

## 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 25 日現在

機関番号： 37111  
 研究種目： 基盤研究(C)  
 研究期間： 2009～2011  
 課題番号： 21550136  
 研究課題名（和文） クラスタ効果に基づくシクロファン多量体の合成および標的ゲストの捕捉と検出  
 研究課題名（英文） Synthesis of Cyclophane Oligomers Having Multivalently Enhanced Guest-Binding Affinity Based on Cluster Effect

研究代表者  
 林田 修 (HAYASHIDA OSAMU)  
 福岡大学・理学部・教授  
 研究者番号： 20231532

研究成果の概要（和文）： 鎖状のシクロファン2～5量体をシクロファンの活性エステル体とリジンやリジンペプチドとのアミノリシスにより高収率で得ることに成功した。合成したシクロファン多量体のゲスト捕捉能を蛍光滴定実験と表面プラズモン共鳴法から検討したところ、シクロファンの個数が増すにつれてゲスト捕捉力が飛躍的に向上するクラスタ効果を発現した。シクロファンの個数とゲスト捕捉力の相関関係を明らかにすることに成功した。

研究成果の概要（英文）： Water-soluble cyclophane dimer, trimer, tetramer, and pentamer were prepared by aminolysis of succinimidyl ester derivative of tetraaza[6.1.6.1]paracyclophane with lysine and the corresponding lysine peptide as a scaffold, followed by removal of the protecting groups. The present cyclophane oligomers showed enhanced guest-binding affinities toward fluorescent guests such as 6-*p*-toluidino-naphthalene-2-sulfonate, in comparison with those of monocyclic cyclophane, reflecting multivalency effects in macrocycles. The effects of multivalent macrocycles on the guest-binding of the present cyclophane oligomers were also confirmed by SPR measurements.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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： ホストゲスト化学、シクロファン、クラスタ効果

## 1. 研究開始当初の背景

大環状シクロファンは、その分子内疎水性空洞の大きさや形状を自由に分子設計できる人工ホストである。とりわけ、親水性側鎖を導入した水溶性シクロファンは、その疎水性空洞の大きさや形状に適した疎水性ゲストを選択的に取り込むことが知られている。

しかし、単純な水溶性シクロファンがゲストに示す結合力は概して弱く不十分であることが多かった。そのため生理活性物質などの極微量物質を標的ゲストとして捕捉し検出するためには、飛躍的な結合力の向上が望まれる。一方、天然の細胞膜レセプターにおいては、レセプター単独のリガンドに対する結

合力は弱いものの、数多く寄り集まることで結合力が飛躍的に増大する所謂“クラスター効果”が知られている。すなわち、例えば2個のレセプターが集まれば、リガンドに対する結合力は2倍ではなくそれ以上に飛躍的に増大する。この天然のクラスター効果を参考にして、これまでに研究代表者は5個のシクロファンを連結したシクロファン5量体を合成することに成功している。しかし、このシクロファン5量体の合成は、6段階、総収率3%であり、非効率的であることが課題であった。人工ホストを大量合成して機能開発するためにも、高収率な合成経路の構築が急務であった。また、クラスター効果の発現においてシクロファン（結合部位）の個数の影響に関しては依然として未解明である。そこで、複数個のシクロファンを連結したシクロファン多量体を系統的に合成し、それらのゲスト捕捉能を比較検討することで最適な人工ホストを得ることに興味もたれる。

## 2. 研究の目的

標的ゲスト分子に強く結合できる人工ホストを開発することが目標である。そのため、生体系でしばしば認められるクラスター効果の概念を人工ホストの分子設計に組み込むことにした。すなわち、ゲスト結合部位であるシクロファンを鎖状に連結したシクロファン多量体の効率的な合成法の確立を目指した。従来の合成法に替えて、ペプチド化学で用いられる Fmoc 合成法および活性エステル (SE) 合成法を採用することにより格段に合成の効率を高めることとした。さらに、これらシクロファン多量体のゲスト捕捉能を定量的に比較検討し、人工ホストとしての最適化を行うことを研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

