

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310162

研究課題名(和文) 微生物迅速同定の新原理：極小蛍光分子とシデロフォアの化学

研究課題名(英文) New Principle of Microorganism Identification: Chemistry based on Small Fluorescent Molecule and Siderophore

研究代表者

難波 康祐 (NAMBA, Kosuke)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：50414123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、最小の蛍光分子の開発と細菌が分泌する鉄キレート剤(シデロフォア)への導入を行った。蛍光分子は、独自に開発した発色団1,3a,6a-トリアザペンタレン(TAP)を基盤とし、紫色から赤色までの全ての波長領域をカバーする種々のコンパクト蛍光分子の開発に成功した。また、腸炎ビブリオ細菌が分泌するビブリオフィェリンおよびサルモネラ菌が分泌するエンテロバクチンなどのシデロフォアの化学合成に成功し、適当な部位に種々のTAPを導入することに成功した。現在、これらのTAP導入シデロフォアを用いて、特定の細菌検出を検討中である。

研究成果の概要(英文)：Novel smallest fluorescent molecules were developed, and they were introduced to siderophore that is secreted by microorganism as a natural iron chelator. We succeeded to produce various compact fluorescent molecules that cover all color region from blue to red on the basis of new fluorescent chromophore 1,3a,6a-triazapentalene originally developed in our laboratory. In addition, vibrioferrin and enterobactin as the siderophore of *Vibrio parahaemolyticus* and *salmonella* respectively were efficiently synthesized. Furthermore, the introduction of various TAPs to vibrioferrin and enterobactin was also achieved. The detection and identification of specific microorganism by using TAP-siderophore are currently underway in our laboratory.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：シデロフォア 1,3a,6a-トリアザペンタレン 蛍光プローブ ビブリオフィェリン エンテロバクチン

1. 研究開始当初の背景

病原性細菌による食中毒は近年においても大きな社会問題となっており、食中毒細菌の簡便な検出や同定法の確立が求められていた。また、通常微生物を同定するためには、微生物を培養した後に、形態学的検査、生化学的検査、血清学的検査、あるいは遺伝学的検査が用いられるが、これらはいずれも時間と高度な技術を必要とする。以上のことから、より簡便かつ迅速な微生物の検出・同定法が求められていた。

2. 研究の目的

哺乳動物に感染している微生物類は常に鉄欠乏状態にあることから、鉄イオンとの親和力の高い特異なキレート剤(シデロフォア)を分泌し、鉄イオンをその錯体として効率的に宿主から奪い取るようとしている。このため、様々な細菌由来のシデロフォア・鉄錯体を感染性微生物に与えてやると、微生物は自種類のシデロフォア・鉄錯体を認識して迅速に取り込むと予想される。どのシデロフォア・鉄錯体を取り込まれたかを検出できれば、感染性微生物の迅速な同定が可能である。この新規同定法の可能性を明らかにするために、1)細菌に取り込まれることで蛍光波長を大きく変化させる蛍光プローブの作製、2)蛍光プローブを導入した各種シデロフォアの化学合成、3)生きた細菌での各種蛍光シデロフォアを取り込み観察を行い、本法による細菌の検出限界を明らかにする。

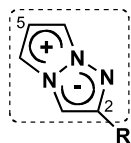
3. 研究の方法

当研究室で開発された最小の新規蛍光分子 1,3a,6a-triazapentalene (TAP) を基盤とした種々の高機能性蛍光プローブの創製と蛍光試薬としての一般化を行う。

