

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550166

研究課題名(和文) ゲストの捕捉および放出を制御できる刺激応答性シクロファン型ホスト多量体の開発

研究課題名(英文) Synthesis of stimuli-responsive cyclophane oligomers for controlled catch and release of guest molecules

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ゲストを強く捕捉するために複数個のシクロファンを集積したホストを分子設計した。クリック反応を利用してシクロファン5量体などのホストを合成した。これらシクロファン多量体は単量体と比較してゲスト捕捉能が飛躍的に向上することがわかった。さらに、外部刺激に応じてゲストに対する捕捉能が制御できる新規ホストとして、分子骨格内にジスルフィド結合を有するアニオン性ホストも開発した。このアニオン性ホストは抗がん剤(ダウノルビシンなど)などをゲストとして取り込むことができること、さらに還元剤の添加によりシクロファン骨格が解裂しゲストを放出できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In order to enhance guest-binding affinities, water-soluble cyclophane oligomers was synthesized by click chemistry. The present cyclophane oligomers demonstrated enhanced guest-binding affinities toward fluorescent guests such as 6-p-toluidinonaphthalene-2-sulfonate, in comparison with those of monomeric cyclophane, reflecting multivalency effects in macrocycles. In addition, water-soluble anionic cyclophane having diphenyl disulfide moieties was also synthesized as a reduction-responsive degradable host. The anionic cyclophane binds cationic anticancer drugs such as daunorubicin hydrochloride (DNR). Reduction of disulfide bonds of the host by dithiothreitol gave its reduced form having poor guest-binding affinity that led to release of the entrapped guest molecules to the bulk aqueous phase.

研究分野：ホストゲスト化学

キーワード：シクロファン ホストゲスト化学 還元応答性

1. 研究開始当初の背景

大環状化合物であるアザシクロファンは、窒素原子を介して様々な機能性側鎖を分子外部に導入できるホスト分子である。また、疎水性空洞を有しているため、疎水性相互作用により、水中で分子内空洞に適した疎水性ゲストを捕捉できる。我々は、これまでにアザシクロファンの側鎖に親水性の糖鎖を導入した水溶性ホストを開発しているが、単環性の水溶性シクロファンがゲストに対して示す結合力は概して弱く不十分であった。これまでに我々はクラスター効果の概念をホストの分子設計に採用し、ゲスト捕捉力の問題を克服している。すなわち、複数のシクロファンが集積したシクロファン多量体を構築することで、ホストのゲスト捕捉能を飛躍的に向上させることに成功した。しかしながら、シクロファン多量体の合成には成功しているが、従来のアミド結合による合成法では反応効率や収率が悪いという問題があった。さらに、薬物送達システムを開発するためには、捕捉したゲストを自在に放出することも必要である。

2. 研究の目的

本研究では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。合成したシクロファン多量体のゲスト捕捉能を各種分光法により評価し、クラスター効果の発現について検討する。また、効果的な薬物送達システムを開発するためには、刺激応答型の薬物放出システムが有効である。そこで、「クラスター効果」に基づいてゲスト(薬物)を強く捕捉し、さらに「動的共有結合」の考えに基づきクラスター効果を解消してゲストを放出制御できる刺激応答性分子システムを確立することを目指した。すなわち、ホストとしてジスルフィド結合などの動的共有結合でシクロファンを互いに連結したシクロファン多量体を開発し、細胞内などの還元的雰囲気においてシクロファン多量体がシクロファン単量体に解離することで、クラスター効果の解消とともにゲスト捕捉力が劇的に低下してゲストを放出する分子システムを構築することを目的とした。

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、ゲスト捕捉と放出を制御するために、以下の項目について検討を行なった。

(1) クリック反応を利用したシクロファン5量体の合成とゲスト捕捉

アルキンとアジドの付加環化である Huisgen 反応を用いることで、シクロファン5量体の効率的な合成を検討した。合成したシクロファン5量体のゲスト捕捉能を蛍光滴定実験から評価した。

(2) 分解型シクロファンの合成と還元応答型ゲスト放出

シクロファンの連結部位にジスルフィド

結合を組み込んだシクロファン2量体や、シクロファン骨格内にジスルフィド結合を組み込んだ分解型シクロファンを合成した。合成したシクロファンの還元応答的なゲスト放出について評価した。

