

平成21年 6月11日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006年度～2008年度
 課題番号：18390003
 研究課題名（和文） 完全水中での分子認識システムの構築と生体内ポリアミン類の迅速定量
 研究課題名（英文） Development of highly sensitive and selective molecules for detection of spermidine and spermine.
 研究代表者
 樺 一典 (TSUBAKI KAZUNORI)
 京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授
 研究者番号：50303897

研究成果の概要：

pH 指示薬として一般的なフェノールフタレインを組み込んだ呈色応答型機能性分子を合成し、生体内ポリアミンである、スペルミジン、スペルミンに対して高い選択性と高い感度を持つ化合物を開発した。更にこれらの応答の場を通常の有機溶媒から完全水系へと移行することにも成功した。これらの成果は癌との相関が指摘されているポリアミンの研究領域においても、また動植物に広く分布しその作用がまだまだ曖昧なポリアミン類の基礎研究においても、応用可能と考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	7,800,000	0	7,800,000
19年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
20年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	2,220,000	17,420,000

研究分野：超分子化学、分子認識化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：分子認識、フェノールフタレイン、スペルミジン、スペルミン、呈色応答、迅速定量、センサー

1. 研究開始当初の背景

生体内ポリアミン類はタンパク合成、核酸合成の過程に影響を与え、細胞増殖の必須因子として知られており、癌との関連も指摘されている物質である。しかしながらあまりにも生理作用が広くかつ薄いために深く踏み込んだ研究が行いにくい研究対象でもある。生体内ポリアミンの研究を行うに当たって、最も基本的かつ重要である組織中、血液中のポリアミン類の濃度の決定でさえそう簡単ではなく、多段階かつ煩雑な手法が必要である。つまり、有効簡便かつ迅速に細胞内、組

織中、血中の生体内ポリアミン類の濃度を決定できる手法の確立は、癌との相関を精査する上においてもまた、動植物に広く分布しその作用がまだまだ曖昧なポリアミン類の基礎研究を進めるに当たっても渴望されている課題である。

一方分子認識化学、超分子化学は共有結合以外の弱い分子間相互作用をデザインし分子に機能を付与する研究領域である。分子認識の場は主に有機溶媒が用いられ、水中での分子認識の例は少ない。その理由は、有機溶媒の場合は認識に都合がよい溶媒をスクリ

ーニングできるという選択肢が多い点、また水溶性の分子を合成するのが困難である点以外に、そもそも水中で有効に機能する分子間相互作用の方法論が未発達である点を挙げることが出来る。水中での分子認識を達成するため、水溶性シクロファンを始め、シクロデキストリンや芳香環を有するかご状分子などが開発されている。これらは内部疎水空間とゲスト分子の疎水部に働く疎水性相互作用を主な駆動力とする。また近年では遷移金属との配位結合を利用するものも報告されている。しかしながら水中で特定の分子を水素結合を駆動力として相互作用させようとした際には、溶媒である水分子が水素結合のドナー・アクセプターとして競合するため達成が困難な課題である。このような背景の下、研究代表者は研究に着手した。

2. 研究の目的

研究代表者は Figure 1 に示すホスト化合物 **1** を用いて、プロテックな溶媒中で水素結合を駆動力にした分子認識に取り組んでいる。

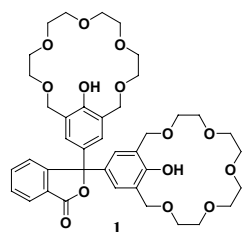


Figure 1. Structure of Host 1

本化合物は pH 指示薬として広く利用されているフェノールフタレインを母核としクラウンエーテル構造を合わせ持つ化合物であり、ゲスト分子の様々な特徴を読み取り、呈色化・可視化する機能を有している。本研究の更なる発展及び応用化を目指し次の二点を研究の目的と定めた。