その後、種々の TAP 誘導体を用いて、細胞内への取り込みを検出するのに最適な TAP 蛍光プローブを決定する。

ついで最適 TAP 型蛍光プローブを導入した細菌由来のシデロフォアを化学合成し、鉄イオンセンサーとしての機能についても検討する。

最後に、実際に生きた細菌に蛍光シデロフォア・鉄錯体を取り込ませる。この取り込みによる蛍光変化を観測し、新たな細菌検出法としての可能性を明らかにする。

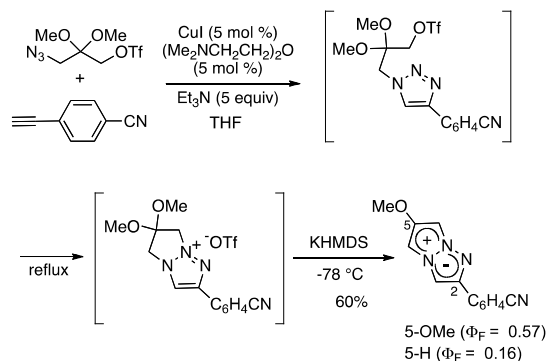


トリアザペンタレン (TAP) <極小蛍光発色団>

4. 研究成果

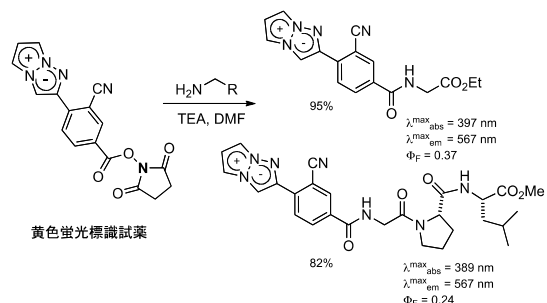
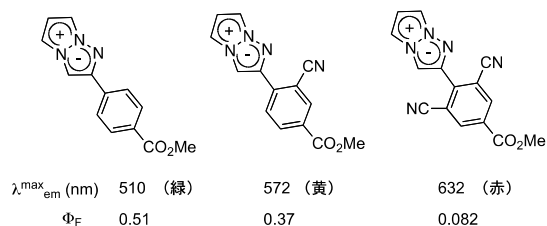
(1) 新規蛍光分子 TAP を新たな機能性蛍光プローブとして展開するために、まずは蛍光波長を赤色領域まで拡張させることを目的

として検討を行った。Push-Pull 効果による長波長シフトを期待して、TAP の 5 位に電子供与性の置換基を導入することを試み、以下に示す 5 位置換基導入体の one-pot 合成法を確立した。



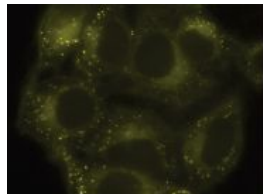
種々の置換基を 5 位に導入し、その蛍光を測定したところ、期待した長波長シフトは観測されなかったが、蛍光光度が大幅に増大することが明らかとなった。これにより、TAP 誘導体は、5 位で蛍光強度を、2 位で蛍光波長を制御できる画期的な蛍光発色団であることが明らかとなった。

5 位置換基導入による蛍光波長の変化は観測されなかったことから、2 位ベンゼン環上の電子密度をより減少させることによって、蛍光波長をより長波長へとシフトさせることを試みた。すなわち、ベンゼン環上の *o* 位に、立体的に小さくかつ強い電子求引性を示すシアノ基を導入したところ、シアノ基を一つ導入した誘導体は黄色の蛍光色を示し、二つ導入した誘導体では赤色の蛍光色を示した。この黄色の誘導体は、メチルエステル部位を *N*-ヒドロキシサクシニミド体へと変換することで、アミンの蛍光標識試薬として一般化することに成功した。この標識試薬は、種々のアミノ酸やペプチドのアミノ基と円滑に反応し、効率良く蛍光標識化できることが明らかとなった。



なお、この黄色蛍光 TAP 誘導体は、水中では殆ど光らなかったが、脂溶性環境では強い蛍光を示した。その環境応答性から、本 TAP 誘導体は、細胞に取り込まれることで強い蛍光を発する望む蛍光プローブとして働くことが期待できた。

