

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25年6月13日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390003

研究課題名（和文） 生体内ポリアミン類の迅速定量法の開発

研究課題名（英文） Development of the effective and concise procedure to determine the concentrations of biogenic polyamines.

研究代表者

椿 一典 (TSUBAKI KAZUNORI)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50303897

研究成果の概要（和文）：

生体内ポリアミンの一種であるスペルミジンおよびスペルミンに高い選択性と高い感度を持つ呈色型および蛍光応答型機能性分子の開発を目指した。呈色応答型の分子では大腸菌内のスペルミジンの濃度を HPLC と同等の感度で定量することに成功した。また蛍光応答型分子ではフルオレセインを母核とし、ベンゼン環を追加し共役系を伸長した化合物を網羅的に合成し、その機能を明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

We developed the third generation host molecule **2**, which is changed the mother skeleton from the phenolphthalein to the phenol sulfonephthalein (Figure 2), with an extraordinary improvement in sensitivity and finally, achieved the detection of concentration of spermidine in *E. coli*. using host molecule **2** as a comparative level of HPLC method.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 10,400,000 | 3,120,000 | 13,520,000 |
| 2011年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2012年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 総計 | 14,200,000 | 4,260,000 | 18,460,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：スペルミジン、スペルミン、呈色応答、ホスト・ゲスト、分子認識

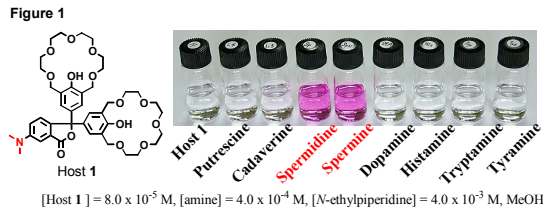
1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内ポリアミン類はタンパク合成、核酸合成の過程に影響を与え、細胞増殖の必須因子として、また癌との関連も指摘されている物質である。しかしあまりにも生理作用が広くまた浅いために踏み込んだ研究は少ない。ポリアミン類を研究するに当たって、最も基本的かつ重要な組織中、血液中の濃度の決定でさえ簡単ではない。

(2) 我々は分子認識、超分子化学の視点で本課題に取り組んでいる。これまでに基盤研究(C)と基盤研究(B)の研究助成を受け、

pH 指示薬であるフェノールフタレインを組み込んだホスト分子 **1** を開発した。化合物 **1** は生体内アミン類からスペルミジン、スペルミンを認識し呈色応答する (Figure 1)。更に化合物 **1** は 100 等量の夾雑アミン類存在下でもスペルミジン、スペルミンに敏感に応答する。また含水メタノール溶媒でも機能を発揮する。幾多の改良の末に開発した化合物 **1** ではあるが、スペルミジンに対する検出限界は 1×10^{-5} M (メタノール) であり、標的の生体内濃度 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-7}$ M の上限に到達した程度であった。即ち約 $10 \sim 10^2$ 倍の検

出感度の向上が本プロジェクトを実際の使用に供するために不可欠な課題であった。



2. 研究の目的

生体内ポリアミン類であるスペルミジン・スペルミンを識別し、超高感度で定量する実用的な検出薬の開発を目的とする。簡便かつ迅速な細胞内、組織中、血中生体内ポリアミンの濃度決定法の確立は癌との相関を精査する上でも、動植物に広く分布するポリアミン類の基礎研究を進めるに当たっても渴望されている研究目標である。

具現すべき検出薬の目標は細胞でリアルタイムでポリアミン濃度の測定が可能であり、また既存のフローサイトメトリーなど自動測定装置で適用可能な ① 超高感度呈色型ホスト分子の開発 および ② 蛍光応答型ホスト分子の開発の二点である。

