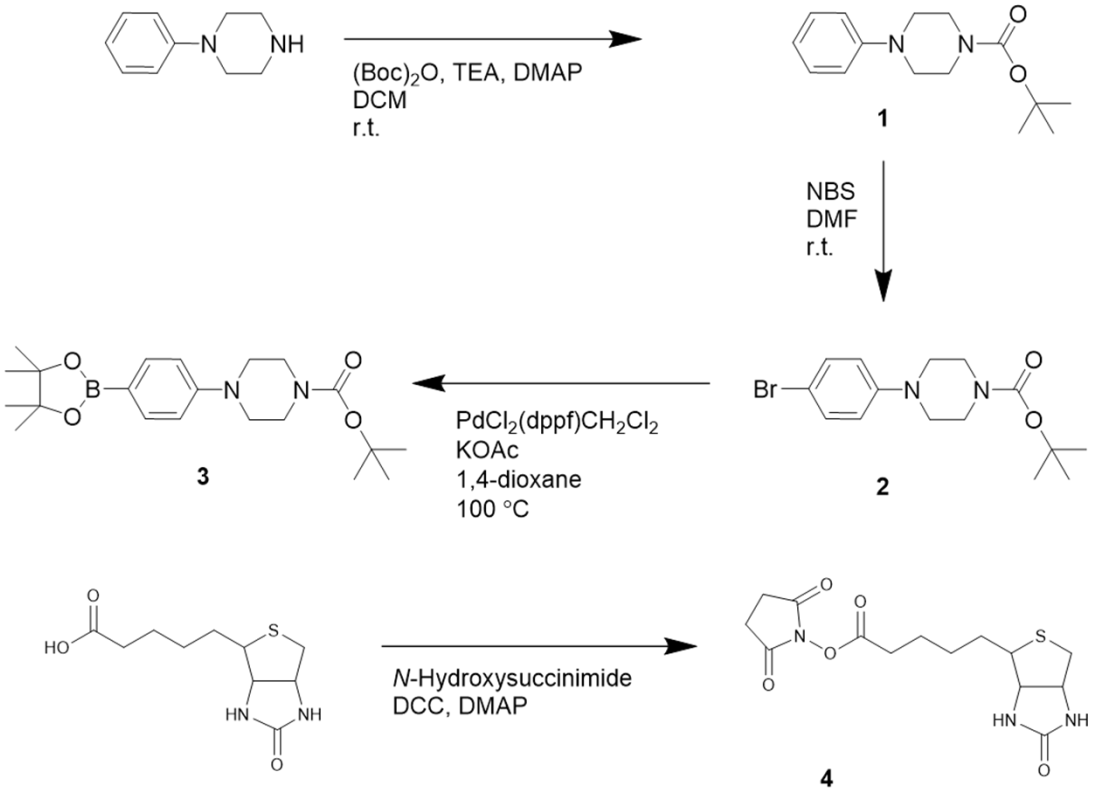
3.2.4.3. 4-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)-piperazine-1-carboxylic acid tert-butyl ester の合成 (3)

100 mL ナスフラスコに化合物 **2** (0.998 g, 2.92 mmol)、 KOAc (0.345 g, 3.52 mmol)、 $PdCl_2(dppf)CH_2Cl_2$ (0.0480 g, 0.0588 mmol)を加え、1,4-dioxane 30 mL に溶解させた。窒素雰囲気下で 5 分間 100℃にて加熱し、その後反応溶液に bis(pinacolato)diboron (1.11 g, 4.37 mmol)を加え、100℃に加熱し一晩撹拌した。反応溶液を H_2O 30 mL に加え、ethyl acetate (15 mL×3)で抽出した。油層を sat. aq. NaCl (40 mL × 2)で洗浄し、硫酸ナトリウムで脱水した。粗精製物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー(10% ethyl acetate in hexane)で精製し、白色結晶 **3** (0.981 g, 86.4%)を得た。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.72 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 6.89 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 3.57 (t, 4H, J = 5.2 Hz), 3.22 (t, 4H, J = 5.1 Hz), 1.48 (s, 9H), 1.33 (s, 12H); ESI-HRMS (m/z) $[M+H]^+$ calcd for $C_{21}H_{34}{}^{10}BN_2O_4$: 388.26425 ; found: 388.26430.

・ビオチン中間体(4)の合成

3.2.4.4. biotinyl-*N*-hydroxysuccinimide の合成 (**4**)

100 mL ナスフラスコに d-biotin (0.257 g, 1.05 mmol)、*N*-hydroxysuccinimide (0.5 g, 4.34 mmol)を加え、熱 DMF 15 mL に溶解させた。その後、混合溶液に *N*,*N*-dicyclohexylcarbodiimide (0.600 g, 2.90 mmol)を加えて室温で一晩撹拌した。反応後の溶液に析出したジシクロヘキシル尿素はセライトろ過で除去した。反応溶液をエバポレーターで濃縮し、diethyl ether を加え白色固体を析出させた。析出した固体を吸引ろ過によって回収し、diethyl ester と methanol で洗浄、回収した固体を真空乾燥し、白色固体 4 (0.241 g, 61.6%)を得た。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 6.43 (brs, 1H), 6.37 (brs, 1H), 4.31 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.11 (m, 1H), 2.76-2.87 (m, 5H), 2.58 (m, 1H), 2.50 (m, 2H), 1.42-1.67 (m, 6H); ESI-HRMS (m/z) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{14}H_{19}N_3NaO_5S$: 364.09376 ; found: 364.09359.



Scheme 3.1. Synthetic scheme of electron-donating intermediates **1-4**.

・ビオチン化蛍光ソルバトクロミックビーズ(9)及び色素(10)の合成

3.2.4.5. Loading of 4-iodobenzoic acid to Wang resin (**5**)

50 mL ナスフラスコに 1.00 g の Wang resin (0.850 mmol g^{-1}, 0.850 mmol) と DMF 15 mL を加え、ビーズを浸潤させた。反応溶液に 4-iodobenzoic acid (0.636 g, 2.56 mmol)、 *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (0.582 g, 2.82 mmol) を加え、少量の DMF に溶かした DMAP (0.0520 g, 0.426 mmol)を混合溶液に滴下した。混合溶媒を 60 ℃で 24 時間撹拌した。ビーズをろ過で回収し、DCM, THF, DMF, methanol でそれぞれ３回洗浄した。 10% TFA / DCM を用いた開裂反応によって、0.395 mmol g^{-1} の基質が固定されていることが確認された。

3.2.4.6. ビーズ **6** の合成 (**6**)

15 mL スクリューバイアルにビーズ **5** (0.757 g)と DMF 6 mL を加え、ビーズを浸潤させた。反応溶液に 2-thiophene boronic acid (0.165 g, 1.29 mmol)、K_2CO_3 (0.222 g, 2.09 mmol)、$Pd_2(dba)_3$ (0.0350 g, 0.0382 mmol)を加え、窒素ガス雰囲気下で撹拌機を用いて 250 RPM、30 ℃で 18 時間振盪した。反応後のビーズをろ過で回収し、H_2O, DCM, DMF, THF, methanol でそれぞれ 3 度洗浄した。目的のビーズ **6** を 0.754 g 回収した。

3.2.4.7. ビーズ **7** の合成 (**7**)

15 mL ナスフラスコにビーズ **6** (0.754 g)と THF 32 mL を加えビーズを浸潤させた。混合溶液を 0℃に冷却し、NBS (0.106 g, 0.595 mmol)と H_2O 0.64 mL を加え、窒素ガス雰囲気下で室温に戻し 18 時間撹拌した。その後、ビーズをろ過で回収し、H_2O, DCM, DMF, THF, methanol でそれぞれ 3 度洗浄した。目的のビーズ **7** を 0.550 g 回収した。

3.2.4.8. ビーズ **8** の合成 (**8**)

30 mL ナスフラスコにビーズ **7** (0.550 g)と 1,2-dimethoxyethane 7.5 mL を加え、ビーズを浸潤させた。混合溶媒に化合物 **3** (0.447 g, 1.15 mmol)、2M Na_2CO_3 1 mL、 $Pd(PPh_3)_4$ (0.0220 g, 0.0190 mmol)を加え、窒素ガス雰囲気下で 85 ℃に加熱し、19 時間撹拌した。その後、ビーズをろ過で回収し、H_2O, DCM, DMF, THF, methanol でそれぞれ 3 度洗浄した。目的のビーズ **8** を 0.571 g 回収した。

