

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560867

研究課題名(和文)再生可能資源からなる新規環状配位錯体

研究課題名(英文)Cyclic coordinate complexes composed of renewable sources

研究代表者

亀山 眞由美(OHNISHI-KAMEYAMA, Mayumi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品分析研究領域・研究領域長

研究者番号：80353994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：環状構造を有するマンニトール、ホウ素、ユウロピウムからなる配位錯体を作製し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーで分離した。精製した配位錯体は平衡化により溶液中では構成要素と共に存在することが明らかになった。¹³C NMRの結果から、環状配位錯体は、3分子のホウ酸がマンニトールの3, 4位の水酸基及び別のマンニトールの1, 2位の水酸基とエステル結合で架橋したりサイクルマークのようなかたちで、その中央外側(1, 3位側)に1個のランタノイドイオンが存在する対称性の高い構造であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：A cyclic coordinate complex was formed in the aqueous solution of mannitol, boric acid and europium chloride. The self-organized product existed in equilibrium and was difficult to be isolated. The cyclic coordinate complex with building blocks was applied to structural analyses of MS and NMR. The cyclic trisspiroboroester structure was confirmed to be like a recycle mark encircling a lanthanoid ion with a symmetry axis C₃.

研究分野：生物有機科学

キーワード：環状配位錯体

1. 研究開始当初の背景

(1) ホウ素 (B) は植物の必須微量元素で、植物体内ではペクチン多糖であるラムノガラクトuronan II (RG-II) と架橋構造を形成することにより細胞壁の構造安定化に寄与している¹⁾⁻³⁾。RG-II とホウ酸の複合体 dRG-II2-B は試験管内でも容易に生成する。このとき、Ca²⁺や Sr²⁺、Ba²⁺、Eu³⁺などの金属陽イオンの存在により、複合体の生成速度が増大すると同時に、生じた複合体も安定化する。複合体生成における陽イオンの役割や存在形態を明らかにすることを目的とした研究過程で、植物細胞壁のモデル化合物として用いたマンニトール-B-Eu 混合溶液中に、環状構造を有する配位錯体 [(Man-B)₃-Eu] が自発的に生成することを見いだした⁴⁾。

(2) ホウ素はガラスや半導体、有機合成試薬として工業的に利用されている他、医薬領域においても、中性子捕捉能を利用した腫瘍細胞に対する放射線療法の薬剤開発の原料とされている⁵⁾⁻⁷⁾。現在腫瘍の治験に使用されているホウ素化合物は、*p*-ボロノフェニルアラニン(図1a)とホウ素クラスター-BSH(図1b)で、選択的に標的細胞に集積する。ホウ素以外にも、Euの属するランタノイドは、安定な元素の中で最も大きな熱中性子捕捉断面積を有するため、重金属毒性はあるものの、キレート剤との複合体化や脂肪乳剤とのリポソーム形成、DNAとの複合体化等によりランタノイドイオンの遊離抑制を図り重金属毒性を低減するなど、治験への適用の試みが続けられている⁸⁾⁻¹⁰⁾。腫瘍治療は大きな苦痛を伴うため、患者負担の比較的少ない中性子捕捉療法の今後の拡大が期待される。その際、水溶性と腫瘍細胞選択性が高く、人体に対する毒性の低い、安価に製造できる中性子捕捉療法のための薬剤が必須になると予想される。

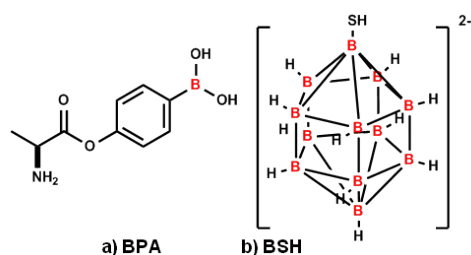


図1 ホウ素化合物の化学構造

2. 研究の目的

- (1) 環状構造を有する配位錯体 [(Man-B)₃-Eu] の化学構造を明らかにする。
- (2) 化学構造の非対称化による蛍光強度の増大を図り、産業利用に資するものとする。