3. 研究の方法

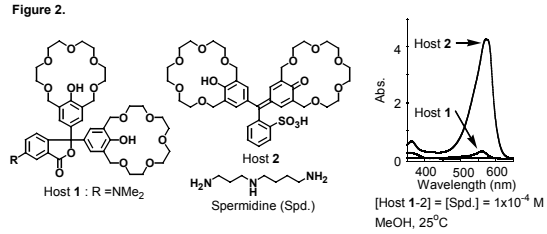
具体的な研究の方法は、① フェノールフタレイン母核からスルホンフタレイン母核へ変換、② 呈色型フェノールフタレイン母核から、蛍光応答型フルオレセイン骨格へ変換の二点である。

4. 研究成果

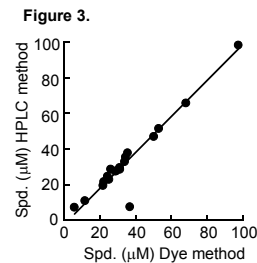
(1) フェノールフタレイン母核からスルホンフタレイン母核へ変換。

ブロモフェノールから8段階の反応を経て所望のホスト分子 **2** の合成を達成した。ホスト分子 **2** と既存のホスト分子 **1** のスペルミジンに対する応答を比較したところ、**2** の感度は大幅に向上していた (Figure 2)。次いで、合成したホスト分子 **2** とスペルミジンの会合定数 K_a 及びモル吸光係数 e を分光光度計を用いた滴定実験により求めた。その結果、 $K_a = 1.2 \times 10^7$, $e = 82000$ と極めて大きい値を示した。またホスト分子 **2** のスペルミジンの定量限界濃度は 1×10^{-7} M であり、課題であった感度の向上を達成した。また本結果は、プロトン性溶媒中での水素結合を主な駆動力とした分子認識としては例外的に大きな値であり、ホスト分子 **2** とスペルミジンの高い相補性を反映するものである。

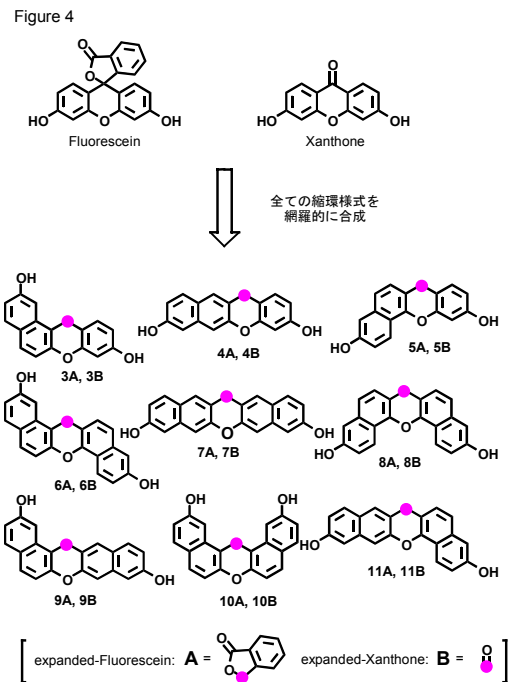
ホスト分子 **2** が実際に生体サンプルに応用可能かどうか精査した。具体的には大腸菌中のスペルミジンの定量を行った。通常大腸菌内のスペルミジンの濃度は専用に組み上げられた特殊な HPLC で測定される。そこで



我々は、大腸菌を培養し、HPLC 法とホスト分子 **2** を用いた方法とでスペルミジンを定量し、両者を比較した。当初、両者は全く一致しなかった。種々検討した結果、一致しない原因は生体内に大量に存在する K^+ である事が判った。この K^+ の影響を除くために系中に K^+ に対して高い親和性をもつ [2, 2, 2] クリプタンドを共存させ、再度スペルミジンの定量を試みた。その結果、HPLC と同等の精度で大腸菌中のスペルミジンの濃度の測定に成功した (Figure 3)。本結果は、ホスト分子 **2** のスペルミジン検出試薬への可能性を高めるものである。