シクロファン多量体の高効率な合成法を確立し、ゲスト捕捉能を比較するために、以下の項目について検討を行なった。

### (1) Fmoc 合成法によるシクロファン2量体の合成とゲスト捕捉

Fmoc リジン部位を有するシクロファンを鍵中間体としてシクロファン2量体を合成し、ゲストに対する捕捉能を蛍光分析法や表面プラズモン共鳴 (SPR) 法から検討した。

### (2) SE 合成法によるシクロファン多量体の合成とゲスト捕捉

活性エステル基を有するシクロファンを鍵中間体として、リジンおよびリジンペプチドと一段階で反応させてシクロファン2~5量体を合成し、ゲストに対する捕捉能を蛍光分析法

や SPR 法から検討した。

## 4. 研究成果

### (1) Fmoc 合成法によるシクロファン2量体の合成とゲスト捕捉

シクロファン部位を側鎖に導入した Fmoc-リジン誘導体を合成し、これをアミノ酸単位とする Fmoc 合成法によりシクロファン2量体を高収率で合成した (図1)。シクロファン単量体も合成した。

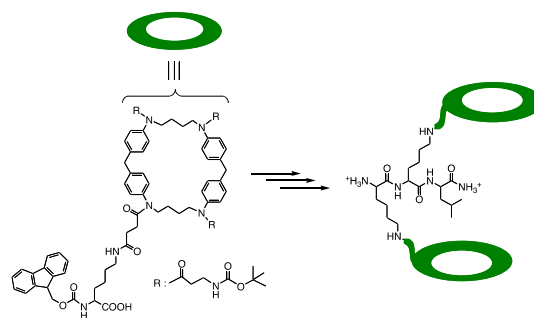


図1. Fmoc 合成法によるシクロファン2量体の合成

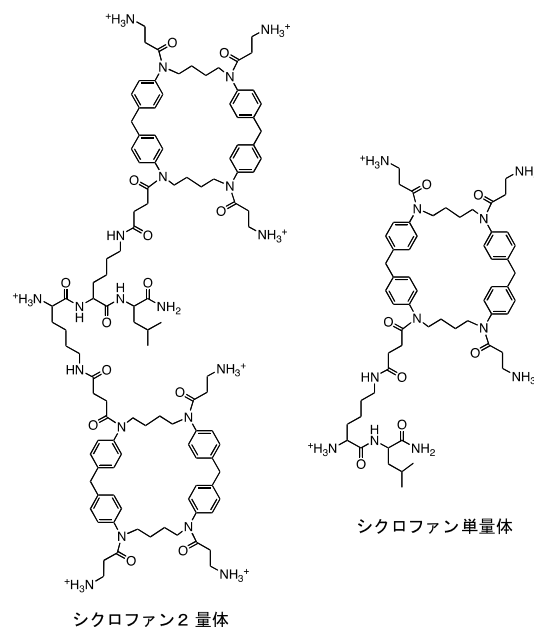


図2. シクロファン2量体とシクロファン単量体

シクロファン2量体の蛍光性ゲストに対する結合能を蛍光滴定実験から評価したところ、シクロファン単量体に比べて約15倍の結合定数の増大が認められた。同様なゲストに対する捕捉能の増大は SPR 法からも確認した。すなわち、ゲストとしてのピレン誘導体などをセンサーチップ表面に共有結合で固定化し、ホストとの結合ならびに解離に

伴う SPR シグナルの応答を追跡した結果、シクロファン 2 量体のこれらゲストに対する結合定数はシクロファン単量体に比べて約 14 倍に増大することが明らかとなった。Fmoc-ペプチド合成法を用いた新規合成スキームを用いると、さらにシクロファンの個数を増やしたシクロファン多量体の合成も可能であると期待される。

### (2) SE 合成法によるシクロファン多量体の合成とゲスト捕捉

鎖状型シクロファン多量体の合成においてはシクロファンの活性エステル体を鍵化合物として用いることで高効率な合成を達成した。すなわち、リジンやオリゴリジンペプチドの  $\alpha$  および  $\epsilon$  アミノ基に対する鍵化