(1) 完全水系での水素結合駆動型分子認識システムの構築。

(2) 生体内ポリアミンであるスペルミジン・スペルミンをターゲットとした迅速高感度分子認識システムの構築。

言い換えれば、直接的に世に役立つ「生体内ポリアミンの迅速高感度分子認識システムの構築」に挑戦する過程で、学術的に困難な課題である「完全水中での分子認識システムの構築」についての様々な知見・発見・方法論を得ることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 完全水系での水素結合駆動型分子認識システムの構築。本目的達成のためには、当然、水溶性を付与した機能性分子を合成する必要があるが、研究代表者は「完全水中での分子認識はクーロン力と水素結合のコンビネーションで可能である」という仮説を持って

いる。すなわち正電荷と負電荷の間に働くクーロン力は方向性は持たないものの、分子間力の中では最も遠くまで作用を及ぼすことができる力である。この力と方向性を持ち、近距離で作用する複数の水素結合を組み合わせることにより、結果として方向性の有る強い作用を水中でデザイン・構築できると考えた。その具体的な構造として化合物 **1** のベンゾラクトン環上に水溶性基を導入することにした。

(2) 生体内ポリアミンであるスペルミジン・スペルミンをターゲットとした迅速高感度分子認識システムの構築。本目的達成のカギは生体内アミンに対する感度の向上である。感度の向上を達成するために、化合物と生体内アミンが相互作用をしたときに存在する無色錯体と呈色錯体の平衡を呈色錯体側にシフトさせること、または、蛍光応答性の機能性分子へ変換する事とした。

4. 研究成果

(1) 完全水系での水素結合駆動型分子認識システムの構築。

① 水溶性分子の合成

化合物 **1** は水に難溶のため、水溶性ホスト分子 **2** を設計、合成した (Figure 2)。

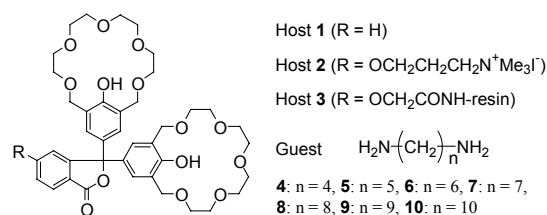
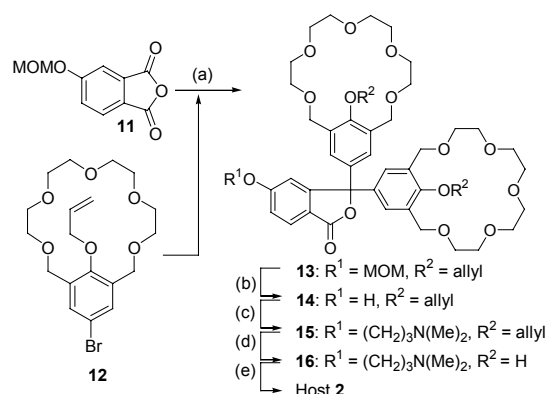


Figure 2. Structures of Hosts 1 – 3 and Guests 4-10.



Scheme 1. Synthesis of Host 2. conditions: (a) **12**, t-BuLi, 90% (b) TMSBr, MS 4Å, 94% (c) MsO(CH₂)₃NMe₂·HCl, 90% (d) Pd(PPh₃)₄, NaBH₄, 80% (e) MeI, 68%

合成は Scheme 1 に従って行った。メトキシメトキシ無水フタル酸 **11** とリチオ化した **12** とを反応させ、続く酸処理による閉環を経て **13** を高収率で構築した。二種の位置異性体が生じる可能性があったが、極めて高い選択性で一方が優先した。次いで側鎖の変換、保護基の除去を行いホスト化合物前駆体 **16**

を得た。最後にヨウ化メチルを用いて 4 級アンモニウム塩へ変換し目的とするホスト分子 **2** を合成した。

ホスト分子 **2** は十分な水溶性 ($\sim 10^{-1}$ M) を獲得していた。また **2** は重メタノールから良好な単結晶が得られ X 線結晶構造解析を行った。リンカーはイソベンゾフラン環上の、5 位に導入されていることが明らかとなった (Figure 3)。

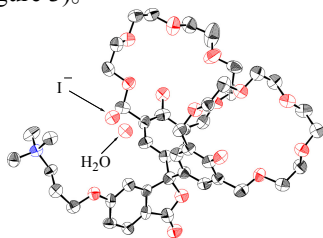


Figure 3. ORTEP View of Crystal Structure of Host **2**.

