Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-11-26

モレキュラーインプリンティングによる生物活性物質認識能を有する機能性高分子材料の創製

村瀬, 敦郎

(Degree)
博士（工学）

(Date of Degree)
2016-09-09

(Date of Publication)
2018-09-09

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
乙第3315号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003315

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

神戸大学博士論文

モレキュラーインプリンティングによる
生物活性物質認識能を有する機能性高分子材料の創製

平成 **28** 年 **7** 月

村瀬　敦郎

目次

第 1 章　緒論 1
1-1. はじめに 2
1-2. 分子認識材料 2
1-3. モレキュラーインプリンティング法 4
1-4. 生物活性物質 6
1-5. 生物活性物質の認識素子と検出法 9
1-6. モレキュラーインプリンティング法による生物活性物質の認識 11
1-7. 本研究の目的と意義 16
1-8. 本論文の構成 19
【参考文献】 21

第 2 章　ポストインプリンティング修飾によるドーパミン認識材料の創製 27
2-1. 緒言 28
2-2. 実験 31
2-2-1. 試薬 31
2-2-2. 分析装置 32
2-2-3. 鋳型分子の合成 32
2-2-4. ドーパミンを認識する MIP の合成 35
2-2-5. ポストインプリンティング修飾 36
2-2-6. MIP に対する標的分子の結合能評価 36
2-3. 結果と考察 37
2-3-1. MIP の合成とポストインプリンティング修飾 37
2-3-2. MIP に対する標的分子の結合能評価 38
2-4. 結言 41
【参考文献】 44

第 3 章　放出制御機能を有する刺激応答性分子認識材料の創製 49
3-1. 緒言 50
3-2. 実験 56
3-2-1. 試薬 56
3-2-2. 分析装置 57
3-2-3. スピロピラン誘導体の合成と分光学的特性の評価 58
3-2-4. ^{1}H NMR によるスピロピラン誘導体と標的分子の相互作用評価 63
3-2-5. アトラジンを認識する MIP の合成と分光学的特性の評価 64
3-2-6. アトラジンを認識する MIP の結合能評価 65

3-2-7. 4-ニトロフェニル α-D-マンノピラノシドを認識する MIP の合成と評価 . 67
3-3. 結果と考察 69
3-3-1. スピロピラン誘導体の合成と分光学的特性の評価 69
3-3-2. ^{1}H NMR によるスピロピラン誘導体と標的分子の相互作用評価 70
3-3-3. アトラジンを認識する MIP の評価 71
3-3-4. 4-ニトロフェニル α-D-マンノピラノシドを認識する MIP の評価 75
3-4. 結言 77
【参考文献】 80

第 4 章　core-shell 型分子認識材料を用いた蛍光偏光法によるコルチゾールセンシングシステム 86
4-1. 緒言 87
4-2. 実験 93
4-2-1. 試薬 93
4-2-2. 分析装置 94
4-2-3. 鋳型分子の合成 94
4-2-4. コルチゾールを認識する MIP の合成 95
4-2-5. MIP に対する標的分子の結合能評価 96
4-2-6. 標的分子の蛍光ラベル化 97
4-2-7. core-shell 型 MIP-NPs の合成と評価 99
4-2-8. MIP-NPs に対する蛍光性標的分子の結合能評価 101
4-2-9. 蛍光偏光法を用いた蛍光性標的分子の結合能評価 102
4-2-10. 競合法を用いた標的分子の結合能評価 104
4-3. 結果と考察 106
4-3-1. 鋳型分子と MIP の合成 106
4-3-2. MIP に対する標的分子の結合能評価 106
4-3-3. 標的分子の蛍光ラベル化 108
4-3-4. core-shell 型 MIP-NPs の合成と評価 109
4-3-5. MIP-NPs に対する蛍光性標的分子の結合能評価 112
4-3-6. 蛍光偏光法と競合法を用いた標的分子の結合能評価 115
4-4. 結言 121
【参考文献】 126

第 5 章　結論 133
5-1. まとめ 134
5-2. おわりに 138
【参考文献】 140

【本研究に関する論文】 141
【謝辞】 142

第 1 章
緒論

1-1. はじめに

生物の生体内では酵素や抗体などによる高度な分子認識が絶えず行われており、これらの分子認識物質は神経細胞間での情報伝達に大きく寄与している。これらの機能の多くは巨大な生体分子に対して特定の分子認識物質が水素結合や静電的相互作用によって結合することにより発現されており、生体内での反応は一般的な化学反応に比していくつか異なる点が存在する。たとえば、一般的な化学反応では酸や塩基により反応を誘起させ、加熱することで反応を促進させることも多い。しかしながら、生体内での反応系は一部の例外を除けば常温の中性付近という穏和な環境下で進行する。また、生体内での反応は生体分子に対していくつかの分子認識物質がそれぞれ独立して作用しており、複数の反応が同時に進行している。このような反応は必要に応じて増幅、減衰が繰り返されることで生体内における生理活性物質の量を適切に制御している。これらの事実は生体内に存在する酵素や抗体の分子認識能がいかに優れていものかを物語っているといえる[1–3]。

ところで、一般に分子の機能という場合、大きく 2 つに分類される。1 点目は 1 分子あるいは特定の数の分子からなる分子集合体が持つ機能をさす場合であり、2 点目は導電性や磁性、粘度や耐久性などその物質の物性に着目する場合である。医薬品などの作用機序を議論するには前者の観点が必要であり、材料の開発にとっては後者の観点が必要となる。しかしながら、バルクの物性は個々の分子の機能の集合体でもあるため、両者は密接な関係にある。そのため、近年ではその複合領域を研究する学問としてナノサイエンスやナノテクノロジーなどの分野が発展してきている[1–3]。

上述したように生体内での反応はさまざまな分子間相互作用に基づくものであり、生体内の酵素や抗体の機能を模倣した分子認識材料の開発が盛んに行われている。酵素や抗体の高度な分子認識能は多点認識に由来しているため、これを人工的に模倣するためには認識対象化合物と多点で相互作用するホスト化合物を分子設計することが必要となる。

1-2. 分子認識材料

生体内に存在する酵素や抗体は高い分子認識能を有している。しかしながら、同時にこれらの分子認識物質は pH や温度による変性の影響を受けやすく、非常に不安定な物質であるために近年では酵素や抗体の機能を模倣した分子認識材料の研究·開発

が盛んに行われている。

1960 年代、米国デュポン社の研究員 *Pedersen* は実験中に偶然、微量のクラウンエーテルが合成されていることを発見した。当時、クラウンエーテルはその空孔に適合する特定のイオンや金属原子を内部に包接することができるという画期的な特性を有する化合物であった。この発見は後に多くの研究分野に影響を及ぼすことになり、分子認識化学の黎明期をささえることになる。その後、*Cram* はクラウンエーテルの認識対象の拡張を行い、2 次元構造が主であった分子認識を 3 次元構造へと展開し、基本分子 (ホスト) と取りこまれる分子 (ゲスト) との相互作用を研究するホスト·ゲスト化学という新しい研究分野を開拓した。さらに、*Lehn* はクリプタンドの発見に加え、これまでのホスト·ゲスト化学を包括した超分子化学という新しい概念を提唱した。この超分子化学と呼ばれる研究分野は広義の意味で両親媒性の化学物質によるミセルやベシクルといった会合体に関する研究分野を含め、後に自己集合や自己組織化のようなナノサイエンスやナノテクノロジーの分野の発展に大きく寄与することになる。

しかしながら、生体内に存在する酵素や抗体の機能を模倣する分子認識材料を人工的に設計·合成することは非常に複雑である。これまでにゲスト分子を認識する有機化合物としてクラウンエーテル、クリプタンド、シクロデキストリン、シクロファン類の一種であるカリックスアレーンなどのさまざまな化合物が検討されてきた[1–3]。これらの化合物は溶液中においてある特定のゲスト分子に対する分子間相互作用を確認できるという点で非常に有効なものであるが、分子認識能を発現できる標的分子が限られることやその耐久性、利便性の観点から工学的な方面へ応用するためにはいくつかの課題を有している。そのため、近年ではこのような化合物をポリマーマトリックス内に固定化することで、溶媒耐性や繰り返し耐性などの耐久性の高い分子認識材料を構築する手法も検討されている。

一方で、モレキュラーインプリンティング法と呼ばれる標的分子を特異的に認識する機能性高分子材料を合成する手法は鋳型となる標的分子と相互作用する機能性モノマーを重合時に添加し、架橋剤とともに共重合させることで標的分子と相互作用するための相補的な位置に機能性モノマーを配置することが可能となり、標的分子を選択的に認識可能な機能性高分子材料をテーラーメイドにかつ簡便に合成できるものと考えられている。

1-3. モレキュラーインプリンティング法

モレキュラーインプリンティング法 (MI 法) とは鋳型重合法の一種であり、検出すべき標的分子 (鋳型分子) と相互作用する機能性モノマーを使用して複合体を形成させた後、架橋剤とともに共重合する。その後、加水分解反応や還元反応などの適切な操作によって鋳型となる標的分子を除去することでポリマーマトリックス内の相補的な位置に機能性モノマーを固定化し、標的分子を特異的に認識可能な分子認識空間を有する機能性高分子材料を構築する手法である[4–10] (***Figure 1-1***)。

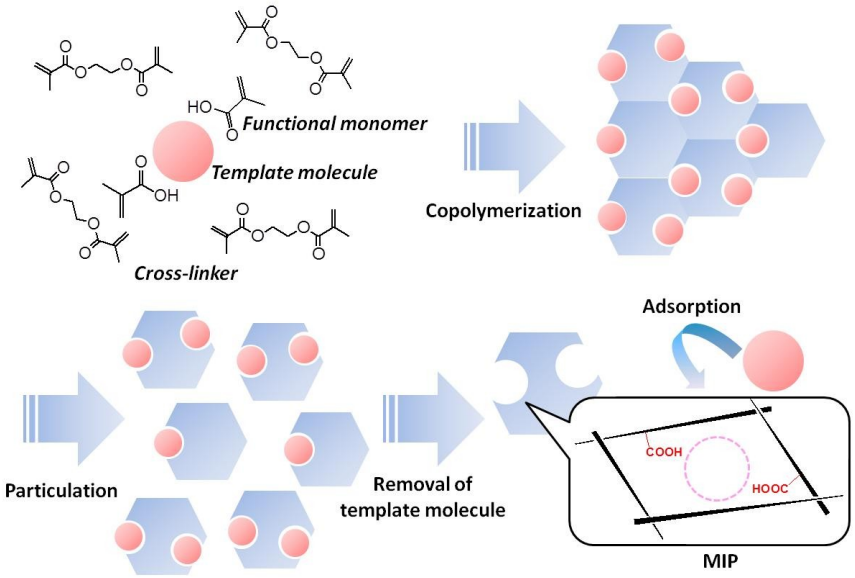


Figure 1-1. MIP prepared by bulk polymerization for recognion of a target molecule.

ここで機能性モノマーとはビニル基やメタクリロイル基などの重合可能な官能基とカルボキシ基やアミノ基、フェニルボロン酸基などの標的分子と相互作用可能な官能基を有する 2 官能性のモノマーを意味する。そのため、モレキュラーインプリントポリマー (MIP) の合成にはメタクリル酸やアクリル酸、アクリルアミド、4-ビニルフェニルボロン酸などの化合物が機能性モノマーとして使用されることが多い。また、架橋剤としてはジビニルベンゼン (DVB) やエチレングリコールジメタクリレート (EDMA) などが使用されることが多く、架橋剤となる DVB にコモノマーとしてスチレンを共重合させることで MIP の架橋度を調整する手法が確立されている。重合時に使用される溶媒は機能性モノマーと鋳型分子の複合体形成を阻害しないために一般にはクロロホルムなどの低極性溶媒が使用されることが多い。しかしながら、近年では重合時に使用する低分子量溶媒 (ポロゲン) が標的分子の分子認識能に影響を及

ぼすとの研究結果も報告されている。

これまでに糖、アミノ酸、核酸塩基、タンパク質などの生体関連物質、ステロイド、テオフィリン、シンコニジンなどの医薬品、アトラジンなどの農薬といったさまざまな化合物を標的分子とした分子認識材料の合成に関する研究結果が報告されてきた[11–18]。上述したように本手法の利点は標的分子を認識する材料をテーラーメイドかつ簡便に合成できる点であり、また、天然の酵素や抗体と異なり溶媒の pH や温度による影響が少ないために標的分子に対する分子認識能を評価するうえで適用可能範囲が広いといった特徴を有する。本手法による分子認識材料はその調整法の違いにより、大きくは共有結合型 MIP と非共有結合型 MIP の 2 種類に分類される[4–10]。

共有結合型 MIP はドイツの *Wulff* らのグループが報告している手法であり[19]、要約すると以下のようになる。1) あらかじめ分子認識可能な機能性モノマーと標的分子 (またはその構造類似体) を複合体にした共有結合型鋳型分子を合成する。2) 得られた複合体を適切な架橋剤とともに共重合することでポリマーマトリックス内に鋳型分子を固定化する。3) 加水分解反応や還元反応などの適切な反応条件により鋳型分子をポリマーマトリックス内から除去する。このような一連の操作により、標的分子を選択的に認識可能な分子認識空間を有する機能性高分子材料を合成する手法である。この手法の利点は重合中に機能性モノマーと鋳型分子の複合体が形成されているために比較的均一な分子認識空間を構築できることにあり、標的分子に対して高い選択性·親和性を有する分子認識材料が合成できると考えられている。一方で、機能性モノマーと鋳型分子を加水分解反応や還元反応などで切断した後、標的分子を再認識するといった可逆的な結合が必要であるために結合の種類がエステル結合、ケタール·アセタール結合、シッフ塩基、配位結合、オキシム結合といったものに限定されることや、機能性モノマーと鋳型分子の複合体形成やポリマーマトリックス内より鋳型分子を除去する手順が煩雑であるなどの問題点も存在する。

一方で、非共有結合型 MIP はスウェーデンの *Mosbach* らのグループが報告している手法であり[20]、要約すると以下のようになる。1) 水素結合や静電的相互作用のような非共有結合を利用して適切な溶媒中で相互作用可能な機能性モノマーと鋳型となる標的分子の複合体を形成させ、架橋剤とととともに共重合する。2) 適切な溶媒を使用して鋳型分子をポリマーマトリックス内から除去する。これらの操作により、標的分子に特異的な分子認識空間を有する機能性高分子材料を合成する手法である。

この手法の利点は結合の種類に制限がないために適用可能範囲が広いことと複合体形成時における煩雑な合成を必要としないため簡便に合成できることである。一方で、比較的弱い水素結合や静電的相互作用により機能性モノマーと鋳型分子の複合体を形成させると同時に、重合時においても当該複合体を安定化させる必要があるために重合溶媒や重合温度が制限されるなどの問題点も存在する。

さらに、ビスフェノール A やコレステロールなどの分子認識においては標的分子と機能性モノマーの複合体が共有結合型でありながら、脱炭酸などで鋳型分子を除去した後、非共有結合的に分子認識する半共有結合型 MIP の合成に関する研究結果も報告されている。近年では、MIP を微粒子化あるいは薄膜化することにより、標的分子の高感度検出を可能にした報告も数多く存在する。前者は主に shell 層に分子認識能を付与した core-shell 構造を有する MIP 微粒子の合成によるものであり、後者はガラス基板や金基板に MIP を薄膜として固定化し、表面プラズモン共鳴 (SPR) や水晶振動子マイクロバランス (QCM) を利用した高感度分子間相互作用測定装置と融合することで標的分子の迅速かつ高感度な検出を可能にしている。

1-4. 生物活性物質

生体に作用して何らかの生物反応を引き起こす化合物を総称して生物活性物質と呼び、当該物質には生理活性物質のような生体内に存在する内因性の物質のみならず、内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) のような外因性の物質も含まれる。生理活性物質には主に体内でアミノ酸やタンパク質から合成される核酸、酵素、神経伝達物質やホルモンなどがあり、これらの物質は生体機能を調整するうえで非常に重要な役割を担っている。また、近年ではそのような生体内のホルモンに影響を与えるとされる内分泌攪乱物質に対する関心も高まっている。たとえば、ポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料となるビスフェノール A や除草剤の一種であるアトラジンなどの農薬も内分泌攪乱物質の一つとして疑われている。このため、これらの生物活性物質の定量を実施することは病気の診断や治療を行うに際して非常に有効な手段となる。以下に本研究で標的分子として使用した生物活性物質であるドーパミン、アトラジン、4-ニトロフェニル α-D-マンノピラノシド、コルチゾールについて記載する。

◇ ドーパミン

3,4-ジヒドロキシフェニル骨格を有する生体アミンをカテコールアミンと呼び、生理活性のあるものとしてドーパミン、エピネフリン、ノルエピネフリンが知られている **(*Figure 1-2*)**。これらは主に脳、副腎髄質、交感神経などに分布しており種々の疾患の際、血中や尿中の質的·量的変動が起こることが確認されている。そのため、血中および尿中のカテコールアミンを定量することは病気の診断や治療にとって非常に有効である。特にドーパミンは後述するコルチゾールとともにストレスマーカーの一つとして知られており、その他にも各種の診断に利用されている非常に重要な物質である。たとえば、神経変性疾患の一つであるパーキンソン病は血中のドーパミン量の低下が起因しているものと考えられている。

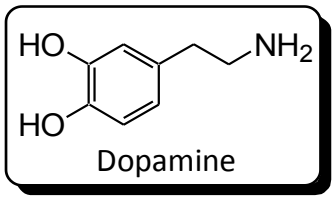


Figure 1-2. Structural formula of dopamine.

◇ アトラジン

アトラジン、シマジン、シアナジンなどのトリアジン骨格を有する化合物は除草剤として広く一般に使用されている **(*Figure 1-3*)**。これらの化合物は光合成における電子伝達系を阻害することにより、特に発芽の抑制および発芽直後の植物を枯らすために非常に有効である。しかしながら、近年、このようなトリアジン骨格を有する化合物は過剰に摂取すると生体内のホルモンバランスに悪影響を及ぼすことが確認されており、内分泌攪乱物質の一つとして疑われている。特にアトラジンは水への溶解性が低く、また微生物による分解も難しいことから土壌に浸漬した過剰なアトラジンを分解する手法も検討されつつある。

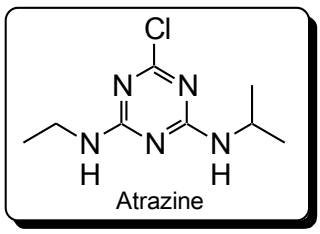


Figure 1-3. Structural formula of atrazine.

◇ 4-ニトロフェニル α-D-マンノピラノシド

生体内に存在する糖類および糖たんぱく質は生体内の機能を調節するうえで非常に重要な役割を担っており、糖類はおもに単糖類、少糖類、多糖類の 3 種類に分類される。単糖類はグルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトースなどが含まれ、少糖類は単糖類がグリコシド結合により少数結合したものであり、糖骨格が 2 個結合した少糖類を特に二糖類と呼び、ラクトース、スクロース、マルトースなどが含まれる。さらに単糖類が多数結合したものが多糖類であり、生体内の肝臓や筋肉中に存在するグリコーゲンや植物の細胞内に存在するでんぷんなどがその例である。

ところで、ピラノース構造とは鎖状の状態から分子内のヒドロキシ基とアルデヒド基が分子内へミアセタール反応を起こすことで 5 つの炭素と 1 つの酸素からなる 6 員環構造を形成する環状化合物の総称である。糖類は基本的にこのピラノース構造をとる場合が多く、1 位のアノマー水酸基がアルキル基に変換されたものがピラノシドである。ニトロフェニル基を有するマンノピラノシドは UV 吸収が強く、コンカナバリン A などの植物由来のレクチンとの分子間相互作用に基づいた吸収ピークのシフトが確認されることから、糖類との分子間相互作用を検討するためのモデルサンプルとして広く一般に使用されている **(*Figure1-4*)**。

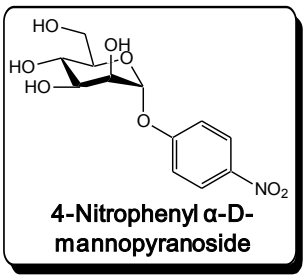


Figure 1-4. Structural formula of 4-nitrophenyl α-D-mannopyranoside.

◇ コルチゾール

ホルモンは大きく分けてアミノ酸･ペプチド･タンパク質系ホルモンとステロイド系ホルモンに分類されるが、一般に副腎皮質ホルモンと性ホルモンはステロイド系ホルモンであり、それ以外はアミノ酸･ペプチド･タンパク質系ホルモンである。ステロイド系ホルモンは結合する受容体により、1) 糖質コルチコイド、2) 鉱質コルチコイド、3) アンドロゲン、4) エストロゲン、5) 黄体ホルモンの 5 種類に分類される。コルチゾールは副腎皮質から分泌される糖質コルチコイドの一種であり、ヒドロコルチゾ

ンとも呼称される。コルチゾールはその前駆体であるコルチゾンから合成され、コルチゾン自体は不活性である。生体内ではコルチゾンが 11-β-ステロイド脱水素酵素と呼ばれる酵素の働きで 11 位のカルボニル基が還元され、2 級アルコールに変換されたものがコルチゾールであり、一般に β 型のみ生理活性を有すると考えられている[21] (***Figure 1-5***)。

また、血中のグルコース濃度や血圧の調整などは糖質コルチコイドによるものであると考えられており、成人男性における血中のコルチゾール濃度は 4–20 μg/dL (110–552 nM) 程度であると考えられているが、過剰なストレスを受けることで多量に分泌されることから、当該ホルモンはカテコールアミンなどの神経伝達物質とともにストレスマーカーとして広く認識されている[22]。また、近年では過剰なストレスを受けることによりコルチゾールが体内で多量に分泌されると脳の海馬が委縮するなどの MRI 結果も報告されている。

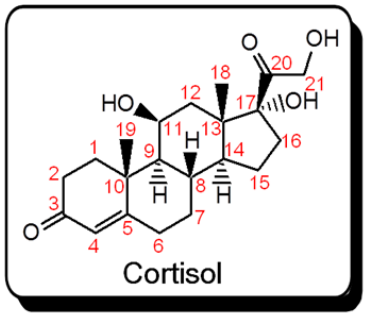


Figure 1-5. Structural formula and carbon numbering of cortisol.

1-5. 生物活性物質の認識素子と検出法

生体内に存在する生物活性物質を迅速かつ簡便に定量することは非常に困難である。1 点目の問題は生体内においては類似の構造を有する化合物が多量に存在し、高度な分離能が要求されることであり、2 点目の問題は血液や尿、唾液といった検体から採取する必要があるために夾雑物の分離といった前処理が必要となるとともに、検体量が制限されることである。このため各生物活性物質に特異的な抽出·分離法が必要となり、さらに微量であるために感度のよい測定法が求められている。以下にこれまでに検討されてきた各生物活性物質の検出法について記載する。

◇ ドーパミン

生体試料からドーパミンを抽出･分離する手法としては、溶媒抽出法、イオン交換クロマトグラフィー、アルミナ吸着法などが存在する。アルミナ吸着法はアルミナがアルカリ性の領域 (pH 8 以上) でカテコール骨格を有する化合物を選択的に吸着し、酸性領域 (pH 3 以下) で脱離するという性質を利用したものでカテコールアミンの選択的抽出法としてしばしば利用されている。また、ホウ酸がジオール類と特異的に結合することから、ホウ酸ゲルもアルミナと同様にカテコールアミンの抽出に使用されている。さらに、カテコールアミンの分析には酵素免疫測定法 (ELISA)、放射免疫測定法 (RIA)、蛍光標識法、HPLC 法、電気化学検出法などが存在し、これまでに各手法に基づいた定量が実施されている[23]。

◇ アトラジン

アトラジンなどの農薬は試料を濾過した後、溶媒抽出法あるいは固相抽出法により夾雑物を分離する手法が確立されている。ここで、溶媒抽出法はベンゼン、ヘキサン、ジクロロメタンなどの比較的低極性の有機溶媒を使用して液･液抽出を行う手法であり、固相抽出法はシリカゲルに C_8 (オクチル基)、C_{18} (オクタデシル基)、CN (シアノ基)、NH_2 (アミノ基) などを化学修飾した充填剤を使用した固液抽出により目的物を分離する手法である。従来の分析手法は検体を含む溶液を濃縮した後、GC/MS や LC/MS などを利用した高精度の微量分析が主流であった。しかしながら、これらの検出手法は前処理の煩雑さの問題もあるため、現在では ELISA による分析も検討されている。

◇ 4-ニトロフェニル α-D-マンノピラノシド

従来は糖類の分析法として主にフェノール･硫酸法、*Somogyi-Nelson* 法が検討されていた。特にフェノール･硫酸法は分析手法が非常に簡便であることから広く一般に使用されてきた分析法である。一方で、*Somogyi-Nelson* 法は銅試薬による還元糖の分析法であり、*Nelson* 発色試薬を使用して吸光度測定により糖の定量を実施する手法である。しかしながら、これらの測定では糖の種類を特定することができないことや夾雑物の影響により、正確な定量が難しいとされていることから、近年では糖類をラベル化することで吸光や蛍光により分析を実施する HPLC 法や ELISA による分析が

実施されることも多い。ELISA による分析手法にはグルコースを選択的に認識するβ-D-グルコースオキシターゼを使用する手法やヘキソキナーゼによりグルコース-6-リン酸に変換するヘキソキナーゼ法などが存在し、類似の酵素を使用した糖類の定量が実施されることもある[24]。

◇ コルチゾール

従来は LC/MS などの装置を使用してコルチゾールを定量する手法が主流であったが、前処理の煩雑さや分析に長時間を要するなどの問題点も多かった。現在では ELISA や RIA などの手法が確立されており[25,26]、当該分析手法によりコルチゾールの定量が実施されることも多い。しかしながら、ELISA は熱や pH に不安定な抗体が必要とされ、RIA は放射性同位体を使用するための特殊な設備が必要となるなどの問題点も存在する[27–29]。また、コルチゾールの定量を実施するにあたり、生体内から採取する検体は主に血液や唾液、尿などが考えられる。これらの検体の中でもコルチゾールの濃度は血液中で最も高いことが知られているが、血液検体の採取には医師の監督を必要とすることや採取時におけるストレス増加により正確な判断ができないことも多い。このため、現在では唾液検体からコルチゾールを抽出することで目的物質の定量を実施する分析手法が主流となりつつある[30–33]。

1-6. モレキュラーインプリンティング法による生物活性物質の認識

これまでにも MIP を利用した標的分子を特異的に認識する分子認識材料に関する研究結果が数多く報告されている。以下にこれまでに報告されている各生物活性物質を認識する MIP について記載する。

◇ ドーパミン

MIP を使用したドーパミンの選択的認識に関しては *Makote* ら (1998) により分子認識層として基板上にナノポーラスシリカを骨格とした薄膜を固定化し、標的分子を電気化学的に検出する研究結果が報告されている[34]。本報告ではゾル·ゲル法により、ドーパミンを鋳型分子としてテトラメトキシシランとフェニルトリメトキシシランの共縮合を行い、得られたゾル状の溶液をサイクリックボルタンメトリーの基板上にキャスト成形することでドーパミンを検出可能なフィルム状の分子センサーを構築

することに成功している。さらに、ドーパミンと類似の骨格を有するカテコールアミン類のエピネフリン、ノルエピネフリンを使用した結合実験を実施しており、ドーパミンに対する選択性も確認されている。

また、*Matsui* ら (2005) により、MIP を金基板に薄膜として固定化し、SPR を利用してドーパミンの高感度検出を可能にした研究結果も報告されている[35]。本報告ではドーパミンを認識するために機能性モノマーとしてアクリル酸、架橋剤として *N,N′*-メチレンビスアクリルアミド (MBAA)、コモノマーとして *N*-イソプロピルアクリルアミドを使用することで金基板上に薄膜として MIP を固定化し、SPR を利用したドーパミンの高感度センシングに成功している。

Dutta ら (2011) は金基板上に MIP を固定化した後、SPR を利用することで nM オーダーのドーパミン検出を可能にした研究結果について報告している[36]。本報告では機能性モノマーとして *p*-アミノスチレン、架橋剤として MBAA を使用することで基板上に MIP を薄膜として固定化し、SPR によりドーパミンに対する結合能を評価することで nM オーダーの標的分子の検出に成功している。さらに、ドーパミンと類似骨格を有するチラミンやカテコールの結合能を評価することで、標的分子に対する選択性も確認されている。

Yu ら (2012) は金ナノ粒子上に MIP を固定化して、ドーパミンを高感度に検出する手法について報告している[37]。本報告では金ナノ粒子上において機能性モノマーとしてフェニルトリメトキシシラン、架橋剤としてテトラメトキシシランを使用して、鋳型分子となるドーパミン存在下で共縮合することにより、shell 層に分子認識能を付与した core-shell 型 MIP を合成することに成功している。さらに得られた MIP を基板上に固定化し、サイクリックボルタンメトリーによりドーパミンの結合能を評価しており、その検出限界は ca. 20 nM であると報告されている。さらに、エピネフリンやノルエピネフリンといった構造類似体を評価することで標的分子に対する選択性も確認されている。

Mao ら (2012) は蛍光性のカーボンドット (CDs) 上に MIP を固定化し、蛍光検出にてドーパミンの結合能を評価する手法について報告している[38]。本報告では CDs 上において機能性モノマーに 3-アミノプロピルトリエトキシシラン、架橋剤としてテトラエトキシシランを使用して鋳型分子となるドーパミン共存下で共縮合することにより、shell 層に分子認識能を付与した core-shell 型 MIP を合成することに成功

している。MIP に対するドーパミンの結合に基づく蛍光強度の変化から結合能を評価しており、その検出限界は ca. 1.7 nM に達している。さらに、比較検体としてエピネフリンやアスコルビン酸を使用した結合能評価により、標的分子に対する選択性も確認されている。

Bouri ら (2012) は core にマグネタイト (Fe_3O_4) を使用した MIP 粒子を合成し、電気化学的にドーパミンを検出する手法について報告している[39]。本報告ではマグネタイト上において機能性モノマーとしてメタクリル酸、架橋剤として EDMA を使用することで MIP 微粒子を合成することに成功している。さらにキャピラリー電気泳動により、MIP に対するドーパミンの結合能を評価しており、エピネフリンやノルエピネフリンといった構造類似体を使用することでドーパミンに対する選択性も確認されている。さらに、実サンプルとなる尿中のドーパミンを検出することにも成功している。

Qian ら (2014) はカーボンナノチューブに MIP を固定化し、電気化学的手法によるドーパミンの高感度検出について報告している[40]。カーボンナノチューブ上において導電性のポリピロールを骨格とした MIP を合成し、サイクリックボルタンメトリーによりドーパミンの高感度検出に成功しており、その検出限界は ca. 10 pM と報告されている。

Zhou ら (2015) はグラフェン量子ドット上に MIP を固定化した微粒子を合成し、蛍光強度の変化に基づいたドーパミンの高感度検出について報告している[41]。グラフェン量子ドット上において鋳型分子となるドーパミン存在下、熱分解を行うことにより MIP を合成している。得られたグラフェン量子ドット MIP のドーパミン対する結合能は蛍光分析により評価しており、エピネフリンやドーパミンといった構造類似体を評価することで選択性の確認もされている。また、血清や尿中の実サンプルを使用した検出にも成功している。

これまでに、MIP を使用したドーパミンの認識に関する報告は 100 報以上におよび、近年では実サンプルを使用したドーパミン分析の迅速性と測定感度の向上を目的とした研究結果が数多く報告されている。

◇ アトラジン

アトラジンを選択的に認識する MIP の合成法は *Matsui* ら (1995) により報告さ

れている[42]。本報告では機能性モノマーとしてメタクリル酸を利用し、鋳型分子となるアトラジンと複合体を形成させた後、架橋剤となる EDMA とともに共重合させることで MIP を合成し、スキャッチャード解析により、MIP とアトラジンの解離定数 (K_d) を 1.2×10^{-5} M と推定している。また、アトラジンと類似の骨格を有するトリアジン系除草剤やその他の農薬を比較検体として評価することでアトラジンに対する選択性も確認されている。

さらに、*Shoji* ら (2003) は金基板に MIP を固定化し、電気化学的手法によるアトラジンセンサーについて報告している[43]。本報告では機能性モノマーとしてメタクリル酸、架橋剤として EDMA を使用して重合溶液を調整した後、その溶液を基板上に滴下し、光重合を行うことで MIP を金基板上に薄膜として固定化している。その後、サイクリックボルタンメトリーを使用した電気化学的手法により、アトラジンの結合能を評価しており、類似のトリアジン骨格を有する化合物を使用した結合実験からアトラジンに対する選択性が確認されている。

また、*Yane* ら (2006) はアトラジンを人体への影響が少ない物質へ変換する触媒作用を有する MIP の合成に関する研究結果について報告している[44]。本報告ではジスルフィド結合を利用したアトラジン骨格を有する鋳型分子を合成し、機能性モノマーとしてメタクリル酸、架橋剤として EDMA を使用して共重合させることで MIP を合成している。また、ジスルフィド結合を還元反応により切断することで鋳型分子を除去し、さらに酸化反応により分子認識空間内にスルホ基を導入することに成功している。得られた MIP を使用してアトラジンに対する結合能を評価しており、トリアジン骨格を有する構造類似体を評価することで選択性も確認されている。さらに、当該ポリマーはアトラジンのクロロ基をメトキシ基に変換する触媒作用を有することが確認されている。

Kubo ら (2006) はマイクロ流路を使用した単分散で球形のアトラジン認識 MIP の合成に関する研究結果について報告している[45]。本報告では機能性モノマーとしてメタクリル酸、架橋剤として EDMA を使用し、重合溶液を調整した後、マイクロ流路を使用して水系溶媒中に重合溶液を滴下することで油滴として分散させており、光重合を行うことで μm オーダーの球形で単分散な MIP を作製することに成功している。さらに、得られた MIP 粒子をクロマトカラムに充填し、HPLC を使用することでさまざまな農薬の結合能を評価することでアトラジンに対する選択性が確認さ

れている。

これまでに MIP を使用したアトラジンの分子認識に関する報告は 100 報近くにおよび、現在においても MIP を微粒子や薄膜として基板に固定化して分子センサーとして応用する試みが盛んに行われている。

◇ 4-ニトロフェニル α-D-マンノピラノシド

Wulff ら (1995) は 4-ニトロフェニル α-D-マンノピラノシド (NPM) を標的分子としたエナンチオ選択性を有する MIP の合成に関する研究結果について報告している[46]。本報告では NPM とビニルフェニルボロン酸の複合体を形成させ、架橋剤となる EDMA とともに共重合させることで NPM を認識する MIP を合成している。類似骨格を有するマンノース、フルクトース、ガラクトースの結合実験を実施することで、当該ポリマーは NPM に対する選択性が確認されており、光学異性体である L 体に対するエナンチオ選択性を有することも確認されている。

Miyahara ら (2000) は NPM に親和性の高い単分子膜状の MIP の合成に関する研究結果について報告している[47]。本報告では NMP を鋳型分子として 3-(10′,12′-ペンタコサジインアミド)フェニルボロン酸と 10,12-ペンタコサジイン酸を共重合することで、分子認識能を有するラングミュアブロジェット膜 (LB 膜) を形成させている。得られた単分子膜は鋳型分子を加えずに重合した NIP に比して NMP に対する親和性を 35% 向上させることに成功している。

MIP を使用した NPM の認識に関する研究結果は上述したような報告を含めた数報に限られているが、類似の糖類を認識する報告は数多くなされており、グルコースに関する研究結果に限定しても 20 報以上が報告されている。近年では水系溶媒中において機能する分子センサーに関する研究結果が数多く報告されている。

◇ コルチゾール

低極性溶媒中において、水素結合を利用した非共有結合型 MIP を合成し、コルチゾールに対する認識能を評価している報告はこれまでにもなされている。

Ramström ら (1996) はコルチゾールを選択的に認識可能なバルク状の分子認識材料を合成することに成功している[48]。本報告では機能性モノマーとしてメタクリル酸を使用して鋳型分子となるコルチゾールと非共有結合的に複合体を形成させた後、架

橋剤となる EDMA とともに共重合することで MIP を合成している。また、スキャッチャード解析により MIP に対するコルチゾールの解離定数を推定しており、さらに、MIP の選択性を評価するためにステロイド骨格を有する構造類似体を使用して競合法による阻害実験を実施しており、コルチゾールに対する選択性が確認されている。

一方で、*Baggiani* ら (2000) は合成した MIP をクロマトカラムに充填し、HPLC によりコルチゾールに対する選択性を評価している[49]。本報告では機能性モノマーとしてメタクリル酸を使用し、鋳型分子となるコルチゾールと複合体を形成させた後、架橋剤となる EDMA とともに共重合することで MIP を合成している。得られた MIP 粒子をクロマトカラムに充填し、HPLC によりコルチゾールに対する結合能を評価しており、ステロイド骨格を有する構造類似体を使用することでコルチゾールに対する選択性が確認されている。

MIP を使用したコルチゾールの認識に関する論文は上述したような報告を含めた数報に限られているが、コレステロールやコール酸をはじめとする類似のステロイド骨格を有する化合物の認識に関しては 100 報以上の研究結果が報告されており、近年では水系溶媒中において、実サンプルを使用したステロイド化合物の分子認識に関する研究結果が数多く報告されている。

1-7. 本研究の目的と意義

本研究の目的はこれまでに報告されてきた生物活性物質を認識するための MIP に高感度、高選択性、外部刺激応答性などの新たな機能を付与した機能性高分子材料を合成することである。これらの機能を有する分子認識材料の合成は分子センサー、アフィニティクロマトグラフィー、コントロールドリリースシステムなどの工学的方面へ応用できるものと期待している。以下に各章における目的と意義を記述する。

第 2 章ではジスルフィド結合とフェニルボロン酸環状エステルを有する鋳型分子を新たに設計·合成し、神経伝達物質の一種であるドーパミンを選択的に認識可能な多点認識型の機能性高分子材料を合成することにした。ドーパミンはエピネフリン、ノルエピネフリンとともにカテコールアミン類に分類されており、生体内において重要な役割を担っている。例えば、エキソサイトーシスによって細胞外に分泌されたドーパミンは特定の受容体に結合し、標的細胞の生理機能を調節する。また、神経変性疾患の一つであるパーキンソン病には生体内におけるドーパミン量の減少が関与し

ているものと考えられている。前述したとおり、MIP を使用したドーパミンの分子認識に関してはこれまでにも数多くの研究結果が報告されているが、その多くはドーパミンのアミノ基をアクリル酸やメタクリル酸によって認識するものやカテコール基を *p*-アミノスチレンなどのアミノ基を有する機能性モノマーを使用して認識するものであった。そこで、本章ではドーパミンを選択的に認識する機能性高分子材料を構築するにあたり、フェニルボロン酸基により、カテコール骨格のジオール基を認識する手法に加え、ドーパミンの 1 級アミンをスルホ基により認識する多点認識型の機能性高分子材料を合成することにした。しかしながら、アミノ基とスルホ基によるスルホン酸アミド結合を有する鋳型分子では一般に加水分解反応による鋳型分子の除去が難しいとされている。そこで、ジスルフィド結合が反応性に富むことを利用して、還元反応によりポリマーマトリックス内から、鋳型分子を除去すると同時に分子認識空間内の相補的な位置にチオール基を導入することにした。さらに、酸化反応により、分子認識空間内のチオール基をスルホ基に変換することでドーパミンに対する結合能を評価することにした (ポストインプリンティング修飾)。このように、多点認識を行うことで病気の診断や治療に有効とされるドーパミンを選択的に認識可能な高分子材料を合成することは臨床用途においても非常に有効で意義のあるものと考えられる。

