

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21550125

研究課題名（和文） 超分子型蛍光プローブの機能精密化と多糖検出系への展開

研究課題名（英文） Development of Sophisticated Supramolecular Fluorescent Probes An Its Application to Detection of Bio-Related Polysaccharides

研究代表者

鈴木 巖（SUZUKI IWAO）

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：30226493

研究成果の概要（和文）： 化学修飾シクロデキストリン誘導体を基盤とする蛍光性超分子による糖およびアルカリ金属イオン検出系についての検討を行い、いくつかの擬ロタキサン構造ならびにロタキサン構造を有する蛍光性超分子が、ガラクトースや、メチルガラクトシド、およびガラクトース残基を有する多糖、およびカリウムイオンの水中での検出に有用であることを見いだした。

研究成果の概要（英文）： Some fluorescent supramolecular probes based of pseudo-rotaxanes and rotaxanes involving chemically-modified cyclodextrins were found to be useful in detecting D-galactose, D-galactopyranoside, bio-related polysaccharides containing D-galactose residues, such as galactomannan, and a potassium cation in water.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野： 化学

科研費の分科・細目： 複合化学・機能物質化学

キーワード： 超分子化学・分子認識・ロタキサン・蛍光プローブ・糖・アルカリ金属イオン

## 1. 研究開始当初の背景

蛍光プローブによる水中における分子およびイオンの非破壊的検出は、細胞機能の視覚化などに結びつき、生命活動の起源を探る上で、必要欠くべからざる手法である。現在の蛍光プローブは、生体ホストである抗体を用いる免疫学的手法に依存しており、その安定性に問題があるほか、小分子化合物には本質的に不向きである。この点を打破するために、種々の合成蛍光プローブが開発されているが、対象となる分子・イオン種は限定され

ている。

合成蛍光プローブでは、発蛍光性残基と分子認識部位を同一分子の中に導入する必要があり、さらに、分子認識情報による蛍光シグナルの変化が求められるため、その分子設計は困難である。

そこで、本課題では、研究代表者が有用性を見いだしている擬ロタキサン型蛍光プローブの展開系として、人工系蛍光プローブの開発に、動的分子認識の概念を導入したポリロタキサン型およびロタキサン型の超分子蛍光プローブの開発と、その機能精密化を図る

こととした。

## 2. 研究の目的

本課題では、以下の4点についての検討を行うこととした。

(1) 擬ロタキサン型認識プローブの分子・イオン認識能の向上と対象ゲストの拡張

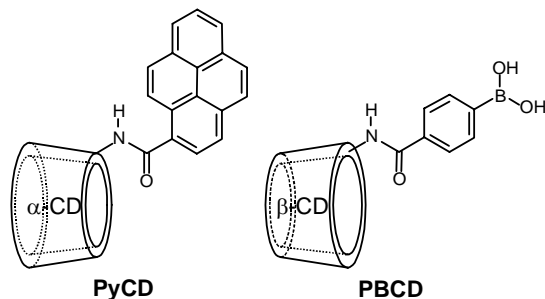
水中でグルコースに対する蛍光応答を示すフェニルボロン酸修飾シクロデキストリン(PBCD)とスチリルピリジニウム(SP)色素との擬ロタキサン蛍光プローブについて、は、SP色素の構造を改変することで、他の糖に対する応答を実現させる。

(2) 擬ロタキサンからロタキサンへの変換

水中で $K^+$ に対する蛍光応答を示すピレン修飾シクロデキストリン(PyCD)とアルキル化ベンゾクラウンエーテル(CR)との擬ロタキサンを、化学平衡に依存しないロタキサンへの変換を実現する。

(3) PBCD-SP 超分子系による多糖認識系の検討

グルコースやガラクトースに対する蛍光応答を示すPBCD-SP 擬ロタキサンについて、擬ロタキサンの「軸」にSP色素を複数導入することで、複数のPBCDによる多糖の協働認識について検討する。



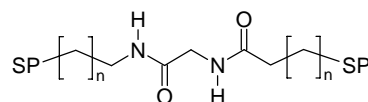
(4) フェロセン誘導体の超分子型電気化がプローブとしての能力の精査

本研究の遂行途上でフェロセン(Fc)誘導体の電気化学的応答が糖の新たな電気化学プローブおよび分光プローブとなることを見いだしたので、(1)~(3)と併せて検討することとした。

