

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23655159

研究課題名(和文)ピロール環の回転を基軸とするN-混乱ポルフィリノイドのバイオ展開

研究課題名(英文)Bio-related chemistry of N-confused porphyrinoids

研究代表者

井川 善也 (IKAWA, YOSHIYA)

富山大学・理工学研究部(理学)・教授

研究者番号：70281087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ポルフィリン異性体N-混乱ポルフィリン(NCP)は「混乱ピロール環の反転と隣接ピロール環との縮合」により生成するN-フューズポルフィリン(NFP)に変換される。これら類縁体は通常ポルフィリンとは異なる特性を有し、その生体化学応用は興味を持たれてきた。本研究ではNCP/NFPの構造変換を基軸に i) 特定分子種のバイオセンシング、ii) NCPの生体分子プローブ利用、iii) 四重鎖DNAの構造制御、の3課題を遂行し、i)ではNFP/NCP変換反応を駆使したバイオチール・センシング、ii)からはトレースレスNFP/NCP相互変換反応、iii)ではNFPによるG4DNAの構造変換、に成功した。

研究成果の概要(英文)：Porphyrinoids (porphyrin-like macrocycles) have attracted considerable attention for their properties. Because of the importance of porphyrins in biology, utilization of porphyrinoids in the bio-related research is anticipated. We have succeeded in synthesizing water-soluble derivatives of N-confused porphyrin (NCP) and N-fused porphyrin (NFP), which enabled us to explore the interactions with bio molecules in aqueous media. Using these derivatives, optical sensing of biothiols and modulation of G-quadruplex DNA structures were achieved.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ポルフィリン N-混乱ポルフィリン バイオチオール N-フューズポルフィリン 蛍光センシング 四重鎖DNA ポルフィリン類縁体

1. 研究開始当初の背景

ポルフィリン化合物は、生体機能物質として、機能材料の素材として幅広く研究されてきたが、ピロール分子を基本ユニットとしたポルフィリン類縁化合物(ポルフィリノイド)の研究が、1990年代中盤以降、急速に進展しつつある。中でもN-混乱型ポルフィリン異性体や拡張ポルフィリンは特異な金属錯化能や光物性を有し、生体機能分子としての潜在能力と応用には大きな注目が集まっている。しかしN-混乱型ポルフィリノイドはノーマル・ポルフィリンに比べ、構造の対称性が大きく低下し生体機能分子に適した化学修飾を施す事が困難であった。

2. 研究の目的

ポルフィリン異性体であるN-混乱ポルフィリン(NCP, 1)は「混乱ピロール環の反転と隣接ピロール環との縮合」により生成するN-フェーズポルフィリン(NFP, 2)と相互に変換される。本研究ではNCP/NFP水溶性誘導体を合成し、ピロール環の回転によるNCP/NFPの構造変換を武器に、生体関連化学の重要な課題である i) 特定分子種のバイオセンシング、ii) NCPをプローブとした生体分子への連結、iii) 四重鎖DNAの構造制御、に挑戦した。本研究は、混乱ポルフィリノイド化学と生体関連化学という従来は別個に存在した二つの領域に橋をかけることを目的として以下の3つの課題を設定した。

[課題1] ピロール環の反転を基軸とした生体チオールのバイオセンシング

NFPが求核種によりNCPに変換される特性を利用し、システインなど生体チオールを求核剤とした水系でのNFP→NCP変換を行いNCPの蛍光を利用したチオール・センシング系の開発。

[課題2] ピロール環の反転を基軸としたN-混乱ポルフィリンと生体分子の連結

生体分子に求核種を組み込みNFPと反応させ、NCPを機能プローブとした連結分子の創製。

[課題3] 混乱ピロール環の特性を駆使した四重鎖DNAの構造変換

NCPおよびNFPは特異な構造に起因する四重鎖DNAとの相互作用を利用した四重鎖DNAの構造制御。

3. 研究の方法

[課題1] 新規な水溶性NFPの合成法を確立し、生体求核種による水系でのNFP(2)→NCP(1)変換を利用し、NCPの蛍光、あるいはNIR吸収の変化を利用した生体求核種のバイオセンシング系を開発する。具体的なターゲットとして、システインなど生体チオールのセンシングを試みる。

[課題2] [課題1]で用いるNFPと生体求核種(特にシステイン)との反応を生体高分子に適用し、求核種を有する生体高分子をNFP

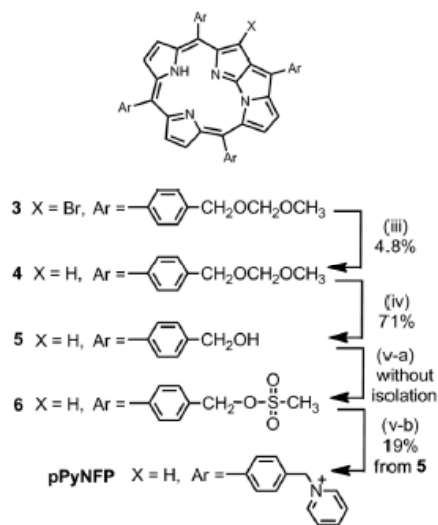
と反応させ、NCPをプローブタグとして温和かつ選択的に導入する。

[課題3] ガンや老化と深く関わるヒトテロメアの四重鎖DNAは外部環境に応じて少なくとも3種の構造をとることが示されており(右図)、その相互変換と生物活性の関連が注目されている。水溶性NCPおよびNFP誘導体はその特異なπ平面がG四重鎖と強く相互作用する事が期待されるため、その相互作用とDNAの構造変化を解析し、構造制御分子としての能力を評価する。

4. 研究成果

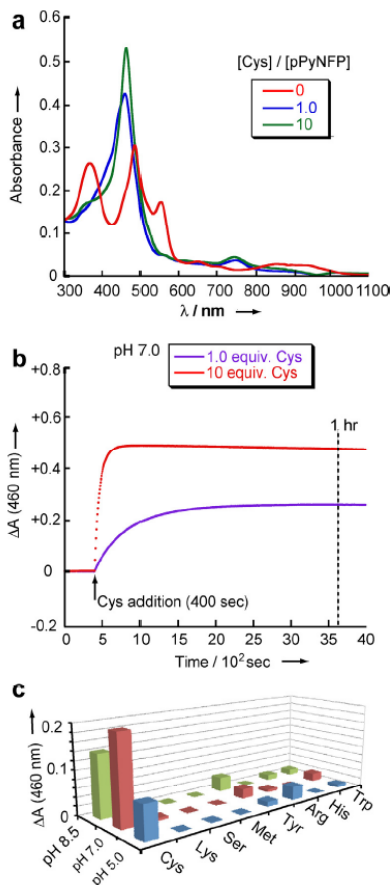
[課題1] ピロール環の反転を基軸とした生体チオールのバイオセンシング

疎水性の高いNFP骨格を水溶液中でセンサー分子として利用するためには、親水性の高い官能基で修飾を施す必要がある。本研究では報告者がこれまでに開発したポルフィリン類縁体の4級ピリジニウム基による修飾を適用し、従来法よりも各段に汎用性の高い合成ルートの開発と確立を行った。具体的にはテトラピロール骨格のメゾアール基の4位に導入したOH基をMOM基で保護し誘導体を合成し、MOM基の脱保護の後、OH基の活性



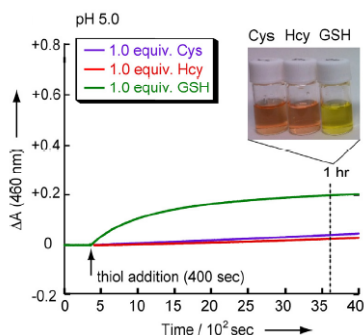
化と4級ピリジニウム基の導入をワンポットで行うことで、取り扱いに難点のある中間化合物の単離を避けつつ、目的物であるpPyNFP(2)を確実に単離することに成功した。

合成されたNFP(2)をpHを調整した(pH 5.0, 7.0, 8.5)緩衝溶液中で求核性アミノ酸であるシステインと混合したところ、NFP骨格由来の赤色が速やかに消失し、黄緑色に変化した。UV-vis-NIRの吸収スペクトルから反応産物はNCP骨格を有する事が強く示唆された(下記図a, b, 論文5より引用)。NMRを含む解析の結果から、システインが結合したNCP誘導体の生成が確認された。



さらに7種の求核性アミノ酸についても同じ条件での反応を行ったが、溶液の吸収特性に大きな変化は見られなかった。以上の結果から、水溶性 NFP 誘導体がシステインを特異的に検知するプローブ分子として利用できる事が示された。