第 3 章では MIP の分子認識空間内に外部刺激応答性の機能性モノマーを固定化することで、標的分子の放出制御が可能な高分子材料を合成することにした。前述したとおり、これまでにもスピロピランを利用して光照射により標的分子を放出することが可能な MIP の報告はなされている。しかしながら、これらの放出制御機能を有する MIP に関する報告はいずれもスピロピランの *N*-末端からメタクリロイル基を生成し、重合時のコモノマーとして使用するものであった。MIP は分子認識空間内の相補的な位置に標的分子と相互作用する官能基を導入することで標的分子に対する分子認識能を担保しているため、高分子主鎖にコモノマーとして含まれるスピロピラン骨格の光異性化のみでは光照射による標的分子の放出制御が不十分となる可能性が考えられた。そこで、本章では重合部位と分子認識部位を有する 2 官能性の外部刺激応答性機能性モノマーを新たに設計･合成し、MIP に取り込まれた標的分子を外部刺激により、高度に放出制御可能な分子認識材料を合成することにした。ここで、外部刺激としては主に熱、pH、光などが考えられるが、特に光照射は短時間で局所的

に刺激を与えることが容易である。このため、本研究では光照射により分子構造が変化する光応答性モノマーを分子認識空間内に固定化した分子認識材料を合成し、光照射時における標的分子の放出制御機能について検討することにした。光応答性モノマーにはアゾベンゼン、スピロピラン、サリチルデンアニンリン、ジアリールエテンなどが存在し、これまでに数多くの研究結果が報告されているが、その中でも光照射により劇的に分子構造と物性が変化するスピロピランを機能性モノマーとして使用することにした。標的分子の取り込み、貯蔵、放出といった一連の機能を有する分子認識材料の合成はコントロールドリリースシステムなど多方面への応用が期待でき、非常に有効で意義のあるものと考えられる。

第 4 章ではステロイド系ホルモンの一種であるコルチゾールを選択的に認識可能な分子認識材料の合成と蛍光偏光法を利用した高感度センシングシステムの構築を目的とした。コルチゾールは一般にストレスマーカーとして知られているため、当該ホルモンを選択的に認識可能な高分子材料を合成することは病気の診断や治療にとって非常に有効であり、当該物質を高感度に評価可能な分析系を確立することが求められている。前述したとおり、これまでにも MIP を使用したコルチゾールの選択的認識に関する報告はなされている。しかしながら、いずれも機能性モノマーとしてメタクリル酸を使用して低極性溶媒中で非共有結合的にコルチゾールとの複合体を形成させており、また、バルク状 MIP の合成によるものであったためコルチゾールに対する低親和性の分子認識空間が数多く存在する可能性が示唆された。そこで、本章では core-shell 型 MIP (MIP-NPs) を合成し、分子認識能の高感度化と高選択性を有するコルチゾール認識高分子材料を構築することにした。予備検討としてバルク状の MIP を合成し、コルチゾール対する結合能や選択性について評価した後、コルチゾールの高感度検出を目的として蛍光ラベル化コルチゾールと MIP-NPs を合成し、それらの分子間相互作用について評価した。また、蛍光ラベル化コルチゾールと MIP-NPs の複合体を利用して蛍光偏光法により分子間相互作用の解析を実施することで、B/F 分離を必要としない新たなコルチゾールセンシングシステムを構築することにした。これまでにも蛍光偏光法を用いた分子間相互作用の解析は生化学や医学の分野において数多く実施されているが、core-shell 型分子認識材料と生理活性物質の相互作用を解析した報告は少なく、蛍光異方性 (アニソトロピー (*r*)) が標的分子の結合能を評価する指標となり得ることを明確にする必要がある。また、遊離のコルチゾールによ

る競合実験を実施して蛍光偏光法と競合法を複合することにより、SPR や QCM を利用した高感度分子間相互作用測定装置を必要とせずに迅速かつ高感度にコルチゾールを分析する手法を確立することにした。

1-8. 本論文の構成

本論文は全 5 章から成り立っており、以下に本論文の構成を示す。

第 1 章では現在に至るまでの分子認識化学の発展の過程について言及し、本研究に関する目的と意義について述べた。

第 2 章では 生理活性物質の一種であるドーパミンを選択的に認識可能な機能性高分子材料の合成を目的として、新たにジスルフィド結合を有する鋳型分子を設計·合成し､MIP へ応用することにした｡すなわち､ジスルフィド結合の還元反応により、ポリマーマトリックス内から鋳型分子を除去すると同時に分子認識空間内の相補的な位置にチオール基を配置し、さらに官能基を酸化することでアミン類との相互作用が強いとされるスルホ基に変換するという後天的官能基変換法 (ポストインプリンティング修飾) について検討し、標的分子に対する結合能を評価することでその有効性について言及した。

第 3 章では光照射により分子構造が劇的に変化するスピロピラン骨格に相互作用部位と重合基を付与した機能性モノマーを新たに設計·合成した。また、分子認識空間内に当該モノマーを固定化することで外部刺激応答性の MIP を合成し、光照射の影響による標的分子の結合能の変化について評価した。すなわち、MIP の分子認識空間内にスピロピラン骨格を有する機能性モノマーを配置することで、標的分子の取り込み、貯蔵、放出といった一連の機能を有する外部刺激応答性の分子認識材料を合成し、その有効性について言及した。

第 4 章では MIP-NPs を使用した蛍光偏光法による新たなコルチゾールセンシングシステムについて検討した｡予備検討として MI 法で合成したバルク状高分子レセプター (MIP) に対するコルチゾールの結合能を確認するためにコルチゾールの 21 位の 1 級水酸基をメタクリロイル化し、鋳型分子として使用することでコルチゾールを認識する MIP を合成した。また、コルチゾールの構造類似体を使用してコルチゾールに対する選択性と結合能を評価した。さらに、コルチゾールの測定感度向上を目的として、shell 層に分子認識能を付与した MIP-NPs を合成し、工学的な方面に応

用するための最適な粒径について検討した。一方で、新たに蛍光ラベル化コルチゾールを合成することで、蛍光測定によりそれらの分子間相互作用を評価するとともに、MIP-NPs と蛍光ラベル化コルチゾールの複合体を使用することで、蛍光偏光法によるアニソトロピー (*r*) を指標とした蛍光ラベル化コルチゾールのセンシングを実施した。さらに、遊離のコルチゾールやその構造類似体による競合実験を実施することで MIP-NPs に対するコルチゾールの選択性を評価した。

第 5 章は本論文の総括であり、本研究内容を要約し、得られた成果をまとめたものである。

以上のように本研究ではこれまでに報告されている生物活性物質を認識する MIP に高感度、高選択性、放出制御機能などを付与した新たな MIP を合成することを目的とした。特定の標的分子を特異的に認識する高分子材料に新たな機能を付与することで、分子センサー、アフィニティクロマトグラフィー、コントロールドリリースシステムなどの工学的な方面への応用が期待できると考えられ、これらの基礎データは臨床検査や健康モニタリングなどの分野の進展にも大きく寄与するものと考えている。

【参考文献】

第 1 章

[1] 小宮山真·荒木孝二　著　分子認識と生体機能　朝倉書店 (1989)

[2] 築部浩　編著　分子認識化学　三共出版 (1997)

[3] 早下隆士·築部浩　編著　分子認識と超分子　三共出版 (2007)

[4] G. Wulff, Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates-A Way towards Artificial Antibodies, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995,** 34, 1812–1832.

[5] K. Haupt and K. Mosbach, Molecularly Imprinted Polymers and their Use in Biomimetic Sensors, *Chem. Rev.* **2000,** 100, 2495–2504.

[6] S.-W. Lee and T. Kunitake, *Handbook of Molecular Imprinting: Advanced Sensor Applications*, Pan Stanford Publishing: Singapore, **2013.**

[7] B. Sellergren, *Molecularly Imprinted Polymers*, Elsevier: Amsterdam, **2000.**

[8] K. Haupt, *Molecular Imprinting*, Springer: Berlin, **2012.**

[9] S. Li, S. Cao, M. J. Whitcombe, and S. A. Piletsky, Size Matters: Challenges in Imprinting Macromolecules, *Prog. Polym. Sci.* **2014,** 39, 145–163.

[10] M. Komiyama, T. Takeuchi, T. Mukawa, and H. Asanuma, *Molecularly Imprinting: From Fundamentals to Applications*, Wiler-VCH: Weinheim, **2003.**

[11] G. Wulff and S. Schauhoff, Racemic Resolution of Free Sugars with Macroporous Polymers Prepared by Molecular Imprinting. Selectivity Dependence on the Arrangement of Functional Groups versus Spatial Requirements, *J. Org. Chem.* **1991,** 56, 395–400.

[12] R. Andersson, B. Sellergren, and K. Mosbach, Imprinting of Amino Acid Derivatives in Macroporous Polymers, *Tetrahedron Lett.* **1984,** 25, 5211–5214.

[13] O. M. Petrukhin, S. P. Pogorelova, A. B. Kharitonov, and E. V. Shipulo, Molecularly Selective Field-Effect Transistors for Determining Nicotinamide Adenine Dinucleotide and its Phosphates, *Anal. Chem.* **2007,** 62, 894–902.

[14] M. Tatemichi, M. Sakamoto, M. Mizuhata, S. Deki, and T. Takeuchi, Protein-Templated Organic/Inorganic Hybrid Materials Prepared by Liquid-Phase Deposition, *J. Am. Chem. Soc.* **2007,** 129, 10906–10910.

[15] M. J. Whitcombe, M. E. Rodriguez, P. Villar, and E. N. Vulfson, A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol, *J. Am. Chem. Soc.* **1995,** 117, 7105–7111.

[16] G. Vlatakis, L. I. Andersson, R. Müller, and K. Mosbach, Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting, *Nature* **1993,** 361, 645–647.

[17] T. Takeuchi, A. Seko, J. Matsui, and T. Mukawa, Molecularly Imprinted Polymer Library on a Microtiter Plate. High-Throughput Synthesis and Assessment of Cinchona Alkaloid-Imprinted Polymers, *Instrum. Sci. Technol.* **2001,** 29, 1–9.

[18] J. Matsui, Y. Miyoshi, O. Doblhoff-Dier, and T. Takeuchi, Molecularly Imprinted Synthetic Polymer Receptor Selective for Atrazine, *Anal. Chem.* **1995,** 67, 4404–4408.

[19] G. Wulff and A. Sarhan, The Use of Polymers with Enzyme-Analogous Structures for the Resolution of Racemates, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1972,** 11, 341–344.

[20] R. Arshady and K. Mosbach, Synthesis of Substrate-Selective Polymers by Host-Guest Polymerization, *Macromol. Chem. Phys.* **1981,** 182, 687–692.

[21] 日本比較内分泌学会　編　ステロイドホルモンの生物化学 学会出版センター (1978)

[22] M. Gordic, *Theoretical modeling of cortisol sensor*, Theses and Dissertations, University of South Florida, **2008.**

[23] 関得一郎　著　カテコールアミンの測定　臨床化学　第 9 巻 272–278 (1980)

[24] 北村進一·中屋慎　著　糖の定量法　生物工学　第 90 巻 790–793 (2012)

[25] C. M. Huang and M. Zweig, Evaluation of Radioimmunoassay of Urinary Cortisol without Extraction, *Clin. Chem.* **1989,** 35, 125–126.

[26] R. A. Dressendorfer, C. Kirschbaum, W. Rohde, F. Stahl, and C. J. Strasburger, Synthesis of a Cortisol-Biotin Conjugate and Evaluation as a Trancer in an Immunoassay for Salivary Cortisol Measurement, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1992,** 43, 683–692.

[27] 脇田慎一·田中喜秀·永井秀典　著　ストレスマーカーの迅速アッセイ　ぶんせき　第 6 号 309–316 (2004)

[28] 大倉洋甫·甲斐雅亮·能田均　著　蛍光および化学発光法による生体成分の高感度分析　分析化学総説 (1994)

[29] J. G. Lewis, Steroid Analysis in Saliva: An overview, *Clin. Biochem. Rev.* **2006,** 27, 139–146.

[30] S. S. Dickerson and M. E. Kemeny, Acute Stressors and Cortisol Responses: A Theoretical Integration and Synthesis of Laboratory Research, *Psychol. Bull.* **2004,** 130, 355–391.

[31] R. Rosmond, M. F. Dallman, and P. Bjorntorp, Stress-Related Cortisol Secretion in Men: Relationships with Abdominal Obesity and Endocrine, Metabolic and Hemodynamic Abnormalities, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1998,** 83, 1853–1859.

[32] C. Kirschbaum, O. T. Wolf, M. May, W. Wippich, and D. H. Hellhammer, Stress- and Treatment-Induced Elevations of Cortisol Leveles Associated with Impaired Declarative Memory in Healthy Adults, *Life Sci.* **1996,** 58, 1475–1483.

[33] M. Yamaguchi, Y. Matsuda, S. Sasaki, M. Sasaki, Y. Kadoma, Y. Imai, D. Niwa, and V. Shetty, Immunosensor with Fluid Control Mechanism for Salivary Cortisol Analysis, *Biosens. Bioelectron.* **2013,** 41, 186–191.

[34] R. Makote and M. M. Collinson, Dopamine Recognition in Templated Silicate Films, *Chem. Comm.* **1998,** 3, 425–426.

[35] J. Matsui, K. Akamatsu, N. Hara, D. Miyoshi, H. Nawafune, K. Tamaki, and N. Sugimoto, SPR Sensor Chip for Detection of Small Molecules Using Molecularly Imprinted Polymer with Embedded Gold Nanoparticles, *Anal. Chem.* **2005,** 77, 4282–4285.

[36] P. Dutta, R. B. Pernites, C. Dantda, and R. C. Advincula, SPR Detection of Dopamine Using Cathodically Electropolymerized, Molecularly Imprinted Poly-*p*-aminostyrene Thin Films, *Macromol. Chem. Phys.* **2011,** 212, 2439–2451.

[37] D. Yu, Y. Zeng, Y. Qi, T. Zhou, and G. Shi, A Novel Electrochemical Sensor for Determination of Dopamine Based on AuNPs@SiO_2 Core-Shell Imprinted Composite, *Biosens. Bioelectron.* **2012,** 38, 270–277.

[38] Y. Mao, Y. Bao, D. Han, F. Li, and L. Niu, Efficient One-Pot Synthesis of Molecularly Imprinted Silica Nanospheres Embedded Carbon Dots for Fluorescent Dopamine Optosensing, *Biosens. Bioelectron.* **2012,** 38, 55–60.

[39] M. Bouri, M. J. Lerma-García, R. Salghi, M. Zougagh, A. Ríos, Selective Extraction and Determination of Catecholamines in Urine Samples by Using a Dopamine Magnetic Molecularly Imprinted Polymer and Capillary Electrophoresis, *Tlanta* **2012,** 99, 897–903.

[40] T. Qian, C. Yu, X. Zhou, P. Ma, S. Wu, L. Xu, and J. Shen, Ultrasensitive Dopamine Sensor Based on Novel Molecularly Imprinted Polypyrrole Coated Carbon Nanotubes, *Biosens. Bioelectron.* **2014,** 58, 237–241.

[41] X. Zhou, Z. Wang, C. Yu, S. Wu, and J. Shen, Facile Synthesis of Molecularly Imprinted Graphene Quantum Dots for the Determination of Dopamine with Affinity-Adjustable, *Acs Appl. Mater. Interfaces.* **2015,** 7, 11741–11747.

[42] J. Matsui, Y. Miyoshi, O. Doblhoff-Dier, and T. Takeuchi, A Moleculaly Imprinted Synthetic Polymer Receptor Selective for Atrazine, *Anal. Chem.* **1995,** 67, 4404–4408.

[43] R. Shoji, T. Takeuchi, and I. Kubo, Atrazine Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymer-Modified Gold Electrode, *Anal. Chem.* **2003,** 75, 4882–4886.

[44] T. Yane, H. Shinmori, and T. Takeuchi, Atrazine Transforming Polymer Prepared by Molecular Imprinting with Post-Imprinting Process, *Org. Biomol. Chem.* **2006,** 4, 4469–44.

[45] A. Kubo, H. Shinmori, and T. Takeuchi, Atrazine-Imprinted Microspheres Prepared Using a Microfluidic Device, *Chem. Lett.* **2006,** 35, 588–589.

[46] G. Wulff and S. Schauhoff, Racemic Resolution of Free Sugars with Macroporous Polymers Prepared by Molecular Imprinting. Selectivity Dependence on the Arrangement of Functional Groups versus Spatial Requirements, *J. Org. Chem.* **1991,** 56, 395–400.

[47] T. Miyahara and K. Kurihara, Two-Dimensional Molecular Imprinting: Binding of Sugars to Boronic Acid Functionalized, Polymerized Langmuir-Blodgett Films, *Chem. Lett.* **2000,** 29, 1356–1357.

[48] O. Ramström, L. Ye, and K. Mosbach, Artificial Antibodies to Corticosteroids Prepared by Molecular Imprinting, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 471–477.

[49] C. Baggiani, G. Giraudi, F. Trotta, C. Giovannoli, and A.Vanni, Chromatographic Characterization of a Molecular Imprinted Polymer Binding Cortisol, *Talanta* **2000**, 51, 71–75.

第 2 章
ポストインプリンティング修飾による
ドーパミン認識材料の創製

2-1. 緒言

チオール基を有する化合物は非常に反応性に富むために有機合成の分野において広く利用されている。チオラートアニオン類は求核力が強く、チオール基の α 位のプロトンは強塩基によって容易にカルボアニオンとなり、求電子試薬との反応で各種の置換チオールに変換される。このように反応性に富み、二重結合や三重結合、水酸基やその他の官能基を有するさまざまな置換チオールは有機化学の分野において非常に重要である[1]。また、有機化学のみならず、生体内の分子認識においてもチオール基を有する生体関連物質は重要な役割を担っている。特にシステインのチオール基とシスチンのジスルフィド結合は生化学の分野で注目されてきた。タンパク質内部において 2 個のシステイン残基はタンパク質の 3 次元構造で隣接している場合、酸化反応によりジスルフィド結合を形成する。また、還元反応によってジスルフィド結合は容易に切断され、可逆的にもとのシステイン残基を形成する。このタンパク質の構造安定性およびジスルフィド結合が酸化·還元反応を起こしやすいという点を利用して酵素の熱安定性を増大させることで触媒としての工業的有用性を高めるために部位特異的変異を用いて酵素に分子内ジスルフィド結合を導入する試みもなされている。一方で、これまでにもジスルフィド結合を利用した MIP またはそれに類似した機能性高分子材料の合成法に関する研究結果が報告されている。

D'Oleo ら (2001) はジスルフィド結合を有する機能性モノマーとして *N,N'*-シスタミンビス(アクリルアミド) (BAC) を使用した機能性高分子の合成に関する研究結果について報告している[2]。本報告では架橋剤として *N,N'*-メチレンビスアクリルアミドを使用し、機能性モノマーとして *N*-イソプロピルアクリルアミドと BAC を使用することでポリマーマトリックス内にジスルフィド結合を有する機能性高分子を合成することに成功している。また、ジチオスレイトール (DTT) を使用した還元反応により、ポリマーマトリックス内にチオール基を生成し、過酸化水素/酢酸を使用した酸化反応により、チオール基をスルホ基に変換することに成功している。さらに、本手法により得られたポリマーに対するカルシウムイオンの結合能を評価している。

Mukawa ら (2002) はジスルフィド結合を有する鋳型分子を使用して MIP を合成し、さまざまな官能基を有するフェニル化合物に対する結合能を評価している[3]。本報告では鋳型分子としてアリルフェニルジスルフィドを使用し、架橋剤となるジビニルベンゼンとともに共重合することで MIP を合成している。その後、ジスルフィド

結合の還元反応により鋳型分子を除去することで、分子認識空間内にチオール基を生成した後、酸化反応により、当該官能基をスルホ基に変換することに成功している。合成した MIP をステンレスカラムに充填し、HPLC を使用して異なる官能基を有するフェニル化合物の結合能について評価しており、当該ポリマーはフェノールに対する結合能が最も高いことを明らかにしている。さらに、分子認識空間内のチオール基をスルホ基へ変換することで、フェニル化合物に対する結合能が増大する可能性があると報告している。

しかしながら、前者の報告は重合時に標的分子（あるいはその構造類似体）となる鋳型分子を使用していないため、ある特定のイオンのみを認識する高分子材料に関する報告であった。また、後者の報告はスルホ基による単点認識であるために非特異的吸着の影響により、標的分子に対する厳密な分子認識能が妨げられていた。

本章では、前述したように病気の診断や治療に対して非常に有効とされるドーパミンを選択的に認識可能な機能性高分子材料を合成し、標的分子に対する認識能を向上させることを目的とした。これまでにも MIP を利用したカテコールアミン類の認識に関する研究結果は数多く報告されているが[4–16]、その多くがドーパミンの 1 級アミンをアクリル酸やメタクリル酸によって認識するものやカテコール基を *p*-アミノスチレンなどのアミノ基を有する機能性モノマーで認識する単点認識によるものであった。そこで、本研究ではドーパミンの認識を行うに際して、カテコール骨格のジオール基をボロン酸エステルによって認識する手法に加え、1 級アミンをスルホ基との静電的相互作用に利用することで、多点認識可能な機能性高分子材料を合成することにした。しかしながら、ドーパミンのアミノ基とスルホ基によるスルホン酸アミド結合を有する鋳型分子では一般に加水分解反応による鋳型分子の除去が難しいとされている。そこで、ジスルフィド結合とボロン酸エステルを有する鋳型分子を新たに設計·合成し、還元反応および加水分解反応によって鋳型分子を除去すると同時に分子認識空間内にチオール基を配置することにした。さらに分子認識空間内のチオール基を酸化反応によってアミノ基との相互作用が強いとされるスルホ基に変換した MIP を合成することで、標的分子に対する結合能·選択性を向上させることにした(ポストインプリンティング修飾) (***Figure 2-1***)。

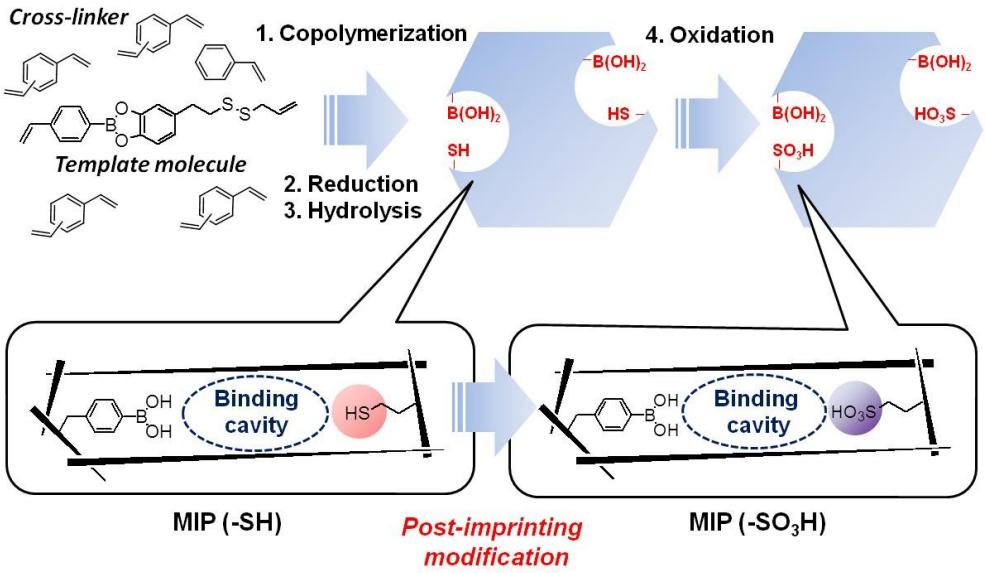


Figure 2-1. Preparation of MIP for dopamine and post-imprinting modification.

2-2. 実験

2-2-1. 試薬

第 2 章で使用した試薬を ***Table 2-1*** に記載した。なお、有機合成に使用したジクロロメタン、トルエンおよび重合に使用したクロロホルムは系内に存在する安定剤や水分を除去するために蒸留した。また、重合時に使用したジビニルベンゼン、スチレンは系内に存在する重合禁止剤を除去するために減圧蒸留した。有機合成および分析に使用した純水は Milli-Q (Merck Millipore Corp, Germany) にて精製した。

Table 2-1. Reagent list.

Reagent	Maker	Grade
3,4-dimethoxy styrene	Sigma-Aldrich Co. LLC. (USA)	technical grade, contains 1% HQ
allyl disulfide	Sigma-Aldrich Co. LLC. (USA)	≥ 80 %
4-vinylphenylboronic acid (4-VPBA)	Sigma-Aldrich Co. LLC. (USA)	―
phenylboronic acid (PBA)	Sigma-Aldrich Co. LLC. (USA)	≥ 97.0 %
boron tribromide	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
sodium sulfate	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
sodium hydroxide (NaOH)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
1 M hydrochloric acid (HCl)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	for volumetric analysis
triethylamine (Et_3N)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
divinylbenzene (DVB)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	55% (mixture of isomers)
styrene	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
2,2′-azobis(isobutyronitrile) (V-60)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
sodium borohydride	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
silver nitrate (I)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
iron (III) nitrate nonahydrate	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
potassium thiocyanate	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
hydrogen peroxide	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
acetic acid	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
1 M sulfuric acid	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	for volumetric analysis
sodium chloride	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
thioacetic acid	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)	extra pure reagent
ethyl acetate	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade

hexane	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
dichloromethane	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
diethyl ether	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
ethanol	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
toluene	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
chloroform	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
methanol	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
chloroform-*d* ($CDCl_3$)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	99.8% (+0.05% TMS)

2-2-2. 分析装置

合成物の同定には ^{1}H NMR (JNM-LA300, JEOL Ltd., Japan) を使用した。また、MIP に対する結合能評価には 2 つのポンプ (Gilson model 305 and 306)、オートインジェクター (Gilson model 234) と UV/Vis 検出器 (Gilson model 119) を連結した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (Gilson Inc, USA) を使用した。

2-2-3. 鋳型分子の合成

◇ *S*-[2-(3,4-ジメトキシフェニル)エチル]チオアセテート **(2)** の合成

なす型フラスコに 3,4-ジメトキシスチレン **(1)** (5.00 g, 30.5 mmol) とチオ酢酸 (2.62 mL, 36.6 mmol) を量りとり、500 W のハロゲンランプで光照射の下、7 h 室温で撹拌した[17]。反応液をカラムクロマトグラフィー (展開層: シリカゲル (C-200), 展開溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン=1:3, v/v) で分離·精製し、真空乾燥させることで白色の固体として *S*-[2-(3,4-ジメトキシフェニル)エチル]チオアセテート **(2)** を得た。(収率: 84%, 6.14 g)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 2.34 (3H, s, -CH_3), 2.80 (2H, t, -CH_2-), 3.11 (2H, t, -CH_2-), 3.86 (3H, s, O-CH_3), 3.88 (3H, s, O-CH_3) and 6.74–6.81 (3H, m, aromatic protons)

◇ *S*-[2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル]チオアセテート **(3)** の合成

二口フラスコに *S*-[2-(3,4-ジメトキシフェニル)エチル]チオアセテート **(2)** (6.00 g, 25.0 mmol) を量りとり、dry ジクロロメタン (80 mL) に溶解し、ドライアイス·アセトンバス (-78 °C) にて冷却した。そこへ、滴下ロートにて dry ジクロロメタン (20 mL) に溶解した三臭化ホウ素 (4.10 mL, 42.4 mmol) を徐々に滴下した[18]。その後、7 h 還流し、さらに室温で 24 h 撹拌した。反応終了後、純水 (10 mL) を徐々に加えて 10

min 程度撹拌した後、有機層を分離し、水層をジエチルエーテル (80 mL) で 4 回抽出した。有機層を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させた後、固形物を濾過し、ロータリーエバポレーターにて溶媒を留去した。その後、カラムクロマトグラフィー (展開層: シリカゲル (C-200), 展開溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン=1:2, v/v) で分離·精製した後、真空乾燥させることで橙色の固体として *S*-[2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル]チオアセテート **(3)** を得た。(収率: 86%, 4.56 g)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 2.33 (3H, s, -CH_3), 2.73 (2H, t, -CH_2-), 3.06 (2H, t, -CH_2-), 6.19 (2H, broad, 2×-OH) and 6.63–6.81 (3H, m, aromatic protones)

◇ 1,2-ジヒドロキシ-4-(2-メルカプトエチル)ベンゼン **(4)** の合成

窒素雰囲気下、*S*-[2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル]チオアセテート **(3)** (4.24 g, 20.0 mmol) を 0.2 M NaOH 水溶液/エタノール (1:1, v/v) (80 mL) に溶解し、室温で 5 h 撹拌した[19]。反応終了後、反応液を 1 M HCl 水溶液で中和し、酢酸エチル (50 mL) で 5 回抽出した後、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた。固形分を濾過し、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去した後、カラムクロマトグラフィー (展開層: シリカゲル (C-200), 展開溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン=1:2, v/v) で分離·精製した。その後、真空乾燥させることで白色固体として 1,2-ジヒドロキシ-4-(2-メルカプトエチル)ベンゼン **(4)** を得た。(収率: 92%, 3.11 g)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 1.41 (1H, t, -SH), 2.72–2.83 (4H, m, -CH_2CH_2-), 5.83 (2H, brord, 2×-OH), 6.61–6.82 (3H, m, aromatic protones)

◇ 4-[2-(アリルジチオ)エチル]カテコール **(5)** の合成 (ジスルフィド交換反応)

窒素雰囲気下、二口フラスコに 1,2-ジヒドロキシ-4-(2-メルカプトエチル)ベンゼン **(4)** (3.00 g, 17.6 mmol) とアリルジスルフィド (25.7 g, 176 mmol) を加え、そこへ、Et_3N (5 mL) を滴下し、60 °C で 8 h 撹拌した[20]。室温まで冷却した後、ヘキサンを徐々に加え、析出してきた固体を濾過により回収し、カラムクロマトグラフィー (展開層: シリカゲル (C-200), 展開溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン=1:2, v/v) で分離·精製した。その後、真空乾燥させることで黄色透明な粘稠固体として 4-[2-(アリルジチオ)エチル]カテコール **(5)** を得た。(収率: 46%, 1.96 g)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 2.72–2.94 (4H, m, -CH_2CH_2-), 3.37 (2H, d, -CH_2-), 5.15–5.25 (2H, m, -CH=CH_2), 5.56 (2H, brord, 2×-OH), 5.83–5.94 (1H, m, -C*H*=CH_2) and 6.63–6.83 (3H, m, aromatic protons)

◇ 5-[2-(アリルジチオ)エチル]-2-(4-ビニルフェニル)ベンゾ[1,3,2]ジオキサボロール **(Template1)** の合成

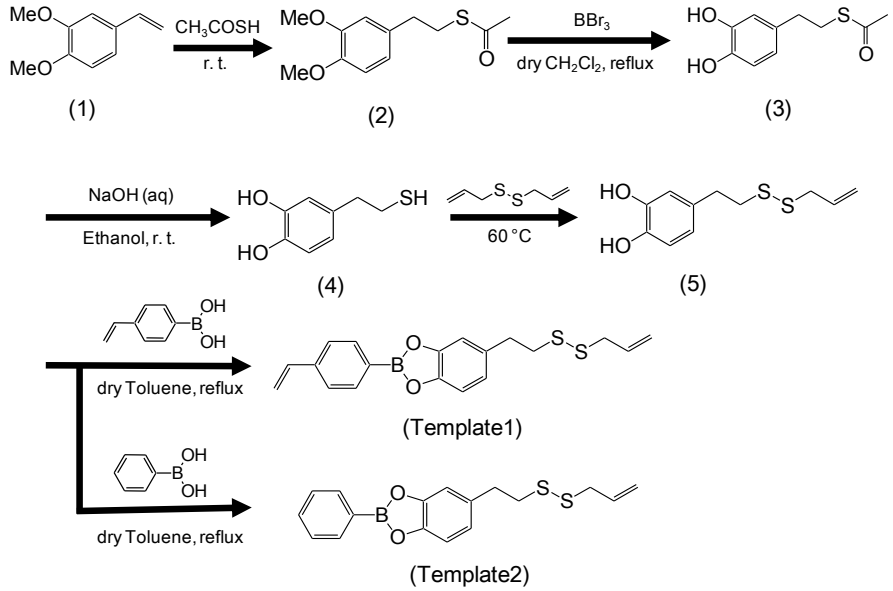
ディーン･スターク装置を使用して、4-VPBA (1.48 g, 10.0 mmol) を dry トルエン (80 mL) 中で 3 h 還流した。その後、ロータリーエバポレーターにて溶媒を留去し、真空乾燥させることで 4-VPBA の無水物を形成させた。さらに、4-VPBA (無水物) (351 mg, 0.9 mmol) と 4-[2-(アリルジチオ)エチル]カテコール **(5)** (654 mg, 2.7 mmol) を dry トルエン (80 mL) に溶解し、3 h 還流した。未溶解物を濾過により除去し、溶媒をロータリーエバポレーターにて留去した。その後、真空乾燥させることで黄色透明な粘稠固体として 5-[2-(アリルジチオ)エチル]-2-(4-ビニルフェニル)ベンゾ[1,3,2]ジオキサボロール **(Template1)** を得た。(収率: 81%, 774 mg)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 2.69–2.91 (4H, m, -CH_2CH_2-), 3.36 (2H, d, -CH_2-), 5.14–5.28 (2H, m, -CH=CH_2), 5.35 (1H, d, -C*H*=CH_2), 5.83–5.94 (2H, m, -C*H*=CH_2 and -CH=CH_2), 6.63–6.83 (4H, m, aromatic protones and -CH=CH_2), 7.51 (2H, d, aromatic protones) and 8.15 (2H, d, aromatic protones)

◇ 5-[2-(アリルジチオ)エチル]-2-(フェニル)ベンゾ[1,3,2]ジオキサボロール **(Template2)** の合成

ディーン･スターク装置を使用して、PBA (1.22 g, 10.0 mmol) を dry トルエン (80 mL) 中で 3 h 還流した。その後、ロータリーエバポレーターにて溶媒を留去し、真空乾燥させることで PBA の無水物を形成させた。さらに、PBA (無水物) (281 mg, 0.9 mmol) と 4-[2-(アリルジチオ)エチル]カテコール **(5)** (654 mg, 2.7 mmol) を dry トルエン (150 mL) に溶解し、3 h 還流した。未溶解物を濾過により除去し、ロータリーエバポレーターにて溶媒を留去した。その後、真空乾燥させることで黄色透明な粘稠固体として 5-[2-(アリルジチオ)エチル]-2-(フェニル)ベンゾ[1,3,2]ジオキサボロール **(Template2)** を得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 2.63–2.89 (4H, m, -CH_2CH_2-), 3.32 (2H, d, -CH_2-), 5.09–5.26 (2H, m, CH=CH_2), 5.78–5.94 (1H, m, CH=CH_2), 6.60–6.78 (3H, m, aromatic protones) and 7.30–8.20 (5H, m, aromatic protones)



Scheme 2-1. Synthesis of template moleucules with disulfide bond.