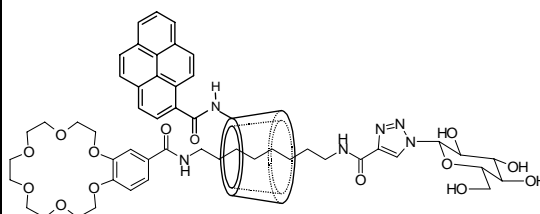
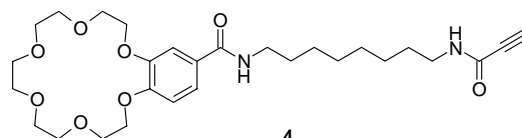
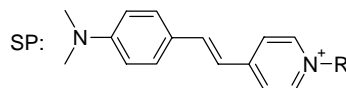
## 3. 研究の方法

(1) PBCDとの擬ロタキサンの「軸」となるSP色素のアルキル鎖部分に、新たに分子認識部位を導入した1~3を合成し、PBCD

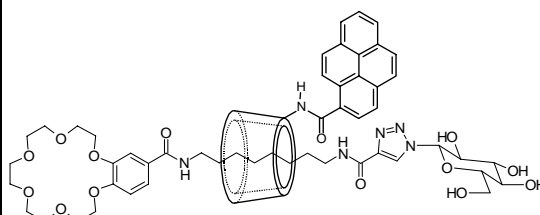
との擬ロタキサン形成と、単糖類、二糖類に対する蛍光応答を精査した。



1:  $n=1$   
2:  $n=2$   
3:  $n=3$



5 (Head-to-Head)

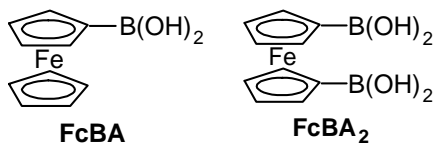


5 (Head-to-Tail)

(2) PyCDとCRによる擬ロタキサンについて、CRの末端にエチニル基を導入した4を合成し、PyCD-4擬ロタキサンに、ストッパーとなるアジド化グルコースを反応させ、ロタキサン5とした。このロタキサン5について、アルカリ金属イオン共存下における蛍光応答を確認した。

(3) PBCDと擬ロタキサンを形成するSP色素の4量体6を合成し、PBCDとの擬ロタキサンを形成させた状態で、単糖類、二糖類、および多糖類に対する蛍光応答を検討した。

(4) フェロセンボロン酸(FcBA)およびフェロセンジボロン酸(FcBA<sub>2</sub>)の酸化還元挙動を、単糖類および二糖類共存下で精査し、 $\beta$ -シクロデキストリン( $\beta$ -CD)、 $\gamma$ -シクロデキストリン( $\gamma$ -CD)、およびPBCDの効果を、サイクリックボルタンメトリーにて精査した。



#### 4. 研究成果

(1) PBCD との擬ロタキサン形成において「軸」かつ蛍光シグナルを与える部分となる SP 色素の二量体 1~3 は、グリシンメチルエステルから 4 段階で得られた。この  $1.5 \times 10^{-5}$  M 水溶液 (pH 7.4) に PBCD を加えたところ、SP 色素 (R はメチル基、ヘプチル基) の場合と同様に、蛍光極大の 20 nm の短波長シフトを伴う 590 nm 付近の蛍光強度の顕著な増大が観察された。蛍光強度変化および  $^1\text{H}$  NMR スペクトル変化の解析より、PBCD と 1~3 は 2 : 1 のモル比の擬ロタキサンを形成することを確認できた。その結合定数を Table 1 にまとめた。

Table 1 PBCD - SP 色素による擬ロタキサン形成過程の結合定数 (単位は  $\text{M}^{-1}$ )

	pH	$K_1$	$K_2$
PBCD - 1	5.4	1800	300
	7.4	5400	400
	9.4	10000	800
PBCD - 2	5.4	3000	800
	7.4	10000	3000
	9.4	22000	5000
PBCD - 3	5.4	4000	800
	7.4	15000	3000
	9.4	30000	6000