② 化合物 **2** を用いたジアミン類の長さ認識

HEPPSO 緩衝液中 (pH 7.7 及び pH 7.9)、ホスト分子 **2** を用い α,ω -ジアミン **5-10** をスクリーニングした (Figure 4)。ホスト分子 **2** はアミン類非存在下でも液性に応答してわずかに呈色するものの、水中でジアミンのメチレン鎖の長さの違いを識別して呈色の差として表現できることが判った。いずれの pH でもジアミン **9** に対して最も強い呈色を示し、メチレン鎖がそれより長くても短くても呈色は弱くなった (Figure 4a, b)。また、**2** の呈色応答は肉眼でも識別できることが判った (Figure 4c)。しかし、メチレン鎖が短く橋架け錯体を形成できないジアミン **5, 6** でも若干の呈色をした。本結果は、設定した条件が高濃度であるため、いずれのアミンでもモノアミンとして振る舞い呈色を示したと考察している。**2** のジアミンに対する長さ認識能の指標として紫外可視吸収スペクトルにおける二波長での吸光度の比を設定し、

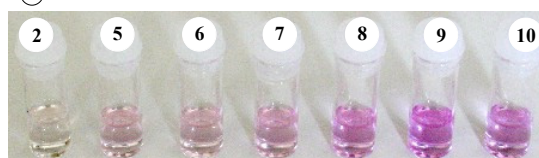
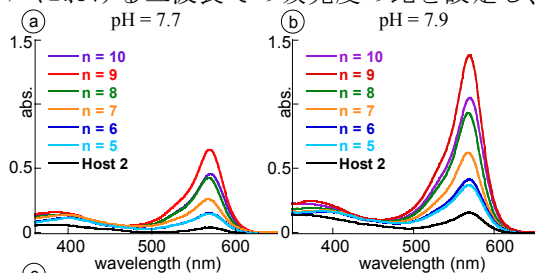


Figure 4. Colorimetric Recognition of α,ω -Diamines in Water. (a) and (b) UV-vis. spectra of host **2** with α,ω -diamines in HEPPSO buffer. conditions: [host **2**] = 1.0×10^{-2} M, [α,ω -diamine] = 1.0×10^{-2} M. HEPPSO = 0.32 M, titrant = NaOH, 10 °C, (a) pH = 7.7, (b) pH = 7.9. (c) Color development by host **2** with α,ω -diamines. [host **2**] = 1.0×10^{-2} M, [α,ω -diamine] = 1.0×10^{-2} M. pH = 7.7.

レシオ測定を行った。**2** の極大吸収波長 570 nm 及び 390 nm における吸光度の比を算出し、ジアミンのメチレン数に対してプロットした (Figure 5)。その結果、**2** はジアミンの長さを呈色の強弱として応答する機能を持ち、ジアミン **9** に対して最も強い呈色を示すことがここでも確認された。以上、 10^{-2} M という高濃度条件ではあるが、完全水中でのジアミンの長さ認識を達成した。

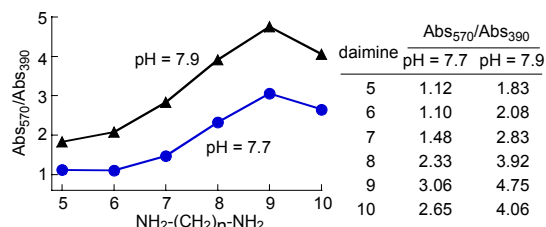


Figure 5. Ratiometric Measurement of Absorbance at 570 nm and 390 nm. Conditions: [host **2**] = 1.0×10^{-2} M, [**5-10**] = 1.0×10^{-2} M, 100% H₂O, 0.32 M HEPPSO, 25 °C