2-2-4. ドーパミンを認識する MIP の合成

ガラスチューブに **Template1** (2 mmol)、DVB (50 mmol)、スチレン (10 mmol)、V-60 (500 mg) を dry クロロホルム (5 mL) に溶解し、5 min 程度窒素置換した。その後、UV ランプ (XX-15L, UVP, Upland, CA) にて 365 nm の紫外光を照射し、5 °C で 24 h、さらに、80 °C で 3 h 重合した。得られたポリマーを粒径が数 μm 程度となるように物理的に粉砕することで MIP (T1) 粒子を得た。また、同様の実験操作にて **Template1** の代わりに **Template2** を加えて重合した MIP (T2) 粒子を得た。さらに、ジスルフィド結合を切断し、ポリマーマトリックス中から鋳型分子を除去するために MIP (T1) 粒子および MIP (T2) 粒子をそれぞれ、水素化ホウ素ナトリウム (757 mg, 20 mmol) を加えたメタノール (100 mL) に懸濁させ、室温で 12 h 撹拌した[3]。この操作を 3 回繰り返した後、ボロン酸エステルを加水分解するために 5% HCl 水溶液/メタノール (1:1, v/v) (100 mL) 中で 12 h 撹拌した。その後、純水/メタノール (1:1, v/v) (100 mL) 中で 2 回、メタノール中で 1 回それぞれ数時間撹拌し、真空乾燥させることで鋳型分子を除去した MIP (T1-SH) および MIP (T2-SH) 粒子を得た。また、MIP の分子認識空間内に存在するチオール基を定量するために MIP (T1-SH) および

MIP (T2-SH) 粒子 (200 mg) をそれぞれ、メタノール/10 mM 硝酸銀 (I) 水溶液 (4:1, v/v) (20 mL) 中で 3 h 撹拌した。ポリマー粒子を濾過した後、濾液を純水にて 100 mL になるように調整した後、硝酸鉄 (III) 九水和物を適量加え、そのうち 10 mL を分取し、2 mM のチオシアン酸カリウムメタノール溶液で滴定した[21]。

2-2-5. ポストインプリンティング修飾

分子認識空間内に存在するチオール基を酸化するために MIP (T1-SH) および MIP (T2-SH) 粒子をぞれぞれ、過酸化水素水/酢酸 (1:1, v/v) (100 mL) に懸濁させ、12 h 撹拌した[2,3]。ポリマー粒子を濾過した後、0.1 M 硫酸/メタノール (1:1, v/v) (100 mL) の溶液で 2 回撹拌し、さらにメタノール (100 mL) で 2 回それぞれ数時間撹拌した。ポリマー粒子を濾過した後、真空乾燥させることで MIP (T1-SO_3H) および MIP (T2-SO_3H) 粒子を得た。さらに、MIP (T1-SO_3H) および MIP (T2-SO_3H) 粒子 (200 mg) をそれぞれ、1 M NaCl 水溶液 (100 mL) で 3 回処理し、イオン交換による水素イオン濃度からポリマーマトリックス中に存在するスルホ基の総量を定量した。

2-2-6. MIP に対する標的分子の結合能評価

MIP (T1-SH)、MIP (T2-SH)、MIP (T1-SO_3H)、MIP (T2-SO_3H) をそれぞれ、クロマトカラム (150 mm × 4.6 mm I.D.) に充填し、HPLC に接続した。溶離液はアセトニトリル/10 mM リン酸緩衝液 pH 11.0 (1:1, v/v)、アセトニトリル/10 mM グリシン緩衝液 pH 9.5 (1:1, v/v)、アセトニトリル/10 mM リン酸緩衝液 pH 6.8 (1:1, v/v) とし、流速を 1 mL/min、検出波長を 254 nm として、各サンプル (ドーパミン、チラミン、カテコール、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)、4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル酢酸 (ホモバニリン酸, HVA)、エピネフリン、ノルエピネフリン) (10 μL) をそれぞれ、3 回インジェクションし、各検体の保持時間を計測した。また、分子間相互作用の指標となるリテンションファクター (k') は下記の定義式 ***(2-1)*** を使用して求めた。

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \qquad \textbf{(2-1)}$$

ここで、t_R は各サンプルの保持時間、t_0 はボイドマーカーとして使用した硝酸カリウムの保持時間である。

2-3. 結果と考察

2-3-1. MIP の合成とポストインプリンティング修飾

フェニルボロン酸を利用して糖類の水酸基を認識する MIP の合成に関する研究結果は *Wulff* らによって報告されており、酸性条件下で環状エステル結合が切断され、分子認識空間内にフェニルボロン酸基を生成し、アルカリ性条件下で再エステル化することにより、標的分子と強く相互作用することが知られている[22]。また、ジスルフィド結合は還元反応により容易に切断可能なため、ジスルフィド結合を有する鋳型分子を合成することで分子認識空間内の相補的な位置にチオール基を配置することが可能である。本研究ではこれらの特性を利用してジスルフィドにて結合したアリル基とボロン酸環状エステルにて結合したフェニルボロン酸基を有する 2 官能性の鋳型分子 **(Template1)** を新たに設計･合成し、MIP の合成へ応用することで、多点認識可能な機能性高分子材料の合成法を見出した。

Scheme 2-1 に従って、ジスルフィド結合と環状エステル結合により、重合基を組み込んだ 2 官能性の鋳型分子 **(Template1)** を設計･合成し、架橋剤となる DVB、コモノマーとなるスチレンとともに共重合することで MIP (T1) を合成した。また、比較対象としてジスルフィド結合側にのみ重合基を組み込んだ **Template2** を合成し、同様の手法にて MIP (T2) を合成した。なお、架橋剤には還元剤や酸に対して比較的安定であり、ベンゼン環との π-π スタッキングによる相互作用が期待される DVB を使用し、架橋度を調整するためのコモノマーとしてスチレンを使用した。

MIP (T1) および MIP (T2) 中に存在するジスルフィド結合は比較的、温和な還元剤 (水素化ホウ素ナトリウム) を使用することにより、また、ボロン酸による環状エステル結合は酸性条件下で加水分解することにより、いずれも簡便に切断可能であることから､分子認識空間内にチオール基を有する機能性高分子材料として MIP (T1-SH) および MIP (T2-SH) を合成することに成功した。MIP (T1-SH) および MIP (T2-SH) 中の分子認識空間内に固定化されたチオール基の含量はいずれも 175 μmol/g であり、これは MIP に固定化された全ての鋳型分子が還元反応によって除去されたと仮定した場合に生成するチオール基の含量の ca. 70% に相当した。さらに、鋳型分子除去後に分子認識空間内に存在するチオール基を過酸化水素/酢酸および硫酸によって処理することで、アミン類と強く相互作用するスルホ基に変換し (ポストインプリンティング修飾)､カテコールアミン骨格を有する化合物を認識するための分子認識空間が

構築された機能性高分子材料である MIP (T1-SO_3H) を合成した。また、同様の実験操作にて対照サンプルとなる **Template2** を使用することで分子認識空間内にフェニルボロン酸基を有しない MIP (T2-SO_3H) を調整した。ポストインプリンティング修飾後のポリマーである MIP (T1-SO_3H) および MIP (T2-SO_3H) 中のスルホ基の含量はそれぞれ 120 μmol/g および 110 μmol/g であり、これは全てのチオール基が酸化されたと仮定した場合の ca. 70% に相当した。その結果、全てのプロセスを通して、重合時の鋳型分子量から仮定される官能基の ca. 50% がスルホ基として分子認識空間内に固定化されたものと考えられる。

2-3-2. MIP に対する標的分子の結合能評価

MIP (T1-SH)、MIP (T2-SH)、MIP (T1-SO_3H)、MIP (T2-SO_3H) をそれぞれ、クロマトカラムに充填し、HPLC を使用して標的分子の結合能を評価した。その結果、pH 9.5 の緩衝液中において、分子認識空間内にフェニルボロン酸基を有していない MIP (T2-SH) および MIP (T2-SO_3H) を使用した場合のドーパミンのリテンションファクター (*k'*) はそれぞれ 0.03±0.01 および 13.08±0.24 であった。この結果は分子インプリンティング後に官能基を変換 (ポストインプリンティング修飾) することで得られた分子認識空間内に存在するスルホ基がポジティブチャージのドーパミンのアミノ基と強く静電的相互作用していることを示唆しており、ポストインプリンティング修飾が有効に機能していることが判明した。また、pH 9.5 の緩衝液中において、カテコールに比して分子構造内にアミノ基を有するドーパミンおよびチラミンが MIP (T2-SO_3H) に対して強く相互作用していることが判明した **(*Figure2-2*)**。

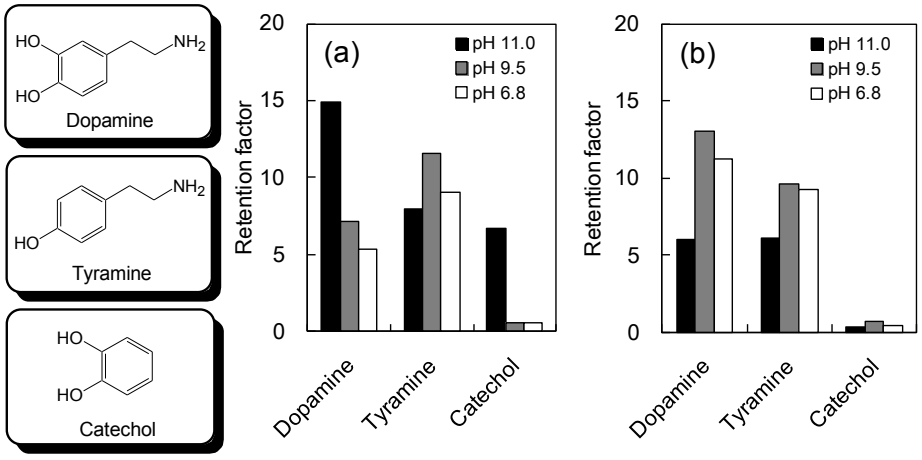


Figure 2-2. pH Dependence of the retention in (a) MIP (T1-SO_3H) and (b) MIP (T2-SO_3H).

フェノール性水酸基およびアミノ基はともに pK_a が 10 程度であり、この pH 領域近傍 (pH 9.5) においてドーパミンは双性イオンとして存在している可能性があり[23]、この結果は静電的相互作用または疎水性相互作用に基づくものであると推定している。一方で pH 6.8 および pH 11.0 の緩衝液中においては主に静電的相互作用が機能しているものと推定している。また、分子構造内にアミノ基を有しないカテコールはいずれの pH においても MIP (T2-SO_3H) に対してほぼ結合していないことから、ポリマーに対する非特異的吸着の影響は少ないものと考えられる。

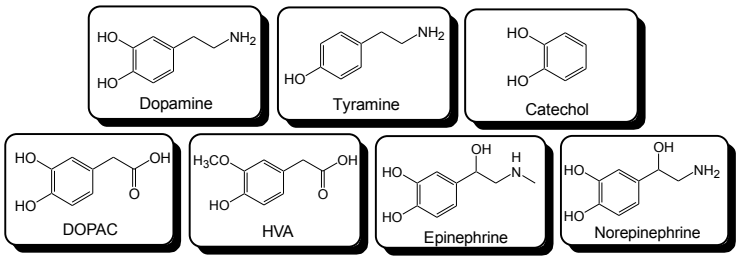
さらに、高 pH 領域 (pH 11.0) において分子認識空間内にフェニルボロン酸基を有する MIP (T1-SO_3H) は MIP (T2-SO_3H) に比して分子構造内にジオール基を有しているドーパミン、カテコールに対して強い結合能を示した。一方で、分子構造内にジオール基を有していないチラミンに対する結合能の差は確認されていない。この結果は塩基性条件下において、分子認識空間内に存在するドーパミンまたはカテコールのジオール基とフェニルボロン酸基の間で環状エステルを形成することで強く相互作用していることを示唆している[24]。これらの結果から、ドーパミンを選択的に認識するためにはスルホ基とフェニルボロン酸基のように多点で相互作用する官能基を分子認識空間内の相補的な位置に配置することが有効であると考えられる。さらに、高 pH 領域 (pH 11.0) において、ドーパミンの構造類似体を使用して MIP (T1-SO_3H) および MIP (T2-SO_3H) に対する選択性を評価した (***Table 2-3***)。

MIP (T1-SO_3H) を使用した系において、分子構造内にジオール基とアミノ基を有するドーパミンは高いリテンションファクター (k') を示した一方で、ジオール基を有しないチラミンやアミノ基を有しないカテコールのリテンションファクター (k') はドーパミンのそれよりも低いことが判明した。また、分子構造内にカルボキシ基を有する DOPAC および HVA の MIP (T1-SO_3H) に対する結合能はドーパミンのそれよりも低いことが判明した。加えて、これらの化合物を比較すると DOPAC は分子構造内にジオール基を有するために MIP (T1-SO_3H) の分子認識空間内に存在するフェニルボロン酸基と相互作用可能であり、HVA に比して結合能が高いことが判明した。

さらに、MIP (T1-SO_3H) に対して分子構造内に 2 級アミンを有するエピネフリンは隣接するメチル基の電子供与性の影響により、1 級アミンを有するノルエピネフリンよりも塩基性が高いことが知られている。このため、これらの分子間相互作用が単純に静電的相互作用によるものであると仮定するとノルエピネフリンに比してエピ

ネフリンの結合能が高いと考えられる。しかしながら、想定していた結果とは異なり、MIP (T1-SO_3H) に対する結合能はノルエピネフリンの方が高く、MIP (T2-SO_3H) に対する結合能はエピネフリンの方が高いことが判明した。これらの結果は分子認識空間内の官能基による静電的相互作用の効果のみではなく、分子認識空間のサイズが分子認識能に影響を及ぼしている可能性を示唆している。

Table 2-3. Relative selectivity* of MIP (T1-SO_3H) and MIP (T2-SO_3H).



Sample	MIP (T1-SO_3H)	MIP (T2-SO_3H)
Dopamine	1.00	1.00
Tyramine	0.54	1.02
Catechol	0.45	0.05
DOPAC	0.36	0.02
HVA	0.08	0.00
Epinephrine	0.05	0.12
Norepinephrine	0.35	0.05

*The relative selectivity is expressed as ratios of retention factors of the tested samples to a retention factor of dopamine at pH 11.0.

※ 本章の実験結果における一部のデータ (***Figure 2-2***, ***Table 2-3***) は神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻材料機能化学研究室のご厚意によりご提供いただいた。

2-4. 結言

本章では病気の診断や治療に有効とされるカテコールアミンの一種であるドーパミンを認識可能な機能性高分子材料を合成し、標的分子に対する結合能を評価した。ドーパミンのカテコール基をフェニルボロン酸基により認識する手法に加え、還元反応により容易に解裂し、鋳型分子の除去が可能なジスルフィド結合を有する鋳型分子を新たに設計·合成することで多点認識が可能な MIP の合成法を見出した。さらに、鋳型分子除去後の分子認識空間内に存在するチオール基をスルホ基に変換するという一連の酸化·還元システムを利用した分子インプリント後の後天的官能基変換法(ポストインプリンティング修飾) により、ドーパミンを選択的に認識可能な機能性高分子材料の合成法を確立した。

本章により得られた知見を要約すると以下のようになる。

1) ドーパミンを選択的に認識する高分子材料を合成するためにジスルフィド結合とフェニルボロン酸による環状エステル結合を有する鋳型分子 (**Template1, Template2**) を新たに設計·合成し、架橋剤とともに共重合した MIP (T1) および MIP (T2) を合成した。

2) MIP (T1) および MIP (T2) ポリマー微粒子から鋳型分子を除去するために還元反応によりジスルフィド結合を切断し、分子認識空間内の相補的な位置にチオール基を配置し (MIP (-SH))、さらに酸化反応により、分子認識空間内にスルホ基を生成する (MIP (-SO_3H)) ことに成功した。MIP (T1-SH) および MIP (T2-SH) の分子認識空間内に存在するチオール基の含量はいずれも 175 μmol/g であり、これは全てのジスルフィド結合が切断されたと仮定した場合の ca. 70% に相当した。また、MIP (T1-SO_3H) および MIP (T2-SO_3H) の分子認識空間内に存在するスルホ基の含量はそれぞれ 120 μmol/g、110 μmol/g であり、これは分子認識空間内に存在する全てのチオール基が酸化されたと仮定した場合の ca. 70% に相当した。

3) MIP (T1-SO_3H) および MIP (T1-SO_3H) を使用してドーパミンおよびその構

造類似体の結合能を評価した結果、ドーパミン、チラミンに対する結合能が他の構造類似体よりも高いことが判明した。この結果は分子認識空間の相補的な位置に存在するスルホ基がポジティブチャージのドーパミン、チラミンのアミノ基と強く静電的相互作用しており、ポストインプリンティング修飾が有効に機能している可能性を示唆している。

4) 高 pH 領域 (pH 11.0) において、MIP (T1-SO_3H) に対するドーパミン、カテコールの結合能がチラミンのそれに比して上昇した。一方で、MIP (T2-SO_3H) を使用した場合には結合能の上昇は認められていない。この結果は高 pH 領域 (pH 11.0) において MIP (T1-SO_3H) の分子認識空間内に存在するフェニルボロン酸基がドーパミンまたはカテコールのジオール基に対して強く相互作用しており、ドーパミンの選択的認識にはスルホ基とフェニルボロン酸基などによる多点認識が有効であることが判明した。

5) MIP (T1-SO_3H) に対する DOPAC、HVA それぞれの結合能を評価した結果、分子認識空間内に存在するスルホ基の影響により、ドーパミンの結合能に比して低いことが判明した。また、両者を比較すると分子構造内にジオール基を有する DOPAC の結合能は分子認識空間内のフェニルボロン酸基の影響により、HVA のそれに比して高いことが判明した。

6) MIP (T1-SO_3H) に対するエピネフリン、ノルエピネフリンの結合能を評価した結果、1 級アミンを有するノルエピネフリンの結合能は、より塩基性の高い 2 級アミンを有するエピネフリンに比して高いことが判明した。この結果は MIP (T1-SO_3H) の分子認識空間内のスルホ基による静電的相互作用に加えて、分子認識空間のサイズが標的分子を認識するうえで非常に重要な因子となっている可能性を示唆している。

本章では共有結合で鋳型分子と機能性モノマーの複合体を形成させ、架橋剤とともに共重合することで MIP を合成した。共有結合型の MIP においては鋳型分子·機能性モノマー複合体の合成や MIP 合成後における鋳型分子の除去が煩雑であるといっ

た問題点が存在するが、均一な相互作用部位を有する分子認識空間が形成されることから非常に有効な手法である。本研究では容易に酸化·還元反応を起こすジスルフィド結合を利用した鋳型分子を新たに設計·合成し、架橋剤とともに共重合することでMIP へ応用することにした。MIP 中の鋳型分子を除去するためにジスルフィド結合を還元し、分子認識空間内の相補的な位置にチオール基を配置し、さらに酸化反応により、官能基を酸性度の高いスルホ基に変換する（ポストインプリンティング修飾）ことでアミン類に対して高い選択性を有する機能性高分子材料の合成法を見出した。また、カテコールアミンのジオール基をフェニルボロン酸基により認識することで多点認識能を有する MIP を合成することによりドーパミンを選択的に認識可能な機能性高分子材料の合成に成功した。

ジスルフィド結合を有する鋳型分子を利用して MIP を合成し、還元反応を利用した鋳型分子の除去、さらに分子認識空間内の相補的な位置に配置された官能基を適切なものへと変換するという一連の酸化·還元システムの利用は非常に有効であり、分子インプリント後に後天的に官能基を変換する本手法はポストインプリンティング修飾として、後にさまざまな応用が可能になっている。1 点目は標的分子に応じて分子認識空間内の相補的な位置に存在する官能基を適切なものへ変換することが容易となり、数多くの研究結果が報告されている[25–28]。2 点目は分子インプリント後の官能基を利用することで分子認識空間近傍に蛍光基を修飾することにより、標的分子の結合を検知する情報発信型の MIP の合成に関する研究結果も数多く報告されるようになった[29–32]。今後も本手法を応用することでナノスケールの分子センサーとしての応用が可能になるなど多方面への展開が期待できるものと考えている。

【参考文献】

第 2 章

[1] P. Y. Bruice 著　大船泰史·香月勗·西郷和彦·富岡清　監訳　ブルース有機化学概説 (第 2 版)　化学同人 (2010)

[2] R. D'Oleo, C. Alvarez-Lorenzo, and G. Sun, A New Approach to Design Imprinted Polymer Gels without Using a Template, *Macromolecules* **2001,** 34, 4965–4971.

[3] T. Mukawa, T. Goto, and T. Takeuchi, Post-Oxidative Conversion of Thiol Residue to Sulfonic Acid in the Binding Sites of Molecularly Imprinted Polymers: Disulfide Based Covalent Molecular Imprinting for Basic Compounds, *Analyst* **2002,** 127, 1407–1409.

[4] M. Morita, Y. Iwasaki, T. Horiuchi, and O. Niwa. Selective Electrochemical Detection of Catechol and Cathecolamines on Modified Electrodes with Molecular Template, *Denki Kagaku* **1996,** 64, 1239–1243.

[5] R. Makote and M. M. Collinson, Dopamine Recognition in Templated Silicate Films, *Chem. Comm.* **1998**, 425–426.

[6] S. Grosu and W. Gorski, Molecular Imprinting of Antibiotic Films for Electroanalysis of the Dopamine/Ascorbate System, *Indian J. Chem.* **2003,** 42, 758–763.

[7] C. Liang, H. Peng, A. Zhou, L. Nie, and S.Yao, Molecular Imprinting Polymer Coated BAW Bio-Mimic Sensor for Direct Determination of Epinephrine, *Anal. Chim. Acta.* **2000,** 415, 135–141.

[8] J. X. Du, L. H. Shen, and J. R. Lu, Flow Injection Chemiluminescence Determination of Epinephrine Using Epinephrine-Imprinted Polymer as Recognition Material, *Anal. Chim. Acta.* **2003,** 489, 183–189.

[9] L. Fischer, R. Mueller, B. Ekberg, and K. Mosbach, Direct Enantioseparation of Beta-Adrenergic Blockers Using a Chiral Stationary Phase Prepared by Molecular Imprinting, *J. Am. Chem. Soc.* **1991,** 113, 9358–9360.

[10] J. Berglund, I. A. Nicholls, C. Lindbladh, and K. Mosbach, Recognition in Molecularly Imprinted Polymer Alpha 2-Adrenoceptor Mimics, *BioMed. Chem. Lett.* **1996,** 6, 2237–2242.

[11] O. Ramstrvm, C. Yu, and K. Mosbach, Chiral Recognition in Adrenergic Receptor Binding Mimics Rrepared by Molecularly Imprinting, *J. Mol. Recogn.* **1996,** 9, 691–696.

[12] S. Nilsson, L. Schweitz, and M. Petersson, Three Approaches to Enantiomer Separation of Beta-Adrenergic Antagonists by Capillary Electrochromatography, *Electrophoresis* **1997,** 18, 884–890.

[13] R. Suedee, C. Songkram, A. Petmoreekul, S. Sangkunakup, S. Sankasa, and N. Kongyarit, Direct Enantioseparation of Adrenergic Drugs via Thin-Layer Chromatography Using Molecularly Imprinted Polymers, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999,** 19, 519–527.

[14] R. Suedee, T. Srichana, J. Saelim, and T. Thavornpibulbut, Chiral Determination of Various Adrenergic Drugs by Thin-Layer Chromatography Using Molecularly Imprinted Chiral Stationary Phases Prepared with Alpha-Agonists, *Analyst* **1999,** 124, 1003–1009.

[15] S. A. Piletsky, E. V. Piletska, B. N. Chen, K. Karim, D. Weston, G. Barrett, P. Lowe, and A. P. F. Turner, Chemical Grafting of Molecularly Imprinted Homopolymers to the Surface of Microplates. Application of Artificial Adrenergic Receptor in Enzyme-Linked Assay for Beta-Agonists Determination, *Anal. Chem.* **2000,** 72, 4381–4385.

[16] A. B. Kharitonov, A. N. Shipway, and I. Willner, An Au Nanoparticle/ Bisbipyridinium Cyclophane-Functionalized Ion-Sensitive Field-Effect Transistor for the Sensing of Adrenaline, *Anal. Chem.* **1999,** 71, 5441–5443.

[17] F. G. Bordwell and W. A. Hewett, The Free Radical Addition of Thiolacetic Acid to Some Cyclic Olefins, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 3493–3496.

[18] J. F. W. McOmie and D. E.West, 3,3'-Dihydroxybiphenyl, *Org. Synth.* **1969,** 49, 50–52.

[19] L. Zervas, I. Photaki, and N. Ghelis, On Cysteine and Cystein Peptides. II. S-Acylcysteines in Peptide Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **1963,** 85, 1337–1341.

[20] D. A. Armitage, M. J. Clark, and C. C. Tso, Synthesis of Unsymmetrical Disulphides, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1* **1972,** 680–683.

[21] C. R. Stahl and S. Siggia, Determination of Organic Disulfides by Reduction with Sodium Borohydride, *Anal. Chem.* **1957,** 29, 154–155.

[22] G. Wulff and S. Schauhoff, Racemic Resolution of Free Sugars with Macroporous Polymers Prepared by Molecular Imprinting. Selectivity Dependence on the Arrangement of Functional Groups versus Spatial Requirements, *J. Org. Chem.* **1991,** 56, 395–400.

[23] G. P. Lewis, The Importance of Ionization in the Activity of Sympathomimetic Amines, *Brit. J. Pharmacol.* **1954,** 9, 488–493.

[24] J. P. Lorand and J. O. Edwards, Polyol Complexes and Structure of the Benzeneboronate Ion, *J. Org. Chem.* **1959,** 24, 769–774.

[25] T. Yane, H. Shinmori, and T. Takeuchi, Atrazine Transforming Polymer Prepared by Molecular Imprinting with Post-Imprinting Process, *Org. Biomol. Chem.* **2006,** 4, 4469–4473.

[26] K. Takeda, A. Kuwahara, K. Ohmori and T. Takeuchi, Molecularly Imprinted Tunable Binding Sites Based on Conjugated Prosthetic Groups and Ion-Paired Cofactors, *J. Am. Chem. Soc.* **2009,** 131, 8833–8838.

[27] E. Takano, Y. Taguchi, T. Ooya and T. Takeuchi, Dummy Template-Imprinted Polymers for Bisphenol A Prepared Using a Schiff Base-Type Template Molecule with Post-Imprinting Oxidation, *Anal. Lett.* **2012,** 45, 1204–1213.

[28] T. Takeuchi, T. Mori, A. Kuwahara, T. Ohta, A. Oshita, H. Sunayama, Y. Kitayama, and T. Ooya, Conjugated-Protein Mimics with Molecularly Imprinted Reconstructible and Transformable Regions that are Assembled Using Space-Filling Prosthetic Groups, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014,** 53, 12765–12770.

[29] H. Sunayama, T. Ooya and T. Takeuchi, Fluorescent Protein Recognition Polymer Thin Films Capable of Selective Signal Transduction of Target Binding Events Prepared by Molecular Imprinting with a Post-Imprinting Treatment, *Biosens. Bioelectron.* **2010,** 26, 458–462.

[30] Y. Suga, H. Sunayama, T. Ooya and T. Takeuchi, Molecularly Imprinted Polymers Prepared Using Protein-Conjugated Cleavable Monomers Followed by Site-Specific Post-Imprinting Introduction of Fluorescent Reporter Molecules, *Chem. Commun.* **2013,** 49, 8450–8452.

[31] H. Sunayama, T. Ooya and T. Takeuchi, Fluorescent Protein-Imprinted Polymers Capable of Signal Transduction of Specific Binding Events Prepared by a Site-Directed Two-Step Post-Imprinting Modification, *Chem. Commun.* **2014,** 50, 1347–1349.

[32] S. Sunayama and T. Takeuchi, Molecularly Imprinted Protein Recognition Cavities Bearing Exchangeable Binding Sites for Postimprinting Site-Directed Introduction of Reporter Molecules for Readout of Binding Events, *ACS Appl. Mater. Interfaces,* **2014,** 6, 20003–20009.

第 3 章

放出制御機能を有する
刺激応答性分子認識材料の創製

3-1. 緒言

近年、光、pH、熱などの外部刺激に応答して分子骨格が変化し、極性、親水性、粘着性、光学特性などの諸物性が変化する刺激応答性材料の研究·開発が盛んに行われており[1,2]、これらの特性を有する化合物は標的分子の放出制御や記録媒体における on/off 制御などへの幅広い分野に応用されている。特に光による刺激応答に関してはアゾベンゼンやスピロピランなどのフォトクロミック化合物を記録媒体用色素へ応用するための研究·開発が進んだこともあり、膨大なデータが蓄積されている[3–5]。ここで、フォトクロミズムとは光により誘起された色変化と定義されるが、本質は色素化合物の光異性化反応 (分子構造変化) であり、この性質によって分子占有体積、双極子モーメントなどの物理的諸性質が変化する現象のことである。フォトクロミック化合物は光に応答して着色、消色を繰り返す化合物であり、たとえば、物質 *A* が光 ($h\nu_1$) を吸収して準安定状態 *B* に変化して着色するが、光を遮断して熱的にあるいは別の波長 ($h\nu_2$) の光で再び *A* に戻る。

$$A \underset{h\nu_2 \text{ or } \Delta}{\overset{h\nu_1}{\rightleftharpoons}} B \qquad \textbf{(3-1)}$$

このような変化が熱で可逆的であるものを特にサーモクロミック化合物と呼び、光で可逆的なフォトクロミック化合物と区別する。また、最初から着色体が安定であるものは逆フォトクロミック化合物と呼ばれる。その他に、圧力あるいは電流による刺激に応答するピエゾクロミズム、エレクトロクロミズムと呼ばれる類似の現象もあり、広くは記録媒体への材料を提供しうるものである。光応答性化合物として利用が検討されている主要なフォトクロミック化合物は、その反応のメカニズムによって以下のように分類される[3–5] (***Figure 3-1***)。

ここで、スピロ化合物とは 2 個の環が原子を 1 個共有し、いかなる橋によっても連結されていないときの多環系の化合物のことであり、スピロピランとはスピロ縮合 (結合) を有する有機色素化合物の総称である。その中でもスピロベンゾピランが最も古くから研究されてきた。このスピロピランが長年にわたり研究されてきた理由としてメロシアニン型特有の吸収波長と吸収強度があげられる。スピロベンゾピランは通常、スピロピラン (SP) 型で存在しており、低濃度領域においてはほぼ無色であるが、紫外光を照射することで有色のメロシアニン (MC) 型に異性化する。MC 型は可視光

照射あるいは暗所で加熱することにより可逆的にもとの SP 型に異性化する (***Figure 3-2***)。

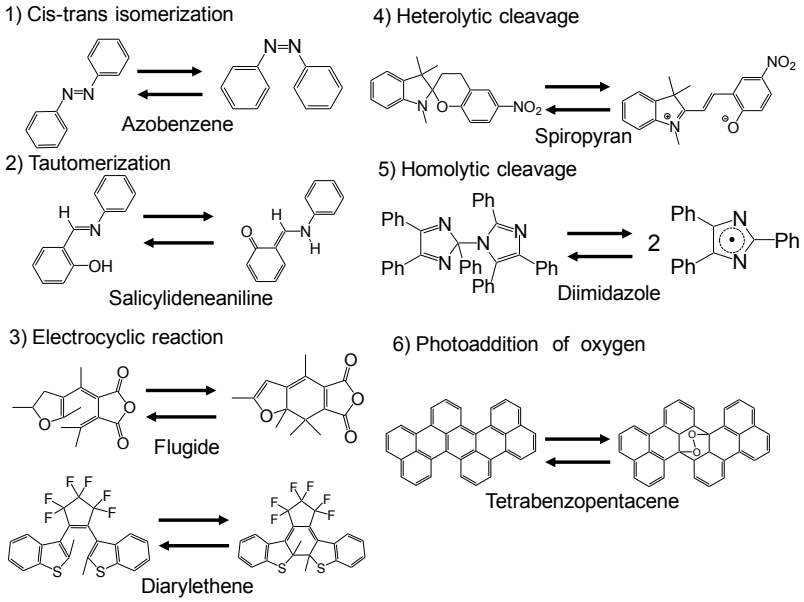


Figure 3-1. Structural formula and photo-isomerization of representative phtochromic compounds.

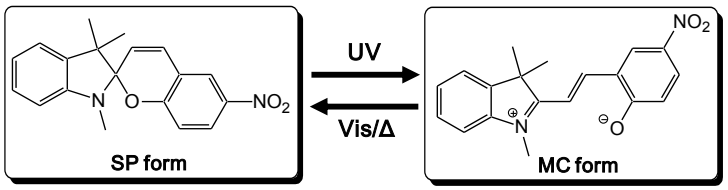


Figure 3-2. Reversible photo-isomerization of spirobenzopyran from SP form to MC form.

数多く存在するフォトクロミック化合物の中でもスピロピラン誘導体の MC 型は比較的長波長側に吸収がある事が知られており、置換基や溶媒などの影響により異なるが、一般には 500–700 nm に極大吸収が確認される。この波長領域は一般的な化合物の吸収領域と重ならないために波長分離を容易に行うことが可能であり、吸収強度が強いために MC 型特有の色の変化を視覚的に確認することも可能である。さらに光異性化にともない、化合物の性質自体も大きく変化することになる。通常、スピロピランでは閉環型 (SP 型) が安定であり、その分子自体は疎水性を示す。しかしながら、光異性化反応により開環型 (MC 型) になると完全にイオン化し、親水性を示すことになる。この大きな極性の変化もまた、他のフォトクロミック化合物にはない特性の一つといえる。

以前から、数多くのスピロピラン誘導体が合成され、有機薄膜への応用や無機材料への固定化などが検討されてきた。しかしながら、実用化にいたるまでにはいくつかの問題点が指摘されている。その一つはスピロピランの耐久性の問題である。他のフォトクロミック化合物に比して、光耐性の面で劣っていることは古くから知られており、現在ではアゾ系やシアニン系の色素が広く研究されているのもこのためである。しかしながら、記録媒体用の色素としての応用可能性を検討するための研究·開発が進んだこともあり、スピロピランに関する膨大な研究結果が蓄積されている。たとえば、スピロピランの耐久性の問題を解決するためにさまざまな改良がなされた結果、スピロナフトオキサジンがこれまでのスピロピランに比して、高い繰り返し耐性を示す事が確認されている (***Figure 3-3***)。さらに極大吸収波長を長波長側にシフトさせるためにベンゾチオピラン系スピロピランの開発も検討された (***Figure 3-3***)。このスピロピランは通常 500–600 nm に存在する MC 型特有の極大吸収を 700 nm 近傍にまでシフトさせることに成功している。これはインドリン環に電子吸引性の置換基、ベンゾチオピラン環に電子供与性の置換基を導入することで長波長シフトの効果が大きくなり、着色体は極大吸収を 700 nm 近傍に有し、その吸収端は 900 nm まで達するようになった[3–5]。その結果、現在では有機材料や無機材料への固定化のために重合可能な官能基が導入され、薄膜形成などにも利用されている。

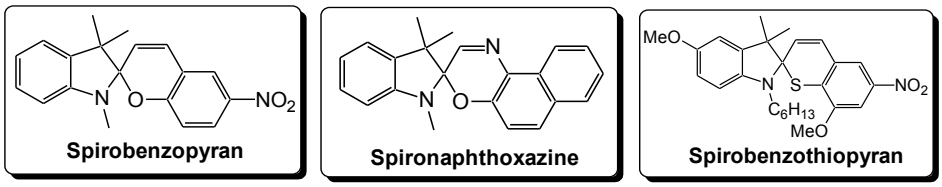


Figure 3-3. Structural formula of representative spiropyran derivatives.

これまでに MI 法を使用した標的分子を特異的に認識する機能性高分子材料の合成に関する研究結果は数多く報告されているが、第 3 章ではそのような高分子材料にさらに放出制御機能を付与した外部刺激応答性の分子認識材料の合成を目的とした。ここで、外部刺激としては光、pH、熱などが考えられるが、その中でも光は短時間で局所的に刺激を与えることができる点で非常に有効である[6–12]。そのため、本章では光照射により分子の性質が変化するフォトクロミック化合物を MIP への応用することを検討した。数多く存在するフォトクロミック化合物の中でもスピロピランは

長年にわたり研究されてきた化合物の一つである[13–19]。

このスピロピランを MIP に応用するにあたり、その有用性は大きく 2 つに分類される。1 点目は光異性化反応にともない、スピロ環骨格が開環·閉環を起こすことにより、標的分子と相互作用可能な官能基が分子認識空間内の相補的な位置から変化することである。数多くあるフォトクロミック化合物の中でも光異性化反応により分子の骨格が劇的に変化する化合物は非常にまれである。MI 法は標的分子と相互作用するような官能基を分子認識空間内の適切な位置に配置することにより標的分子に対する分子認識能を担保しているが、この官能基が相補的な位置から変化することによって認識していた標的分子を放出できるものと考えられる。2 点目は光異性化反応にともない、分子の極性が劇的に変化することである。通常、スピロピランは閉環型 (SP 型) が安定であり、その分子自体は疎水性を示す。しかしながら、光異性化反応により開環型 (MC 型) になると、完全にイオン化することで親水性を示すことになる。この大きな極性の変化もまた、他のフォトクロミック化合物にはない特性の一つである。この劇的な極性変化の影響により、分子認識空間近傍の水素結合が阻害されることで MIP に結合していた標的分子を放出できるものと考えられる。これまでにもスピロピラン誘導体を利用することで標的分子の放出制御機能を有する MIP を合成した研究結果が報告されている[11,12]。

Marx-Tibbon ら (1994) はポリマーマトリックス中にスピロピランモノマーを共重合させた MIP を合成することで、外部刺激により、標的分子となるアミノ酸の分子認識能を制御可能な高分子膜に関する研究結果を報告している[11]。本報告では鋳型分子としてアミノ酸の一種であるトリプトファンを使用し、機能性モノマーとなるアクリル酸にスピロピランモノマー、アクリルアミド、架橋剤となる EDMA、*N,N'*-メチレンビスアクリルアミドを共重合した MIP 膜を合成している。その後、外部刺激として紫外光を照射することにより、トリプトファンを分離することが可能な MIP 膜の開発に成功している。

さらに、*Renkecz* ら (2013) はスピロピランモノマーを使用した MIP を合成し、外部刺激により標的分子となるテルブチラジンの放出制御に成功している[12]。本報告では鋳型分子としてテルブチラジンを使用し、機能性モノマーとなるメタクリル酸との複合体を形成させ、架橋剤となる EDMA にコモノマーとして光異性化可能なスピロピラン誘導体を共重合することで外部刺激応答性の MIP を合成している。その後、

外部刺激として紫外光を照射することによりトリアジン骨格を有する標的分子の結合能の変化を評価しており、紫外光の on/off 制御による標的分子に対する結合能の繰り返し変化も確認されている。

しかしながら、いずれの報告においてもスピロピラン骨格の *N*-末端からメタクリロイル基を生成したスピロピラン誘導体を重合時におけるコモノマーとして使用するものであった。MIP は分子認識空間内の相補的な位置に標的分子と相互作用可能な官能基を固定化することで標的分子に対する分子認識能を担保しているが、高分子主鎖の光異性化反応のみでは標的分子を十分に放出制御できない可能性が考えられた。そこで、本章では重合基と相互作用部位を有する 2 官能性のスピロピラン誘導体を新たに設計･合成し、分子認識空間内の相補的な位置に固定化した MIP を合成することで外部刺激により、標的分子の結合能を高度に制御可能な分子認識材料の合成を目的とした **(*Figure 3-4*)**。

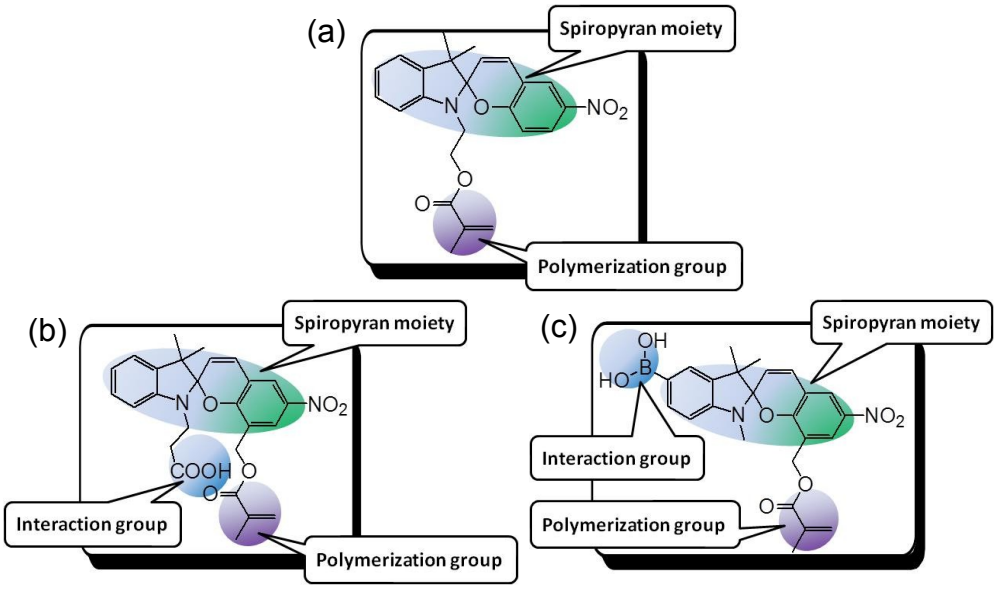


Figure3-4. Spiropyran-based comonomer and functional monomers for MIPs in (a) previous study and (b), (c) this study.

すなわち、カルボキシ基とメタクリロイル基を有する 2 官能性のスピロピラン誘導体を新たに設計･合成し、MIP に応用することで光照射時における標的分子の結合能を評価することにした **(*Figure3-5*)**。ここで、標的分子にはカルボキシ基を有する機能性モノマーと強く相互作用することが確認されており、トリアジン骨格を有する農薬の一種であるアトラジンを選定した[20–24]。

さらに、同様のコンセプトにてフェニルボロン酸基とメタクリロイル基を有する 2 官能性のスピロピラン誘導体を新たに設計·合成し、MIP に応用することで標的分子の結合能を評価することにした **(*Figure3-5*)**。ここで標的分子はフェニルボロン酸基と相互作用することが確認されており、生体内でも多様な役割を担っている糖類を選定し[25–27]、その中でもニトロフェニル骨格による UV 吸収が顕著に確認される 4-ニトロフェニル α-D-マンノピラノシドをモデルサンプルとして使用した。

標的分子の取り込み、貯蔵、放出といった一連の放出制御が可能な分子認識材料の創製は広くは光照射によるコントロールドリリースシステムなどへ応用できるものと期待している。

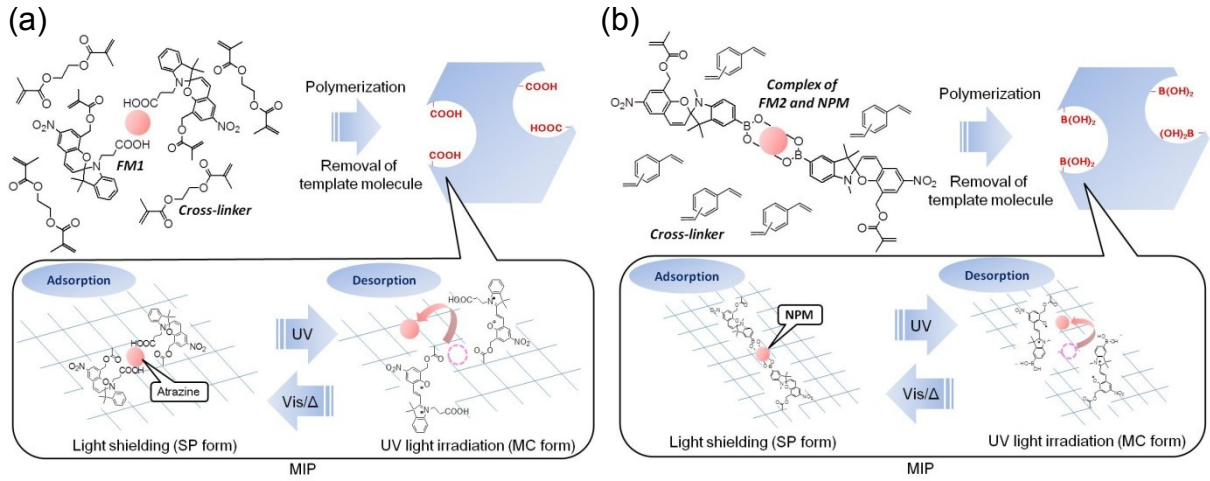


Figure 3-5. Preparation of MIPs bearing (a) atrazine and (b) NPM binding cavities incorporated with the spiropyran moiety.

