

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

2015年3月

埼玉大学大学院理工学研究科（博士後期課程）

理工学専攻（主指導教員 齋藤 伸吾）

大内 和希

目次

| | |
|---|----|
| 第一章 序論 | 4 |
| 1 シアル酸分子認識の意義 | 4 |
| 1-1 シアル酸とは | 4 |
| 1-2 シアロオリゴ糖 | 4 |
| 1-3 シアロタンパク質 | 5 |
| 1-4 シアロ糖脂質 | 6 |
| 1-5 ジ・オリゴ・ポリシアル酸の機能 | 7 |
| 1-6 シアル酸と疾病 | 7 |
| 2 生体中における糖分子認識 | 8 |
| 3 人工プローブによる糖分子認識の一般的な戦略 | 9 |
| 3-1 疎水性・水素結合を利用するプローブ | 10 |
| 3-2 共有結合を利用するプローブ | 10 |
| 3-3 多点相互作用を利用するプローブ | 11 |
| 3-3-1 ビスボロン酸プローブ | 11 |
| 3-3-2 異なる種類の相互作用を組み合わせたプローブ | 12 |
| 4 多変量判別分析による糖の判別 | 14 |
| 4-1 多変量判別分析の理論 | 14 |
| 4-2 多変量判別に分析による糖分子の判別 | 17 |
| 5 本研究でのプローブの分子設計 | 17 |
| 5-1 ランタノイド (Ln) 錯体の利用 | 17 |
| 5-1-1 発光性 Ln イオン | 18 |
| 5-1-2 Ln 錯体のエネルギー移動発光 | 19 |
| 5-1-3 Ln 錯体による糖認識過程 | 19 |
| 5-2 フェニルボロン酸修飾型スカリリウム色素の利用 | 20 |
| 5-2-1 スカリリウム色素 | 20 |
| 5-2-2 フェニルボロン酸修飾型スカリリウム色素による糖認識過程 | 21 |
| 6 目的 | 22 |
| 7 参考文献 | 23 |
| | |
| 第二章 ランタノイド - 六座および七座大環状ポリアザカルボン酸錯体によるシアル酸認識 | 25 |
| 1 緒言 | 25 |
| 2 実験 | 26 |
| 2-1 試薬 | 26 |
| 2-2 操作手順 | 28 |
| 2-2-1 蛍光スペクトルの測定 | 28 |

| | |
|---|----|
| 2-2-2 発光寿命の測定 | 28 |
| 3 結果と考察 | 28 |
| 3-1 単糖分子の添加による Ln 錯体の発光増感 | 28 |
| 3-2 糖分子による発光増感の pH 依存性 | 30 |
| 3-3 シアル酸に対する発光増感 | 32 |
| 3-4 Ln ³⁺ -ABNOTA 錯体のエネルギー移動発光の糖分子による増感 | 34 |
| 3-5 Ln ³⁺ -ABNOTA 錯体と糖分子との熱力学的安定性 | 35 |
| 3-6 シアル酸分子の検出限界と定量限界 | 36 |
| 3-7 ムチン糖鎖上のシアル酸認識 | 38 |
| 3-7-1 Ln 錯体の発光増感による MUC 糖鎖上のシアル酸認識 | 38 |
| 3-7-2 発光寿命測定による MUC 糖鎖上のシアル酸認識 | 40 |
| 4 結言 | 41 |
| 5 参考文献 | 42 |
| | |
| 第三章 Ln-ABNOTA 錯体のシアル酸認識機構の解明 | 43 |
| 1 緒言 | 43 |
| 2 実験 | 43 |
| 2-1 試薬 | 43 |
| 2-2 操作手順 | 43 |
| 2-2-1 電気移動度の測定 | 43 |
| 2-2-2 ¹ H-NMR スペクトルの測定 | 43 |
| 3 結果と考察 | 44 |
| 3-1 酸解離定数の測定 | 44 |
| 3-2 発光寿命の測定 | 49 |
| 3-3 シアル酸の配位様式の調査 | 50 |
| 3-4 シアル酸認識の推定機構 | 53 |
| 4 結言 | 53 |
| 5 参考文献 | 54 |
| | |
| 第四章 ボロン酸修飾型スカリリウム色素 (SQ-BA) 群を利用するシアル酸分子の判別分 析法の開発 | 56 |
| 1 緒言 | 56 |
| 2 実験 | 57 |
| 2-1 試薬 | 57 |
| 2-2 SQ-BA 色素の合成と同定 | 58 |
| 1-2-1 SQ-BA2 の合成と同定 | 58 |
| 1-2-2 SQ-BA3 の合成と同定 | 59 |
| 1-2-3 SQ-BA4 の合成と同定 | 60 |

| | |
|--|----|
| 1-2-4 SQ-BA 色素保存溶液の調製 | 62 |
| 2-3 操作手順 | 62 |
| 2-3-1 蛍光スペクトルの測定 | 62 |
| 2-3-2 UV-vis 吸収スペクトルの測定 | 62 |
| 2-3-3 ¹ H-NMR スペクトルの測定 | 62 |
| 2-3-4 MDA | 62 |
| 3 結果と考察 | 63 |
| 3-1 SQ-BA および糖 - SQ-BA 錯体の UV-vis および蛍光スペクトル | 63 |
| 3-2 SQ-BA および糖 - SQ-BA 錯体の ¹ H-NMR スペクトル | 66 |
| 3-3 シアル酸認識の推定機構 | 68 |
| 3-4 SQ-BA 色素の発光強度の pH 依存性およびその平衡解析 | 69 |
| 3-5 SQ-BA と糖分子との安定度定数 | 73 |
| 3-5-1 1:1Fru-SQ-BA の安定度定数の平衡解析 | 73 |
| 3-5-2 Neu5Ac-(SQ-BA) ₂ および Neu5Ac-SQ-BA 錯体の安定度定数の平衡 解析 | 76 |
| 3-5-3 糖-SQ-BA 錯体の安定度定数と文献値との比較 | 79 |
| 3-6 多変量判別分析による尿中シアル酸の判別 | 80 |
| 3-6-1 尿試料の蛍光応答 | 81 |
| 3-6-2 尿中シアル酸の判別分析 | 83 |
| 3-6-3 MDA の精度に関する考察 | 83 |
| 4 結言 | 84 |
| 5 参考文献 | 89 |
| 第五章 総括と展望 | 90 |
| 後記 | 95 |
| 付記 | 95 |
| 謝辞 | 96 |
| 付録 | 97 |

第一章 序論

1 シアル酸分子認識の意義

本研究ではシアル酸分子認識プローブの開発をするが、ここではその意義および一般的なシアル酸の分子認識反応について述べる。

1-1 シアル酸とは

糖鎖の重要性が認知され、近年、糖鎖生物学 (Glycobiology) は急速に発展している分野である。その中でも、シアル酸含有糖鎖 (シアロ糖鎖) の生物学であるシアロ生物学 (Sialobiology) は、大きな注目を浴び、多くの研究者によって研究される挑戦的かつ魅力的な分野である。

シアル酸は *N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac), *N*-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc), デアミノノイラミン酸 (KDN) のアセチル化, 硫酸化, メチル化, ラクチル化などの置換体を含めた約 40 種類からなる陰イオン性の単糖分子であり (図 1-1), 生体中では, Neu5Ac が最も多く存在する。Neu5Ac は, 糖タンパク質, 糖脂質, 細胞膜中の糖鎖末端に位置することが多く, 様々な生物学的, 生理学的現象 (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) に関連するため, 生体中で最も重要なシアル酸の一つである¹⁻⁷。Neu5Ac は水溶液中で α -ピラノース型 (7.5%), β -ピラノース型 (92.1%) と非環状ケトン型 (0.4%) の平衡で存在する (図 1-1)⁸。 α -ピラノース型および β -ピラノース型のカルボキシル基の pK_a 値はそれぞれ 2.5, 2.6 である。一方, Neu5Ac 配糖体は, α -結合であり, $\alpha(2\rightarrow3)$ や $\alpha(2\rightarrow6)$ グルコシド結合を介してガラクトースや *N*-ガラクトサミンによく結合することが知られている⁹。

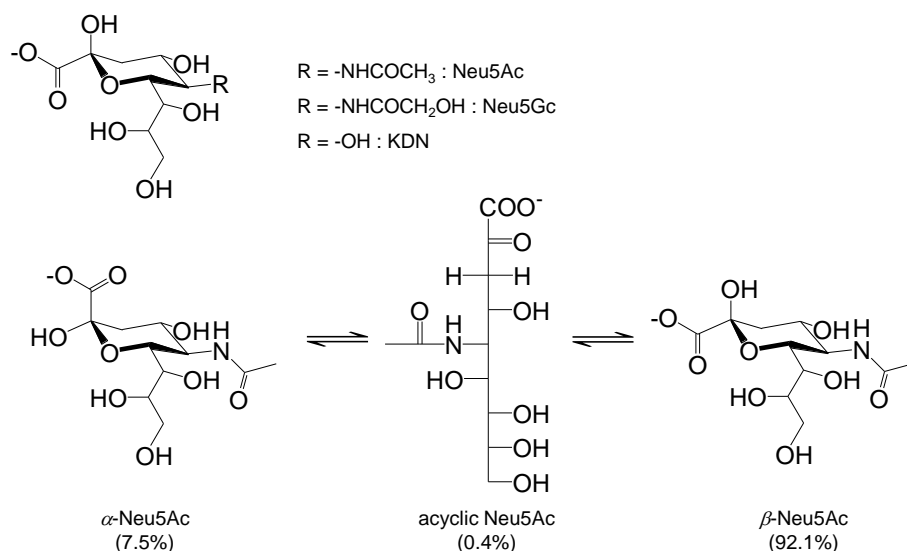


図 1-1 シアル酸の化学構造および Neu5Ac のアノマー平衡.

1-2 シアロオリゴ糖^{10,11}

Neu5Ac を含む糖鎖 (シアロ糖鎖) は腫瘍細胞表面に強く発現することが知られ, Neu5Ac

は腫瘍マーカーの候補となるため重要である。癌マーカーの代表的な例に、Neu5Acを含むオリゴ糖であるシアリルルイス a (sLea, 図 1-2) やシアリルルイス x (sLex, 図 1-2) がある。これらのオリゴ糖は、糖鎖性癌抗原として知られ、血液中に大量に発現する。そのため、癌の血清診断に応用されてきた。

sLea 抗原は、血液型抗原のルイス A 抗原 (Lea) にシアル酸転移酵素により、Neu5Ac が 2→3 結合した構造をしている。sLea 抗原の合成には、基幹領域の Galβ1→3GlcNAc のガラクトース (Gal) にシアル酸転移酵素により NeuAc が 2→3 結合し、シアリルルイス c (sLec) 抗原が形成する。次いで、sLec 抗原の GlcNAc にルイス抗原遺伝子酵素によりフコース (Fuc) が 1→4 結合し、sLea 抗原が合成される。癌マーカーの sLea 抗原は、膀胱癌、胆道系癌などで増加することが知られている。

sLex 抗原は、Lex 抗原に Neu5Ac が 2→3 結合した構造をしている。分化した正常の腺上皮細胞では、合成された sLex 抗原は、ABO 式血液型物質、Gal、GlcNAc や硫酸基などにより、多様な修飾を受け多様な糖鎖を発現している。例えば、sLex に GlcNAc が結合した構造をした sLex-i がある (図 1-2)。sLex 抗原系を測定する腫瘍マーカーには、SLX (sLex-i 抗原：FH-6 抗体で認識する糖鎖構造)、CSLEX (sLex 抗原、CSLEX-1 抗体で認識する糖鎖構造：乳癌の腫瘍マーカー)、NCC-ST-439 (NCC-ST-439 抗体で認識する糖鎖構造) がある。正常な上皮細胞では本来修飾される糖鎖が、癌化した上皮細胞では修飾されないため、多様な糖鎖が発現されなくなる。それにより、癌化した上皮細胞は、前駆物質から SLX (sLex 抗原) を多く産生するようになり、血液中 SLX 値が増加する。

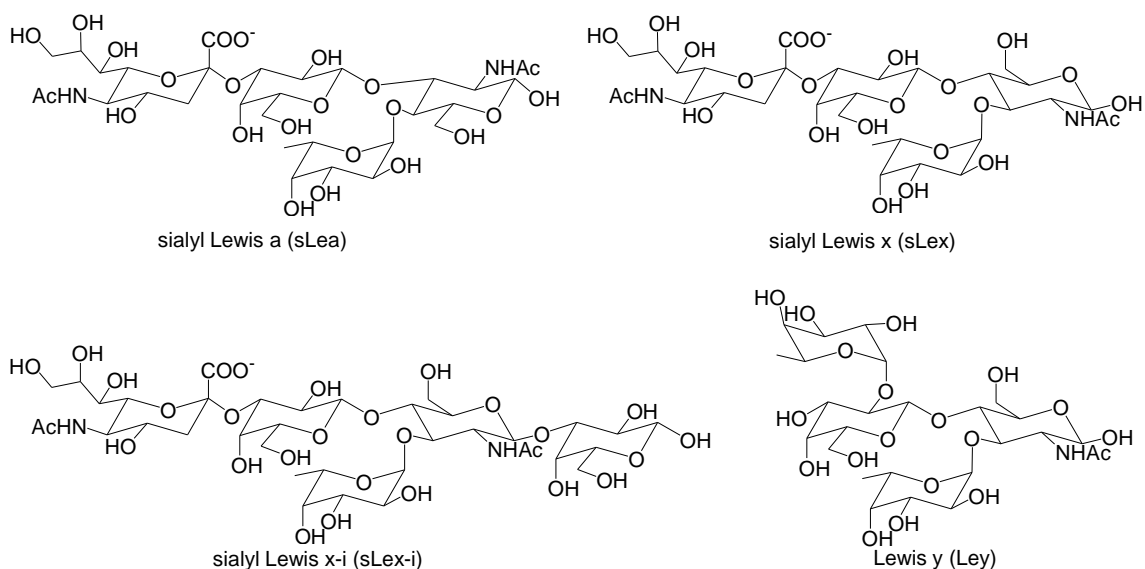


図 1-2 ルイスオリゴ糖の化学構造。

1-3 シアロタンパク質

タンパク質に代表される生体分子の量と糖鎖の配列の違いによる疾病の診断が有効であることが報告されている。その例として、トランスフェリン (Tf) という糖タンパク質がある。Tf には 1 分子あたりシアル酸分子が 1~6 分子含まれているものが存在し、シアル酸 4

分子が結合する Tf (テトラシアロ Tf) が最も多く存在する. 2 週間以上にわたって過剰にアルコールを摂取するとジシアロ Tf の割合が増大する. そのため, Tf 同士を分離することでアルコール摂取や治療中の外来患者の禁酒状況をモニタリングすることができる¹². また, ムチン 1 (MUC1, 図 1-3) という糖タンパク質がある. MUC1 は約 80% が糖鎖で構成される巨大タンパク質 (分子量 400~1000 kDa 以上) で, 糖鎖末端のシアル化の割合が癌の種類により異なるため, MUC1 同士の分離は, 癌の診断に有効であり, これらの高速分離検出法の開発が望まれている¹³⁻¹⁵.

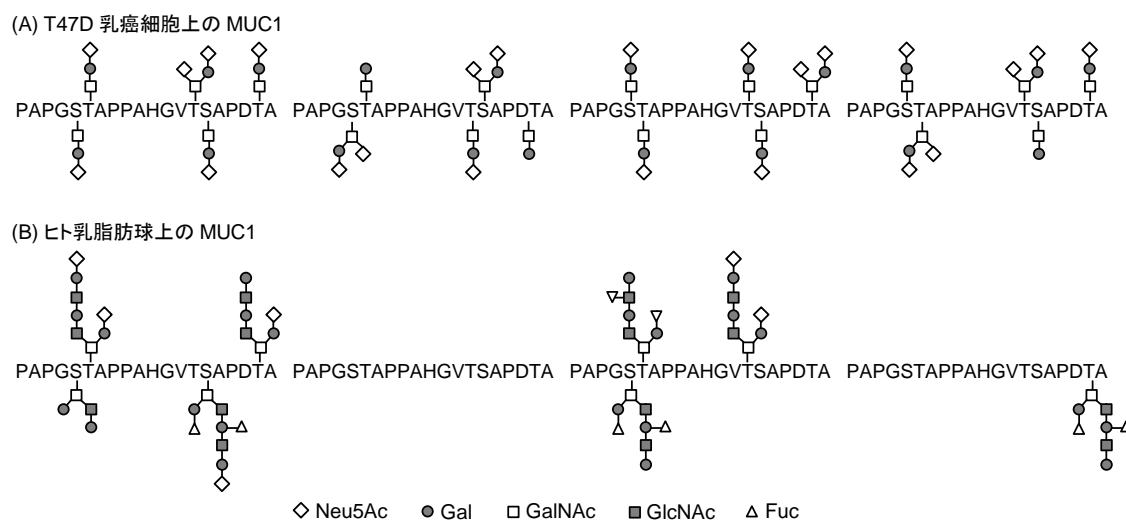


図 1-3 T47D 乳癌細胞上の MUC1 (A) とヒト乳脂肪球上の MUC1 (B) の特異的なグリコシル化.

1-4 シアロ脂質

シアル酸含有脂質であるガングリオシドも重要な物質である. ガングリオシドはシアル酸を糖鎖構造中に含むスフィンゴ糖脂質の総称である. スフィンゴ脂質はスフィンゴシン塩基の 1 級ヒドロキシル基がグリコシド結合により単糖またはオリゴ糖 (親水性部分) とアミノ基が脂肪酸とアミド結合したもの (疎水性部分) である. ガングリオシドはセラミド部分が脂質二重層に埋もれた形で, 細胞膜構成成分として広く分布し, 特に, 神経細胞のシナプス領域に豊富に存在する¹⁶. ガングリオシドは, 神経の発生と成長に必要不可欠であり, 神経の再生と修復という多機能な役割を持っている^{17,18}. 代表的なガングリオシドである GM1 (図 1-4) は, 多くの動物モデルで神経損傷と老化の転帰をもたらす機能を有している. また, ガングリオシドは外因性の細菌毒素やウイルスのレセプターとしても働く. 例えば, コレラ毒素は GM1 に結合する. また, 内因性のタンパク質がガングリオシドに結合する病気も知られている. アルツハイマー病は GM1 とアミロイド β タンパク質が複合体を形成し, 堆積することが原因であると報告されている^{19,20}. 早期型または家族型アルツハイマー病の場合, ガングリオシド濃度が灰白質で健常者の 58~70%, 前頭葉白質で 81% に減少する. 一方, 遅発性の場合, 側頭葉, 海馬, 前頭葉白質のみガングリオシド濃度が著しく減少する. そのため, GM1 を認識するプローブの開発は, アルツハイマー病の診断試薬

にも有効である。

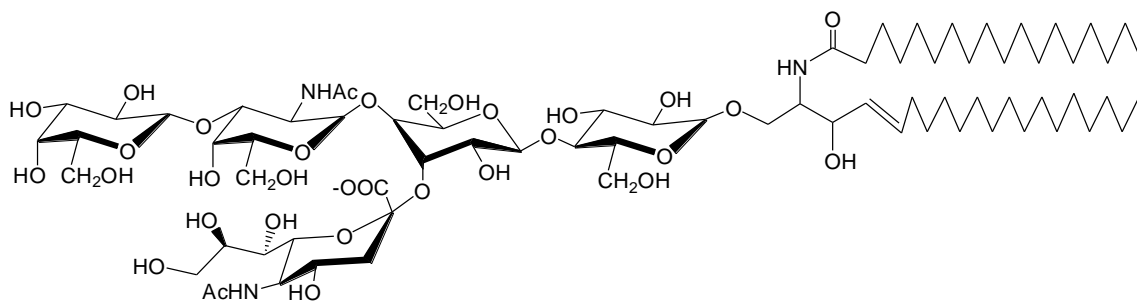


図 1-4 GM1 の化学構造.

1-5 ジ・オリゴ・ポリシアル酸の機能

これまで述べた複合糖質の末端シアル基は大部分がモノシアル酸である。糖鎖末端がジ・オリゴ・ポリシアル酸構造である複合糖質も重要な役割を果たしている^{21,22}。シアル酸が2残基、タンデムに結合した α -2,8結合ジシアル酸構造(図1-5)はガングリオシドではよくみられる構造単位であり、神経突起伸長をはじめ、細胞接着、細胞分化、シグナル伝達など、多くの生物学的機能を果たしていることが知られている。また、近年、ジ・オリゴ・ポリシアル酸構造が糖タンパク質においても存在していることが明らかとなった。しかし、ジ・オリゴ・ポリシアル酸含有等タンパク質の生物学的機能の完全な解明には至っていない。解明されつつある機能として、神経突起伸長に糖タンパク質上のジシアル酸構造が重要であることが見出されている。そのため、糖タンパク質におけるジ・オリゴシアル酸構造がガングリオシドで提唱されているような機能の一部を担っている可能性が高いといえる。

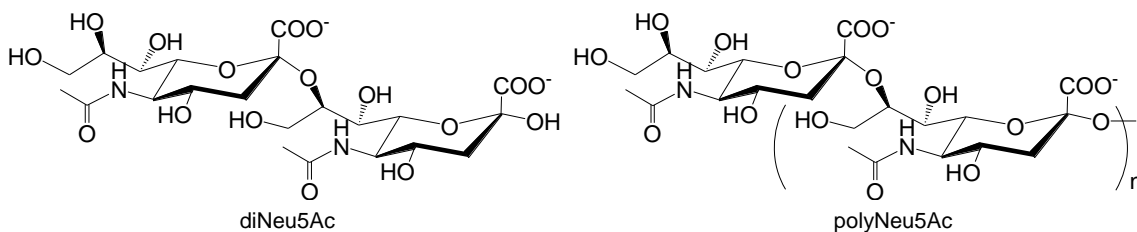


図 1-5 diNeu5Ac と polyNeu5Ac の化学構造.