③ 固相担持型分子 **3** による分子認識

水溶性ホスト分子 **2** を用い完全水中での呈色型分子認識を達成したが、別のアプローチとして、本ホスト分子を樹脂に固定化することにより感度の向上を目指した。樹脂上ではホストの局所濃度が増大し、感度向上の打開策になり得ると考えた。ホスト分子はアミド結合で樹脂に連結することとし、導入するためのアミノ基を持ち、水中でも十分に膨潤する樹脂として amino PEGA resin を用いた。合成した **3** を用いメタノール中及び水中で α,ω -ジアミン **5-10** の長さ認識能を調べた。Figure 6 及び Figure 7 には、**3** をジアミン **6** あるいは **9** の溶液で膨潤させた様子を示す。メタノール中では 10^{-3} M のジアミン **9** を認識してムラのない呈色を示した (Figure 6)。一方、鎖長の短いジアミン **5** では全く呈色しなかった。すなわち **3** はジアミンの長さの違いを認識し呈色の差として応答する機能を保持していることは判った。

さらに、本来の目的である完全水中での呈色型分子認識を検討した (Figure 7)。pH 8.0 に調整した HEPES 緩衝液中、ゲスト分子濃度を 10^{-2} M に設定すると、**3** はジアミンの長さを可視化できることが判った。しかし、メタノール及び水いずれの溶媒中でも期待したような感度の増大は認められなかった。この原因に amino PEGA resin の側鎖により錯形成が阻害されていることが考えられた。以上、感度、選択性ともに改善の余地を残すものの、フェノールフタレイン型ホスト分子 **2-3** を用いて完全水中でもクーロン力と水素結合を組み合わせた分子認識が可能であることを示した。特に固相担持型ホストでは、回収して繰り返し再利用可能という利点を持つ。従って、より選択的に感度良く呈色するホスト分子を精密に設計し樹脂に導入す

れば、実用性も兼ね備えた機能性分子になり得ると期待できる。

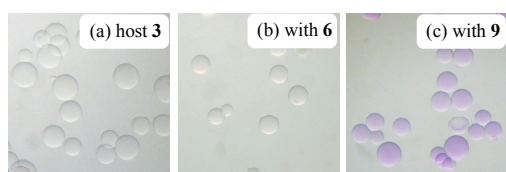


Figure 6. Coloration of Host **3** with α,ω -Diamines in MeOH. [diamine] = 2.0×10^{-3} M.

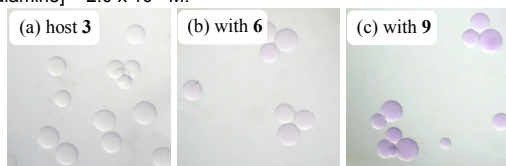


Figure 7. Coloration of Host **3** with α,ω -Diamines in Water. [diamine] = 2.0×10^{-2} M. HEPES buffer (0.6 M, pH 8.0)

(2) 生体内ポリアミンであるスペルミジン・スペルミンをターゲットとした迅速高感度分子認識システムの構築

ホスト化合物 **1** を母核とした化合物群は生体内アミンであるスペルミジン、スペルミンに対して高い認識能を有し、紫色に呈色応答する事が判っていた。しかし実用化、応用化の観点から見れば、感度が不足していた。研究代表者は、ホスト化合物とスペルミジン類からなる錯体には、平衡関係にある二種類の錯体が存在し、一方は呈色型、他方は無色であることを突き止めた (Figure 8)。

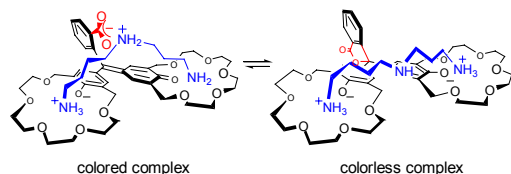


Figure 8. Equilibrium between colored and colorless complexes.