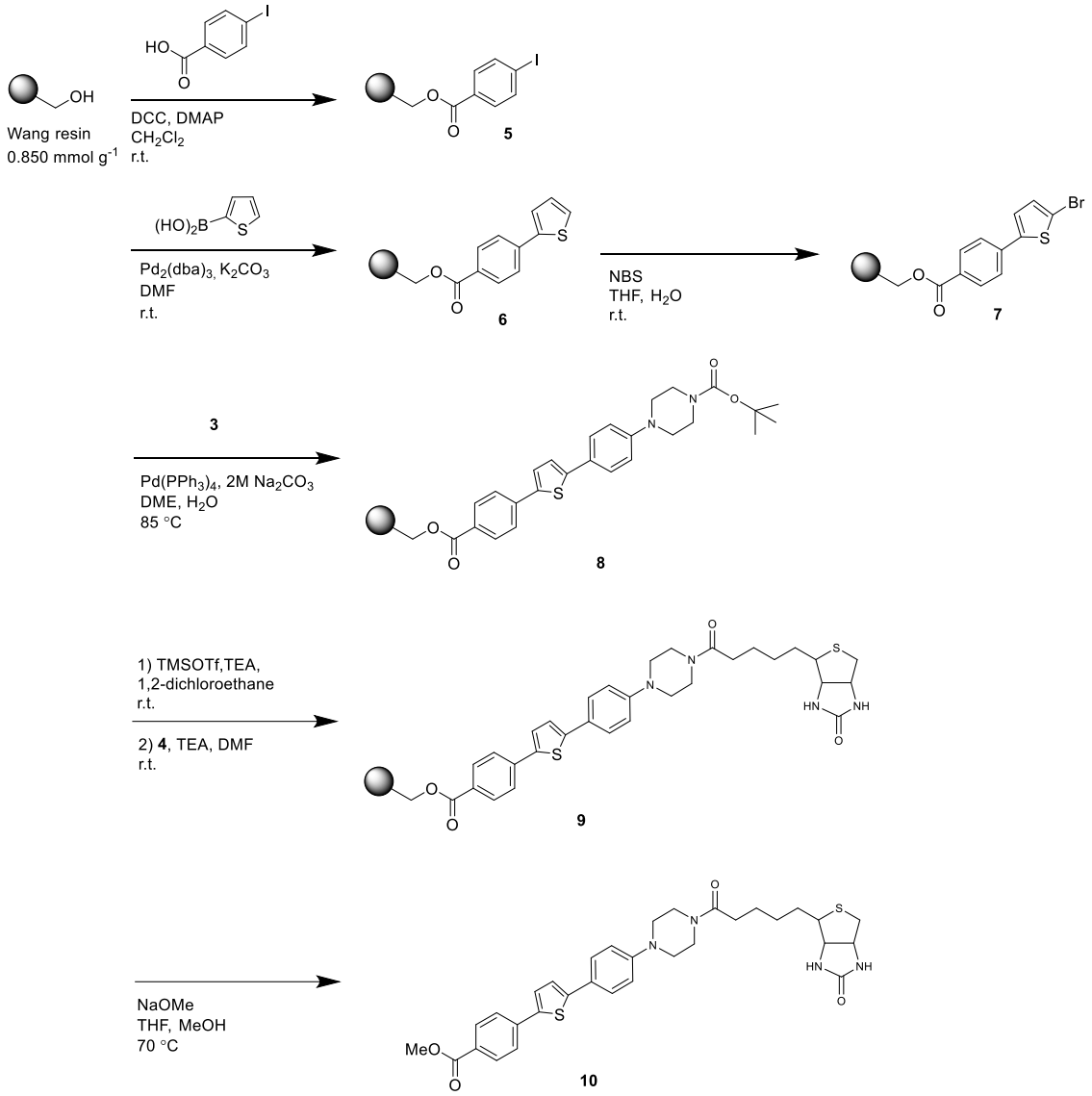
3.2.4.9. ビーズ **9** の合成 (**9**)

15 mL スクリューバイアルにビーズ **8** (0.200 g)と少量の 1,2-dichloroethane を加え、ビーズを浸潤させた. 浸潤したビーズに trimethylsilyl triflate (0.120 mL)、triethylamine (0.050 mL)、1,2-dichloroethane 3 mL を混合した溶液を加え、混合溶液を 5 分間振盪した。その後、ビーズをろ過で回収し、10% *N,N*-diisopropylethylamine-DCM, H_2O, DCM, DMF, THF, methanol でそれぞれ 3 度洗浄した。回収したビーズを 15 mL スクリューバイアルに移し、一晩真空乾燥した。乾燥したビーズに DMF 5 mL を加えビーズを浸潤させた。混合溶液に化

合物 **4** (0.164 g, 0.481 mmol)と triethylamine 0.07 mL を加え、振盪機で一晩振盪した。ビーズをろ過で回収し、H_2O, DCM, DMF, THF, methanol でそれぞれ 3 度洗浄した。目的のビーズ **9** を 0.200 g 回収した。

3.2.4.10. ビオチン化蛍光ソルバトクロミック色素 **10** の合成 (**10**)

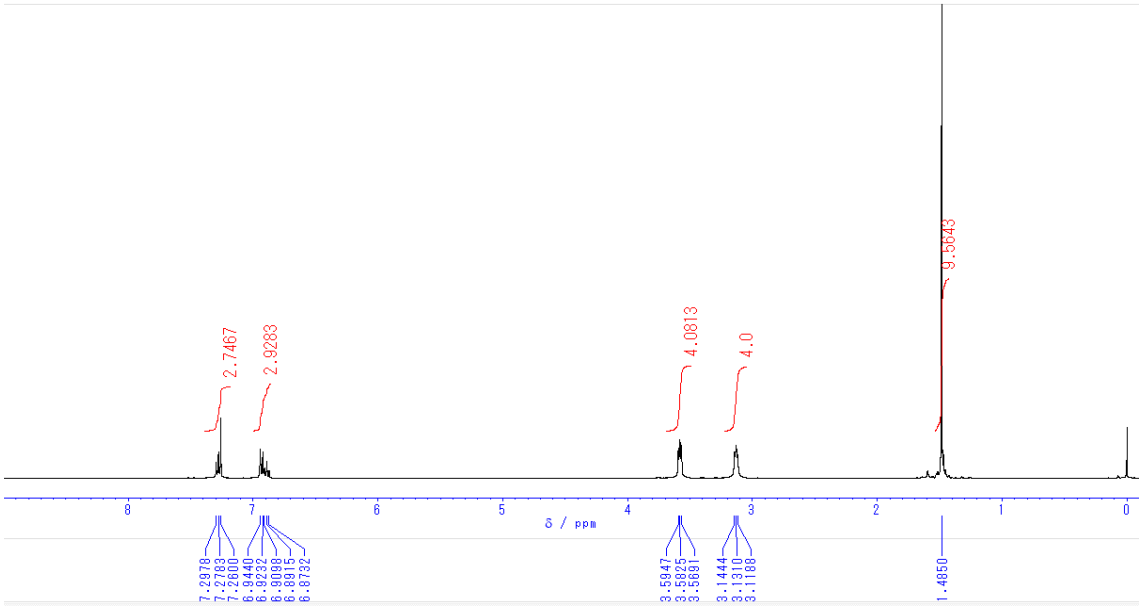
15 mL ナスフラスコにビーズ **9** (0.200 g)を分取し、THF 10.0 mL、methanol 2.40 mL の混合溶媒でビーズを浸潤させた。その後、NaOMe (0.0300 g, 0.555 mmol)を加え、窒素雰囲気下で一晩還流した。その後、反応溶液から吸引ろ過によってビーズを除去し、DCM、THF、methanol でビーズを洗浄した。ろ液をエバポレーターで濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(5% methanol in DCM)で精製、目的物の黄色固体 **10** (6.40 mg, 13.4%)を得た。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 7.57 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 7.43 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.03 (q, 2H, J = 8.8 Hz, 18.5 Hz), 6.43 (brs, 1H), 6.35 (brs, 1H), 4.29 (m, 1H, J = 8.8 Hz), 4.13 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.59 (brs, 4H), 3.21 (m, 4H), 3.11 (m, 1H), 2.81 (m, 1H), 2.57 (m, 1H), 2.35 (t, 2H, J = 7.38 Hz) , 1.36-1.69 (m, 6H); ESI-HRMS (m/z) $[M+Na]^+$ calcd for $C_{32}H_{36}N_4NaO_4S_2$: 627.20702 ; found: 627.20760.