1-6 シアル酸と疾病

癌マーカーの sLea 抗原は、膵管、胆管、胆嚢上皮、胃腸上皮の一部の細胞膜に局在し、膵管や胆管を通り消化管に排泄されている。癌化した細胞では、糖鎖合成の過程でガラクトース転移酵素の欠損や低下が起り、細胞内に Lea 抗原が大量に蓄積する。また、シアル酸転移酵素の活性化により、sLea 抗原が大量に産生されると推定されている。sLea 抗原は悪性疾患の場合、産生が非常に活発となり、腫瘍細胞の細胞膜のみならず胞質にも検出される。また、sLea 抗原は、腫瘍や炎症により膵臓や胆道系が閉塞し、消化管へ排泄され

ず膵管や胆管の内圧が上昇することによって、血中に逸脱し値が上昇する。従って、sLea 抗原は、癌などの悪性疾患に限らず慢性膵炎などの良性疾患でも増加する。sLea 抗原の陽性率は、食道癌 0%、胃癌 27%、大腸癌 37%、肝細胞癌 26%、胆道癌 59%、膵癌 83%、急性膵炎 10%、慢性膵炎 43%、急性肝炎 7%、慢性肝炎 11%、肝硬変 13%、胆石症 22%となっている。腫瘍マーカーの SLX (sLex-i 抗原) は、癌化に伴い、sLex 抗原の合成に関与するフコース転移酵素が活性化し増加する。SLX は、分化型腺癌で増加し、進行肺腺癌 (III 期, IV 期) では陽性率が高く、早期肺腺癌 (I 期, II 期) では低い。SLX は、気管支拡張症などの良性肺疾患でも上昇する。SLX の陽性率は、肺腺癌 45%、胃癌 13%、大腸癌 20%、肝癌 27%、胆道系癌 36%、膵癌 62%となっている¹¹。

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^{23,24}。SSD は、シアル酸のトランスポーターである膜タンパク質、シアリンの遺伝子異常によりシアル酸がリソソームに堆積することで発症する。SSD にはその症状の程度により Salla 病 (SD) と幼児性シアル酸蓄積症 (ISSD) が存在する。SD は、軽度～中等度運動および発達遅滞、体幹筋緊張低下、痙性、アテトーゼ、知能障害、てんかんなどが症状として現れる。この場合の尿中シアル酸濃度は健常者 (~0.3 mM)²⁵ の 10 倍程度と報告されている。ISSD は、早期乳児期発症で、重度の発達遅滞、粗な顔貌、全身性筋緊張低下、肝脾腫、重度の知能障害、心拡大をもち、合併症により早期小児期以前に死亡する。この場合の尿中シアル酸濃度は健常者の 100 倍以上と報告されている。

このようにシアル酸は、生体中でモノシアル酸だけではなくシアル酸重合体が存在し、また、それらを含む糖鎖がタンパク質や脂質と複合糖質を多種多様な形成しているため、様々な生物学的機能を有し、多くの疾病との関連性も大きい。そのため、シアル酸を選択的に認識する人工プローブの開発は、生体中糖鎖プローブ、新規診断試薬、様々な糖鎖配列分離試薬の開発に非常に重要である。

2 生体中における糖分子認識

生体中では糖鎖はレクチンと呼ばれるタンパク質で認識されている。レクチンは糖鎖と結合することで複合糖質の多様な糖鎖情報を細胞に伝達し、多岐にわたる生物機能を果たしている。レクチンは、細菌、植物、動物を問わず、広く細胞内に存在する。このレクチンの関与する現象として、感染、生体防御、免疫、受精、標的細胞へのターゲティング、細胞分化、細胞間接着、新生糖タンパク質の品質管理および細胞内選別輸送などがあげられるが、これらはレクチンのもつ多様な糖鎖結合特異性と速やかな結合および解離という固有の物理化学的性質により制御されている。単糖とレクチンの安定度定数は 10^4 M^{-1} 程度である。糖鎖やレクチンは、1 分子中に複数の結合部位を有していたり、分子集合体として存在していたりする場合が多く、糖鎖とレクチン間の多点 - 多点相互作用により安定度定数を高めている (10^6 M^{-1} 程度)。また、レクチンは、構成糖、糖鎖の基本骨格、側鎖の結合位置、アノマー構造の違いを認識することができ、その選択性は高い¹⁶。

代表的なレクチンとして、糖認識活性のために Ca^{2+} を必要とする C 型レクチン、動物界

に広く分布しガラクトースに特異性を示すガレクチン，リソソーム酵素の細胞内輸送に関わる P 型レクチンなどがある。C 型レクチンは糖分子のヒドロキシル基が 8 座の Ca^{2+} の残余配位座への配位結合とタンパク質側鎖との水素結合により糖分子を高い安定度定数で認識している (図 1-6 (A))。C 型レクチンの中には，細胞接着因子として機能しているセレクチンと呼ばれる動物レクチンがある。これは，E-, L-, P-セレクチンの 3 種が知られ，いずれも分子内に糖鎖認識ドメインを有し， Ca^{2+} 依存的に sLex を認識する。

リンパ球表面の L-セレクチンは高内皮細胞に発現しているシアリル-6-スルホ Lex と結合することでこれらの細胞間接着を担っている。L-セレクチンはほとんどの白血球に恒常的に発現している。E-セレクチンは炎症を起こしている血管内皮細胞上に発現し，それが顆粒球や単球を炎症箇所に集める役割を果たしている。血管内皮細胞が interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor-1 (TNF-1), エンドトキシンなどで刺激されると，数時間内に発現が誘導される。P-セレクチンは血小板の α 顆粒および内皮細胞の Weibel-Palade 体に含まれ，トロンビンの刺激などにより，細胞表面に発現する。P-セレクチンは PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand) 分子の sLex と N 末端側の硫酸化チロシン残基を合わせて認識する¹⁶。

セレクチンと sLex の相互作用は配位結合と水素結合によるものである (図 1-6 (B))。sLex 中の Fuc の 3-, 4-ヒドロキシ基は Ca^{2+} への配位結合とタンパク質側鎖との水素結合を形成する。sLex Gal 残基は Tyr94 および Glu92 と水素結合を形成する。Neu5Ac のカルボキシル基は Try48, 4-ヒドロキシ基は Ser99 と水素結合を形成する。各セレクチンと sLex との安定度定数は， $2.6 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (L-セレクチン)， $1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (E-セレクチン)， $1.3 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (P-セレクチン) である^{26,27}。このように生体中のタンパク質による糖鎖認識はおおよそ配位結合と水素結合で成り立っている。本研究では，C 型レクチンの糖認識サイトのように配位結合をシアル酸認識に利用しようと考えた。詳しい分子設計は本章 5 項で述べる。

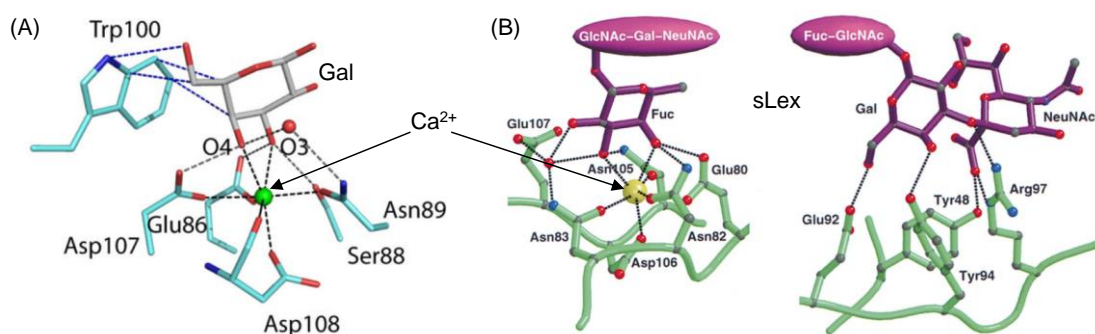


図 1-6 (A) 一般的な C 型レクチンとガラクトースの相互作用，(B) E-セレクチンと sLex の相互作用²⁶。

3 人工プローブによる糖分子認識の一般的な戦略

これまで多くの糖認識プローブが開発され，中性糖に対するプローブはある程度機能しているが，Neu5Ac に選択的なプローブの報告例は少ない。ここでは，一般的なシアル酸認識プローブ開発の戦略を述べる。

3-1 疎水性・水素結合を利用するプローブ

糖認識プローブの分子設計戦略として、糖認識タンパク質であるレクチンの結合モチーフを模倣し、疎水性相互作用および水素結合を利用するプローブが報告されている。Mazikらは Neu5Ac 含有リガンド - Neu5Ac 結合レクチン複合体の結晶構造を分析し、Neu5Ac とレクチンの結合を調査した²⁸。図 1-7 (A) より、観測された相互作用は、ポリオーマウイルスと Neu5Ac(α 2-3) Gal β 4Glc 間における、Neu5Ac アセトアミド基とタンパク質側鎖との水素結合、Neu5Ac カルボキシル基とアミノ酸との水素結合、Neu5Ac グリセロール基と正電荷を帯びたアミノ酸との水素結合、Neu5Ac カルボンキシル基とノイラミターゼとのイオン対形成である。これらの結果からプローブ 1-4 を設計・合成している (図 1-7 (B))。これらのプローブは、中性およびイオン性水素結合により Neu5Ac との錯体を安定化させている。また、中央のベンゼン環と糖 CHs との CH- π 相互作用により安定化を図っている。各プローブと Neu5Ac との安定度定数は、 10^3 M^{-1} オーダーと糖認識タンパク質と同程度の値が得られた。しかし、有機 - 水混合溶媒 (ジメチルスルホキシド - 水など) 中でのみ Neu5Ac と結合するため、水溶液中での糖認識が不可能という問題があり、本研究で目指す水溶液中でのシアル酸認識プローブの開発は困難である。

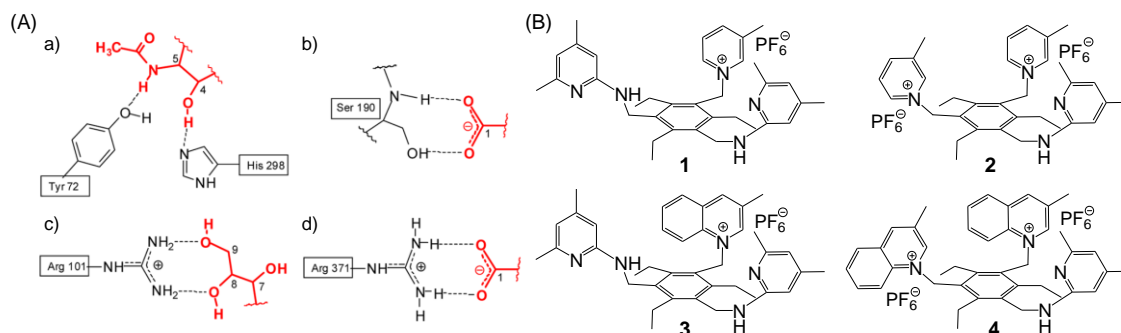


図 1-7 (A) Neu5Ac 含有リガンド - Neu5Ac 結合レクチン複合体の相互作用. (a) Neu5Ac (α 2-3) Gal β 4Glc とポリオーマウイルス間, (b, c) メチル α -シアロ基とアカゲザルロタウイルスヘマグルチニン間, (d) Neu5Ac とインフルエンザノイラミターゼ間. (B) プローブ 1-4 の化学構造²⁸.

3-2 共有結合を利用するプローブ

純粋な水溶液環境下で糖認識能を示す有効なモチーフとしてフェニルボロン酸構造がある。この種のプローブは糖分子の *cis*-ジオールとボロン酸との可逆共有結合を利用している²⁹⁻³²。ボロン酸は弱いルイス酸として働き、結果として、水分子と反応して中性三角平面構造から陰イオン性の四面体構造になる。これは、ボロン酸錯体とボロン酸エステルにも当てはまる。フェニルボロン酸とジオールとの結合過程は図 1-8 で説明する。ジオールとの相互作用による環状ボロン酸エステルの形成はボロン酸基の求電子性を強め、その pK_a 値を低下する (約 9 から約 6 へ)。例えば、pH 6.5~8.5 のとき、ボロン酸は三角平面構造で存在するが、糖の存在下では陰イオン性の四面体構造で存在する。

フェニルボロン酸誘導体プローブは水溶液中で有効であるが、糖分子との安定度定数が $\sim 10^2 \text{ M}^{-1}$ 程と小さい (表 1)³³。特に Neu5Ac との安定度定数は 21 M^{-1} と極めて小さく、リ

ブース (24 M^{-1}) やアラビノース (25 M^{-1}) と同程度であることから Neu5Ac 選択性も有していない。また、糖分子の検出には発光増感系が選択性・感度の観点から理想的であるが、フェニルボロン酸系プローブの多くは蛍光の消光作用を利用しており、かつ、そのシグナルの変化量が小さく、実用的な高感度蛍光プローブとしては改善が必要である。加えて、それらは表 1-1 に示すように単糖類の中でも選択性がフルクトースに対してのみ大きいといった問題点があり、本研究で目指すシアル酸や多様な糖鎖への応用が現在のところ困難である。

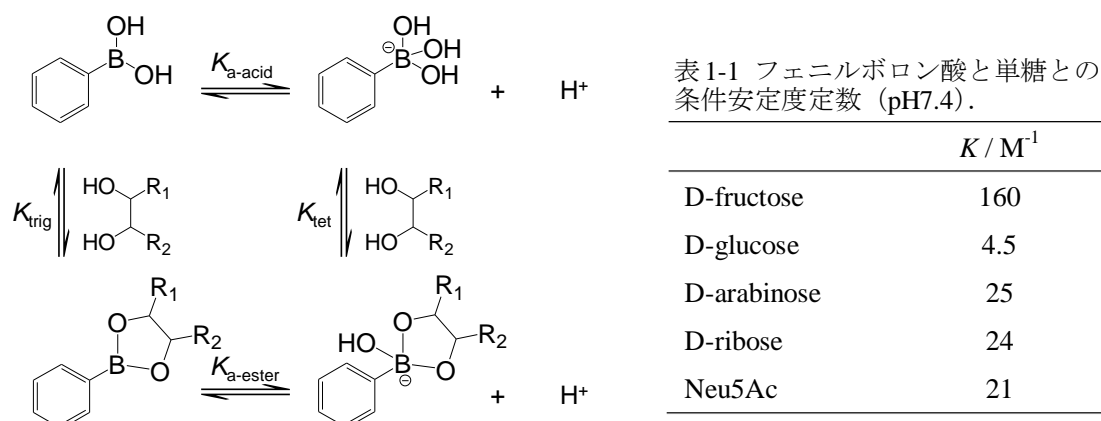


図 1-8 フェニルボロン酸とジオールの平衡反応.

3-3 多点相互作用を利用するプローブ

ここではプローブに複数の糖認識部位を導入することで、糖分子との結合に多点相互作用を持ち込み、新たな選択性、安定性の向上を図った研究例について述べる。

3-3-1 ビスボロン酸プローブ

Levonis らは、Neu5Ac と 2 箇所 で結合するビスボロン酸プローブ **5** を開発した (図 1-9)³⁴。シアル酸のグリセロール基およびアノマー位ヘミアセタールの α -ヒドロキシ基はボロン酸基と結合可能な構造的特徴を持つ。このプローブは、リン酸緩衝液 (pH 6.2) -メタノール混合溶媒中で、Neu5Ac を蛍光の消光作用により選択的に検出可能である。また、50 mM のグルコースの共存下でも妨害がなく、Neu5Ac を選択的に認識可能な数少ない例である。ビスボロン酸プローブ **5** と Neu5Ac の安定度定数は $10^{1.5} \text{ M}^{-1}$ とフェニルボロン酸 ($10^{1.3} \text{ M}^{-1}$) よりも大きくなった。しかしながら、水に対する溶解度の低さから水-メタノール混合溶媒を用いなければならないことや消光作用による検出といった問題点がある。

また、Yang らはボロン酸基を 2 つ有する sLex 認識プローブ **6** を設計・合成を行った (図 1-9)^{35,36}。プローブ **6** は 2 つのボロン酸基と Neu5Ac および隣接する糖分子との 2 点の結合により選択性をコントロールすることを目的としている。また、両ボロン酸基間のリンカー部分を様々なメチレン基やベンジル基とすることで長さを変化させ、sLex の選択性をコントロールしている。結果として、**6a** は最も sLex に対する応答が大きく、また他のルイスオリゴ糖 (Ley, 図 1-2) に対し応答が小さく、sLex 選択性も高かった。一方、**6b** はルイス Y

に対する選択性が大きかった。また、**6c** は *sLex* と *Ley* に対する反応性は同程度であった。認識機構については調査されておらず、Yang らは一般的なボロン酸と Neu5Ac との結合から、2つのボロン酸が Neu5Ac ユニットのグリセロール基とガラクトースまたはフコースのジオールとの結合と推測している。これらのプローブは、癌細胞のイメージングにも応用された。このように、リンカー部の長さを制御することでオリゴ糖分子の認識能を制御した数少ない例である。しかし、水に対する溶解度の低さから水-メタノール混合溶媒を用いなければならない問題点がある。

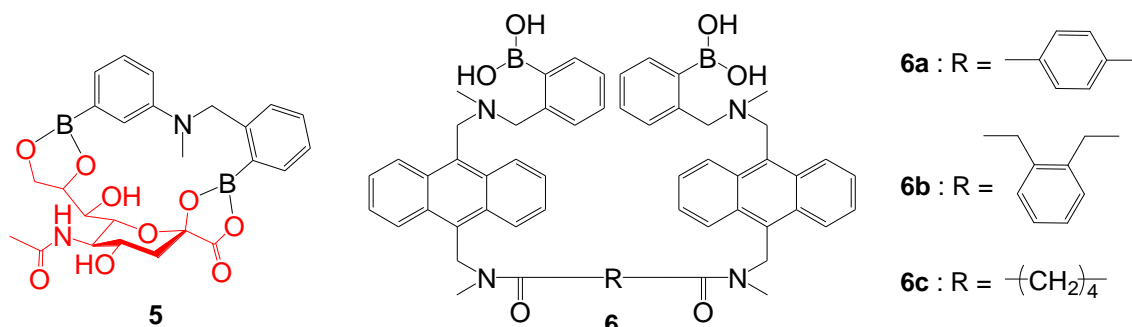


図 1-9 ビスフェニルボロン酸系プローブ **5**, **6** の化学構造.

3-3-2 異なる種類の相互作用を組み合わせたプローブ

前項では 2 つの共有結合により糖分子を認識するプローブの例を挙げたが、ここでは異なる相互作用を組み合わせた例を述べる。Regueiro-Figueroa らは、尿素基やチオ尿素基を導入したフェニルボロン酸誘導体プローブ **7** を設計・合成した (図 1-10)³⁷。このプローブ **7** はフェニルボロン酸基による共有結合と尿素基やチオ尿素基との水素結合の組み合わせで性能の向上を図ったものである。プローブ **7** と各糖分子との安定度定数を表 1-2 に示す。Neu5Ac との安定度定数は $10^{3.4} \sim 10^{4.8} \text{ M}^{-1}$ と大きな値となり、**7a** は Neu5Ac に対し最も大きな安定度を示し、選択性も大きかった。しかし、この水素結合は有機溶媒中でのみ形成するため、水溶液中での糖認識が不可能である。

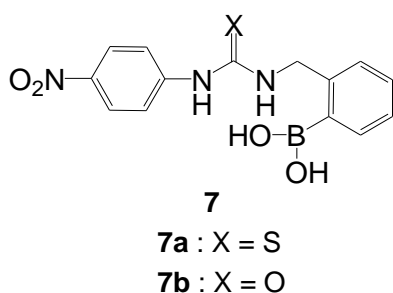


図 1-10 プローブ **7a**, **7b** の化学構造.

表 1-2 プローブ **7a**, **7b** と単糖との安定度定数 ($\log K$).

| | 7a | 7b |
|------------|-----------|-----------|
| Neu5Ac | 4.78 | 4.65 |
| MeNeu5Ac | 4.38 | 3.14 |
| D-fructose | 3.49 | 5.51 |
| D-glucose | 3.24 | 4.69 |

Shinkai らにより Zn^{2+} 錯体を導入したフェニルボロン酸誘導体プローブ **8** が報告されている (図 1-11)^{38,29}。このプローブはフェニルボロン酸基による共有結合と Zn^{2+} 錯体への配位結合を組み合わせで性能の向上を図ったものである。プローブ **8** と各糖分子との安定度定

数を表 1-3 に示す. フェニルボロン酸と比較するとフルクトースは同程度であったが, Neu5Ac は 10 倍大きくなった. しかし, フルクトースと同程度であることから, 高選択性とは言い難い. また, 水に対する溶解度の低さから水-メタノール混合溶媒を用いなければならない問題点がある.

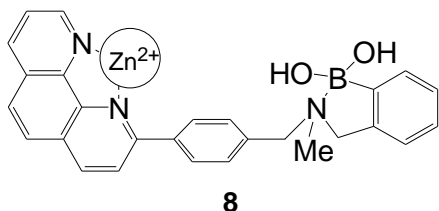


図 1-11 プローブ **8** の化学構造.

表 1-3 プローブ **8** と単糖との安定度定数 ($\log K$).

| | 7b |
|-------------|-----------|
| Neu5Ac | 2.3 |
| D-galactose | 1.3 |
| D-fructose | 2.4 |
| D-glucose | N.D. |

水溶液系では, Neu5Ac が発現する腫瘍のイメージングのためにランタノイド錯体とフェニルボロン酸を組み合わせたプローブ **9** が報告されている (図 1-12) ⁴⁰. このプローブは, フェニルボロン酸基とのエステル結合に加え, アンモニウム基と Neu5Ac カルボキシル基との静電相互作用により安定度の向上を図ったものである. プローブと Neu5Ac との安定度定数は 50 M^{-1} とフェニルボロン酸より 2.5 倍大きくなり, またグルコース (15 M^{-1}) に対する選択性も向上した. しかし, Neu5Ac に対する安定度・選択性は不十分である.

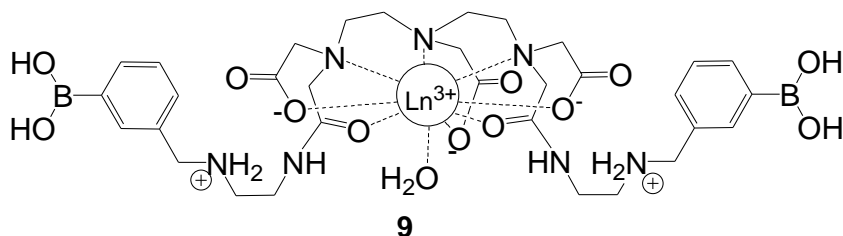


図 1-12 プローブ **9** の化学構造.

また, Regueiro-Figueroa らにより, ランタノイド錯体を導入したフェニルボロン酸誘導体プローブ **10** (図 1-13) が報告されている ⁴¹. このプローブはフェニルボロン酸基による共有結合とランタノイド錯体の残余配位座への配位結合を組み合わせることで性能の向上を図ったものである. プローブ **10** と各糖分子との安定度定数を表 1-4 に示す. フェニルボロン酸と比較すると中性糖は 2~8 倍大きくなり, Neu5Ac は 8 倍大きくなった. 水溶液系でフェニルボロン酸系プローブにより Neu5Ac を認識可能な数少ない例である. このプローブは, Neu5Ac のグリセロール基とフェニルボロン酸基とのエステル結合と, Neu5Ac カルボキシル基のランタノイド金属への配位結合により Neu5Ac の安定度が大きくなった. しかしながら, その安定度定数は 10^2 M^{-1} オーダーと小さく, ボロン酸基特有のフルクトース特異選択性が変化していないといった問題点がある. また, Neu5Ac との結合に伴うシグナル変化が乏しく, 測定時にシグナル変化が大きいフルクトースを添加しなければならず, Neu5Ac の

直接的な測定ができない問題点もある。

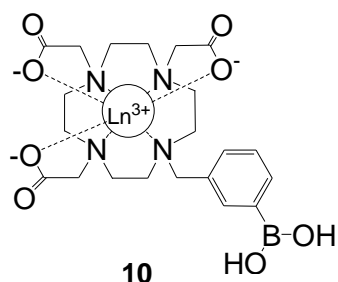


図 1-13 プローブ **10** の化学構造.