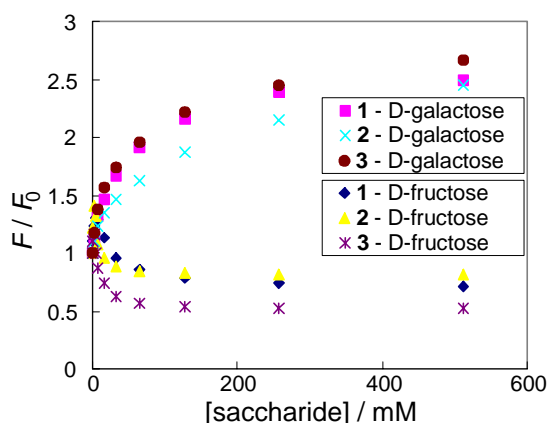


Fig. 1 擬ロタキサン (PBCD - 1, PBCD - 2, PBCD - 3,  $1.5 \times 10^{-5}$  M, pH 7.4 リン酸緩衝液中) の D-フルクトースおよび D-ガラクトースに対する蛍光応答

この結果より、擬ロタキサン形成時の「軸」となる 1~3 のアルキル基部分の長さが長いと、PBCD との擬ロタキサン形成が阻害される

傾向にあることがわかる。化合物 2, 3 の場合、 $K_1 / K_2$  は速度論的に予想される 1/4 に近い値になるが、1 の場合は  $K_1$  に比べ  $K_2$  が速度論的に予想される値よりも小さく、二つめの PBCD の挿入が一つめの PBCD により阻害されていることを示唆している。

この系に、単糖あるいは二糖を加えたところ、フルクトースでは蛍光強度の減少が観察されたのに対し、グルコースとガラクトースでは蛍光強度の増大が観察された。フルクトースとガラクトースに対する pH 7.4 における蛍光応答を Fig. 1 に示す。

この結果より、1~3 の違いは明確ではなく、 $K_1, K_2$  の違いは糖に対する蛍光応答には大きな影響を与えないことがわかった。しかしながら、 $K_1, K_2$  の値が小さく、糖に対する蛍光応答が小さいと予想された 1 でも、2 および 3 と同程度の糖に対する蛍光応答を示したことは、PBCD - 1 擬ロタキサンの形成が、糖、とくにガラクトース共存下で促進されている可能性を示唆しているともいえる。

また、フルクトースとガラクトースの違いを見てみると、フルクトースは低濃度においても複雑な蛍光の変化を与えることから、PBCD と強く相互作用していることがわかる。しかしながら、蛍光応答自体はガラクトースの方が大きく、SP 同士を単純なアルキル鎖で繋いだ軸との大きな違いは得られなかった。

(2) PyCD - CR 擬ロタキサンをロタキサンに変換する手法として、CR のアルキル基の末端にアミノ基もしくはカルボキシル基を導入し、水中でのアミド結合形成を触媒する DMT-MM による縮合反応、CR の末端にエチニル基を導入し、アジド化合物との縮合反応の 2 経路についての検討を行った。

の経路では、末端にカルボキシル基を導入したものよりも、アミノ基を導入したものの方が PyCD と安定な擬ロタキサンを形成することがわかった。しかしながら、PyCD との擬ロタキサンに、種々の嵩高いアミンを DMT-MM により縮合させる試みは、痕跡量のロタキサンを与えるのみであった (ESI 質量分析にて確認)。

の経路では、末端にエチニル基を導入した 4 が安定な擬ロタキサンを形成することを確認し、アジド化グルコースとのフィスゲン反応に付したところ、低収率 (~1%) ながらも、目的とするロタキサン 5 を得ることに成功した。

このロタキサン 5 は水中で PyCD のピレン残基由来の蛍光を 400 nm 付近に示した。蛍光量子収率は 0.2 であり、PyCD ( $3 \times 10^{-5}$  M) - CR ( $1 \times 10^{-4}$  M) 擬ロタキサンの見かけの蛍光量子収率 (0.2) とほぼ同じであった。ロタキサンでは、PyCD のピレン残基と CR のベンゾクラウン残基との間の光誘起電子

移動により、ほぼ完全な蛍光消光を期待したが、結果は異なっていた。その理由として、ロタキサン形成時に、PyCD のピレン残基と CR のベンゾクラウン残基の配向が揃わず、蛍光消光に効果的な Head-to-Head 型にならずに Head-to-Tail 型の配向を取るものが混在していたためと推察される。