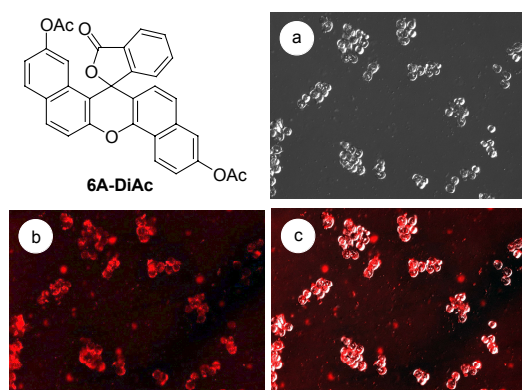


(2) 呈色型フェノールフタレイン母核から、蛍光応答型フルオレセイン骨格へ変換。蛍光応答型にすることで、フローサイトメトリーなどへの応用が考えられる。まず生体内の自家蛍光との吸収・発光の重なりを避けるた



め、近赤外領域に発光を示すフルオレセイン型の分子の開発に着手した。共鳴系を拡張するため単純にフルオレセインの両側、または片側にベンゼン環を拡張した化合物を網羅的に合成した (Figure 4)。 π 系のサイズだけでなく形に注目し網羅的に合成・比較した研究はこれまでにない。光学特性を調べたところ多彩な性質を示し、以下の知見を得た ① 横向きのナフタレンを有する **4A**, **7A**, **9A** の発光波長は近赤外に達する。② 四環性の **4A**, **5A** はストークスシフトが特に大きい。③ 下向きのナフタレンを有する **5A**, **8A**, **11A** は量子収率が高い。さらに、**6A** のジアセテート体を用いて細胞導入実験を行ったところ低い細胞毒性及び良好な細胞移行性が確認され、生体への応用に一步前進した (Figure 5)。

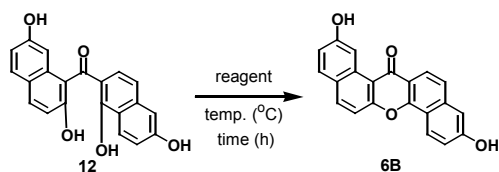
Figure 5. Raw and fluorescence images of HEK 293 cells.



HEK 293 cell were incubated in 0.05 mM of diacetate of compound **6A-DiAc** for 60 min. (a) raw image, (b) fluorescence image, (c), and overlapping image of (a) and (b).

ジナフトフルオレセイン型の蛍光色素を効率的に合成するために、キサントンの左右にベンゼン環を一枚づつ追加した、ジベンゾキサントン骨格を鍵中間として位置づけそ

Table 1. Cyclization reaction of compound **12**.

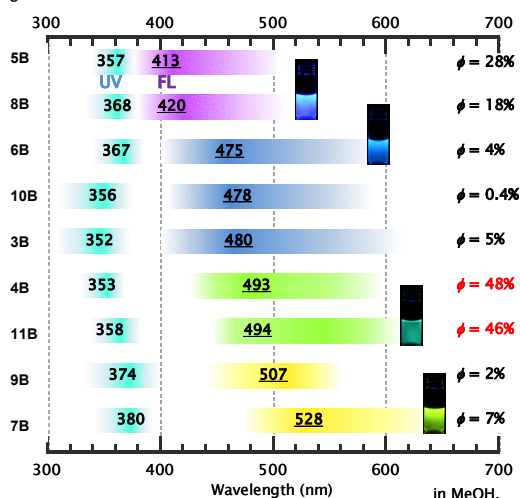


| Entry | reagent | temp. (°C) | time (h) | yield of 6B (%) |
|-------|--|------------|----------|------------------------|
| 1 | H ₂ O | 150 | 9 | 0.3 |
| 2 | MeSO ₃ H | 50 | 6 | not obtained |
| 3 | SiO ₂ | 40 | 21 | not obtained |
| 4 | KOH / EtOH | reflux | 9 | mixture |
| 5 | K ₂ CO ₃ / MeCN | reflux | 9 | mixture |
| 6 | AcONa / H ₂ O | reflux | 9 | 21 |
| 7 | cat. K ₂ CO ₃ / H ₂ O | 150 | 9 | 99 |