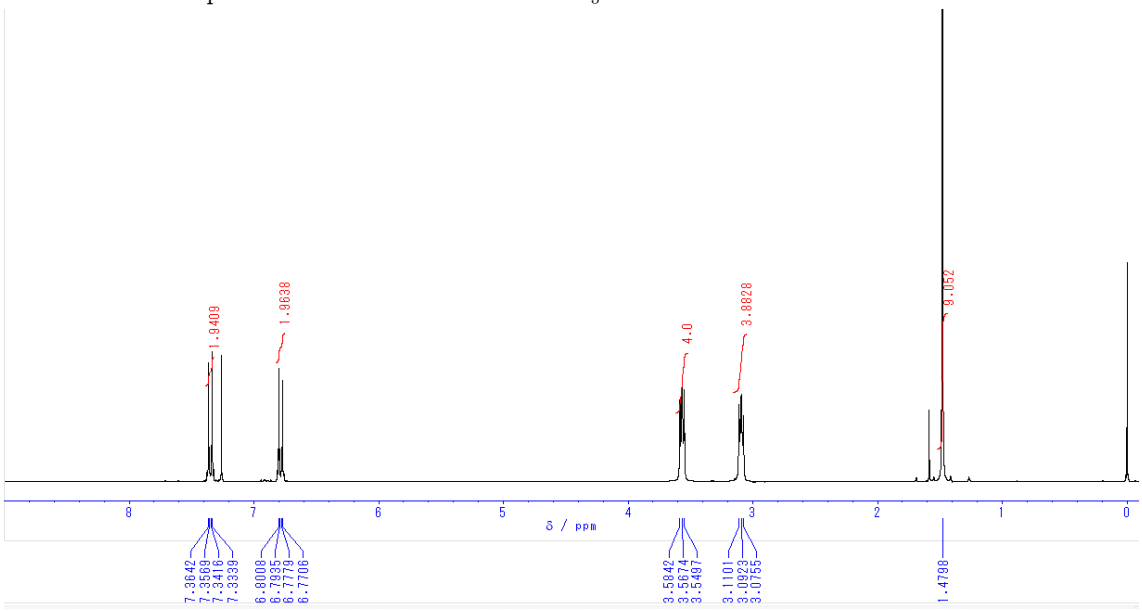
Scheme 3.3. Synthesis of biotinylated fluorescent solvatochromic resin **9** and dye **10**.

3.2.5. ^{1}H NMR スペクトル

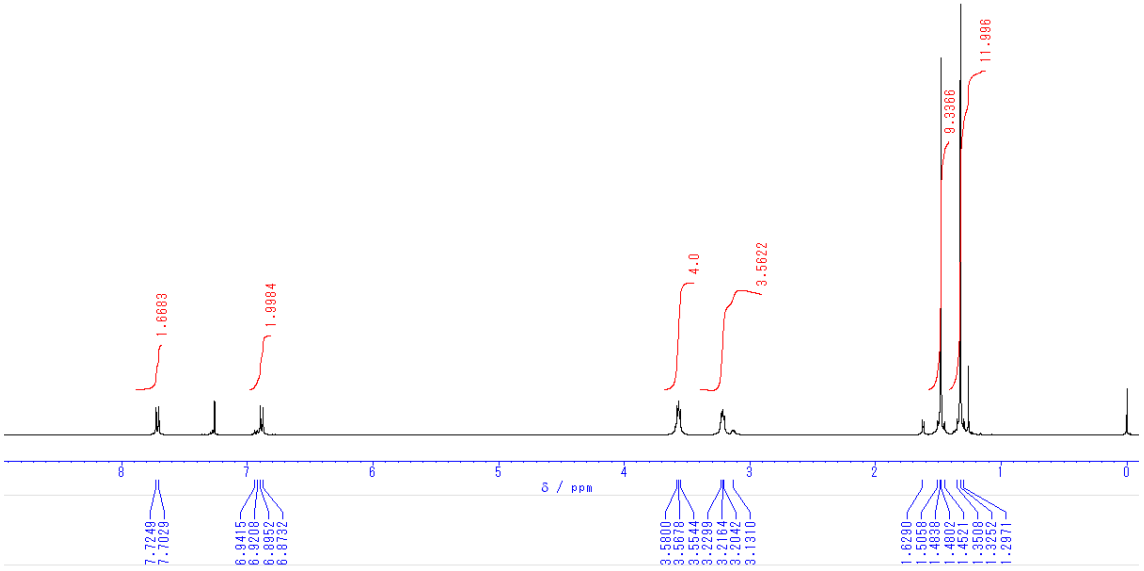
^{1}H NMR of compound **1** measured in $CDCl_3$ at 400 MHz



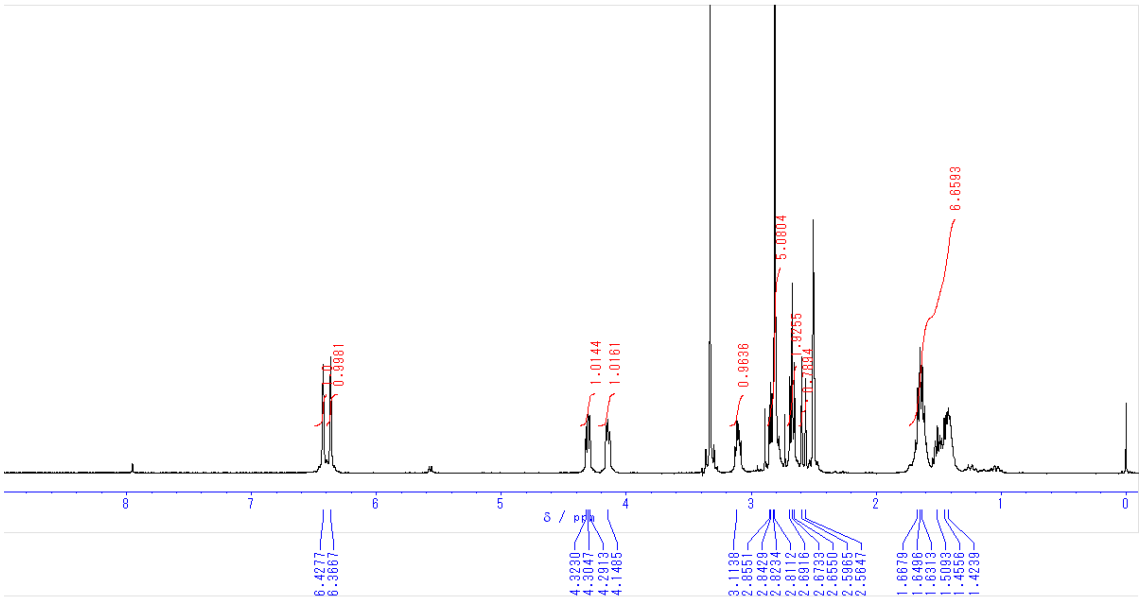
^{1}H NMR of compound **2** measured in $CDCl_3$ at 400 MHz



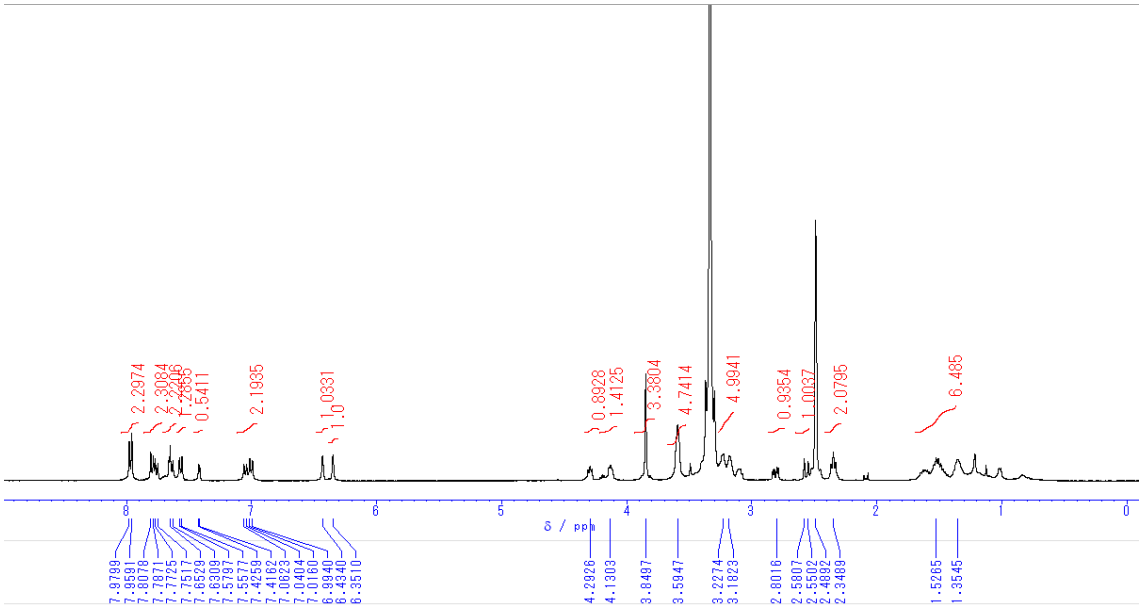
^{1}H NMR of compound **3** measured in $CDCl_3$ at 400 MHz



^{1}H NMR of compound **4** measured in DMSO-d_6 at 400 MHz



^{1}H NMR of compound **10** measured in DMSO-d_6 at 400 MHz



3.3. 結果・考察

3.3.1. ビオチン化蛍光ソルバトクロミックビーズの合成

本章での蛍光ソルバトクロミックビーズの合成は、Han らの論文を参考にすることで、電子求引性部位、芳香族部位、電子供与性部位をそれぞれ用意し、ビーズ上で直結する多段階の合成反応によって目的のビーズを得ることに成功した(Scheme 3.1, 3.2, 3.3)[21]。この合成ルートの構築によって、前章の合成ルートにて示したボロン酸が保護されたチオフェン中間体の合成が不要となり、液相で合成する工程を大幅に省略することが可能となった。また、それぞれの部位を自由に組み替えることで自由に光物性を調節できる可能性が示された。さらに上記の方法によって電子供与基にピペラジンが修飾された色素誘導体が合成されたことで、背景で示したようにピペラジンの 4 位に任意の官能基を導入する合成戦略を得ることが出来た。しかし、蛍光ソルバトクロミック色素部位にビオチンを修飾する前に、t-ブトキシカルボニル基を脱保護する必要があるが、一般的な方法であるトリフルオロ酢酸を使用すると、直ちに合成した色素分子がビーズから切り離されてしまう。そこで、比較的温和な条件で脱保護することが可能なトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシランを用いたところ、約 5 分の反応時間で t-ブトキシカルボニル基の脱保護が確認された。この結果により、ピペラジンの二級アミンが露出した所へビオチンを活性エステル法によって修飾することに成功した。

本論文における測定には、先述したように基質固定量の低いビーズから合成したビーズ **9** を用いた。主な理由は、前章でも示したように基質固定量が多いほど光量子収率が低下し、定量性の低下が懸念されたからである。加えて、ビーズ上の色素濃度が高いほど、一度の測定に必要なアビジンの量が増加してしまうためである。アビジンの量が増えれば、必要なデータを得るためのコストがかかり、十分なデータが得られないと考えた。これらの点を考慮し、蛍光スペクトル測定には低基質固定量のビーズを用いて測定を行った。

3.3.2. PBS 溶液中における色素 10 と中性アビジンの相互作用による蛍光スペクトル変化の測定

ビーズ上で合成された色素 10 が実際にアビジンとの相互作用を示すのか、色素 10 とアビジンを PBS 溶液中に 1:1 のモル比で混合した際の蛍光スペクトル変化を確認した。色素 10 を DMSO 溶液に溶解させ 3 μM のストック溶液を作成した。そして 1.5 μM の中性アビジン PBS 溶液と 1:1 になるように混合し、溶液の体積を 3 mL とした。

蛍光光度計による測定の結果、アビジン添加後の色素 10 溶液の蛍光スペクトルは色素 10 溶液と比較して蛍光強度が増加し、蛍光スペクトルの極大波長が 526 nm から 504 nm までブルーシフトすることが確認された(Figure 3.2)。この発光強度増加と蛍光波長のブルーシフトの現象は、Sun らの報告にあるクマリン骨格を有するビオチン化蛍光色素の報告と一致している[22]。この結果から、アビジンと合成された色素 10 が分子認識によって結合し、アビジン内部に色素 10 が取り込まれたことを示している。

しかし、上記のスペクトルシフトを示すシグナルとは別に、各溶液の蛍光スペクトルには 580 nm 付近に強い蛍光発光が見られた、これは色素 10 が PBS 溶液中にて、一部析出した事からこのような飽和したシグナルが現れている可能性が考えられる。対して、合成された蛍光ソルバトクロミックビーズはポリスチレンに担持されていることから、高分子鎖によって色素分子の凝集を低減する可能がある事を示した。よってビーズ 9 はこの溶液中における測定上の問題点を解決しうる材料である可能性が推察された。

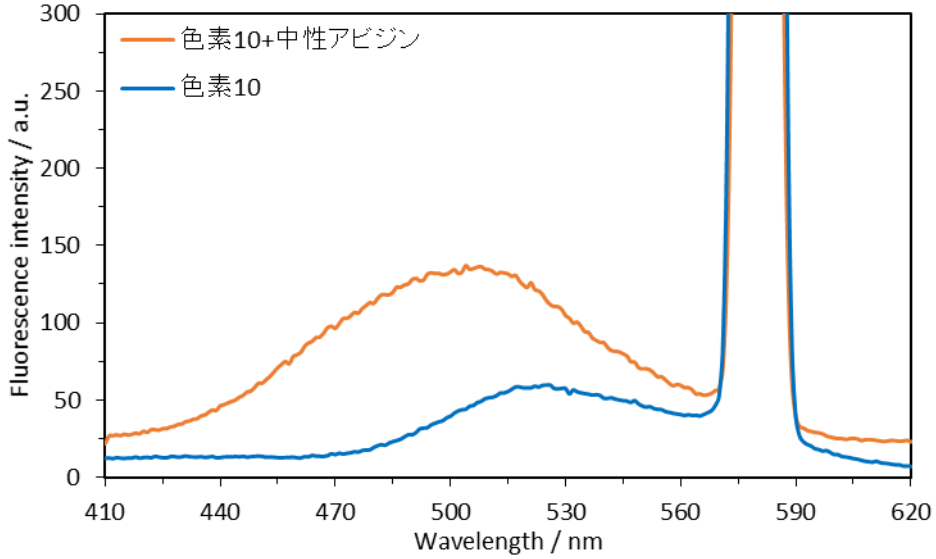


Figure 3.2. Fluorescence spectra of dye 10 solution with neutravidin.

3.3.3. 光導波路分光装置を用いた中性アビジンに対するビーズ 9 の蛍光スペクトル変化

まず初めに、ビーズ 9 と中性アビジンが溶解した PBS 溶液を 1 mL サンプルチューブ内で混合し、1 時間ほど振盪機で振盪を行った試料を用意し光導波路分光装置での測定を試みた。しかし、ビーズが 1 mg と微量であること、乾燥してい

ないビーズを光導波路上に移そうとすると容易に分散してしまうといった測定上の問題が重なった。マイクロメーターによる固定も測定感度が改善できず効果が低かった。また、あらかじめ乾燥したビーズ **9** をマイクロメーターで光導波路上に固定し、試料溶液を添加したところ、試料溶液がポリスチレンビーズに対して浸透しにくいことから、ビーズが十分に膨潤せず、十分な蛍光シグナルを得ることはできなかった。これらの結果を踏まえ、事前にビーズをマイクロメーターによって光導波路に固定し、事前にアビジン-ビオチン相互作用を阻害しない程度の少量の DMF で一度ビーズを膨潤させた後、試料溶液を添加し測定を試みた。その結果、微量なビーズであっても十分な蛍光スペクトル応答を得ることに成功した。その上、上記の測定手法によって試料溶液を添加する作業が容易になった為、光導波路分光装置の迅速な測定速度を活かし、アビジン-ビオチン相互作用の経時変化測定も可能であることが示された。

ビーズ **9** に中性アビジンを含まない PBS 溶液を添加したところ、蛍光スペクトルは 519 nm に極大蛍光波長を示した、対して中性アビジンを含む PBS 溶液を添加すると、491 nm に極大蛍光波長を示し蛍光強度が増加した蛍光スペクトルが観測された。この蛍光スペクトル変化は前項の溶液中における色素 **10** の蛍光発光挙動と類似するものであり、アビジンとビーズ **9** が分子認識によって結合を形成したと考えられる。

次に、この蛍光スペクトルの変化が測定系中のアビジン量に依存するのか測定を行った。17 μmol、13μmol 、10 μmol、6.6 μmol、3.3 μmol の中性アビジンをそれぞれ 60 μL の PBS に溶解させた溶液に対する応答性を確認したところ、いずれの試料も蛍光スペクトルはブルーシフトを示し、添加した中性アビジン量に依存した蛍光強度の増加が確認された(Figure 3.3)。また、17 μmol の中性アビジン PBS 溶液が加えられることで、ブランクと比較して約 2.8 倍の蛍光強度差が見られた。これらの発光挙動変化は、ビーズ上の色素分子が中性アビジンの結合サイトに由来する疎水場に取り込まれることで、蛍光強度の増強及び発光波長のブルーシフトが発生したとみられる。ことから、ビーズ **9** がアビジンとの相互作用していることを示唆している。そして、これらの極大蛍光波長の強度と添加した中性アビジン量との間には相関があることが、中性アビジンの添加量増加に伴いほぼ直線的な蛍光強度の増加から示された(Figure 3.4)。この結果から、ビーズ **9** は光導波路分光装置による測定で、切り離した色素 **10** と比べて飽和した蛍光シグナルを示さないことから、アビジン-ビオチン相互作用の測定に適していることが示された。また、アビジン添加後の蛍光波長変化と極大蛍光波長の強度をモニタリングすることで、アビジン-ビオチン相互作用の追跡が可能である可能性が示された。

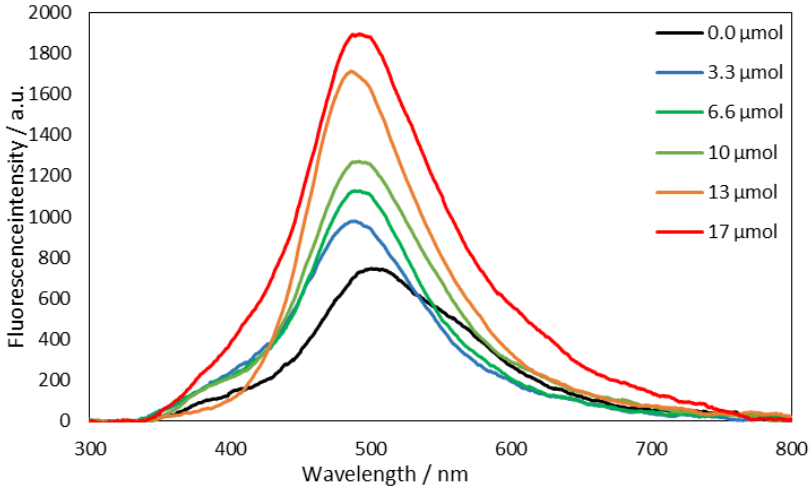


Figure 3.3. Fluorescence spectra of beads **9** with different amount of neutravidin.