3. 研究の方法

(1) 配位錯体の精製

試料調製

マンニトール、ホウ酸、塩化ユウロピウムの

0.1 mol/L 水溶液を作成し、3:3:1 の容量比で混和後、液性をアンモニア水または水酸化ナトリウム水溶液で中性に調整して配位錯体を生成させた。ユウロピウム以外のランタノイドや、マンニトールの代わりにマンニトールの異性体であるD-イジトール、炭素鎖が1つ短いキシリトール、2つ短いD-トレイトールおよび五炭糖のD-アラビノースの場合も同様に調製した。

精製

調製後7日以上経過した試料溶液を用い、低分子用ゲル濾過カラム (YMC-Pack Diol-60, 5 μm, 4.6 x 300 mm もしくは YMC-Pack Diol-120, 5 μm, 8.0 x 300 mm、YMC 製) で milliQ 水を溶媒とし、0.3 もしくは 0.8 mL/min の流速で資生堂製 HPLC (SI-2) により分離を行った。検出には紫外検出器もしくは、蛍光検出器、蒸発光散乱検出器、エアロゾルベース検出器を用いた。

(2) 構造解析

質量分析 (MS)

エレクトロスプレーイオン化 (ESI) マスペクトルは、Apex II 70e (Bruker Daltonics) もしくは LCQ (Thermo Fisher Scientific) で記録した。

核磁気共鳴分光 (NMR)

Bruker Avance 800 により重水を溶媒として 303 K で測定した。

4. 研究成果

(1) 配位錯体の分離

低分子分画が可能なゲル濾過カラムクロマトグラフィにより、配位錯体を分離した(図2)。ゲル濾過カラム以外に、充填剤の細孔径の大きい(30 nm)C8 カラムも使用したが、逆相系充填剤では配位錯体とその構成成分を

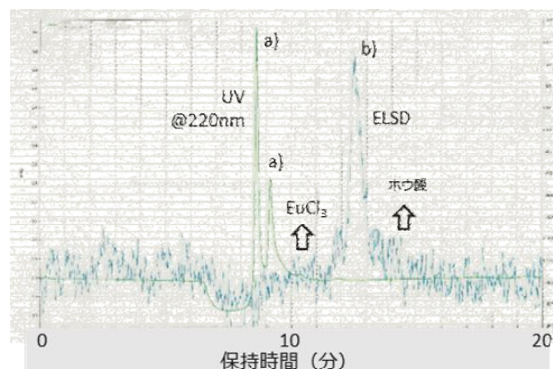


図2 ゲル濾過カラムによる配位錯体溶液のクロマトグラム

a) 配位錯体、b) マンニトール

分離できなかった。また、分離時の温度を4から60まで変えて観測したが、60で最もよい分離が得られた。溶離液としては、0.2M NaCl 含有0.1M リン酸緩衝液及び酢酸アンモニウム緩衝液も使用した。リン酸緩衝液で最もよい分離が得られたが、試料濃縮時の塩の析出や濃縮液の再クロマトグラフィ時の保持時間の変動、検出器の汚染を考慮し、最終

的にはこれらに対して影響がない、milliQ を用いて精製実験を行うこととした。ゲル濾過クロマトグラフィにおいて、配位錯体に相当するピーク a の分取は、220 nm の吸収を指標にした。集めたピーク a を凍結乾燥し、一部を溶解して再度クロマトグラフィに供したところ、マンニトールが配位錯体と同程度存在する、分離前と同様のプロファイルが得られた。また、濃縮前に分取画分を再度クロマトグラフィにかけても分離前と同様のプロファイルが得られた。このことから、配位錯体は水溶液中で平衡状態で存在し、分画後すぐに一定の割合で構成成分に分解すると考えられた。

(2) 構造解析

X線結晶構造解析

6ヶ月以上低温下(4℃)で保管した試料溶液中に生成した結晶について、X線結晶構造解析を試みた。その結果、結晶は一辺 2.79 nm の立方体で Eu のみからなることが判明し、配位錯体に相当する結晶は得られなかった。このように、配位錯体の精製が困難であったため、混合物として構造解析を行うこととした。

ESI-MS

環状配位錯体 $[(\text{Man-B})_3\text{-Eu}]$ (図 3a) を構成する糖アルコールの種類を、イジトール (図 3b) やキシリトール (図 3c) 等、マンニトールと水酸基の向きや分子の長さの異なる糖アルコールもしくは糖に代えて複合体形成の可否を検討した。マンニトールの構造異性