3-2. 実験

3-2-1. 試薬

第 3 章で使用した試薬を ***Table 3-1*** に記載した。なお、有機合成に使用したメチルエチルケトン、トルエン、*N,N*-ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、ジクロロメタン、重合に使用したクロロホルム、インキュベーション溶媒として使用したクロロホルム、ヘキサン、アセトニトリルは系内に存在する水分や安定剤を除去するため、蒸留した。重合に使用した DVB、スチレンは系内に存在する重合禁止剤を除去するため、減圧蒸留した。また、EDMA、TRIM はインヒビター･リムーバー (Sigma-Aldrich Co. LLC., USA) により、重合禁止剤を除去した。有機合成および分析に使用した純水は Milli-Q (Merck Millipore Corp, Germany) にて精製した。

Table 3-1. Reagent list.

Reagent	Maker	Grade
5-nitrosalicylaldehyde	Sigma-Aldrich Co. LLC. (USA)	≥ 97%
2,3,3-trimethylindolenine	Sigma-Aldrich Co. LLC. (USA)	98%
bis(neopentyl glycolato)diboron	Sigma-Aldrich Co. LLC. (USA)	96%
chloromethyl methyl ether (CMME)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	practical grade
aluminium chloride anhydrous	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
methacrylic acid	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
28% ammonia solution	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
silver nitrate	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
4-bromophenylhydrazine hydrochloride	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	—
3-methyl-2-butanone	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
[1,1′-bis(diphenylphosphino) ferrocene]dichloropalladium(II) ($Pd(dppf)Cl_2$)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	for organic synthesis
methyl iodide	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
potassium acetate	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
triethylamine (Et_3N)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
piperidine	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
sodium hydroxide (NaOH)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	1_{st} grade
acetic acid	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
1 M hydrochloric acid (HCl)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	for volumetric analysis

sodium chloride	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	1_{st} grade
sodium sulfate	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
styrene	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
divinylbenzene (DVB)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	55% (mixture of isomers)
ethylene glycol dimethacrylate (EDMA)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	1_{st} grade
trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	—
2,2′-azobis(2,4-demethylvalero-nitrile) (V-65)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	1_{st} grade
3-iodopropionic acid	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)	> 98%
4-nitrophenyl α-D-mannopyranoside (NPM)	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)	> 98%
methylethylketone (MEK)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	for organic synthesis
ethyl acetate	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
hexane	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
benzene	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
methanol	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
ethanol	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
acetone	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
toluene	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
dichloromethane	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
chloroform	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
diethyl ether	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
acetonitrile	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
N,N-dimethylformamide (DMF)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
chloroform-*d* ($CDCl_3$)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	99.8% (+0.05% TMS)

* Atrazine, cyanazine, asulam, and iprodione were kindly provided from Nissan Chemical Industries, Ltd (Tokyo, Japan).

3-2-2. 分析装置

合成物の同定には ^{1}H NMR (JNM-LA300, JEOL Ltd., Japan)、ESI-MS (API-2000, AB Sciex Pte. Ltd., USA) を使用した。また、UV 測定には UV/Vis 分光光度計 (V-560, JASCO Corporation, Japan) を使用した。分析物の定量には分離カラムとして SPELCOSIL-LC-8DB (150 mm × 4.6 mm I.D.) (Sigma-Aldrich, USA) を接続した高速液

体クロマトグラフィー (HPLC) (Gilson Inc, USA) を使用した。

3-2-3. スピロピラン誘導体の合成と分光学的特性の評価

◇ 3-クロロメチル-5-ニトロサリチルアルデヒド **(b)** の合成

窒素雰囲気下、5-ニトロサリチルアルデヒド **(a)** (5.0 g, 29.3 mmol) を dry CMME (50 mL, 520 mmol) に懸濁させ、氷浴で 0 °C に冷却した。そこへ、無水塩化アルミニウム (20.0 g, 150 mmol) を徐々に加え、反応液を 10 °C 以下で 1 h、室温で 1 h、さらに 65 °C で 2 h 撹拌した[28-30]。反応液を室温まで放冷し、150 g 程度の氷を徐々に加えることで析出してきた固体を大量の水で洗浄した。その後、真空乾燥させることで黄白色の固体として 3-クロロメチル-5-ニトロサリチルアルデヒド **(b)** を得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 4.72 (2H, s, -CH_2Cl), 8.55–8.58 (2H, m, aromatic protons), 10.02 (1H, s, -CHO), 12.07 (1H, s, -OH)

◇ メタクリル酸銀 **(d)** の合成

丸型フラスコにメタクリル酸 **(c)** (20 mL) を加え 28% アンモニア水 (14 mL) を徐々に滴下した。さらに、純水 (80 mL) に溶解した硝酸銀 (40 g) を加え、室温で一晩撹拌した。析出してきた固体を大量の純水で洗浄し、熱水から再結晶させた後、真空乾燥させることでメタクリル酸銀 **(d)** を得た。

◇ 3-メタクリロキシメチル-5-ニトロサリチルアルデヒド **(e)** の合成

窒素雰囲気下、3-クロロメチル-5-ニトロサリチルアルデヒド **(b)** (4.5 g, 20.9 mmol)、メタクリル酸銀 **(d)** (4.1 g, 21.2 mmol) を dry トルエン (120 mL) 中で 2 h 環流した[28–30]。析出してきた固体をセライトで濾過した後、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去した。その後、カラムクロマトグラフィー (展開層: シリカゲル (C-200), 展開溶媒: クロロホルム) で分離·精製し、真空乾燥させることで黄白色の固体として 3-メタクリロキシメチル-5-ニトロサリチルアルデヒド **(e)** を得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 1.99 (3H, s, -CH_3), 5.32 (2H, s, -CH_2-), 5.65 and 6.20 (1H, each, d, methacryloyl=CH_2), 8.47–8.52 (2H, m, aromatic protons), 10.00 (1H, s, -CHO), 11.93 (1H, s, -OH)

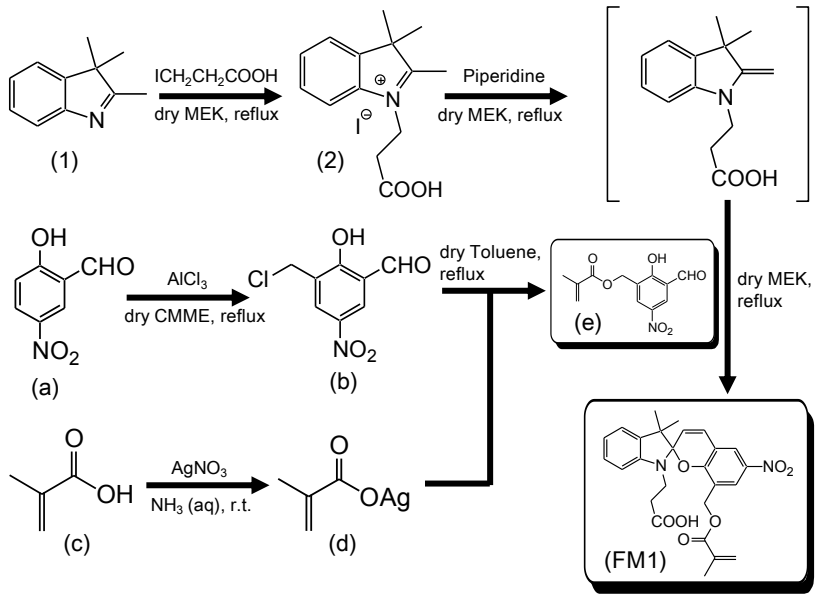
◇ 1-(2-カルボキシエチル)-2,3,3-トリメチル-3H-インドリウム塩 **(2)** の合成

窒素雰囲気下、二口フラスコに 2,3,3-トリメチルインドレニン **(1)** (3.2 mL, 20 mmol) と 3-ヨードプロピオン酸 (4.0 g, 20 mmol) を加え、dry MEK (40 mL) に溶解した[31–38]。80 °C で一晩反応させた後、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去し、析出してきた塩をベンゼンで洗浄した。得られた固体をベンゼン/エタノールから再結晶した後、真空乾燥させることで 1-(2-カルボキシエチル)-2,3,3-トリメチル-3H-インドリウム塩 **(2)** を得た。

◇ 3-(3′,3′-ジメチル-8-メタクリロキシメチル-6-ニトロスピロ[クロメン-2,2′-インドール]-1′-イル)プロピオン酸 **(FM1)** の合成と分光学的特性の評価

二口フラスコに 1-(2-カルボキシエチル)-2,3,3-トリメチル-3H-インドリウム塩 **(2)** (2.88 g, 8 mmol) を加え、窒素置換した。そこへ、dry MEK (20 mL)、ピペリジン (800 μL, 8 mmol) を加えた後、5 min 程度環流することで脱ヨウ素化した。その後、dry MEK (20 mL) に溶解した 3-メタクリロキシメチル-5-ニトロサリチルアルデヒド **(e)** (2.12 g, 8 mmol) をシリンジにて加えた[31–38]。一晩 80 °C で環流した後、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去し、酢酸エチルを加えて純水で 3 回、その後、飽和食塩水で洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過にて固形分を除去した後、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去し、粗生成物をカラムクロマトグラフィー (展開層: シリカゲル (C-200), 展開溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン/酢酸=250:250:3, v/v/v) で分離·精製した後、真空乾燥させることで紫色の固体として 3-(3′,3′-ジメチル-8-メタクリロキシメチル-6-ニトロスピロ[クロメン-2,2′-インドール]-1′-イル)プロピオン酸 **(FM1)** を得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 1.24 (6H, s, -$(CH_3)_2$), 1.88 (3H, s, methacryloyl-CH_3), 2.58–2.71 (2H, m, -CH_2-carboxy), 3.43–3.64 (2H, m, N-CH_2-), 4.91–5.02 (2H, m, φ-CH_2-O), 5.57 and 6.05 (1H, s, each, methacryloyl=CH_2), 5.85 (1H, d, -CH=), 6.55 (1H, d, =CH-), 6.86–7.22 (4H, m, aromatic protons), 8.05 and 8.06 (1H, s, each, NO_2-aromatic protons) ESI-MS: *m/z* (negative) Calcd. for $C_{26}H_{26}N_2O_7$: 477.5 $[M-H]^-$, Found: 476.9.



Scheme 3-1. Synthesis of the designed spiropyran-based functional monomer (**FM1**).

さらに、合成した **FM1** をメタノールに溶解し、その溶液 (3 mL) を UV セル (10×10×40 mm) に移液した。そこへ、蛍光分光光度計 (F-2500, Hitachi, Ltd. Japan) にて 332 nm の紫外光を照射しながら、0, 10, 20, 30 min ごとに UV/Vis 分光光度計 (V-560, JASCO Corporation, Japan) を使用して **FM1** の UV スペクトルを測定した。さらに、**FM1** をクロロホルム/ヘキサン (4:1, v/v) 溶媒に溶解し、その溶液 (3 mL) を UV セル (10×10×40 mm) に移液した。そこへ、熱線吸収フィルター (HAF-50S-50H, Sigmakoki Co., Ltd, Japan) および紫外透過可視吸収フィルター (UTAF-50S-33U, Sigmakoki Co., Ltd, Japan) (230–430 nm の紫外光を透過) を取り付けた超高圧水銀ランプ (USH-500SC, Ushio Inc. Japan) にて紫外光を照射しながら、0, 10, 20, 30 min ごとに、UV/Vis 分光光度計 (V-560, JASCO Corporation, Japan) にて **FM1** の UV スペクトルを測定した。

◇ 5-ブロモ-2,3,3-トリメチルインドレニン **(4)** の合成 (フィッシャーインドール合成)

窒素雰囲気下、二口フラスコに 4-ブロモフェニルヒドラジン塩酸塩 **(3)** (6.0 g, 26.7 mmol) を量りとり、酢酸 (150 mL) に溶解した。そこへ、3-メチル-2-ブタノン (8.58 mL, 80.4 mmol) を徐々に加え、80 °C で一晩撹拌した[31–38]。ロータリーエバポレーターで

溶媒を留去し、純水を加え、1 M NaOH 水溶液により中和した後、溶液を酢酸エチルにより 3 回抽出した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた後、濾過にて固形分を除去し、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去した。粗生成物はカラムクロマトグラフィー (展開層: シリカゲル (C-200), 展開溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン=1:2, v/v) により分離·精製し、真空乾燥させることで橙色の固体として 5-ブロモ-2,3,3-トリメチルインドレニン **(4)** を得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz): δ 1.30 (6H, s, -$(CH_3)_2$), 2.24 (3H, s, -CH_3), 7.35–7.44 (3H, m, aromatic protons)

◇ 5-(5,5-ジメチル-1,3,2-ジオキサボラン)-2,3,3-トリメチルインドレニン **(5)** の合成

窒素雰囲気下、二口フラスコに 5-ブロモ-2,3,3-トリメチルインドレニン **(4)** (5.00 g, 21.0 mmol)、ビス(ネオペンチルグリコレート)ジボロン (5.02 g, 22.2 mmol)、Pd(dppf)Cl_2 (425 mg, 0.58 mmol) および酢酸カリウム (3.20 g, 32.7 mmol) を加え、dry DMF (100 mL) に溶解した。80 °C で 18 h 反応させた後、ベンゼン (100 mL) を加え、溶液をセライトで濾過した。さらにベンゼン (300 mL) を加え、純水で 3 回、その後、飽和食塩水で洗浄した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過にて固形分を除去した後、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去した。粗生成物はカラムクロマトグラフィー (展開層: シリカゲル (C-200), 酢酸エチル/ヘキサン=1:1, v/v) で分離·精製した。その後、真空乾燥させることで赤橙色の粘稠固体として 5-(5,5-ジメチル-1,3,2-ジオキサボラン)-2,3,3-トリメチルインドレニン **(5)** を得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 1.03 (6H, s, -$(CH_3)_2$), 1.31 (6H, s, -$(CH_3)_2$), 2.29 (3H, s, -CH_3), 3.78 (4H, s, -$(CH_2)_2$), 7.51–7.78 (3H, m, aromatic protons)

◇ 5-(5,5-ジメチル-1,3,2-ジオキサボラン)-1,3,3-トリメチル-2-メチレンインドリン **(6)** の合成

窒素雰囲気下、二口フラスコに 5-(5,5-ジメチル-1,3,2-ジオキサボラン)-2,3,3-トリメチルインドレニン **(5)** (4.0 g, 14.8 mmol) を量りとり、dry アセトニトリル (100 mL) に溶解した。そこへ、ヨウ化メチル (27.7 mL, 443 mmol) を加え、遮光しながら 60 °C で 5 h 撹拌した後、ヨウ化メチル (9.2 mL, 148 mmol) を追加し、60 °C で一晩撹拌した。溶媒を留去した後、純水を加え、1 M NaOH 水溶液を使用して水相を弱アルカリ

性にした後、酢酸エチルで 5 回抽出した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過にて固形分を除去した後、溶媒をロータリーエバポレーターで留去した。粗生成物をカラムクロマトグラフィー (展開層: シリカゲル (C-200 charged by 1% Et_3N), 展開溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン=1:2, v/v) で分離·精製した後、真空乾燥させることで固体として 5-(5,5-ジメチル-1,3,2-ジオキサボラン)-1,3,3-トリメチル-2-メチレンインドリン **(6)** を得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 1.06 (6H, s, -$(CH_3)_2$), 1.34 (6H, s, -$(CH_3)_2$), 3.05 (3H, s, N-CH_3), 3.75 (4H, s, -$(CH_2)_2$), 3.87 (2H, s, =CH_2), 6.53–7.64 (3H, m, aromatic protons)

◇ スピロピラン誘導体 **(7)** の合成と分光学的特性の評価

窒素雰囲気下、二口フラスコに 5-(5,5-ジメチル-1,3,2-ジオキサボラン)-1,3,3-トリメチル-2-メチレンインドリン **(6)** (572 mg, 2 mmol) と 3-メタクリロキシメチル-5-ニトロサリチルアルデヒド **(e)** (532 mg, 2 mmol) を量りとり、dry MEK (10 mL) に溶解した[31–38]。反応液を 80 °C で一晩撹拌した後、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去することで赤紫色の粘稠固体を得た。その後、酢酸エチルを加えて純水で 3 回洗浄し、さらに飽和食塩水にて洗浄した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた後、濾過にて固形分を除去し、溶媒をロータリーエバポレーターで留去した。粗生成物をカラムクロマトグラフィー (展開層: シリカゲル (C-200), 展開溶媒: ジクロロメタン ~ ジクロロメタン (1%Et_3N) ~ 酢酸エチルで精製した後、酢酸エチル/ヘキサンから再結晶し、真空乾燥させることで紫色の固体としてスピロピラン誘導体 **(7)** を得た。

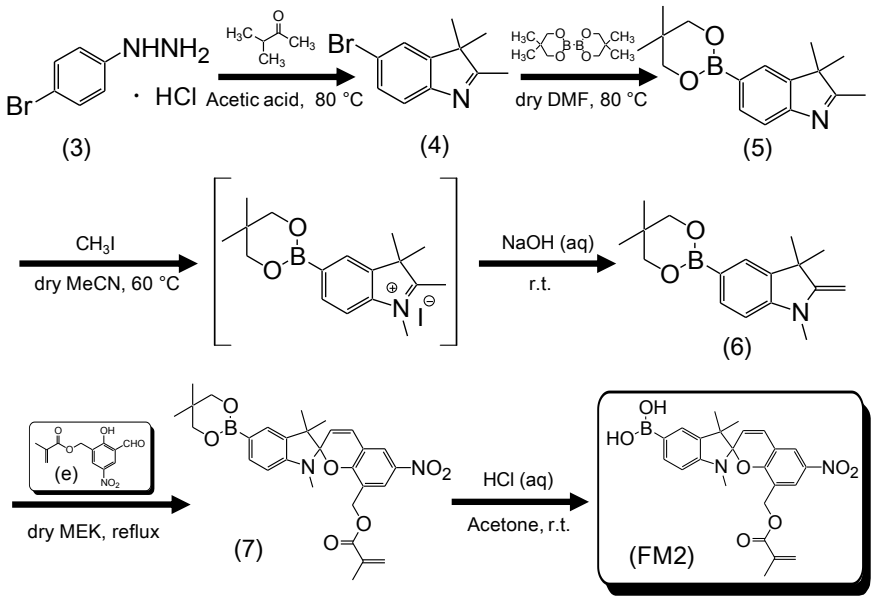
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 1.10 (6H, s, -$(CH_3)_2$), 1.27 (6H, s, -$(CH_3)_2$), 1.91 (3H, s, methacryloyl-CH_3), 2.71 (3H, s, N-CH_3), 2.80 (4H, s, -$(CH_2)_2$), 5.01 (2H, s, φ-CH_2-O), 5.59 and 6.05 (1H, s, each, methacryloyl=CH_2), 5.86 (1H, d, -CH=), 6.40 (1H, d, =CH-), 6.87–7.48 (3H, m, aromatic protons), 8.00 and 8.10 (1H, s, each, NO_2-aromatic protons)

さらに、**(7)** を酢酸エチルまたはクロロホルムに溶解し、それぞれの溶液 (3 mL) を UV セル (10×10×40 mm) に移液した。蛍光分光光度計 (F-2500, Hitachi, Ltd. Japan) にて 332 nm の紫外光を照射しながら、0, 10, 20, 30 min 毎に UV/Vis 分光光度計 (V-560, JASCO Corporation, Japan) を使用して **(7)** の UV スペクトルを測定した。

◇ スピロピラン誘導体 **(FM2)** の合成

(7) を 0.2 M HCl 水溶液 (2 mL) を含むアセトン (60 mL) に溶解し、室温で 24 h 撹拌した。その後、ジクロロメタンを加えて純水で 3 回洗浄し、さらに飽和食塩水で洗浄した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた後、濾過にて固形分を除去し、溶媒をロータリーエバポレーターにて留去した。少量のヘキサンおよびジエチルエーテルで洗浄した後、粗生成物をクロロホルム/ヘキサンから再沈殿させ、真空乾燥させることで赤紫色の固体としてスピロピラン誘導体 **(FM2)** を得た。

ESI-MS: *m/z* (positive) Calcd. for $C_{24}H_{25}BN_2O_7$: 465.3 $[M+H]^+$, 487.3 $[M+Na]^+$, Found: 465.0, 487.0 respectively.



Scheme 3-2. Synthesis of the designed spiropyran-based functional monomer (**FM2**).

3-2-4. ^{1}H NMR によるスピロピラン誘導体と標的分子の相互作用評価

3 mM のアトラジン重クロロホルム溶液 (0.6 mL) を調整し、そこへ、**FM1** を 0, 3, 6, 12 mM となるように加え、ボルテックスミキサー (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., USA) を使用して撹拌した。その溶液を NMR チューブに移液し、45 °C において ^{1}H NMR を測定することで **FM1** とアトラジンの分子間相互作用に基づくアミノプロトンのケミカルシフトを測定し、カーブフィッティングソフトウェア (Origin Pro 7.5J) により、結合定数 (K_a) を推算した。

ここで、アトラジンに由来するイソプロピル側のアミノプロトンと **FM1** のカルボ

キシ基が 1:1 で相互作用すると仮定すると、結合定数 (K_a) は一般に下記のモデル式で近似できる[39]。

$$\Delta\delta = \frac{((1+K_aG+K_aH)-((1+K_aG+K_aH)^2-4K_a{}^2GH)^{\frac{1}{2}})(\delta_\infty-\delta_0)}{2K_aG} \quad \textbf{(3-2)}$$

ここで $\Delta\delta$ はアトラジンにおけるアミノプロトンのケミカルシフト (δ) の変化量であり、δ_∞ は複合体形成反応終結時の δ (漸近値)、δ_0 は初期の δ を表す。H は滴下した **FM1** の濃度とし、G はフィッティングパラメータである。

3-2-5. アトラジンを認識する MIP の合成と分光学的特性の評価

◇ カルボキシ基を有するスピロピラン誘導体を分子認識空間内に固定化した MIP の合成

窒素雰囲気下、アトラジン (5.4 mg, 25 μmol)、**FM1** (47.9 mg, 100 μmol)、EDMA (94 μL, 500 μmol)、V-65 (2.5 mg, 10 μmol) を dry クロロホルム (200 μL) に溶解した。その後、60 °C で 18 h さらに 80 °C で 3 h 重合し、得られたポリマーを真空乾燥した後、粒径が数 μm 程度となるように物理的に粉砕した。得られたポリマー粒子をメタノール (10 mL) で 3 回、その後、クロロホルム (10 mL) 中で撹拌することでポリマーマトリックス内から鋳型分子であるアトラジンを抽出した。ポリマー溶液を濾過した後、真空乾燥させることで MIP_{EDMA} を得た。また、***Table 3-2*** に従って同様の実験操作を実施することで MIP_{TRIM}、MIP_{DVB}、$MIP_{DVB/Styrene}$ を合成した。それぞれのアトラジン抽出溶液を HPLC (溶離液: メタノール/純水=60:40, v/v, 流速: 1 mL/min, 分離カラム: SPELCOSIL-LC-8DB (150 mm × 4.6 mm I.D.) (Sigma-Aldrich, USA), 検出波長: 263 nm) にて定量することでポリマーマトリックス内からのアトラジンの抽出率を求めた。

また、架橋剤として EDMA を使用してスケールアップした条件で MIP_{EDMA} および NIP_{EDMA} を合成した。アトラジン (43 mg, 0.2 mmol)、**FM1** (383 mg, 0.8 mmol)、EDMA (1060 μL, 5.6 mmol)、V-65 (25 mg, 0.1 mmol) をクロロホルム (1200 μL) に溶解し、窒素雰囲気下、45 °C で 18 h さらに 80 °C で 3 h 重合した。得られたポリマーを真空乾燥させた後、粒径が数 μm 程度となるように物理的に粉砕し、ポリマー粒子から鋳型分子を除去するためにメタノールにて 18 h ソックスレー抽出を実施した。

その後、インキュベーション溶媒となるクロロホルム/ヘキサン (4:1, v/v) で 2 回 (それぞれ 18 h, 5 h) 撹拌した。抽出溶液を回収した後、前述した分析手法により MIP_{EDMA} からのアトラジン抽出率を求めた。また、同様の実験条件にて鋳型分子となるアトラジンを加えていない NIP_{EDMA} を対照サンプルとして合成した。

Table 3-2. Preparation recipes of MIPs using various cross-linkers.

	MIP_{EDMA}	MIP_{TRIM}	MIP_{DVB}	$MIP_{DVB/Styrene}$
Atrazine	5.4 mg (25 μmol)			
FM1	47.9 mg (100 μmol)			
EDMA	94 μL (500 μmol)	—	—	—
TRIM	—	160 μL (500 μmol)	—	—
DVB	—	—	72 μL (500 μmol)	57 μL (400 μmol)
Styrene	—	—	—	12 μL (100 μmol)
V-65	2.5 mg (10 μmol)			
Chloroform	200 μL			

◇ スピロピラン誘導体を分子認識空間内に固定化した MIP_{EDMA} の分光学的特性評価

MIP_{EDMA} をクロロホルム/ヘキサン (4:1, v/v) 溶液に懸濁させ、その溶液 (3 mL) を UV セル (10×10×40 mm) に移液した。紫外光照射には熱線吸収フィルター (HAF-50S-50H, Sigmakoki Co., Ltd, Japan) および紫外透過可視吸収フィルター (UTAF-50S-33U, Sigmakoki Co., Ltd, Japan) (230–430 nm の紫外光を透過) を取り付けた超高圧水銀ランプ (USH-500SC, Ushio Inc. Japan) を使用し、可視光照射には熱線吸収フィルター (HAF-50S-50H, Sigmakoki Co., Ltd, Japan) およびシャープカットフィルター (SCF-50S-42L, Sigmakoki Co., Ltd, Japan) (420–780 nm の可視光を透過) を取り付けた超高圧水銀ランプ (USH-500SC, Ushio Inc. Japan) を使用した。それぞれ 10 min 光照射した後、積分球 (ISV-469, JASCO Corporation, Japan) を取り付けた UV/Vis 分光光度計 (V-560, JASCO Corporation, Japan) を使用することで **FM1** を分子認識空間内に固定化した MIP_{EDMA} の UV スペクトルを測定した。

3-2-6. アトラジンを認識する MIP の結合能評価

◇ MIP 合成における最適な架橋剤の検討 [a)]

MIP_{EDMA} (3 mg) と 100 μM アトラジン溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) (3 mL) をバイアル瓶に加え、遮光条件下、25 °C で 20 h インキュベートした。0.2 μm のシリンジフィルター (DISMIC-13HP020AN, Advantec Japan, Co., Ltd., Japan) を使用してポリマー粒子を濾過し、濾液から 1 mL の溶液を抽出した後、真空乾燥させた。溶液残渣をメタノール (1 mL) に再溶解し、HPLC (溶離液: メタノール/純水=60:40, v/v、流速: 1 mL/min、分離カラム: SPELCOSIL-LC-8DB (150 mm × 4.6 mm I.D.) (Sigma-Aldrich Co. LLC., USA)、検出波長: 263 nm) を使用することで MIP_{EDMA} に対する未結合のアトラジンを定量した。また、MIP_{EDMA} を加えていないアトラジン溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) のみで同様の実験操作を実施し、これを対照の検量線として MIP_{EDMA} に対するアトラジンの結合量を求めた。さらに、同様の実験操作にて MIP_{TRIM}、MIP_{DVB}、$MIP_{DVB/Styrene}$ に対するアトラジンの結合量を求めた。

◇ MIP_{EDMA} に対するアトラジンの吸着等温線およびスキャッチャード解析 [b)]

MIP_{EDMA} (10 mg) と異なる濃度のアトラジン溶液 (25, 50, 100, 200, 400, 500, 800, 1000, 1600, 2000 μM) (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) (3 mL) をバイアル瓶に加え、遮光条件下、25 °C で 20 h インキュベートした。その後、上述した実験操作により MIP_{EDMA} に対するアトラジンの結合量を求め、スキャッチャード解析により、解離定数 (K_d) を推定した。

◇ 種々の農薬を使用した選択性の評価 [b)]

MIP_{EDMA} (10 mg) と 200 μM のアトラジン溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) (3 mL) をバイアル瓶に加え、遮光条件下、25 °C で 20 h インキュベートした。その後、上述した実験操作により MIP_{EDMA} に対するアトラジンの結合量を求めた。さらに、同様の実験操作にて MIP_{EDMA} に対する各種農薬 (シアナジン、アシュラム、イプロジオン) の結合量を求めることで選択性の評価を実施した。

◇ 紫外光照射による放出制御機能の評価 [b)]

MIP_{EDMA} (10 mg) と 200 μM のアトラジン溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) (3 mL) をバイアル瓶に加え、遮光条件下、25 °C で 20 h インキュベートした。その後、熱線吸収フィルター (HAF-50S-50H, Sigmakoki Co., Ltd, Japan) および紫外透過可

視吸収フィルター (UTAF-50S-33U, Sigmakoki Co., Ltd, Japan) を取り付けた超高圧水銀ランプ (USH-500SC, Ushio Inc., Japan) を使用して 230–430 nm の紫外光を照射し、25 °C で 20 h インキュベートした。その後、上述した実験操作により MIP_{EDMA} に対するアトラジンの結合量を求めることで紫外光照射による標的分子の放出制御機能について評価した。さらに、同様の実験操作を実施することで NIP_{EDMA} に対するアトラジンの結合量を求めた。

※ a) は架橋剤検討用の条件にて重合した MIP_{EDMA} を使用し、b) はスケールアップした条件にて重合した MIP_{EDMA} を使用して結合実験を実施した。

3-2-7. 4-ニトロフェニル α-D-マンノピラノシドを認識する MIP の合成と評価

◇ フェニルボロン酸基を有するスピロピラン誘導体を分子認識空間内に固定化した MIP の合成

FM2 (46.4 mg, 0.1 mmol) と NPM (15.1 mg, 0.05 mmol) を dry ジクロロメタン (150 mL) に懸濁させ、水分除去のためにモレキュラーシーブを充填したソックスレー抽出器を使用して 3.5 h 還流することにより **FM2** のフェニルボロン酸基と NPM の水酸基による環状エステルを形成させ、ロータリーエバポレーターにより溶媒を留去した。その後、真空乾燥させることで **FM2** と NPM の複合体を得た。

窒素雰囲気下、**FM2** と NPM のエステル複合体、DVB (284 μL, 2 mmol)、V-65 (10.0 mg) を dry クロロホルムに溶解し、45 °C で 20 h、さらに 80 °C で 3 h 重合した。得られたポリマーを真空乾燥させた後、粒径が数 μm 程度となるように物理的に粉砕した。さらに、ポリマー粒子を 5% HCl 水溶液/アセトン (1:1, v/v) 溶媒 (20 mL) に懸濁させ、室温で一晩撹拌した。その後、純水/メタノール (1:1, v/v) 溶媒で数時間撹拌し、アセトニトリル溶媒を使用して 8 h ソックスレー抽出を実施した後、真空乾燥させることで MIP_{FM2} を得た。

さらに、MIP_{FM2} をメタノールに懸濁させ、その溶液 (3 mL) を UV セル (10×10×40 mm) に移液した。さらに、熱線吸収フィルター (HAF-50S-50H, Sigmakoki Co., Ltd, Japan) および紫外透過可視吸収フィルター (UTAF-50S-33U, Sigmakoki Co., Ltd, Japan) を取り付けた超高圧水銀ランプ (USH-500SC, Ushio Inc. Japan) にて 230–430 nm の紫外光を照射した。その後、積分球 (ISV-469, JASCO Corporation, Japan) を取り

付けた UV/Vis 分光光度計 (V-560, JASCO Corporation, Japan) を使用して **FM2** を分子認識空間内に固定化した MIP_{FM2} の UV スペクトルを測定した。

◇ MIP に対する NPM の結合能評価

MIP_{FM2} (3 mg) と 50 μM NPM アセトニトリル溶液 (3 mL) をバイアル瓶に加え、遮光条件下、25 °C で 20 h インキュベートした。一方、同様の実験操作により溶液を調整し、熱線吸収フィルター (HAF-50S-50H, Sigmakoki Co., Ltd, Japan) および紫外透過可視吸収フィルター (UTAF-50S-33U, Sigmakoki Co., Ltd, Japan) を取り付けた超高圧水銀ランプ (USH-500SC, Ushio Inc. Japan) にて 230–430 nm の紫外光を照射し、25 °C で 20 h インキュベートした。0.2 μm のシリンジフィルター (DISMIC-13HP020AN, Advantec Japan, Co., Ltd., Japan) を使用して各インキュベーション溶液を濾過し、HPLC (溶離液: アセトニトリル/純水=60:40, v/v、流速: 1 mL/min、分離カラム: SPELCOSIL-LC-8DB (150 mm × 4.6 mm I.D.) (Sigma-Aldrich, USA)、検出波長: 293 nm) を使用することにより MIP_{FM2} に対する未結合の NPM を定量した。また、MIP_{FM2} を加えていない溶液のみで同様の実験操作を実施し、これを対照の検量線として使用することで MIP_{FM2} に対する NPM の結合量を求めた。

3-3. 結果と考察

3-3-1. スピロピラン誘導体の合成と分光学的特性の評価

カルボキシ基とメタクリロイル基を有する **FM1** は前述した条件により合成し、^{1}H NMR と ESI-MS にて同定した (***Scheme 3-1***)。また、**FM1** の分光学的特性を評価した結果、高極性溶媒であるメタノール中においては蛍光分光光度計を使用し 332 nm の紫外光を照射することで **FM1** の 550 nm 近傍の吸収が徐々に増加し、SP 型から MC 型への光異性化が確認され、20 min 程度で飽和することが判明した (***Figure 3-6***)。しかしながら、同様の条件にて低極性溶媒であるクロロホルム/ヘキサン (4:1, v/v) 溶媒中では SP 型から MC 型への明確な光異性化は確認されなかった。そこで、超高圧水銀ランプを使用して紫外光を照射した結果、低極性溶媒であるクロロホルム/ヘキサン (4:1, v/v) 溶媒中においても **FM1** の 580 nm 近傍の吸収が増加し、SP 型から MC 型への光異性化が確認され、10 min 程度で速やかに飽和することが判明した (***Figure 3-6***)。これらの結果は **FM1** の光異性化には溶媒の極性が大きく関与しており、高極性溶媒を使用することで MC 型のイオン対がより安定化されることを示唆している[12]。また、いずれの溶媒中においても、自然光により、20 min 程度の時間で MC 型から初期の SP 型へ可逆的に異性化することも確認した。

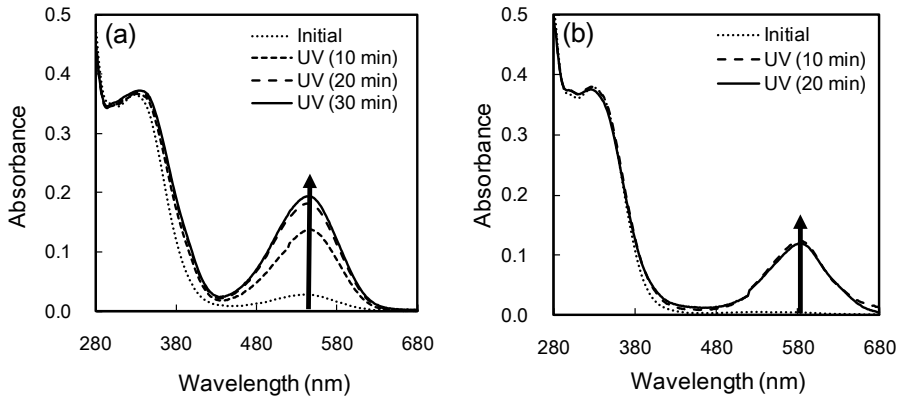


Figure 3-6. Photo-responsive properties of **FM1** by UV light irradiation in (a) methanol (light source: Fluorescence spectrophotometer, 332 nm) and (b) chloroform/hexane (4:1, v/v) (light source: extra-high pressure mercury lamp).

(7) の分光学的特性を評価した結果、蛍光分光光度計にて 332 nm の紫外光を照射することにより、酢酸エチル、クロロホルムいずれの溶媒中においても **(7)** の 580 nm

近傍の吸収が増大し、SP 型から MC 型への光異性化が確認された (***Figure 3-7***)。この光異性化は 30 min 程度で飽和し、酢酸エチル中における **(7)** の光異性化効率はクロロホルム中における異性化効率よりも高いことが判明した。これは前述したとおり、**(7)** の MC 型が高極性溶媒中でより安定化するためであると考えられる。また、いずれの溶媒中においても自然光の下、20 min 程度で MC 型から SP 型へ可逆的に光異性化が進行することも確認した。

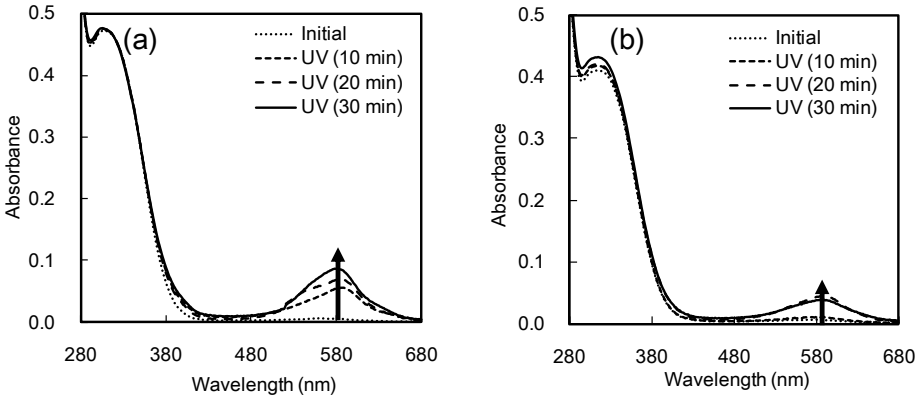


Figure 3-7. Photo-responsive properties of **(7)** by UV light irradiation in (a) ethyl acetate and (b) chloroform (light source: Fluorescence spectrophotometer (332 nm)).

また、**(7)** におけるネオペンチルグリコール基を脱保護することにより、フェニルボロン酸基とメタクリロイル基を有する **FM2** を合成し、ESI-MS にて同定した (***Scheme 3-2***)。さらに、エステル複合体を形成させるために **FM2** と NPM を dry ジクロロメタン中に懸濁させた。数時間、脱水反応を実施した結果、固形分がほぼ全て溶解した。この結果は、NPM 単独では極性の高い水酸基の影響のためにジクロロメタンなどの低極性溶媒には不溶であるが、**FM2** のフェニルボロン酸基とエステル複合体を形成したことで化合物の極性が下がり、低極性溶媒への溶解性が増加したことを示唆している。

3-3-2. ^{1}H NMR によるスピロピラン誘導体と標的分子の相互作用評価

アトラジンと **FM1** の分子間相互作用を ^{1}H NMR にて評価した結果、アトラジンのイソプロピル基側のアミノプロトンが低磁場側 (5.08 ppm から 5.66 ppm) にシフトしており、ca. 2 eq で飽和することが判明した。この結果は 45 °C のクロロホルム

溶媒中においても、アトラジンのアミノ基と **FM1** のカルボキシ基が相互作用していることを示唆している (***Figure 3-8***)。アトラジンのイソプロピル基上のアミノプロトンと **FM1** のカルボキシ基が 1:1 で相互作用すると仮定し、カーブフィッティングソフトウェア (Origin Pro 7.5J) にて解析するとそれらの結合定数 (K_a) は 1.4×10^3 M^{-1} であり、R^2 の値は 0.99 と上記モデル式によくフィットした。これらの結果から、**FM1** はアトラジンの MIP を合成する際において、複合体形成のための機能性モノマーとして有効であることが判明した。

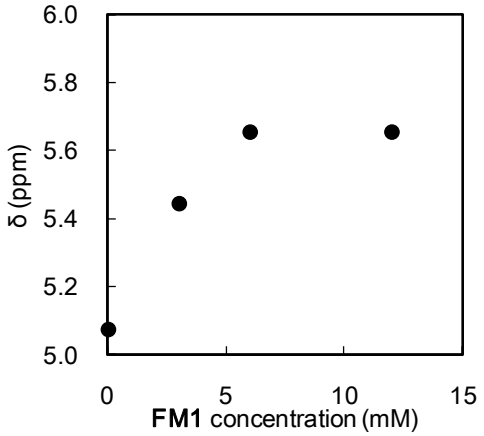


Figure 3-8. Chemical shift of the *N*-isopropyl amino proton on atrazine (3 mM) in $CDCl_3$ by titrating **FM1**.