ロタキサン 5 のアルカリ金属イオン共存下での蛍光応答を Fig. 2 に示す。

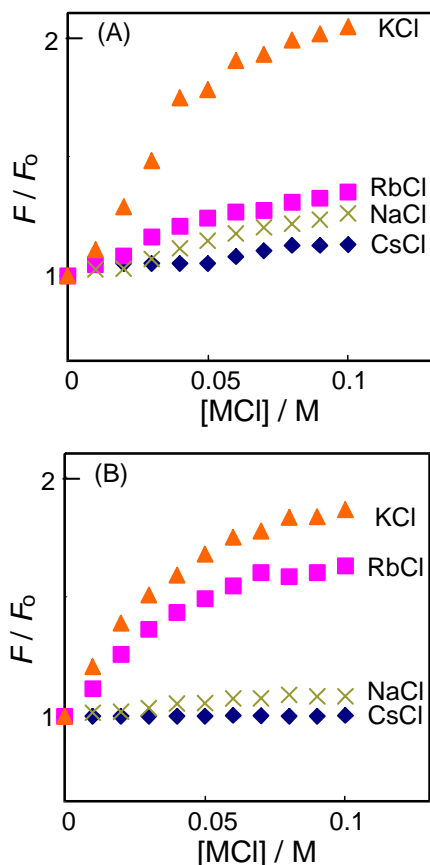


Fig. 2. PyCD - CR 擬ロタキサン (A),  $[PyCD] = 30 \text{ mM}$ ,  $[CR] = 0.1 \text{ mM}$ ) とロタキサン 5 のアルカリ金属塩共存下での蛍光応答。

PyCD - CR 擬ロタキサンの場合、 $K^+$  に対して大きな蛍光強度の増大が観察され、ついで  $Rb^+$ ,  $Na^+$  の順で蛍光増大が認められた。これに対し、ロタキサン 8 では期待通りに  $K^+$  に対する蛍光応答が観察されたが、 $Rb^+$  でも  $K^+$  の約 70 % の蛍光応答が得られた。しかし、 $Na^+$  については  $K^+$  の 10 % 以下の蛍光応答を示すのみであった。しかしながら、 $K^+$  に対する蛍光応答の大きさは、初期の期待とは逆に、PyCD - CR 擬ロタキサンの方が優れていた。その理由として、やはり Head-to-Tail 型のロタキサン 8 が含まれているものと考え、Head-to-Head 型ロタキサン 8 との逆相 HPLC による分離は、条件を種々検討したものの達成はできなかった。

(3) SP の 4 量体である 6 は Fig. 3 に示した経路により、合成した。精製は逆相カラムを装着した HPLC によって行った。

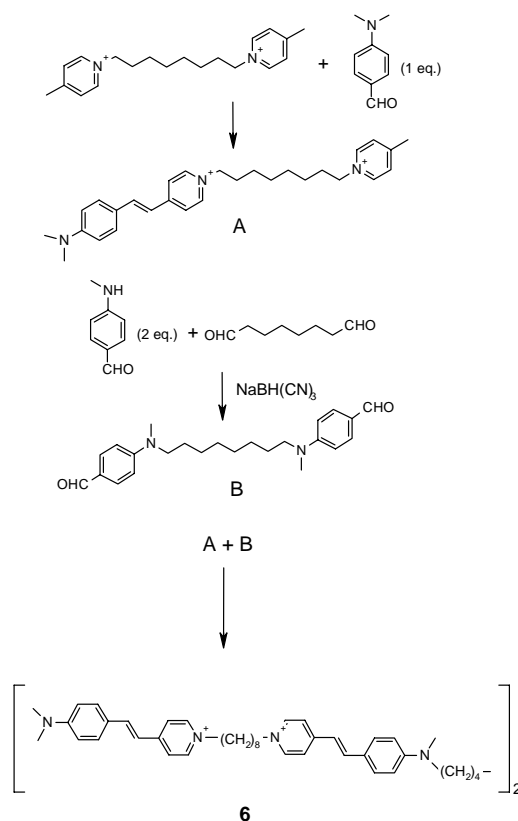


Fig. 3. SP 4 量体 6 の合成経路。

SP 4 量体 6 は、他の SP 誘導体と同様に、pH 7.4 の水溶液中で 590 nm 付近に弱い蛍光を示し、PBCD の添加により、蛍光極大の約 20 nm の短波長移動を示しながら、その蛍光強度は約 30 倍に増大した。よって、6 と PBCD は、水中で擬ロタキサン型の包接化合物を形成することが強く示唆された。さらに、6 の蛍光強度の PBCD 濃度依存性より、6 と PBCD は 1:1 以外のモル比で擬ロタキサンを形成することが明らかとなった。しかしながら、6 と PBCD 擬ロタキサン中の 6 と PBCD のモル比を確定させることはできなかった。