の網羅的合成法の開発を行った。驚いた事にキサントン合成で汎用されている手法が、ジベンゾキサントン骨格ではうまく適用できない基質が存在することが判った。このため種々反応条件を検討した。その結果、水を溶媒とし、弱塩基性で加温する条件を見出した。

この手法は汎用性とみ、本手法を用いて全ての縮環様式のジベンゾキサントン類を合成した (**6B-14B**)。また合成したジベンゾキサントンは全て蛍光性を示した。その吸収波長は同じ領域にあるが、発光波長は400~530 nm の4色の領域に分布していた (Figure 6)。本性質は一波長励起/多波長発光のマルチカラー色素として優れた性質を持っていることを見出した。

Figure 6



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3件)

- ① E. Azuma, K. Kuramochi, K. Tsubaki, Alternative simple and effective synthesis of (di)benzoxanthenes and their functions toward fluorescent dyes, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 1694-1699. 査読有
- ② E. Azuma, N. Nakamura, K. Kuramochi, T. Sasamori, N. Tokitoh, I. Sagami, K. Tsubaki, Exhaustive Syntheses of Naphthofluoresceins and Their Functions *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 3492-3500. 査読有
- ③ 椿 一典、谷間 大輔、富士 薫、フェノールフタレインを組み込んだ呈色型分子の開発、有機合成化学協会誌、2011, 69, 266-277、査読有、

[学会発表] (計20件)

- ① 東 恵理子、倉持 幸司、椿 一典、新規ジベンゾキサントン色素の合成と構造一物

性相関、日本薬学会第 133 年会(横浜)、
2013/3/28

- ② 山下 耀、東 恵理子、倉持 幸司、椿 一典、近赤外発光を示す新規ナフトフルオレセイン類の合成と機能、第 6 回有機 π 電子系シンポジウム (松山)、2012/12/14
- ③ 東 恵理子、倉持 幸司、椿 一典、生体イメージングを指向した新規近赤外発光色素の合成と性質、第 2 回 4 大学 (京都工芸繊維大学、京都府立医科大学、京都府立大学、京都薬科大学) 連携研究フォーラム (京都) 2012/12/5
- ④ 中村 美和、坂井 友美、東 恵理子、今村 洋子、倉持 幸司、川端 猛夫、鈴木 秀之、椿 一典、超分子化学を駆使した生体内ポリアミン類の定量、第 23 回基礎有機化学討論会 (京都)、2012/9/20
- ⑤ 中村 美和、坂井 友美、東 恵理子、今村 洋子、倉持 幸司、川端 猛夫、鈴木 秀之、椿 一典、超分子化学を駆使した生体内ポリアミン類の定量、第 9 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム (札幌)、2012/5/26

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- (1) 名称：蛍光色素、蛍光試薬、生体患部の診断方法、標的細胞の特定方法及び標的物質の検出方法

発明者：椿 一典、東 恵理子

権利者：京都府公立大学法人

種類：特許

番号：特願 2012-119804

出願年月日：2012 年 5 月 25 日

国内外の別：国内

- (2) 名称：近赤外蛍光色素、画像診断材料及び画像診断方法

発明者：椿 一典、東 恵理子

権利者：京都府公立大学法人

種類：特許

番号：特願 2011-090109

出願年月日：2011 年 4 月 14 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/syn_chem_fm/index.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椿 一典 (TSUBAKI KAZUNORI)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：5 0 3 0 3 8 9 7

(2) 研究分担者

倉持 幸司 (KOUJI KURAMOCHI)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究

科・准教授

研究者番号：9 0 4 0 8 7 0 8