生体内に存在する他のバイオチオールについてもシステインと同様の反応が進行した。その一方、低 pH 条件化では反応速度に顕著な違いが観察された。3種の最も代表的なバイオチオール（システイン、ホモシステイン、GSH）では、pH 5.0 の条件下では GSH のみ速やかに反応が進行した（右上図論文 5 より引用）。この結果から NFP 骨格が特定のバイオチオールを選択的に検出可能なセンサー分子のプラットフォーム構造になり得ることを示している。



NCP 骨格は近赤外領域（800 nm 付近）に特有の蛍光を発することが知られている。一方 NFP 骨格は同領域には蛍光を発しない。以上の特性を利用すれば、バイオチールとの反応で生じる NCP 骨格由来の蛍光を用いて、チオール類の蛍光検出が可能と考えられる。吸収変化による反応追跡と同様の条件下、チオールと NFP (2) の反応は近赤外蛍光によっても検出できることを確認した。さらにその蛍光スペクトルの形状と発光の pH 依存性がチオールの種類に依存する事も明らかとなった。これらの結果と、前述の反応速度の差を適切に組み合わせることにより、NFP 骨格がチール類の選択的センサー分子のプラットフォーム分子として有望であることを見いだした。

[課題 2] ピロール環の反転を基軸とした N-混乱ポルフィリンと生体分子の連結

課題 1 の成果より、チオールを含む生体分子を NFP と反応させれば、C-S 結合を介して生体分子と反応で生成する NCP 骨格を簡単に連結できることが期待される。ただし NCP を生体分子のタグ分子として利用する上では C-S 結合を介する連結部位が十分な安定性を有する事が必要条件となる。システインおよびチオール骨格を有する数種のペプチドと水溶性 NFP (2) との反応で生成した連結分子は逆相 HPLC を含む精製手法により単離が可能であり、その安定性を検討した。その結果、連結反応はおおむねスムーズに進行し、連結分子を単離、解析することにも成功した。しかし C-S 結合ユニットが予想以上に不安定であり、簡便かつ安定なタグ連結ユニットとしては十分でない事も明らかになった。

以上の結果に基づき、本課題は下記の二つの方向に展開する事とした。

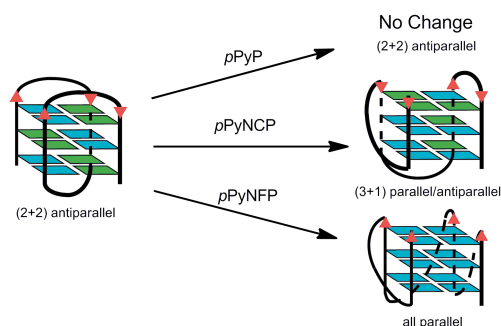
i) システイン以外の求核種を用いた連結反応の探索：反応性の点からはチオール性求核種が好ましいものの反応産物である NCP 骨格との結合は C-O 結合の方がはるかに安定である事が明らかとなった。従って一定の反応性を有する求核種を探索したところ、非極性溶媒中で、フェノール類が塩基の非存在下においても比較的良好な反応性を示す事を見いだした。従ってチロシンを求核種として適切な反応条件を設定する事で、安定な連結ユニットとして生体分子と NCP 骨格の連結が可能であることが示唆された。

ii) NCP とチオール間の C-S 結合の不安定性を積極的に利用した分子骨格変換技術の開発：チオールと NFP の反応は NFP→NCP の骨格変換を伴う。本変換は吸収発光特性の大きな変化を伴うためにセンサー分子として利用可能な一方で、従来は不可能であった NCP 誘導体の合成ルートとしても捉えられる。これまでアルコキシド (RO⁻) を求核剤として用いた骨格変換が NCP 誘導体の合成に用いられた例はあるものの、得られる誘導体には RO⁻ユニットが必然的に付加され、その除去は

困難である欠点があった。NCP とチオール間の C-S 結合の不安定性を利用して還元的条件化でチオールユニットの除去を検討したところ、 $\text{NiCl}_2/\text{NaBH}_4$ を低温で作用させることで、比較的良好な収率 (54-88%) でチオフェノールユニットの除去に成功し NFP→NCP のトレースレスな骨格変換手法の開拓に成功した (論文 2)。

[課題 3] 混乱ピロール環の特性を駆使した四重鎖 DNA の構造変換

水溶性 NFP 誘導体 (pPyNFP) と DNA との相互作用を系統的に検討した結果、テロメア四重鎖 DNA と相互作用することを見いだした。さらに NFP 存在下のテロメア四重鎖 DNA の構造を CD スペクトルにより検討した結果、NFP はテロメア四重鎖 DNA の (2+2) アンチパラレル構造をオールパラレル型へと誘起することを見いだした。