(2) 細胞に取り込まれることで、蛍光強度が大幅に変化する



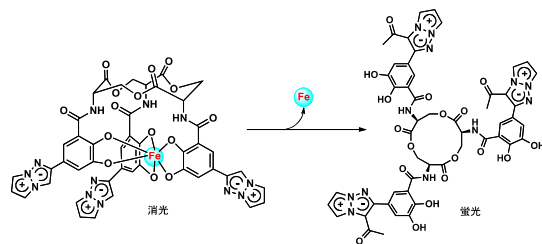
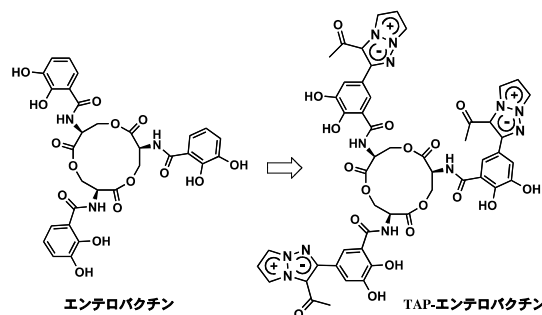
か調べるために、先の黄色蛍光 TAP を種々の細胞に処理したところ、TAP 誘導体は円滑に細胞内へ取り込まれ、細胞内からの黄色蛍光が容易に観測出来た。これより、黄色蛍光 TAP 誘導体は、細胞に取り込まれる前（水中）では全く光らず、細胞内へ取り込まれることによって強い蛍光を発する、取り込み検出プローブとして機能することが明らかとなり、細菌の取り込みを検出できる蛍光プローブを得ることに成功した。なお、この取り込みによる細胞毒性は全く観測されなかったことから、TAP は他の生物活性分子の機能解明にも有効な小型蛍光標識基であることが明らかとなっている。

(3) 取り込み検出プローブが作製できたことから、次に細菌のシデロフォアの化学合成と TAP の導入を検討した。シデロフォアとしては、重篤な食中毒を引き起こす腸炎ピブリオが分泌するピブリオフィリンと、サルモネラ菌が分泌するエンテロバクチンを標的とした。まず、鉄イオンに対する親和性が最も強いとされているエンテロバクチンへの TAP 導入を試みた。

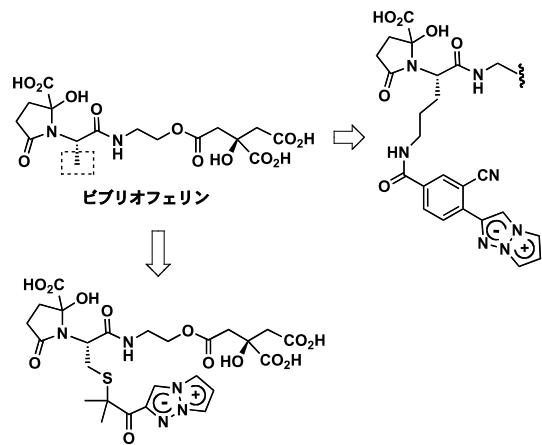
基本骨格となるセリンの 3 量体は セリン-β-ラクトンの 3 量化反応によって容易に合成できた。次に、TAP を導入したカテコールユニットとの縮合反応を行ったところ、TAP が容易に分解し、単離・精製が困難であることが分かった。そこで、TAP 上の電子密度を低下させる目的で、TAP の 3 位にアセチル基を導入した誘導体を用いたところ、望む TAP 導入エンテロバクチンを得ることに成功した。

TAP-エンテロバクチンはアルコール溶媒中（水に不溶）で弱い蛍光を発していたが、鉄イオンを加えるとその蛍光は消失した。当初は鉄イオンとの錯体形成によって、蛍光色を変化させ鉄イオンセンサーとして働くことを期待したが、蛍光が消失する結果となった。しかしながら、本蛍光プローブは鉄イオンとの錯体を形成している間は消光しているものの、鉄イオンを放出することで蛍光が復活すると期待できる。これは、エンテロバクチン・鉄錯体が細菌内に取り込まれた後、どの段階で鉄イオンを切り離しているかを知る画期的なプローブとなる。また、細菌に取り込まれることで、消光から蛍光へと変化

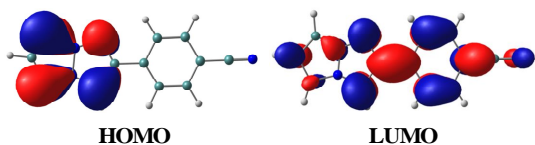
することから、細菌による取り込みを検知できる、望みのプローブとして機能することが明らかとなった。