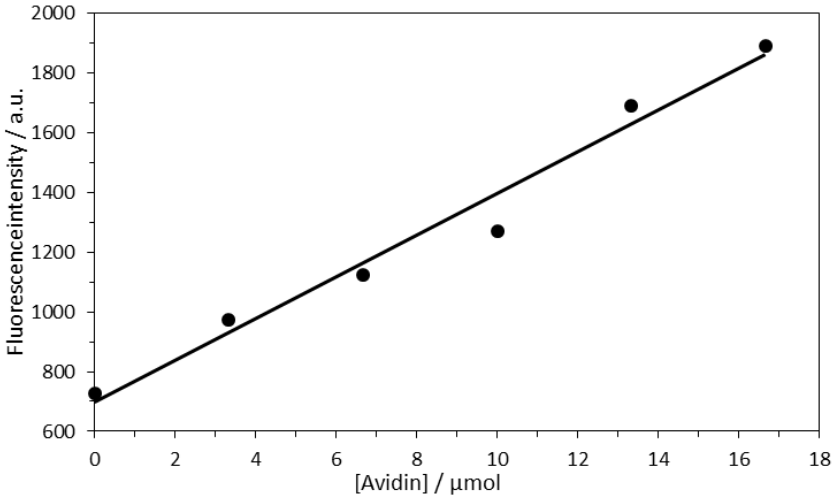


Figure 3.4. Fluorescence intensity change of beads **9** with neutravidin (R^2= 0.9743)

3.3.4. 中性アビジン・ウシ血清アルブミン(BSA)を添加したビーズ 9 蛍光スペクトルの時間変化測定

前項にてビーズ **9** が中性アビジンの添加量に依存して蛍光強度が変化する様子が示された。よって本項では、光導波路分光装置の経時変化測定モードを利用したアビジン-ビオチン相互作用の経時変化測定を検討した。

中性アビジン 17 μmol を添加した際の、ビーズ **9** の蛍光スペクトル変化を 10 秒毎に測定したところ、時間経過とともに蛍光スペクトルシフトが生じることが確認された。Figure 3.5. では中性アビジン添加前の状態と、反応初期である中性アビジン添加後 10-310 秒間の蛍光スペクトルを示している。この蛍光スペクトル変化から、中性アビジン添加後約 100 秒までは顕著な蛍光強度の変化がみられることが確認された。よって、ビーズ **9** 表面におけるアビジン-ビオチン相互作用は約 100 秒でほぼ完了し、それ以降は蛍光強度が変化しない状態となり、30 分後であっても大きなスペクトル変化は見られなかった。倉光らによると、アビジンはビオチン化した電極表面に対して約 5 分程度で特異的に吸着し

たことを報告している[22]。この既報と比較して、約 100 秒で蛍光強度の増加が収まったことは妥当な結果であると考えられる。また、アビジンとの親和性を評価する為に、比較対象としてウシ血清アルブミン(BSA)を非特異な相互作用を示すタンパク質として用いた。PBS 溶液に 17 μmol の BSA を溶解させた試料をビーズ **9** に添加し、光導波路分光装置で経時変化測定を行ったところ、Figure 3.6 に示すような蛍光スペクトルが観測された。BSA を添加した際の蛍光スペクトルは各スペクトルの間隔が狭いことから非常に緩やかな反応であると見られ、中性アビジンと比較して非特異的な相互作用を示すことが確認された。また、それぞれ反応前の極大蛍光波長(F_0:519 nm)と反応後における極大蛍光波長の蛍光強度($F_{neutravidin}$:491 nm, F_{BSA}:500 nm)から算出した相対蛍光強度と経過時間でプロットしたグラフによって相互作用に対する蛍光発光挙動を比較した(Figure 3.7)。中性アビジンは約 100 秒で蛍光強度の増加が収まったが、BSA は顕著な蛍光強度変化は示さず、徐々に蛍光強度が増加する様子が蛍光スペクトルからも確認された。PBS 溶液のみでは蛍光強度の増加が見られないことから添加したタンパク質との相互作用に伴いビーズ **9** が蛍光スペクトルシフトを示したことが確認された。そして Figure 3.7 では、200 秒以降に中性アビジンよりも BSA の相対蛍光強度が高くなる様子が認められた。これは、蛍光ソルバトクロミックビーズの支持体が疎水性のポリスチレンビーズであることから、ビーズ表面を BSA が非特異的に被覆することによる疎水場の形成に起因すると考えられる。また、中性アビジンと BSA それぞれの反応初期(0-50 秒)における相対蛍光強度の増加速度を求めたところ。中性アビジンは 20.12 sec^{-1} であり、BSA は 2.459 sec^{-1} となった。このことから相対蛍光強度の増加速度は約 8 倍の差があることから、ビーズ **9** の蛍光強度変化速度から、添加した生体物質との相互作用を識別可能なことが実証された。

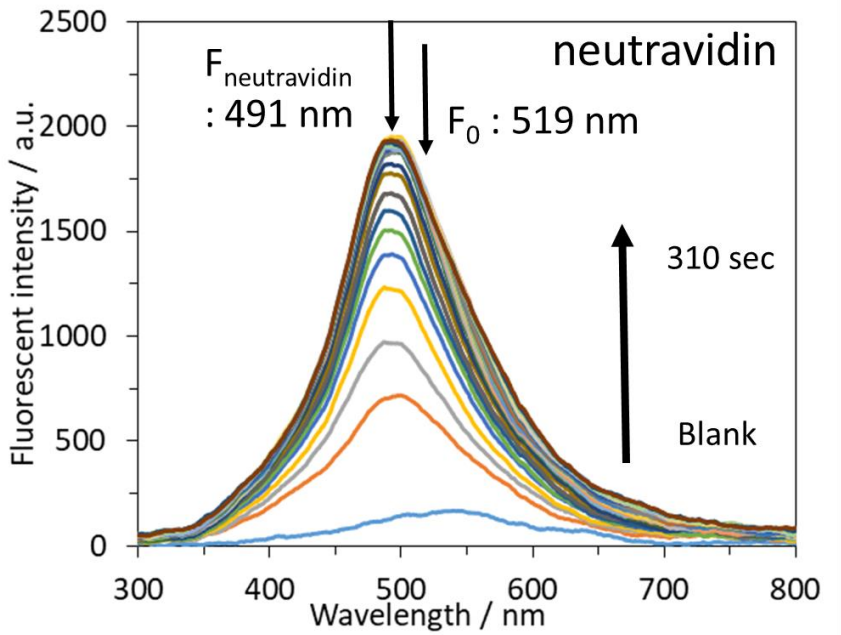


Figure 3.5. Fluorescence spectra of beads **9** with 17 μmol of neutravidin. Scan rate: 10 sec.