したがってこの平衡を呈色型へとずらす事ができれば、感度の向上が望めると考え、ベンゾラクトン環に主に電子吸引性の置換基を導入した化合物 **17-20**、ならびに拡張芳香環へと変換した化合物 **21-23** を合成した (Figure 9)。

合成した化合物についてスペルミジン (**24**)、スペルミン (**25**) に対する呈色能を肉眼および可視紫外吸収スペクトルを用いて比較した (Figure 10)。化合物 **1** と比較してトリフルオロメチル基を導入した化合物 **17, 18** ジメチルアミノ基を導入した **20**、更に拡張芳香環へと変換した化合物 **22, 23** が肉眼でも明らかに強く呈色した (Figure 10a-b)。トリフルオロメチル基導入体では、明らかに化合物 **17** の方が呈色が強く、化合物 **18** はこの段階で選からもれた。残り 4 化合物のスペルミジン (**24**)、スペルミン (**25**) に対する会合定数を求めた (Table 1)。高い呈色能を示す 4 化

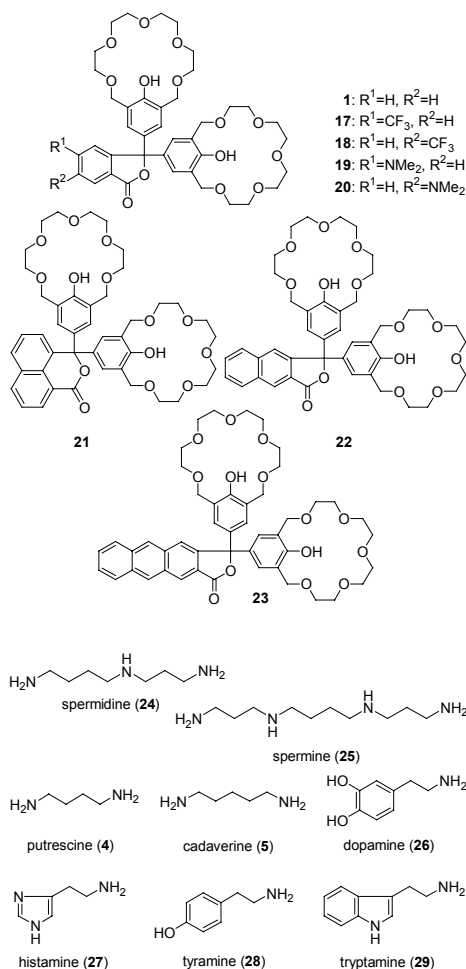


Figure 9. Hosts, guests and related compounds.

合物ではあるが、アミン類との親和性を示す会合定数 K_a では対照化合物 **1** と比較して顕著な差はなく、モル吸光係数 ϵ で大きな差が出ていることが判った。本分子認識系では ϵ は呈色錯体と無色錯体の平衡の位置を示すパラメータである。即ち ϵ の大きな差は、当初の設計通りに置換基導入により平衡の位置を呈色錯体側へと移動させたことを示している (Figure 8)。会合定数 K_a と ϵ の積を対照化合物 **1** のそれで除した値 (SI) を、呈色感度の指標とした。その結果化合物 **17, 20, 23** が約 10 倍の感度の向上を示した。この 3 化合物を候補品として選び、スペルミジンに対する呈色の挙動を精査した。会合定数 K_a 、モル吸光係数 ϵ の値では三者に大きな差は無いものの、メタノールに対する溶解度に大きな差が認められ、最も大きな溶解度を持つ化合物 **20** が最も低濃度のスペルミジンを検出できることが判った (Figure 11)。

次に最も高感度であった化合物 **20** を用いて、生体内に存在するアミノ基を持つ化合物 **4, 5, 26-29** に応答を示さないか、選択性を調べた。Figure 12a,b に示すように、他の生体内アミン類に対して化合物 **20** は全く呈色を示さなかった。更にそれらのアミン類が