3-3-3. アトラジンを認識する MIP の評価

◇ アトラジンを認識する MIP の分光学的特性の評価

FM1 を分子認識空間内に固定化した MIP_{EDMA} の分光学的特性を評価した結果、MIP_{EDMA} における分子認識空間内に存在するスピロピラン由来の 580 nm 近傍の吸収が増大し、インキュベーション溶媒となるクロロホルム/ヘキサン (4:1, v/v) 溶媒中においても SP 型から MC 型への光異性化が 10 min 以内で速やかに進行することが判明した。さらに、可視光を 10 min 照射することにより、580 nm 近傍の MC 型の吸収が減少し、可逆的に初期の SP 型へ光異性化することも確認した (***Figure 3-9***)。このため、低極性溶媒中においても 超高圧水銀ランプにて紫外光を照射することにより、MIP_{EDMA} の分子認識空間内に固定化されたスピロピラン部位が可逆的に光異性化することが判明した。

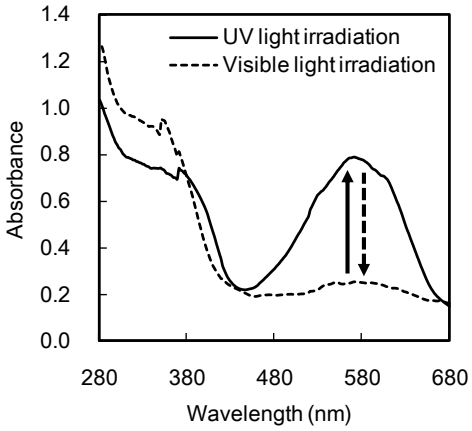


Figure 3-9. UV-Vis spectra of MIP_{EDMA} under the UV light irradiation for 10 min and the following visible light irradiation for 10 min in chloroform/hexane (4:1, v/v).

◇ アトラジンを認識する MIP の結合能評価

アトラジンを認識するための最適な架橋剤を検討するために種々の架橋剤 (EDMA, TRIM, DVB, DVB/Styrene) を使用した MIP を合成した。各ポリマーにおけるアトラジンの抽出率はそれぞれ MIP_{EDMA} では 72%、MIP_{TRIM} では 65%、MIP_{DVB} では 59%、$MIP_{DVB/Styrene}$ では 76% であることが判明した。MIP_{EDMA} および $MIP_{DVB/Styrene}$ におけるアトラジン抽出率は MIP_{TRIM} および MIP_{DVB} のアトラジン抽出率に比して高いことから、ポリマーマトリックスを構成する架橋密度の違いにより鋳型分子の抽出率が異なることが判明した。

さらにアトラジンに対する結合能を評価したした結果、MIP_{EDMA} に対するアトラジンの結合量は 2.1 μmol/g であり、他の架橋剤を使用した MIP_{TRIM} (0.86 μmol/g)、MIP_{DVB} (0.51 μmol/g)、$MIP_{DVB/Styrene}$ (1.5 μmol/g) よりも高い結合能を示すことが判明した (***Figure 3-10***)。この結果はポリマー自体の極性と架橋点間距離が標的分子の結合能に大きく寄与している可能性を示唆している。すなわち、アトラジンの分子認識においては、剛直で極性の低い芳香族系の架橋剤を使用することで分子認識空間内への標的分子のアクセシビリティが低下すると考えられる。一方で、類似の極性を有する架橋剤であっても 3 官能性のモノマーである TRIM に比して 2 官能性のモノマーである EDMA を使用した MIP に対するアトラジンンの結合量が高いことから、適度に低架橋度のポリマーを合成することが標的分子の認識に対して有効であることが判明した。

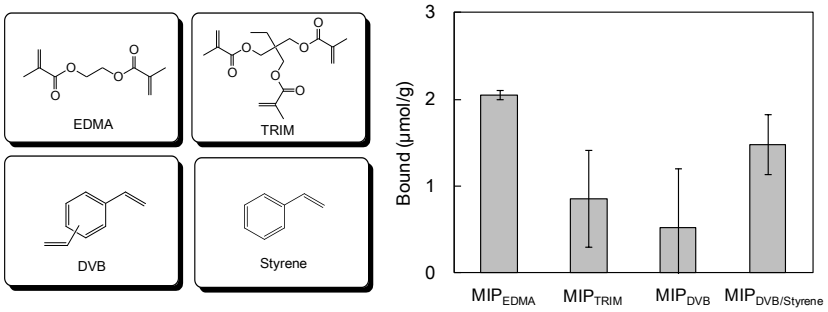


Figure 3-10. Binding activity of MIP_{EDMA}, MIP_{TRIM}, MIP_{DVB}, and $MIP_{DVB/Styrene}$ for atrazine (100 μM) in chloroform/hexane (4:1, v/v).

また、スケールアップした条件にて合成した MIP_{EDMA} からのアトラジン抽出溶液を定量した結果、アトラジン抽出率は 78% であることが判明した。当該ポリマーを使用することにより、種々の濃度 (25, 50, 100, 200, 400, 500, 800, 1000, 1600, 2000 μM) のアトラジン溶液を調整し、MIP_{EDMA} に対する結合量を求め、スキャッチャード解析により、解離定数 (K_d) および最大結合量 (B_{max}) を推定した (***Figure 3-11***)。ここで、スキャチャードプロットはリニア型ではなく、双曲線型を示している。この結果は標的分子であるアトラジンに対して親和性の高い分子認識空間 **(1)** と親和性の低い分子認識空間 **(2)** が混在していることを示唆している。スキャッチャード解析による解離定数 (K_d) は それぞれ **(1)** 式において 4.7×10^{-5} M であり、**(2)** 式において 2.0×10^{-3} M であった。この値は機能性モノマーとしてメタクリル酸を使用して合成した MIP の解離定数 (K_d) の文献値[20] [1.2×10^{-5} M] と同程度であることが判明した。また、スキャッチャード解析による最大結合量 (B_{max}) は それぞれ、**(1)** 式において 5.0 μmol/g であり、**(2)** 式において 46 μmol/g であった。これらの値は重合時に添加した鋳型分子量から推算した (アトラジン抽出率を考慮した) 分子認識空間の値のそれぞれ 4.8% および 44% に相当することが判明した。

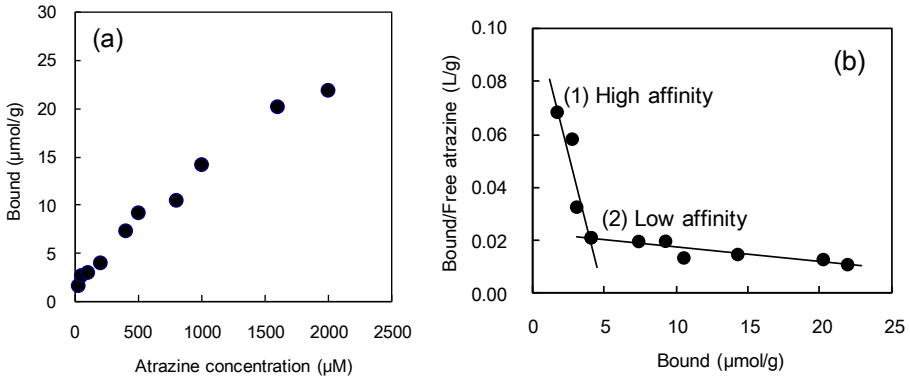


Figure 3-11. (a) Biding isotherm and (b) Scatchard plot of atrazine for MIP_{EDMA} (10 mg) in chloroform/hexane (4:1, v/v).

さらに、種々の農薬 (トリアジン型: アトラジン、シマジン、酸アミド型: アシュラム、ジカルボキシイミド型: イプロジオン) のクロロホルム/ヘキサン (4:1, v/v) 溶液を調整し、MIP_{EDMA} に対する結合量を求めた。その結果、トリアジン骨格を有するアトラジン、シマジンの結合量はそれぞれ、4.9 μmol/g、4.1 μmol/g であり、その他の農薬であるアシュラム、イプロジオンの結合量よりも高いことが判明した **(*Figure 3-12*)**。加えて、アトラジンの結合量は嵩高いシアノ基を有するシマジンの結合量よりもわずかに高く、分子認識空間のサイズが標的分子に対する分子認識能に影響を及ぼしている可能性を示唆している。これらの結果から、トリアジン骨格を有するアトラジンやシマジンは他の農薬 (アシュラム、イプロジオン) に比して MIP_{EDMA} に対する結合能が高く、トリアジン骨格を有する化合物を選択的に認識できる機能性高分子材料の合成が可能であると考えられる。

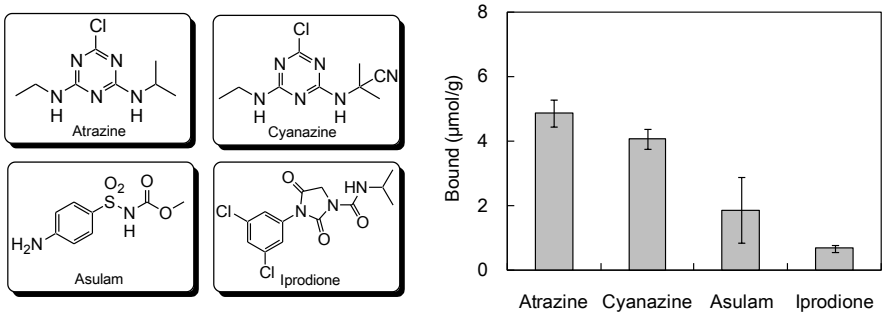


Figure 3-12. Selectivity of MIP_{EDMA} toward atrazine, cyanazine, asulam, and iprodione (200 μM) in chloroform/hexane (4:1, v/v).

加えて、遮光条件で 20 h インキュベートした際の MIP_{EDMA} に対するアトラジンの結合量は 4.8 μmol/g である一方で、重合時に鋳型分子を加えていない NIP_{EDMA} に対する結合量 (3.0 μmol/g) よりも高かった (***Figure 3-13***)。この結果は機能性モノマーである **FM1** のカルボキシ基と鋳型分子であるアトラジンのアミノ基による複合体が形成されるため、重合時において鋳型分子近傍の架橋点間距離が局所的に増大し、分子認識空間内への標的分子のアクセシビリティが向上したためであると考えている。さらに紫外光を照射することにより、MIP_{EDMA} に対して結合していたアトラジンは 4.8 μmol/g から 0.9 μmol/g へ減少し、初期のアトラジン結合量の ca. 80% が放出された (***Figure 3-12***)。一方で NIP_{EDMA} に対するアトラジンの結合量は紫外光照射により、3.0 μmol/g から 1.5 μmol/g に減少し、初期のアトラジン結合量の ca. 50% が放出された (***Figure 3-12***)。これらの結果は紫外光照射により、分子認識空間内の **FM1** が SP 型から MC 型へ光異性化することにより、1) 標的分子を認識するためのカルボキシ基が相補的な位置から変化すること、2) ポリマー粒子表面近傍の極性が局所的に増大するために水素結合が阻害されることに起因するものと推定している。

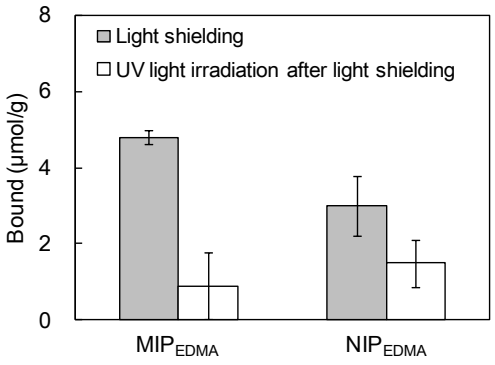


Figure 3-13. The binding behavior of atrazine (200 μM) in MIP_{EDMA} and NIP_{EDMA} under the light shielding for 20 h followed by the UV light irradiation for 20 h in chloroform/hexane (4:1, v/v).

3-3-4. 4-ニトロフェニル α-D-マンノピラノシドを認識する MIP の評価

遮光条件および紫外光照射条件にて **FM2** を分子認識空間内に固定化した MIP_{FM2} の分光学的特性を評価した結果、560 nm 近傍の吸収が増大し、MIP_{FM2} 中の分子認識空間内に存在するスピロピラン部位が SP 型から MC 型へ速やかに光異性化することが判明した (***Figure 3-14***)。

そこで、遮光条件および紫外光照射条件において MIP_{FM2} と NPM のアセトニトリル溶液を 20 h インキュベートし、MIP_{FM2} に対する標的分子の結合量を算出した。その結果、MIP に対する NPM の結合量は 4.3 μg/mol から 2.9 μg/mol へ ca. 30% 減少したことが判明した (***Figure 3-15***)。この結果は前述したとおり、MIP_{FM2} の分子認識空間内のスピロピラン部位が SP 型から MC 型へ光異性化することにより、標的分子を認識するためのフェニルボロン酸基が相補的な位置から変化することに起因するものと推定している。しかしながら、カルボキシ基を有する **FM1** を含有する MIP_{EDMA} に対するアトラジンの結合結果とは異なり、初期の NPM 結合量の ca. 30% が放出された。この結果は 1) カルボキシ基とアトラジンのアミノプロトン間の水素結合とは異なり、フェニルボロン酸基と NPM の水酸基がエステル複合体を形成しているために標的分子の解離が不十分であること、2) 分子認識空間内にフェニルボロン酸基を有する **FM2** を含有する MIP_{FM2} の光異性化効率が **FM1** を含有する MIP_{EDMA} に比して低いことに起因しているものと推定している。

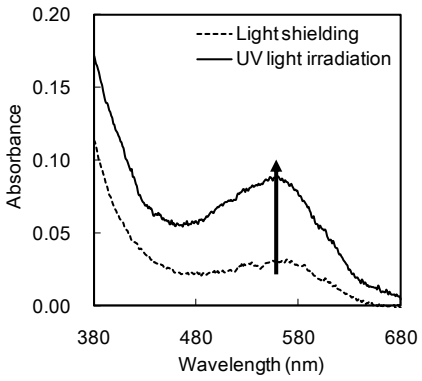


Figure 3-14. UV-Vis spectra of MIP_{FM2} under UV light irradiation in methanol.

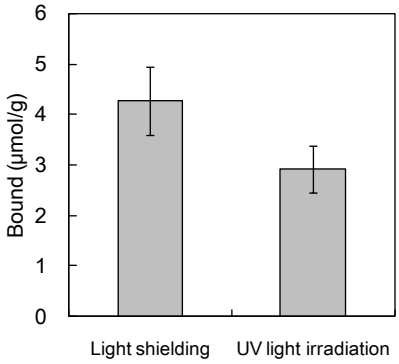


Figure 3-15. The binding behavior of NPM in MIP_{FM2} under the light shielding for 20 h and UV light irradiation for 20 h in acetonitrile.

3-4. 結言

本章では光異性化可能な機能性モノマーを新たに設計·合成し、MIP の分子認識空間内に固定化することで標的分子を放出制御可能な分子認識材料の合成を試みた。はじめに、機能性モノマーとしてカルボキシ基とメタクリロイル基を有する **FM1** を設計·合成し、種々の架橋剤を使用してアトラジンを標的分子とした MIP_{EDMA} を合成することで最適な架橋剤を選定した。また、吸着等温線とスキャッチャード解析により解離定数 (K_d) を推定し、種々の農薬を使用した選択性の評価、光異性化時における結合能の変化について検討した。

さらに、同様のコンセプトにて、機能性モノマーとしてフェニルボロン酸基とメタクリロイル基を有する **FM2** を新たに設計·合成し、標的分子となる NPM を認識する MIP の合成を実施した。また、光異性化時における MIP に対する NPM の結合量の変化について検討した。

本章により得られた知見を要約すると以下のようになる。

1) スピロピラン骨格にカルボキシ基およびメタクリロイル基を有する **FM1**、フェニルボロン酸基およびメタクリロイル基を有する **FM2** を合成することに成功した。いずれのスピロピラン誘導体においても紫外光照射により、速やかに SP 型から MC 型への光異性化が進行し、自然光にて MC 型から初期の SP 型へ可逆的に光異性化が進行した。

2) アトラジンを標的分子として **FM1** を分子認識空間内に固定化した MIP_{EDMA}、NPM を標的分子として **FM2** を分子認識空間内に固定化した MIP_{FM2} を合成した。いずれの MIP においても紫外光照射により、MIP の分子認識空間内に存在するスピロピラン部位が SP 型から MC 型へ速やかに光異性化した。

3) 最適な架橋剤を検討するために種々の架橋剤 (EDMA, TRIM, DVB, DVB/Styrene) を使用した MIP を合成し、それぞれの MIP に対するアトラジンの結合量を求めた。その結果、ポリマーの架橋度と極性が標的分子の分

子認識能に大きく寄与しており、アトラジンを認識するためには MIP の架橋剤として EDMA が最適であることが判明した。

4) アトラジンを標的分子とした MIP_{EDMA} の吸着等温線およびスキャッチャード解析の結果より、親和性の高い分子認識空間における解離定数 (K_d) は 4.7×10^{-5} M であり、この解離定数 (K_d) の値はメタクリル酸を機能性モノマーとして使用したアトラジンを標的分子とした MIP の文献値と同程度であることが判明した。一方で親和性の低い分子認識空間における解離定数 (K_d) は 2.0×10^{-3} M であった。また、最大結合量 (B_{max}) はそれぞれ、5.0 μmol/g、46 μmol/g であり、これらの値は重合時に添加した鋳型分子量から推算した分子認識空間 (理論値) のそれぞれ 4.8%、44% に相当した。

5) MIP_{EDMA} に対する種々の農薬 (アトラジン、シマジン、アシュラム、イプロジオン) の選択性を評価した結果、アシュラム、イプロジオンに比してアトラジン、シマジンの結合量が高いことが判明した。これらの結果から合成した MIP_{EDMA} はトリアジン骨格を有する化合物に対して選択性を有することが判明した。

6) 遮光条件において MIP_{EDMA} および NIP_{EDMA} に対するアトラジンの結合実験を実施した結果、アトラジンの結合量はそれぞれ MIP_{EDMA} (4.8 μmol/g)、NIP_{EDMA} (3.0 μmol/g) であることが判明した。この結果は MIP_{EDMA} を重合する際に鋳型分子となるアトラジンを添加することで鋳型分子近傍の架橋点間距離が局所的に増大し、分子認識空間内への標的分子のアクセシビリティが向上したためであると考えている。一方で、遮光後、紫外光照射条件において MIP_{EDMA} および NIP_{EDMA} を使用して結合実験を実施した結果、アトラジンの結合量はそれぞれ MIP_{EDMA} (0.9 μmol/g)、NIP_{EDMA} (1.5 μmol/g) であり、ぞれぞれ、アトラジンの初期結合量の ca. 80%、ca. 50% が放出された。これらの結果は MIP_{EDMA} の分子認識空間内に存在する **FM1** が紫外光照射により、SP 型から MC 型へ光異性化したことに起因しているものと考えられる。すなわち、光異性化により標的分子と相互作用するカルボキシ基が相補的な

位置から変化したことおよびポリマー粒子表面近傍の極性が増大したことで **FM1** とアトラジン間の水素結合が阻害されたものと推定している。

7) 分子認識空間内に **FM2** を固定化した MIP_{FM2} に対する NPM の結合量はそれぞれ 遮光条件 (4.3 μmol/g)、紫外光照射条件 (2.9 μmol/g) であり、紫外光照射により NPM の結合量が ca. 30% 減少した。この結果は前述したとおり、NPM と相互作用するフェニルボロン酸基が相補的な位置から変化するため、分子間相互作用が阻害されたものと推定している。

本章では光異性化可能な機能性モノマーを新たに設計·合成し、光照射条件における標的分子の結合能の変化を検討した。その結果、遮光時と紫外光照射時における標的分子の結合量に有意差が認められ、本手法により外部刺激によって放出制御機能を有する分子認識材料を合成できる可能性が見出された。外部刺激により標的分子を取り込み、貯蔵、放出するといった一連の機能を有する材料を創製することは薬物などのコントロールドリリースシステなどにも応用可能であり、非常に有効で意義のあるものと考えられる。

【参考文献】

第 3 章

[1] M. A. C. Stuart, W. T. S. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, G. B. Sukhorukov, I. Szleifer, V. V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. Luzinov and S. Minko, Emerging Applications of Stimuli-Responsive Polymer Materials, *Nat. Mater.* **2010,** 9, 101–113.

[2] L. Zhai, Stimuli-responsive polymers films, *Chem. Soc. Rev.* **2013,** 42, 7148–7160.

[3] 市村国広　監修　光機能性高分子の開発　シーエムシー出版 (2000)

[4] F. Ercole, T. P. Davis, and R. A. Evans, Photo-Responsive Systems and Biomaterials: Photochromic Polymers, Light-Triggered Self-Assembly, Surface Modification, Fluorescence Modulation and Beyond, *Polym. Chem.* **2010,** 1, 37–54.

[5] D-H. Qu, Q-C. Wang, Q-W. Zhang, X. Ma, and H. Tian, Photoresponsive Host-Guest Functional Systems, *Chem. Rev.* **2015,** 115, 7543–7588.

[6] L. Fang, S. Chen, X. Guo, Y. Zhang, and H. Zhang, Azobenzene-Containing Molecularly Imprinted Polymer Microspheres with Photo- and Thermoresponsive Template BindingProperties in Pure Aqueous Media by Atom Transfer Radical Polymerization, *Langmuir* **2012,** 28, 9769–9777.

[7] C. B. Gong, M. H-W. Lam, and H. X. Yu, The Fabrication of a Photoresponsive Molecularly Imprinted Polymer for the Photoregulated Uptake and Release of Caffeine, *Adv. Funct. Mater.* **2006,** 16, 1759–1767.

[8] X-R. Zhou, S-A. Zhong, and G-S. Jiang, Computer Simulation and Synthesis of Stimuli-Responsive Polymer by Sol-Gel for Selective Recognition of (4-Chloro-2-methylphenoxy)acetic acid, *Polym. Int.* **2012,** 61, 1778–1785.

[9] T. Takeuchi, K. Akeda, S. Murakami, H. Shinmori, S. Inoue, W. S. Lee, and T. Hishiya, Photoresponsive Porphyrin-Imprinted Polymers Prepared Using a Novel Functional Monomer Having Diaminopyridine and Azobenzene Moieties, *Org. Biomol. Chem.* **2007,** 5, 2368–2374.

[10] T. Takeuchi, T. Mori, A. Kuwahara, T. Ohta, A. Oshita, H. Sunayama, Y. Kitayama, and T. Ooya, Conjugated-Protein Mimics with Molecularly Imprinted Reconstructible and Transformable Regions that are Assembled Using Space-Filling Prosthetic Groups, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014,** 53, 12765–12770.

[11] S. Marx-Tibbon and I. Iillner, Photostimulated Imprinted Polymers: A Light-regulated Medium for Transport of Amino Acid, *J. Chem. Soc. Commun.* **1994,** 10, 1261–1262.

[12] T. Renkecz, G. Mistlberger, M. Pawlak, V. Horváth, and E. Bakker, Molecularly Imprinted Polymer Microspheres Containing Photoswitchable Spiropyran-Based Binding Sites, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013,** 5, 8537–8545.

[13] E. Fisher and Y. Hirshberg, Formation of Coloured Forms of Spirans by Low-Temperature Irradiation, *J. Chem. Soc.* **1952,** 11, 4522–4524.

[14] Y. Wu, X. Qu, L. Huang, D. Qiu, C. Zhang, Z. Liu, Z. Yang, and L. Feng, Optically Switchable Organic Hollow Nanocapsules, *J. Colloid. Interface. Sci.* **2010,** 343, 155–161.

[15] J. Tao, Y. Li, P. Zhao, J. Li, Y. Duan, W. Zhao, and R.Yang, Development of Spiropyran-Based Electrochemical Sensor via Simultaneous Photochemical and Target-Activatable Electron Transfer, *Biosens. Bioelectron.* **2014,** 62, 151–157.

[16] N. Shao, Y. Zhang, S. M. Cheung, R. H. Yang, W. H. Chan, T. Mo, K. A. Li, and F. Liu, Copper Ion-Selective Fluorescent Sensor Based on the Inner Filter Effect Using a Spiropyran Derivative, *Anal. Chem.* **2005,** 77, 7294–7303.

[17] R. Klajn. Spiropyran-Based Dynamic Materials, *Chem. Soc. Rev.* **2014,** 43, 148–184.

[18] L. Kong, H.-L. Wong, A. Y.-Y. Tam, W. H. Lam, L. Wu, and V. W.-W. Yam, Synthesis, Characterization, and Photophysical Properties of Bodipy-Spirooxazine and -Spiropyran Conjugates: Modulation of Fluorescence Resonance Energy Transfer Behavior via Acidochromic and Photochromic Switching, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014,** 6, 1550−1562.

[19] L. Florea, A. Hennart, D. Diamond, and F. Benito-Lopez, Synthesis and Characterisation of Spiropyran-Polymer Brushes in Micro-Capillaries: Towards an Integrated Optical Sensor for Continuous Flow Analysis, *Sens. Actuators B Chem.* **2012,** 175, 92–99.

[20] J. Matsui, Y. Miyahi, O. Doblhoff-Dier, and T. Takeuchi, A Molecularly Imprinted Synthetic Polymer Receptor Selective for Atrazine, *Anal. Chem.* **1995,** 67, 4404–4408.

[21] M. Matsui, M. Okada, M. Tsuruoka, and T. Takeuchi, Solid-Phase Extraction of a Triazine Herbicide Using a Molecularly Imprinted Synthetic Receptor, *Anal*. *Commun*. **1997,** 34, 85–87.

[22] J. Chen, L.-Y. Bai, K.-F. Liu, R.-Q. Liu, and Y.-P. Zhang, Atrazine Molecular Imprinted Polymers: Comparative Analysis by Far-Infrared and Ultraviolet Induced Polymerization, *Int. J. Mol. Sci.* **2014,** 15, 574–587.

[23] R. Liu, G. Guan, S. Wang, and Z. Zhang, Core-Shell Nanostructured Molecular Imprinting Fluorescent Chemosensor for Selective Detection of Atrazine Herbicide, *Analyst* **2011,**136, 184–190.

[24] B. Ara, Z. Chen, J. Shah, M. Rasul Jan, and L. Ye, Preparation and Characterization of Uniform Molecularly Imprinted Polymer Beads for Separation of Triazine Herbicides, *J. Appl. Polym. Sci.* **2012,** 126, 315–321.

[25] T. Ishi-i., R. Iguchi, and S. Shinkai, D/L Selective Re-Binding of Saccharide-Imprinted [60] Fullerene-Bisadducts Based on a Saccharide-Boronic Acid Interaction: Development of a Molecular Imprinting Technique Useful in a Homogeneous System, *Tetrahedron* **1999,** 55, 3883–3892.

[26] T. D. James, K. R. A. Samankumara Sandanayake, and S. Shinkai, Saccharide Sensing with Molecular Receptors Based on Boronic Acid, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996,** 35, 1910–1922.

[27] G. Wulff and S. Schauhoff, Racemic Resolution of Free Sugars with Macroporous Polymers Prepared by Molecular Imprinting. Selectivity Dependence on the Arrangement of Functional Groups versus Spatial Requirements, *J. Org. Chem.* **1991,** 56, 395–400.

[28] M. Hirano, A. Miyashita, and H. Nohira Synthesis and Metastable Structure of New Photochromic Spiroindolinobenzothiopyrans, *Chem. Lett.* **1991,** 20, 209–212.

[29] M. Hirano, A. Miyashita, H. Shitara, and H. Nohira Synthesis and Photochemical Properties of Novel Spirobenzoselenazolinobenzopyrans, *Chem. Lett.* **1991,** 20, 1873–1876.

[30] S. Nakano, A. Miyashita, and H. Nohira, Metastable Solution Structures of Spirobenzoselenazolino-benzopyrans and their Negative Photochromic Properties, *Chem. Lett.* **1993,** 22, 13–16.

[31] R. Guglielmeni, R. Meyer, and C. Dupuy, Synthesis of a Photochromic Benzothiazolinic Spiropyran, *J. Chem. Educ.*, **1973,** 50, 413–415.

[32] C. Brieke and A. Heckel, Spiropyran Photoswitches in the Context of DNA: Synthesis and Photochromic Properties, *Chem. Eur. J.* **2013,** 19, 15726–15734.

[33] C. Beyer and H.-A. Wagenknecht, Synthesis of Spiropyrans as Building Blocks for Molecular Switches and Dyads, *J. Org. Chem.* **2010,** 75, 2752–2755.

[34] L. Hauser, A.-C. Knall, M. Roth., G. Trimmel, M. Edler, T. Griesser, and W. Kern, Reversible Photochromism of Polynorbornenes Bearing Spiropyran Side Groups, *Monatsh. Chem.* **2012,** 143, 1551–1558.

[35] A. Radu, R. Byrne, N. Alhashimy, M. Fusaro, S. Scarmagnani, and D. Diamond, Spiropyran-Based Reversible, Light-Modulated Sensing with Reduced Photofatigue, *J. Photochem. Photobiol A Chem.* **2009,** 206, 109–115.

[36] B. S. Lukyanov, and M. B. Lukyanova, Spiropyrans: Synthesis, Properties, and Apprication (Review), *Chem. Heterocycl. Compd.* **2005,** 41, 281–311.

[37] J. Han, J. Wang, K. Shen, G. Wang, Y. Li, and D. Zhao, Synthesis of Novel Photochromic Spiropyran Dyes Containing Quaternary Ammonium Salt or Cinnamoyl Moiety and their Properties as Photoinitiators, *J. Appl. Polym. Sci.* **2012,** 126, 30–37.

[38] M. Tomasulo, S. L. Kaanumal, S. Sortino, and F. M. Raymo, Synthesis and Properties of Benzophenone-Spiropyran and Naphthalene-Spiropyran Conjugates, *J. Org. Chem.* **2007,** 72, 595–605.

[39] 日本化学会生体機能関連化学部会　編　生体機能関連化学実験法　化学同人 (2003)

第 4 章

core-shell 型分子認識材料を用いた蛍光偏光法によるコルチゾールセンシングシステム

4-1. 緒言

コルチゾールは副腎皮質から分泌されるステロイド系ホルモンの一種であり、一般にストレスマーカーとして知られているため、当該物質を選択的に認識可能な機能性高分子材料の開発が求められている[1–6]。これまでにも機能性モノマーとしてメタクリル酸を使用して非共有結合型 MIP を合成し、コルチゾールに対する認識能を評価している研究結果が報告されている[7,8]。しかしながら、いずれの報告も水素結合を利用した非共有結合型 MIP の調整によるものであり、ポリマーマトリックス内に標的分子に対する親和性の高い分子認識空間と親和性の低い分子認識空間が混在するため、均一な分子認識空間が構築されていない可能性が示唆された。そこで、予備検討としてコルチゾールのステロイド骨格 21 位の 1 級水酸基をメタクリロイル化し、機能性モノマーとしてイタコン酸を使用した MIP の合成と評価を実施することにした **(*Figure 4-1*)**。

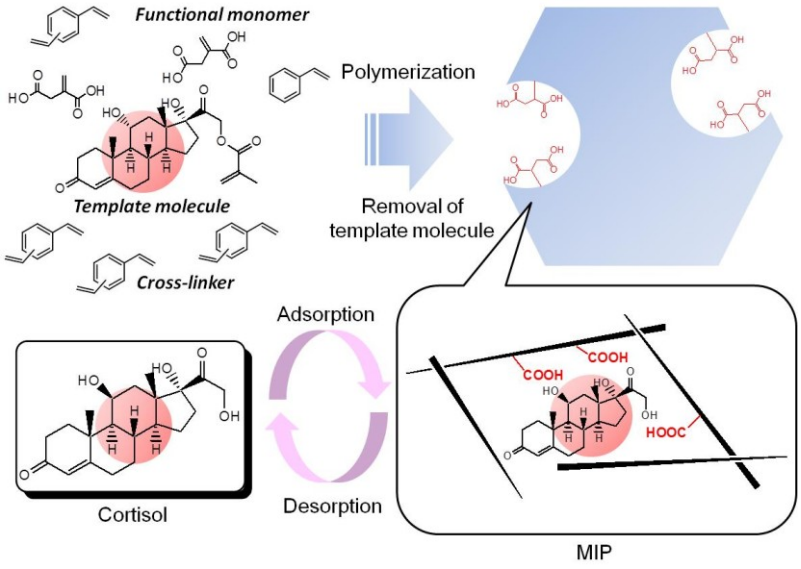


Figure 4-1. Preparation of MIP and molecular recognition of cortisol.

また、近年では MIP を薄膜や微粒子のような形状にすることにより分子認識空間へのアクセシビリティを向上させることで、迅速かつ高感度なセンシングが可能になるとの報告も数多くなされている[9–19]。そのため、本章では shell 層に分子認識能を付与した core-shell 型 MIP (MIP-NPs) を合成し、分子認識層の比表面積を増大させることで標的分子に対する結合能の迅速性と感度の向上を図ることにした。加えて、これまで検討されてきた MIP の評価法では B/F 分離が測定の感度を低下させる要

因ともなっていた。そこで、標的分子であるコルチゾールを蛍光色素でラベル化することで測定感度を向上させるとともに B/F 分離を必要としない評価法を構築することにした。

ところで、蛍光物質は特定の波長域の光エネルギーを吸収することで励起され、発光する。ここで、励起状態のエネルギー準位から基底状態のエネルギー準位に戻るまでに放出される光が蛍光と定義される。蛍光物質と光エネルギーの関係は *Jablonski* ダイアグラムのエネルギー準位によって表現されることが知られており、一般に蛍光強度 (輝度) はモル吸光係数 (ε) と量子収率 (φ) の積からなり、下記の定義式で規定される。

$$\text{輝度} \propto \text{モル吸光係数}\ (\varepsilon) \times \text{量子収率}\ (\varphi) \qquad \textbf{(4-1)}$$

蛍光物質の吸光係数とは蛍光物質に吸収される特定波長の光量を意味し、モル吸光係数は光路 1 cm 当たりの 1 M 蛍光色素溶液の光学濃度として定義される。また、量子収率とは励起光と蛍光の変換効率を示すものであり、放出された光子数と吸収された光子数の比で表わされる。また、蛍光物質の蛍光スペクトルは周囲の環境から影響を受ける場合があり、環境条件としては温度、イオン濃度、pH、リガンドとの共有結合、非共有結合性の相互作用などが存在する[20]。

以前から、蛍光ラベル化試薬の開発は数多くなされており、クマリン系、ダンシル系、ベンゾフラザン系、フルオレセイン系、ローダミン系などが広く利用されている。また、特殊な蛍光を発する代表例としてピレン系の蛍光色素も存在する。ピレン系蛍光色素は通常の極大蛍光波長 (350–400 nm) に加えて、高濃度領域において二量体を形成することによるエキシマー蛍光と呼ばれる比較的長波長 (450–500 nm) の蛍光を発することが知られている[21]。一方で、蛍光波長を長波長側にシフトさせる検討も行われ、現在では Alexa Fluor や Cyanine 系の色素などの極大蛍光波長が 600 nm を超える色素も開発されている。これらの蛍光色素は蛍光基に直結したスルホ基に特徴を有し、蛍光ラベル化検体に親水性を付与すると同時に蛍光色素同士の凝集誘起消光を抑制する働きを有する。この特性により、現在では生体内に存在する細胞内でのタンパク質間相互作用や DNA のハイブリダイゼーションなどの結合能や結合速度の解析に使用され、また、蛍光顕微鏡による細胞内のイメージングなどに広く利用されて

いる。蛍光物質の中には環境応答性が非常に高く、分子間相互作用を評価するために有効な物質も数多く存在する。上述した蛍光色素の中でもダンシル系蛍光色素は他の蛍光色素に比してストークスシフトが大きいため波長分離が容易に行えると同時に、比較的構造が小さいために分子認識時におけるラベル化した蛍光基の影響が少ないものと考えられる[22]。そこで、本章では shell 層に分子認識能を付与した core-shell 構造を有するポリマー微粒子を合成し、ダンシル系蛍光色素でラベル化したコルチゾールに対する分子認識能について評価することにした (***Figure 4-2***)。

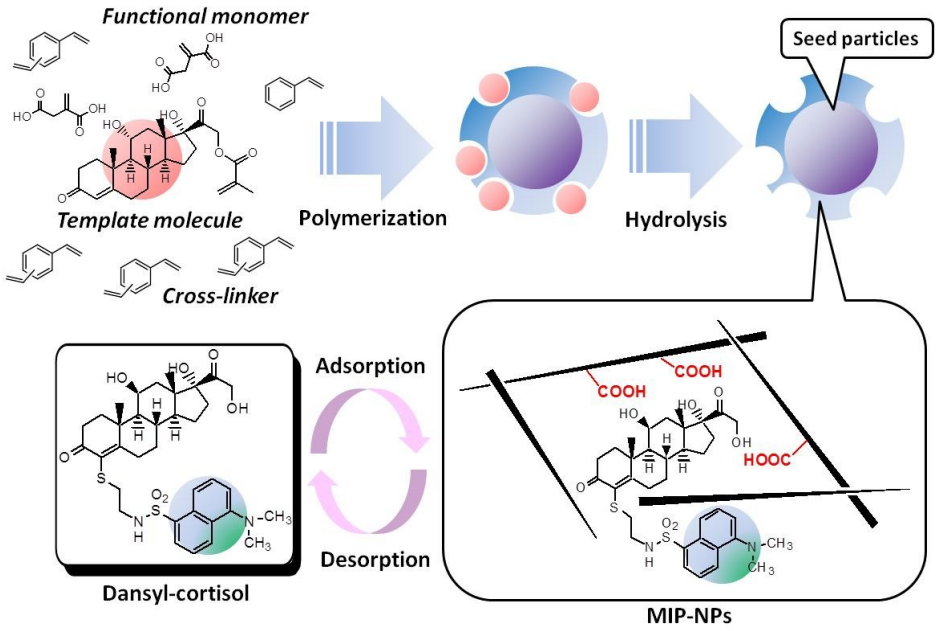


Figure 4-2. Preparation of the core-shell-type MIP-NPs and fluorimetric evaluation of cortisol binding capability on the core-shell-type MIP-NPs by using dansyl-cortisol.