表 1-4 プローブ **10** と単糖との安定度定数.

| | K / M^{-1} |
|-------------|--------------|
| Neu5Ac | 151 |
| D-galactose | 24.5 |
| D-fructose | 646 |
| D-glucose | 12.3 |

以上をまとめると、シアル酸認識には多点相互作用は有効な戦略といえる。しかしながら、現段階において、水溶液中で Neu5Ac 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した例はなく、より高選択的で高安定性なプローブの開発が望まれている。

4 多変量判別分析による糖の判別

生体試料のような複雑で夾雑物が多く含まれている中の幾つかの成分を同時に計測することは非常に難しい。しかし、多変量解析を用いれば、複雑なシグナルからある特定の化学種に対する応答を抽出することが可能である。その様な考えから、多変量解析の一種である多変量判別分析 (MDA) を複雑な混合系中の中性糖分子の判別に用いた例が報告されている。ここでは、まず MDA の理論について述べ、その後、糖分子の判別に適用された例についてまとめる。

4-1 多変量判別分析の理論⁴²⁻⁴⁵

MDA は、母集団分布が多変量の時、次元を縮約して、判別群で分けられたデータを少数の線形判別関数で分類する手法で、「群間分散/群内分散」を最大化するように判別関数の係数を決定するものである。

判別群 α , 判別のデータ番号 μ , 変数番号 i として、データを x ($\alpha = 1, \dots, m; \mu = 1, \dots, n_c; i = 1, \dots, p$) と表す。判別関数 F は次のように示すことができる。

$$F_{\mu}^{\alpha} = \sum_{i=1}^p a_i x_{i\mu}^{\alpha} \quad (1-1)$$

式 1-1 による群間分散 s_b^2 , 群内分散 s_w^2 は次のように示すことができる。

$$s_B^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{\alpha=1}^m n_{\alpha} (\bar{F}^{\alpha} - \bar{F})^2 \quad (1-2)$$

$$s_W^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{\alpha=1}^m \sum_{\mu=1}^{n_\alpha} (F_\mu^\alpha - \bar{F}^\alpha)^2 \quad (1-3)$$

ここで,

$$\bar{F}^\alpha = \frac{1}{n_\alpha} \sum_{\mu=1}^{n_\alpha} F_\mu^\alpha, \quad \bar{F}^\alpha = \frac{1}{n} \sum_{\alpha=1}^m \sum_{\mu=1}^{n_\alpha} F_\mu^\alpha, \quad n = \sum_{\alpha=1}^m n_\alpha$$

である. 式 1-1, 1-2, 1-3 から, 次式 1-4, 1-5 を誘導することができる.

$$s_B^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{\alpha=1}^m n_\alpha \left[\sum_{i=1}^p a_i (\bar{x}_i^\alpha - \bar{x}_i) \right]^2 = \frac{n-\alpha}{n-1} \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^p a_i b_{ij} a_j \quad (1-4)$$

$$s_W^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{\alpha=1}^m \sum_{\mu=1}^{n_\alpha} \left[\sum_{i=1}^p a_i (\bar{x}_{i\mu}^\alpha - \bar{x}^\alpha) \right]^2 = \frac{n-\alpha}{n-1} \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^p a_i w_{ij} a_j \quad (1-5)$$

ここで,

$$\bar{x}_i^\alpha = \frac{1}{n_\alpha} \sum_{\mu=1}^{n_\alpha} x_{i\mu}^\alpha, \quad \bar{x}_i = \frac{1}{n} \sum_{\alpha=1}^m \sum_{\mu=1}^{n_\alpha} x_{i\mu}^\alpha, \quad n = \sum_{\alpha=1}^m n_\alpha$$

として,

$$b_{ij} = \frac{1}{n-\alpha} \sum_{\alpha=1}^m n_\alpha (\bar{x}_i^\alpha - \bar{x}_i) (\bar{x}_j^\alpha - \bar{x}_j), \quad w_{ij} = \frac{1}{n-\alpha} \sum_{\alpha=1}^m \sum_{\mu=1}^{n_\alpha} (\bar{x}_{i\mu}^\alpha - \bar{x}_i) (\bar{x}_{j\mu}^\alpha - \bar{x}_j)$$

である. 行列の成分として $(\mathbf{B})_{ij} = b_{ij}$, $(\mathbf{W})_{ij} = w_{ij}$, $(\mathbf{a})_i = a_i$ とすると, 式 1-4, 1-5 は次のようになる.

$$s_B^2 = {}^t \mathbf{a} \mathbf{B} \mathbf{a} \quad (1-6)$$

$$s_W^2 = {}^t \mathbf{a} \mathbf{W} \mathbf{a} \quad (1-7)$$

ここで, $n > m$ の場合, 一般に $\text{rank}(\mathbf{B}) = m-1$, $\text{rank}(\mathbf{W}) = n-m$ となる. 群間分散と群内分散の分散比 ρ は次のようになる.

$$\rho = \frac{s_B^2}{s_W^2} = \frac{{}^t \mathbf{a} \mathbf{B} \mathbf{a}}{{}^t \mathbf{a} \mathbf{W} \mathbf{a}} \quad (1-8)$$

分散比が最大となる条件は次のようになる.

$$\frac{\partial \rho}{\partial \mathbf{a}} = \frac{1}{(s_W^2)^2} \left[\frac{\partial s_B^2}{\partial \mathbf{a}} s_W^2 - s_B^2 \frac{\partial s_W^2}{\partial \mathbf{a}} \right] = 0 \quad (1-9)$$

$\partial s_B^2 / \partial \mathbf{a} = 2\mathbf{B}\mathbf{a}$, $\partial s_W^2 / \partial \mathbf{a} = 2\mathbf{W}\mathbf{a}$ であることから, 式 1-9 は次のようになる.

$$\mathbf{B}\mathbf{a} = \rho\mathbf{W}\mathbf{a} \quad (1-10)$$

\mathbf{W} が正則の場合には, 次のように変形できる.

$$\mathbf{W}^{-1}\mathbf{B}\mathbf{a} = \rho\mathbf{a} \quad (1-11)$$

ρ は $\mathbf{W}^{-1}\mathbf{B}$ の固有値, \mathbf{a} は $\mathbf{W}^{-1}\mathbf{B}$ の固有ベクトルであり, 式 1-11 は $\mathbf{W}^{-1}\mathbf{B}$ の固有値問題である. また, $\mathbf{W}^{-1}\mathbf{B}$ は正値行列であることから固有値は正となる. ここで, 固有値の大きい順に $\rho(1) > \rho(2) > \dots > \rho(d)$ とすると, 対応する固有ベクトルは $\mathbf{a}(1) > \mathbf{a}(2) > \dots > \mathbf{a}(d)$ となり, 判別関数は次のようになる.

$$F_\mu^\alpha(d) = \sum_{i=1}^p a_i(d) x_{i\mu}^\alpha \quad (1-12)$$

$F(d)$ を判別得点と呼び, $F(1)$ が最もよく群間の変動を説明し, $F(2)$ が次に群間の変動を説明する. 通常は, $F(1)$, $F(2)$ で群間の変動のほとんどが説明可能であるため, データを 2 つの判別得点でプロットして二次元化することで視覚化される.

各群の判別はマハラノビスの距離を用いて行う. マハラノビスの距離 D^2 は, ある点 (f_1, f_2) とグループとの距離の 2 乗を示し, 次のように定義される.

$$D^2(f_1, f_2) = (f_1 - \bar{f}_1 \quad f_2 - \bar{f}_2) \begin{bmatrix} s_{11} & s_{12} \\ s_{12} & s_{22} \end{bmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} f_1 - \bar{f}_1 \\ f_2 - \bar{f}_2 \end{pmatrix} = \frac{s_{22}(f_1 - \bar{f}_1)^2 + s_{11}(f_2 - \bar{f}_2)^2 - 2s_{12}(f_1 - \bar{f}_1)(f_2 - \bar{f}_2)}{s_{11}s_{22} - s_{12}^2} \quad (1-13)$$

\bar{f} はグループ内の平均値, $\begin{bmatrix} s_{11} & s_{12} \\ s_{12} & s_{22} \end{bmatrix}$ は分散共分散行列である. ここで, 分散共分散行列は次のように示される.

$$\begin{bmatrix} s_{11} & s_{12} \\ s_{12} & s_{22} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{1}{n-1} \left(\sum_{\mu=1}^{n_c} (f_{1\mu})^2 - \frac{(\sum_{\mu=1}^{n_c} f_{1\mu})^2}{n} \right) & \frac{1}{n-1} \left(\sum_{\mu=1}^{n_c} f_{1\mu} f_{2\mu} - \frac{(\sum_{\mu=1}^{n_c} f_{1\mu})(\sum_{\mu=1}^{n_c} f_{2\mu})}{n} \right) \\ \frac{1}{n-1} \left(\sum_{\mu=1}^{n_c} f_{1\mu} f_{2\mu} - \frac{(\sum_{\mu=1}^{n_c} f_{1\mu})(\sum_{\mu=1}^{n_c} f_{2\mu})}{n} \right) & \frac{1}{n-1} \left(\sum_{\mu=1}^{n_c} (f_{2\mu})^2 - \frac{(\sum_{\mu=1}^{n_c} f_{2\mu})^2}{n} \right) \end{bmatrix} \quad (1-14)$$

2 つのグループ 1, 2 の境界線は両グループから等しい距離にある点の軌跡である. すなわ

ち対応するマハラノビスの距離 D_1 と D_2 の差が 0 となり、次のように示すことができる。

$$D_1^2(f_1, f_2) - D_2^2(f_1, f_2) = 0 \quad (1-15)$$

また、 $D_1 > D_2$ ならばグループ 1、 $D_1 < D_2$ ならばグループ 2 に帰属することができる。

4-2 多変量判別に分析による糖分子の判別

いくつかの化学レセプターを用いる MDA は、混合系中のわずかに異なる検体の判別に有効な方法である。MDA に適用するレセプターとして、ある検体に対し特異的に反応するのではなく様々な検体にマイルドに反応するものが理想的である。そのため、糖分子の判別ではボロン酸系誘導体を用いられている。報告例として Lee らは、ボロン酸/フェニルボロン酸と様々な単・二糖類との反応における pH 変化を 24 種類の pH 指示薬により検出し、23 種類の単・二糖類の判別に成功した⁴⁶。また、Edwards らは、ボロン酸修飾型のオリゴペプチドライブラリーを用いて飲料水中の中性オリゴ糖の判別に成功している (図 1-14)⁴⁷。しかし、いずれの例も指示薬の吸光度の変化を利用していることから、ボロン酸と糖との反応を直接検出していない、感度が発光検出系と比較して劣るといった問題点がある。また、中性糖の判別にとどまっておき、シアル酸に対し発光増感する蛍光試薬を利用した MDA の例はない。そもそも、シアル酸と反応する分子モチーフを開発すること自体が困難であるのが現状である。

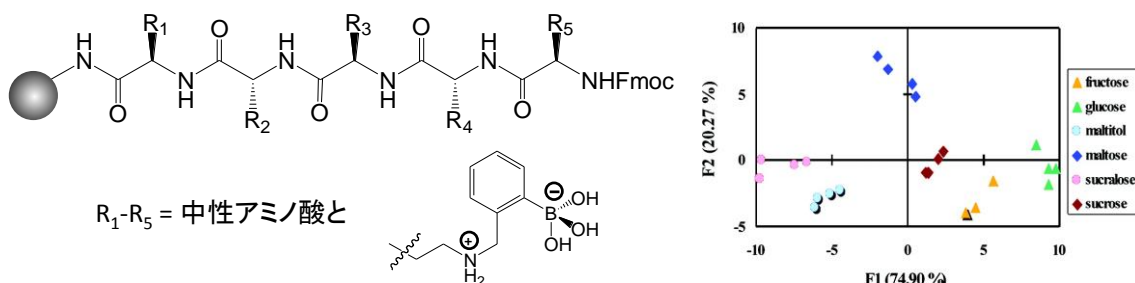


図 1-14 ボロン酸修飾型オリゴペプチドライブラリーの化学構造と判別の結果。

5 本研究でのプローブの分子設計

本研究では、ランタノイド (Ln) 錯体を利用する糖認識とフェニルボロン酸修飾型スクアリウム色素 (SQ-BA) を利用する糖認識の二種類のアプローチを試みた。ここでは、二種類のアプローチの概略について述べる。

5-1 ランタノイド (Ln) 錯体の利用

本研究では、ランタノイド (Ln) 錯体をシアル酸認識プローブとして用いた。なぜなら、Ln 金属の配位結合を利用しようと考え、残余配位座を持つ水溶性の Ln 錯体に着目したからである (図 1-16 を参照)。Ln 錯体に着目した理由として、C 型レクチンの糖認識サイトが

挙げられる。本章2項で述べたように、生体中では、C型レクチンと呼ばれる糖認識タンパク質で糖分子を認識している。C型レクチンは、 Ca^{2+} の残余配位座への配位結合とタンパク質側鎖との水素結合により糖分子を認識している。 Ca^{2+} のイオン半径(99 pm)と Ln^{3+} のイオン半径(La^{3+} : 103 pm ~ Lu^{3+} : 86 pm)はほぼ等しく、Lnの電荷は3価でCaより大きいため、電荷密度は Ln^{3+} の方が大きくなる。そのため、 Ln^{3+} への静電的な配位結合がより強くなり、糖分子との安定度定数が向上すると考えた。また、Ln錯体はLn金属特有の発光を示すため、その発光をシアル酸の結合によって増感させるシステムを考えた。

5-1-1 発光性 Ln イオン錯体

多くの Ln イオンは f-f 遷移に起因する発光性を有しているが、発光が強いものや弱いものが存在する。Ln 発光は、アンテナ部位からのエネルギー移動により発光させる場合がほとんどである(エネルギー移動発光の機構については次項で詳細を述べる)。このときの Ln 含有分子の全量子収率は次のように示す⁴⁸。

$$Q_{Ln}^L = \eta_{sens} Q_{Ln}^{Ln} \quad (1-16)$$

ここで Q_{Ln}^L と Q_{Ln}^{Ln} は、間接的と直接的な励起から得られた量子収率であり、 η_{sens} は励起エネルギーがアンテナ部位から金属イオンへ移動する有効性である。図 1-15 に一部のエネルギー線図を示す。図 1-15 より、 Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} はそれぞれエネルギー差が 12300 (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_6$), 32200 (${}^6\text{P}_{7/2} \rightarrow {}^8\text{S}_{7/2}$), 14800 (${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_0$) cm^{-1} であり、発光に最適な金属である。しかし、 Gd^{3+} は紫外部での発光であり、錯体の有機部の発光または光吸収を妨げるため、生体試料の発光性プローブにはふさわしくない。一方、 Eu^{3+} , Tb^{3+} はそれぞれ、照射された紫外光により励起し、赤(610 nm 付近)、緑色の発光(550 nm 付近)を示すため頻りに利用される。量子収率は小さいが、 Sm^{3+} (${}^4\text{G}_{5/2} \rightarrow {}^6\text{H}_{7/2}$, 590 nm), Dy^{3+} (${}^4\text{F}_{9/2} \rightarrow {}^6\text{H}_{13/2}$, 570 nm) も利用されている。近年、近赤外領域の発光を示す Nd^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+} を用いた研究例も数多く報告されている。本研究では、 Eu^{3+} , Tb^{3+} および Dy^{3+} を用いている。

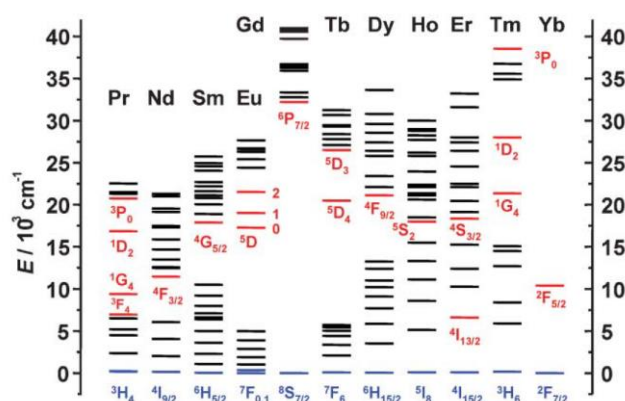


図 1-15 Ln イオンのエネルギー線図⁴⁸。

5-1-2 Ln 錯体のエネルギー移動発光

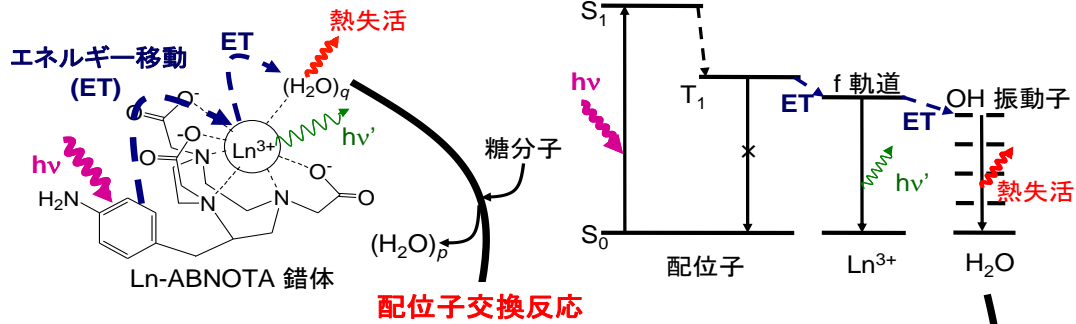
ほとんどの Ln イオンの電子遷移は、4f 副殻中の電子の再分配に関係する。電子双極子選択側はそのような遷移を禁制にしているが、いくつかの機構により緩和される。重要な 1 つは振動状態との結合であり、分子振動は一時的に金属まわりの幾何学的配置を変化させる。別の機構は、5d 軌道、配位子軌道、電荷移動状態のような J 準位間での混合と逆パリティ波動関数の混合である。振動、電子、4f 波動関数間の混合は、4f 軌道と配位子間の相互作用の強さに依存する。4f 軌道の 5s5p 軌道による遮蔽を考慮すると、混合の度合いは小さく、f-f 遷移の振動子強度に依存することになる。結果として、多くの Ln - 有機配位子錯体が良い量子収率を示しても、Ln イオンの直接的な励起ではめったに高い発光を示すことはない。

Ln - 有機配位子錯体は、次に示す過程に従い高量子収率で発光することが知られる^{48,49}。まず、配位子中心の π 電子系が励起し、 S_1 状態となる。その後 T_1 準位を經由し中心金属の Ln の f 軌道へエネルギー移動し、中心金属の f-f 遷移によって特異な発光を生じる (図 1-16 上)。この発光は励起波長と発光波長の差が大きく、励起スペクトルと発光スペクトルのスペクトル分離がほぼ完全になされるため、Ln イオンからの発光だけが観測される。これにより、迷光を減らしたり、ベースラインを安定させたりすることで高感度化が可能である。また、この発光は禁制遷移である f-f 遷移由来なので、一般に発光の減衰時間が長く、数十 μ 秒～数 m 秒の長寿命となることが知られている。そのため、時間分解測光が可能であり、レーザー等のパルス光と時間プログラムを用いることで、ナノ秒オーダーのバックグラウンド蛍光が減衰し終わった後の Ln 錯体の発光量を簡単に測定できる。したがって、蛍光物質の妨害のない非常に高感度な計測システムの構築が可能である。一方、Ln 金属錯体の第一配位圏に水分子が配位していると、励起されたエネルギーは Ln の f 軌道から OH 振動子の倍音準位へとエネルギー移動し、熱失活することが知られている。この場合、発光強度が小さくなり、また発光寿命も短くなる。本研究では、これらの特徴を生かし、高度な分子認識が構築できると考えた。

5-1-3 Ln 錯体による糖認識過程

ここで、本研究で開発したシアル酸認識 Ln 錯体の分子認識プロセスを説明する。本研究では Ln - 芳香族ポリアミノカルボン酸錯体を使用した。Ln イオン自体は通常 8~9 座配位を取るが、使用した配位子は 6~7 座配位とした。そのため、残余配位座が 2~3 座存在すると推測できる。その残余配位座には、通常、水分子が配位していて、励起された中心金属のエネルギーは f 軌道から OH 振動準位の倍音準位へのエネルギー移動により熱失活し、Ln 錯体の発光は弱くなると考えられる。一方、もし Ln 錯体の第一配位圏 (中心 Ln 金属) に糖分子が配位したとすると、配位水分子と単糖分子の配位子交換反応により配位水分子が減少し、OH へのエネルギー移動が減少するため、エネルギー移動効率が増大し発光強度の増感が観測されるはずである (図 1-16)。この増感の度合いにより糖分子を認識することができる⁵⁰。糖分子の中心金属への配位については三章で詳しく述べる。

糖未添加



糖添加

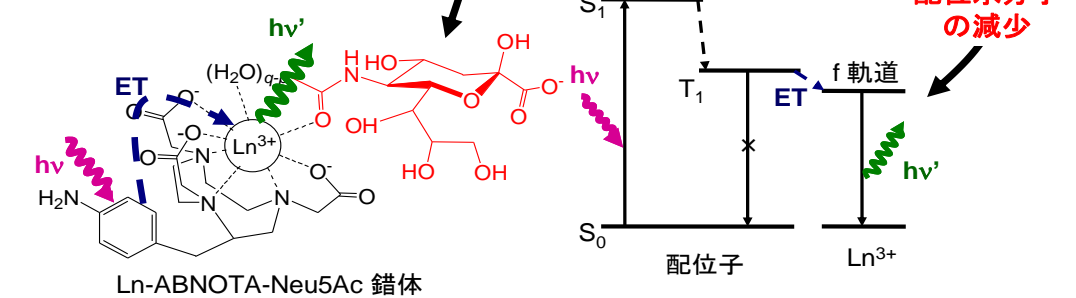


図 1-16 Ln³⁺錯体の糖認識プロセス.

5-2 フェニルボロン酸修飾型スカリリウム色素の利用

一方、従来のボロン酸と糖との相互作用に加え、SQ-BA 色素の疎水性による会合体形状および発光スイッチング能を制御して、従来にない高感度な糖認識系を構築した。

5-2-1 スカリリウム色素

スカリリウム色素 (SQ) は、 π 共役系の中央部に四角酸残基 C_2O_2 を有する特異な構造を有する色素である (図 1-17) ^{51,52}. SQ 色素の例として、**11** の電子配置は、電子供与体であるアニリン分子 (D) と電子受容体である中心 C_2O_2 構造 (A) を有していることから非常に分極している. 基底状態での窒素原子、酸素原子および中心 C_2O_2 構造の局在電荷は、 $-0.4e$ 、 -0.35 および $+0.37e$ である. それらの局在電荷は、主として中心 C_2O_2 構造内で電荷移動 (各々の酸素原子から 4 員環への電荷移動) ではなく、分子内 D-A-D 配置の $S_0 \rightarrow S_1$ 電子励起間の電荷移動することで、長波長での励起・蛍光 (600 ~ 800 nm) が観測される ^{53,54}. また、一般的な SQ 色素は、高いモル吸光係数 ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)、高い量子収率 (~ 0.3) といった発光特性も有する.

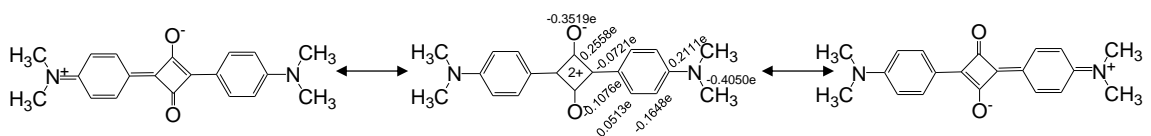


図 1-17 SQ 色素 **11** の共鳴構造.

しかし、SQ 色素を化学センサーとして利用する場合、SQ 色素自体はセンサー機能を有していないため、対象分子を特異的に反応する官能基を修飾する必要がある。SQ ベースとするセンサーの例として、Ros-Lis らは、ジチアージオキサーアザクラウン構造と SQ 色素を組み合わせた **12** により、nM レベルの Hg^{2+} を選択的に検出した (図 1-18)⁵⁵。また、Volkova らは、ヒト血清アルブミンやオボアルブミンと結合することで 10 倍発光増感する **13** を開発した (図 1-18)⁵⁶。先行研究では、齋藤らは、単糖、糖タンパク質、グラム陽性細菌を認識されるため、ボロン酸を修飾した SQ 色素 (SQ-BA1, 図 1-19) を開発し、発光増感により検出を行っている^{57,58}。

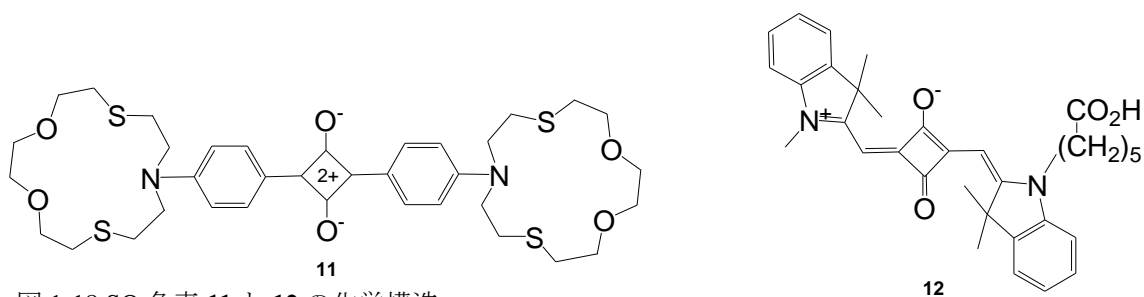


図 1-18 SQ 色素 **11** と **12** の化学構造。

5-2-2 フェニルボロン酸修飾型スカリリウム色素による糖認識過程

ここで、SQ-BA 色素の糖分子認識プロセスを説明する。SQ-BA 色素は水溶液中で π - π 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、強い発光増感を示すと推定されている (図 1-19)^{53,54}。本研究では、SQ-BA 色素のアルキル鎖長を変化させ糖選択性の制御を行うこととしたが、その分子設計の詳細については第四章にて述べる。

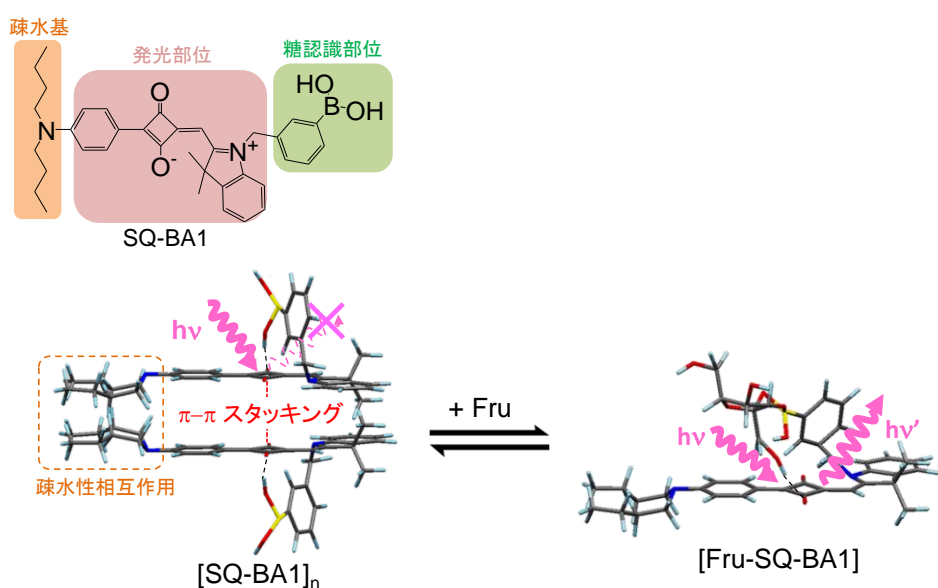


図 1-19 SQ-BA1 の化学構造 (上) SQ-BA 色素の糖認識プロセス (下)。

6 目的

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した分子設計を施すことで、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た。そのために二種類のアプローチを試みた（本研究の概要を図 1-20 に示す）。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素子の開発である。ここでは、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-ABNOTA 錯体（後述）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た。

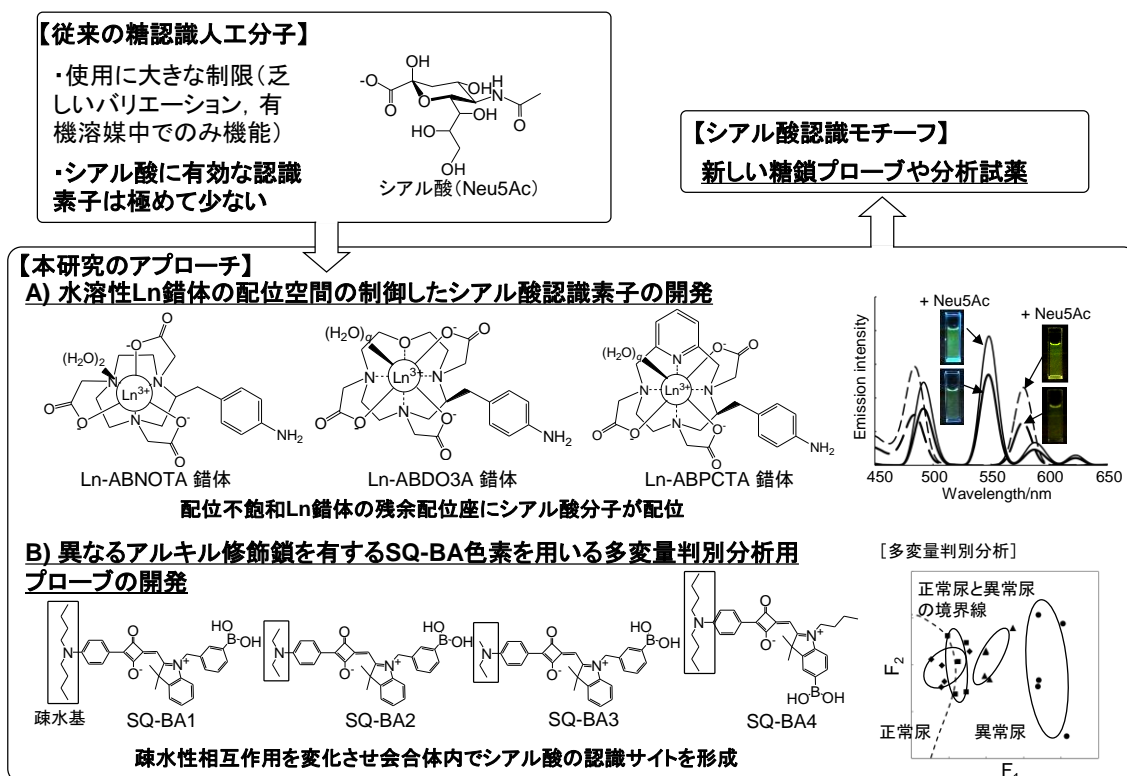


図 1-20 本研究の概要.

7 参考文献

- 1) R. Schauer, *Glycoconjugate Journal*, **2000**, 17, 485–499.
- 2) D. M. Carlson, E. J. McGuire, G. W. Jourdian, S. Roseman, *J. Bio. Chem.*, **1973**, 248, 5763–5773.
- 3) X. Chen, A. Varki, *ACS Chem. Biol.*, **2010**, 5, 163–176.
- 4) C. Yea, S. McCorrister, G. Westmacott, M. Petric, R. Tellier, *J. Virol. Meth.*, **2011**, 172, 72–77.
- 5) K. Bork, R. Horstkorte, W. Weidemann, *J. Pharm. Sci.*, **2009**, 98, 3499–3508.
- 6) S. Arming, D. Wipfler, J. Mayr, A. Merling, U. Vilas, R. Schauer, R. Schwartz-Albiez, R. Vlasak, *Glycobiology*, **2011**, 21, 553–564.
- 7) I. Mocchetti, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2005**, 62, 2283–2294.
- 8) T. Klepach, I. Carmichael, A.S. Serianni, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 11892–11900.
- 9) K. Furuhata, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **2004**, 16, 143–169.
- 10) 永井克孝, *糖鎖 II. 糖鎖と病態*, **1994**, 東京化学同人.
- 11) 渡邊昌彦, 腫瘍マーカーの臨床的意義と今後の展望, *日本医師会雑誌*, **2004**, 第 131 卷, 第 5 号.
- 12) A. Helander, A. Husa, J.-O. Jeppsson, *Clinical Chemistry*, **2003**, 49, 1881–1890.
- 13) K. C. Kim, E. P. Lillehoj, *AJRCMB*, **2008**, 39, 644–647.
- 14) Y. S. Kim, J. Gum, Jr, I. Brockhausen, *Glycoconjugate J.*, **1996**, 13, 693–707.
- 15) J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1990**, 1455, 301–313.
- 16) 谷口直之, *ポストゲノム時代の糖鎖生物学がわかる*, **2002**, 羊土社.
- 17) M. hadjiconstantinou, N. H. Neff, *J. Neurochem*, **1998**, 70, 1335–1345.
- 18) I. Mocchetti, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, **2005**, 62, 2283–2294.
- 19) T. Ariga, M. P. McDonald, R. K. Yu, *Journal of Lipid Research*, **2008**, 49, 1157–1175.
- 20) K. Yanagisawa, *J. Neurochem*, **2011**, 116, 806–812.
- 21) C. Sato, K. Furuhata, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **1999**, 11, 371–390.
- 22) 佐藤ちひろ, 北島健, *Glycoforum*, **2002**.
- 23) L. Haataja, J. Schleutker, A.-P. Laine, M. Renlund, M.-L. Savontaus, C. Dib, J. Weissenbach, L. Peltonen, P. Aula, *Am. J. Hum. Genet.* **1994**, 54, 1042–1049.
- 24) R. Seppala, F. Tietze, D. Krasnewich, P. Weiss, G. Ashwell, G. Barsh, G.H. Thomas, S. Packman, W.A. Gahl, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 7456–7461.
- 25) P. Sillanaukee, M. Pönniö, I.P. Jääskeläinen, *Eur.J. Clin. Invest.* **1999**, 29, 413–425.
- 26) L. Poppe, G. S. Brown, P. V. Nikrad, B. H. Shah, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 1727–1736.
- 27) W. S. Somers, J. Tang, G. D. Shaw, R. T. Camphausen, *Cell*, **2000**, 103, 467–479.
- 28) C. Geffert, M. Kuschel, M. Mazik, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 292–300.
- 29) H. S. Mader, O. S. Wolfbeis, *Microchimica Acta*, **2008**, 162, 1–34.
- 30) X. Wu, Z. Li, X.-X. Chen, J. S. Fossey, T. D. Jamesc, Y.-B. Jiang, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 8032–8048.
- 31) J. A. Peters, *Coord. Chem. Rev.* **2014**, 268, 1–22.

- 32) L.I. Boscha, T.M. Fylesb, T.D. James, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 11175–11190.
- 33) Springsteen, G.; Wang, B. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 5291–5300.
- 34) S. M. Levonis, M. J. Kiefel, T. A. Houston, *Chem. Commun.* **2009**, 2278.
- 35) W. Yang, S. Gao, X. Gao, V.V.R. Karnati, W. Ni, B. Wang, W.B. Hooks, J. Carson, B. Weston, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2175–2177.
- 36) W. Yang, H. Fan, X. Gao, S. Gao, V.V.R. Karnati, W. Ni, W.B. Hooks, J. Carson, B. Weston, B. Wang, *Chem. Biol.*, **2004**, 11, 439–448.
- 37) M. Regueiro-Figueroa, K. Djanashvili, D. Esteban-Gomez, A. de Blas, C. Platas-Iglesias, T. Rodriguez-Blas, *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, 3237–3248.
- 38) M. Takeuchi, M. Yamamoto, S. Shinkai, *Chem. Commun.*, **1997**, 1731.
- 39) M. Yamamoto, M. Takeuchi, S. Shinkai, *Tetrahedron*, **1998**, 54, 3125–3140.
- 40) L. Frullano, J. Rohovec, S. Aime, T. Maschmeyer, M.I. Prata, J.J. Pedroso de Lima, C.F.G.C. Geraldes, J.A. Peters, *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 5205–5217.
- 41) M. Regueiro-Figueroa, K. Djanashvili, David Esteban-Gomez, T. Chauvin, E. Toth, A. de Blas, T. Rodriguez-Blas, C. Platas-Iglesias, *Inorg. Chem.*, **2010**, 49, 4212–4223.
- 42) J. F. Hair, W. C. Black, B. J. Babin, R. E. Anderson, *Multiple Discriminant Analysis, 7th ed.*; Prentice Hall, **2008**, 235–316.
- 43) A. C. Rencher, W. F. Christensen, *METHODS OF MULTIVARIATE ANALYSIS, 3rd ed.*; A JOHN WILEY & SONS, INC., **2012**, 91–124.
- 44) P. C. Jurs, G.A. Bakken, H. E. McClelland, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2649–2678.
- 45) R. A. Fenner, R. M. Suetz, *Water Environment Research*, **1999**, 71, 282–289.
- 46) J. W. Lee, J.-T. Lee, Y.-T. Chang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 6485–6487.
- 47) N. Y. Edwards, T. W. Sager, J. T. McDevitt, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 13575–13583.
- 48) Jean-Claude G. Büinzli, Claude Piguet, *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, 34, 1048–1077.
- 49) D. Parker, *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 205, 109–130.
- 50) S. Saito, A. Hikichi, T. Kamura, M. Aoyama, M. Shibukawa, *Chem. Lett.*, **2005**, 38, 412–413.
- 51) 中澄博行, 八木繁幸, *有機合成化学協会誌*, **2008**, 66, 477–487.
- 52) J. J. McEwen, K. J. Wallace, *Chem. Commun.*, **2009**, 6339–6351.
- 53) R. W. Bigelow, *Chemical Physics*, **1986**, 107, 159–174.
- 54) K.-Y. Law, *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 5184–5193.
- 55) J. V. Ros-Lis, R. Martínez-Mañez, K. Rurack, F. Sancenon, J. Soto and M. Spieles, *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 5183–5185.
- 56) K. D. Volkova, V. B. Kovalska, A. L. Tatarts, L. D. Patsenker, D. V. Kryvorotenko and S. M. Yarmnoluk, *Dyes Pigm.*, **2007**, 72, 285–292.
- 57) S. Saito, T. L. Massie, T. Maeda, H. Nakazumi, C. L. Colyer, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 2452–2458.
- 58) S. Saito, T. L. Massie, T. Maeda, H. Nakazumi, C. L. Colyer, *Sensors* **2012**, 12, 5420–5431.

第二章 ランタノイド - 六座および七座大環状ポリアザカルボン酸錯体によるシアル酸認識

1 緒言

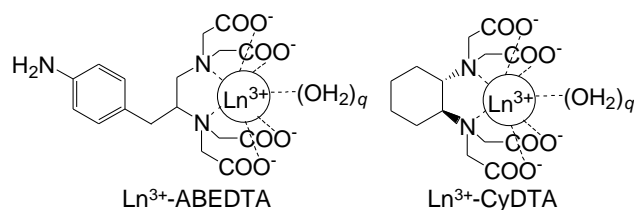


図 2-1 Ln^{3+} -ABEDTA および Ln^{3+} -CyDTA の化学構造.

先行研究では、齋藤らは EDTA 骨格にアミノベンジル基が結合した ABEDTA を配位子とする Ln^{3+} -ABEDTA 錯体 (図 2-1) と窒素 - 窒素架橋部位の配位骨格にシクロヘキサンジアミンを有する Ln^{3+} -CyDTA 錯体 (図 2-1) を単糖認識蛍光プローブとして評価している. その結果として, pH 11.8 の高アルカリ溶液で単糖アニオンを認識できることが明らかとなった¹². pH 11.8 での Ln 錯体と単糖分子との条件安定度定数を表 2-1 に示す.

表 2-1 Ln^{3+} -ABEDTA および Ln^{3+} -CyDTA と単糖アニオンとの条件安定度定数 K (pH11.8).

| | $\log K_{\text{fructose}}$ | $\log K_{\text{Neu5Ac}}$ |
|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Ln^{3+} -ABEDTA | 2.18 | 3.69 |
| Ln^{3+} -ABEDTA | 2.11 | 3.55 |
| Ln^{3+} -CyDTA | 2.59 | - |
| Ln^{3+} -CyDTA | 3.23 | - |

ここで Ln^{3+} -ABEDTA 錯体は中性糖よりも Neu5Ac に対し一桁以上高い選択性を有し, 安定度定数も $10^{3.69} \text{ M}^{-1}$ と生体中に存在するレクチンに匹敵する親和性を有することが分かった. また, 配位子間で比較をすると CyDTA 錯体の方が糖との安定度定数が大きくなるということが分かる. ほぼ同じ配位骨格を有しながらも安定度定数が異なることの原因は不明であるが, ポリアミノカルボン酸骨格中の窒素 - 窒素架橋部位の剛性が高いほうがより高い熱力学的安定性が得られると考察している. 一方で, Ln^{3+} -ABEDTA 錯体および Ln^{3+} -CyDTA 錯体は, pH 11.8 という強アルカリ条件下でのみ単糖類を認識することは, 生体試料などの実試料への適用を考えた場合, 糖鎖の加水分解が起こるため, 弱アルカリ～中性 pH 条件での糖認識が好ましい. 強アルカリ条件下においては, 単糖分子のヒドロキシ基の一部は酸解離するため, 中心 Ln 金属に陰イオンとして配位しやすくなっていると考えられるが, 一方で, 負電荷を帯びた Ln^{3+} 錯体化学種と単糖アニオンとが静電反発し安定度定数が低下しており, 配位能を十分に生かし切れていない可能性もある.

そこで, 本章では, 剛性の高い配位骨格を有する配位子として, 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 (図 2-2) 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. 特に, ABNOTA は, ABEDTA と同様に六座配位であり, Ln^{3+} -ABNOTA 錯体には 2~3 座の残余配位座が存在すると推測できる. また, NOTA 骨格は, 剛性が高く, 無電荷錯体を形成し, 強アルカリ条件下でも糖アニオンとの静電反発しないことが予測できたため, 安定度定数の向上を期待した. 糖分子との安定度定数が向上すれば, 認識が可能な pH 範囲が下がり, 先行研究の ABEDTA 系よりより中性条件近くでの糖分子認識が可能であると考えた. また, Ln^{3+} -ABDO3A および Ln^{3+} -ABPCTA 錯体も Ln^{3+} -ABNOTA 錯体同様に無電荷錯体を形成し, これらの配位子は七座配位であるため, 各 Ln^{3+} 錯体には 1~2 座の残余配位座が存在する. したがって, 糖分子との配位子交換反応が期待でき, 六座配位子とは異なる残余配位座数により糖認識能に違いが生じるか比較することが可能であると考えた. また, ABPCTA には励起三重項状態から Eu の $^5\text{D}_0$ へエネルギー移動するピリジン基が導入されており, この光吸収部位によってアミノベンジル基では発光しない Eu^{3+} も発光する. よって, 異なる中心 Ln 金属によって糖認識能に違いが生じるか比較することが可能であると考えた. 本章では, これら 3 種の配位子の Ln^{3+} 錯体のシアル酸認識能を調査し, シアル酸に特異的選択性を示す錯体を探索した.

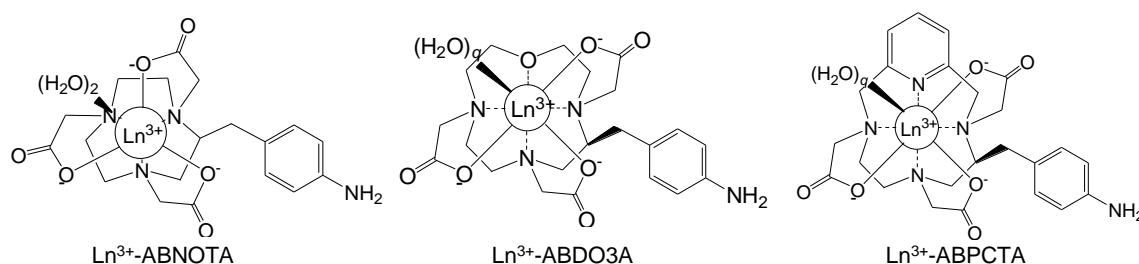


図 2-2 Ln^{3+} -ABNOTA, Ln^{3+} -ABDO3A および Ln^{3+} -ABPCTA の化学構造.

2 実験

2-1 試薬

塩化ユーロピウム (III) 六水和物 (純度 99.99%以上), 塩化ジスプロシウム (III) 六水和物 (純度 99.99+%), 塩化テルビウム (III) 六水和物 (純度 99.999%) は Sigma-Aldrich (千葉) から購入した. 各 Ln 金属溶液は各々の金属塩を超純水および少量の塩酸溶液で溶解し, 所定の濃度 (1.0×10^{-2} M) にし, pH 2 に調整した. ファクター既知の EDTA 溶液で XO 指示薬を用いてキレート滴定し, ファクターを求め, 室温で暗所に保存した.

4-アミノベンジル-NOTA (ABNOTA, 純度 94%以上), 4-アミノベンジル-DO3A (ABDO3A, 純度 100%), 4-アミノベンジル-PCTA (ABPCTA, 純度 100%) は Macrocyclics (アメリカ, ダラス) から購入した. 各配位子の所定量を超純水 25 ml で溶解し, 所定の濃度 (1.0×10^{-3}

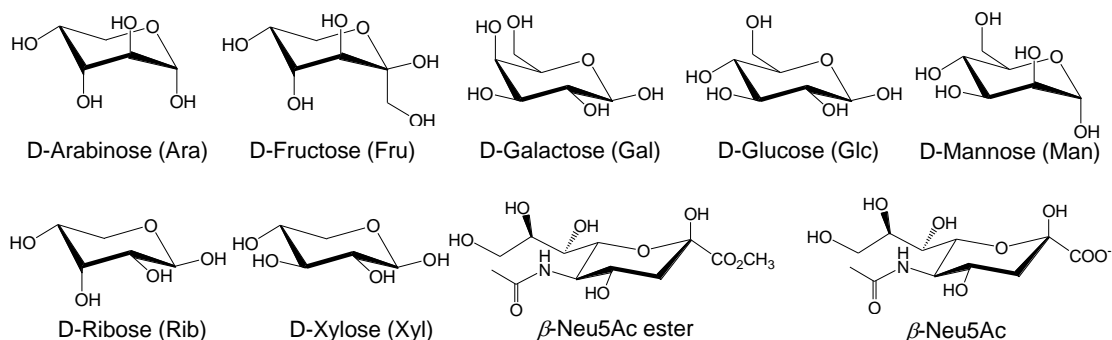
M) とした. 濃度既知の Tb^{3+} 溶液を用いて, モル比法によりこれら配位子の濃度 (ファクター) を求め, 溶液は光分解を避けるため冷暗所に保存した.

D(-)-arabinose (特級), D(+)-galactose (特級), D(+)-mannose (特級) は和光純薬株式会社 (大阪) から購入した. D(-)-fructose (特級) は関東化学株式会社 (東京) から購入した. D(+)-glucose (特級), D(+)-xylose (特級) はキンダ化学株式会社 (大阪) から購入した. D(-)-ribose (特級), D-(+)-lactose monohydrate (特級), D-(+)-maltose monohydrate (特級), D-(+)-sucrose (特級) は東京化成工業株式会社 (東京) から購入した. *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac, 純度 99% 以上), *N*-Acetylneuraminic acid ester (Neu5Ac ester, 純度 99% 以上), di*N*-acetylneuraminic acid (diNeu5Ac, 純度 99% 以上) は長良サイエンス株式会社 (岐阜) から購入した. 各保存溶液は劣化を防ぐため冷暗所に保存した. ウシ顎下腺由来ムチン (MUC1-S) およびブタ胃由来ムチン (MUC3) は Sigma-Aldrich (千葉) から購入し, 各溶液は冷凍庫で保存した.

重水 (D : 99.8%) は Acros Organics (アメリカ, ニュージャージー) から購入した.

以下に使用した糖分子の化学構造を示す.

(A) 単糖類



(B) 二糖類

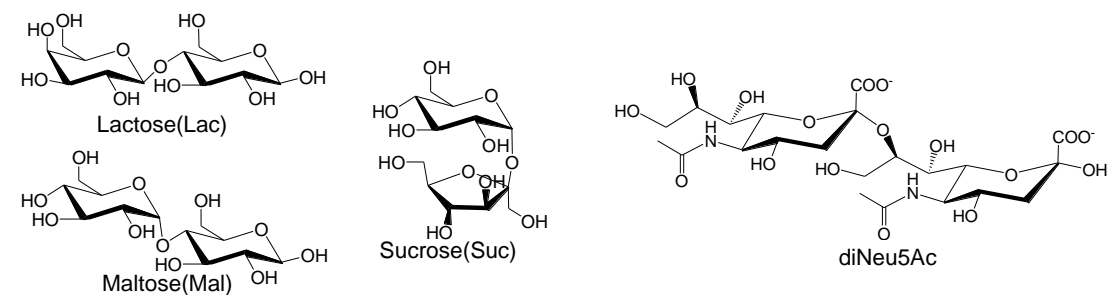


図 2-3 使用した単糖および二糖の化学構造.

2-2 操作手順

2-2-1 蛍光スペクトルの測定

5 ml または 100 ml メスフラスコに Ln^{3+} ($\text{Ln} = \text{Tb}, \text{Dy}, \text{Eu}$) と配位子 L (L = ABNOTA, ABDO3A, ABPCTA) を 1:1 で含む Ln-L 錯体溶液を 1.0×10^{-6} M, イオン強度 $I = 0.1$ M (NaCl), 単糖または二糖溶液を $1.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ M となるように添加し, NaOH で pH を調整後, 超純水で定容とし, 1 cm 石英セルを用いて蛍光スペクトルの測定 (日本分光 FP-6300) を行った. 測定条件は次のとおりである. Tb^{3+} -ABNOTA 錯体は, 励起波長 238.8 nm, 蛍光波長 547.6 nm, Dy^{3+} -ABNOTA 錯体は, 励起波長 286.8 nm, 蛍光波長 577.0 nm, また, Tb^{3+} -ABDO3A 錯体の測定条件は, 励起波長 239.2 nm, 蛍光波長 546.6 nm, Dy^{3+} -ABDO3A 錯体は, 励起波長 286.8 nm, 蛍光波長 574.8 nm, Eu^{3+} -ABPCTA 錯体は, 励起波長 270.4 nm, 蛍光波長 617.4 nm, Tb^{3+} -ABPCTA 錯体は, 励起波長 269.6 nm, 蛍光波長 547.6 nm, Dy^{3+} -ABPCTA 錯体は, 励起波長 270.0 nm, 蛍光波長 577.0 nm, 励起バンド幅 5 nm, 蛍光バンド幅 5 nm (フィルター-L-39), 感度 Manual (PMT 電圧 630~1000 V), レスポンス 4 sec, データ読取間隔 0.2 nm, 走査速度 200 nm/min とした.

2-2-2 発光寿命の測定

1.5 ml サンプルカップ (ポリプロピレン製) に Tb^{3+} と配位子 L (L = ABNOTA, ABDO3A, ABPCTA) を 1:1 で含む Tb^{3+} -L 錯体溶液を 1.0×10^{-5} M, 所定の糖溶液を添加し, NaOH で pH を調整後, 超純水で 1 ml とし, 1 cm 石英セルを用いて発光寿命の測定 (日本分光 FP-6300) を行った. 測定条件は次のとおりである. Tb^{3+} -ABNOTA 錯体は, 励起波長 238.8 nm, 蛍光波長 547.6 nm, Tb^{3+} -ABDO3A 錯体は, 励起波長 239.2 nm, 蛍光波長 546.6 nm, Tb^{3+} -ABPCTA 錯体は, 励起波長 269.6 nm, 蛍光波長 547.6 nm, 励起バンド幅 10 nm, 蛍光バンド幅 10 nm (フィルターなし), PMT 電圧 1000 V, 遅延時間 7.7 ms, データ読取間隔 0.1 ms とした.

3 結果と考察

3-1 単糖分子の添加による Ln^{3+} 錯体の発光増感

Ln^{3+} -ABNOTA 錯体, Ln^{3+} -ABDO3A 錯体および Ln^{3+} -ABPCTA 錯体の発光特性を調査した. 中心金属には発光性の Ln^{3+} である Sm^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} および Dy^{3+} の 4 種類を用い, 各錯体の ET 発光を確認したところ, ABNOTA および ABDO3A 錯体は Tb^{3+} , Dy^{3+} に対し発光が確認され, ABPCTA 錯体は Eu^{3+} , Tb^{3+} および Dy^{3+} に対し発光が確認された. 代表例として, Dy^{3+} -ABNOTA, Tb^{3+} -ABDO3A および Eu^{3+} -ABPCTA 錯体の励起および発光スペクトルを測定した結果を図 2-4 に示す.

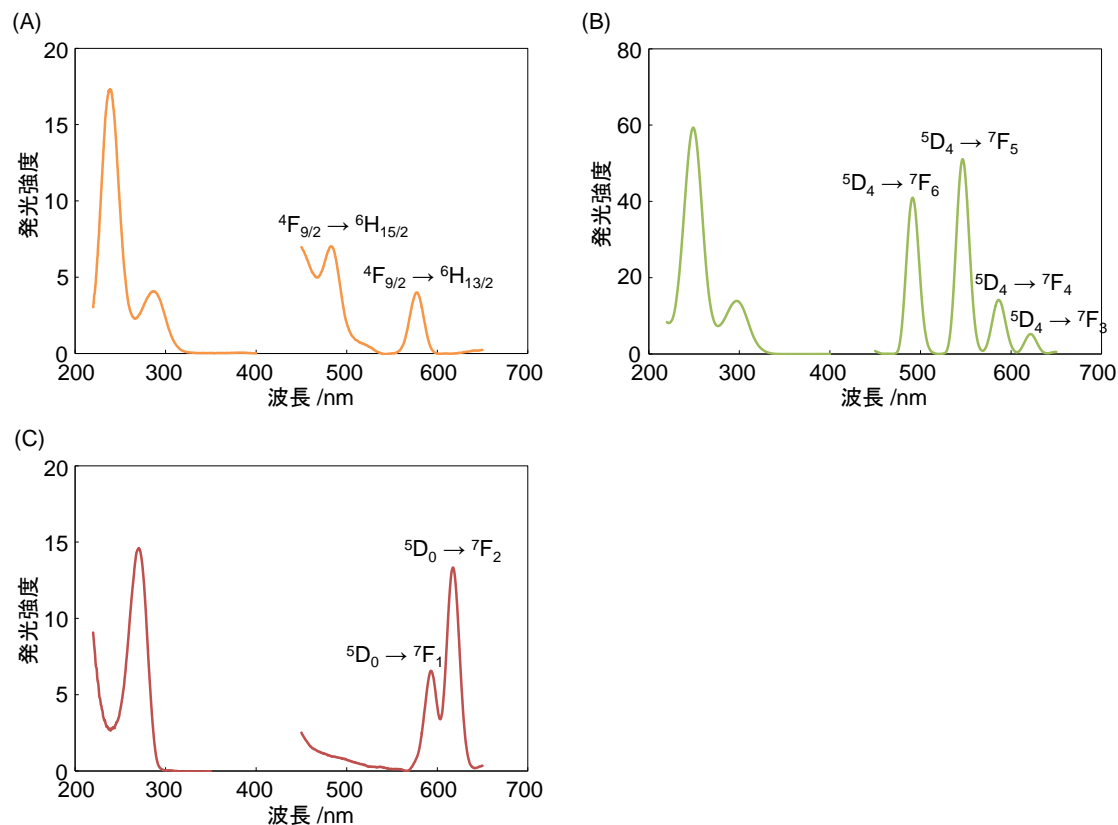


図 2-4 Ln 錯体の励起および発光スペクトル. $[\text{Ln}^{3+}\text{-L}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, pH 10.2. (A) $\text{Dy}^{3+}\text{-ABNOTA}$ 錯体, (B) $\text{Tb}^{3+}\text{-ABDO3A}$ 錯体, (C) $\text{Eu}^{3+}\text{-ABPCTA}$ 錯体.

図 2-4 のようにそれぞれの中心金属の f-f 遷移に依存する特徴的な形状のスペクトルを得た. 各々の錯体の励起および発光スペクトルから, 最適測定波長は次のようにした. $\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA}$ 錯体は, 励起波長 238.8 nm, 蛍光波長 547.6 nm, $\text{Dy}^{3+}\text{-ABNOTA}$ 錯体は, 励起波長 286.8 nm, 蛍光波長 577.0 nm, また, $\text{Tb}^{3+}\text{-ABDO3A}$ 錯体の測定条件は, 励起波長 239.2 nm, 蛍光波長 546.6 nm, $\text{Dy}^{3+}\text{-ABDO3A}$ 錯体は, 励起波長 286.8 nm, 蛍光波長 574.8 nm, $\text{Eu}^{3+}\text{-ABPCTA}$ 錯体は, 励起波長 270.4 nm, 蛍光波長 617.4 nm, $\text{Tb}^{3+}\text{-ABPCTA}$ 錯体は, 励起波長 269.6 nm, 蛍光波長 547.6 nm, $\text{Dy}^{3+}\text{-ABPCTA}$ 錯体は, 励起波長 270.0 nm, 蛍光波長 577.0 nm である. Dy^{3+} 錯体の最適測定波長を ${}^4\text{F}_{9/2} \rightarrow {}^6\text{H}_{15/2}$ 遷移の極大発光波長としなかった理由は, ${}^4\text{F}_{9/2} \rightarrow {}^6\text{H}_{15/2}$ 遷移のピークが配位子の蛍光スペクトルに重なっているためである. ${}^4\text{F}_{9/2} \rightarrow {}^6\text{H}_{13/2}$ 遷移であれば配位子の蛍光スペクトルの影響が小さく, 糖分子を添加した際の発光増感の測定精度が上がると考えた.

発光が確認された 7 種類の錯体 ($\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA}$, $\text{Dy}^{3+}\text{-ABNOTA}$, $\text{Tb}^{3+}\text{-ABDO3A}$, $\text{Dy}^{3+}\text{-ABDO3A}$, $\text{Eu}^{3+}\text{-ABPCTA}$, $\text{Tb}^{3+}\text{-ABPCTA}$ および $\text{Dy}^{3+}\text{-ABPCTA}$) を用い, pH 10.2 の水溶液中で, 1 mM 単糖を添加したときの発光スペクトルを測定した結果を図 2-5 に示す.

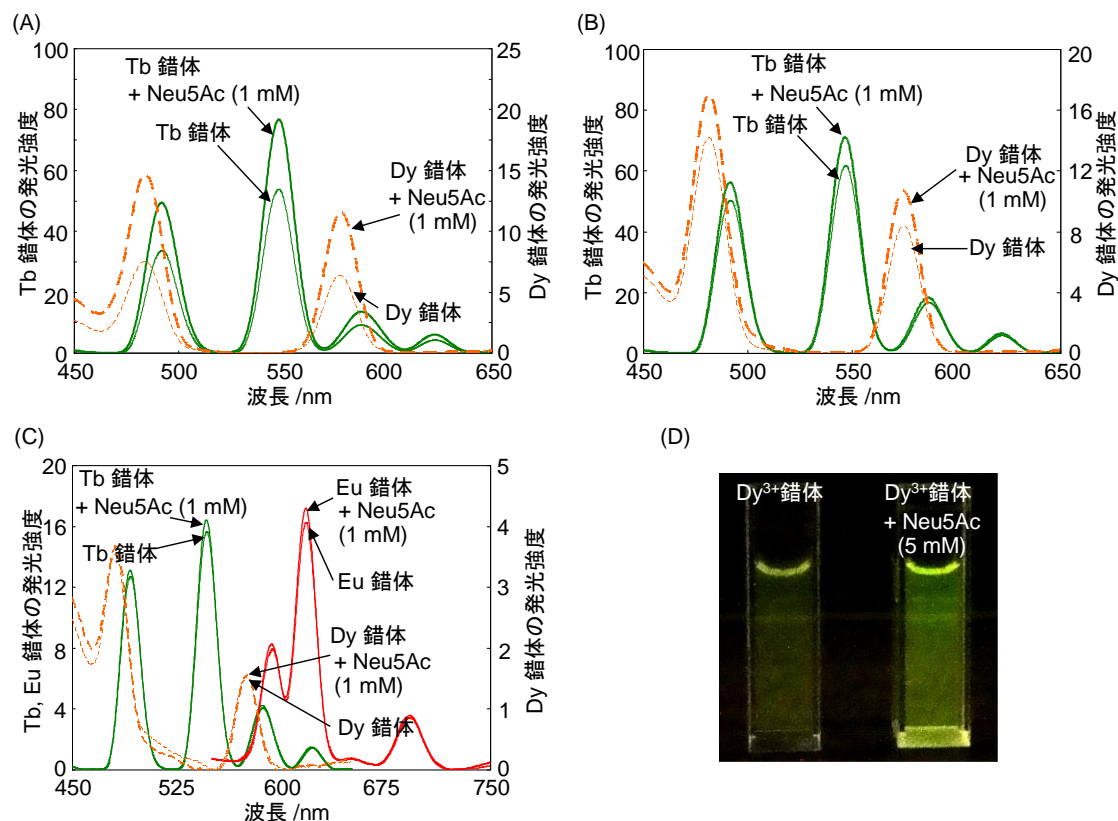


図 2-5 単糖の添加による Ln に基づく発光増感. $[Ln^{3+}\text{-L}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, pH 10.2. (A) Ln^{3+} -ABNOTA 錯体の発光スペクトル, (B) Ln^{3+} -ABDO3A 錯体の発光スペクトル, (C) Ln^{3+} -ABPCTA 錯体の発光スペクトル, (D) Neu5Ac (5 mM) を添加したときの Dy^{3+} -ABNOTA 錯体 ($1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$) の発光写真.

pH 10.2 の水溶液中で、1 mM の Neu5Ac を添加したとき、すべての Ln^{3+} 錯体に発光増感が観測された。(図 2-5 (A) ~ (C)). その中でも、 Dy^{3+} -ABNOTA 錯体は最も大きな増感を示し、その増感率は最大 221%と肉眼でも十分に確認できるほど大きかった(図 2-5 (D)). 一方、その他の錯体は Neu5Ac の添加に伴う増感を肉眼で確認することができなかった。また、10 mM の単糖を添加したときも、すべての Ln^{3+} 錯体に発光増感が観測された。これらの増感は、 Ln^{3+} -L-単糖錯体を形成していることを示し、本システムが予測どおり配位水分子と単糖分子の配位子交換反応により発光増感したと考えた。

3-2 糖分子による発光増感の pH 依存性

Ln^{3+} -L-単糖錯体の形成に伴い発光強度の増感が確認されたため、三元錯体の発光強度の pH 依存性を調査した。 Ln^{3+} -ABNOTA-単糖錯体の結果を図 2-6 に示す。

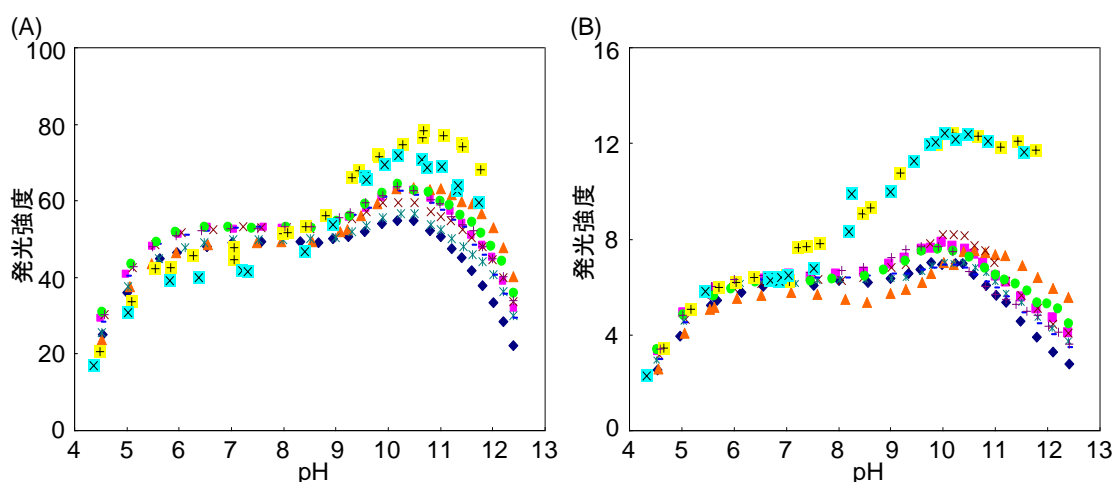


図 2-6 Ln-ABNOTA-単糖錯体の発光強度の pH 依存性. $[\text{Ln-ABNOTA}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$. ◆ : Ln-ABNOTA, ■ : Ara (10 mM), ▲ : Fru (10 mM), × : Gal (10 mM), * : Glc (10 mM), - : Man (10 mM), ● : Rib (10 mM), + : Xyl (10 mM), □ : Neu5Ac (1 mM), ⊠ : Neu5Ac ester (1 mM). (A) Tb 錯体, (B) Dy 錯体.

Ln^{3+} -ABNOTA 錯体の発光強度の pH 依存性は、pH 4~6 で発光強度が増大した (図 2-6)。これは L のアミノベンジル基の酸解離反応に基づくものであろう (アニリンの $\text{p}K_a = 4.9$)。後の項 (本章 3-3 項) でも触れるが、 Tb^{3+} および Dy^{3+} 錯体ともに単糖を添加しない場合 (単糖分子がない場合) でも、pH 10 付近で若干の増感がみられた。pH 11 以上での消光は、Ln 水酸化物形成に伴う ABNOTA 錯体の解離反応に基づくものと考察した。10 mM の中性糖 (Ara, Fru, Gal, Glc, Man, Rib および Xyl) を加えた場合、 Tb^{3+} 錯体の発光の pH 依存性は、pH 6~9 まで一定で、pH 9~11 で~17%程度の増感が観測された。 Dy^{3+} 錯体については pH 6~8 まで一定で、pH 8~11 で~17%程度の増感が観測された。一方、1 mM の Neu5Ac を加えた場合、 Tb^{3+} 錯体の発光の pH 依存性は、中性糖の場合と同様 pH 6~9 まで一定であったが、pH 9~11 で劇的な増感 (約 40%) が観測された。その後、pH 11 以上になると発光強度は減少した。 Dy^{3+} 錯体についても、pH 6~8 まで一定で、pH 8~11 でより劇的な増感 (約 80%) が観測された。この結果から、pH 10 付近で Ln^{3+} -ABNOTA 錯体と Ln^{3+} -ABNOTA-Neu5Ac 錯体の発光強度の差に大きな差が生じ、シアル酸の認識が可能であることが分かった。また、 Tb^{3+} および Dy^{3+} 錯体ともに 10 mM の中性糖分子すべてに対し増感現象が確認されたが、1 mM の Neu5Ac と Neu5Ac のカルボキシル基をエステル化した Neu5Ac ester に対しては濃度が中性単糖の濃度の 10 分の 1 にも関わらず、中性糖分子よりも大きな増感が観測されたことから、Neu5Ac に対し高い選択性を示すことが明らかとなった。また、 Tb^{3+} および Dy^{3+} 錯体ともに Neu5Ac と Neu5Ac ester に対する発光強度の pH 依存性がほぼ同じ挙動 (図 2-6) であることから、Neu5Ac 中のカルボキシル基は Ln^{3+} 錯体への配位にほとんど関与していないことが明らかとなった。Neu5Ac の配位の機構に関する考察は次項 (3-3 項) で詳しく行う。

次に、七座配位子錯体 Tb^{3+} -ABDO3A および Eu^{3+} -ABPCTA 錯体に糖類を添加した時の結果を図 2-7 に示す。

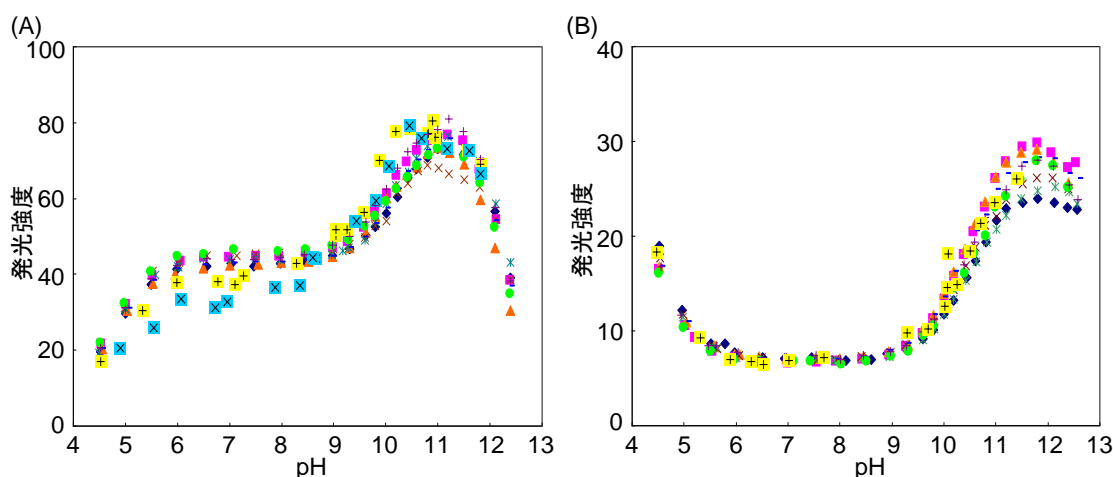


図 2-7 Ln^{3+} -L-単糖錯体の発光強度の pH 依存性. $[\text{Ln}^{3+}\text{-L}] = 1.0 \times 10^{-6}$ M. \blacklozenge : Ln-L, \blacksquare : Ara (10 mM), \blacktriangle : Fru (10 mM), \times : Gal (10 mM), \blacklozenge : Glc (10 mM), $-$: Man (10 mM), \bullet : Rib (10 mM), $+$: Xyl (10 mM), $+$: Neu5Ac (1 mM), \times : Neu5Ac ester (1 mM). (A) Tb^{3+} -ABDO3A 錯体, (B) Eu^{3+} -ABPCTA 錯体.

Tb^{3+} -ABDO3A 錯体の発光の pH 依存性についても、 Ln^{3+} -ABNOTA 錯体同様、単糖を添加しなくとも pH10 付近で増感がみられた (図 2-7 (A)). 10 mM の中性糖 (Ara, Fru, Gal, Glc, Man, Rib, Xyl) を加えた場合、pH 9~11 で~5%程度と小さいが有意な増感が観測された. 1 mM の Neu5Ac を加えた場合、 Tb^{3+} -ABDO3A 錯体の発光の pH 依存性は、pH 6~9 まで一定であったが、pH 9~11 で大きな増感が観測された. 一方、pH 11 以上では増感が観測されなくなった. この結果から、pH 10 付近で Ln^{3+} -ABDO3A 錯体と Ln^{3+} -ABDO3A-Neu5Ac 錯体の発光強度の差に有意な差が生じ、シアル酸の認識が可能であることがわかった. また、Neu5Ac と Neu5Ac ester に対する発光強度の pH 依存性も Ln^{3+} -ABNOTA 錯体同様、中性糖分子よりも大きな増感が観測されたことから、Neu5Ac に対し高い選択性を示すことが明らかとなった (図 2-7 (A)).

Eu^{3+} -ABPCTA 錯体の発光の pH 依存性については、pH 4~6 で蛍光強度が小さくなっているが、これは、発光部位であるピリジン環の酸解離 ($\text{p}K_a = 5.2$) によりピリジン環から Ln へのエネルギー移動効率が減少したものと考察した. また、 Ln^{3+} -ABNOTA 錯体、 Ln^{3+} -ABDO3A 錯体同様、単糖を添加しなくとも pH 10 付近で増感がみられた (図 2-7 (B)). 10 mM の中性糖を加えた場合、 Eu^{3+} -ABPCTA 錯体の発光の pH 依存性は、pH 6~10 まで一定で、pH 10~11 で発光増感 (約 20%) が観測された. その後、pH 12 以上になると発光強度は減少した. ABNOTA, ABDO3A 錯体とは異なり、1 mM の Neu5Ac に対する増感が他の中性糖 (10 mM) の増感に対し小さく、その選択性の低いことが明らかとなった.

3-3 シアル酸に対する発光増感

ABNOTA 錯体, ABDO3A 錯体, ABPCTA 錯体の 1 mM の Neu5Ac に対する増感率を図 2-8 にまとめる.

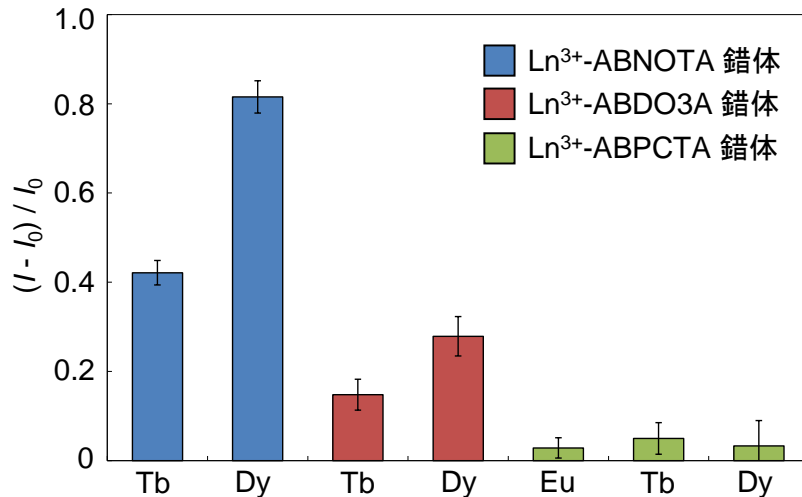


図 2-8 Neu5Ac (1 mM) の添加による Ln 錯体の発光増感. [Ln-L] = 1.0×10^{-6} M, pH 10.2 (ABNOTA および ABDO3A 錯体), pH 11.1 (ABPCTA 錯体).

1 mM の Neu5Ac に対し, Tb³⁺-ABNOTA 錯体は約 40%, Dy³⁺-ABNOTA 錯体は約 80% の増感が観測された. 一方, Tb³⁺-ABDO3A 錯体では約 15%, Dy³⁺-ABDO3A 錯体は約 30% と ABNOTA 錯体の増感率の 1/2 以下であった. また, すべての Ln³⁺-ABPCTA 錯体の増感は 5% 以下と他の錯体と比較して極めて小さかった.

Neu5Ac による各 Ln³⁺錯体の増感の違いを考察するため, 弱アルカリ性条件での Ln³⁺錯体の配位水分子数を見積もった. ここで, 発光寿命測定について説明する. Ln³⁺錯体の発光は f-f 遷移によるため長寿命発光であることが知られており, その遅延蛍光の発光強度が一次減衰を示すとき発光寿命 τ は次式で表せる.

$$I = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2-1)$$

ここで, I は時間 t における発光強度, I_0 は測定開始時の発光強度である. この発光寿命を軽水及び重水中で測定する. すなわち, OH 振動子が存在するときとしないときの寿命を測定し, その発光寿命の逆数の差から配位水分子数を見積もることができる. Horrock Jr.らの研究から明らかとなっている^{3,4}. Horrock Jr.らは, 発光寿命の逆数の差と X 線結晶構造によって決定した配位水分子数の数から次式に示す経験式を導いた.

$$q = 4.2(\tau_{\text{H}_2\text{O}}^{-1} - \tau_{\text{D}_2\text{O}}^{-1}) \quad (2-2)$$

ここで, 4.2 は Tb³⁺錯体に対する係数であり, $\tau_{\text{H}_2\text{O}}$ は軽水中での発光寿命, $\tau_{\text{D}_2\text{O}}$ は重水中での発光寿命である. 測定結果を表 2-2 に示す.

表 2-2 Ln^{3+} -L 錯体の配位水分子数^a.

| | pH | τ/ms | q |
|-------------------------------|------|------------------|------|
| free Tb^{3+} -ABNOTA | 10.3 | 1.46 ± 0.02 | 1.34 |
| free Tb^{3+} -ABDO3A | 10.2 | 1.94 ± 0.02 | 0.90 |
| free Tb^{3+} -ABDO3A | 11.0 | 2.21 ± 0.02 | 0.54 |
| free Tb^{3+} -ABPCTA | 11.1 | 1.58 ± 0.03 | 1.31 |

^a $[\text{Tb}^{3+}\text{-L}] = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $R^2 = 0.998\text{-}0.999$.

Neu5Ac に対する認識能が発現する pH 10.3 のときの遊離の Tb^{3+} -ABNOTA 錯体には配位水が 1.3 個存在するのに対し、遊離の Tb^{3+} -ABDO3A 錯体の配位水数は 0.9 個であった。これは、七座配位子である ABDO3A が六座配位子である ABNOTA より配位数が多いため、錯体の残余配位座が少なかったためである。 Tb^{3+} -ABDO3A 錯体では Neu5Ac との配位子交換する水分子が少ないため（空配位座数が少ない）、増感が ABNOTA 錯体より小さかったと考察した。また、 Tb^{3+} -ABDO3A 錯体は pH 11 付近で糖認識能を示さなくなるが、このときの配位水分子数は 0.5 個と、糖分子との配位子交換する水分子がないためと考えられる。一方、遊離の Tb^{3+} -ABPCTA 錯体は ABNOTA 錯体と同程度の配位水数であり、配位子交換するために十分な水分子が存在するが、Neu5Ac による増感は極めて小さかった。現段階でこのような結果となった原因は不明だが、配位子の PCTA 骨格にピリジン環が導入されていることによって残余配位空間が狭くなり、Neu5Ac の配位を妨げた可能性があると考えた。

以下の項では、シアル酸に対し最も大きな増感を示した ABNOTA 錯体のシアル酸認識能について述べる。

3-4 Ln^{3+} -ABNOTA 錯体のエネルギー移動発光の糖分子による増感

これまでは単糖分子による増感を調査してきたが、この項では単糖および二糖類分子による Ln^{3+} -ABNOTA 錯体の増感を詳細に調査した。 Ln^{3+} -ABNOTA 錯体に 1 mM 単糖および二糖類を添加したときの発光強度の増感を図 2-9 に示す。

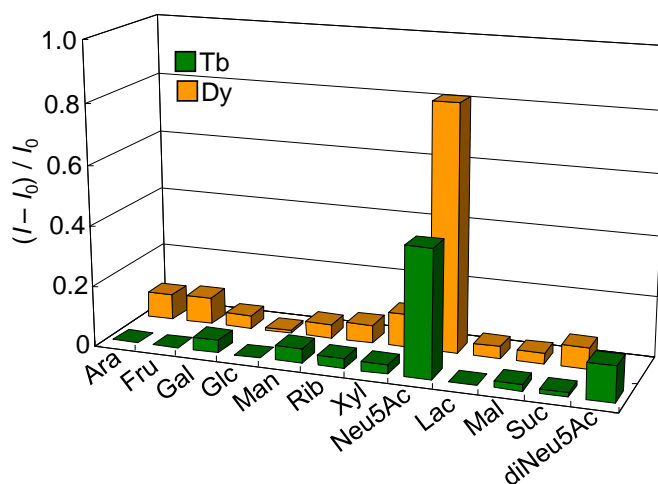


図 2-9 1 mM の糖分子の添加による発光増感率。
 $[\text{Ln}^{3+}\text{-ABNOTA}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, pH 10.2.

Tb³⁺-ABNOTA 錯体では、他の中性糖と比較して Neu5Ac と diNeu5Ac に対する増感が大きかった。diNeu5Ac による増感は Neu5Ac よりも小さかったが、二糖類分子同士では最も大きかった。この結果から、Ln³⁺-ABNOTA 錯体が Neu5Ac 骨格に対し高い選択性を示すことが分かった。これは、Neu5Ac の中性糖に存在しない官能基であるアセトアミド基、カルボキシル基およびグリセロール基が配位に関与しているためであると考えられる。また、本章 3-2 項の Neu5Ac ester に対する発光強度の pH 依存性からカルボキシル基は配位に大きく関与していないと考えられ、Ln³⁺-ABNOTA 錯体は Neu5Ac や diNeu5Ac のアセトアミド基およびグリセロール基側の骨格に特異的であると推測した。この認識機構についての詳しい考察は第三章で述べる。

3-5 Ln³⁺-ABNOTA 錯体と糖分子との熱力学的安定性

さらに Ln³⁺-ABNOTA 錯体のシアル酸特異性に関して調査をするため、Ln³⁺-ABNOTA 錯体と糖分子との安定度定数を測定した。pH 10.3 での Ln³⁺-ABNOTA-糖錯体の条件安定度定数は、発光強度の糖分子濃度依存性から決定した。ここで三元錯体形成の平衡を考えると次のようになる。



ここで、C、S および C-S はそれぞれ [Ln³⁺-ABNOTA]、糖分子および [Ln³⁺-ABNOTA-糖]。ある pH での条件安定度定数 K' は、次のようになる。

$$K' = \frac{[C-S]}{[C][S]} \quad (2-4)$$

観測される発光強度 I_{obs} は式 2-5 のように表すことができる。

$$I_{\text{obs}} = I_0[C] + I_{\infty}[C-S] \quad (2-5)$$

ここで、 I_0 と I_{∞} は 1 M 当たりの [Ln³⁺-ABNOTA] と [Ln³⁺-ABNOTA-糖] の発光強度である。一方、Ln³⁺-ABNOTA 錯体の物質収支は次のようになる。

$$[C]_{\text{T}} = [C] + [C-S] \quad (2-6)$$

ここで、 $[C]_{\text{T}}$ は Ln³⁺-ABNOTA 錯体の全濃度である。式 2-4、2-5 および 2-6 を組み合わせて式 2-7 を導く。

$$\frac{I_{\text{obs}} - I_0}{I_{\infty} - I_0} = \frac{K[S]}{K'[S] + 1} \quad (2-7)$$

実験的に得られたプロットに対して、式 2-7 を非線形最小二乗法を用いてフィッティングし

た. フィッティングの結果を図 2-10 に, 得られた条件安定度定数を表 2-3 に示す.

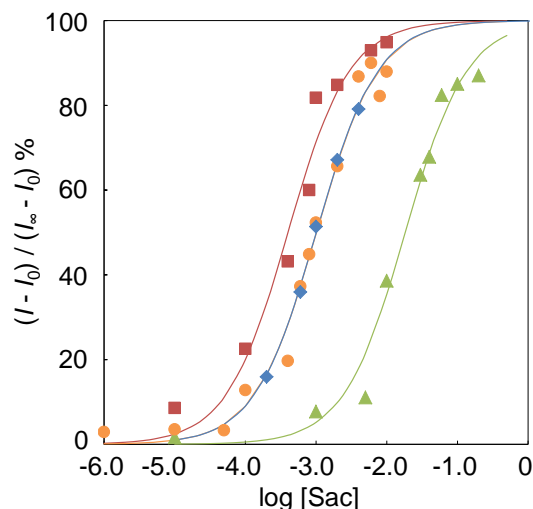


図 2-10 糖濃度変化に対する発光増感率 $((I - I_0) / (I_\infty - I_0)) \%$. 実線は平衡計算の非線形最小二乗フィッティング結果. $[\text{Ln}^{3+}\text{-ABNOTA}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, pH 10.3. \blacktriangle : $\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA-Rib}$, \blacklozenge : $\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA-diNeu5Ac}$, \circ : $\text{Dy}^{3+}\text{-ABNOTA-Neu5Ac}$, \blacksquare : $\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA-Neu5Ac}$.

表 2-3 $\text{Ln}^{3+}\text{-ABNOTA}$ 錯体と単糖アニオンとの条件安定度定数 K (pH10.3).

| | $\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA}$ | $\text{Dy}^{3+}\text{-ABNOTA}$ |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| $\log K_{\text{Rib}}$ | 1.77 ± 0.07 | - |
| $\log K_{\text{Neu5Ac}}$ | 3.39 ± 0.10 | 2.99 ± 0.07 |
| $\log K_{\text{diNeu5Ac}}$ | 3.03 ± 0.05 | - |

三元錯体の pH 10.3 での条件安定度定数 K' を測定したところ, Neu5Ac および diNeu5Ac に対する値はリボースの条件安定度定数より 20~50 倍大きく, これは発光増感の大小と一致している. したがって, シアル酸認識特異性を発現している要因の一つが三元錯体形成の熱力学的安定性であることが分かった. また, 得られた安定度定数は 10^3 M^{-1} オーダーであり, 水溶液中における人工プローブとして一般的なフェニルボロン酸誘導体プローブ ($\sim 10^2 \text{ M}^{-1}$) よりも一桁以上大きい値である. このようにシアル酸に特異的なプローブの報告例は少なく, 興味深い結果である.

3-6 シアル酸分子の検出限界と定量限界

$\text{Ln}^{3+}\text{-ABNOTA}$ 錯体がシアル酸を特異的に認識することが明らかとなった. この項では, $\text{Ln}^{3+}\text{-ABNOTA}$ 錯体のシアル酸検出感度および他の中性糖からの妨害を調査することにより, $\text{Ln}^{3+}\text{-ABNOTA}$ 錯体を血清などの実サンプル中のシアル酸の検出または定量への可能性を評価する.

まず, Neu5Ac の検出限界と定量限界を測定した. 検出限界はブランク値の 3σ を用いて算出し, 定量限界は 10σ を用いた. 得られた検量線を図 2-11 に, 検出限界および定量限界を表 2-4 に示す.

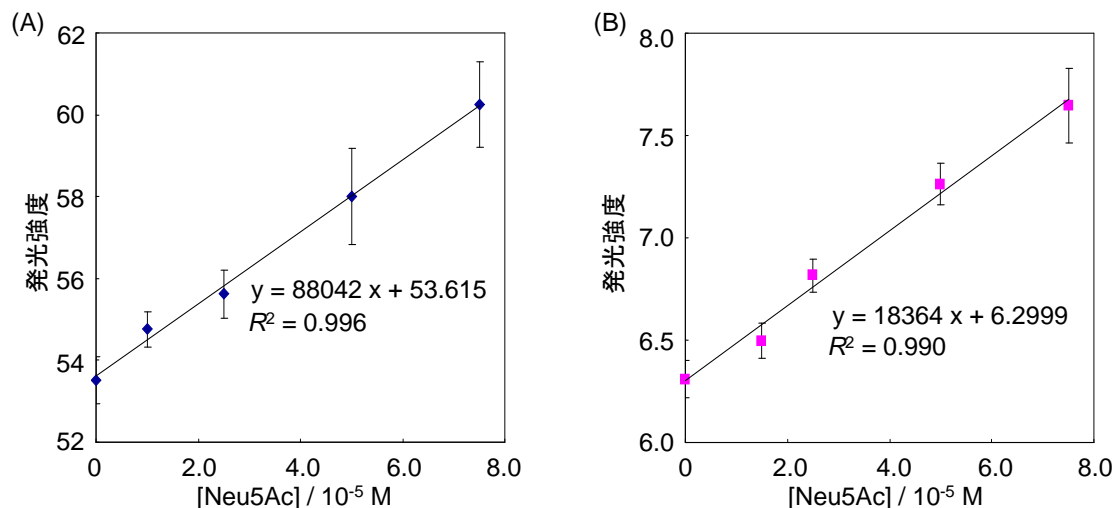


図 2-11 Neu5Ac の検量線. (A) Tb^{3+} 錯体. $[Tb^{3+}\text{-ABNOTA}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, pH 10.3. (B) Dy^{3+} 錯体. $[Dy^{3+}\text{-ABNOTA}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, pH 10.2.

表 2-4 Neu5Ac の検出限界と定量限界.

| | $Tb^{3+}\text{-ABNOTA}$ | $Dy^{3+}\text{-ABNOTA}$ |
|---------|-------------------------|-------------------------|
| 検出限界 /M | 1.9×10^{-5} | 1.5×10^{-5} |
| 定量限界 /M | 6.5×10^{-5} | 4.9×10^{-5} |

得られた値は, 健常者の血清中シアル酸濃度 $2 \times 10^{-4} \text{ M}^{5,6}$ よりも低濃度レベルであり, $Ln^{3+}\text{-ABNOTA}$ 錯体を血清サンプルに適用できる可能性がある.

また, 血清と同様の糖類組成で調製した模擬試料中のシアル酸を検出できるかを調査した. 糖混合試料として, 血清中の濃度と同程度である中性糖 ($[Ara, Fru, Man, Gal, Rib, Xyl] = 1 \text{ mM}$, $[Glc] = 10 \text{ mM}$) と 0.2 mM Neu5Ac (健常者の濃度レベル) あるいは 1 mM Neu5Ac (腫瘍患者の濃度レベル) を含むものを用いた. 結果を図 2-12 に示す.

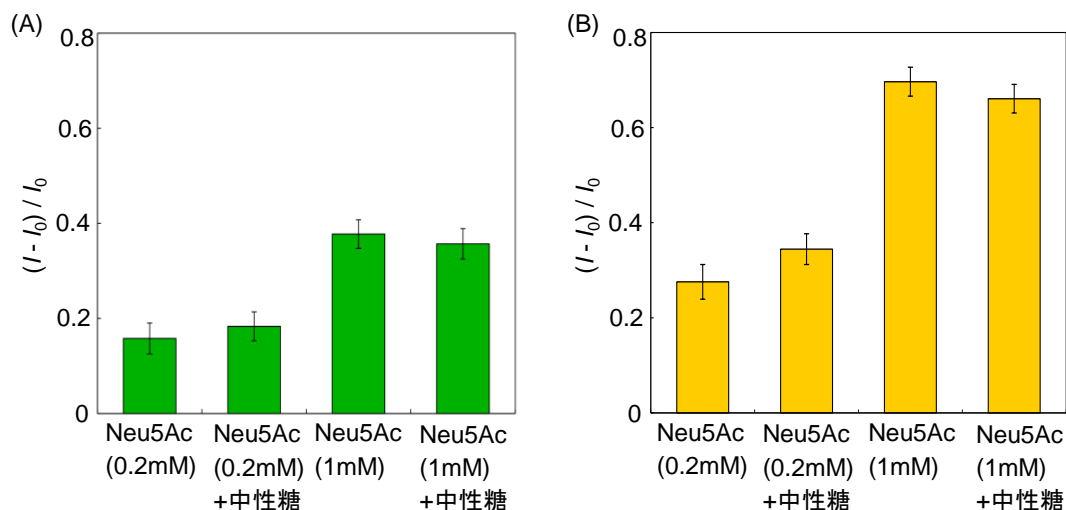


図 2-12 糖類混合試料の添加による発光増感. (A) Tb³⁺錯体, (B) Dy³⁺錯体. [Ln³⁺-ABNOTA] = 1.0 × 10⁻⁶ M, 中性糖 ([Ara, Fru, Man, Gal, Rib, Xyl] = 1 mM, [Glc] = 10 mM), pH 10.2.

Tb³⁺錯体, Dy³⁺錯体ともに, 血清試料中の中性糖濃度の存在下でも, Neu5Ac (0.2 および 1 mM) に対する増感, 中性糖を添加しない場合とほぼ等しく (図 2-12), 血清などの生体試料中の Neu5Ac の定量できるポテンシャルがある.

3-7 ムチン糖鎖上のシアル酸認識

前項で血清に近い組成の中性糖共存下でのシアル酸の判別を行ったが, ここでは, 第一章でも述べた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 (MUC) に代表される生体分子に結合した糖鎖末端のシアル酸残基に対しても分子認識が可能であるかを調査した. MUC は分子の約 80% が糖で構成され, シアル酸含有量の異なる種類が存在することか知られている⁷. 本研究では, シアル酸含有量が 1% 以下のブタ胃由来ムチンである MUC3 と 9~17% のウシ顎下線由来ムチンである MUC1 を用い, 両者のシアル酸含有量の違いが Ln³⁺錯体の発光増感により判別できるかを試みた.

3-7-1 Ln 錯体の発光増感による MUC 糖鎖上のシアル酸認識

Ln³⁺錯体の発光増感による MUC1 および MUC3 の認識を試み, それぞれの MUC を添加し発光スペクトルを測定した. 結果を図 2-13 に示す.

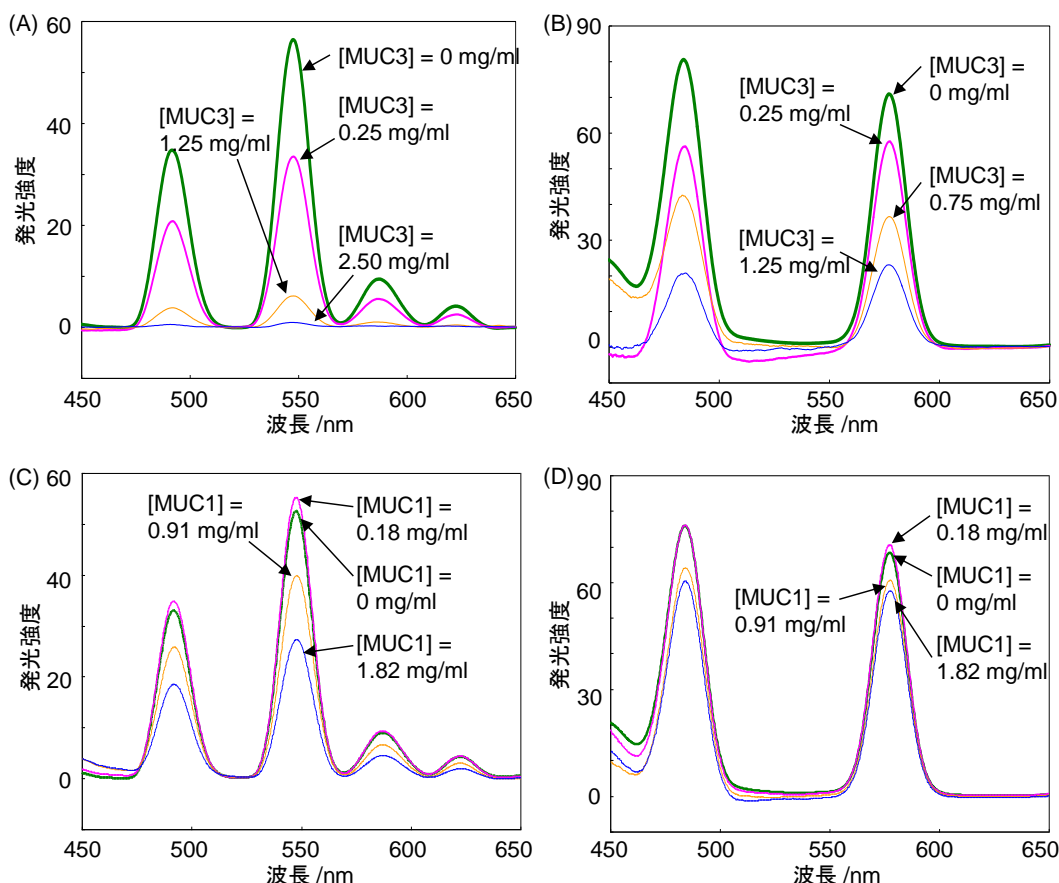


図 2-13 MUC を添加したときの Ln^{3+} -ABNOTA 錯体の発光スペクトル. (A) Tb^{3+} -ABNOTA 錯体に MUC3 を添加した場合の発光スペクトル. $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, pH 10.3. (B) Dy^{3+} -ABNOTA 錯体に MUC3 を添加した場合の発光スペクトル. $[\text{Dy}^{3+}\text{-ABNOTA}] = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, pH 10.3. (C) Tb^{3+} -ABNOTA 錯体に MUC1 を添加した場合の発光スペクトル. $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, pH 10.3. (D) Dy^{3+} -ABNOTA 錯体に MUC1 を添加した場合の発光スペクトル. $[\text{Dy}^{3+}\text{-ABNOTA}] = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, pH 10.3.

MUC3 を添加することにより、MUC3 中の糖分子と Ln^{3+} -ABNOTA 錯体とが三元錯体を形成し、発光増感することを期待したが、 Tb^{3+} および Dy^{3+} 錯体ともに MUC3 濃度が高くなるほど発光強度が減少した (図 2-13 (A) および (B)). しかしながら、MUC1 については、0.18 mg/ml の MUC1 を添加したとき Tb^{3+} および Dy^{3+} 錯体ともに僅かながらも有意な増感が観測された. さらに MUC1 濃度を増加させると MUC3 同様両 Ln^{3+} 錯体の発光強度が減少した (図 2-13 (C) および (D)). 高濃度の MUC1 および MUC3 添加時の消光は、MUC によって励起光の一部が吸収される内部濾光効果により見かけの発光強度が減少したためであると考察した. 実際に、MUC の光吸収を確認するため、各々の吸収スペクトルを測定した. 結果を図 2-14 に示す.

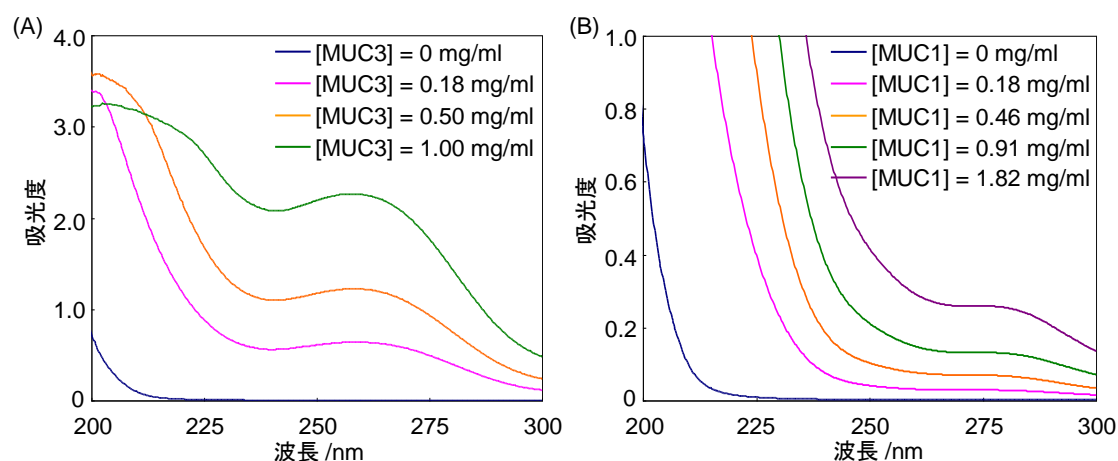


図 2-14 MUC3 (A) および MUC1 (B) の吸収スペクトル. [MUC3] = 0, 0.25, 0.50, 1.00 mg/ml, [MUC1] = 0, 0.18, 0.46, 0.91, 1.82 mg/ml, $I = 0.1 \text{ M (NaCl)}$, pH 10.3.

一般に吸光度 0.2 (1 cm セル) よりも大きい溶液では内部濾光効果のために消光が起こる可能性がある⁸. MUC3 濃度 1.0 mg/ml のとき, 吸光度はそれぞれ Tb^{3+} 錯体の励起波長である 238.8 nm で 2.0 および Dy^{3+} 錯体の励起波長である 286.8 nm で 1.0 であるため, 照射された励起光の大部分が MUC3 により吸収されたことが分かった. そのため, MUC3 の添加に伴う発光強度の減少は, MUC3 の内部濾光効果によるものと考察した. 一方, MUC1 (図 2-14 (B)) では 0.18 mg/ml のときの吸光度はそれぞれ 0.078 (238.8 nm), 0.022 (286.8 nm) であるため, MUC3 の内部濾光効果による蛍光への影響は小さく, 両 ABNOTA 錯体の増感が消光作用を上まわったために僅かな増感が観測されたと考えられる. さらに MUC1 濃度が増大すると内部濾光効果が大きくなり蛍光強度が減少したと考察した. 以上のように, Ln^{3+} 錯体の発光増感による MUC 糖鎖上のシアル酸を認識する上で, 内部濾光効果の影響を避けるのは困難であった.

3-7-2 発光寿命測定による MUC 糖鎖上のシアル酸認識

MUC の内部濾光効果より Ln 錯体の発光増感による MUC 認識は不可能と判断し, 発光寿命測定によって MUC 認識ができるかを調査した. Ln^{3+} 錯体の発光寿命は Ln^{3+} 錯体の配位水分子の数に依存しており, MUC 中のシアル酸残基と三元錯体を形成すると配位水分子が減少し OH 振動子の倍音への ET が小さくなるため長寿命となる. この寿命の変化は, 発光量とは関係がないため, MUC の認識できる可能性がある. 測定結果を図 2-15 に示す.

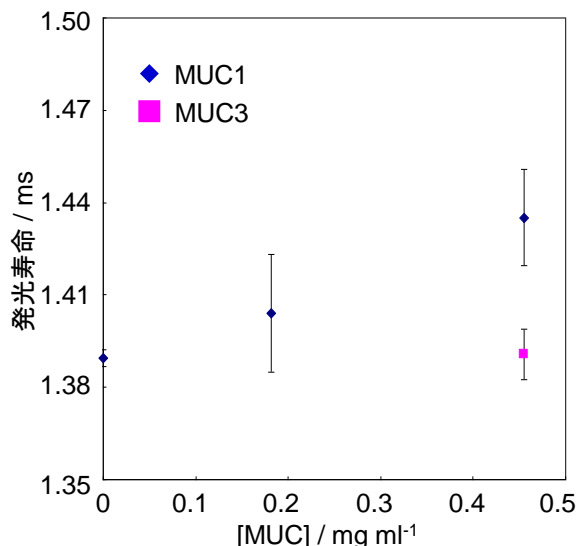


図 2-15 Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の発光寿命の MUC 濃度依存性. $[Tb^{3+}\text{-ABNOTA}] = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, pH 10.3.

MUC1 濃度 0~0.45 mg/ml (シアル酸換算濃度 0~0.25 mM) の範囲で, MUC1 濃度が高くなるにつれて発光寿命も長くなることが分かった. 実際に, MUC1 中のシアル酸が Tb^{3+} -ABNOTA 錯体に配位しているかを確認するため, 0.45 mg/ml (シアル酸換算濃度 0.13~0.25 mM) の MUC1 を添加した時の発光寿命と 0.1 mM の Neu5Ac を添加したときの発光寿命を比較した. 発光寿命はそれぞれ $1.44 \pm 0.02 \text{ ms}$ (MUC1), $1.448 \pm 0.009 \text{ ms}$ (0.1 mM Neu5Ac) であり, ほぼ一致した. よって, MUC1 中のシアル酸が Tb^{3+} -ABNOTA 錯体と三元錯体を形成していると考えるのが妥当である. また, シアル酸含有量が 1%以下の MUC3 を 0.45 mg/ml 添加 (シアル酸換算濃度 0.014 mM 以下) した時の発光寿命は, $1.391 \pm 0.008 \text{ ms}$ であり, シアル酸を添加していないときの発光寿命 ($1.390 \pm 0.003 \text{ ms}$) とほぼ一致する. したがって, シアル酸をほとんど有していない MUC3 では蛍光認識されなかった. このように同濃度の MUC1 と MUC3 の添加によるそれぞれ発光寿命は有意な差が得られ, シアル酸含有量の異なる MUC の判別が可能であると考えられる.

4 結言

六座および七座大環状ポリアミノカルボン酸 ABNOTA, ABDO3A, ABPCTA と 8~9 座配位をする発蛍光性 Ln イオンである Tb^{3+} , Dy^{3+} , Eu^{3+} を錯形成させた Ln^{3+} 錯体はシアル酸と三元錯体を形成し, それに伴う Ln エネルギー移動発光の増感現象が観測された. その増感率は $Dy^{3+}\text{-ABNOTA} > Tb^{3+}\text{-ABNOTA} > Dy^{3+}\text{-ABDO3A} > Tb^{3+}\text{-ABDO3A} > Eu^{3+}\text{-ABPCTA} \approx Dy^{3+}\text{-ABPCTA} \approx Tb^{3+}\text{-ABPCTA}$ の順に大きかった. 特に, $Dy^{3+}\text{-ABNOTA-Neu5Ac}$ 錯体の増感率は肉眼でも確認できるほど大きかった. このように発光増感により Neu5Ac を認識可能でかつ視覚的に確認された例は過去にない. 使用した配位子の中で最もシアル酸により増感する ABNOTA 錯体を調査すると, Neu5Ac の認識能は pH 8~11 の弱アルカリ条件下で発現し, 先行研究での結果 (pH 11.8) より低 pH での認識に成功した. また, 三元錯体の安定度定数

を測定したところ、Neu5Ac および diNeu5Ac に対する値が 10^3 M^{-1} オーダーであり水溶液中で用いる人工プローブとしてはかなり大きい値であり、かつシアル酸骨格に特異的な増感現象であった。選択的に認識可能なシアル酸の検出限界と定量限界は、健常者の血清シアル酸濃度より低濃度であり、比較的高感度であった。また、中性糖を添加した混合サンプルの増感は、添加しない増感と等しかったことから、 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唆した。さらに、MUC 糖鎖上のシアル酸を Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の発光寿命により認識することが可能であることを示し、同濃度の MUC1 と MUC3 の添加によるそれぞれ発光寿命は有意な差が得られたことから、シアル酸含有量の異なる MUC の判別できる可能性を示唆した。

しかし、現段階の Ln^{3+} 錯体は、糖認識タンパク質であるレクチンより糖分子との安定度定数が小さいこと、糖鎖の認識が不可能であるといった課題が残っており、これらを解決することで将来、癌の診断、生体分子中のシアル酸の定量が可能であろう。その点に関しては第五章で述べる。

5 参考文献

- 1) 引地篤, 北見工業大学大学院修士論文, **2009**, 33–44.
- 2) 島田悟, 埼玉大学卒業論文, **2008**, 1–36.
- 3) W. D. Horrock Jr., D. R. Sudnick, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 14, 284–392.
- 4) T. Kimura, Y. Kato, *J. Alloys Compd.*, **1998**, 275-277, 806–810.
- 5) A. Lagana, B. Pardo-Martinez, A. Marino, G. Fago, M. Bizzarri, *Anticancer Res.*, **1995**, 15, 2341–2346.
- 6) A. Lagana, B. Pardo-Martinez, A. Marino, G. Fago, M. Bizzarri, *Clin. Chim. Acta*, **1995**, 243, 165–179.
- 7) K. C. Kim, E. P. Lillehoj, *AJRCMB*, **2008**, 39, 644–647.
- 8) 西川泰治, 平木敬三, 蛍光・りん光分析法, **1987**, 共立出版株式会社, 50–52.

第三章 Ln-ABNOTA 錯体のシアル酸認識およびシアル酸認識機構の解明

1 緒言

第二章では、 Ln^{3+} -ABNOTA 錯体は Ln^{3+} -ABDO3A 錯体、 Ln^{3+} -ABPCTA 錯体よりも特異的なシアル酸選択性を示した。また、前章での Neu5Ac と Neu5Ac ester に対する発光強度の pH 依存性がほぼ同じ挙動 (図 2-6) であることから、シアル酸のカルボキシル基は Ln^{3+} 錯体への配位にほとんど関与していないという考察をしたが、 Ln^{3+} -ABNOTA 錯体の特異的シアル酸認識機構の解明には至っていない。今後、 Ln^{3+} -ABNOTA 錯体系を癌マーカーなどの生体プローブへ適用する場合、単糖分子認識から糖鎖認識へ、シアル酸認識能における選択性および安定度定数の向上といったプローブの高性能化が必要になると考える。高性能化するには、このシアル酸認識がどのような機構で起こるかを明らかにし、それを増幅する必要がある。そこで、この章では、 Ln^{3+} -ABNOTA 錯体のシアル酸認識機構の解明について述べる。

2 実験

2-1 試薬

N-メチルアセトアミド (特級) を東京化成工業株式会社 (東京) から、グリセロール (特級) を和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。キャピラリー電気泳動で用いる泳動緩衝剤には、和光純薬株式会社から購入したトリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris) の所定量を超純水で溶解し、HCl を用いて、pH を調整した Tris-HCl 緩衝液を使用した。その他の試薬は第二章と同じである。

2-2 操作手順

2-2-1 電気移動度の測定

試料は、 Tb^{3+} -ABNOTA 錯体溶液を 5.0×10^{-4} M, イオン強度調整用の NaCl を 1.0×10^{-2} M ($I = 0.01$), 所定の pH の Tris-HCl を 1.0×10^{-3} M になるように調製した。サンプルは Agilent CE システム G1600BA を用いてキャピラリー電気泳動 (CE) を行い、錯体の泳動時間を測定した。電気浸透流 (EOF) の計測には非イオン性物質マーカーとしてメタノールを用いた。泳動液は、NaCl を 1.0×10^{-2} M ($I = 0.01$), 所定の pH の Tris-HCl を 1.0×10^{-3} M になるように調製した。溶融シリカキャピラリーは、内径 50 μm , 全長 31 cm, 有効長 22.5 cm のものを使用した。測定条件は、インジェクション量 20 mbar, 4 s (4 nl), 印加電圧 10 kV, 検出波長 239 nm とした。

2-2-2 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定

Eu^{3+} と ABNOTA をモル濃度が 1:1 となるように調製した水溶液を減圧下 100°C で蒸発乾固した後に重水で溶解し Eu^{3+} -ABNOTA 錯体重水溶液とした。試料は、 Eu^{3+} -ABNOTA 錯体重水溶液 (最終濃度 8.2×10^{-3} M) に Neu5Ac または Neu5Ac ester (最終濃度 5.0×10^{-3} M) を添加し、pH を調整後、重水で定容とし、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した (BRUKER

ADVANCE 500). 得られたスペクトルは, 軽水の ^1H ピーク (4.63ppm) 位置を基準として補正した.

3 結果と考察

3-1 酸解離定数の測定

図 2-6 において, 1 mM Neu5Ac を添加した際の pH 8~11 でのシグナル変化は pH に依存することから, 酸解離反応に起因すると考えられる. この範囲で Neu5Ac ($\text{p}K_{\text{a}} = 2.6$) は $\text{p}K_{\text{a}}$ を持たないことから Ln^{3+} 錯体によるものと考えられ, Ln^{3+} 錯体中で酸解離可能なプロトンが配位水分子のみであることと, 幾つかの Ln^{3+} -ポリアミノカルボン酸錯体の配位水が中性から塩基性条件下で酸解離することが報告されていることから^{1,2}, Ln^{3+} -ABNOTA 錯体でも配位水が酸解離を起こし, その酸解離化学種がシアル酸を認識している可能性が考えられる.

そこで, 予測された酸解離反応が実際に起きているかを確認するため, キャピラリー電気泳動法 (CE) を用い, 錯体の電気移動度の pH 依存性を測定し, 配位水の酸解離定数を測定することにした. CE は, 自由溶液中での電気泳動法の 1 つであり, 検出時間から対象物質固有の電気移動度を求めることができる. その移動度はイオンの電化密度に依存するため, 酸解離を追跡できる可能性がある. 実際, 多くの研究で酸解離反応等の平衡反応は CE によって追跡され, 熱力学定数の決定がなされている^{3,4}. そこで本研究でも CE により, Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の電気移動度を測定することにより $\text{p}K_{\text{a}}$ 値を決定した. ここでは電気移動度の計測法および解析法について述べる. まず, Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の電気泳動図を図 3-1 に示す.

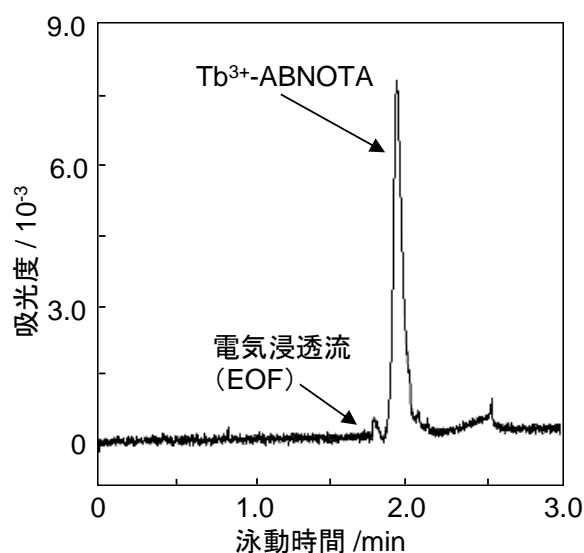


図 3-1 Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の電気泳動図. $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA}] = 0.5 \text{ mM}$, $[\text{NaCl}] = 10 \text{ mM}$, $[\text{Tris-HCl}] = 1 \text{ mM}$, pH 7.07, 泳動液: $[\text{NaCl}] = 10 \text{ mM}$, $[\text{Tris-HCl}] = 1 \text{ mM}$.

図 3-1 より Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の検出時間が得られ、 Tb^{3+} -ABNOTA 錯体のみかけの移動度 μ_a は次式より求めることができる。

$$\mu_a = \frac{lL}{tV} \quad (3-1)$$

ここで、 l 、 L 、 t および V はそれぞれキャピラリーの有効長、全長、検出時間および印加電圧である。また、電気浸透流 (EOF) の移動度 μ_{EOF} は次式のようになり、非イオン性物質マーカーとしてメタノールを用い、その検出時間 t_{EOF} から μ_{EOF} を求めた。

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{lL}{t_{\text{EOF}}V} \quad (3-2)$$

錯体の真の移動度 μ_e は式 3-3 となる。

$$\mu_e = \mu_a - \mu_{\text{EOF}} \quad (3-3)$$

予測された配位水分子の酸解離反応を考えると次のようになる。



C は Tb^{3+} -ABNOTA 錯体であり、 $\text{C-H}_2\text{O}$ と C-OH^- は、それぞれ $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA}(\text{H}_2\text{O})_q]$ と $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA-OH}(\text{H}_2\text{O})_{q-1}]^-$ を示す。また、その酸解離定数は式 3-5 で表わせる。

$$K_a = \frac{[\text{C-OH}^-][\text{H}^+]}{[\text{C-H}_2\text{O}]} \quad (3-5)$$

また、 μ_e はそれぞれの化学種の存在比を考えて次式のようになる。

$$\mu_e = \mu_0 \frac{[\text{C-H}_2\text{O}]}{[\text{C}]_T} + \mu \frac{[\text{C-OH}^-]}{[\text{C}]_T} \quad (3-6)$$

ここで、 μ_0 と μ はそれぞれ $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA}(\text{H}_2\text{O})_q]$ と $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA-OH}(\text{H}_2\text{O})_{q-1}]^-$ の移動度であり、 $[\text{C}]_T$ は Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の全濃度である。 Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の物質収支は次のようになる。

$$[\text{C}]_T = [\text{C-H}_2\text{O}] + [\text{C-OH}^-] \quad (3-7)$$

式 3-5, 3-6, 3-7 を組み合わせて式 3-8 が導ける。

$$\mu_e = \frac{\mu_- - \mu_0}{10^{-\text{pH}} + 1} + \mu_0 \quad (3-8)$$

式 3-8 は、pH と錯体の移動度 μ_e の関係性を表わす式であり、その他の μ_0 、 μ および K_a はフィッティングパラメータとして決定する。移動度 μ_e の pH 依存性を実験的に求め、非線形最小二乗法を用いて式 3-8 をフィッティングすることで K_a を求めた。非線形最小二乗フィッティングの結果を図 3-2 に示す。

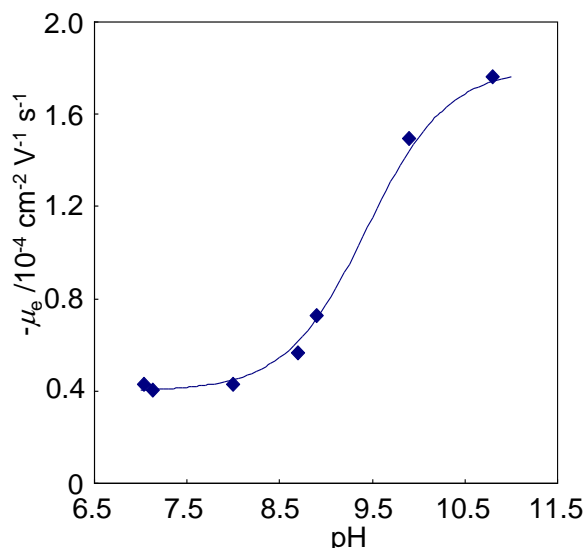
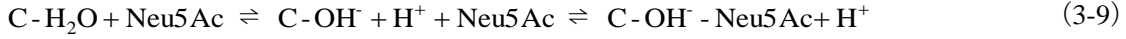


図 3-2 Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の電気移動度の pH 依存性. 実線は平衡計算の非線形最小二乗フィッティング. $\mu_0 = -4.0 \pm 0.2 \times 10^{-5}$, $\mu = -1.80 \pm 0.04 \times 10^{-4}$, $\log K_a = 9.44 \pm 0.06$, $R^2 = 0.998$.