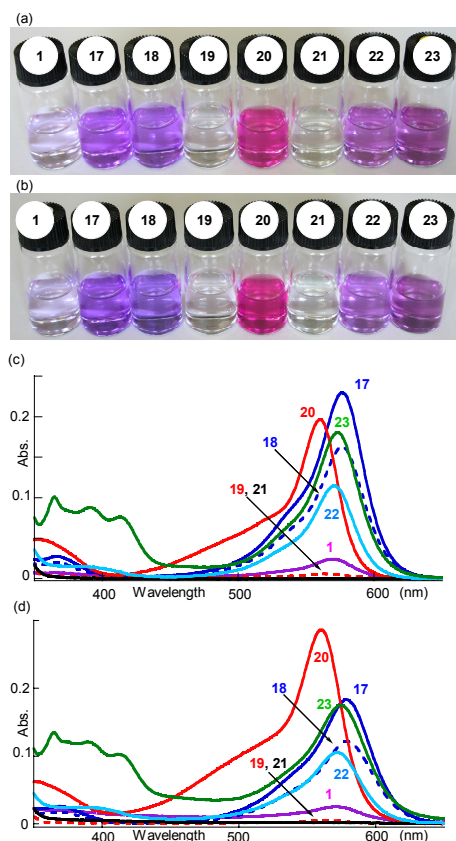


Figure 10. Colorimetric recognition of hosts **1** and **17-23** with spermidine (**24**) or spermine (**25**). (a) and (b) color development by hosts **1**, **17-23** with spermidine (**24**) or spermine (**25**), respectively. (c) and (d) UV-vis spectra of hosts **1**, **17-23** with **24** and **25**, respectively. Conditions: [host **1**, **17-23**] = [amine **24-25**] = 2.0×10^{-4} M, 20 °C, light path length for UV measurement = 0.1 cm.

host	K_a (24) ^f	ϵ (24)	S^g	K_a (25) ^f	ϵ (25)	S^g
1 ^a	790 ± 60	5000 ± 200	1.0	3600 ± 230	1900 ± 30	1.0
17 ^b	1410 ± 130	42000 ± 1800	15.0	3930 ± 330	18100 ± 500	10.4
20 ^c	860 ± 30	46300 ± 900	10.1	2570 ± 110	31300 ± 500	11.8
22 ^d	1210 ± 30	19900 ± 200	6.1	3420 ± 340	10100 ± 300	5.1
23 ^e	1450 ± 50	26500 ± 400	9.7	2930 ± 160	16500 ± 300	7.1

Table 1. Binding constants (K_a) of complexes of hosts with spermidine (**24**) or spermine (**25**) in methanol at 25 °C. Conditions: (a) $[1]_0 = 4.0 \times 10^{-4}$ M. (b) $[17]_0 = 4.0 \times 10^{-5}$ M for **24** and 8.0×10^{-5} M for **25**. (c) $[20]_0 = 5.0 \times 10^{-5}$ M. (d) $[22]_0 = 2.0 \times 10^{-4}$ M for **24** and 1.0×10^{-4} M for **25**. (e) $[23]_0 = 5.0 \times 10^{-5}$ M. (f) K_a (**24**) and K_a (**25**) are association constants for **24** and **25**, respectively. (g) $S^g = (K_a \times \epsilon) / (K_{a1} \times \epsilon_1)$.

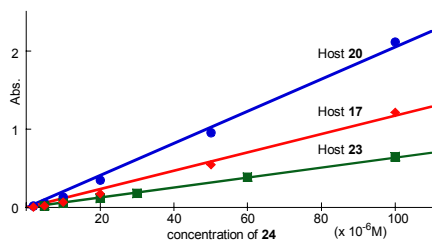


Figure 11. Detection sensitivities of hosts **17**, **20**, and **23**. Conditions: [host **17**] = 5.0×10^{-4} M, [host **20**] = 1.0×10^{-3} M, [host **23**] = 2.0×10^{-4} M, 25 °C, Methanol, light path length = 1 cm.

