

氏 名	大内 和希
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記号番号	博理工甲第975号
学位授与年月日	平成27年3月24日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	非共有結合を利用するシアル酸認識蛍光プローブの開発
論文審査委員	委員長 准教授 齋藤 伸吾 委員 教授 洪川 雅美 委員 准教授 藤原 隆司 委員 教授 松岡 浩司

## 論文の内容の要旨

第一章では、シアル酸認識の重要性と従来のシアル酸認識分子開発の戦略を述べた。シアル酸は、糖タンパク質や糖脂質の糖鎖末端に位置し、生体中に幅広く存在する。その役割は、細胞 - 細胞相互作用、宿主 - 病原体認識、タンパク質の血清半減期の調整など、様々な生物学的、生理学的現象や癌、シアル酸蓄積症などの疾病に関連するため、生体中で重要な糖分子である。そのため、シアル酸を分子認識する人工プローブの開発は、生体中における糖鎖プローブや診断試薬の開発に非常に重要である。これまで、糖分子の *cis*-ジオールとボロン酸との可逆的共有結合や糖分子との水素結合を利用した糖認識レセプターが数多く報告されているが、それらの多くは有機 - 水混合溶媒中で認識能を示すもの（水溶液中では機能しない）や蛍光の消光作用を利用しているものが多く（感度・選択性の面で発光増感系が有利）、現段階において、水溶液中でシアル酸を発光増感かつ高い安定性で認識するプローブの開発に至った例はなく、このようなプローブの開発が望まれていた。そこで本研究では、配位結合、水素結合および疎水性相互作用などの非共有結合的な化学相互作用を協同的に機能するように空間配置することで、シアル酸分子を水溶液中で特異的に認識する分子素子の開発を目的とし、二つの分子論的アプローチを試みた。

第二章では、ランタノイド (Ln) 錯体の配位空間を制御したシアル酸認識素子の開発を行った。これは、水溶性 Ln 錯体中の配位水分子と糖分子との配位子交換反応に基づく発光増感系である。まず、3種類の大環状ポリアミノカルボン酸配位子 (ABNOTA, ABDO3A および ABPCTA) の Ln 錯体を用いてシアル酸認識能の調査を行った (図1)。特に、六座大環状ポリアミノカルボン酸である Ln<sup>3+</sup>-ABNOTA 錯体はシアル酸に対し従来にはない高い熱力学的安定性と選択性 (安定度定数  $K=10^{35} \text{ M}^{-1}$ , 通常ボロン酸プローブでは  $10^{12} \sim 2 \text{ M}^{-1}$ ) を示すことを見出した。Ln<sup>3+</sup>-ABNOTA 錯体を用いた場合、シアル酸の検出限界と定量限界 (それぞれ  $1.5 \times 10^5 \text{ M}$ ,  $4.9 \times 10^5 \text{ M}$ ) は、健常者の血清シアル酸濃度 (約  $2 \times 10^4 \text{ M}$ ) と比較して低濃度であり、Ln<sup>3+</sup>-ABNOTA 系が血清のような実サンプルに適用できる可能性を示した。また、Tb<sup>3+</sup>-ABNOTA 錯体の発光寿命測定により、癌マーカーとしても利用されているタンパク質であるムチンの糖鎖上のシアル酸を認識可能であることを示した。さらに、シアル酸含有量の異なるムチン同士でそれぞれの発光寿命に有意な差 ( $1.44 \pm 0.02 \text{ ms}$  と  $1.391 \pm 0.008 \text{ ms}$ ) が得られたことから、シアル酸含有量の違いによりムチンの種類を判別でき

る可能性も示唆した。

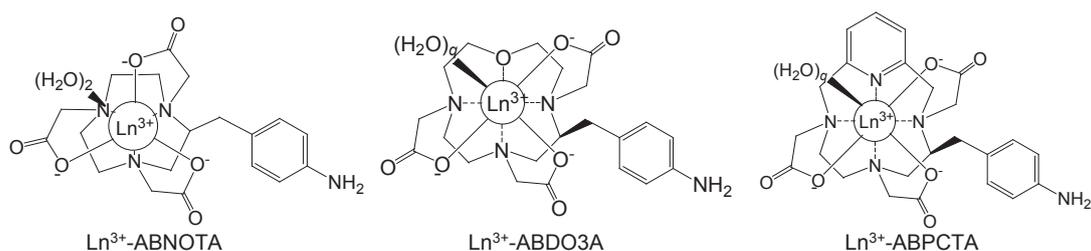


図1  $\text{Ln}^{3+}$ -ABNOTA,  $\text{Ln}^{3+}$ -ABDO3A および  $\text{Ln}^{3+}$ -ABPCTA の化学構造。