ついで、ピブリオフィリンへの TAP 導入を試みた。TAP を導入する部位としては、鉄錯体形成に影響を及ぼさないと考えられるメチル基の先に導入することを試みた。そこで、アラニン部位をリシンやシステインなどに変更し、それらの側鎖官能基を介して TAP を導入することとした。まずはクエン酸部位の不斉合成が必要となったが、リンゴ酸をテンプレートとする不斉アリル化反応を駆使することで、クエン酸部位の不斉合成を達成した。ついで、アラニンに代わる種々のアミノ酸とクエン酸とをエタノールアミンを介して連結し、最後にケトグルタル酸部位との縮合によって、ピブリオフィリンの誘導体を得た。システインのチオール残基を介して TAP を導入した基質は痕跡量しか得られなかったため、リシンを介して黄色蛍光 TAP を導入した誘導体を合成した。現在、このものの精製法を検討中である。



また TAP 類は、トリアザペンタレン骨格から 2 位置換基への charge-transfer によって励起されていることを DFT 計算より明らかにした。



以上、現在までに 2 種の TAP 導入シデロフォアの化学合成に成功したことから、今後は実際に生きた細菌による合成シデロフォアの取り込み実験を行い、本細菌同定の新原理が実際に適用可能について検証を行う。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

- 1) M. Shibata, R. Fuchigami, T. Kotaka, K. Namba, K. Tanino. Acid-catalyzed [4+3] cycloaddition reaction of *N*-nosyl pyrroles. *Tetrahedron*, **2015**, *71*, 4495-4499. (査読有)
- 2) K. Namba, A. Osawa, A. Nakayama, A. Mera, F. Tano, Y. Chuman, E. Sakuda, T. Taketsugu, K. Sakaguchi, N. Kitamura, K. Tanino. Synthesis of Yellow and Red Fluorescent 1,3a,6a-Triazapentalene and Theoretical Investigation of Optical Properties. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1083-1093. (査読有)
- 3) 大澤歩, 難波康祐. 小型蛍光発色団 1,3a,6a-Triazapentalene. 社団法人日本化学会生体関連機能関連化学部会 NEWS LETTER. **2015**, *29*, 11-14. (査読なし)
- 4) Araki, K. Kousaka, K. Namba, Y. Murata, J. Murata. 2'-Deoxymugineic acid promotes growth of rice (*Oryza sativa* L.) by orchestrating iron and nitrate uptake processes under high pH conditions. *Plant. J.* **2015**, *81*, 233-246. (査読有)
- 5) Y. Yoshida, T. Mizuguchi, K. Namba. One-pot synthesis of tri- and tetrasubstituted pyridines by sequential ring-opening-cyclization-oxidation reaction of *N*-arylmethyl 3-aziridinylpropiolate esters. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *22*, 14550-14554. (査読有)
- 6) K. Namba, Y. Shobo, K. Fujimoto, I. Shoji, K. Tanino. *N*-Acyl-*N*-tosylhydrazine as a Synthone To Construct Tetrasubstituted Carbon Centers Possessing a Nitrogen Group. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 5196-5203. (査読有)
- 7) Y. Yoshida, T. Kasai, K. Namba. Total synthesis of (-)-HM-3 and (-)-HM-4 utilizing a palladium-catalyzed addition of an arylboronic acid to an allenic alcohol-Eschenmoser-Claisen rearrangement. *Synlett*, **2014**, *25*, 1160-1162. (査読有)
- 8) Y. Yoshida, K. Kinoshita, K. Namba. Synthesis of functionalized 2-vinyl-2,3-dihydropyrroles and 3-methylene-1,2,3,4-tetrahydropyridines by palladium-catalyzed cyclization of β -enaminocarbonyl compounds with allylic bisacetates. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2394-2403. (査読有)
- 9) 難波康祐, 実践的合成研究を基盤としたイネ科植物の鉄イオン取り込み機構に関する研究. *ファルマシア*, **2014**, *50*, 305-309. (査読なし)
- 10) 難波康祐, ムギネ酸類の実用的合成と機能解明プローブへの展開, 月刊ファインケミカル, **2014**, *43*, 15-22. (査読なし)
- 11) M. Yoshida, S. Ohno, K. Namba. Synthesis of substituted tetrahydrocyclobuta[b]benzofurans by palladium-catalyzed domino substitution-[2+2] cycloaddition of propargylic carbonates with 2-vinylphenols. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13597-13600. (査読有)
- 12) A. Osawa, A. Mera, K. Namba, K. Tanino. Transformations of 1-(Oxiranylmethyl)-1,2,3-triazoles into 2-(Oxiranylmethyl)-1,2,3-triazoles and Alkanenitriles. *Synlett*, **2013**, 207-210. (査読有)
- 13) K. Namba, A. Mera, A. Osawa, E. Sakuda, N. Kitamura, K. Tanino. One-pot Synthesis of Highly Fluorescent 2,5-Disubstituted-1,3a,6a-triazapentalene. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5554-5557. (査読有)
- 14) Y. Ohfune, K. Oe, K. Namba, T. Shinada, Total Synthesis of Manzacidins. An Overview and Perspective. *Heterocycles*, **2012**, *85*, 2617-2649. (査読有)
- 15) R. Fuchigami, K. Namba, K. Tanino, Concise [4+3] cycloaddition reaction of pyrroles leading to tropinone derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 5725-5728. (査読有)
- 16) H. Yamamoto, N. Yamasaki, S. Yoshidome, I. Sasaki, K. Namba, H. Imagawa, M. Nishizawa, M. Carbon-Nitrogen Bond Formation Between Allyl Silyl Ether and Hydrazide Promoted by Mercuric Triflate Catalyst. *Synlett*, **2012**, 1069-1073. (査読有)
- 17) K. Namba, M. Kanaki, H. Suto, M. Nishizawa, K. Tanino, K. Hg(OTf)₂-Catalyzed Vinylogous Semi-Pinacol Rearrangement Leading to 1,4-Dihydroquinolines. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1222-1225. (査読有)