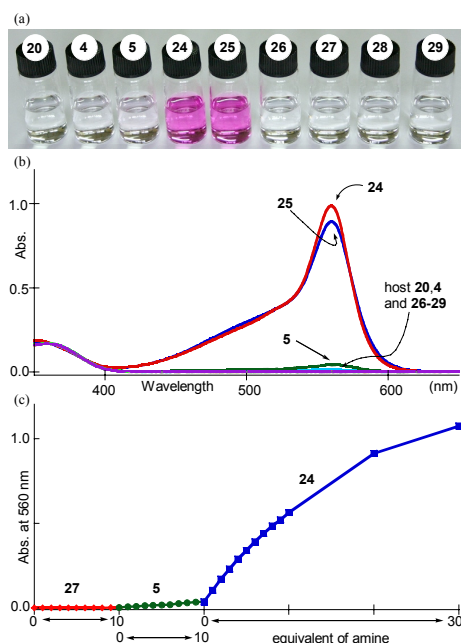


Figure 12. Naked-eye recognition of spermidine (**24**) and spermine (**25**) among biogenic amines (**26-29**) using host **20**. (a) Photograph of color development by host **20** with amines (**4-5**, **24-29**). (b) UV-vis spectra of host **20** with amines (**4-5**, **24-29**). Conditions: [host **20**] = 8.0×10^{-5} M, [**4-5**, **24-29**] = 4.0×10^{-4} M, [*N*-ethylpiperidine] = 4.0×10^{-3} M, 25 °C, Methanol, light path length for UV measurement = 1 cm. (c) Change in color of host **20** with three kinds of biogenic amines. Conditions: [host **20**] = 5.0×10^{-5} M, [amine]₀ = 5.0×10^{-3} M, 25 °C, Methanol, light path length for UV measurement = 1 cm.

共存下、スペルミジン (**24**) に応答するか否かを調べた。Figure 12c ではまず化合物 **20** の溶液に、チラミン (**27**) を 10 等量まで順次加えて行き、最大吸収波長である 560 nm の吸光度をプロットしている。**27** を 10 等量加えても、ほとんど呈色を示さない。ついでその溶液にカダベリン (**5**) を 10 等量加えた。このときにも、ほとんど呈色は認められない。そこへ (この段階で既に一級アミノ基単位で 30 当量が共存している) 標的であるスペルミジン (**24**) を加えると用量依存的に吸光度が上昇した。即ち化合物 **20** は他のアミン類が系中に夾雑した状態でもスペルミジン (**24**) に対して高い呈色能を持つことが明らかになった。