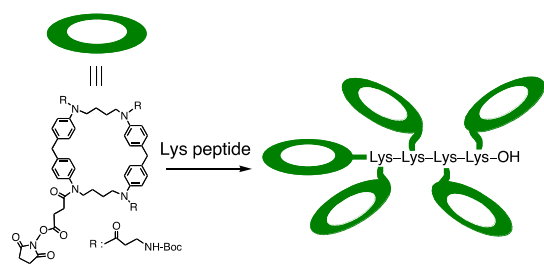


図 3. SE 合成法によるシクロファン多量体の合成

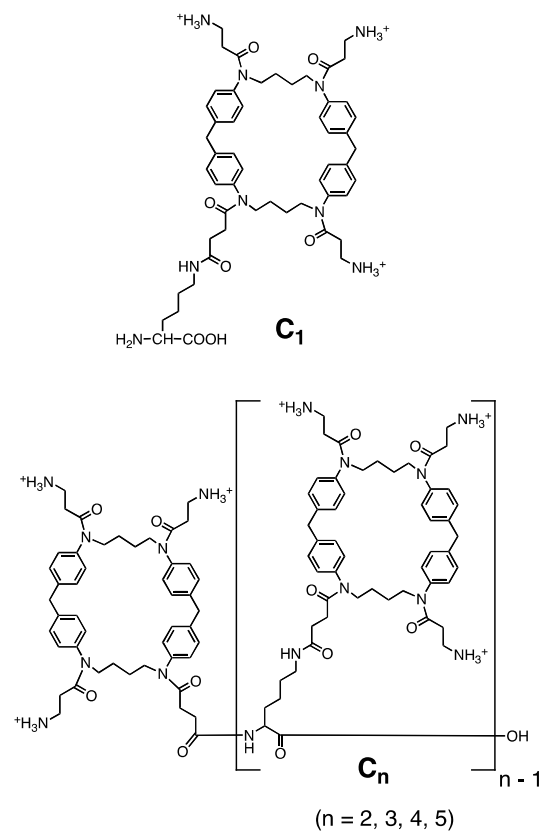


図 4. シクロファン多量体 ( $C_1$ ) とシクロファン単量体 ( $C_2, C_3, C_4, C_5$ )

物のアミノリシスにより目的とするシクロファン 2 量体 ( $C_2$ )、3 量体 ( $C_3$ )、4 量体 ( $C_4$ )、5 量体 ( $C_5$ ) を高収率で得ることに成功した (図 3、4)。シクロファン単量体 ( $C_1$ ) も合成した。これら新規化合物の同定は NMR, IR, MS および元素分析などで行なった。これら鎖状シクロファン多量体の CPK 分子モデルをもちいた検討から、シクロファン部位どうしはリジン残基を挟んで互いに離れていることからゲスト捕捉部位として機能することが期待される (図 5)。

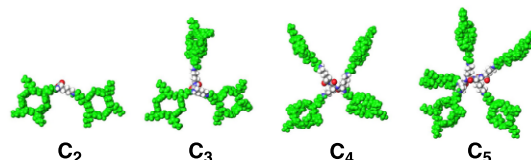


図 5. シクロファン多量体の CPK 分子モデル

これら鎖状シクロファン多量体のゲスト捕捉能に関しては、蛍光性プローブ TNS および 2,6-ANS を用いた蛍光滴定実験から検討した (図 6)。TNS の HEPES 緩衝溶液にシクロファン多量体を添加していくといずれも TNS 由来の蛍光強度が増大していき、ホストゲスト複合体の形成が示された。滴定にともなう蛍光強度の変化から、ホスト:ゲスト (1:1) 結合定数 ( $K$ ) を Benesi-Hildebrand 法から算出した。鎖状シクロファン多量体において、個数の異なるシクロファン多量体の TNS に示す  $K$  を定量的に評価した (表 1)。一例をあげると、鎖状型シクロファン 5 多量体のゲスト TNS に対する  $K$  はシクロファン単量体のそれと比べて 92 倍に増大することがわかった。蛍光性プローブ 2,6-ANS に対してもほぼ同等のゲスト捕捉力における増大が認められた。