4. 研究成果

(1) クリック反応を利用したシクロファン5量体の合成とゲスト捕捉

シクロファン多量体の合成に、クリック反応を用いることにより高収率な合成法の確立を目指した。アルキンとアジドの付加環化である Huisgen 反応を用いることで、シクロファン5量体の効率的な合成に成功した。従来の合成法では収率60%程度であったが、本研究ではクリック反応を用いることにより収率87%と高収率で合成することができた(図1)。合成した **N5**、**C5** およびカチオン性シクロファン単量体 (**CP**) において、ホストゲスト複合体の組成比を調べるため Job プロット法を行ったところ、すべてのホストとゲスト (**TNS**, **2,6-ANS**) のホストゲスト複合体は 1:1 の組成比であることが分かった。また、蛍光滴定実験によりゲスト捕捉能におけるクラスター効果の評価を行った。ゲストに対してホストを添加していくと、ゲスト由来の蛍光強度は増大し、その蛍光スペクトル変化から、*K* を算出した。その結果、**N5** は **CP** に比べ *K* の値が 40~50 倍に増大し、従来のカチオン性シクロファン5量体と同等のクラスター効果の発現に成功した。同様に薬物ゲストとして抗がん剤 (**DNR**, **DOX**) を用いた蛍光滴定実験も行った。**DNR**, **DOX** は 550~600 nm 付近に蛍光を発することが知られているため、その蛍光スペクトル変化から、*K* を算出した。その結果、**N5** および **C5** は **CP** に比べ結合定数が 25~40 倍に増大し、クラスター効果の発現に成功した。

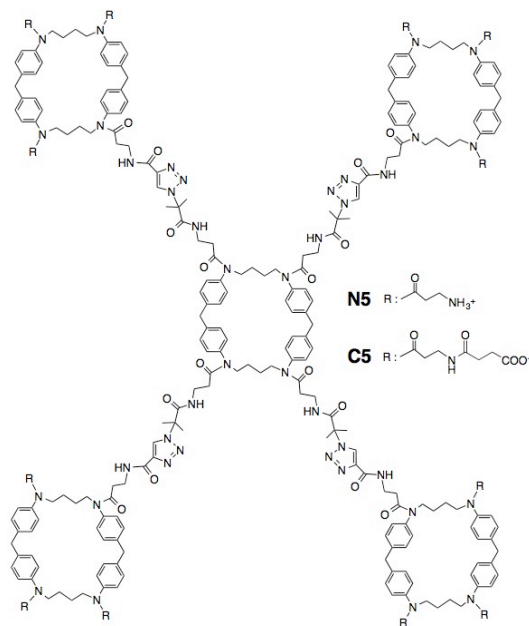


図1. クリック反応により合成したシクロファン5量体

## (2) 分解型シクロファン<sup>2</sup>の合成と還元応答型ゲスト放出

シクロファン多量体はクラスター効果によってゲストを強く捕捉するものの、ゲスト捕捉力を制御することは困難である。そこで、ゲスト捕捉力を制御することを目指して、新たに動的共有結合であるジスルフィド結合に起因した還元応答性のシクロファン誘導体の開発を行った。そのための分子設計として二つのアプローチをとった。はじめに、シクロファン<sup>2</sup>の連結部位にジスルフィド結合を組み込んだシクロファン<sup>2</sup>量体 **S2** の開発を行った。次に、シクロファン骨格内にジスルフィド結合を組み込んだ分解型シクロファン **N4** の合成も行った (図2)。それぞれ合成したシクロファン<sup>2</sup>のゲスト捕捉能と還元条件下におけるゲスト放出能を蛍光滴定実験法により評価した。ジスルフィド連結型シクロファン<sup>2</sup>の合成は、既知化合物の Boc3 と 3,3'-ジチオジプロピオン酸から DCC 縮合により前駆体を合成し、TFA で脱保護してシクロファン<sup>2</sup>量体 **S2** を合成した。また、チオールジスルフィド交換反応によりシクロファン<sup>2</sup>単量体 **S1** もあわせて合成した。分解型シクロファン **N4** の合成は、4,4'-ジチオジアニリンのアミノ基をトシル化した後に、1,4-ジブROMブタンとの環化反応により前駆体を合成した。その後、トシル基を脱保護し、カチオン性の側鎖を有する分解型シクロファン **N4** を合成した。また、アニオン性の **C4** もあわせて合成した。まず、**S2**、**S1** と TNS、2,6-ANS からなるホストゲスト複合体の組成比は 1 : 1 であることが Job プロット法より示された。また、TNS を含む HEPES 緩衝溶液にホスト **S2** および **S1** を添加するにつれ、ゲスト由来の蛍光強度が増大することがわかった。得られた滴定曲線から *K* を算出したところ、**S2** の TNS に対する *K* は **S1** が示す値と比較してクラスター効果のために約 8 倍に向上することがわかった。さらに、**S2** と TNS からなるホストゲスト複合体を含む HEPES 緩衝溶液に DTT を添加したところ、捕捉された TNS 由来の蛍光強度が次第に減少していった。さらに、120 分経過時における蛍光強度の減少率から約 90% のゲストが放出されたと考えられる。また、2,6-ANS の場合でも同様な挙動が認められた。この結果から、還元応答によりシクロファン<sup>2</sup>量体のジスルフィド結合が開裂にしてシクロファン<sup>2</sup>単量体が生じ、クラスター効果の解消に伴ってゲスト分子が放出されたものと考えられる。

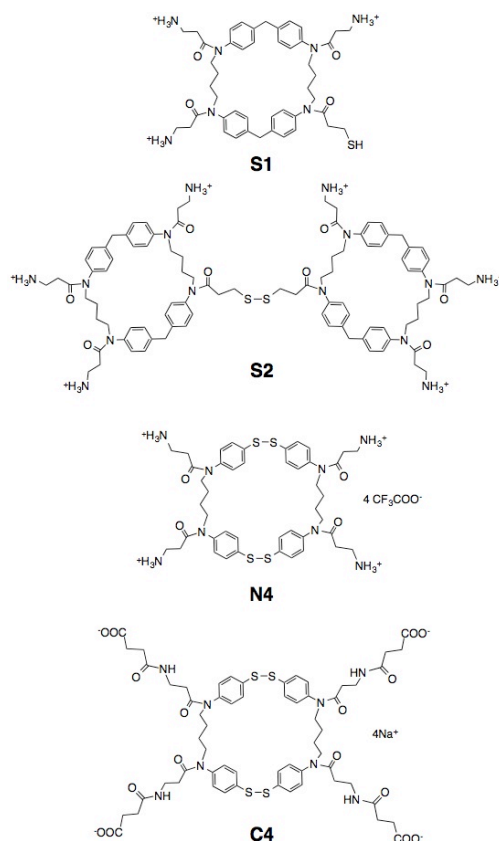


図2. ジスルフィド結合を組み込んだシクロファン

ところで、シクロファン環のサイズがより大きな **N4** と **C4** は TNS の捕捉には適していないことがわかった。そのため、ゲストとして Bis-ANS、ピレン酪酸(PA)、ピレンメチルアミン(PMA)を検討した。Job プロット法から **N4**、**C4** と Bis-ANS、PA、PMA とのホストゲスト複合体は 1 : 1 であることが示され、*K* を算出したところ、Bis-ANS で  $6.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、PA で  $4.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 、PMA で  $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  ということがわかった。また、抗がん剤である DOX などをゲストとして用いた場合、**N4** よりも **C4** が抗がん剤をより強く捕捉することがわかった。塩酸塩である DOX は、アニオン性の **C4** とより強く静電相互作用し、捕捉されたためと考えられる。さらに **N4**、**C4** は、還元条件下でホスト機能が抑制されることがわかった。それゆえ、ジスルフィド結合の開裂によりシクロファンが分解してゲスト分子が放出されたものと考えられる。一方、ある種のがん細胞は細胞外部に比べてグルタチオンの濃度が高く保たれた還元雰囲気であることが知られている。それゆえ、今回合成したジスルフィド結合を有する水溶性シクロファンは、がん細胞内などの還元雰囲気下で内包ゲスト(薬物)を放出できる新たな薬物送達システムとして期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Osamu Hayashida and Keiko Kojima, "Entrapment and Release of Guest Molecules by Reduction-Responsive Cyclophane Dimers Based on Disulfide Linkage", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 印刷中. 査読有
- ② Osamu Hayashida, Yuki Nakamura, and Takuya Sato, "Synthesis and Guest-Binding Behavior of Water-Soluble Cyclophanes Bearing PEG Residues", *Adv. Chem. Eng. Sci.*, Vol. 4, No. 4, 409-416 (2014). 査読有
- ③ Osamu Hayashida and Yu Kaku, "Synthesis of A Rhodamine-Appended Cyclophane as A Fluorescence Host in Water", *Adv. Chem. Eng. Sci.*, Vol. 4, No. 4, 401-408 (2014). 査読有
- ④ Osamu Hayashida\* and Daisuke Sato, "Degradation Properties and pH-Responsive Guest-Release of Cyclophanes Having Four Ester Side Chains with Terminal Choline Residues", *Chem. Lett.*, Vol. 43, No. 3, 322-324 (2014). 査読有
- ⑤ Osamu Hayashida\* and Yu Kaku, "Synthesis of Dabsyl-Appended Cyclophanes and Their Heterodimer Formation with Pyrene-Appended Cyclophanes", *J. Org. Chem.*, Vol. 78, No. 20, 10437-10442 (2013). 査読有
- ⑥ Osamu Hayashida, Kazuaki Ichimura, Daisuke Sato, and Terutaka Yasunaga, "Synthesis, Guest-Binding, and Reduction-Responsive Degradation Properties of Water-Soluble Cyclophanes Having Disulfide Moieties", *J. Org. Chem.*, Vol 78, No. 11, 5463-5469 (2013). 査読有
- ⑦ Osamu Hayashida, Tomomi Nakashima, and Yu Kaku, "Synthesis and Enhanced Guest-Binding Affinities of Dendrimer-Based Cyclophane Tetramer and Octamer", *Adv. Chem. Eng. Sci.*, Vol. 3, No. 3A, 33-37 (2013). 査読有
- ⑧ Osamu Hayashida and Yuki Nakamura, "Synthesis of Water-Soluble Cyclophane Pentamers Using Click Chemistry as A Multivalent Host for Daunorubicin and Doxorubicin", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, Vol. 86, No. 2, 223-229 (2013). 査読有
- ⑨ Osamu Hayashida and Kazuaki Ichimura, "Synthesis and Characterization of Reduction-Responsive Cyclophane Dimer Based on Disulfide Linkage", *Chem. Lett.*, Vol. 41, No. 12, 1650-1651 (2012). 査読有

[学会発表] (計 24 件)

- ① 中村 湧、小島 恵子、林田 修、ジスルフィド結合で連結したシクロファン 5 量体の合成と性質、日本化学会第 95 春季年会、(2015 年 3 月 26-29 日、日本大

学(船橋市))

- ② 大野 達矢、松下 幸司、林田 修、動的共有結合を有する水溶性シクロファン多量体の合成とゲスト捕捉能の制御、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、(2014 年 9 月 11-13 日、岡山大学(岡山市))
- ③ 小島 恵子、中村 湧、林田 修、シスチンで連結したシクロファン 2 量体の合成と還元応答性、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、(2014 年 9 月 11-13 日、岡山大学(岡山市))
- ④ 中村 湧、小島 恵子、林田 修、シクロファン多量体の合成とゲスト捕捉能の制御、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、(2014 年 9 月 11-13 日、岡山大学(岡山市))
- ⑤ 大野達矢、林田 修、動的共有結合を有する水溶性シクロファン 2 量体の合成とゲスト捕捉能、第 51 回化学関連支部合同九州大会、(2014 年 6 月 28 日、北九州国際会議場(北九州市))
- ⑥ 小島恵子、林田 修、ジスルフィド結合で連結したシクロファン 2 量体の合成とホストゲスト化学、第 51 回化学関連支部合同九州大会、(2014 年 6 月 28 日、北九州国際会議場(北九州市))
- ⑦ 小島 恵子、林田 修、ジスルフィド結合で連結した水溶性シクロファン 2 量体の合成とホスト機能の評価、日本化学会第 94 春季年会、(2014 年 3 月 27-30 日、名古屋大学(名古屋市))
- ⑧ 中村 湧、林田 修、ジスルフィド結合で連結したシクロファン 5 量体の合成と性質、日本化学会第 94 春季年会、(2014 年 3 月 27-30 日、名古屋大学(名古屋市))
- ⑨ 大野 達矢、林田 修、アシルヒドラゾン結合を有する水溶性シクロファン 2 量体の合成とゲスト捕捉におけるクラスター効果、日本化学会第 94 春季年会、(2014 年 3 月 27-30 日、名古屋大学(名古屋市))
- ⑩ 大野 達也、佐藤 大介、林田 修、動的共有結合で連結したシクロファン多量体の合成、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、(2013 年 9 月 27-28 日、名古屋大学(名古屋市))
- ⑪ 小島 恵子、加來 悠、林田 修、シスチンで連結した蛍光性シクロファン 2 量体の合成と機能、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、(2013 年 9 月 27-28 日、名古屋大学(名古屋市))
- ⑫ 大野 達也、佐藤 大介、林田 修、動的共有結合で連結したシクロファン多量体の合成、第 50 回化学関連支部合同九州大会、(2013 年 7 月 6 日、北九州国際会議場(北九州市))
- ⑬ 小島 恵子、加來 悠、林田 修、シスチンで連結したシクロファン 2 量体の合成と機能、第 50 回化学関連支部合同九州大会、(2013 年 7 月 6 日、北九州国

- 際会議場（北九州市）
- ⑭ 市村和明、林田 修、ジスルフィド結合を有する水溶性シクロファンの合成と還元応答によるゲスト放出、日本化学会第93春季年会、(2013年3月22-25日、立命館大学(草津市))
- ⑮ 小島 恵子、市村 和明、加來 悠、林田 修、シスチンで連結したピレン基を有するシクロファン二量体の合成と蛍光特性、日本化学会第93春季年会、(2013年3月22-25日、立命館大学(草津市))
- ⑯ O. Hayashida, K. Ichimura, K. Kimura, Y. Nakamura, T. Nakashima, SPR and Fluorescence Study on Host-guest Interactions of Cyclophane Oligomers Having Multivalently Enhanced Guest-binding Affinity, Label-Free Technologies: Advances and Applications (2012. 11. 1-3, NH Grand Hotel Krasnapolsky (Amsterdam))
- ⑰ 市村 和明、林田 修、ジスルフィド結合を有する水溶性シクロファンの合成と捕捉したゲストの放出、2012年日本化学会西日本大会、(2012年11月10-11日、佐賀大学(佐賀市))
- ⑱ 中村勇氣、林田 修、Huisgen 反応を用い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、2012年日本化学会西日本大会、(2012年11月10-11日、佐賀大学(佐賀市))
- ⑲ 木村 圭一朗、塩路 幸生、林田 修、蛍光性シクロファンの合成とエンドサイトーシスによるゲスト送達、第6回バイオ関連化学シンポジウム、(2012年9月6-7日、北海道大学(札幌市))
- ⑳ 市村 和明、林田 修、ジスルフィド結合を環骨格に組み込んだシクロファンの合成と還元応答によるゲスト捕捉の制御、第6回バイオ関連化学シンポジウム、(2012年9月6-7日、北海道大学(札幌市))
- ㉑ 中村 勇氣、佐藤 大介、林田 修、クリック反応を用いた水溶性シクロファン多量体の合成とゲスト捕捉における側鎖の影響、第6回バイオ関連化学シンポジウム、(2012年9月6-7日、北海道大学(札幌市))
- ㉒ 市村和明、林田 修、ジスルフィド部位を有する水溶性シクロファンの合成と分子認識、第49回化学関連支部合同九州大会、(2012年6月30日、北九州国際会議場(北九州市))
- ㉓ 木村圭一朗、林田 修、シクロファン多量体を用いたアニオン性ゲストの HepG2細胞内取り込み、第49回化学関連支部合同九州大会、(2012年6月30日、北九州国際会議場(北九州市))
- ㉔ 中村勇氣、林田 修、ゲスト捕捉能を持つシクロファン多量体の huisgen 反応を用いた効率的合成、第49回化学関連支

部合同九州大会、(2012年6月30日、北九州国際会議場(北九州市))

〔図書〕(計 1件)

- ① 林田 修、市村 和明、木村 圭一朗、中村 勇氣、中島 智美 「クラスター効果によって機能化された水溶性シクロファン類の創製とゲスト捕捉能」福岡大学理学集報、**2013**, 43, 87-95. 査読無

## 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