第三章では、特に  $\text{Ln}^{3+}$ -ABNOTA 錯体のシアル酸認識機構の解明を行った。錯体の酸解離定数、発光寿命および  $^1\text{H-NMR}$  の測定から、この特異的認識能は、中心金属の第一配位圏でのシアル酸分子中のアセトアミド基酸素原子の単座配位結合と、第二配位圏での  $\text{Ln}$  錯体の配位水の酸解離 ( $\text{p}K_{\text{a}}=9.44$ ) によって生じたヒドロキシ基とシアル酸中のグリセロール基間の水素結合との相乗効果により得られることが判明した。この機構は、シアル酸の配位サイトの精密な制御によって初めて得られた特有なものであり、従来にはない認識機構である (図2)。

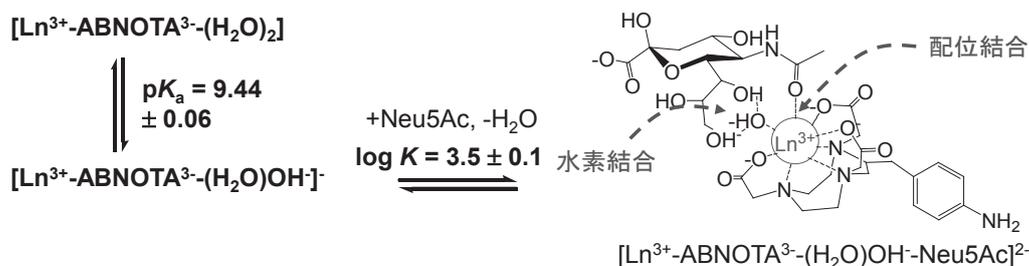


図2  $\text{Ln}^{3+}$ -ABNOTA 錯体のシアル酸認識機構の推定図。

第四章では、異なるアルキル修飾鎖を有するフェニルボロン酸修飾型スカリリウム色素 (SQ-BA) 群を開発し、その単糖分子への蛍光応答を、生体試料中のシアル酸の多変量判別分析 (MDA) に応用した。SQ-BA 色素は、水溶液中で  $\pi$ - $\pi$  スタッキングおよび疎水性相互作用を駆動力とする会合体を形成し、SQ-BA 由来の蛍光は消光しているが、糖分子と結合することで親水性を増大し、会合体が解離して SQ-BA 単量体-糖分子錯体を形成することで、強い蛍光を示す発光増感系である。SQ-BA 分子中のシアニン基に修飾したアルキル鎖長を変化させることで、疎水性相互作用を制御し、剛健で解離しにくい  $H$ -会合体 (シアル酸と反応しない) から柔弱で横滑り可能な  $J$ -会合体 (シアル酸と多点相互作用する) までを創出し、シアル酸と 2 箇所結合する安定な 1:2 錯体の形成に成功した (図3, 安定度定数  $K=10^{17} \text{ M}^{-1}$ , その他の単糖とは反応しない)。4 種類の SQ-BA 色素群を、ヒト尿試料中のシアル酸の MDA へと応用し、健常者 (シアル酸濃度  $\sim 0.3 \text{ mM}$ ) とシアル酸蓄積症 (シアル酸濃度  $2 \text{ mM}$  以上) を想定した異常尿の判別に成功した。この研究で開発した手法は、糖分子が反応するボロン酸基を化学修飾するのではなく、反応サイトから離れたアルキル鎖長を変化させることで、分子会合体形状を変化させてシアル酸選択性を与えたという意味で新規性のあるアプローチである。また、発光増感系プローブ分子を用いて生体実試料中のシアル酸を、糖分子同士の空間分離をすることなく MDA に初めて成功したという点でも有用である。