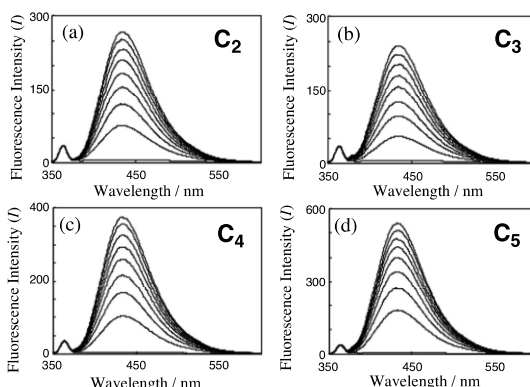


図 6. シクロファン多量体  $C_n$  ( $n=2, 3, 4, 5$ ) の添加に伴う TNS の蛍光スペクトルの変化。 [ $C_2$ ] = 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, and 20  $\mu\text{M}$ . [ $C_n$  ( $n=3,4,5$ )] = 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, and 4.0  $\mu\text{M}$ .

表 1. シクロファン多量体と蛍光性ゲストとのホストゲスト複合体生成定数<sup>a</sup> ( $K, M^{-1}$ )

Host	$K, M^{-1}$		$K / K(C_1)$	
	TNS	2,6-ANS	TNS	2,6-ANS
C <sub>5</sub>	$4.8 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	92	49
C <sub>4</sub>	$2.7 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	52	37
C <sub>3</sub>	$1.7 \times 10^5$	$6.7 \times 10^4$	33	13
C <sub>2</sub>	$5.4 \times 10^4$	$3.0 \times 10^4$	10	6
C <sub>1</sub>	$5.2 \times 10^3$	$5.1 \times 10^3$		

<sup>a</sup>Excitation: 322 nm (TNS); 318 nm (2,6-ANS).

シクロファンの個数とゲスト捕捉力の間には一定の相関関係があることを示すことにも成功した (図 7)。この相関関係を検量線として用いれば、さらにシクロファンの個数を増やしたシクロファン多量体のゲストに対する結合力を予測することが可能である。また、蛍光実験から捕捉されたゲストの分子運動性の評価も行い、これらシクロファン多量体はゲストと強く結合することもわかった。

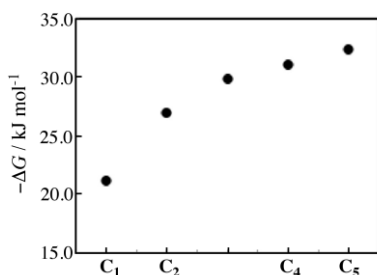


図 7. シクロファン多量体と TNS からなる複合体形成にともなう自由エネルギー変化 ( $\Delta G$ ) とシクロファンの個数の関係

ゲストに対する捕捉能の増大は SPR 法からも評価した。すなわち、1-アミノメチルピレンを共有結合で固定化したセンサーチップ表に対してホスト注入に伴う SPR センサーグラムを図 8 に示す。

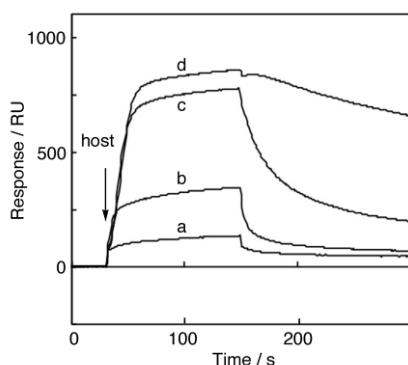


図 8. シクロファン多量体の注入にともなう SPR センサーグラム変化. C2 (a, 5.0  $\mu$ M), C3 (b, 3.3  $\mu$ M), C4 (c, 2.5  $\mu$ M), and C5 (d, 2.0  $\mu$ M).

得られた SPR センサーグラムから、結合と解離の速度定数 ( $k_a, k_d$ ) および結合定数 ( $K_a$ ) を算出し、表 2 にまとめた。シクロファンの個数が増すにつれてゲスト捕捉に対する  $k_a$  の上昇と  $k_d$  の減少が確認された。蛍光滴定実験と同様に  $K$  は飛躍的に増大し、クラスター効果の発現に成功した。このように  $K$  が飛躍的に増大したことはゲスト結合部位 (シクロファン) の局所濃度が高いためであると考えている。