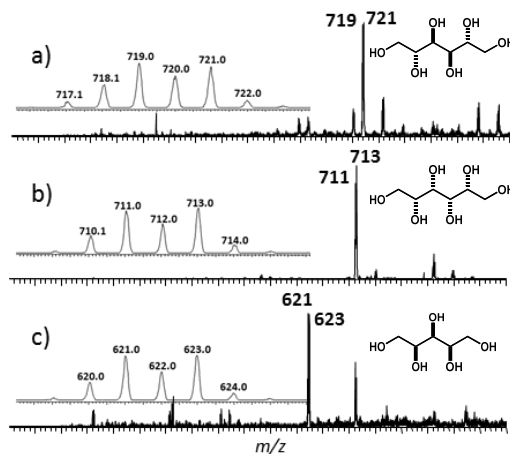


図3 糖アルコール種の異なる糖アルコール、ホウ素、ユウロピウム混合試料溶液のESIMSスペクトルと $[\text{M}+\text{H}]^+$ 近傍の拡大図

a) マンニトール、b) イジトール、c) キシリトールを糖アルコールとして使用

体であるイジトールを用いた場合、ユウロピウム 1 モルに対し、糖アルコール 3 モル、ホウ酸 2 モルからなるイオン (図 4 右) が観測された。マンニトールよりも炭素鎖が一つ短いキシリトールを用いた場合も、イジトールの場合と同様に、ユウロピウム 1 モルに対し、糖アルコール 3 モル、ホウ酸 2 モルからなるイオン (図 4 右) が観測された。炭素数 4 の

トレイトールについては生成物を観測できなかった。一方、アラビノースを用いた場合は、マンニトールと同様に、ユウロピウム 1 モルに対し、糖アルコール 3 モル、ホウ酸 3 モルからなるイオン (図 4 左) が観測された。これらのことから、マンニトールおよびアラビノースを構成要素として用いた場合は、図 4 左のような環状構造のイオンが生成するのに対し、マンニトールとは水酸基の向きが異なるものや糖の炭素数が少ないものでは、図 4 右のように、環化しないと考えられた。

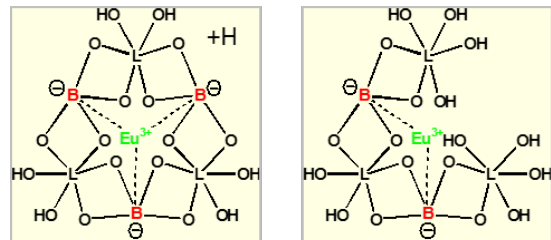


図4 ESIMSスペクトルで観測されたイオンの模式図

左) L=マンニトールもしくはアラビノース
右) L=イジトールもしくはキシリトール

NMR

^{13}C NMR の解析についても試料溶液から環状

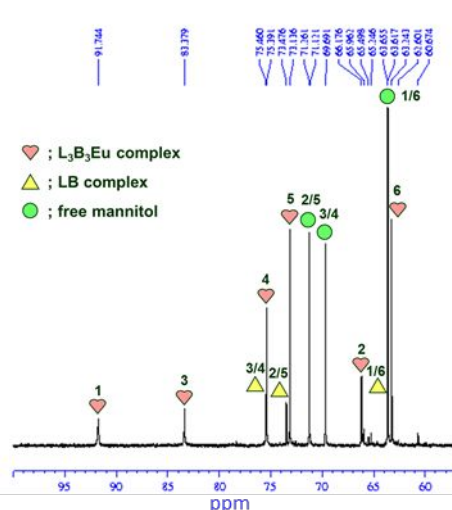


図5 $[(\text{Man-B})_3\text{-Eu}]$ の ^{13}C NMR スペクトル

配位錯体を単離することなく、混合物のまま構造解析を進めた。図 5 では、マンニトールの場合に観測されるシグナルを (黄色)、ホウ酸とマンニトールの混合物 (LB) 由来のシグナルを (緑色)、それ以外の配位錯体由来と考えられるシグナルをハート型 (ピンク) で示した。

この結果から、配位錯体を構成するマンニトール 3 分子は等価であるが、一つのマンニトールに含まれる 6 個の炭素原子はそれぞれ異なる環境に存在することが確認できた。また、ユウロピウムを含まないホウ酸エステル (LB) が、マンニトールの 3, 4 位でホウ酸とエステル結合して対称構造をとっているのに対し、 $[(\text{Man-B})_3\text{-Eu}]$ では、マンニトールの 1, 3 位に帰属される炭素原子のケミカルシ