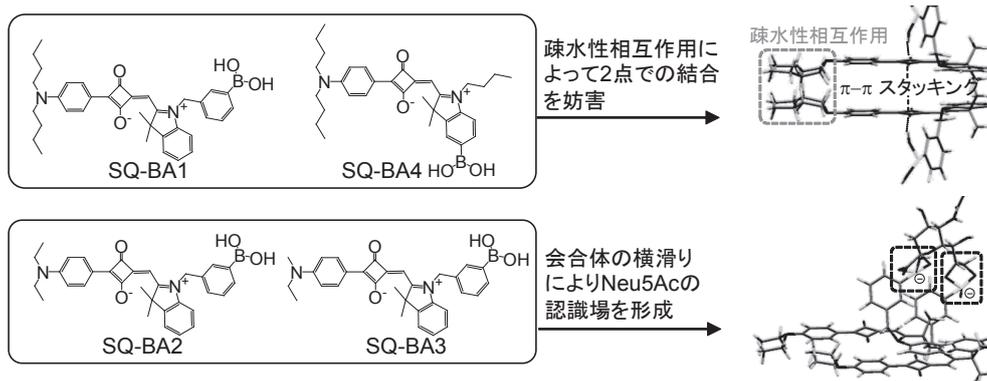


図3 SQ-BA色素のシアル酸認識機構の推定図.

以上のように、非共有結合的な化学相互作用を協同的に機能するように空間配置することによる分子認識場（配位結合と水素結合の配置，分子会合体形状）を精密に制御することで，これまで特異的分子認識が困難であったシアル酸に対して二種類のアプローチで認識系を与えることに成功した．今後，このような独自のアプローチによって，より認識能の高い糖鎖認識分子素子の開発やMDA用試薬の開発が可能と考える．

## 論文の審査結果の要旨

第一章では、陰イオン性単糖であるシアル酸認識の重要性と従来のシアル酸認識分子の設計戦略を述べた。シアル酸は、糖タンパク質や糖脂質の糖鎖末端に位置し、生体中に幅広く存在する。その役割は、様々な生物学的、生理学的現象や疾病に関連するため、生体中で重要な糖分子である。特に、Neu5Acを含むオリゴ糖であるシアリルルイス a やシアリルルイス x は、腫瘍細胞表面に強く発現することが知られ、腫瘍マーカーの候補となる。また、シアル酸の代謝異常として、シアル酸蓄積症 (SSD) があり、尿中のシアル酸濃度により診断されている。そのため、シアル酸を分子認識する人工プローブの開発は、生体中における糖鎖プローブや診断試薬の開発に非常に重要である。これまで、糖分子の *cis*- ジオールとボロン酸との可逆的共有結合や糖分子との水素結合を利用した糖認識レセプターが数多く報告されているが、それらの多くは有機 - 水混合溶媒中で認識能を示すもの (水溶媒中では機能しない) や蛍光の消光作用を利用しているものが多く (感度・選択性の面で発光増感系が有利)、現段階において、水溶液中でシアル酸を発光増感で高い安定度定数で認識するプローブの開発に至った例はなく、このようなプローブの開発が望まれていた。

本研究では、配位結合、水素結合および疎水性相互作用などの非共有結合的な化学相互作用を協同的に機能するように空間配置することで、シアル酸分子を水溶液中で特異的に認識する分子素子の開発を目的とし、二つの分子論的アプローチを試みた。一つは、A) ランタノイド (Ln) 錯体の配位空間を制御したシアル酸認識分子素子の開発である。まず、Ln-六座および七座芳香族大環状ポリアミノカルボン酸錯体のシアル酸認識能の調査を行った (第二章)。次に、最も認識性能の高かった Ln-六座芳香族大環状ポリアミノカルボン酸錯体 (Ln-ABNOTA) のシアル酸認識機構の解明を行った (第三章)。もう一つの戦略は、B) 異なるアルキル修飾鎖を有するフェニルボロン酸修飾型スカリリウム色素 (SQ-BA) を用いる多変量判別分析 (MDA) 用プローブの開発である (第四章)。さらに、第五章では、将来の展望として ABNOTA をベースとする新規多核錯体の合成およびそのシアル酸認識能の評価についての予備実験結果を述べるとともに本研究を総括している。