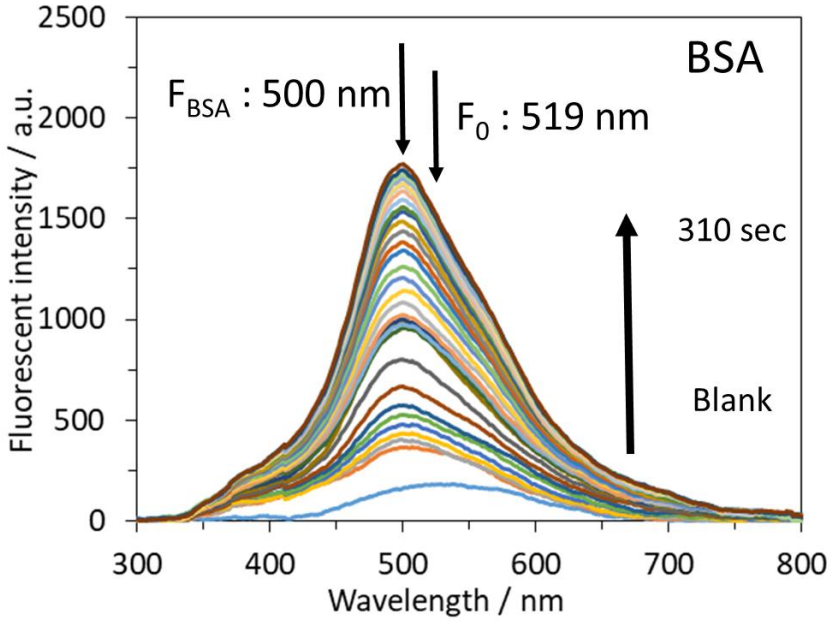


Figure3.6. Fluorescence spectra of beads **9** with 17 μmol of BSA. Scan rate: 10 sec.

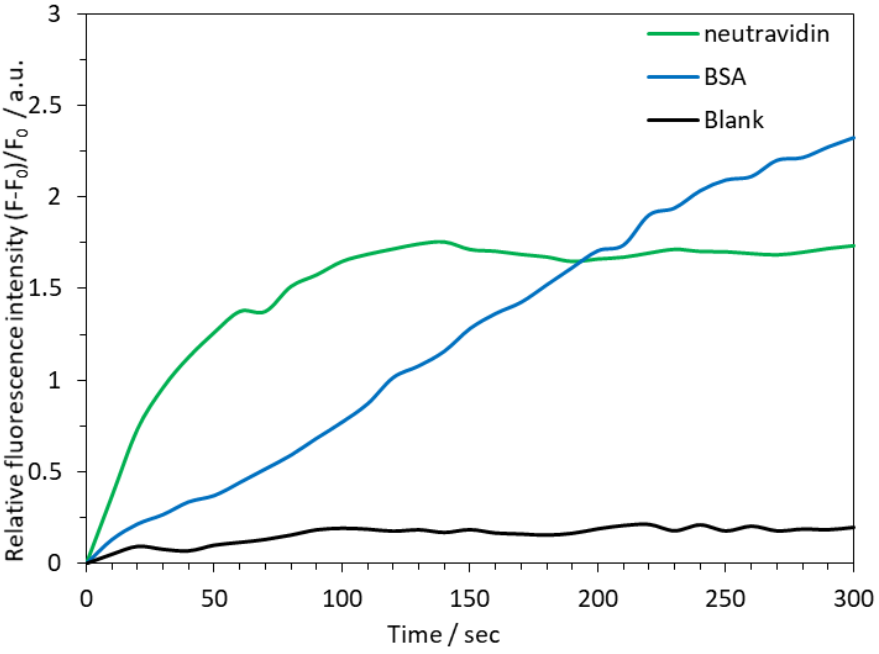


Figure 3.7. Relative fluorescence intensity of beads **9** with different protein.

3.3.5. アビジン-ビオチン複合体の物性評価

ビーズ上で形成されたアビジン-ビオチン複合体の物性を評価する為に、PBS 溶液を用いたビーズの洗浄を光導波路表面で行い、その後の蛍光強度変化の有無を測定した。

ビーズ **9** に対して、17 μmol の中性アビジン又は BSA を含む溶液を添加し、完全に平衡状態となった 1000 秒後に一度蛍光検出器をシャッターによって遮断

し、300 μL の PBS 溶液によって洗浄した後、再度シャッターを開放し測定を再開した。Figure 3.8 に示すように、BSA 溶液を添加したビーズ 9 の蛍光強度は PBS 溶液で洗浄すると著しい蛍光強度の低下が見られた。そして、2 度の PBS 溶液による洗浄後、平衡状態と洗浄後での蛍光強度を比較したところ約 86.7%減少していることが確認された。一方で、中性アビジンを添加したビーズ 9 は、2 度の洗浄後であっても蛍光強度が低下することはなかった。よってビーズ 9 と中性アビジンの間で不可逆な複合体を形成していることから、PBS 溶液での洗浄後も蛍光強度の変化は見られなかったと考えられる。これらの測定結果によって、本章にて示したバイオアフィニティーセンシングデバイスは、生体分子認識を熱力学的・速度論的に解析することが出来る有用なバイオセンシングデバイスであることが示された。

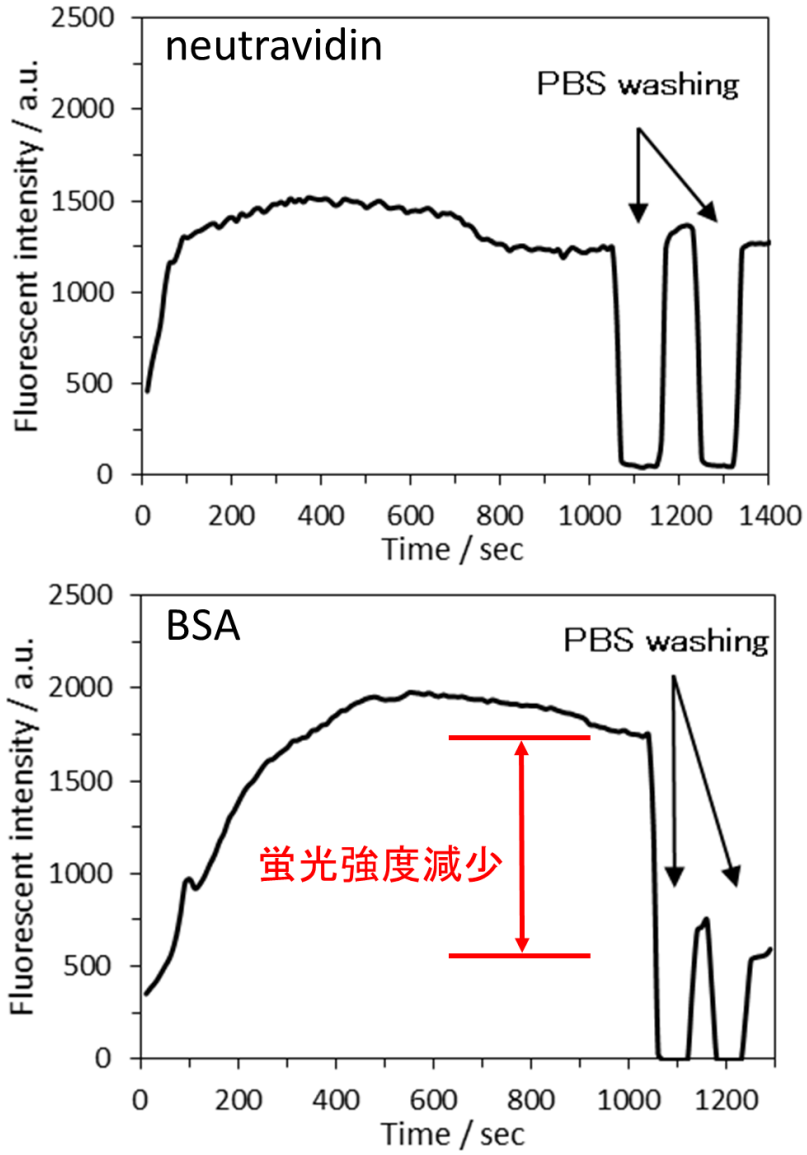


Figure 3.8. Measurement of fluorescence intensity of beads **9** after washing with PBS solution (above: neutravidin 17 μmol, below: BSA 15 μmol)

3.3.6. ビーズ 9 のソルバトクロミズム性能を利用したタンパク質の識別

ビーズ 9 は添加したタンパク質に対して、蛍光スペクトルのブルーシフトや蛍光強度の増加を示すことが確認された。これまでのデータからビーズ 9 はソルバトクロミズムの性能を有しており、相互作用を示すタンパク質によって蛍光波長が変化する可能性が示唆されていた。本項ではこれまで検討した中性アビジンと BSA に加えて、糖鎖が処理されていないアビジンを添加した際にビーズ 9 の蛍光スペクトルはそれぞれどのように変化するのか、比較検討を行った。

ビーズ 9 に対して 17 μmol の中性アビジン、BSA、アビジンの PBS 溶液を用意し、添加した際の蛍光スペクトルを測定した。

Figure3.9.に示すように、PBS 溶液のみ加えた場合よりも中性アビジン及び BSA を加えた際の蛍光スペクトルはブルーシフトを示しており、若干ではあるものの中性アビジンがより短波長であることが確認された。蛍光強度に関しては大きな違いはないことも確認された。アビジンを加えた際のビーズ 9 の蛍光スペクトルが最も短波長領域にシフトしており、蛍光強度も中性アビジン等と比較して約 2.35 倍高い特徴的な蛍光スペクトルを示した。アビジンは中性アビジンと比べて糖鎖が処理されていない為に、アビジンのタンパク質と糖鎖からなる疎水場へビーズ上の色素部位が取り込まれたために、特徴的な蛍光スペクトルが得られたものと考えられる。

これらの蛍光スペクトルは、ビーズ 9 を用いることで添加したタンパク質を相互作用に伴う蛍光発光挙動によって識別できる可能性を示している。加えて、このビオチン化蛍光ソルバトクロミックビーズを用いたバイオアフィニティーセンシングデバイスの性能は、対象のタンパク質を標識化することなく液相での測定が困難な生体分子認識を容易に検出し分析することのできる有用なバイオセンシングデバイスであることが示された。また、蛍光ソルバトクロミックビーズの合成法を応用することで、色素部位に生体親和性を示す官能基を導入し、これまで観測されなかった生体分子認識を発見できる可能性が示された。

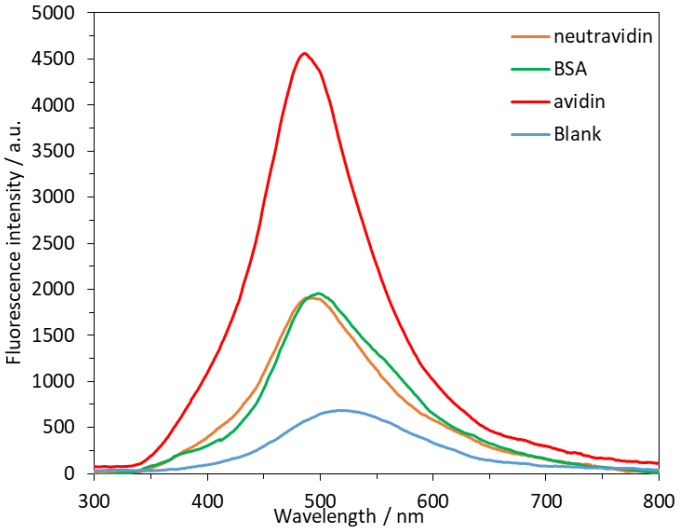


Figure 3.9. Fluorescence spectra of beads **9** with proteins (neutravidin, BSA, avidin: 17 μmol).

3.4. 総括

本章では、ビオチン化蛍光ソルバトクロミックビーズと、光導波路分光装置を組み合わせたバイオアフィニティーセンシングデバイスを構築し、分析対象であるアビジン-ビオチン相互作用を光学的に識別、経時変化で追跡することを目的とした。ビーズ上に合成した蛍光色素部位はピペラジン骨格を電子供与性部位として用いたことから、ソルバトクロミズムの性能を低下させることなくビオチンを蛍光色素部位へ導入することに成功した。合成されたビーズ **9** は一度 DMF によって膨潤させることで、光導波路上でアビジン-ビオチン相互作用を検出することが可能となった。中性アビジンを含む PBS 溶液を膨潤したビーズ **9** に添加することで、ビーズ **9** の蛍光スペクトルがブルーシフトを示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の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、3.3-17 μmol の範囲では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。

中性アビジンを添加した際の、経時変化に伴う蛍光スペクトルシフトを測定したところ、添加直後から急激な蛍光強度の増加が確認され約 100 秒で蛍光強度の増加が収まることが確認された。また、比較対象として、非特異性のタンパク質である BSA を添加した際のビーズ **9** の蛍光スペクトルを経時変化測定し比較を行ったところ、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(0-50 秒)における相対蛍光強度の増加速度を求めたところ、蛍光強度の増加速度は中性アビジンが BSA よりも約 8 倍速いことが確認された。この結果から、ビーズ **9** を用いることで添加したタンパク質との相互作用を蛍光発光の挙動から識別が可能であることが実証された。

ビーズ上で形成されたアビジン-ビオチン複合体の物性を評価するために、中性アビジン又は BSA を添加し蛍光強度の変化が収まった後、PBS 溶液による洗浄を実施した。BSA を添加したビーズ **9** は PBS 溶液の洗浄によって蛍光強度が減少することが確認され、2 度洗浄した後の蛍光強度は添加時の最大強度と比較して、86.7%減少していた。よって、BSA は PBS 溶液による洗浄で除去できる程度の相互作用であることが実証された。対して、中性アビジンを添加したビーズ **9** は PBS による洗浄でも蛍光強度が減少することがなかった。これらの PBS 洗浄による蛍光強度変化の差は、中性アビジンがビーズ **9** と不可逆な結合を形成している明確な証拠であるといえる。

さらに、ビーズ **9** は添加されたタンパク質に対して蛍光強度と蛍光波長の変化を示すことから、添加したタンパク質に対応した蛍光発光を示す可能性が示された。そこで、添加したタンパク質に対する蛍光スペクトルの応答を比較する為、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。結果として、中性アビジンの添加されたビーズ **9** 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より疎水的な環境になっている可能性があると推察された。このように添加したタンパク質の性質を蛍光発光の挙動から類推することが可

能であることが示唆された。

本章にて示した合成法は、ビーズ上の色素へ修飾する生体親和性を示す官能基を後付で自由に組み替えることで、分析対象を標識化することなく生体分子認識を検出することのできる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を創生できる可能性を示している。さらに本研究によって、蛍光ソルバトクロミックビーズを光導波路分光装置と組み合わせることで、添加された分析対象との相互作用を熱力学的、速度論的に解析することが可能であることから、本章にて示したセンシングシステムは、汎用性のあるバイオアフィニティーセンシングデバイスとして期待される。

References

1. Wilchek, M.; Bayer, E.A.; Livnah, O. Essentials of biorecognition: The (strept)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction. *Immunol. Lett.* **2006**, 103, 27-32, doi:10.1016/j.imlet.2005.10.022.
2. Bayer, E.A.; Wilchek, M. Application of avidin-biotin technology to affinity-based separations. *J. Chromatogr.* **1990**, 510, 3-11, doi:10.1016/S0021-9673(01)93733-1.
3. Guesdon, J.-L.; Ternynck, T.; Avrameas, S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem.* **1979**, 8, 1131-1139, doi:10.1177/27.8.90074.
4. Luong, J.H.T.; Male, K.B.; Glennon, J.D. Biotin interference in immunoassays based on biotin-strept(avidin) chemistry: An emerging threat. *Biotechnol. Adv.* **2019**, 37, 634-641, doi:10.1016/j.biotechadv.2019.03.007.
5. Hoshi, T.; Anzai, J. ichi; Osa, T. Controlled Deposition of Glucose Oxidase on Platinum Electrode Based on an Avidin/Biotin System for the Regulation of Output Current of Glucose Sensors. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 770-774, doi:10.1021/ac00100a013.
6. Pollheimer, P.; Taskinen, B.; Scherfler, A.; Gusenkov, S.; Creus, M.; Wiesauer, P.; Zauner, D.; Schöfberger, W.; Schwarzinger, C.; Ebner, A.; et al. Reversible biofunctionalization of surfaces with a switchable mutant of avidin. *Bioconjug. Chem.* **2013**, 24, 1656-1668, doi:10.1021/bc400087e.
7. Mukundan, H.; Kubicek, J.Z.; Holt, A.; Shively, J.E.; Martinez, J.S.; Grace, K.; Grace, W.K.; Swanson, B.I. Planar optical waveguide-based biosensor for the quantitative detection of tumor markers. *Sensors Actuators, B Chem.* **2009**, 138, 453-460, doi:10.1016/j.snb.2009.01.073.
8. Saravanan, G.; Daigo, K.; Imae, T.; Hamakubo, T. Visual observation of avidin-biotin affinity by fluorescent G4.5 poly(amidoamine) dendrimer. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2011**, 83, 58-60, doi:10.1016/j.colsurfb.2010.10.043.
9. Wang, S.; Hossain, Z.; Han, T.; Shinozuka, K.; Suzuki, T.; Kuwana, A.; Kobayashi, H. Avidin – Biotin Technology in Gold Nanoparticle-Decorated Graphene Field E ff ect Transistors for Detection of Biotinylated Macromolecules with Ultrahigh Sensitivity and Speci fi city. **2020**, doi:10.1021/acsomega.0c04429.
10. Kherlopian, A.R.; Song, T.; Duan, Q.; Neimark, M.A.; Po, M.J.; Gohagan, J.K.; Laine, A.F. A review of imaging techniques for systems biology. *BMC Syst. Biol.* **2008**, 2, 1-18, doi:10.1186/1752-0509-2-74.
11. Tinnefeld, P.; Sauer, M. Branching out of single-molecule fluorescence spectroscopy: Challenges for chemistry and influence on biology. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, 44, 2642-2671, doi:10.1002/anie.200300647.
12. Otsuka, Y.; Li, G.; Takahashi, H.; Satoh, H.; Yamada, K. Synthesis of a fluorescent solvatochromic resin using suzuki-miyaura cross-coupling and its optical waveguide spectra to measure the solvent polarity on the surface. *Materials (Basel).* **2020**, 13, 1-10, doi:10.3390/ma13204483.
13. Dziuba, D.; Pospíšil, P.; Matyašovský, J.; Brynda, J.; Nachtigallová, D.; Rulíšek, L.; Pohl, R.; Hof, M.; Hocek, M. Solvatochromic fluorene-linked nucleoside and DNA as color-changing fluorescent probes for sensing interactions. *Chem. Sci.* **2016**, 7, 5775-5785, doi:10.1039/c6sc02548j.