化合物 6 ( $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) と PBCD ( $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) を含む水溶液に、ガラクトース、フルクトース、およびイソマルツロース(パラチノース)を加えた場合の蛍光強度変化を Fig. 4(A)に、グリコーゲンおよびガラクトマンナンを加えた場合の蛍光強度変化を Fig. 4(B)に示す。単糖類および二糖類については、6 - PBCD 擬ロタキサンは、ガラクトースとイソマルツロースに対する高い応答を示し、多糖については、ガラクトマンナンに対して高い応答を示した。多糖に対して蛍光応答を示すポロン酸誘導体は希少であり、擬ロタキサンという超分子構造が、多糖の認識に有用であることが

示唆される結果である。

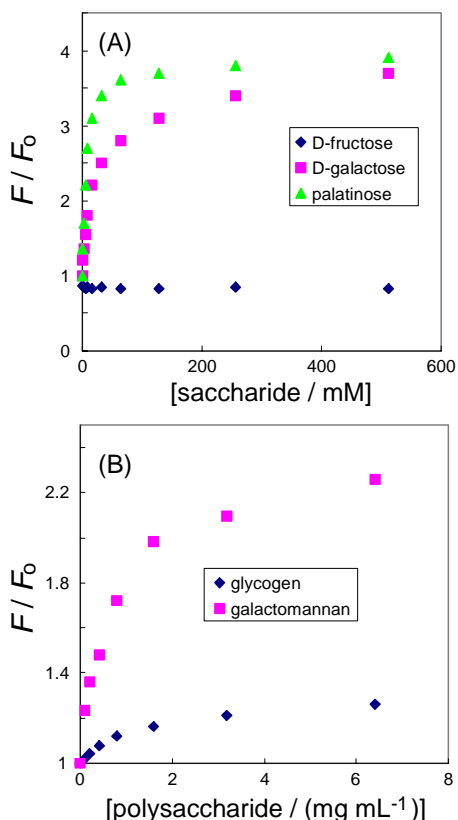


Fig. 4. SP 4 量体 6 (5  $\mu$ M) - PBCD (1 mM) 系 (pH 7.4) における蛍光強度の (A) 単糖類, 二糖類に対する応答, (B) 多糖類に対する応答.

(4) FcBA は pH 7.4 水溶液中で, 銀塩化銀電極に対して 0.26 V 付近に FcBA のフェロセン残基の一電子酸化に対応する可逆的な酸化還元ピークを示す. ここにフルクトースを加えると再還元波の約 0.2 V 負側へにシフトが観察された. これは糖が FcBA のボロン酸残基と環状エステルを形成することで, ホウ素原子上に負電荷が生じ, フェロセン残基の電荷密度を増大させるためと解釈できる. この再還元波ピークのシフト量, および再還元波ピーク電流値を指標とすることで, FcBA は電気化学的な糖検出プローブとしての機能を有することになる.

ここにフェロセンと親和性の高い  $\beta$ -CD および  $\gamma$ -CD を加えると, ピーク電流値の絶対値の減少を伴うものの, FcBA 単独の場合と同様の, 再還元波ピークのシフトが観察された. この CD - FcBA 超分子系の糖に対する応答を比較したところ, FcBA 単独ではフルクトースに対する応答が大きかったのに対し,  $\beta$ -CD - FcBA 超分子系では, フルクトースに対する選択性が低下し, 代わりにガラクトースに対する応答が大きくなった. また, FcBA に PBCD を添加した場合, ガラクトースに対する

応答がさらに大きくなった. 同様の結果は FcBA<sub>2</sub> でも観察されたが, 糖に対する選択性の差は FcBA の場合と大きな違いはなかった. 詳細は不明であるが, この結果は CD - FcBA 超分子系が糖, 特にガラクトースに対する応答に有用な材料となりうることを示唆するものである.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Kumai, Satoko Kozuka, Mariko Samizo, Takeshi Hashimoto, Iwao Suzuki, and Takashi Hayashita, *Anal. Sci.*, 査読有, **2012**, *28*, 121 - 126.

[学会発表] (計 2 件)

大嶋尚子, 鈴木巖. フェニルボロン酸修飾シクロデキストリン - スチリルピリジニウム色素超分子系によるグリコシド糖の蛍光応答. 日本薬学会第 131 年会 (静岡, 2011 年).

中原和秀, 今長谷陽菜. 鈴木巖. ピレン修飾シクロデキストリン - ベンゾクラウンエーテル超分子系のアルカリ金属イオンに対する水中蛍光応答. 日本薬学会第 131 年会 (静岡, 2011 年)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 巖 (SUZUKI IWAO)

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号: 30226493

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし