

令和元年6月8日現在

機関番号：17201
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2016～2018
 課題番号：16K05702
 研究課題名(和文) カリックスアレーンを基盤とするピコレベルでの生体機能物質識別蛍光センサーの開発

研究課題名(英文) Development of Calixarene-based Fluorescent Chemosensors Towards Biological Functional Substances in Pico Level

研究代表者
 大和 武彦 (YAMATO, TAKEHIKO)
 佐賀大学・理工学部・客員研究員

研究者番号：60136562
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新規C3対称を持つホモオキサリックス[3]アレーン誘導体を開発した。lower rimのフェノール性水酸基にアルキルアンモニウムイオンとの錯体形成可能な官能基および蛍光性官能基の導入に成功し、アロステリック機能を有するカリックス[3]アレーンを基盤とする生体機能物質識別機能を有する蛍光性化学センサーの簡便な合成ルートの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規C3対称を持つホモオキサリックス[3]アレーン誘導体のベンゼン環及びフェノール性水酸基にアルキルアンモニウムイオンとの錯体形成可能な官能基および蛍光性官能基の導入に成功し、アロステリック機能を有するカリックス[3]アレーンを基盤とする蛍光性化学センサーの簡便な合成ルートの開発に成功した。さらに、本成果を元に、種々の生体機能分子との水素結合に基づく分子認識機能を蛍光スペクトル測定および核磁気共鳴スペクトル法を用いて評価するなど、着実に本研究の当初の目的を達成出来た。本研究成果は、アメリカ化学会、イギリス化学会、ワイリージャーナル等に公表し、国際的に高い評価を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The selective synthesis and spectral properties of novel fluorescent chemosensors based on C3-symmetrical hexahomotrioxacalix[3]arenes were carried out in the present research projects. We have succeeded to synthesize novel hexahomotrioxacalix[3]arene-based alkylammonium ion fluorescent chemosensors having allosteric effect in the present research. The present work gives insight into the molecular design of chemosensors towards biological functional substances in pico level for high efficiency.

研究分野：化学

キーワード：ヘキサホモオキサリックス[3]アレーン 蛍光性官能基の導入 アルキルアンモニウムイオン 包接機能 生体機能物質認識 アロステリック効果 蛍光性化学センサー ピコレベル

1. 研究開始当初の背景

基礎科学における未知の現象の発現、**新しい物質の創製**は直ちに応用技術の開発に繋がり、革新的なニュープロセス、ニュープロダクトを生む原動力となることは言うまでもない。有機化合物は多様性に富み、かつ加工性に優れているにも拘わらず、無機化合物に比較すると、耐酸化性、耐熱性、機械的強度等の安定性に欠けるために、現在のところ機能性物質としての用途は広くない。しかしながら、上述の利点があるために、今後の研究によって、元来有機化合物の弱点とされる特性を改善するとともに、**人工的にデザイン**されることにより新しい機能の発現が認められれば、有機物質の用途は極めて広範囲に渡り、これらの有機物質は次世代の機能物質の主流となることが予想される。本研究者は**機能性有機物質の創製**を目的とする研究の一環として、分子認識機能をもつ有機化合物の合成及びその構造と機能の相関関係を明らかにする研究を行っている。

一方、生体内では、酵素は反応や抗原・抗体反応に代表されるように、ある物質（ホスト）が他の特定の物質（ゲスト）を極めて厳密に認識（識別）することによって特定の反応のみが行われるようになっている。このような**生体の認識系に比肩できる人工的な認識系を構築**し、これを利用して物質が物質を識別するメカニズムを研究することを目指している。こうした研究は、自然界における認識機能の解明にとどまらず、全く新しい物質認識機能に基づいた超分子システムを構築することにより、**新しいセンサー**、分離システム、各種の機能素子などの創成が可能となる。本申請者は現在までにこのような目的を達成するために**多様な認識機能を人工的に具現できる優れた素材（ホスト）の開発**に成功している。さらに、本化合物群の構造と反応性との相関関係を解明するなど、着実に目的とする研究業績が得られており、架橋芳香族化合物の化学に重要な示唆を与えている。これらの成果の一部は国内外の学会及び化学雑誌に公表し、高い評価を挙げている。

一方、G-プロテインが連結した**ドーパミンレセプター**（DRs）は神経系統の細胞間シグナル伝達過程において重要な役割を演じていることが知られている。ドーパミンレセプターは **D2-like**（cAMP 抑制型）受容体あるいは **D1-like**（cAMP 促進型）受容体への薬理的に従って細別されており、分子レベルでのドーパミン結合機構を解明するために人工的なドーパミンレセプターの開発に関して勢力的に研究が行われている。それらは**統合失調症やパーキンソン病**を取り扱う際に生物学的に重要なレセプターであるにも拘らず、それらの正確な結合機構については十分に解明されていないのが実情である。したがって、ドーパミンのような生物学的に重要なアミンに対する有効な**ピコレベル (10^{-12} M) まで検出可能な認識システムの開発**は臨床応用において**不可欠**である。

本研究者は現在まで、C3 あるいは D3 対称をもつカリックスアレーンおよびヘキサホトリオキサカリックス[3]アレーンが第一級アルキルアンモニウムイオンの認識において高い選択性を持つことを明らかにしている。さらに、本物質はドーパミン、セロトニン等の生体機能物質に対しても高選択的にその空孔内に包接し、現在**世界最高の会合定数**を持っている。さらに、ピレンを蛍光部位として有する蛍光性カリックスアレーンを分子設計し、分子認識に基づく情報を蛍光シグナル変化（エキシマー発光及びモノマー発光）により読み出す金属イオンおよびアニオン認識**蛍光性センサーの開発**に成功している。

本研究では**カリックスアレーン**を基盤とする**分子認識システムの開発**に関する研究の一環として、生物学的に重要なアミンレセプターを開発し、構造と分子識別能との相関関係を調べることを目的とするものである。特に、**ピコレベル (10^{-12} M) まで検出可能な臨床応用において不可欠な**蛍光性アミンセンサー****を開発するとともに、生物学において分子レベルでのドーパミン、セロトニン等のアミンとレセプターとの結合機構を解明することは、架橋芳香族化合物の化学の進歩に大きく貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

フェノール-ホルマリン系環状オリゴマーであるカリックスアレーンは、その特異な構造と、それに基づく優れた分子認識機能を持つことから、近年、基礎、応用の両面から活発な研究が行

われている。本物質の分子認識機能向上、あるいは分子認識に加えて他の機能を併せ持つ機能物質を得るために、種々の化学修飾がなされている。

一方、重金属イオンは生体系で重要な役割を果たしているばかりではなく、非常に毒性が高く、それ故に深刻な環境問題を引き起こすために、重金属イオンの選択的および高感度分析法の開発は特に関心が注がれている。本研究ではカリックスアレーンを基盤とする高選択的および高感度重金属イオンの蛍光性化学センサーの開発を目的としている。

近年、ドーパミンおよびセロトニンに代表されるアルキルアンモニウムイオンは生体系で重要な役割を果たしており、これらの化学種の選択的および高感度分析法の開発は特に関心が注がれている。そこで、本研究ではカリックスアレーンを基盤とする分子認識システムの開発に関する研究の一環として、生物学的に重要な**アミンレセプター**を開発し、構造と分子識別能との相関関係を調べることを目的とするものである。特に、臨床応用において不可欠な**ピコレベル** (10^{-12} M) まで検出可能な**蛍光性アミンセンサー**を開発するとともに、生物学において**分子レベルでのドーパミン、セロトニン結合機構を解明**することは、架橋芳香族化合物の化学の進歩に大きく貢献できると考えられる。従って、本研究が完成すれば、新しい研究分野が開かれ、国内外で高い評価を受けることが十分期待される。

3. 研究の方法

本研究では、**C3 対称を持つホモオキサリックス[3]アレーン誘導体**の簡便な合成ルートを開発し、**lower rim** のフェノール性水酸基にアルキルアンモニウムイオンとの錯体形成可能な官能基および**蛍光性官能基の導入**を行う。種々の生体機能分子との水素結合に基づく分子認識機能を**蛍光スペクトル測定**および核磁気共鳴スペクトル法を用いて評価する。さらに、生物学的に重要な**アミンレセプター**を分子設計し、**構造と分子識別能との相関関係**を調べ、分子レベルでのドーパミン、セロトニン結合機構を解明する (**図 1**)。

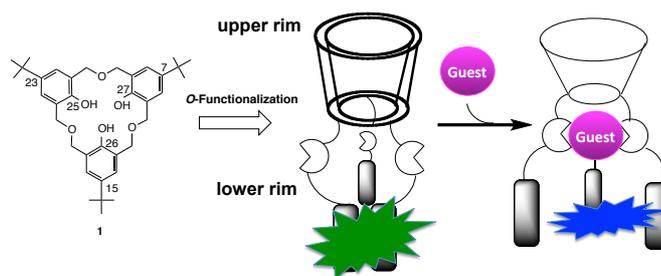


図 1. 蛍光性化学センサーの原理

(1) **合成ルートの開発** 本研究では **upper rim** のフェノール環に種々の官能基を導入したヘキサホモオキサリックス[3]アレーンの**簡便な合成ルートの開発**が Key Step となる。本研究者はすでに *p*-エトキシカルボニルホモオキサリックス[3]アレーン (**4**) が *p*-ヒドロキシ安息香酸エチル (**2**) から 2 段階で高収率で合成できることを明らかにしている。そこで、本研究ではエトキシカルボニル基-COOEt を-COOH, -CH₂OH, -CHO, NH₂ (CON₃ のクルチウス転位を用いて) 等への変換を行う。さらに、-COOH から脱炭酸後、-H に変換し、-Br, -I のハロゲン基の導入を行い、Pd 触媒を用いる**菌頭カップリング反応**、**鈴木カップリング反応**、Buchwald-Hartwig アミノ化反応を行い、それぞれ、エチニル-, アリール-, およびジアリールアミノ-置換ヘキサホモトリオキサリックス[3]アレーン誘導体の合成法を確立する。本成果を基にドーパミン等のカテコール部位と水素結合およびパイスタッキング可能な水素結合アクセプターの導入を行う。

(2) フェノール性水酸基への蛍光性官能基の導入

上述の成果を基にして、ヘキサホモオキサリックス[3]アレーンのフェノール性水酸基へのピレン、アントラセン等の**蛍光性官能基の導入**を行う。すなわち、本申請者がすでに確立しているフェノール性水酸基へのアミノエチル基の導入、ついでピレン-1-イソシアニドおよび 9-アンスリルイソシアニドとの反応によって容易に行うことが出来る。本手法により、**図 2** に示したように蛍光部位、アニオン認識部を導入したヘテロダイトピックヘキサホモトリオキサリックス[3]アレーンを基盤とする**ピコレベル** (10^{-12} M) **まで検出可能なドーパミン蛍光発色センサー**の合成が可能となる。

(3) アルキルアンモニウムイオンに対する包接機能に関する研究 合成した一連のアミン蛍光性センサーのアルキルアンモニウムイオンを用いてセンサーとしての評価を行う。さらに、lower rim 上のウレア部分とアニオン（ハライドイオン、リン酸イオン、硫酸イオン、酢酸イオン等）との**錯体形成に伴うアロステリック効果の発現**についても核磁気共鳴分光法を用いる滴定実験および蛍光スペクトル法により検討する。

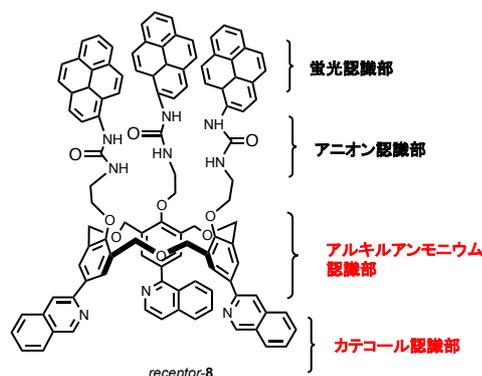


図2. ヘキサホモオキサリックス[3]アレーンを基盤とするドーパミン蛍光発色センサー

(4) 生体分子に対する包接機能に関する研究 ヘテロダイトピックヘキサホモオキサリックス[3]アレーン類と種々の**生体機能分子との水素結合に基づく分子認識機能**を蛍光スペクトル測定および核磁気共鳴分光法を用いて評価する (図3)。さらに、既存の**ドーパミン、セロトニン検出試薬**との比較を行い、ヘキサホモオキサリックス[3]アレーンへのアミン錯体形成配位子の導入による蛍光特性に及ぼす影響を溶液中・結晶状態（単結晶 X 線解析装置）の両方から調べる。さらに、光学活性ホスト化合物へと変換し、不斉認識を行う。

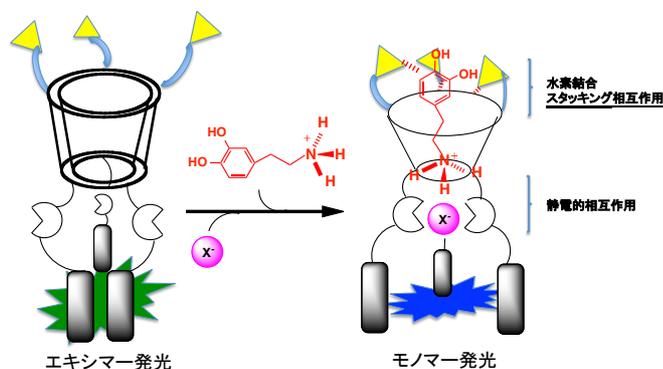


図3. ホモオキサリックス[3]アレーンセンサーによるドーパミンの検出

(5) **臨床応用への検証** さらに、ドーパミンのような生物学的に重要なアミンに対する有効な認識システムの**臨床応用**について検証する。本研究テーマに関しては共同研究者である岡山大学大学院医歯薬学総合研究所の勝孝教授との研究打合せを行い、高感度 ($10^{-9} \sim 10^{-12}$ M で検出可能な) 簡便なアミンセンサーの実用化を試みる。

(6) **ドーパミン、セロトニン結合機構を解明** 有機合成化学的手法を用いて、本研究で開発した生物学的に重要なアミンセンサーをスルホン酸基 (-SO₃H) やトリアルキルアンモニウム基 (-NR₃⁺) を導入した**水溶性センサーへと変換**し、**構造と分子識別能との相関関係**を調べ、分子レベルでのドーパミンおよびセロトニン結合機構を解明する。

4. 研究成果

C3 対称を持つホモオキサリックス[3]アレーン誘導体を開発し、lower rim のフェノール性水酸基にアルキルアンモニウムイオンとの錯体形成可能な官能基および**蛍光性官能基の導入**に成功し、アロステリック機能を有する**カリックス[3]アレーンを基盤とする蛍光性化学センサー**の簡便な合成ルートの開発に成功した。さらに、本成果を元に、種々の生体機能分子との水素結合に基づく分子認識機能を**蛍光スペクトル測定**および核磁気共鳴分光法を用いて評価するなど、着実に本研究の当初の目的を達成出来た。本研究成果は、アメリカ化学会、イギリス化学会、ワイリージャーナル等に公表し、国際的に高い評価を得ることができた。

(1) **合成ルートの開発** 本研究では upper rim のフェノール環に種々の官能基を導入したヘキサホモオキサリックス[3]アレーンの**簡便な合成ルートの開発**が Key Step となる。そこで、本年度では *p*-ヒドロキシ安息香酸エチルからの合成法を検討し、*p*-エトキシカルボニルホモオキサリックス[3]アレーンが簡便な操作で2段階での合成ルートの開発に成功した。さらに、エトキシカルボニル基-COOEt を-COOH, -CH₂OH, -CHO, NH₂ (CON₃のクルチウス転位を用いて)

等への変換に成功した。

(2) フェノール性水酸基への蛍光性官能基の導入

上述の成果を基にして、ヘキサホモオキサリックス[3]アレーンのフェノール性水酸基へのピレン、アントラセン等の**蛍光性官能基の導入**を行った。すなわち、本申請者がすでに確立しているフェノール性水酸基へのアミノエチル基の導入、ついでピレン-1-イソシアニドおよび 9-アンスリルイソシアニドとの反応によって容易に行うことが出来た。

(3) **アルキルアンモニウムイオンに対する包接機能に関する研究** 合成した一連のアミン蛍光性センサーのアルキルアンモニウムイオンを用いてセンサーとしての評価を行う。さらに、lower rim 上のウレア部分とアニオン（ハライドイオン、リン酸イオン、硫酸イオン、酢酸イオン等）との**錯体形成に伴うアロステリック効果の発現**についても核磁気共鳴分光法を用いる滴定実験および蛍光スペクトル法により検討した。アニオン認識部を導入したヘテロダイトピックヘキサホモトリオキサリックス[3]アレーンを基盤とする**ピコレベル (10^{-12} M) まで検出可能なアルキルアンモニウムイオン蛍光性化学センサーの開発に成功した。**

(4) **生体分子に対する包接機能に関する研究** 本研究で開発したアルキルアンモニウムイオン蛍光性化学センサーの評価を論じている。**C₃ 対称性をもつホスト分子**ホモトリオキサリックス[3]アレーンが一級アンモニウムイオンに対し高い結合能を発現し、ホスト分子とゲスト分子が同じ対称性を持つことが重要であることおよび本物質の環状部位の酸素原子に基づく分子認識能の向上が実証できた。特に、ドーパミンおよびセロトニン等の生体機能物質との錯体形成による蛍光強度の増大による高選択的検出が実現できたことは特筆すべき成果であろう。

さらに、本研究で開発したレセプターは Zn^{2+} およびアルキルアンモニウムイオンと同時に錯体形成可能な**ヘテロダイトピックレセプター**として機能することを明らかにしている。異なった金属イオンとの錯形成能の差に基づくアルキルアンモニウムイオン錯形成に対する**アロステリック効果**が観察され、アンモニウムイオンの catch and release を**発光および消光で読み取り可能なシステムの開発**に成功した。

(5) **人工蛍光性レセプターの構築** 本研究では Upper rim (カリックスベンゼン環) および lower rim に、ピレニル-1, 2, 3-トリアゾリル基を置換したヘキサホモトリオキサリックス[3]アレーンの合成に成功している。本物質はピレン部位の蛍光強度の減少に基づく消光型化学センサーとして機能し、**Hg²⁺イオン**に対して高い選択特性およびナノレベル (10^{-9}) まで検出可能な蛍光性化学センサーとして有効であることが明らかとなった。さらに、本 Hg²⁺イオンによる重原子効果による消光挙動を詳細に検討し、水の添加により発光強度が増大し、**重原子効果が抑制**されることを、初めて明らかにしたことは特筆すべき成果であろう。さらに、本物質はピレン部位の蛍光強度の減少に基づく消光型化学センサーとして機能し、**芳香族ニトロ化合物**に対して高い検出能を持つことを明らかにしている。特に、2, 4, 6-トリニトロフェノールに対しては、**ナノレベル (10^{-9}) まで検出可能な蛍光性化学センサー**として有効であることが明らかとなった。

以上、本論研究では、**カリックスアレーン**を基盤とする**新規蛍光性イオン化学センサー**の新しい実用的な合成法の開発に成功するとともに、本化合物群の構造とイオンおよび**生体機能分子**認識能との相関関係を解明および分子素子としての応用の可能性を明らかにするなど、多くの研究成果が得られている。本研究成果は、**人工蛍光性レセプターの構築**への重要な指針を与え、今後の分子認識化学のみならず超分子化学に寄与すると確信している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 24 件)全て査読有

1. A. Ignaszak, N. Patterson, M. Radtke, M. R. J. Elsegood, J. W. A. Frese, J. L. Z. F. Lipman, T. Yamato, S. Sanz, E. Brechin, T. J. Prior and C. Redshaw: Vanadyl sulfates: molecular structure, magnetism and electrochemical activity *Dalton Transactions*, **47**, 15983–15993 (2018).
2. X.-K. Jiang, Y. Ikejiri, C. Wu, S. Rahman, P. E. Georghiou, X. Zeng, M. R. J. Elsegood, C. Redshaw, S. J. Teat and T. Yamato: A Hexahomotrioxacalix[3]arene-Based Ditopic Receptor for Alkylammonium Ions Controlled by Ag⁺ Ions

- Molecules*, **22**, 467 (2018).
3. C. Wu, C.-Z. Wang, Q. Zhu, X. Zeng, C. Redshaw and T. Yamato:
Click synthesis of a quinoline-functionalized hexahomotrioxacalix[3]arene: A turn-on fluorescence chemosensor for Fe³⁺
Sensors and Actuators B, **254**, 52–58 (2018).
 4. C. Wu, Y. Ikejiri, X. Zeng, M. R. J. Elsegood, C. Redshaw and T. Yamato:
Synthesis of Mono-*O*-Alkylated Homooxacalix[3]arene and a Protection-Deprotection Strategy for Homooxacalix[3]arene
Org. Lett., **19**, 66–69 (2017).
 5. C. Wu, J.-L. Zhao, X.-K. Jiang, C.-Z. Wang, X.-L. Ni, X. Zeng, C. Redshaw and T. Yamato:
A novel fluorescence “on–off–on” chemosensor for Hg²⁺ via a water-assistant blocking heavy atom effect
Dalton Transactions, **45**, 14948–14953 (2016).
 6. X.-K. Jiang, Y. Ikejiri, C.-C. Jin, C. Wu, J.-L. Zhao, X.-L. Ni, X. Zeng, C. Redshaw and T. Yamato:
Synthesis and evaluation of a novel fluorescent sensors based on hexahomotrioxacalix[3]arene for Zn(II) and Cu(II)⁺
Tetrahedron, **72**, 4854–4858 (2016).
 7. C. Wu, J.-L. Zhao, X.-K. Jiang, X.-L. Ni, X. Zeng, C. Redshaw and T. Yamato:
Click-modified hexahomotrioxacalix[3]arenes as fluorometric and colorimetric dual-modal chemosensors for 2,4,6-trinitrophenol
Anal. Chim. Acta, **936**, 216–221 (2016).
 8. C. Wu, Y. Ikejiri, J.-L. Zhao, X.-K. Jiang, X.-L. Ni, X. Zeng, C. Redshaw and T. Yamato:
A pyrene-functionalized triazole-linked hexahomotrioxacalix[3]arene as a fluorescent chemosensor for Zn²⁺ ions
Journal of Sensors & Actuators: B. Chemical, **228**, 480–485 (2016).

〔学会発表〕(計 25 件) (一般発表)(計 10 件)

1. ○Chong Wu, Takehiko Yamato: Click synthesis of quinoline-functionalized homooxacalix[3]arene as turn-on fluorescence chemosensor for Fe³⁺ 第 54 回化学関連支部合同九州大会 2017 年 7 月 1 日
2. ○揚野 彰純, 大和武彦 チアカリックス[4]アレーンを基盤とする蛍光性化学センサーの開発 第 54 回化学関連支部合同九州大会 2017 年 7 月 1 日

招待講演 (計 15 件)

1. Takehiko Yamato
Synthesis and Photophysical Properties of Donor/Acceptor Substituted Pyrene-Based Fluorophores
The 11th Taiwan-Japan Bilateral Symposium on Architecture of Functional Organic Molecules (招待講演) 台湾東海大学 Tung Hai University, 2018 年 9 月 25–28
2. Takehiko Yamato
Calixarene Based Fluorescent Chemosensors 2018 SYMPOSIUM FOR THE PROMOTION OF THE APPLIED RESEARCH COLLABORATION IN ASIA (SPARCA 2018) (沖縄県宜野湾市) 2018 年 2 月 8–11 日
3. Takehiko Yamato
Calixarene Based Fluorescent Chemosensors, The 9th International Symposium on Nano & Supramolecular Chemistry (9th ISNSC) (Napoles, *Italy*) 2017 年 9 月 4–7 日
4. Takehiko Yamato
Calixarene Based Fluorescent Chemosensors, 14th International Conference on Calixarenes (Calix 2013), Nankai University (Tianjin, *China*), 2017 年 8 月 21–24
5. Takehiko Yamato
Calixarene Based Fluorescent Chemosensors, ICCAS International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry, Tsinghua University (Beijing, *China*) 2017 年 8 月 18–21 日

〔図書〕(計 0)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6.研究組織