14. Loving, G.S.; Sainlos, M.; Imperiali, B. Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores. *Trends Biotechnol.* **2010**, 28, 73-83, doi:10.1016/j.tibtech.2009.11.002.
15. Kozma, P.; Kehl, F.; Ehrentreich-Förster, E.; Stamm, C.; Bier, F.F. Integrated planar optical waveguide interferometer biosensors: A comparative review. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, 58, 287-307, doi:10.1016/j.bios.2014.02.049.
16. Leung, A.; Shankar, P.M.; Mutharasan, R. A review of fiber-optic biosensors. *Sensors Actuators, B Chem.* **2007**, 125, 688-703, doi:10.1016/j.snb.2007.03.010.
17. Lee, T.H.; Hirst, D.J.; Aguilar, M.I. New insights into the molecular mechanisms of biomembrane structural changes and interactions by optical biosensor technology. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2015**, 1848, 1868-1885, doi:10.1016/j.bbamem.2015.05.012.
18. Kozma, P.; Hámori, A.; Kurunczi, S.; Cottier, K.; Horvath, R. Grating coupled optical waveguide interferometer for label-free biosensing. *Sensors Actuators, B Chem.* **2011**, 155, 446-450, doi:10.1016/j.snb.2010.12.045.
19. Robinson, G.A. Optical immunosensing systems - meeting the market needs. *Biosens. Bioelectron.* **1991**, 6, 183-191, doi:10.1016/0956-5663(91)80003-G.
20. Sun, S.; Huang, X.; Ma, M.; Qiu, N.; Cai, Z.; Luo, Z.; Alies, N.P. Systematic evaluation of avidin-biotin interaction by fluorescence spectrophotometry. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2012**, 89, 99-104, doi:10.1016/j.saa.2011.12.003.
21. Han, Y.; Giroux, A.; Lépine, C.; Laliberté, F.; Huang, Z.; Perrier, H.; Bayly, C.I.; Young, R.N. Solid phase parallel synthesis of highly substituted thiophene derivatives and identification of novel phosphodiesterase-4 (PDE-4) inhibitors. *Tetrahedron* **1999**, 55, 11669-11685, doi:10.1016/S0040-4020(99)00686-9.
22. Sun, Q.; Qian, J.; Tian, H.; Duan, L.; Zhang, W. Rational design of biotinylated probes: Fluorescent turn-on detection of (strept)avidin and bioimaging in cancer cells. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 8518-8521, doi:10.1039/c4cc03315a.
23. Kuramitz, H.; Sugawara, K.; Tanaka, S. Electrochemical sensing of avidin-biotin interaction using redox markers. *Electroanalysis* **2000**, 12, 1299-1303, doi:10.1002/1521-4109(200011)12:16<1299::AID-ELAN1299>3.0.CO;2-6.

第四章 結論

4.1. 結論

本論文では、分析対象の標識化を必要とせず、生体分子認識を識別し経時変化で追跡することが可能なバイオアフィニティー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センサー材料として、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、表面の極性変化に対して蛍光色変化で応答する蛍光ソルバトクロミックビーズを合成した。そして、光導波路分光装置と組み合わせることで、生体分子認識を蛍光色変化からレシオメトリックに追跡する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としての有用性を評価した。

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、芳香族部位のチオフェンに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、一段階の反応で蛍光発光を示す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色変化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。合成されたビーズは固定する基質量の増加に伴う蛍光発光及び蛍光スペクトルシフトの長波長化を示した。加えて、高固定量よりも低固定量はより高い光量子収率を示すことが確認された。よって、蛍光センシング材料として利用する際には、低基質固定量でビーズを用意し、色素部位を合成することで蛍光センシングデバイス材料として望ましい性能を示すと考えられる。さらに、合成されたビーズは 1,4-dioxane と DMF を用いた異なる混合比率の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ることから、色素分子がビーズに固定されている為、溶媒種に対する選択的な溶媒和を低減し、レシオメトリックな蛍光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用いることが可能であると示された。

第三章では、特異的な相互作用で知られるアビジン-ビオチン相互作用を光学的に検出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、光導波路分光装置による測定からアビジン-ビオチン相互作用を追跡することに成功した。本章で示した合成法は色素部位を構成するビルディングブロックをそれぞれ用意し、ビーズ上で段階的にカップリング反応によって色素部位を形成、そしてピペラジンを介してビオチンを修飾することで、目的のセンサー材料を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を一度 DMF によって膨潤させることで、反応点が十分に露出し導波路上でアビジン-ビオチン相互作用の測定が可能となった。中性アビジンを含むホスフェートバッファー（PBS）溶液を膨潤したビーズに添加することで、ビーズの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の形成する疎水場へビーズ上の色素分子が相互作用によって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で、分子認識の過程を蛍光強度から追跡可能であると推察された。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、急激な蛍光強度の増加を示し、約 100 秒で蛍光強度の増加が収まることが確認された。また、非特異性なタンパク質として、ウシ血清アルブミン（BSA）を添加した際のビーズの蛍光スペクトルを経時変化で測定しその相対蛍光強度を中性アビジン添加時と比較を行ったところ、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 よりも約 8 倍蛍光強度の増加速度が速く、ビーズは中性アビジンとの特異的な相互作用の識別が可能であることが確認された。また、ビーズ上で形成されたアビジン-ビオチン複合体の物性を評価するために、中性アビジン又は BSA を添加した後、PBS 溶液による洗浄を行ったところ、BSA を添加した場合に、2 度の洗浄によって蛍光強度は添加時の最大強度と比較して、86.7%減少した。対して、中性アビジンを添加したビーズは PBS による洗浄でも蛍光強度の減少が確認されなかった。これらの PBS 洗浄による蛍光挙動の差は、中性アビジンがビーズと不可逆な結合を形成している明確な証拠であり、ビーズを用いることで複合体の性質を熱力学的に分析可能であることが示された。さらに、ビーズは添加されたタンパク質に対して蛍光強度と蛍光波長の変化を示すことから、添加したタンパク質に対応した蛍光発光を示す可能性が示された。そこで、添加したタンパク質に対する蛍光スペクトルの応答を比較する為、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。結果として、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。よって、本章にて合成されたビーズはアビジン-ビオチン相互作用の特異性を識別するのみならず、添加したタンパク質の性質を蛍光発光の挙動から類推することが可能であることが示唆された。

また、本章にて示した合成及び分析手法は、蛍光ソルバトクロミックビーズに修飾する生体親和性を示す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分析することのできる有用な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。

これらの結果により、本論文にて報告した蛍光ソルバトクロミックビーズの合成手法及びセンシングシステムは汎用性のある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を創製できる技術として期待される。

謝辞

本博士論文の主査を務めていただいた、地球環境科学院 環境物質科学専攻 生体物質科学コース　山田 幸司 准教授には、常日頃から丁寧な指導・助言をいただきました、心より感謝申し上げます。

本論文の副査をお引き受けいただいた、北海道大学大学院 工学研究院 環境創生工学部門 水環境保全工学研究室　佐藤　久　教授、北海道大学地球環境科学研究院　統合環境科学部門　環境適応科学分野　沖野　龍文　教授、そして北海道大学環境科学院　物質科学専攻ナノ環境材料コース　小西　克明　教授には予備審査及び博士論文公聴会において貴重なご意見を賜り、本論文を仕上げることができました、心より感謝いたします。

本論文の作成にあたり、光導波路分光装置を貸し出していただいた北海道大学大学院 工学研究院 環境創生工学部門 水環境保全工学研究室　佐藤　久　教授、そして光導波路分光装置に関わる様々な技術指南そしてご意見を賜りました ATR Scientists Partners Inc.　高橋　浩三　様、絶対量子収率計を貸し出していただいた北海道大学工学研究院　有機元素化学研究室　伊藤　肇　教授のご協力により、有意義なデータを得られることができました、心より感謝いたします。

日々の研究を共にし、多くの困難を乗り越えてきた南京経済大学　李　光磊　様、同研究室　岸　和樹　様、環境起学専攻　谷本　憂太郎　様、そして山田幸司研究室メンバーの方々に心より感謝いたします。

最後に、修士課程、博士課程に進学し学ぶ機会を与えてくださり、常に研究生活を応援していただいた両親に深く感謝申し上げます。

2021 年 2 月
大塚　侑