以上、まとめると研究代表者は研究当初に掲げた二つの研究目標のうち、(1)「完全水系での水素結合駆動型分子認識システムの構築」については、クーロン力と水素結合のコンビネーションを用いてその課題を解決した。さらに (2)「生体内ポリアミンであるスペルミジン・スペルミンをターゲットとした迅速高感度分子認識システムの構築」については、呈色錯体と無色錯体間の平衡を呈色錯体側にずらすというアイデアで合理的に化合物をデザイン、合成し従来型の分子に比べて約 10 倍程度の感度を持つ化合物群を開発した。今後の課題として、より一層の感度の向上または蛍光応答を付与した化合物の合成を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- ① Tsubaki, K. Colorimetric Recognition Using Functional Phenolphthalein Derivatives. *J. Incl. Phenom. Macrocyclic. Chem.* **2008**, *61*, 217-225. 査読有
- ② Tsubaki, K.; Tanima, D.; Sasamori, T.; Tokitoh, N.; Kawabata, T. Colorimetric Recognition of Length of α,ω -Diamines in Water *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 2135-2138. 査読有
- ③ Tsubaki, K.; Tanima, D.; Kuroda, Y.; Fuji, K.; Kawabata, T. Bidirectional and Colorimetric Recognition of Sodium and Potassium Ions. *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 5797-5800. 査読有
〔学会発表〕(計17件)
- ① 今村洋子、谷間大輔、川端猛夫、樫一典 スペルミジン・スペルミンの呈色型高感度認識 日本薬学会第129年会 2009年3月28日 京都
- ② 樫一典、今村洋子、谷間大輔、川端猛夫 スペルミジン・シペルミンの呈色型高感度認識 日本ポリアミン研究会第23回研究発表会 2009年1月22日 大阪
- ③ 今村洋子、谷間大輔、川端猛夫、樫一典 スペルミジン・スペルミンの呈色型高感度認識「戦略的の大学連携支援事業」先端科学セミナー 京都 ケミカルバイオロジーシンポジウム 2008年12月15日 京都
- ④ 今村洋子、谷間大輔、川端猛夫、樫一典 スペルミジン・シペルミンの呈色型高感度認識 第2回有機 π 電子系シンポジウム 2008年12月5日 広島
- ⑤ 樫一典、谷間大輔、今村洋子、川端猛夫 フェノールフタレインを基本骨格とする新奇機能性分子の開発 日本薬学会第128年会 一般シンポジウム 「薬学の基盤としての分子認識化学・超分子化学」 2008年3月27日 横浜
- ⑥ 樫一典、今村洋子、谷間大輔、川端猛夫 スペルミジン及びスペルミンを標的とした高感度試薬の検出 第1回有機 π 電子系シンポジウム 2007年12月8日 東京
- ⑦ 樫一典、今村洋子、谷間大輔、川端猛夫 スペルミジン及びスペルミンを標的とした高感度検出試薬の創出 第27回有機合成若手セミナー 明日の有機合成を担う人のために 2007年11月15日 京都
- ⑧ 樫一典、今村洋子、谷間大輔、川端猛夫 スペルミジン及びスペルミンを標的とした高感度試薬の開発 第57回日本薬学会近畿支部総会・大会 2007年10月27日 大阪
- ⑨ Tsubaki, K.; Tanima, D.; Kawabata, T. Colorimetric Recognition of Spermidine and Spermine Based on Phenolphthalein Derivatives. 21st International Congress for Heterocyclic Chemistry 2007年7月17日 Sydney

⑩ 樫一典、谷間大輔、川端猛夫 フェノールフタレインを基本骨格とする新奇機能性分子の開発 第2回ホスト・ゲスト化学シンポジウム 2007年5月25日 大阪

⑪ 樫一典、谷間大輔、川端猛夫 スペルミジンを標的とした機能性分子の研究 日本ポリアミン研究会第21回研究発表会 2007年1月25日 東京

⑫ Kazunori Tsubaki, Daisuke Tanima, Tomokazu Kusumoto, Kaoru Fuji, Takeo Kawabata. Phenolphthalein-based Chemosensors for Diamines and Unprotected Dipeptides in Water. The 3rd Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists 2006年11月27日 Seoul, Korea

⑬ 樫一典、谷間大輔、富士薫、川端猛夫 フェノールフタレインを基本骨格とする新奇機能性分子の開発 第36回複素環化学討論会 2006年11月24日 長崎

⑭ 樫一典、谷間大輔、富士薫、川端猛夫 フェノールフタレインを基本骨格とする新規機能性分子の開発と光学応答 第56回日本薬学会近畿支部総会・大会 2006年10月28日 大阪

⑮ Kazunori Tsubaki, Daisuke Tanima, Tomokazu Kusumoto, Kaoru, Fuji, Takeo Kawabata Colorimetric Recognition of Molecular Length in Water Based on Phenolphthalein Derivatives ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products 2006年7月24日 京都

⑯ 樫一典、谷間大輔、楠本友和、富士薫、川端猛夫 機能性フェノールフタレインの合成と水中における分子認識挙動 第1回ホスト・ゲスト化学シンポジウム 2006年5月29日 つくば

⑰ 樫一典、谷間大輔、楠本友和、川端猛夫、富士薫 機能性フェノールフタレインの合成と水中における分子認識挙動 第4回次世代を担う有機化学シンポジウム 2006年5月19日 大阪

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: フェノールフタレイン誘導体および生体内ポリアミン検出用検査薬

発明者: 樫一典、谷間大輔、川端猛夫

出願人: 国立大学法人京都大学

番号: 特願2006-289703

出願年月日: 2006年10月25日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樫一典 (TSUBAKI KAZUNORI)

京都府立大学 大学院生命環境科学研究科 教授