蛍光分子にはある特定の方向を有する遷移双極子モーメントが存在し、偏光した励起光を照射することにより、励起光と同方向の遷移双極子モーメントを有する蛍光分子のみが励起され、蛍光を発することが知られている。一方で、溶液中において、蛍光分子はブラウン運動により回転しており、遷移双極子モーメントの方向は絶えず変化している。この回転運動の速度は分子サイズに依存し、分子サイズが大きいものほど分子の回転運動が束縛されることになる。この 2 つの性質を利用して蛍光分光光度計の励起側および蛍光側スリットに偏光板を設置し、蛍光分析を実施することでホスト･ゲスト分子が複合体を形成した際における分子サイズの変化、すなわち、蛍光偏光法に基づいた分子間相互作用の解析が可能となる[23–26] (***Figure 4-3***)。

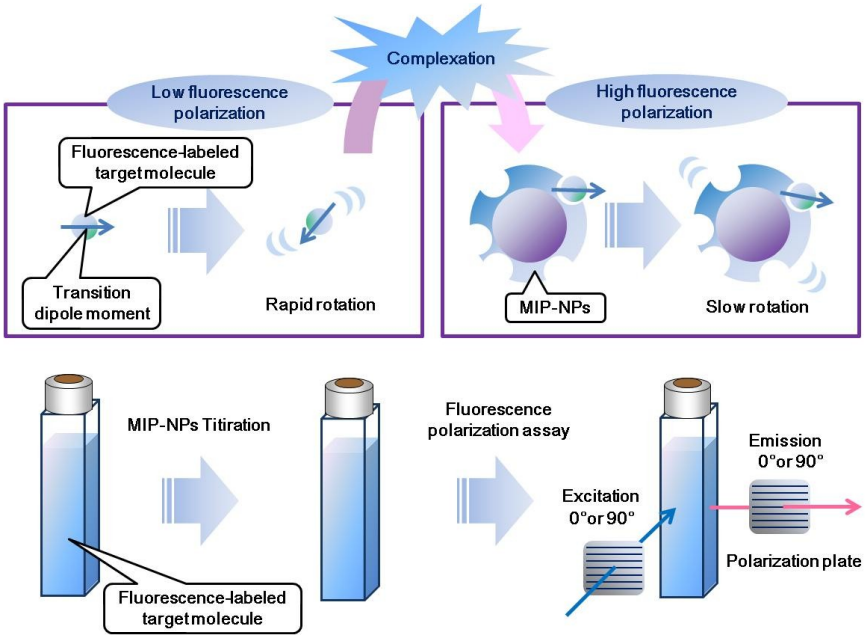


Figure 4-3. Fluorescence polarization-based sensing of target molecule using complex of MIP-NPs and fluorescence-labeled target molecule.

ここで、蛍光偏光法はこれまでに生化学や医学の分野において分子間相互作用を評価するにあたり、数多く利用されてきた解析手法であり[27–40]、蛍光偏光度 (*P*) または蛍光異方性 (アニソトロピー (*r*)) が分子間相互作用の指標として用いられる。蛍光偏光法は B/F 分離を必要とせず、標的分子の結合能を簡便にかつ経時的に評価できる利点が存在するため、これまでにも蛍光偏光法を利用した MIP による標的分子のセンシングに関する研究結果が報告されている[41,42]。

Hunt ら (2006) は標的分子の構造類似体である蛍光色素を利用して MIP に対する標的分子の結合能を蛍光偏光法により評価している[41]。本報告では 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸を標的分子として機能性モノマーに 4-ビニルピリジン、架橋剤に TRIM を使用して MIP を合成している。また、重合時に鋳型分子となる 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸を加えていない NIP を合成し、標的分子の結合能を評価することで鋳型分子の効果を確認している。また蛍光性の競合分子として 7-カルボキシ-4-メチルクマリンを使用して蛍光偏光法と競合法により MIP に対する標的分子の結合能を評価している。

Ton ら (2012) はフルオロキノリン環を有する標的分子の MIP に対する結合能を蛍光偏光法により直接測定する手法を報告している[42]。本報告では蛍光性のエンロフ

ロキサシンを標的分子とし、機能性モノマーとしてメタクリル酸と 2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA)、架橋剤として EDMA を使用した MIP を合成し、標的分子に対する結合能を評価している。さらに、実サンプルを使用した標的分子の検出にも成功している。

しかしながら、いずれの報告も標的分子自体あるいはその類似体が蛍光を有する物質である必要があるため、分析可能な検体が制限されていた。そこで、本研究では標的分子となるコルチゾールのステロイド骨格 4 位の 1 級水酸基を蛍光ラベル化に使用することで新たに蛍光ラベル化コルチゾールを設計･合成し、core-shell 型 MIP-NPs との相互作用を評価することにした。ここで、コルチゾールはステロイド骨格 21 位の 1 級水酸基が最も反応活性が高いことが知られているが、相互作用可能な官能基として保持するためにステロイド骨格 4 位の不飽和結合を蛍光ラベル化に使用することにした。上述したように蛍光分子の回転速度は分子サイズに依存するため、蛍光偏光法を利用することで蛍光分子が MIP-NPs と複合体を形成した際における分子サイズの変化、すなわち、分子間相互作用を簡便に評価することができる。しかしながら、蛍光偏光法は有効な分子間相互作用の評価法であるが、厳密には蛍光ラベル化された標的分子との相互作用を評価することになる。そこで、MIP-NPs の分子認識空間内に結合したダンシルラベル化コルチゾールを遊離のコルチゾールによって阻害することにより、アニソトロピー (r) の変化を解析し、間接的に MIP-NPs とコルチゾールの分子間相互作用を評価することにした。この競合実験により、同種のステロイド骨格を有する分子に対する選択性の評価が可能となり、B/F 分離を必要としない迅速かつ高感度なコルチゾールセンシングシステムが構築できるものと考えている (***Figure 4-4***)。

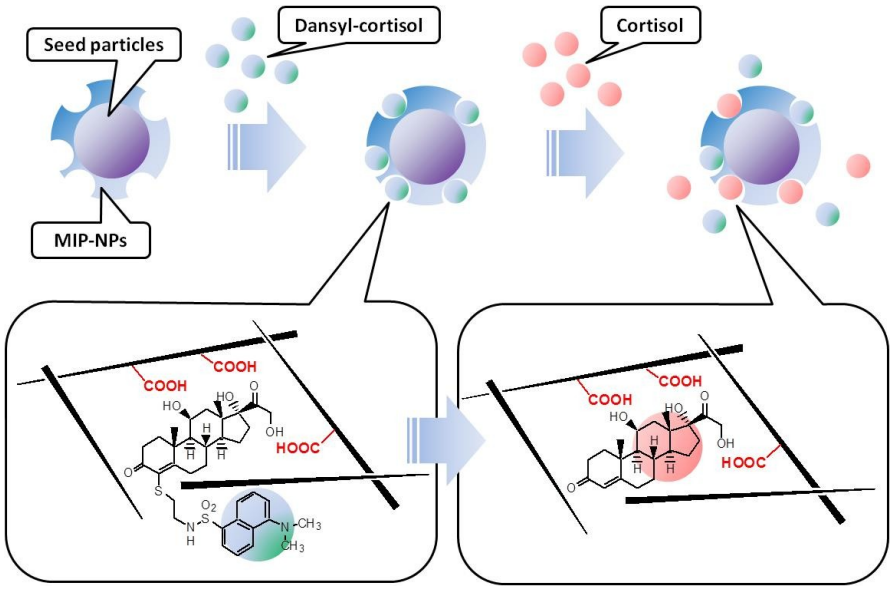


Figure 4-4. Fluorescence polarization-based cortisol sensing using competitive binding of dansyl-cortisol and cortisol toward the cortisol-imprinted cavities in MIP-NPs.

4-2. 実験

4-2-1. 試薬

第 4 章で使用した試薬を ***Table 4-1*** に記載した。なお、重合に使用した DVB およびスチレンは減圧蒸留により系内の重合禁止剤を除去した。重合に使用した THF、インキュベーションに使用したクロロホルムおよびヘキサンは系内の安定剤や水分を除去するために蒸留した。また、有機合成および重合時に使用した純水は Milli-Q (Merck Millipore Corp, Germany) で精製した。

Table 4-1. Reagent list.

Reagent	Maker	Grade
cortisol (hydrocortisone)	Sigma-Aldrich Co. LLC. (USA)	≥ 98%
methacrylic anhydride	Sigma-Aldrich Co. LLC. (USA)	94%
2,5-dihydroxy benzoic acid (DHB)	Sigma-Aldrich Co. LLC. (USA)	98%
progesterone	Sigma-Aldrich Co. LLC. (USA)	≥ 99%
dansyl chloride	Sigma-Aldrich Co. LLC. (USA)	≥ 99%
2-(Boc-amino)ethanethiol	Sigma-Aldrich Co. LLC. (USA)	97%
2,5-dihydroxy benzoic acid (DHB)	Sigma-Aldrich Co. LLC. (USA)	98%
triethylamine (Et_3N)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
methacryloyl chloride	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	1_{st} grade
N,N-dimethyl-4-aminopyridine (DMAP)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
methacrylic acid	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
itaconic acid	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
divinylbenzene (DVB)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	55% (mixture of isomers)
styrene	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
N,N′-methylenebisacrylamide-HG (MBAA)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	for electrophoresis
2,2′-azobis (4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile) (V-70)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	1_{st} grade
2,2′-azobis(2-methylpropion-amidine) dihydrochloride (V-50)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	1_{st} grade
1 M hydrochloric acid (HCl)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	for volumetric analysis
0.5 M HCl methanolic solution	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	for volumetric analysis
sodium hydroxide (NaOH)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	1_{st} grade

teststerone	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	for biochemistry
potassium bromide, crystal block	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	for infrared spectrophotometry
hydrogen peroxide (H_2O_2)	Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan)	extra pure reagent
sodium hydrogen carbonate	Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan)	extra pure reagent
citric acid	Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan)	extra pure reagent
sodium chloride	Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan)	extra pure reagent
sodium sulfate	Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan)	guaranteed reagent
tetrahydrofuran (THF)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	1_{st} grade
ethyl acetate	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	1_{st} grade
hexane	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	1_{st} grade
methanol	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
dry methanol	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	for organic synthesis
dry ethanol	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	for organic synthesis
acetonitrile	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	special grade
dichloromethane	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	1_{st} grade
acetone	Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)	1_{st} grade
chloroform	Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan)	extra pure reagent
chloroform-*d* ($CDCl_3$)	Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (USA)	99.8% (+0.05% TMS)

4-2-2. 分析装置

合成物の同定には ^{1}H NMR (JNM-LA300, JEOL Ltd., Japan)、MALDI-TOF-MS (Voyager-DE-1000, Applied Biosystems Inc, USA)、FT-IR (Varian 660KU, Varian Inc, USA) を使用した。微粒子の粒径測定には動的光散乱光度計 (DLS) (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) を使用し、微粒子の形状観察には走査型電子顕微鏡 (SEM) (VE-9800, Keyence Corp., Japan) を使用した。コルチゾールの定量には分離カラムとして Chromolith RP-18e (100 mm × 4.6 mm I.D.) (Merck Millipore Corp., Germany) を接続した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (Gilson Inc, USA) を使用した。また、蛍光分析には蛍光分光光度計 (F-2500, Hitachi, Ltd., Japan) を使用し、蛍光偏光実験には付属の偏光板 (650-0156, Hitachi, Ltd., Japan) を取り付けて使用した。

4-2-3. 鋳型分子の合成

◇ コルチゾール-21-モノメタクリレートの合成 (合成法 1)

窒素雰囲気下、コルチゾール (907 mg, 2.5 mmol) を dry THF (40 mL) に溶解し、

Et_3N (4.2 mL, 30 mmol) を加え、氷冷した。その後、dry THF (40 mL) に溶解した塩化メタクリロイル (1.5 mL, 15 mmol) を徐々に滴下し、0 °C で 1 h、その後、室温で 4 h 撹拌した。反応液に酢酸エチルを加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和クエン酸水溶液、飽和食塩水にて洗浄した後、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過にて固形分を除去した。溶媒をロータリーエバポレーターで留去し、粗生成物をカラムクロマトグラフィー (展開層: シリカゲル (C-200), 展開溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン=1:1, v/v) で分離·精製した。その後、真空乾燥を行うことで白色固体としてコルチゾール-21-モノメタクリレートを得た。

◇ コルチゾール-21-モノメタクリレートの合成 (合成法 2)

窒素雰囲気下、二口フラスコにコルチゾール (907 mg, 2.5 mmol)、DMAP (30.5 mg, 0.25 mmol) を加え dry THF (40 mL) に溶解した後、氷冷した。Et_3N (4.2 mL, 30 mmol)、無水メタクリル酸 (1.2 mL, 7.5 mmol) を徐々に滴下し、0 °C で 1 h、その後、室温で 2 日間撹拌した。反応液に酢酸エチルを加え、純水で 3 回洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた後、濾過にて固形分を除去し、溶媒をロータリーエバポレーターで留去した。粗生成物をカラムクロマトグラフィー (展開層: シリカゲル (C-200), 展開溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン=1:1, v/v) で分離·精製した後、真空乾燥させることで白色固体としてコルチゾール-21-モノメタクリレートを得た。(収率: 89%)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.99 (3H, s, 18-CH_3), 1.45 (3H, s, 19-CH_3), 2.17 (3H, s, methacryloyl-CH_3), 4.49 (1H, s, 11-OH), 4.93 and 5.12 (1H, each, d, *J*=18Hz, 21-CH_2), 5.67 (2H, s, methacryloyl=CH_2), 6.22 (1H, s, 4-CH), MALDI-TOF-MS (DHB) *m/z* (positive): Calcd. for $C_{25}H_{34}O_6$: 431.5 $[M+H]^+$, Found: 431.7

4-2-4. コルチゾールを認識する MIP の合成

ねじ口試験管にコルチゾール-21-モノメタクリレート (215.3 mg, 0.5 mmol)、イタコン酸 (262 mg, 2 mmol)、DVB (1304 mg, 10 mmol)、スチレン (209 mg, 2 mmol)、V-70 (86.4 mg, 0.28 mmol) を量りとり、dry THF (10 mL) に溶解した。2 min 程度窒素置換した後、密閉して 30 °C で 72 h 重合した (***Table 4-2***)。得られたポリマーを真空乾燥させた後、乳鉢にて粒径が数 μm 程度となるように物理的に粉砕した。その後、2 M NaOH 水溶液/メタノール (1:1, v/v) (50 mL) で 48 h 加水分解し、1 M HCl 水溶液/メ

タノール (1:1, v/v) (50 mL)、純水/メタノール (1:1, v/v) (50 mL) で撹拌した。さらに、メタノールにて 6 h ソックスレー抽出を実施し、ポリマー粒子を真空乾燥することで分析用検体とした。得られたポリマー粒子は SEM にて形状観察を行った。また、対照実験としてメタクリロイル化コルチゾールの代わりにメタクリル酸を加えた NIP を同様の条件にて合成した (***Table 4-2***)。

Table 4-2. Composition of MIP and NIP prepared by bulk polymerization.

	MIP	NIP
Cortisol-21-monomethacrylate	215.3 mg (0.5 mmol)	—
Methacrylic acid	—	43.1 mg (0.5 mmol)
Itaconic acid	262 mg (2 mmol)	
DVB	1304 mg (10 mmol)	
Styrene	209 mg (2 mmol)	
V-70	86.4 mg (0.28 mmol)	
dry THF	10 mL	

4-2-5. MIP に対する標的分子の結合能評価

◇ MIP に対する標的分子の吸着等温線

バイアル瓶に MIP (5 mg) を量りとり、62.5, 125, 250, 500, 1000 μM に調整したコルチゾール溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) (1 mL) を加え、サーモミキサー (Eppendorf AG., Germany) (25 °C, 800 rpm) にて 48 h インキュベートした。インキュベーション溶液を 0.2 μm 径のシリンジフィルター (DISMIC-13HP020AN, Advantec Japan, Co., Ltd., Japan) で濾過し、そのうち 0.5 mL を採取して真空乾燥させた。その後、アセトニトリル (0.5 mL) に再溶解し、分離カラムを取り付けた HPLC (溶離液: アセトニトリル/純水=70:30, v/v、流速: 1 mL/min、分離カラム: Chromolith RP-18e (100 mm × 4.6 mm I.D.) (Merck Millipore Corp., Germany)、検出波長: 241 nm) にて MIP に対する未結合のコルチゾールを定量した。MIP を加えていないコルチゾール溶液のみの検体で同様の実験操作を実施し、これを対照の検量線としてコルチゾールの結合量を求めた。さらに、MIP の対照実験として NIP を使用して同様の実験操作を実施することにより NIP に対するコルチゾールの結合量を求めた。

ここで、MIP における結合サイトとコルチゾールが 1:1 の分子錯体を形成すると

仮定すると結合定数 (K_a) は一般に下記のモデル式で近似できる[43]。

$$B = \frac{((1 + K_a H + K_a G) - ((1 + K_a H + K_a G)^2 - 4K_a{}^2 HG)^{\frac{1}{2}})B_{max}}{2K_a H} \quad \textbf{(4-2)}$$

本実験においては B が MIP または NIP に対するコルチゾールの結合量、G は変化させたコルチゾール濃度とする。ここで H はフィッティングパラメータであり、B_{max} はコルチゾールの最大結合量を表す。上述したモデル式 **(*4-2*)** を利用してカーブフィッティングにより、結合定数 (K_a) を求めた。

◇ MIP に対する標的分子の選択性評価

選択性の評価を実施するためにコルチゾールと類似のステロイド骨格を有するテストステロンおよびプロゲステロンを選定した。これらの化合物は主にステロイド骨格 17 位の官能基が異なる。すなわち、コルチゾールは β-ヒドロキシケトン基、テストステロンはヒドロキシ基、プロゲステロンはメチルケトン基をそれぞれ有している **(*Figure 4-5*)**。バイアル瓶に MIP (5 mg) を量りとり、62.5, 125, 250, 500 μM に調製したテストステロンまたはプロゲステロン溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) (1 mL) を加え、サーモミキサー (Eppendorf AG., Germany) (25 °C, 800 rpm) にて 48 h インキュベートした。上述した実験操作により MIP に対する各検体 (テストステロン、プロゲステロン) の結合量を求めた。

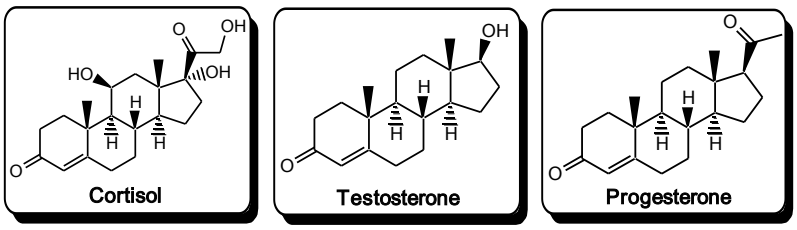


Figure 4-5. Structural formula of various steroid hormones (cortisol, testosterone, and progesterone).

4-2-6. 標的分子の蛍光ラベル化

◇ 4-(2′-(Boc-アミノ)エチルチオ)-11β,17α,21-トリヒドロキシプレグン-4-エン-3,20-ジオン **(2)** の合成

窒素置換雰囲気下、二口フラスコにコルチゾール **(1)** (1.82 g, 5 mmol) を量りとり、dry メタノール (65 mL)、dry エタノール (25 mL) に部分溶解した。氷浴にて 0 °C にした後、10% NaOH 水溶液 (5 mL) と 30% 過酸化水素水 (5 mL) をシリンジで加え、0 °C にて 2 h、さらに室温にて一晩撹拌した。その後、2-(Boc-アミノ)エタンチオール (1 mL) を加えて 6 h 室温で撹拌した後、溶媒をロータリーエバポレーターで留去し、飽和食塩水 (30 mL) を加え、希塩酸で中和した[44]。その後、酢酸エチルで 3 回抽出し、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた後、濾過により固形分を除去し、溶媒を留去した。粗生成物はカラムクロマトグラフィー (展開層: シリカゲル (C-200), 展開溶媒: クロロホルム/メタノール/Et_3N=20:1:0.2, v/v/v) で分離·精製し、真空乾燥を行うことで黄白色の固体として 4-(2′-(Boc-アミノ)エチルチオ)-11β,17α,21-トリヒドロキシプレグン-4-エン-3,20-ジオン **(2)** を得た。(収率: ca. 20%)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.95 (3H, s, 18-CH_3), 1.24 (9H, s, t-Boc-CH_3), 1.47 (3H, s, 19-CH_3), 3.15 (1H, s, 21-OH), 3.69 (2H, t, S-CH_2), 4.29 and 4.66 (1H, each, d, *J*=18Hz, 21-CH_3), 4.46 (1H, s, 11-OH), 5.15 (1H, broad, NH), MALDI-TOF-MS (DHB): *m/z* (positive) Calcd. for $C_{28}H_{43}NO_7S$: 560.7 $[M+Na]^+$, Found: 560.4

◇ 4-(2′-アミノエチルチオ)-11β,17α,21-トリヒドロキシプレグン-4-エン-3,20-ジオン **(3)** の合成

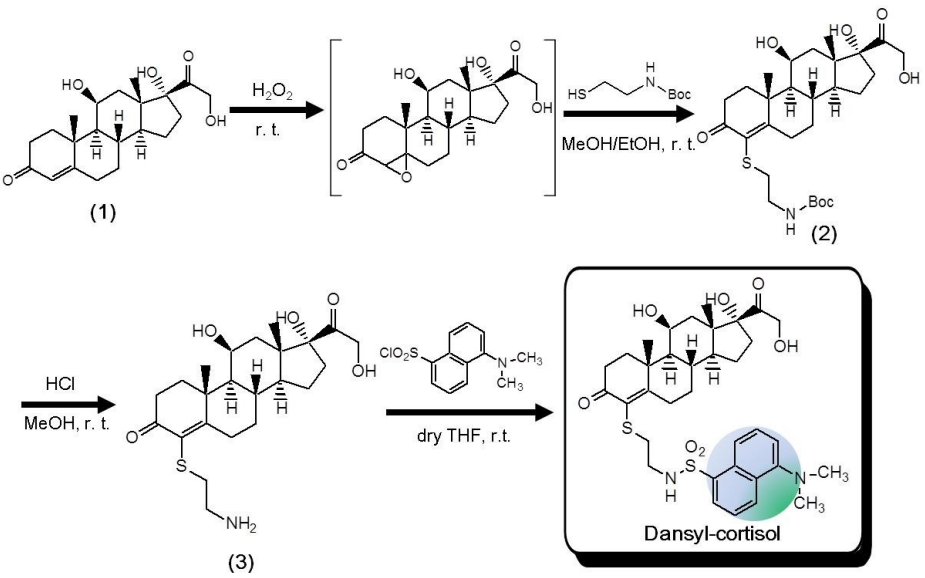
4-(2′-(Boc-アミノ)エチルチオ)-11β,17α,21-トリヒドロキシプレグン-4-エン-3,20-ジオン**(2)** (54 mg, 0.1 mmol) に 0.5 M HCl メタノール溶液 (1 mL) を加えた。遮光しながら、室温で 4 h 撹拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和した。その後、飽和食塩水を加え、酢酸エチルで 3 回抽出し、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた後、濾過により固形分を除去し、溶媒を留去した。その後、真空乾燥を行うことで黄褐色の固体として 4-(2′-アミノエチルチオ)-11β,17α,21-トリヒドロキシプレグン-4-エン-3,20-ジオン **(3)** を得た。当該化合物は精製することなく次の反応に使用した。(収率: 91%)

◇ 4-(2′-ダンシルエチルチオ)-11β,17α,21-トリヒドロキシプレグン-4-エン-3,20-ジオン **(4)** の合成

窒素置換雰囲気下、4-(2′-アミノエチルチオ)-11β,17α,21-トリヒドロキシプレグン-4-

エン-3,20-ジオン **(3)** (30 mg, 0.069 mmol) に DMAP (10 mg, ca. 1.2 eq) を加え、dry THF (3 mL) に溶解した。その後、dry THF (2 mL) に溶解したダンシルクロリド (20 mg, ca. 1.1 eq) と Et_3N (0.1 mL) を加え、一晩室温で撹拌した。反応終了後、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去し、飽和食塩水を加えた後、ジクロロメタンで 3 回抽出した。その後、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過により固形分を除去した後、溶媒を留去した。粗生成物は分取 TLC (展開層: シリカゲル (60 F254), 展開溶媒: クロロホルム/メタノール/Et_3N=20:1:0.2, v/v/v) にて分離·精製し、真空乾燥を行うことで黄色の粘稠固体として 4-(2′-ダンシルエチルチオ)-11β,17α,21-トリヒドロキシプレグン-4-エン-3,20-ジオン **(4)** を得た。(収率: 63%)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.94 (3H, s, 18-CH_3), 1.36 (6H, s, N-$(CH_3)_2$), 1.46 (3H, s, 19-CH_3), 3.64 (2H, t, S-CH_2), 4.29 and 4.66 (1H, each, d, *J*=18Hz, 21-CH_2), 4.45 (1H, s, 11-OH), 5.13 (1H, broad, NH), 7.12–8.66 (6H, m, dansyl aromatic protons)



Scheme 4-1. Synethesis of dansyl-cortisol using unsaturated bond of 4-position on steroid skeleton.

4-2-7. core-shell 型 MIP-NPs の合成と評価

◇ P(S-DVB) seed 粒子の合成

丸底フラスコに純水 (79.2 g) を量りとり、そこへ、スチレン (7.3 mmol, 760 mg)、DVB (0.31 mmol, 40 mg)、V-50 (41.3 mg, 2 mol% *vs* monomer) を加えた。還流管を取り付け、系内を窒素で置換した後、80 °C、800 rpm で 24 h 重合した[45]。その後、反応

液を氷浴にて急冷することで白色の懸濁溶液として Seed1 を得た。Seed2–6 は ***Table 4-3*** に従って同様の条件にて重合した。得られたポリマー微粒子は DLS (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) および SEM (VE-9800, Keyence Corp., Japan) により粒径および粒子形状を評価した。

Table 4-3. Emulsifier-free emulsion polymerization for P(S-DVB) seed particles synthesis.

	Seed1	Seed2	Seed3	Seed4	Seed5	Seed6
Styrene	760 mg (7.3 mmol)					
DVB	40 mg (0.31 mmol)					
Water/acetone=100:0	79.2 g	—	—	79.2 g	—	—
Water/acetone=80:20	—	79.2 g	—	—	79.2 g	—
Water/acetone=60:40	—	—	79.2 g	—	—	79.2 g
V-50	41.3 mg (0.15 mmol)					
Temperature	80 °C	80 °C	80 °C	60 °C	60 °C	60 °C
Stirring rate	800 rpm	800 rpm	800 rpm	1000 rpm	1000 rpm	1000 rpm

◇ コルチゾールを認識する core-shell 型 MIP-NPs の合成

丸型フラスコに Seed1 emulsion (20 g) を量りとり、そこへ、コルチゾール-21-モノメタクリレート (3.9 mg, 9 μmol)、イタコン酸 (4.7 mg, 36 μmol)、DVB (59.5 mg, 467 μmol)、スチレン (9.5 mg, 91.2 μmol)、V-50 (2.7 mg, 2 mol% *vs* monomer) を加えた **(*Table 4-4*)**。還流管を取り付け、系内を窒素で置換した後、80 °C、800 rpm で 24 h 重合した[45]。重合液を回収し、20 min 遠心分離 (18 900 rpm) を行い、上澄み溶液を除去した後、2 M NaOH 水溶液/メタノール (1:1, v/v) (50 mL) で 24 h 加水分解した。その後、1 M HCl 水溶液/メタノール (1:1, v/v) (50 mL) で数時間撹拌し、純水/メタノール (1:1, v/v) (50 mL) で数時間 (2 回) 撹拌した後、純水にて置換することで分析用検体とした。MIP-NPs2–4、R-MIP-NPs、NIP-NPs は ***Table 4-4*** に従って同様の条件にて合成した。得られたポリマー微粒子は SEM (VE-9800, Keyence Corp., Japan) により粒径と粒子形状を評価した。

Table 4-4. Emulsifier-free seeded emulsion polymerization for MIP-NPs synthesis.

	MIP-NPs1	MIP-NPs2	MIP-NPs3	MIP-NPs4	R-MIP-NPs	NIP-NPs
Seed1 emulsion	20 g	20 g	—	—	20 g	20 g
Seed2 emulsion	—	—	20 g	20 g	—	—
Cortisol-21-mono-methacrylate	3.9 mg (9 μmol)	3.9 mg (9 μmol)	3.9 mg (9 μmol)	3.9 mg (9 μmol)	3.9 mg (9 μmol)	—
Methyl methacrylate	—	—	—	—	—	0.90 mg (9 μmol)
Itaconic acid	4.7 mg (36 μmol)	4.7 mg (36 μmol)	4.7 mg (36 μmol)	4.7 mg (36 μmol)	—	4.7 mg (36 μmol)
DVB	59.5 mg (457 μmol)	—	59.5 mg (457 μmol)	—	59.5 mg (457 μmol)	59.5 mg (457 μmol)
Styrene	9.5 mg (91.2 μmol)	—	9.5 mg (91.2 μmol)	—	9.5 mg (91.2 μmol)	9.5 mg (91.2 μmol)
MBAA	—	69 mg (448 μmol)	—	69 mg (448 μmol)	—	—
V-50	3.2 mg (11.8 μmol)	2.7 mg (9.9 μmol)	3.2 mg (11.8 μmol)	2.7 mg (9.9 μmol)	3.2 mg (11.8 μmol)	3.2 mg (11.8 μmol)

4-2-8. MIP-NPs に対する蛍光性標的分子の結合能評価

蛍光分析の測定条件は励起波長 365 nm とし、励起側スリット幅を 10 nm に、蛍光側スリット幅を 10 nm にホトマル電圧を 400 V に設定した。蛍光セルは 10×10×40 mm の石英セルを使用し、測定温度は 25 °C にて温度コントロールした。なお、滴定に使用した MIP-NPs1 はインキュベーション溶媒 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) で置換し、固形分濃度が 1 mg/mL となるように調整したものを使用した。

◇ 蛍光分析による分子間相互作用の経時変化

100 μM に調整したダンシルラベル化コルチゾール溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) (3 mL) を蛍光セルに量りとり、撹拌しながら 500 μL の MIP-NPs1 を滴下した後 (最終ポリマー濃度: 143 μg/mL)、所定の時間 (0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30, 60 min) ごとに蛍光分光光度計により蛍光測定を実施した。

◇ MIP-NPs に対するダンシルラベル化コルチゾールの吸着等温線

100 μM に調整したダンシルラベル化コルチゾール溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) (3 mL) を蛍光セルに量りとり、撹拌しながら 10 min ごとに MIP-NPs1 (100 μL) を滴下した後 (最終ポリマー濃度: 143 μg/mL)、蛍光分光光度計により蛍光測定を実施することで吸着等温泉を作成した。ここで、ポリマー内の結合サイト量を重合時に添加したメタクリロイル化コルチゾール量であるとし、MIP-NPs1 の結合サイトとダンシルラベル化コルチゾールが 1:1 錯体を形成すると仮定すると、結合定数 (K_a) は一般に下記のモデル式で近似できる[43]。

$$\Delta\lambda m = \frac{((1+K_aG+K_aH)-((1+K_aG+K_aH)^2-4K_a{}^2GH)^{\frac{1}{2}})(\lambda m_\infty - \lambda m_0)}{2K_aG} \qquad \textbf{(4-3)}$$

ここで $\Delta\lambda m$ は蛍光極大波長 (λm) の変化量であり、λm_∞ は反応終結時の λm (漸近値)、λm_0 は初期の λm を表す。また、H は MIP-NPs を滴下した際の結合サイトの濃度であり、G はフィッティングパラメータである。式 **(4-3)** を用いてカーブフィッティングソフトウェア (Origin Pro 7.5J) により結合定数 (K_a) を算出した。

4-2-9. 蛍光偏光法を用いた蛍光性標的分子の結合能評価

蛍光分析における測定条件は励起波長 365 nm、励起のスリット幅 10 nm に、蛍光のスリット幅 10 nm、ホトマル電圧を 400 V に設定した。蛍光セルは 10×10×40 mm の石英セルを使用し、測定温度は 25 °C にて温度コントロールした。なお、蛍光偏光測定には付属の偏光付属板を取り付け 1) 励起側偏光板=0°, 蛍光側偏光板=0°、2) 励起側偏光板=0°, 蛍光側偏光板=90°、3) 励起側偏光板=90°, 蛍光側偏光板=90°、4) 励起側偏光板=90°, 蛍光側偏光板=0° の 4 条件にて測定を実施した。また、滴定に使用した MIP-NPs1 はインキュベーション溶媒 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) で置換し、固形分濃度が 1 mg/mL となるように調整したものを使用した。

10 μM に調整したダンシルラベル化コルチゾール溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) (3 mL) を蛍光セルに量りとり、撹拌しながら 20 min ごとに MIP-NPs1 (100 μL) を滴下した後、蛍光分光光度計により蛍光測定を実施した。得られた結果から、式 **(4-4)** により、蛍光偏光度の波長依存性 ($P(\lambda)$) を評価した。また、式 **(4-6)** によりアニソトロピー (r) を求め、蛍光セル中のポリマー濃度ごとにプロットした。また、

同様の条件にて MIP-NPs1 の代わりに R-MIP-NPs を使用して対照実験を実施した。

ここで、蛍光偏光法における蛍光偏光度の波長依存性 $P(\lambda)$ は式 **(4-4)** で定義される[23–26]。

$$P(\lambda)=\frac{\left(I_{\mathrm{vv}}(\lambda)-GI_{\mathrm{vh}}(\lambda)\right)}{\left(I_{\mathrm{vv}}(\lambda)+GI_{\mathrm{vh}}(\lambda)\right)}\quad\left(G=\frac{I_{\mathrm{hv}}}{I_{\mathrm{hh}}}\right) \tag{4-4}$$

添え字の v (vertical), h (horizontal) は各偏光板の向きを示している。すなわち、I_{vv} とは励起側偏光板が垂直方向、蛍光側偏光板が垂直方向の状態における蛍光強度を示している。G は蛍光分光光度計および偏光板に由来する補正値である。一方で、蛍光偏光度 (P) は一般に下記の *Perrin-Weber* の式を満たすことが知られている[46,47]。

$$\frac{1}{P}-\frac{1}{3}=\left(\frac{1}{P_0}-\frac{1}{3}\right)\left(1+\frac{RT}{\eta V}\tau\right) \tag{4-5}$$

ここで V は蛍光物質の実効体積 (=比体積 (比容) × 分子量)、η は溶媒の粘度、T は絶対温度、τ は蛍光寿命を示す。R は気体定数であり、P_0 は 0 K における P の値である。

式 **(4-5)** において測定条件が一定のもとでは蛍光偏光度 (P) は蛍光分子の実効体積 (V) にのみ依存する。すなわち、分子間相互作用により、蛍光分子が複合体を形成し、蛍光分子の実効体積が増加するとそれに対応して蛍光偏光度 (P) が増加することになる。ここで、蛍光分子が遷移双極子モーメントと同方向の偏光面を有する励起光を受けた後、蛍光を発するまでの時間 (蛍光緩和時間) に蛍光分子はブラウン運動により回転する。この回転速度は分子の実効体積に依存するため、分子間相互作用により蛍光分子が複合体を形成することで分子の回転運動が束縛され、結果として蛍光偏光度 (P) が増大することになる。また、蛍光偏光法におけるアニソトロピー (r) は式 **(4-6)** で定義される。

$$r=\frac{\left(I_{\mathrm{vv}}-GI_{\mathrm{vh}}\right)}{\left(I_{\mathrm{vv}}+2GI_{\mathrm{vh}}\right)}\quad\left(G=\frac{I_{\mathrm{hv}}}{I_{\mathrm{hh}}}\right) \tag{4-6}$$

アニソトロピー (r) は無次元数であり、理論上 -0.5 から 1 の値をとり、蛍光分子が複合体を形成することで蛍光分子の実効体積が増加すると遷移双極子モーメント

の回転が阻害され、式 **(*4-6*)** の I_{vh} の項が減少する。結果としてアニソトロピー (r) が 1 に近づくことを示している。さらに、アニソトロピー (r) と蛍光偏光度 (P) との間には式 **(*4-7*)** の関係が成立することが知られている。

$$r = \frac{2P}{(3-P)} \qquad \textbf{(4-7)}$$

ポリマー内の結合サイト量を重合時に添加したメタクリロイル化コルチゾール量であるとし、MIP-NPs1 の結合サイトと蛍光ラベル化コルチゾールが 1:1 錯体を形成すると仮定すると、一般に結合定数 (K_a) は下記モデル式で近似できる[43]。

$$\Delta r = \frac{((1+K_aG+K_aH)-((1+K_aG+K_aH)^2-4K_a{}^2GH)^{\frac{1}{2}})(r_\infty - r_0)}{2K_aG} \qquad \textbf{(4-8)}$$

ここで Δr はアニソトロピー (r) の変化量、r_∞ は反応終結時の r (漸近値)、r_0 は初期の r を表す。H は MIP-NPs1 滴定時における結合サイトの濃度であり、G はフィッティングパラメータである。上記モデル式にカーブフィッティングを行うことで結合定数 (K_a) を算出した。

4-2-10. 競合法を用いた標的分子の結合能評価

本セクションにおける蛍光偏光法の測定は ***4-2-9.*** と同様の条件にて実施した。

◇ ダンシルラベル化コルチゾールの最適濃度の検討

各濃度 (2, 5, 10 μM) に調製したダンシルラベル化コルチゾール溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) (3 mL) を蛍光セルに量りとり、撹拌しながら MIP-NPs1 (500 μL) を滴下した後 (最終ポリマー濃度: 143 μg/mL)、20 min 撹拌することでダンシルラベル化コルチゾールと MIP-NPs1 の複合体を形成させた。その後、20 min ごとに (0.1, 1, 10, 100, 1000 μM) に調整したコルチゾール溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) (100 μL) を順次滴下し、蛍光分光光度計により蛍光測定を実施した。得られた結果から式 **(*4-6*)** により、アニソトロピー (r) を求め、蛍光セル中のポリマー濃度ごとにプロットした。

◇ MIP-NPs および NIP-NPs に対する標的分子の結合能評価

2 μM に調製したダンシルラベル化コルチゾール溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) (3 mL) を蛍光セルに量りとった。その後、撹拌しながら MIP-NPs1 (500 μL) を滴下し (最終ポリマー濃度: 143 μg/mL)、20 min 撹拌することでダンシルラベル化コルチゾールと MIP-NPs1 の複合体を形成させた。その後、20 min ごとに (0.1, 1, 10, 100, 1000 μM) に調整したコルチゾール溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) (100 μL) を順次滴下し、蛍光分光光度計により蛍光測定を実施した。測定は 3 回実施し、得られた結果から式 ***(4-6)*** により、アニソトロピー (*r*) を求め、蛍光セル中のポリマー濃度ごとにプロットした。また、同様の実験操作にて MIP-NPs1 の代わりに NIP-NPs を滴下することで対照実験を実施した。

◇ MIP-NPs に対する選択性の評価

2 μM に調整したダンシルラベル化コルチゾール溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) (3 mL) を蛍光セルに量りとり、撹拌しながら MIP-NPs1 (500 μL) を滴下した後 (最終ポリマー濃度: 143 μg/mL)、20 min 撹拌することでダンシルラベル化コルチゾールと MIP-NPs1 の複合体を形成させた。その後、20 min ごとに (0.1, 1, 10, 100, 1000 μM) に調整した各検体 (コルチゾール、プロゲステロン) 溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) (100 μL) を順次滴下し、蛍光分光光度計により蛍光測定を実施した。測定は 3 回実施し、得られた結果から式 ***(4-6)*** により、アニソトロピー (*r*) を求め、蛍光セル中のポリマー濃度ごとにプロットした。

4-3. 結果と考察

4-3-1. 鋳型分子と MIP の合成

鋳型分子となるコルチゾール-21-モノメタクリレートは dry THF 中で有機塩基を用いてコルチゾールに塩化メタクリロイルまたは無水メタクリル酸を反応させることにより合成した。^{1}H NMR、MALDI-TOF-MS にて同定した結果、主にコルチゾールの 21 位の 1 級水酸基がメタクリロイル化された化合物が得られたことが判明した。コルチゾールのステロイド骨格は 11 位と 17 位においても水酸基を有するが、11 位に存在する 2 級水酸基は一般に β 型のみ反応活性を有することが知られており、17 位に存在する 3 級水酸基は立体障害のために反応性が著しく低いものである。そのため、主生成物として 21 位の 1 級水酸基のみがメタクリロイル化されたコルチゾール-21-モノメタクリレートが合成されたものと考えられる。

さらに、得られたコルチゾール-21-モノメタクリレートを使用し、機能性モノマー、架橋剤とともに共重合することでコルチゾールを認識するための MIP を合成した。得られたポリマーは粒径が数 μm 程度となるように物理的に粉砕した後、鋳型分子を除去するためにアルカリ加水分解を行い、SEM にて粒子の形状を評価した。その結果、ポリマー粒子は不規則な形状でその粒径は 1–10 μm であることが判明した **(*Figure 4-6*)**。

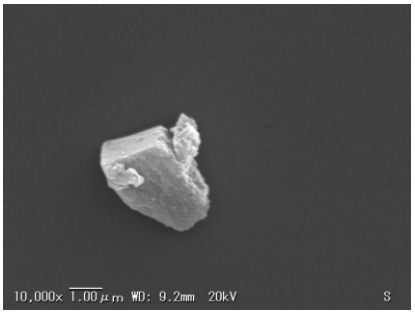


Figure 4-6. SEM image of MIP prepared by bulk polymerization (×10 000).