表 2. 固定化されたピレン誘導体とシクロファン多量体からなるホストゲスト複合体の結合定数 ( $K_a, M^{-1}$ ) と結合と解離の速度定数 ( $k_a / M^{-1} s^{-1}$ ;  $k_d / s^{-1}$ )

Host	$k_a, M^{-1} s^{-1}$ ( $k'_a, M^{-1} s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$k_d, s^{-1}$ ( $k'_d, s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$K_a, M^{-1}$ ( $K', M^{-1}$ ) <sup>a</sup>
C <sub>5</sub>	$2.9 \times 10^4$ ( $5.8 \times 10^3$ )	$3.2 \times 10^{-3}$ ( $6.4 \times 10^{-4}$ )	$9.1 \times 10^6$ ( $1.8 \times 10^6$ )
C <sub>4</sub>	$2.0 \times 10^4$ ( $5.0 \times 10^3$ )	$3.6 \times 10^{-3}$ ( $9.0 \times 10^{-4}$ )	$5.6 \times 10^6$ ( $1.4 \times 10^6$ )
C <sub>3</sub>	$1.2 \times 10^4$ ( $4.0 \times 10^3$ )	$4.2 \times 10^{-3}$ ( $1.4 \times 10^{-3}$ )	$3.0 \times 10^6$ ( $1.0 \times 10^6$ )
C <sub>2</sub>	$8.1 \times 10^3$ ( $4.1 \times 10^3$ )	$9.6 \times 10^{-3}$ ( $4.8 \times 10^{-3}$ )	$8.4 \times 10^5$ ( $4.2 \times 10^5$ )

<sup>a</sup> ゲスト結合部位で除した  $K_a, k_a, k_d$  を括弧内に示した

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Osamu Hayashida, Tomomi Nakashima, Synthesis of peptide-based cyclophane oligomers having multivalently enhanced guest-binding affinity, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 査読有, 印刷中, 10.1246/bcsj.20120076.
- ② Osamu Hayashida, Tomomi Nakashima, Synthesis of cyclophane dimer using cyclophane-tethered Fmoc-amino acid derivatives as a multivalent host, *Chemistry Letters*, 査読有, 40, 2011, 134-135.
- ③ Osamu Hayashida, Daisuke Sato, Surface plasmon resonance study on binding interactions of multivalent cyclophane hosts with immobilized guests, *Polym. Adv. Technol.* 査読有, 21, 2010, 96-99.
- ④ Osamu Hayashida, Chika Eguchi, Keiichiro Kimura, Yu Oyama, Tomomi Nakashima, Kosei Shioji, Guest-binding, cellular uptake, and molecular delivery of water-soluble cyclophanes having a pyrene moiety, *Chemistry Letters*, 査読有, 39, 2010, 1321-1322.

[学会発表] (計 38 件)

- ① 中島智美, 中村勇氣, 林田 修, ペプチドを基本骨格としたシクロファン多量体の合成とゲスト捕捉能の比較評価、日本化学会第 92 春季年会、(2012 年 3 月 25 日-28

日、横浜市)

- ② 中島智美、中村勇氣、林田 修、ペプチドを基本骨格としたシクロファンオリゴマーの合成とゲストとの結合親和性評価、第5回バイオ関連化学シンポジウム、(2011年9月12日-14日、つくば市)
- ③ Osamu Hayahsida, Syntheses and guest-binding behaviors of peptide-based cyclophane oligomers, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, (2010年12月17日、ホノルル、アメリカ)
- ④ 中島智美、中村勇氣、林田 修、ペプチドを基盤とするシクロファン多量体の合成とゲスト取り込みにおけるクラスター効果、第4回バイオ関連化学シンポジウム、(2010年9月24日-26日、大阪市)
- ⑤ Tomomi Nakashima, Osamu Hayashida, Preparation and multivalently enhanced guest-binding affinity of peptide-based cyclophane oligomers, Fukuoka Univ. – Ulsan Univ. Joint Seminar (2010年8月25日-27日、ウルサン、韓国)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林田 修 (HAYASHIDA OSAMU)

福岡大学・理学部・教授

研究者番号：20231532

### (2) 研究分担者

安東 勢津子 (ANDO SETSUKO)

福岡大学・理学部・講師

研究者番号：20078562

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：