〔学会発表〕(計 6 7 件)

招待講演のみ抜粋

1. 難波康祐「イネ科植物の鉄イオン取り込み機構に関する有機化学的研究」、難波康祐 日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 29 日、岡山大学(岡山県岡山市)
2. Kosuke Namba「Organic Chemistry Research on Iron Acquisition in Gramineous Plants」, Osaka City University International Conference, 2015 年 3 月 9 日、大阪市立大学理学部(大阪府大阪市)
3. 難波康祐「機能解明および実用化を指向した天然有機化合物の実践的合成研究」、慶応義塾大学理工学部講演会、2014 年 12 月 12 日、慶応義塾大学理工学部(神奈川県横浜市)
4. 難波康祐「機能解明や実用化を指向した微量天然有機化合物の実践的合成研究」、関西学院大学理工学部講演会、2014 年 11 月 28 日、関西学院大学理工学部(兵庫県三田市)
5. 難波康祐「ムギネ酸およびパラウアミンの合成研究～有機合成の実力向上を目指して～」有機合成化学協会中四国支部第 71 回パネル討論会：天然物合成を通してみる「有機合成の実力」、2014 年 11 月 21 日、愛媛大学工学部(愛媛県松山市)
6. 難波康祐「複雑な天然有機化合物の実践的合成研究」、熊本大学大学院特別講義、2014 年 11 月 18 日、熊本大学理学部(熊本県熊本市)
7. Kosuke Namba, 「Organic Chemistry Research on Iron Acquisition in Gramineous Plants」, *The 3rd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products*, 2014.10.28. Life Science Center (Osaka), Japan
8. 難波康祐「生物活性天然物の機能解明を指向した実践的合成研究」、武田薬品工業 CMC 研究センター、2014 年 9 月 16 日、武田薬品工業(大阪府大阪市)
9. Kosuke Namba「Organic Chemistry Research on Iron Acquisition in Gramineous Plants」Asubio Pharmaceuticals, Inc. 2014 年 9 月 1 日、アスピオファーマ(兵庫県神戸市)
10. 難波康祐「生物活性天然有機化合物の機能解明及び実用化を指向した実践的合成研究」、住友化学株式会社 健康・農業関連事業研究所、2014 年 6 月 13 日(兵庫県宝塚市)
11. 難波康祐「イネ科植物の鉄イオン取り込み機構に関する有機化学的研究」、理研シンポジウム-有機合成化学を起点とするものづくり戦略、2014 年 6 月 9 日、理化学研究所(埼玉県和光市)
12. 難波康祐、「実践的合成研究を基盤とした新規土壌改良素材をよび蛍光素材の開発」、新規素材探索研究会第 13 回セミナー、2014 年 6 月 6 日、新横浜フジビューホテル(神奈川県横浜市)
13. 難波康祐、「作用機序解明を指向した palau'amine の全合成研究」、日本化学会第 94 春季年会特別企画「有機合成化学を起点とするものづくり戦略」、2014 年 3 月 26 日、名古屋大学(愛知県名古屋市)