第二章では、「Ln 錯体の配位空間を制御したシアル酸認識素子の開発」の研究成果について述べている。これは、エネルギー移動発光する水溶性 Ln 錯体中の配位水分子と糖分子との配位子交換反応に基づく発光増感系である。まず、大環状型の 1,4,7- トリアザシクロノナン -1,4,7- 三酢酸 (NOTA)、1- オキサ -4,7,10- トリアザシクロドデカン -4,7,10- 三酢酸 (DO3A)、3,6,9,15- テトラアザビシクロ [9.3.1] ペンタデカ -1(15),11,13- トリエン -3,6,9- 三酢酸 (PCTA) 骨格にアミノベンジル基を付与した 4- アミノベンジル -NOTA (ABNOTA)、4- アミノベンジル -DO3A (ABDO3A)、4- アミノベンジル -PCTA (ABPCTA) を用い、その Ln 錯体の残余配位座を利用して単糖および二糖類の分子認識を試みた。その結果、Ln-ABNOTA 錯体系で強い発光増感を観測し、特に、 $Dy^{3+}$ -ABNOTA-Neu5Ac 錯体の増感は肉眼でも確認できるほど大きく、シアル酸に対し従来にはない高い熱力学的安定性と選択性 (安定度定数  $K = 10^{35} M^{-1}$ 、通常のボロン酸プローブでは  $10^{12} \sim 2 M^{-1}$ ) を示すことを見出した。また、シアル酸の検出限界と定量限界 (それぞれ  $1.5 \times 10^{-5} M$ ,  $4.9 \times 10^{-5} M$ ) は、健常者の血清シアル酸濃度 (約  $2 \times 10^{-4} M$ ) と比較して低濃度であり、 $Ln^{3+}$ -ABNOTA 系が血清のような実サンプルに適用できる可能性を示した。このように発光増感により Neu5Ac を特異的に認識可能でかつ視覚的に確認された例は過去にない。

第三章では、特にシアル酸認識能の高かった  $Ln^{3+}$ -ABNOTA 錯体のシアル酸認識機構の解明を行っている。

キャピラリー電気泳動法で錯体の酸解離定数を，発光寿命測定によって配位水数を， $^1\text{H-NMR}$  測定から配位状態を調査した．その結果，シアル酸に対する特異的な認識は，中心金属の第一配位圏への Neu5Ac 中アセトアミド基の酸素原子の単座配位結合と，Ln 錯体中の酸解離により生じたヒドロキシル基と Neu5Ac 中のグリセロール基間の第二配位圏での水素結合の 2 種類の結合の相乗効果により得られることを明らかとした．この反応機構は， $\text{Ln}^{3+}$ -ABNOTA 錯体中の配位水の酸解離化学種がシアル酸に対する認識能を示すという，報告例のない新しい機構であり，配位化学的にも興味深い結果であった．

第四章では，異なるアルキル修飾鎖を有する SQ-BA 色素を用いる MDA 用プローブの開発を行っている．SQ-BA 色素は，水溶液中で  $\pi$ - $\pi$  スタッキングおよび疎水性相互作用を駆動力とする会合体として消光した状態にあるが，単糖分子と錯形成することで会合体が解離して強い蛍光性の SQ-BA 単量体-糖分子錯体を形成する．ここで，SQ-BA 分子中のシアニン基に修飾したアルキル鎖長を変化させた分子群を用いることとした．すなわち，アルキル鎖長の変化によって疎水性相互作用を制御し，剛健で解離しにくい  $H$ -会合体（シアル酸と反応しない）から柔弱で横滑り可能な  $J$ -会合体（シアル酸と多点相互作用する）までを形成させた．その結果，シアル酸と 2 箇所まで結合する安定な 1:2 錯体を形成させることに成功した（安定度定数  $K = 10^{17} \text{ M}^{-1}$ ，その他の単糖とは反応しない）．4 種類の SQ-BA 色素群を化学ライブラリーとして，ヒト尿試料中のシアル酸の MDA へと応用したところ，健常者（シアル酸濃度  $\sim 0.3 \text{ mM}$ ）とシアル酸蓄積症（シアル酸濃度  $2 \text{ mM}$  以上）を想定した異常尿の判別に成功した．この分子系では，糖分子と反応するボロン酸基を化学修飾するのではなく，反応サイトからある程度離れたアルキル鎖長を変化させることで，分子会合体形状をソフトに変化させてシアル酸選択性を与えたという点で新規性のあるアプローチである．また，長波長領域（ $\sim 700 \text{ nm}$ ）での発光増感プローブ分子系を用いて生体実試料中のシアル酸を，糖分子同士の空間分離をすることなく MDA に初めて成功したという点でも意義が高いといえる．

本論文は，これまで特異的分子認識が困難であったシアル酸分子に対して二種類のアプローチで認識系を与えることに成功した．本論文の第二章および第三章の内容は，第一著者として査読付き英語論文誌 *Inorganic Chemistry* 誌に発表し，第四章の内容は，第一著者として査読付き英語論文誌 *Analytical Chemistry* 誌に発表している．以上の結果から，本審査委員会は，本学位論文を博士（工学）の学位授与にふさわしいものと判断し，合格と判定した．