4-3-2. MIP に対する標的分子の結合能評価

一般的に水素結合や静電的相互作用などの分子間相互作用を検出するためには無極性の溶媒が適当とされる。そこで、本実験においては標的分子となるコルチゾールの溶解性と MIP の分散安定性を考慮し、インキュベーション溶媒を混合溶媒 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) とすることにした。

62.5, 125, 250, 500, 1000 μM のコルチゾール、プロゲステロン、テストステロン各溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) を用いて結合実験を実施した結果、いずれの濃度においても MIP は NIP と同等以上の結合能を示した (***Figure 4-7***)。カーブフィッティングソフトウェア (Origin Pro 7.5J) を使用し、上記モデル式 **(*4-2*)** にカーブフィッティングを行った結果、コルチゾールの結合定数 (K_a) はそれぞれ MIP (1.3×10^4 M^{-1})、NIP (7.8×10^3 M^{-1}) であり、MIP に対する結合定数 (K_a) は NIP に対する結合定数 (K_a) の 1.7 倍であることが判明した。加えて、MIP に対するコルチゾールの最大結合量 (B_{max}) は 36.1 μmol/g であり、この値は重合時に添加した鋳型分子量から推算した結合量の ca. 13% に相当することが判明した。また、当該フィッティングにおける R^2 の値は 0.97 と上記モデル式によくフィットした。これらの結果から、重合時に鋳型分子となるコルチゾール-21-モノメタクリレートを添加したことにより、NIP に比して MIP はコルチゾールに対する有効な分子認識空間が多く存在している可能性が示唆された。この結果は、重合時にコルチゾール-21-モノメタクリレートを添加したことで鋳型分子近傍の架橋点間距離が局所的に増大し、分子認識空間内への標的分子のアクセシビリティが向上したことに起因するものと考えている。

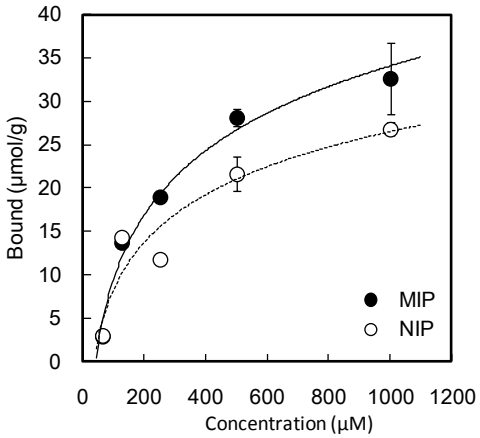


Figure 4-7. Binding isotherms of cortisol (concentrations: 62.5, 125, 250, 500, and 1000 μM) for MIP and NIP in chloroform/hexane (4:1, v/v).

さらに類似のステロイド骨格を有する化合物を用いて MIP に対する選択性を評価した結果、MIP に対するプロゲステロンの結合はごくわずかしか確認されず、非特異的吸着による影響は少ないものと考えられる。テストステロンは 5 員環に直結する 2 級水酸基の影響により MIP への結合が確認されているが、コルチゾールの結合量

に比して低いものであった (***Figure 4-8***)。これらの結果は MIP が標的分子を認識する際においてステロイド骨格 17 位にヒドロキシ基を有するテストステロンやメチルケトン基を有するプロゲステロンに比して β-ヒドロキシケトン基を有するコルチゾールを選択的に認識できることを示唆している。

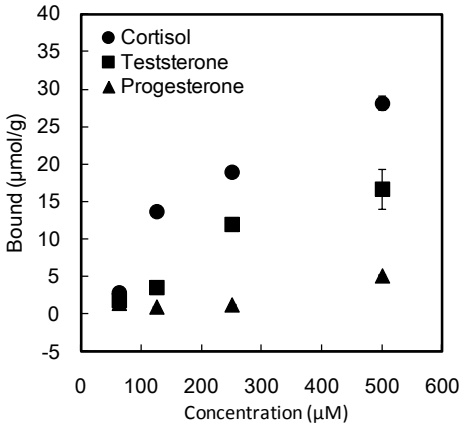


Figure 4-8. Selectivity test for MIP using cortisol, testosterone, and progesterone (concentrations: 62.5, 125, 250, and 500 μM) in chloroform/hexane (4:1, v/v).

4-3-3. 標的分子の蛍光ラベル化

コルチゾールの蛍光ラベル化を実施するにあたり、ステロイド骨格 21 位の 1 級水酸基が最も反応活性が高いと考えられるが、分子認識材料に対する分子間相互作用が可能な官能基として保持するために、ステロイド骨格 4 位の不飽和結合を介してダンシル系蛍光色素を使用することで蛍光ラベル化したコルチゾールを合成することにした。合成したダンシルラベル化コルチゾールは ^{1}H NMR、MALDI-TOF-MS、FT-IR にて同定した (***Figure 4-9***)。

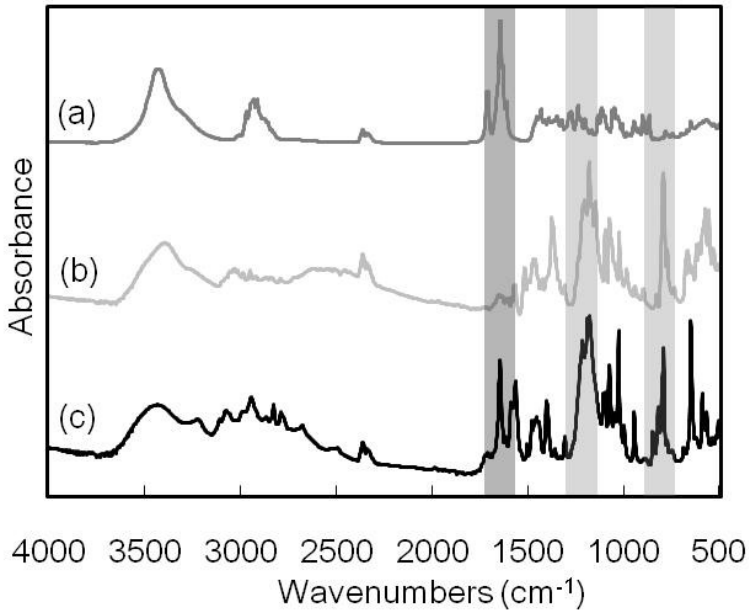


Figure 4-9. FT-IR spectra of (a) cortisol, (b) dansyl chloride, and (c) dansyl-cortisol.

4-3-4. core-shell 型 MIP-NPs の合成と評価

◇ seed 粒子の評価

得られた seed 粒子の DLS 測定結果を ***Table 4-5***、***Figure 4-10*** に、SEM 画像を ***Figure 4-11*** に示した。ここで ***Table 4-5*** における多分散性指数 (PDI) とは粒径分布を表わす無次元数であり、0 から 1 の値で表記される。一般に PDI が 0 とは粒径の分布がない理想的な懸濁液を表し、0.1 以下の PDI を有する懸濁液は単分散と呼ばれ、0.5 以上の PDI を有する懸濁液は多分散と呼ばれる。本実験系においては微粒子化するほど PDI が増大する傾向にあるが、いずれの seed 粒子においても PDI < 0.1 であり、単分散で球形の粒子が合成されたことが判明した。また、純水/アセトン比の異なる分散溶媒 (純水/アセトン=100:0, 80:20, 60:40, v/v) を使用して 80 °C にて重合することにより、33–148 nm の粒径を有する粒子を合成できることが判明した。これは、分散溶媒となる純水にアセトンを添加することで、重合モノマーが微分散したためであると考えられる。一方で、同条件の純水/アセトン比の分散溶媒を使用して 60 °C にて重合することにより、95–248 nm の粒径を有する粒子を合成できることが判明した。これは重合温度の上昇にともなって短時間にラジカルが発生し、核生成速度が増加したためであると考えられる。分子認識能の高感度化という点に鑑みれば、小粒径の粒子が適切であると考えられるが、100 nm 以下の粒子は遠心分離による溶

媒置換が難しく、また、SEM による粒子形状が判断し難いものであったため、粒子の取り扱いやすさを考慮して、その後の実験においては 100–200 nm 程度の粒径を有する粒子を使用することにした。

Table 4-5. Number-average sizes and polydispersity indexes (PDI) of prepared seed particles.

	Seed1	Seed2	Seed3	Seed4	Seed5	Seed6
Number-average (nm)	148	90	33	248	177	95
PDI	0.025	0.057	0.085	0.012	0.029	0.036

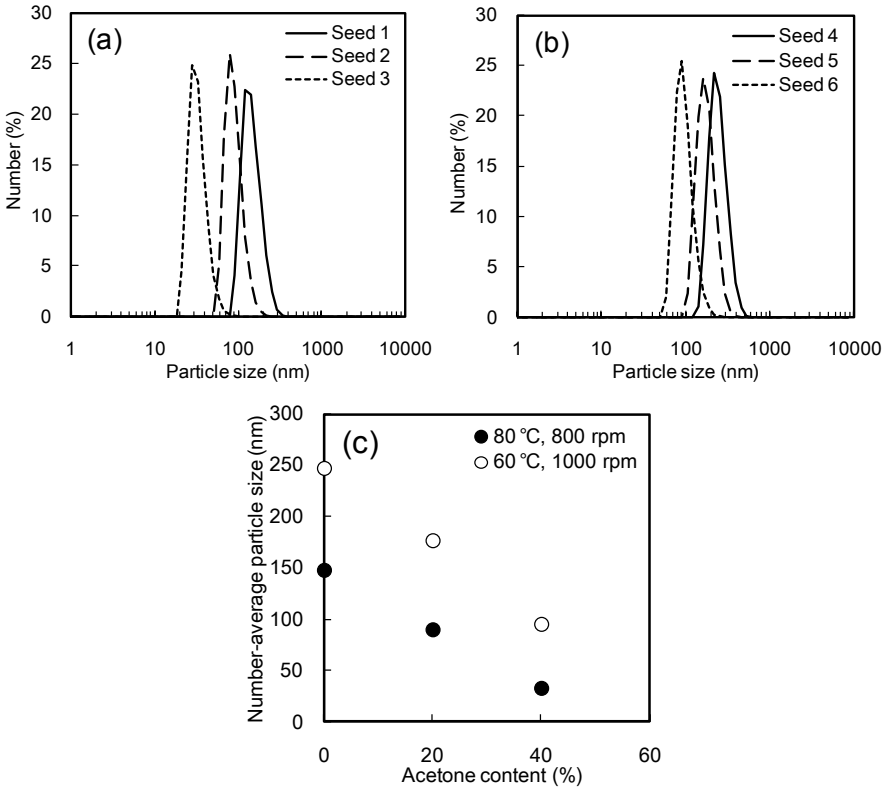


Figure 4-10. Particle size distributions (number distributions) of P(S-DVB) (a) seed particles1–3 (80 °C, 800 rpm), (b) seed particles4–6 (60 °C, 1000 rpm), and (c) number-average sizes of P(S-DVB) seed particles prepared by emulsifier-free emulsion polymerization under various polymerization conditions.

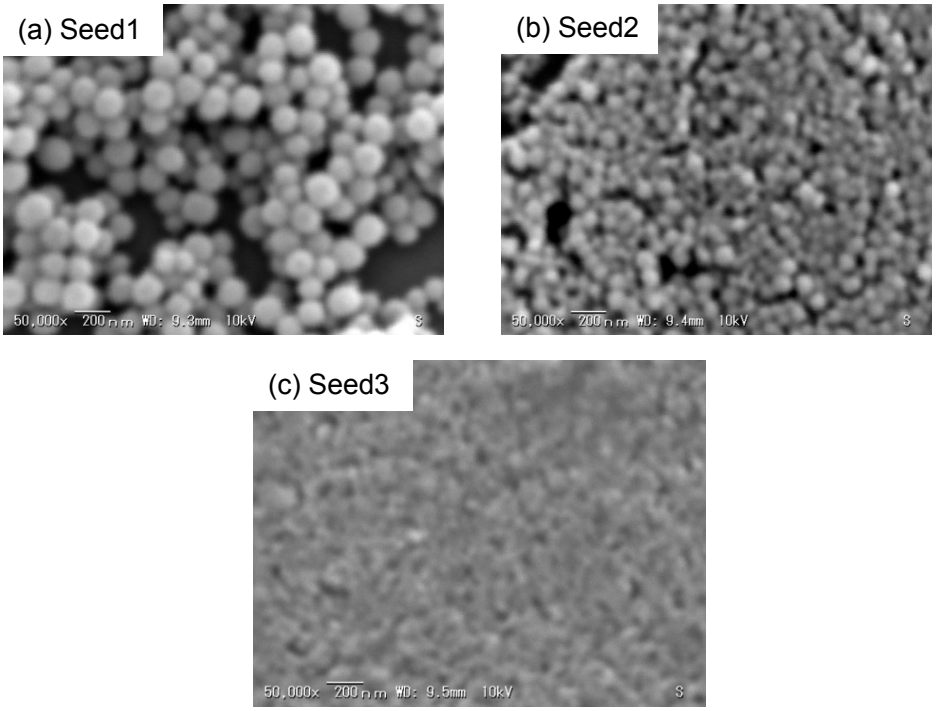


Figure 4-11. SEM images of P(S-DVB) seed particles (a) Seed1, (b) Seed2, and (c) Seed3 prepared by emulsifier-free emulsion polymerization (×50 000).

◇ core-shell 型 MIP-NPs の合成と評価

また、Seed1 を core として使用して shell 層に分子認識能を付与した MIP-NPs1 および MIP-NPs2 の SEM 画像においては、いずれも球形かつ比較的単分散なポリマー微粒子が観察された (***Figure 4-12***)。画像解析の結果、MIP-NPs1 の粒径は ca. 199 nm であり、MIP-NPs2 の粒径は ca. 175 nm であることが判明した。いずれも、core として使用した Seed1 の粒径 (ca. 155 nm) よりも大きく、core-shell 型 MIP-NPs1 の shell 層の厚みは ca. 20 nm と推定した。また、core となる Seed1 と MIP-NPs1 の FT-IR (KBr) を測定した結果、MIP-NPs1 においてのみ 1720 cm^{-1} 近傍に C=O 伸縮振動由来のピークが確認された (***Figure 4-13***)。このため、shell 層にカルボキシ基の存在が確認されており、shell 層に分子認識能を付与した core-shell 構造を有する MIP-NPs が合成されたものと考えられる。一方で、Seed2 を core として使用して shell 層に分子認識能を付与した MIP-NPs3 および MIP-NPs4 はいずれも加水分解後に凝集しやすく、SEM 画像においても粒子形状が判断し難いものであったため、ダンシルラベル化コルチゾールを使用した分子間相互作用の検討には Seed1 を core として合成した MIP-NPs1 を使用した。

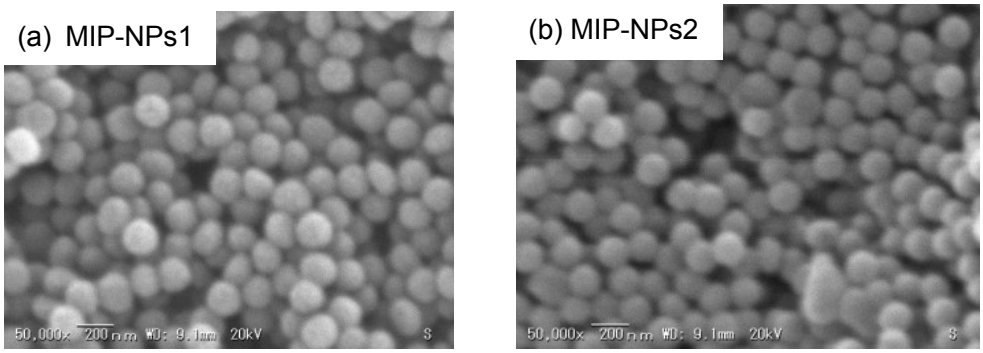


Figure 4-12. SEM images of core-shell-type (a) MIP-NPs1 and (b) MIP-NPs2 prepared by emulsifier-free seeded emulsion polymerization (×50 000).

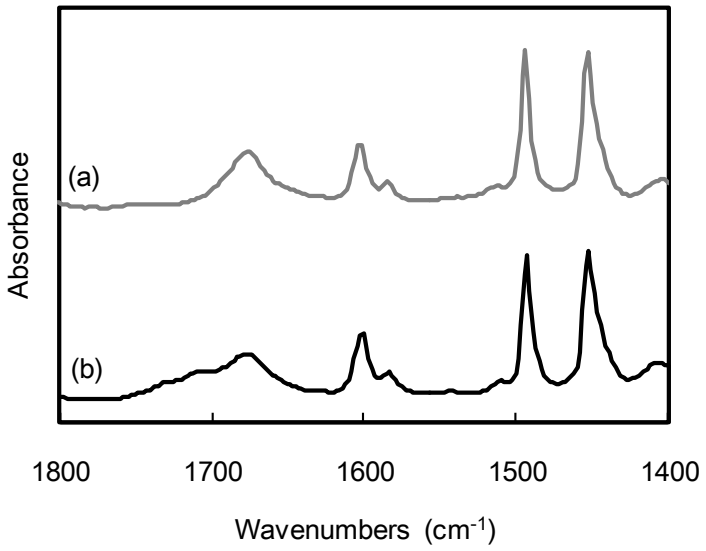


Figure 4-13. FT-IR spectra of (a) P(S-DVB) seed particles and (b) MIP-NPs.

4-3-5. MIP-NPs に対する蛍光性標的分子の結合能評価

MIP-NPs1 および R-MIP-NPs に対するダンシルラベル化コルチゾールの相互作用を検討した結果、いずれのポリマーにおいても 20 min 程度で蛍光極大波長の変化量 ($\Delta\lambda m$) が飽和する様子が確認された。これは MIP-NPs1 滴下後、ca. 20 min で特異的吸着にともなう蛍光極大波長の変化 ($\Delta\lambda m$) が終結していることを示唆している (***Figure 4-14***)。一方で、20 min 経過以降も微量ながら蛍光極大波長の変化 ($\Delta\lambda m$) が確認されているが、これは重合時にコルチゾールと相互作用していないフリーのイタコン酸が架橋剤とともに共重合されたことにより MIP-NPs1 に対するダンシルラベル化コルチゾールの非特異的吸着が進行しているためであると推定している。また、

MIP-NPs1 では R-MIP-NPs に比して蛍光極大波長の変化量 ($\Delta\lambda m$) が大きく、機能性モノマーとして導入したイタコン酸および鋳型分子由来のカルボキシ基が協同的に機能することでダンシルラベル化コルチゾールと強く相互作用していることを示唆している。

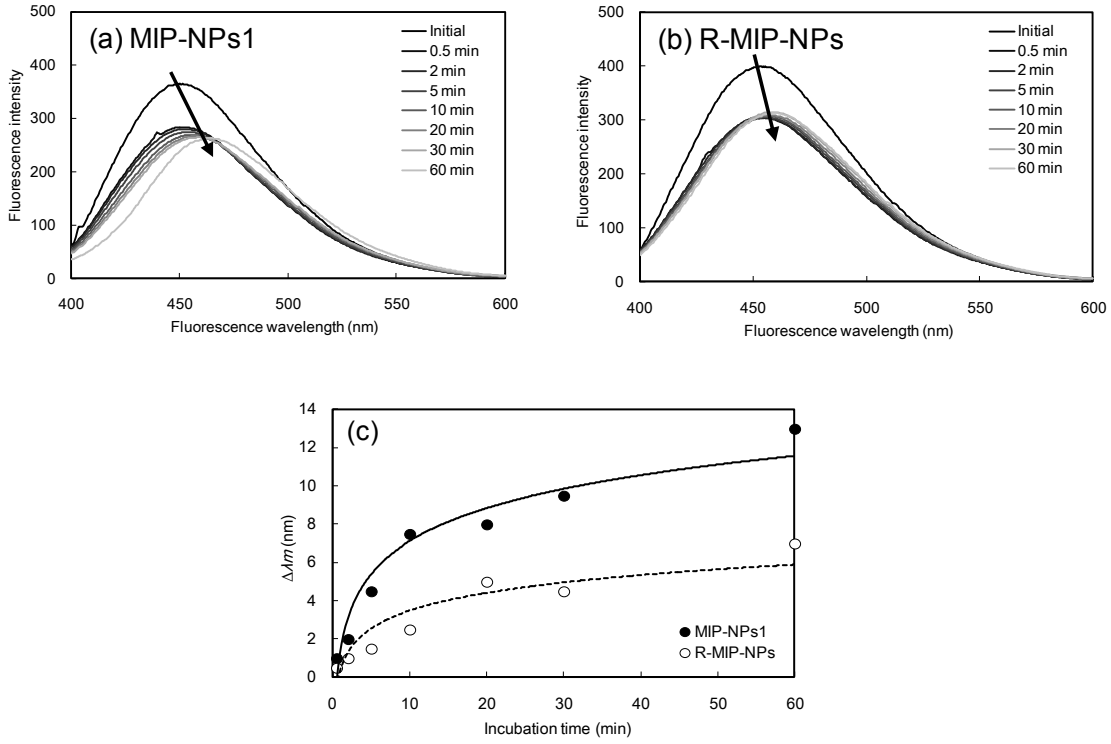


Figure 4-14. Time course (initial, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30, and 60 min) of fluorescence spectra (Ex: 365 nm) at 25 °C for (a) MIP-NPs1, (b) R-MIP-NPs derived from dansyl-cortisol (100 μM) after addition, and (c) fluorescence maximum wavelength change ($\Delta\lambda m$).

ここで、MIP-NPs1 とダンシルラベル化コルチゾールの複合体形成における経時変化を二次反応にあてはめ、その近似曲線でカーブフィッティングすることにより複合体形成速度を定量的に求めることにした[48]。

$$A + B \rightarrow AB \qquad \textbf{(4-9)}$$

ホスト分子を A、ゲスト分子を B、ホスト･ゲスト複合体を AB で表記すると二次反応の反応速度 (k_a) は次の式を満たす。

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a[A][B] \qquad \textbf{(4-10)}$$

ここで $[A]$ および $[B]$ は反応要素 A および B の濃度である。$[B]_0 \gg [A]_0$ のとき、上式の解は近似により簡略化され次式で表わされる。

$$[AB] = [A]_0\{1 - \exp(-[B]_0 k_a t)\} \qquad \textbf{(4-11)}$$

ここで $[A]_0$ および $[B]_0$ はそれぞれ A および B の初期濃度であり、t は反応時間である。また、$[A]_0$ は以下の式を満たしている。

$$[A]_0 = [A] + [AB] \qquad \textbf{(4-12)}$$

結合と解離の反応は同時に起こっているが、それらの割合が一定ならば巨視的に二次反応に当てはまると考えられる。本実験では以下のモデル式で近似することで結合速度定数 (k_a) を推算することにした。

$$\Delta\lambda m = (\lambda m_\infty - \lambda m_0)\{1 - \exp(-[B]_0 k_a t\} \qquad \textbf{(4-13)}$$

ここで λm_∞ はダンシルラベル化コルチゾールと MIP-NPs1 の複合体形成が終結する時点の蛍光極大波長 (λm) (漸近値) であり、λm_0 は初期の蛍光極大波長 (λm) である。

本実験では $[B]_0$ をダンシルラベル化コルチゾールの初期濃度とおいて十分に特異的吸着が飽和に達していると考えられる 30 min までのデータを使用し、カーブフィッティングソフトウェア (Origin Pro 7.5J) により、式 **(4-13)** にカーブフィッティングさせた。フィッティング係数から求められた MIP-NPs1 および R-MIP-NPs に対するダンシルラベル化コルチゾールの結合速度定数 (k_a) はそれぞれ 1.4×10^3 $M^{-1}min^{-1}$、7.6×10^2 $M^{-1}min^{-1}$ であり、MIP-NPs1 に対するダンシルコルチゾールの結合速度定数 (k_a) は R-MIP-NPs に対するダンシルコルチゾールの結合速度定数 (k_a) の 1.8 倍であることが判明した。また、当該フィッティングにおける R^2 の値は 0.99 と上記モ

デル式によくフィットした。この結果は重合時に鋳型分子として添加したコルチゾール-21-モノメタクリレートの影響により、鋳型分子近傍の架橋点間距離が増大し、かつ機能性モノマーとして添加したイタコン酸が分子認識空間に対する標的分子のアクセシビリティを向上させたものと考えている。

さらに MIP-NPs1 とダンシルラベル化コルチゾールの結合定数 (K_a) を推定するためにダンシルラベル化コルチゾールの溶液に MIP-NPs1 を一定量ごとに滴下した。その結果、ダンシルラベル化コルチゾールに由来する蛍光強度が低下し、蛍光極大波長がレッドシフトする様子が確認された (***Figure 4-15***)。これはダンシルラベル化コルチゾールの水酸基と MIP-NPs1 の分子認識空間内に存在するカルボキシ基との間で水素結合による相互作用が機能しているものと考えられ、ダンシルラベル化コルチゾールはインキュベーション溶媒に比して極性の高いポリマー中の分子認識空間内に存在している可能性を示唆している。また、蛍光極大波長の変化量 ($\Delta\lambda m$) を ***Figure 4-13*** に示した。カーブフィッティングソフトウェア (Origin Pro 7.5J) を使用し、上記のモデル式 **(*4-3*)** にカーブフィッティングを行った結果、MIP-NPs に対するダンシルラベル化コルチゾールの結合定数 (K_a) は $2.6\times10^6\ M^{-1}$ であることが判明した。また、当該フィッティングにおける R^2 の値は 1.00 と上記モデル式によくフィットした。

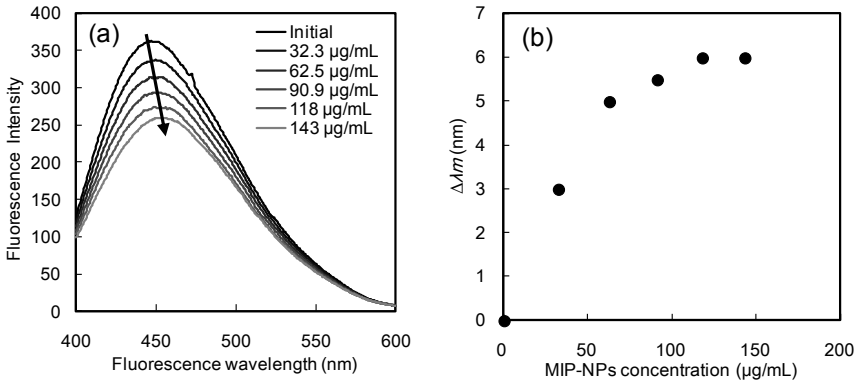


Figure 4-15. (a) Fluorescence spectrum (Ex: 365 nm) at 25 °C derived from dansyl-cortisol (100 μM) with titration (initial, 32.3, 62.5, 90.9, 118, and 143 μg/mL) of MIP-NPs1 and (b) fluorescence maximum wavelength change ($\Delta\lambda m$).

4-3-6. 蛍光偏光法と競合法を用いた標的分子の結合能評価

MIP-NPs1 および R-MIP-NPs (クロロホルム/ヘキサン=4:1, v/v) とダンシルラベル化コルチゾールの相互作用を解析した結果、MIP-NPs1、R-MIP-NPs いずれにおいて

も蛍光偏光度 (*P*) とともにアニソトロピー (*r*) が増大することが判明した (***Figure 4-16***, ***Figure 4-17***)。また、MIP-NPs1 の滴下では R-MIP-NPs の滴下に比してアニソトロピー (*r*) がより増大し、前述したとおり、機能性モノマーであるイタコン酸が分子間相互作用に大きく寄与しているものと考えられる。この結果は蛍光極大波長の変化量 (Δλm) を比較した ***Figure 4-15*** の報告値と一致する。カーブフィッティングソフトウェア (Origin Pro 7.5J) を使用して、式 ***(4-8)*** にカーブフィッティングさせた結果、MIP-NPs1 に対するダンシルラベル化コルチゾールの結合定数 (K_a) は 1.0×10^6 M^{-1} であり、R^2 の値は 0.99 と本実験結果は上記モデル式によくフィットした。この結果は蛍光極大波長の変化量 (Δλm) から推算した結合定数 (K_a) (2.6×10^6 M^{-1}) とおおむね一致する結果となった。したがって、蛍光偏光法を用いた解析法は MIP-NPs1 に対する蛍光ラベル化コルチゾールの分子間相互作用を評価するうえで非常に有効であることが判明した。

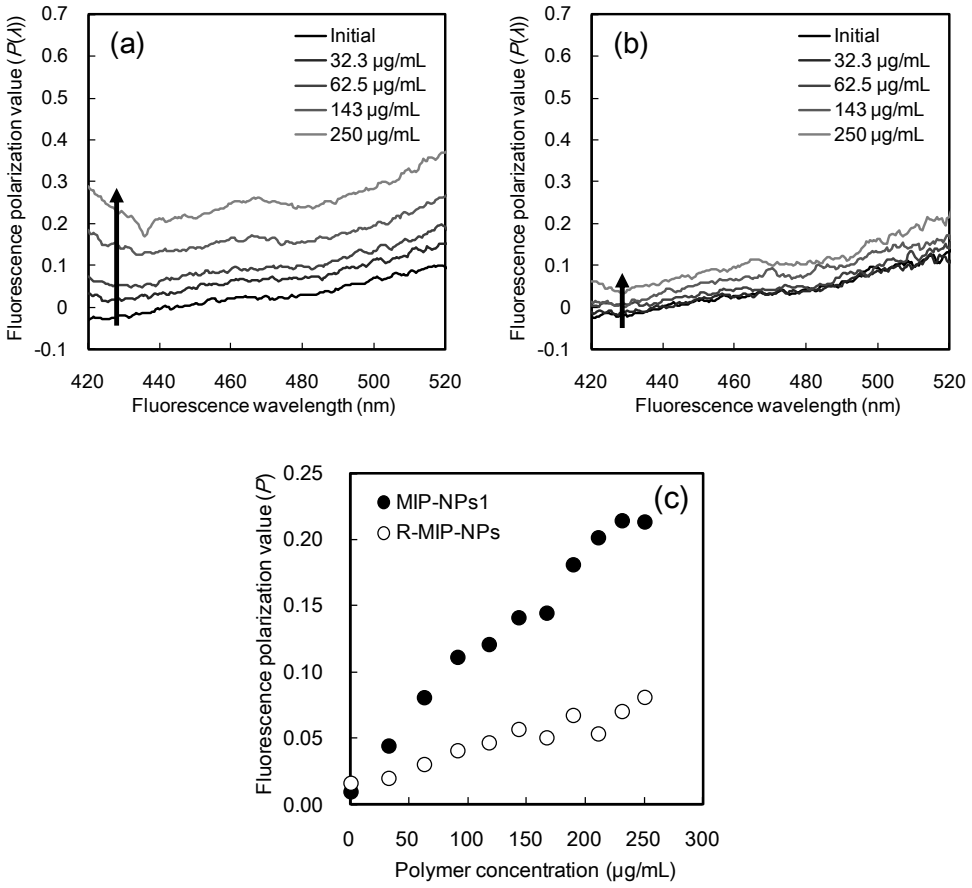


Figure 4-16. Fluorescence polarization value (P (λ)) with titration of (a) MIP-NPs1, (b) R-MIP-NPs, and (c) P at 450 nm.

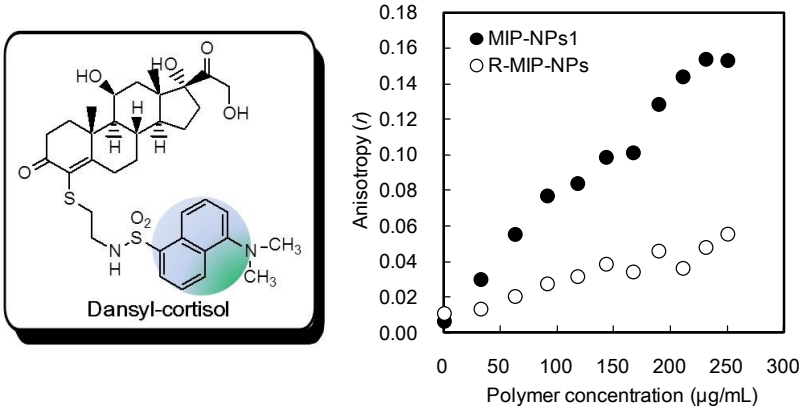


Figure 4-17. Effect of MIP-NPs1 and R-MIP-NPs concentrations on the fluorescence anisotropy (*r*) of dansyl-cortisol (10 μM) in chloroform/hexane (4:1, v/v).

また、ダンシルラベル化コルチゾールの濃度を低下させるにつれて MIP-NPs1 との複合体形成時にアニソトロピー (*r*) が増大していく様子が確認された (***Figure 4-18***)。これはダンシルラベル化コルチゾールの濃度を低下させることでインキュベーション時におけるフリーのダンシルラベル化コルチゾールが減少するため、MIP-NPs1 と複合体を形成している割合が上昇した結果、アニソトロピー (*r*) が上昇したものと考えられる。

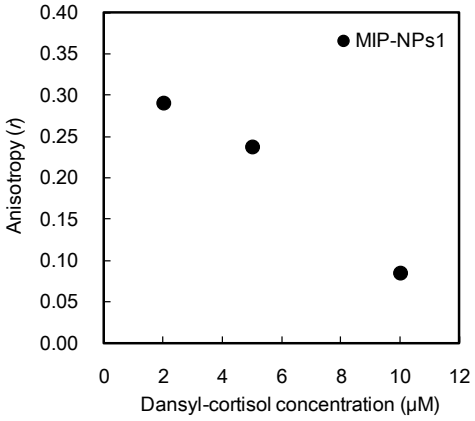


Figure 4-18. Fluorescence anisotropy (*r*) of dansyl-cortisol (2, 5, 10 μM) in the presence of MIP-NPs1 (143 μg/mL) in chloroform/hexane (4:1, v/v).

10 μM および 5 μM のダンシルラベル化コルチゾールを使用して MIP-NPs1 と複合体を形成させた後、ノンラベルコルチゾールによる競合実験を実施した結果、期待していたアニソトロピー (*r*) の変化は確認されなかった。一方で 2 μM のダンシルラ

ベル化コルチゾールと MIP-NPs1 の複合体ではコルチゾールを滴下した際にアニソトロピー (*r*) の低下が顕著に確認された (***Figure 4-19***)。この結果は、ダンシルラベル化コルチゾールの濃度を低下させることで MIP-NPs と複合体を形成していないフリーのダンシルラベル化コルチゾールが減少し、コルチゾールによる競合が速やかに進行したためと考えている。このため、以降の滴定実験においてはダンシルラベル化コルチゾールの濃度は 2 μM に調製することにした。

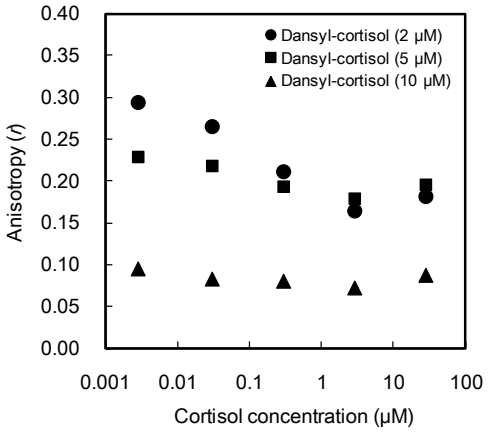


Figure 4-19. Fluorescence anisotropy (*r*) of dansyl-cortisol in the presence of MIP-NPs1 (143 μg/mL) and various concentrations of cortisol in chloroform/hexane (4:1, v/v).

ダンシルラベル化コルチゾールの溶液に MIP-NPs1 または NIP-NPs を滴下した結果、NIP-NPs に比して MIP-NPs1 では 1.3 倍アニソトロピー (*r*) が上昇することが判明した。この結果は重合時に鋳型分子となるコルチゾール-21-モノメタクリレートを添加することで鋳型分子近傍の架橋点間距離が増大し、結果として分子認識空間に対するダンシルラベル化コルチゾールのアクセシビリティが向上したものと考えている。また、MIP-NPs1 と NIP-NPs のいずれのポリマーにおいてもコルチゾールを滴下した際にアニソトロピー (*r*) が低下することが確認され、コルチゾールとダンシルラベル化コルチゾールの競合が成立していることが示唆された (***Figure 4-20***)。しかしながら、MIP-NPs1 においてコルチゾールを滴下した場合のアニソトロピー (*r*) の下限値は ca. 0.15 であることが判明した。この結果は、重合時にコルチゾールと複合体を形成していないフリーのイタコン酸の影響により、一部のダンシルラベル化コルチゾールが MIP-NPs1 に対して非特異的に吸着しており、コルチゾールによる競合が部分的に成立していないためと推定している。ここで、***Figure 4-20*** に示した逆シ

グモイド曲線は一般に競合 ELISA のモデル式である下記の 4 パラメータロジスティック関数 **(*4-14*)** で近似できる。

$$r = \frac{(B - A)}{\left(1 + \left(\frac{H}{IC_{50}}\right)^{C}\right)} + A \qquad \textbf{(4-14)}$$

ここで r はアニソトロピー、H を滴定時におけるコルチゾール濃度とすると、A は下限の漸近値、B は上限の漸近値、C は変曲点における傾き、IC_{50} は 50% 阻害濃度 (変曲点) を表す。

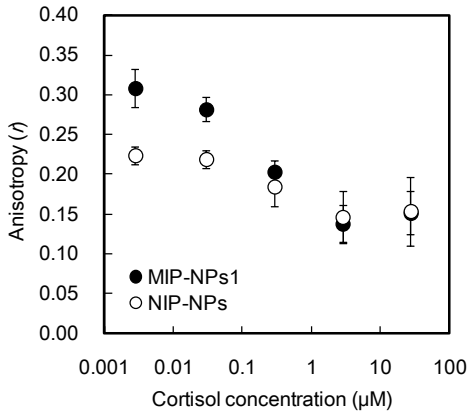


Figure 4-20. Fluorescence polarization-based competitive binding assay of cortisol using MIP-NPs1 and NIP-NPs (143 μg/mL) in chloroform/hexane (4:1, v/v).

カーブフィッティングソフトウェア (Origin Pro 7.5J) にて式 **(*4-13*)** にカーブフィッティングを行った結果、MIP-NPs1 を滴下した際の IC_{50} は 1.67×10^{-7} M であり、NIP-NPs1 を滴下した際の IC_{50} (2.88×10^{-7} M) に比して 1.7 倍の高感度であることが判明した。また、R^2 の値は 0.99 であり、上記モデル式によくフィットした。これはバルク状のポリマーである MIP と NIP の結合定数 (K_a) の比の逆数に一致する。すなわち、MIP-NPs1 では重合時に添加したコルチゾール-21-モノメタクリレートが鋳型分子近傍の架橋点間距離を増大させ、NIP-NPs に比して分子認識空間に対するコルチゾールのアクセシビリティを向上させたものと考えている。結果として MIP-NPs1 には NIP-NPs に比して有効な分子認識空間が数多く存在していることが示唆された。

また、MIP-NPs1 を滴下した系ではコルチゾールの競合による検出限界が ca. 80 nM であることが判明した。この値は臨床的に測定意義のあるコルチゾール濃度とされている 1–30 μg/dL (27.6–828 nM) と同程度であった。

さらに、ダンシルラベル化コルチゾールと MIP-NPs1 の複合体を形成させた後、類似のステロイド骨格を有するプロゲステロンで競合実験を実施した結果、アニソトロピー (*r*) の変化は確認されなかった (***Figure 4-21***)。この結果はバルク状のポリマーである MIP の結合実験で実証したように MIP-NPs1 の分子認識層はプロゲステロンに対する親和性が低いため、MIP-NPs1 の分子認識空間に結合したダンシルラベル化コルチゾールとの競合が成立していないことを示唆している。以上の結果から蛍光偏光法と競合法を複合することにより、ダンシルラベル化コルチゾールと MIP-NPs1 の複合体を使用した蛍光偏光法によるコルチゾールのセンシングシステムが構築できる可能性を見出した。

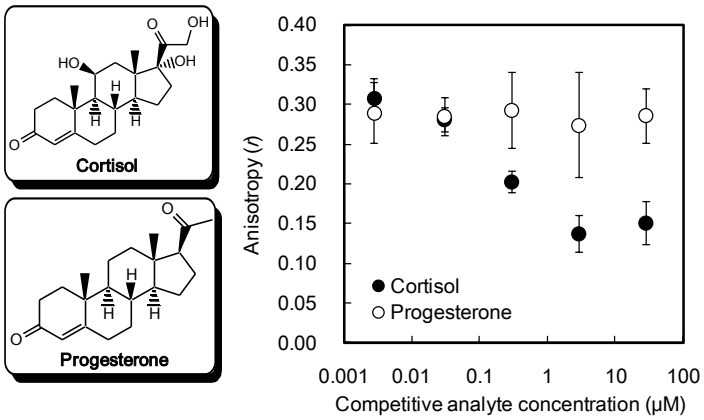


Figure 4-21. Fluorescence polarization-based competitive binding assay of cortisol and progesterone using MIP-NPs1 (143 μg/mL) and dansyl-cortisol (2 μM) in chloroform/hexane (4:1, v/v).

4-4. 結言

本章では MI 法により、ストレスマーカーとして知られているコルチゾールに対するバルク状分子認識材料 (MIP) を合成し、標的分子に対する結合能と選択性を評価した。また、core-shell 構造を有する微粒子を合成し、shell 層に分子認識能を付与することで、分子認識層の比表面積を増大させた分子認識材料 (MIP-NPs) を合成した。加えて、コルチゾールのステロイド骨格 4 位の不飽和結合を利用することでダンシルラベル化コルチゾールを合成し、MIP-NPs1 に対する分子間相互作用を評価した。さらに、蛍光偏光法を用いてダンシルラベル化コルチゾールと MIP-NPs1 の分子間相互作用を解析し、ダンシルラベル化コルチゾールと MIP-NPs1 の複合体を形成させた後、コルチゾールによる競合実験を実施し、間接的にコルチゾールと MIP-NPs1 の分子間相互作用を評価することで、その結合能と選択性を評価した。

本章により得られた知見を要約すると以下のようになる。

1) 吸着等温線から推算された MIP に対するコルチゾールの結合定数 (K_a) は $1.3\times10^4\ M^{-1}$ であり、これは NIP との結合定数 (K_a) である $7.8\times10^3\ M^{-1}$ の 1.7 倍であることが判明した。この結果は重合時に添加した鋳型分子であるコルチゾール-21-モノメタクリレートが鋳型分子近傍の架橋点間距離を増大させ、分子認識空間内への標的分子のアクセシビリティを向上させたものと推定している。

2) 選択性の評価実験により、コルチゾールの結合能は類似のステロイド骨格を有するテストステロンおよびプロゲステロンに対して有意差が認められたことから、ステロイド骨格 17 位の β-ヒドロキシケトン基による水素結合が分子間相互作用に影響を及ぼしていることが判明した。

3) コルチゾールのステロイド骨格 4 位の不飽和結合を利用し、コルチゾールを原料とした蛍光性のダンシルラベル化コルチゾールを 3 ステップで合成することに成功した。

4) core となる P(S-DVB) seed 粒子を合成し、2 段階の重合により、shell 層に分子認識能を付与した MIP-NPs1 を合成した。SEM 画像の結果から、得られた微粒子は球形で比較的単分散なものであることが判明した。また、画像解析により推定された粒径は ca. 199 nm であり、P(S-DVB) seed 粒子の粒径 (ca. 155 nm) よりも大きく、ca. 20 nm の膜厚を有する core-shell 型 MIP-NPs が合成されたものと考えられる。

5) MIP-NPs1 滴下時における蛍光極大波長のシフト ($\Delta\lambda m$) の経時変化を評価した結果、MIP-NPs1 を滴下した系では R-MIP-NPs を滴下した系に比して蛍光極大波長のシフト ($\Delta\lambda m$) が大きく、重合時に機能性モノマーとして添加したイタコン酸がダンシルラベル化コルチゾールと MIP-NPs1 の複合体形成を促進していることが示唆された。また、ダンシルラベル化コルチゾールと MIP-NPs1 の複合体形成における反応速度定数 (k_a) は 1.4×10^3 $M^{-1}min^{-1}$ であり、これは ダンシルラベル化コルチゾールと R-MIP-NPs の複合体形成における反応速度定数 (k_a) (7.6×10^2 $M^{-1}min^{-1}$) の 1.8 倍であることが判明した。

6) ダンシルラベル化コルチゾールの溶液に MIP-NPs1 を滴下して蛍光スペクトル変化を評価した結果、蛍光極大波長 (λm) がレッドシフトする様子が確認された。これはダンシルラベル化コルチゾールと MIP-NPs1 の水素結合による相互作用により、標的分子がインキュベーション溶媒に比して極性の高いポリマーの分子認識空間内に存在している結果であると考えられる。また、MIP-NPs1 に対するダンシルラベル化コルチゾールの結合定数 (K_a) は 2.6×10^6 M^{-1} であることが判明した。

7) ダンシルラベル化コルチゾールの溶液に MIP-NPs1 を滴下することで蛍光偏光度 P (λ) およびアニソトロピー (r) が上昇することが判明した。これはダンシルラベル化コルチゾールと MIP-NPs1 が複合体を形成することにより、蛍光分子の実効体積が増大し、蛍光分子の遷移双極子モーメントの回転運動が束縛された結果であると考えられる。また、MIP-NPs1 に対するダンシルラベル化コルチゾールの結合定数 (K_a) を推算した結果、1.0×10^6 M^{-1} であること

が判明した。この結果は、蛍光極大波長の変化 ($\Delta\lambda m$) から推算した結合定数 (K_a) の値 ($2.6\times10^6\ M^{-1}$) とおおむね一致した。したがって、アニソトロピー (r) が本実験系においても分子間相互作用の指標となることが判明した。

8) ダンシルラベル化コルチゾールの溶液に MIP-NPs1 を滴下した系では R-MIP-NPs を滴下した系に比してアニソトロピー (r) の上昇率が高く、機能性モノマーとして使用したイタコン酸が蛍光ラベル化コルチゾールの分子認識空間へのアクセシビリティを向上させている可能性があることが示唆された。

9) ダンシルラベル化コルチゾールの濃度依存性を評価した結果、10 μM および 5 μM ではコルチゾールでの競合実験時に明確なアニソトロピー (r) の変化は確認されなかった。この結果はダンシルラベル化コルチゾール濃度が高いことで MIP-NPs1 と複合体を形成していないフリーのダンシルラベル化コルチゾールが系内に多量に存在することになり、系全体としてのアニソトロピー (r) の低下が抑制されていると同時にコルチゾールによる競合が成立し難いことを示唆している。一方で、ダンシルラベル化コルチゾールの濃度を 2 μM まで低下させた結果、複合体形成によるアニソトロピー (r) の増大が確認され、コルチゾールによる競合実験時においても顕著にアニソトロピー (r) の低下が確認された。

10) ダンシルラベル化コルチゾールの溶液に MIP-NPs1 を滴下した系では NIP-NPs を滴下した系に比してアニソトロピー (r) の上昇度が 1.3 倍高いことが判明した。この結果はポリマーマトリックス内のカルボキシ基とコルチゾールの水酸基による水素結合のみならず、分子認識空間のサイズが分子間相互作用に影響していることを示唆している。この結果は、重合時に添加したコルチゾール-21-モノメタクリレートが鋳型分子近傍の架橋点間距離を増大させることで MIP-NPs1 の分子認識空間に対する標的分子のアクセシビリティを向上させたものと考えている。

11) コルチゾールによる競合実験を実施した結果、MIP-NPs1 の IC_{50} は 1.67×10^{-7} M であり、NIP-NPs の IC_{50} (2.88×10^{-7} M) より 1.7 倍高感度であることが判明した。また、MIP-NPs1 に対するコルチゾールの検出限界は ca. 80 nM であり、この値は臨床的に測定意義があるとされる 1–30 μg/dL (27.6–828 nM) と同等の値であることが判明した。

12) プロゲステロンによる競合実験を実施した結果、アニソトロピー (r) の変化が確認されなかったことから、ダンシルラベル化コルチゾールと MIP-NPs1 の複合体形成の阻害にコルチゾールの 21 位の 1 級水酸基が強く関与していることが判明した。

本章では core-shell 構造を有するポリマー微粒子を作成し、shell 層に分子認識能を付与することで標的分子に対する結合能の迅速性と感度を向上させることを目的とした。また、B/F 分離を必要とせず、蛍光セル内にてダンシルラベル化コルチゾールと MIP-NPs1 の分子間相互作用による蛍光極大波長のシフト ($\Delta\lambda m$) から結合速度定数 (k_a) と結合定数 (K_a) を推算することに成功し、蛍光偏光法と競合法を複合することによって SPR や QCM を利用した高感度分子間相互作用測定装置を使用することなく、コルチゾールに対する迅速なセンシングシステムを構築することに成功した。

また、本報告では蛍光ラベル化試薬としてダンシル系蛍光色素を使用したが、ピレン系蛍光色素を使用することで、同様の実験を実施することにより、MIP-NPs1 に蛍光ラベル化コルチゾールが結合し、局所的に蛍光色素の濃度が上昇することでピレンのエキシマー蛍光により、視覚的にコルチゾールの結合を解析できる可能性があると考えられる。また、その他の分子間相互作用解析法として蛍光相関分光法と競合法を複合することも可能である。蛍光相関分光法は蛍光分子の分子サイズの変化にともなう並進速度の違いを蛍光のゆらぎとして検出することで分子間相互作用を評価する分析法である。すなわち、蛍光分子が共焦点領域を通過するためにかかる時間を蛍光の揺らぎとして検出する。得られた強度スペクトルを逆フーリエ変換すると時間スペクトルが得られ、複合体形成時における分子間相互作用の解析が可能となる。蛍光偏光法あるいは蛍光相関分光法はいずれも複合体形成における分子サイズの変化を蛍

光分子のブラウン運動 (回転運動または並進運動) の差として検出する手法であり、B/F 分離を必要とせずに分子間相互作用の解析が可能である。これらの分析法とコルチゾールによる競合法を複合することにより分子間相互作用を解析することで、生体試料中におけるコルチゾールの高感度かつ簡易的評価法 (アフィニティクロマトグラフィー) への応用が可能になるものと考えている。

【参考文献】

第 4 章

[1] C. M. Huang and M. Zweig, Evaluation of Radioimmunoassay of Urinary Cortisol without Extraction, *Clin. Chem.* **1989,** 35, 125–126.

[2] R. A. Dressendorfer, C. Kirschbaum, W. Rohde, F. Stahl, and C. J. Strasburger, Synthesis of a Cortisol-Biotin Conjugate and Evaluation as a Trancer in an Immunoassay for Salivary Cortisol Measurement, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1992,** 43, 683–692.

[3] S. S. Dickerson and M. E. Kemeny, Acute Stressors and Cortisol Responses: A Theoretical Integration and Synthesis of Laboratory Research, *Psychol. Bull.* **2004,** 130, 355–391.

[4] R. Rosmond, M. F. Dallman, and P. Bjorntorp, Stress-Related Cortisol Secretion in Men: Relationships with Abdominal Obesity and Endocrine, Metabolic and Hemodynamic Abnormalities, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1998,** 83, 1853–1859.

[5] C. Kirschbaum, O. T. Wolf, M. May, W. Wippich, and D. H. Hellhammer, Stress- and Treatment-Induced Elevations of Cortisol Leveles Associated with Impaired Declarative Memory in Healthy Adults, *Life Sci.* **1996,** 58, 1475–1483.

[6] M. Yamaguchi, Y. Matsuda, S. Sasaki, M. Sasaki, Y. Kadoma, Y. Imai, D. Niwa, and V. Shetty, Immunosensor with Fluid Control Mechanism for Salivary Cortisol Analysis, *Biosens. Bioelectron.* **2013,** 41, 186–191.

[7] O. Ramström, L. Ye, and K. Mosbach, Artificial Antibodies to Corticosteroids Prepared by Molecular Imprinting, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 471–477.

[8] C. Baggiani, G. Giraudi, F. Trotta, C. Giovannoli, and A.Vanni, Chromatographic Characterization of a Molecular Imprinted Polymer Binding Cortisol, *Talanta* **2000**, 51, 71–75.

[9] Y. Hoshino, H. Koide, T. Urakami, H. Kanazawa, T. Kodama, N. Oku, and K. J. Shea, Recognition, Neutralization, and Clearance of Target Peptides in the Bloodstream of Living Mice by Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles: A Plastic Antibody, *J. Am. Chem. Soc.* **2010,** 132, 6644–6645.

[10] S. T. Wei, A. Molinelli, and B. Mizaikoff, Molecularly Imprinted Micro and Nanospheres for the Selective Recognition of 17β-Estradiol, *Biosens. Bioelectron.* **2006,** 21, 1943–1951.

[11] Y. Ma, G. Pan, Y. Zhang, X. Guo, and H. Zhang, Narrowly Dispersed Hydrophilic Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Efficinet Molecular Recognition in Real Aqueous Samples Including River Water, Milk, and Bovine Serum, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013,** 52, 1511–1514.

[12] W. Wan, M. Biyikal, R. Wagner, B. Sellergren, and K. Rurack, Fluorescent Sensory Microparticles that “Light-up” Consisting of a Silica Core and a Molecularly Imprinted Polymer (MIP) Shell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013,** 52, 7023–7027.

[13] A. Poma, A. P. F. Turner, and S. A. Piletsky, Advances in the Manufacture of MIP Nanoparticles, *Trends Biotechnol.* **2010,** 28, 629–637.

[14] C. J. Tan and Y. W. Tong, Molecularly Imprinted Beads by Surface Imprinting, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007,** 389, 369–376.

[15] Y. Kamon, R. Matsuura, Y. Kitayama, T. Ooya, and T. Takeuchi, Precisely Controlled Molecular Imprinting of Glutathione-s-Transferase by Orientated Template Immobilizaiton Using Specific Interaction with an Anchored Ligand on a Gold Substrate, *Polym. Chem.* **2014,** 5, 4764–4771.

[16] S. Sasaki, T. Ooya, Y. Kitayama, and T. Takeuchi, Molecularly Imprited Protein Recognition Thin Films Constructed by Controlled/Living Radical Polymerization, *J. Biosci. Bioeng.* **2015,** 119, 200–205.

[17] H. Sunayama, T. Ooya, and T. Takeuchi, Fluorescent Protein Recognition Polymer Thin Films Capable of Selective Signal Transduction of Target Binding Events Prepared by Molecular Imprinting with a Post-Imprinting Treatment, *Biosens. Bioelectron.* **2010,** 26, 458–462.

[18] L. Chen, S. Xu, and J. Li, Recent Advances in Molecular Imprinting Technology: Current States, Challenges and Highlighted Applications, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 2922–2942.

[19] Z. Zhang, J. Li, J. Fu, and L. Chen, Fluorescent and Magnetic Dual-Responsive Coreshell Imprinting Microspheres Strategy for Recognition and Detection of Phycocyanin, *RSC Advances* **2014**, 4, 20677–20685.

[20] GE ヘルスケアバイオサイエンス株式会社　蛍光検出の基礎知識 <http://www.gelifesciences.co.jp/contact/imaging/index.html>

[21] 山口政俊·能田均·吉田秀幸·轟木堅一郎　著　生体成分の高選択·高感度分子内エキシマー蛍光誘導体化法の開発と医療分析への展開 The Chemical Times No.1 (2009)

[22] H. Huang, A. L. Mclntosh, B. P. Atshrves, Y. Ohno-Iwashita, A. B. Kier, and F. Schroeder, Use of Dansyl-Cholestanol as a Probe of Cholesterol Behavior in Membranes of Living Cells, *J. Lipid Res.* **2010,** 51, 1157–1172.

[23] J. R. Albani, *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*, Blackwell Publishing: France, **2007.**

[24] P. Prabhat and T. Erdogan, *Fluorescence Polarization in Life Sciences*, Semrock, Inc., A Unit of IDEX Corporation. <http://www.semrock.com/fluorescence-polarization-in-life-sciences.aspx>

[25] D. M. Jameson and J. A. Ross, Fluorescence Polarization/Anisotropy in Diagnostics and Imaging, *Chem Rev.* **2010,** 110, 2685–2708.

[26] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer: New York, **2006.**

[27] X. Zhang, J. K. Jackson, and H. M. Burt, Determination of Surfactant Critical Micelle Concentration by a Novel Fluorescence Depolarization Technique, *J. Biochem. Biophys. Methods.* **1996,** 31, 145–150.

[28] S. Hamai and H. Kokubun, Fluorescence Depolarization Study of Hydrogen Bonded 1-Anthrol, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1974,** 47, 24–27.

[29] M. Tsuruoka, S. Murano, M. Okada, I. Ohiso, and T. Fujii, The Extremely Rapid Oligonucleotide Hybridization and High Throughput Detection of Microbial Gene Sequences Using Fluorescence Polarization, *Biosens. Bioelectron.* **2001,** 16, 695–699.

[30] V. C. Le Tilly and A. Royer, Fluorescence Anisotropy Assays Implicate Protein-Protein Interactions in Regulating Trp Repressor DNA Binding, *Biochemistry* **1993,** 32, 7753–7758.

[31] D. Zhang, M. Lu, and H. Wang, Fluorescence Anisotropy Analysis for Mapping Aptamer-Protein Interaction at the Single Nucleotide Level, *J. Am. Chem. Soc.* **2011,** 133, 9188–9191.

[32] N. Barbero, L. Naplone, P. Quagliotto, S. Pavan, C. Barolo, E. Barni, F. Bussolino, and G. Viscardi, Fluorescence Anisotropy Analysis of Protein-Antibody Interaction, *Dyes Pigments* **2009,** 83, 225–229.

[33] F. Cleemann and P. Karuso, Fluorescence Anisotropy Assay for the Traceless Kinetic Analysis of Protein Digestion, *Anal. Chem.* **2008,** 80, 4170–4174.

[34] M. Ameloot, M. van de Ven, A. U. Acuña, and B. Valeur, Fluorescence Anisotropy Measurements in Solution: Methods and Reference Materials (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* **2013,** 85, 589–608.

[35] M. Cyrankiewicz, B. Ziomkowska, and S. Kruszewski, Fluorescence Spectra Analysis and Fluorescence Anisotropy Titration Methods in Determining the Hydroxycamptothecins Affinity to Membranes, *Polish J. of Environ. Stud.* **2006,** 15, 47–49.

[36] J. C. Owicki, Fluorescence Polarization and Anisotropy in High Throughput Screening: Perspectives and Primer, *J. Biomol.Screen.* **2000,** 5, 297–306.

[37] B. M. Cummins, J. T. Garza, and G. L. Coté, Optimization of Concanavalin A-Based Glucose Sensor Using Fluorescence Anisotropy, *Anal. Chem*. **2013,** 85, 5397–5404.

[38] T. J. V. Prazeres, A. Fedorov, S. P. Barbosa, J. M. G. Martinho, and M. N. Berberan-Santos, Accurate Determination of the Limiting Anisotropy of Rhodamine 101. Implications for its Use as a Fluorescence Polarization Standard, *J. Phys. Chem. A* **2008,** 112, 5034–5039.

[39] O. P. Varnavski, J. C. Ostrowski, L. Sukhomlinova, R. J. Twieg, G. C. Bazan, and T. Goodson III., Coherent Effects in Energy Transport in Model Dendritic Structures Investigated by Ultrafast Fluorescence Anisotropy Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **2002,** 124, 1736–1743.

[40] S. A. Eremin, and D. S. Smith, Fluorescence Polarization Immunoassays for Pesticedes, *Comb. Chem. High. T. Scr.* **2003,** 6, 257–266.

[41] C. E. Hunt, P. Pasetto, J. A. Richard, and K. Haupt, A Fluorescence Polarisation Molecular Imprint Sorbent Assay for 2,4-D: a Non-Separation Pseudo-Immunoassay, *Chem. Commun.* **2006,** 16, 1754–1756.

[42] X-A. Ton, V. Acha, K. Haupt, and B. T. S. Bui, Direct Fluorimetirc Sensing of UV-Excited Analytes in Biological and Environmental Samples Using Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles and Fluorescence Polarization, *Biosens. Bioelectron.* **2012,** 36, 22–28.

[43] 日本化学会生体機能関連化学部会　編　生体機能関連化学実験法　化学同人 (2003)

[44] J. S. Mitchell, Spin-Coated Methacrylic Acid Copolymer Thin Films for Covalent Immobilization of Small Molecules on Surface Plasmon Resonance Substrates, *Eur. Polym. J.* **2011,** 47, 16–23.

[45] A. Uchida, Y. Kitayama, E. Takano, T. Ooya, and T. Takeuchi, Suprapartciles Comprised of Molecularly Imprinted Nanoparticles and Modified Gold Nanoparticles as a Nanosensor Platform, *RSC Advances* **2013,** 3, 25306–25311.

[46] F. Perrin, Polarisation de la Lumière de Fluorescence. Vie Moyenne des Molécules dans L'etat Excite, *J. Phys. Radium.* **1926,** 7, 390–401.

[47] G. Weber, Rotational Brownian Motion and Polarization of the Fluorescence of Solutions, *Adv. Prot. Chem.* **1953,** 8, 415–459.

[48] M. Tsuruoka, K. Yano, K. Ikebukuro, H. Nakayama, Y. Masuda, and I. Karube, Optimization of the Rate of DNA Hybridization and Rapid Detection of Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* DNA Using Fluorescence Polarization, *J. Biotechnol.* **1996,** 48, 201–208.

第 5 章
結論

5-1. まとめ

これまでに、天然の酵素や抗体の機能を模倣した標的分子を特異的に認識する MIP に関する研究結果が数多く報告されてきたが、その多くは生物活性物質の認識に関するものである。このような事実は熱や pH などの外部環境に依存せずに標的分子に対して分子認識能を発現できる材料の開発が求められている結果であるとも考えられる。ここ数 10 年で MIP に関連した研究の進歩はめざましいものがあり、現在では天然の酵素や抗体に匹敵するほどの結合能を有する分子認識材料に関する研究結果も報告されている。また、従来はバルク状の MIP を合成することが主流であったため、工学的な方面への応用はカラムの充填剤などの分離材料としての用途に限られていた。一方で、近年では微粒子や薄膜といった形状の MIP を合成することが可能となったため、金基板上に MIP を固定化することで SPR や QCM を利用した分子間相互作用測定装置との融合による高感度な分子センサーとしての用途にも広く利用されるようになった。しかしながら、天然の酵素や抗体による生体内での分子認識は非常に優れており、複数の反応が同時にほぼ 100% の選択性を有しながら進行している。このため、分子認識の選択性という点に鑑みればこれらに匹敵するほどの分子認識材料に関する研究結果は報告されていないといえる。本研究ではこれまでに検討されてきた生物活性物質を認識する MIP に高選択性、高感度、放出制御機能などの新たな機能を付与した分子認識材料を合成することを目的とした。

第 1 章では現在に至るまでの分子認識化学の発展の過程について言及し、本研究の目的と意義について述べた。分子認識化学は比較的新しい研究分野であり、1960 年代にクラウンエーテルが発見されて以来、特定の標的分子を認識可能な機能性材料に関する研究結果が数多く報告されてきた。その中でも MIP に関する研究分野は標的分子を選択的に認識可能な高分子材料をテーラーメイドに合成することが可能であることから、1970 年代以降に新たな分子認識材料の構築法として研究が進められるようになった。これまでにも特定の生物活性物質を認識する MIP に関する研究結果は数多く報告されているが、本研究ではそのような MIP に対してさらに高選択性、高感度、放出制御機能などを付与した新たな分子認識材料を合成することを目的とした。このような基礎データは臨床用途においても重要であり、分子センサー、アフィニティクロマトグラフィー、コントロールドリリースシステムなどの工学的方面への

応用可能性を判断するために非常に有効で意義のあるものと考えられる。

第 2 章では生体内で多様な役割を担っているドーパミンを選択的に認識する高分子材料の合成を試みた。これまでにもドーパミンを認識する MIP に関する報告は数多く存在するが、それらの報告の多くは機能性モノマーとしてアクリル酸やメタクリル酸のようなカルボキシ基を有するモノマーあるいは *p*-アミノスチレンなどのアミノ基を有するモノマーを使用した単点認識によるものであった。そこで、本研究では多点認識型の MIP を合成し、標的分子に対する選択性を向上させることを目的とした。そのため、ドーパミンの 1 級アミンと強く相互作用するスルホ基を分子認識空間内に導入する手法を検討することにした。しかしながら、ドーパミンのアミノ基とスルホ基によるスルホン酸アミド結合を有する鋳型分子では一般に加水分解による鋳型分子の除去が難しいとされている。そこで、ジスルフィド結合を有する鋳型分子をを設計·合成し、MIP に応用することにした。本実験系において、MIP 中に存在するジスルフィド結合は還元反応によって容易に切断可能であり、鋳型分子を除去すると同時に分子認識空間内の相補的な位置にチオール基を配置すること可能であった。さらに、分子インプリント後に酸化反応によって分子認識空間内の相補的な位置に存在するチオール基をスルホ基に変換するという後天的官能基変換法 (ポストインプリンティング修飾) を確立した。加えて、フェニルボロン酸基によるジオール基の認識を複合することで標的分子となるドーパミンを多点認識する機能性高分子材料の合成し、選択的にドーパミンを認識することに成功した。ジスルフィド結合による一連の酸化還元システムの利用は分子認識空間を構築すると同時にその近傍に修飾可能な官能基を配置することで相互作用部位の変換を行うことが容易となり、標的分子に応じて分子認識能を高めることや分子認識空間近傍への蛍光基の修飾が可能になるなどさまざまな分野に応用できる可能性を見出した。

第 3 章では外部刺激により、標的分子の放出制御が可能な分子認識材料の構築を目的として光応答性モノマーであるスピロピラン誘導体を分子認識空間内に固定化した MIP を合成し、標的分子の放出制御機能について評価した。これまでにもスピロピランモノマーを MIP に応用することで、標的分子の放出制御が可能な分子認識材料に関する研究結果が報告されている。しかしながら、いずれの報告においてもスピロピラン骨格の *N*-末端からメタクリロイル基を生成し、重合時のコモノマーとして使用するものであったため、標的分子の放出制御が不十分となる可能性が示唆され

た。そこで本研究では分子認識部位と重合基を有するスピロピラン誘導体を新たに設計·合成し、MIP へ応用することにした。その結果、遮光時および紫外光照射時の結合実験において分子認識空間内に存在するスピロピラン部位が SP 型から MC 型へ光異性化することにより、劇的に標的分子の放出が可能となることが判明した。この結果は分子認識部位となる官能基が相補的な位置から変化することに加え、MIP 粒子表面近傍の極性増大により水素結合が阻害されることに起因するものと推定している。本章では標的分子を特異的に認識する外部刺激応答性の MIP を合成し、放出制御可能な分子認識材料を合成することに成功した。これらの結果は必要に応じて外部刺激により薬物などを放出することが可能なコントロールドリリースシステムなどへ幅広く応用できる可能性があるものと考えられる。

第 4 章では core-shell 型 MIP (MIP-NPs) を使用した蛍光偏光法によるコルチゾールのセンシングについて検討した。予備検討としてバルク重合により合成した分子認識材料のコルチゾールに対する結合能と選択性を評価することで、重合時に添加した鋳型分子が有効に機能していることを確認することにした。これまでにもコルチゾールを認識する MIP の報告はなされているが、いずれも機能性モノマーとしてメタクリル酸を使用した非共有結合型の MIP の合成によるものであったため、均一な分子認識空間が構築されていない可能性が示唆された。そこで、本研究ではコルチゾールのステロイド骨格における 21 位の 1 級水酸基をメタクリロイル化することで共有結合型の鋳型分子を作成し、MIP へ応用することにし、さらに機能性モノマーとしてイタコン酸を利用した多点認識を行うことで標的分子に対する選択性の向上を試みた。その結果、鋳型分子としてコルチゾール-21-モノメタクリレートを加えた MIP はコルチゾール-21-モノメタクリレートの代わりにメタクリル酸を加えた重合した NIP に比して高い結合能を有することが判明した。これは重合時に鋳型分子として添加したコルチゾール-21-モノメタクリレートが近傍の架橋点間距離を増大させ、分子認識空間に対する標的分子のアクセシビリティを向上させたものと考えている。また、選択性の評価において同種のステロイド骨格を有するテストステロンやプロゲステロンに比してコルチゾールの結合能が高いことから、コルチゾールのステロイド骨格 21 位の 1 級水酸基が分子認識空間内のカルボキシ基と相互作用している可能性が高いことが判明した。さらに、汎用的に使用される分析装置を使用したコルチゾールの高感度センシングを目的として core-shell 型 MIP-NPs を合成し、蛍光ラベル化コ

ルチゾールとの複合体を用いた蛍光偏光法による新たなセンシングシステムを構築することにした。これまで報告されている MIP による高感度センシングの多くは微粒子や薄膜状の MIP を基板上に固定化し、SPR や QCM を利用した高感度な分子間相互作用測定装置との融合することで分子センサーとしての研究結果に関するものであった。SPR や QCM を利用した分析手法は標的分子をラベル化する必要がなく、高感度検出が可能であることから、近年では一般に広く使用されるようになった。しかしながら、このような分析手法では特殊な分析装置や金基板が必要とされることと微量な表面プラズモン共鳴や振動数の変化を観察する必要があるために低分子量の分子認識には適さないといった問題点も存在した。そこで、本研究では core-shell 型 MIP-NPs と蛍光ラベル化コルチゾールの複合体を利用することで、汎用的な分析装置を使用して迅速にコルチゾールの高感度センシングが行えるシステムを構築することにした。シード重合法により、shell 層に分子認識能を付与した core-shell 構造を有する MIP-NPs の合成を実施した結果、ポリマー微粒子は球形かつ比較的単分散なものであることが判明した。また、ダンシルラベル化コルチゾールと MIP-NPs1 の分子間相互作用を蛍光分光光度計により評価した結果、蛍光強度が低下し蛍光極大ピークがレッドシフトする様子が確認された。この結果はダンシルラベル化コルチゾールと MIP-NPs1 が複合体を形成していることに基づくものであると考えられる。また、分子間相互作用の経時変化を測定した結果、比較的短時間 (ca. 20 min) で MIP-NPs1 に対するダンシルラベル化コルチゾールの結合が平衡に達することが判明した。さらに、蛍光偏光法を利用してアニソトロピー (r) を指標とした分子間相互作用の解析を実施することにした。蛍光偏光法によりアニソトロピー (r) を指標として解析した結合定数 (K_a) は蛍光極大波長のシフト ($\Delta\lambda m$) を指標として解析した結合定数とおおむね一致したため、本実験系においてもアニソトロピー (r) を指標とすることで分子間相互作用の解析が可能となることが判明した。さらに、蛍光偏光法と競合法を複合することにより MIP-NPs1 とコルチゾールの結合能を評価した。MIP-NPs1 と NIP-NPs の比較から、重合時に鋳型分子として使用したコルチゾール-21-モノメタクリレートが近傍の架橋点間距離を増大させ、結果としてコルチゾールの分子認識空間へのアクセシビリティを向上させたものと推定している。さらに、標的分子に対する MIP-NPs1 の選択性を評価した結果、同種のステロイド骨格を有するプロゲステロンでの競合実験ではアニソトロピー (r) に対する応答が認められないことからコルチ

ゾールによるダンシルラベル化コルチゾールの競合が成立していることが判明した。以上のことから、蛍光偏光法と競合法を複合することでストレスマーカーの一種であるコルチゾールを迅速にセンシング可能なシステムを構築することに成功した。

5-2. おわりに

1970 年代以降、*Wulff* や *Mosbach* らのグループによって、標的分子を選択的に認識する MIP の合成法に関する研究結果が報告されて以来[1,2]、MIP に対するさまざまな改良がなされてきた。第 2 章において検証した分子インプリント後において分子認識空間内に存在する官能基を使用した後天的官能基変換法の構築 (ポストインプリンティング修飾) や第 4 章において検証した core-shell 型 MIP-NPs の合成に加え、MIP を微粒子や基板に薄膜として固定化することで SPR や QCM を利用した分子間相互作用測定装置への応用を可能にし、分子認識の迅速性や測定感度を向上させてきたのもその例である。しかしながら、今後、MIP を実用化するためにはさらなる付加価値を求める必要がある。そのひとつが MIP に取り込んだ標的分子の放出制御機能である。第 3 章にて検証したスピロピランをはじめ、アゾベンゼン部位を有する光応答性モノマーや *N*-イソプロピルアクリルアミド (NIPAM) などの温度もしくは pH 応答性モノマーを使用することにより、標的分子の取り込み、貯蔵、放出といった一連の操作を外部刺激によって制御できる材料を構築することは非常に有効であると考えられる。さらに、現在ではポリグリコール酸 (PGA)、ポリ乳酸 (PLA) などを利用した生分解性ポリマーやポリビニルアルコール (PVA) を利用した水崩壊性ポリマー、高分子鎖内にカルボニル基を導入した光分解性ポリマーなどの研究も盛んに行われており、このような特異な物性を有するポリマーとの融合による分子認識材料の開発は非常に有効であると考えられる。また、MIP の微粒子化という点に鑑みれば金ナノ粒子や量子ドット、磁性粒子などの既存の材料との融合は非常に有効である。金ナノ粒子は現在、妊娠検査薬などの簡易検査 (イムノクロマトグラフィー) をはじめとして、さまざまな分野で実用化されている。量子ドットは主に InP/ZnS、CdSe/ZnS 系などの重金属が使用されていることから臨床用途に応用するにはいくつかの問題点が存在するが、非常に高感度かつ蛍光の半値幅が狭いため安定性の高い材料を構築できるものとして実用化されつつある。磁性粒子はすでに生化学や医学の分野において抗体を固定化し、迅速な B/F 分離を可能にするなどの応用が試みられている。さ

らに、分子認識能を評価するための分析手法という観点からみると、これまでに生化学や医学の分野で培われてきた分析手法が利用できることも多い。第 5 章において実施した蛍光偏光法もそのひとつであるが、その他にも蛍光共鳴エネルギー移動や蛍光相関分光法、蛍光顕微鏡を使用した分子イメージング技術などさまざまな解析法が応用できると考えられる。上述したように、今後は有機材料や高分子材料だけではなく、無機材料との複合や生化学、医学の分野における材料の評価法を応用するなど他分野との融合がますます重要になってくるものと考えている。

【参考文献】

第 5 章

[1] G. Wulff and A. Sarhan, The Use of Polymers with Enzyme-Analogous Structures for the Resolution of Racemates, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1972,** 11, 341–344.

[2] R. Arshady and K. Mosbach, Synthesis of Substrate-Selective Polymers by Host-Guest Polymerization, *Macromol. Chem. Phys.* **1981,** 182, 687–692.

【本研究に関する論文】

第 2 章

[1] T. Takeuchi, N. Murase, H. Maki, T. Mukawa, and H. Shinmori, Dopamine Selective Molecularly Imprinted Polymers *via* Post-Imprinting Modification, *Org. Biomol. Chem.* **2006,** 4, 565–568. (front cover)

第 3 章

[2] N. Murase, T. Mukawa, H. Sunayama, and T. Takeuchi, Molecularly Imprinted Polymers Bearing Spiropyran-Based Photoresponsive Binding Sites Capable of Photo-Triggered Switching for Molecular Recognition Activity, *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* (in press)

[3] N. Murase, T. Mukawa, H. Sunayama, and T. Takeuchi, Photo-Responsible Binding Behavior of 4-Nitorophenyl α-D-mannopyranoside Using Molecularly Imprinted Polymer Containing Spiropyran-Based Functional Monomer with Phenyl Boronic Acid (in preparation)

第 4 章

[4] N. Murase, S. Taniguchi, E. Takano, Y. Kitayama, and T. Takeuchi, Fluorescence Reporting of Binding Interactions of Target Molecules with Core-Shell-Type Cortisol Imprinted Polymer Particles Using Environmentally Responsible Fluorescent-Labeled Cortisol, *Macromol. Chem. Phys.* **2015,** 216, 1396–1404.

[5] N. Murase, S. Taniguchi, E. Takano, Y. Kitayama, and T. Takeuchi, A Molecularly Imprinted Nanocavity-Based Fluorescence Polarization Assay Platform for Cortisol Sensing, *J. Mater. Chem. B* **2016,** 4, 1770–1777. (front cover)

【謝辞】

本研究を行う機会を与えていただき、多大なるご指導とご助言をいただきました神戸大学大学院工学研究科竹内俊文教授に心より感謝いたします。また、学位論文の審査を引き受けていただきました同研究科西野孝教授、山地秀樹教授に感謝いたします。第 2 章および第 3 章におきまして有機合成を実施するにあたり、当時、神戸大学にてリサーチアソシエイトをされておりました務川高志博士には多大なるご指導とご助言をいただきました。また、第 2 章におきまして分析を実施するにあたり、神戸大学大学院工学研究科成相裕之教授、牧秀志准教授には大変お世話になりました。第 4 章におきまして神戸大学大学院工学研究科大谷亨准教授、北山雄己哉助教、高野恵里博士、砂山博文博士には本研究テーマに関するご助言をいただき、厚く御礼を申し上げます。また、研究費の面でご支援をいただきました株式会社日立製作所横浜研究所のみなさまに感謝いたします。同研究所の谷口伸一博士には大変お世話になりました。また、微粒子の粒径測定を実施するにあたり、DLS 測定装置を使用させていただきました神戸大学大学院工学研究科近藤昭彦教授に感謝いたします。最後になりましたが、研究室の装置の使用法や実験操作などさまざまなことを教えていただきました材料機能化学研究室のみなさまに厚く御礼申し上げます。

2016 年 7 月　村瀬　敦郎

神戸大学博士論文
「モレキュラーインプリンティングによる生物活性物質認識能を有する機能性高分子材料の創製」全 142 頁
提出日 2016 年 7 月 5 日
本博士論文が神戸大学機関リポジトリ Kernel にて掲載される場合、掲載登録日 (公開日) はリポジトリの該当ページ上に掲載されます。

© 村瀬　敦郎

本論文の内容の一部あるいは全部を無断で複製･転載･翻訳することを禁じます。