14. 難波康祐、「生体機能制御分子の創製へと繋ぐ実践的有機合成化学研究」岡山大学異分野融合研究支援事業「有機合成を基盤とした生体機能制御分子の創製」、2013 年 11 月 22 日、岡山大学(岡山県岡山市)
15. 難波康祐、「イネ科植物の鉄イオン取り込み機構に学ぶものづくり戦略」、第 3 回 CSJ 化学フェスタ 2013, ナノ機能への挑戦-材料, 素子, バイオ, そして未来-, 2013 年 10 月 21 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)
16. 難波康祐、「生物活性天然有機化合物の機能解明および実用化を指向した実践的合成研究」第 29 回若手化学者のための化学道場、2013 年 8 月 31 日、KKR ホテル(広島県広島市)
17. Kosuke Namba, 「Organic Chemistry Research on Iron Acquisition in Gramineous Plants」The First Asian Conference for "MONODUKURI" Strategy by Synthetic Organic Chemistry (ACMS), 2013, 7, 17, Southern Beach Hotel & Resort (Okinawa, Japan)
18. 難波康祐、「実践的合成研究を基盤としたイネ科植物の鉄イオン取り込み機構に関する研究」、有機合成化学講習会、2013 年 6 月 19 日、長井記念ホール(東京都渋谷区)
19. 難波康祐、「発蛍光型クリック反応の開発とその革新的蛍光特性」、大阪市立大学有機化学セミナー、2013 年 3 月 9 日、大阪市立大学(大阪府大阪市)
20. 難波康祐、「生物活性天然有機化合物の機能解明及び実用化を指向した実践的合成研究」、徳島大学薬学部講演会、2013 年 2 月 18 日(徳島県徳島市)
21. Kosuke Namba, 「Direct Synthesis of 1,3a,6a-Triazapentalene Derivatives and Their Interesting Fluorescent Properties.」Cambodian Malaysian Chemical Conference (CMCC), 2012.10.20, Siem Reap, Cambodia
22. Kosuke Namba, 「Organic Chemistry Research on Iron Acquisition in Gramineous Plants」17th Malaysian Chemical Congress 2012 (17MCC), 2012.10.16, Kuala Lumpur, Malaysia.

〔図書〕(計 2 件)

1. 第 12 章 機器分析による分析, 土川博史, 難波康祐, 中尾佳亮, 田中克典, 有機合成実験法ハンドブック 第 2 版, 公益社団法人有機合成化学協会監修, 丸善出版株式会社, in press (2015).
2. 第 4 章 Click 反応を利用した小型蛍光分子の合成, 難波康祐, 谷野圭持, ファインケミカルシリーズ「クリックケミストリー-基礎から実用まで-」, 高田十志和, 小山靖人, 深瀬浩一監修, 株式会社シーエムシー出版, 29-38 (総 260 p) (2014).

〔その他〕

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labobot/>

6．研究組織

(1)研究代表者

難波 康祐 (NAMBA Kosuke)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：50414123

(2)研究分担者

・村田 佳子 (MURATA Yoshiko)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・主席研究員

研究者番号：60256047

・小田 真隆 (ODA Masataka)

新潟大学大学院医歯薬系・准教授

研究者番号：00412403