同じ 4 級ピリジニウム置換基を有するポルフィリン (pPyP) は構造変化を誘起せず、NCP は異なる構造 (3+1 パラレル/アンチパラレル) への構造変化を誘起することも明らかにされている。従って類似のテトラピロール骨格を有する π 系分子種により四重鎖 DNA をチューニング可能である事が明らかとなった。特に NCP と NFP で異なる構造を誘起できることは、前述の骨格変換反応と組み合わせた動的な四重鎖 DNA 構造の制御基盤となる成果である。

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 5 件)

1) Y. Ikawa, S. Touden & H. Furuta
N-fused porphyrin with pyridinium side-arms: A new class of aromatic ligand with DNA-binding ability. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 8068-8078 (2011), 査読あり

2) S. Touden, Y. Ikawa, R. Sakashita, M. Toganoh, S. Mori, & H. Furuta,
Sulfur-assisted interconversion between N-confused porphyrin and N-fused porphyrin.
Tetrahedron Lett., **53**, 6071-6074 (2012),

査読あり

3) Y. Ikawa, S. Touden, S. Katsumata, & H. Furuta,
Water soluble N-confused porphyrinoids for bio-related chemistry.
Kyushu University GCOE Program Journal **5**, 6-8 (2012), 査読なし

4) Y. Ikawa, H. Harada, S. Katsumata, and H. Furuta,
Facile conjugation of porphyrin and N-confused porphyrin with nona-arginine peptide by click reaction.
Report of the Center of Advanced Instrumental Analysis Kyushu University, **30**, 1-7 (2012), 査読なし

5) Y. Ikawa, S. Touden, S. Katsumata, & H. Furuta
Colorimetric/fluorogenic detection of thiols by N-fused porphyrin in water.
Bioorg. Med. Chem., **21**, 6501-6505 (2013), 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

1) Interaction between a N-fused porphyrin and biomolecules. 東田悟・井川善也・古田弘幸、第 21 回万有福岡シンポジウム、福岡、2011 年 5 月

2) Optical properties of meso-hexakis(pentafluorophenyl)-substituted hexaphyrin(1.1.1.1.1.1) with acid and base. 勝間田匠・井川善也・古田弘幸、第 7 回「化学的にプログラムされた合成色素類の超分子ナノ化学」国際研究集会、滋賀、2011 年 6 月

3) Optical Properties of a Dumbbell-Type [26] Hexaphyrin. 竹之下雄一・井川善也・古田弘幸、第 7 回「化学的にプログラムされた合成色素類の超分子ナノ化学」国際研究集会、滋賀、2011 年 6 月

4) メゾ-アリール [26] ヘキサフィリンの構造と物性：置換基効果の検討、竹之下雄一・井川善也・古田弘幸、第 48 回化学関連支部合同九州大会、福岡、2011 年 7 月

5) メゾ-(ヘキサキス)ペンタフルオロフェニル-ヘキサフィリン (1.1.1.1.1.1) のモノアニオンとジアニオンの蛍光特性、勝間田匠・井川善也・古田弘幸、第 48 回化学関連支部合同九州大会、福岡、2011 年 7 月

6) メゾ-オルト無置換アリール型ヘキサフィリンの合成と物性、竹之下雄一・井川善也・古田弘幸、第 43 回構造有機若手の会、広島、2011 年 8 月

7) ピリジニウム置換基をもつ水溶性二重
N-混乱ヘキサフィリンの合成と特性、勝間田
匠・井川善也・古田弘幸、日本化学会第 92
春季年会、2012 年 3 月

8) グループ(I)イントロン RNA の酵素活性に
対する水溶性ポルフィリノイドの添加効果、
伊藤龍信・古田弘幸・井川善也、第 49 回化
学関連支部合同九州大会、福岡、2012 年 6 月

9) 7) メゾ-(4-トリフルオロメチルフェニ
ル)置換ヘキサフィリン(1.1.1.1.1)の合
成と物性、鶴田邦彦・竹之下雄一・森重樹・
石田真敏・井川善也・古田弘幸、日本化学会
第 94 春季年会、2014 年 3 月

[その他]

HP: <http://www3.u-toyama.ac.jp/orgsyn3/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井川 善也 (IKAWA YOSHIYA)

富山大学・大学院理工学研究部 (理学)・
教授

研究者番号: 70281087