フトが大きく移動していた。このことから、マンニトールの1,3位は配位錯体中でEuの近傍に存在することが示唆された。さらに、MS解析結果から、マンニトールの6個の水酸基の内、4つが2分子のホウ酸とエステル結合

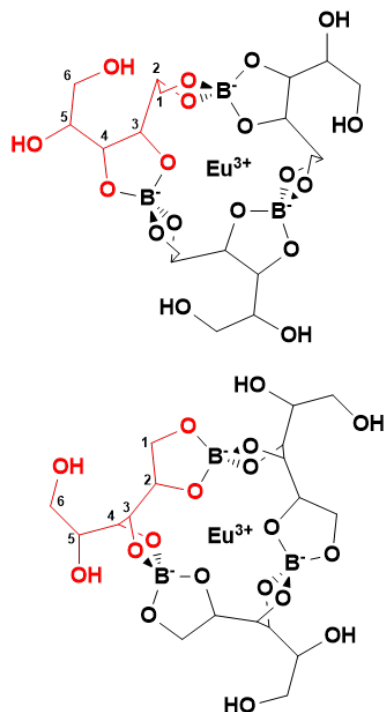


図6 [(Man-B)₃-Eu]の化学構造

合をしていることが判明しており、イジトールやキシリトールが環状配位錯体を形成しないことも考え合わせると、配位錯体は図6に示すような構造をとっていると考えられた。すなわち、1分子のホウ酸が1分子のマンニトールの3,4位の水酸基、もう1分子のマンニトールの1,2位の水酸基とエステル結合し、合計3個のホウ酸で架橋された環状構造を形成し、その中央外側(1,3位側)に1個のランタノイドイオンが存在するC₃軸を有する構造である。マンニトールやアラビノースのように、ホウ酸とエステル結合する、隣り合う水酸基が *threo* の位置にある場合、まず、*threo* 型(マンニトールでは3,4位)の水酸基がホウ酸とエステル結合し、ランタノイドイオンのまわりに寄り集まり、次いで残りの *threo* 型(マンニトールでは1,2(5,6)位)の水酸基が近傍のマンニトール-ホウ酸エステルと結合し、適当な大きさになると閉環するという過程を経て生成すると推定された。

<引用文献>

- Ishii T et. al. (1996) Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. Carbohydr Res. 284:1-9.
Ishii T et. al. (2001) Formation of rhamnogalacturonan II-borate dimer in

pectin determines cell wall thickness of pumpkin tissue. Plant Physiol 126:1698-1705.

Kaneko S et. al. (1997) A boron-rhamnogalacturonan-II complex from bamboo shoot cell walls. Phytochemistry 44:243-248.

亀山真由美ら (2002), ホウ酸-マンニトール-ランタノイド複合体のESI-MSによる構造解析. 第50回質量分析総合討論会要旨集. P. 302-303.

Mier W et. al. (2004), Conjugation of the closo-borane mercapto undecahydrododecaborate (BSH) to a tumour selective peptide. Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie 630(8-9): 1258-1262.

Jong-Dae Lee et. al. (2007) Synthesis of boron cluster lipids: closo-dodecaborate as an alternative hydrophilic function of boronated liposomes for neutron capture therapy. Org. Lett. 9 (2):323 -326.

Feakes D A, et. al. (1999) Synthesis and in vivo murine evaluation of Na₄[1-(1-B10H9)-6-SHB10H8] as a potential agent for boron neutron capture therapy. PNAS 96(11): 6406-6410.

Watanabe T et. al. (2002), Tumor accumulation of gadolinium in lipid-nanoparticles intravenously injected for neutron-capture therapy of cancer. Eur. J. Pharm. Biopharm. 54(2): 119-124.

Le U. M. et. al. (2006) Long-circulating gadolinium-encapsulated liposomes for potential application in tumor neutron capture therapy. Int. J. Pharm. 312 (1):105-112.

Paunesku T et. al. (2008) Gadolinium-conjugated TiO₂-DNA oligonucleotide nanoconjugates show prolonged intracellular retention period and T1-weighted contrast enhancement in magnetic resonance images. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 4(3):201-207.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0件)
[学会発表](計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

亀山真由美 (OHNISHI-KAMEYAMA, Mayumi)
独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所食品分析研究領域・研究領域長
研究者番号: 80353994