電気移動度は pH の増加とともに負に大きくなり、錯体の有効電荷がより負に移行することが分かった。さらに、曲線の形状は式 3-8 に良く一致することから ($R^2 = 0.998$)、酸解離反応が起きていることが確かめられた。非線形最小二乗フィッティングの結果、 Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の $\text{p}K_a$ 値は、 9.44 ± 0.06 と決定した。錯体中のどの部位が酸解離しているかが問題であるが、錯体中の配位子構造で酸解離可能な部位は $\text{p}K_a$ が 4 付近であるアミノ基のみであり、さらに、pH 7.4 で Sm^{3+} -teta (1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカン-1,4,8,11-四酢酸) 錯体のようなポリアミノカルボン酸錯体中の配位水の酸解離が報告されているため、配位水の酸解離が起きているとして妥当である。この結果は前章の図 2-6 で観測された pH 9~11 での遊離の Ln-ABNOTA 錯体の発光強度の pH 依存性とも挙動が類似しており整合性がとれる。また、 $\text{p}K_a$ から判断して、pH 10 では酸解離化学種である $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA}^{3-}\text{-OH}]$ が卓越した化学種になるため、Neu5Ac を認識している化学種は、 $[(\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA}^{3-}\text{-OH})\text{-Neu5Ac}]^{2-}$ と考えるのが妥当である。

また、電気泳動ではなく分光学的にも $\text{p}K_a$ 値を測定した。すなわち、 Tb^{3+} -ABNOTA 錯体と Neu5Ac の混合溶液の発光強度の pH 依存性 (図 2-6 (A), +) から $\text{p}K_a$ 値を算出できるはずである。ただし、錯体の酸解離反応と Neu5Ac との錯形成反応を同時に解く必要がある。

また、解析する Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の発光強度の pH 範囲は、蛍光強度が一定である中性 pH 付近 (pH 8) から蛍光強度が極大となる pH 11 付近とした。これは蛍光強度が pH 11 以上で減少することから、Tb イオンの水酸化物化学種の形成に伴う Ln^{3+} -ABNOTA 錯体の解離反応が考えられるためである。この pH 範囲の平衡反応を考えると以下の様になる。



ここで、 $\text{C-H}_2\text{O}$ 、 C-OH^- および $\text{C-OH}^- \cdot \text{Neu5Ac}$ は $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA}(\text{H}_2\text{O})_q]$ 、 $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA-OH}(\text{H}_2\text{O})_{q-1}]$ および $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA-OH}(\text{H}_2\text{O})_{q-1}\text{-Neu5Ac}]^{2-}$ をそれぞれ示す。また、酸解離定数は式 3-10 で表わせる。

$$K_a = \frac{[\text{C-OH}^-][\text{H}^+]}{[\text{C-H}_2\text{O}]} \quad (3-10)$$

Tb^{3+} -ABNOTA-Neu5Ac 錯体の安定度定数 K は式 3-11 のようになる。

$$K = \frac{[\text{C-OH}^- \cdot \text{Neu5Ac}]}{[\text{C-OH}^-][\text{Neu5Ac}]} \quad (3-11)$$

観測される発光強度 I_{obs} は式 3-12 のように表すことができる。

$$I_{\text{obs}} = I_0[\text{C-H}_2\text{O}] + I_-[\text{C-OH}^-] + I_\infty[\text{C-OH}^- \cdot \text{Neu5Ac}] \quad (3-12)$$

ここで、 I_0 、 I_- および I_∞ は、1 M 当たりの $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA}(\text{H}_2\text{O})_q]$ 、 $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA-OH}(\text{H}_2\text{O})_{q-1}]$ および $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA-OH}(\text{H}_2\text{O})_{q-1}\text{-Neu5Ac}]^{2-}$ の発光強度である。 Ln^{3+} -ABNOTA 錯体の物質収支は次のようになる。

$$[\text{C}]_T = [\text{C-H}_2\text{O}] + [\text{C-OH}^-] + [\text{C-OH}^- \cdot \text{Neu5Ac}] \quad (3-13)$$

ここで、 $[\text{C}]_T$ は Ln^{3+} -ABNOTA 錯体の全濃度である。式 3-10、3-11、3-12 および 3-13 を組み合わせて式 3-14 を導く。

$$I_{\text{obs}} = \frac{I_0}{1 + \frac{K_a}{10^{-\text{pH}}} + \frac{K[\text{Neu5Ac}]K_a}{10^{-\text{pH}}}} + \frac{I_-}{1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{K_a} + K[\text{Neu5Ac}]} + \frac{I_\infty}{1 + \frac{1}{K[\text{Neu5Ac}]} + \frac{10^{-\text{pH}}}{K[\text{Neu5Ac}]K_a}} \quad (3-14)$$

ここで、 Tb^{3+} -ABNOTA-Neu5Ac 錯体の安定度定数 K と条件安定度定数 K' には次のような関係が成り立つ。

$$K = \frac{K_a}{10^{-\text{pH}} + K_a} K' \quad (3-15)$$

$K' = 10^{3.39} \text{ M}^{-1}$ (第二章 3-5 項) であり, $[\text{Neu5Ac}] = 1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ と大過剰であるので一定 ($[\text{Neu5Ac}]_{\text{T}} = [\text{Neu5Ac}] = 1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$) として, 式 3-14 と 3-15 を組み合わせて式 3-16 を導く.

$$I_{\text{obs}} = \frac{I_0}{1 + \frac{K_a}{10^{-\text{pH}}} + \frac{10^{0.39} K_a^2}{10^{-2\text{pH}} + K_a 10^{-\text{pH}}}} + \frac{I_-}{1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{K_a} + \frac{10^{0.39} K_a}{10^{-\text{pH}} + K_a}} + \frac{I_{\infty}}{1 + \frac{10^{-\text{pH}} + K_a}{10^{0.39} K_a} + \frac{10^{-2\text{pH}} + K_a 10^{-\text{pH}}}{10^{0.39} K_a^2}} \quad (3-16)$$

式 3-16 は, pH と錯体の発光強度 I_{obs} の関係性を表わす式であり, その他の I_0 , I , I_{∞} および K_a はフィッティングパラメータとなる. よって, 発光強度 I_{obs} の pH 依存性を実験的に求めれば, 非線形最小二乗法を用いた式 3-16 のフィッティングで K_a を求めることができる. 非線形最小二乗フィッティングの結果を図 3-3 に示す.

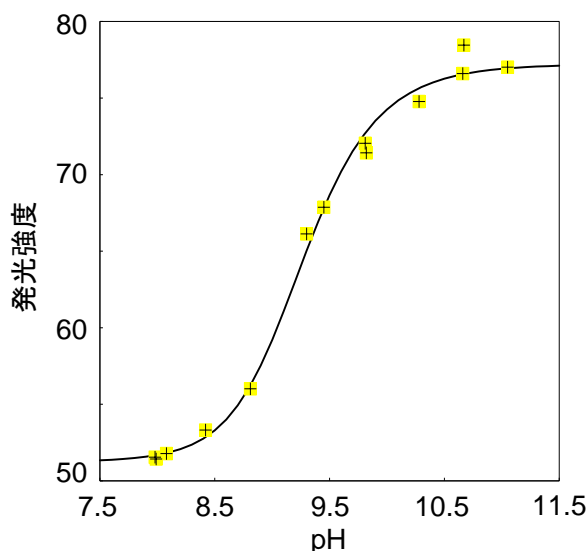


図 3-3 Tb^{3+} -ABNOTA 錯体 - Neu5Ac 混合溶液の発光強度の pH 依存性. 実線は平衡計算の非線形最小二乗フィッティング. $I_0 = 51.2$, $I = 60.1$, $I_{\infty} = 84.1$, $\log K_a = 9.4 \pm 0.2$, $R^2 = 0.994$.

非線形最小二乗フィッティングの結果, Tb^{3+} -ABNOTA-Neu5Ac 錯体の $\text{p}K_a$ 値 9.4 ± 0.2 が得られた ($R^2 = 0.994$). Tb^{3+} -ABNOTA-Neu5Ac 錯体の $\text{p}K_a$ 値は, CE により得られた Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の $\text{p}K_a$ 値 9.44 ± 0.06 と比較してよく一致した. CE 法と分光法から得られた Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の $\text{p}K_a$ 値がほぼ等しいことから, この値は妥当である. また, フィッ

ティングも良いことから, Neu5Ac の配位は配位水の酸解離反応に伴い起こる式 3-9 が妥当であることが明らかとなった. さらに, 得られた Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の $\text{p}K_a$ 値 9.44 ± 0.06 を式 3-15 に適用し, Tb^{3+} -ABNOTA 錯体と糖分子との安定度定数 K を求めたところ, $10^{3.5 \pm 0.1}$ (Neu5Ac), $10^{3.09 \pm 0.09}$ (diNeu5Ac), $10^{1.8 \pm 0.1} \text{ M}^{-1}$ (Rib) を得た.

3-2 発光寿命の測定

第二章では, Ln^{3+} -ABNOTA 錯体はシアル酸を特異的に発光認識し, その選択性は三元錯体の安定性に起因することを示した. ここでは, 実際にシアル酸が Ln の第一配位圏へ配位しているかどうかを確認するため, Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の配位水分子の数を発光寿命測定によって見積もった. 発光寿命の測定結果を図 3-4 に示す.

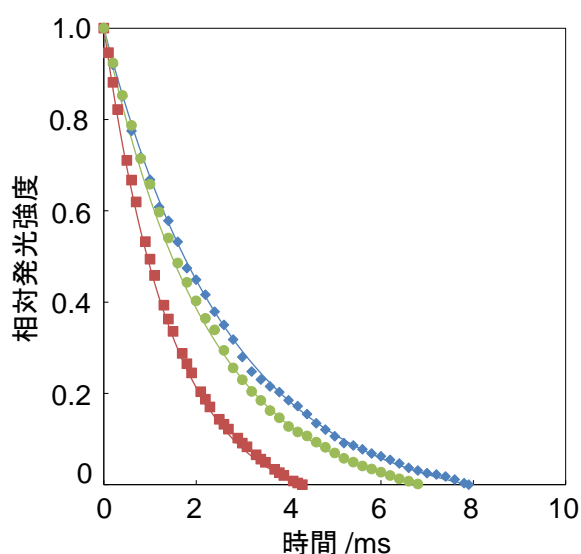


図 3-4 Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の発光強度の一次減衰曲線. 実線は一次減衰曲線をフィッティングした結果. $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA}] = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Neu5Ac}] = 3.0 \times 10^{-2} \text{ M}$, $\text{pH} 10.3$. ◆: Tb^{3+} -ABNOTA 錯体 (D_2O 中), ■: Tb^{3+} -ABNOTA 錯体 (H_2O 中), ●: Tb^{3+} -ABNOTA-Neu5Ac 錯体 (H_2O 中).

図 3-4 の結果を式 2-1 にフィッティングして得られた Tb^{3+} -ABNOTA 錯体および Tb^{3+} -ABNOTA-Neu5Ac 錯体中の配位水分子数を表 3-1 に示す.

表 3-1 Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の配位水分子数 q^a .

| | pH | τ/ms | q | Δq |
|---------------------------------|------|------------------|------|------------|
| free Tb^{3+} -ABNOTA | 10.3 | 1.46 ± 0.02 | 1.34 | - |
| Tb^{3+} -ABNOTA-Neu5Ac | 10.3 | 2.28 ± 0.04 | 0.29 | -1.04 |

^a $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA}] = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Neu5Ac}] = 3.0 \times 10^{-2} \text{ M}$, $R^2 = 0.9990 \sim 0.9998$.

表 3-1 より, $\text{pH} 10.3$ では, 遊離の Tb^{3+} -ABNOTA 錯体中には配位水が 1.3 個ほど存在し,

シアル酸と三元錯体を形成すると配位水が 0.3 個となった。すなわち、約 1 個の水分子が Ln イオンの第一配位圏から排除されることが分かった ($\Delta q = -1.04$)。つまり、このことからシアル酸は中心金属の第一配位圏に単座で配位していることが明らかとなった。

また、遊離の Tb^{3+} -ABNOTA 錯体中の配位水数を、シアル酸を認識しない pH 6.8 とシアル酸を認識する pH 10 とで比較した。

表 3-2 Tb^{3+} -ABNOTA 錯体の配位水分子数 q^a 。

| | pH | τ/ms | q | Δq |
|-------------------------------|------|------------------|------|------------|
| free Tb^{3+} -ABNOTA | 6.8 | 1.15 ± 0.02 | 2.14 | - |
| free Tb^{3+} -ABNOTA | 10.3 | 1.46 ± 0.02 | 1.34 | -0.80 |

^a $[\text{Tb}^{3+}\text{-ABNOTA}] = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $R^2 = 0.9990\text{-}0.9998$.

ABNOTA 錯体の配位水数は、中性 pH に比べ、シアル酸認識をする弱塩基条件で減少し、第一配位圏からの OH 振動子が減少していることが分かった。これは配位水の酸解離に基づくものと考えた ($[\text{Ln}^{3+}\text{-ABNOTA}^3(\text{H}_2\text{O})]$ の酸解離による OH 振動子の減少)。

3-3 シアル酸の配位様式の調査

前述のように Neu5Ac は Ln^{3+} -ABNOTA 錯体中の配位水の酸解離反応に伴い配位可能となることが明らかとなった。ここでは、Neu5Ac のどの官能基が Ln^{3+} -ABNOTA 錯体への配位に関与しているかを解明する。 Ln^{3+} -ABNOTA 錯体が中性糖に比べて Neu5Ac に対して特異的な発光増感および高い安定度定数が得られた結果から、Neu5Ac は中性糖に存在しない官能基が配位に関与している可能性が高い。中性分子にない Neu5Ac に特有の官能基として、アセトアミド基、カルボキシル基およびグリセロール基があるが、Neu5Ac のカルボキシル基をメチルエステル化した Neu5Ac ester に対する発光強度の pH 依存性が Neu5Ac に対する挙動とほぼ一致すること (第二章, 図 2-6) からカルボキシル基は配位に大きく関与していないと考察でき、アセトアミド基、グリセロール基が有力な候補となる。この 2 種類の官能基のうちのどちらか、あるいは両方が配位に関与しているのかを明らかとするため、Neu5Ac の部分的な官能基を持つモデル物質として、グリセロールまたは *N*-メチルアセチルアミド (図 3-5 (A)) を Tb^{3+} -ABNOTA 錯体に添加したときの発光増感を測定した。測定結果を図 3-5 (B) に示す。

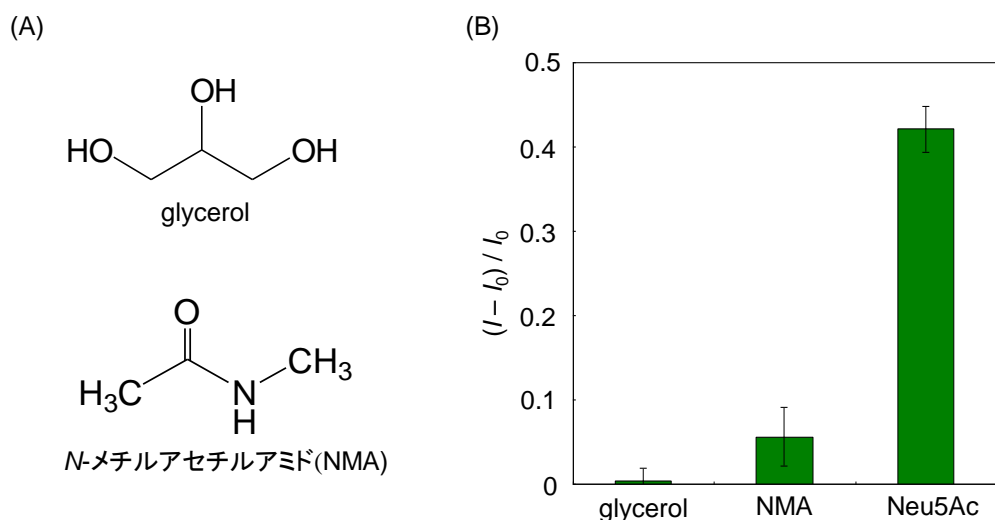


図 3-5 (A) モデル物質の化学構造. (B) モデル物質 (1 mM) を添加したときの Tb³⁺-ABNOTA 錯体の発光増感.

図 3-5 (B) から明らかなように、グリセロールの添加による増感は観測されなかったのに対し、*N*-メチルアセトアミドの添加によって若干の有意な増感が観測された。この増感は、*N*-メチルアセトアミド分子中で静電ポテンシャルが負に大きい酸素原子⁵が中心 Ln 金属に配位したことによると考えられ、シアル酸の場合でも、アセトアミド基の酸素原子が中心金属に配位していることが示唆された。しかし、*N*-メチルアセトアミドによる増感は、Neu5Ac による増感よりも七分の一程度と非常に小さく、熱力学的安定性が低いと推測される。この結果から、Ln 錯体とシアル酸の結合は、中心金属への配位結合に加え、他に相互作用への寄与があると考察した。

シアル酸認識に関するさらに深い知見を得るため、Eu³⁺-ABNOTA、Eu³⁺-ABNOTA-Neu5Ac および Eu³⁺-ABNOTA-Neu5Ac ester 錯体の ¹H-NMR スペクトルを測定した。図 3-6 には Eu³⁺-ABNOTA 錯体の測定結果を示す。Eu の常磁性キレート錯体は、種々の化合物の官能基と三元錯体を形成すると NMR スペクトルパターンを広げることから、NMR シフト試薬試薬として用いられている⁶。中心金属である Eu に近い位置にあるプロトンほど常磁性効果を強く受け大きくシフトする。しかし、共鳴周波数が高くなると、ピークの広がりが大きくなるという欠点があり、100 MHz の装置に比べ 500 MHz の装置の方がピーク幅の広がり が 25 倍以上も大きくなると報告されている⁷。

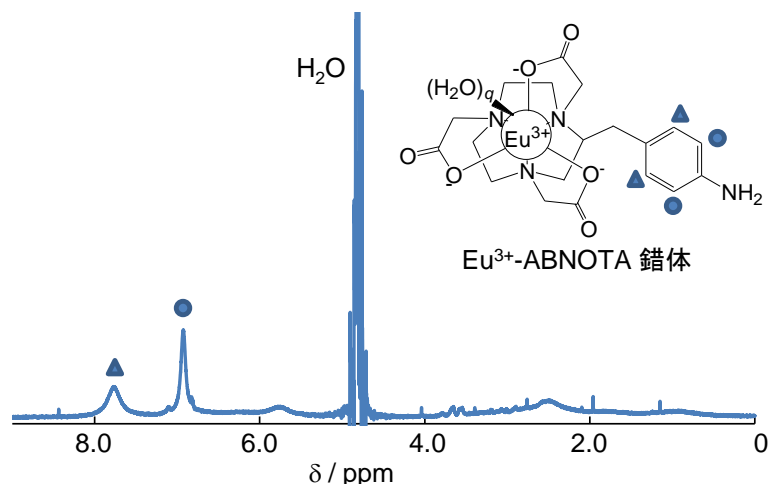


図 3-6 Eu^{3+} -ABNOTA 錯体の ^1H -NMR スペクトル. $[\text{Eu}^{3+}\text{-ABNOTA}] = 8.2 \text{ mM}$, pH 10.5.

Eu^{3+} -ABNOTA 錯体では、Eu の強い常磁性効果により NOTA 骨格の ^1H シグナルは全く検出されなかった。これは、NOTA 骨格のすべての ^1H スペクトルが大きくシフト (20ppm 以上)⁸ またはブロード化⁹ したためであると考えられる。一方、アミノベンゼンのプロトンはブロード化が見られるが、ピーク (化学シフト値 7.76 および 6.93ppm) が検出された。これは、スペクトルが僅かにブロード化する程度に Eu から遠い位置であることを示している (分子模型より 6Å 程度と予測)。

図 3-7 に、 Eu^{3+} -ABNOTA 錯体 (a)、Neu5Ac (b)、 Eu^{3+} -ABNOTA-Neu5Ac (c)、Neu5Ac ester (d)、 Eu^{3+} -ABNOTA-Neu5Ac ester (e) の ^1H -NMR 測定結果を示す。

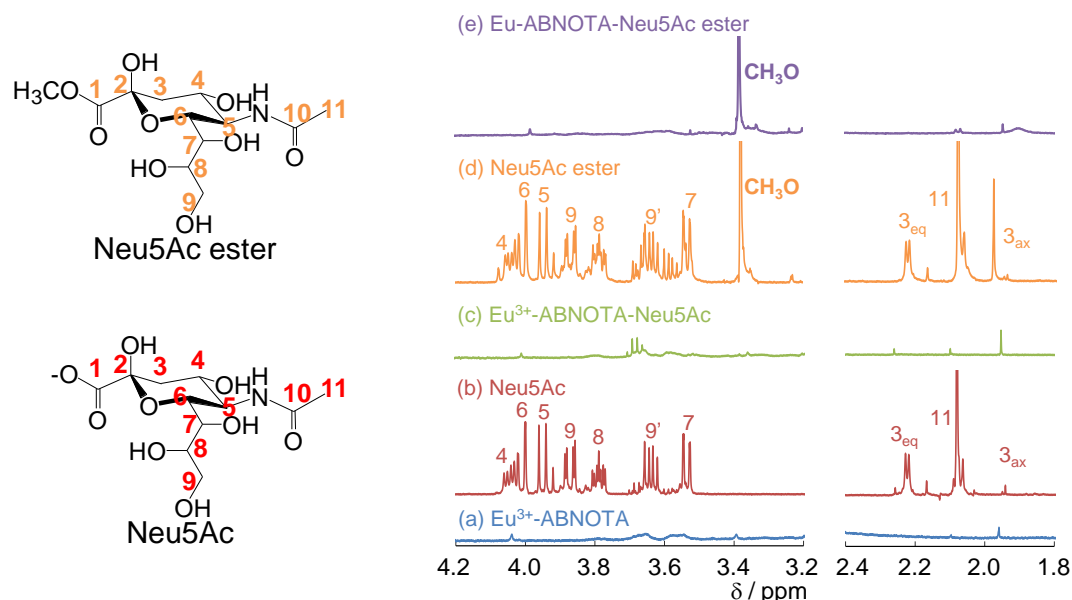


図 3-7 Eu^{3+} -ABNOTA 錯体の ^1H -NMR スペクトル. (a) Eu^{3+} -ABNOTA ($[\text{Eu}^{3+}\text{-ABNOTA}] = 8.2 \text{ mM}$, pH 10.4). (b) Neu5Ac ($[\text{Neu5Ac}] = 5 \text{ mM}$, pH 11.0). (c) Eu^{3+} -ABNOTA-Neu5Ac ($[\text{Eu}^{3+}\text{-ABNOTA}] = 8.2 \text{ mM}$, $[\text{Neu5Ac}] = 5 \text{ mM}$, pH 10.5). Neu5Ac ester (d) ($[\text{Neu5Ac ester}] = 5 \text{ mM}$, pH 10.5). (e) Eu^{3+} -ABNOTA-Neu5Ac ester ($[\text{Eu}^{3+}\text{-ABNOTA}] = 8.2 \text{ mM}$, $[\text{Neu5Ac ester}] = 5 \text{ mM}$, pH 10.5).

Eu³⁺-ABNOTA-Neu5Ac 錯体では Eu の強い常磁性効果により Neu5Ac のシグナルは全く検出されなかった (図 3-7 (c)). これは, NMR スペクトルが非常に大きくシフトまたはブロード化する程度に, 錯体中 Neu5Ac の水素原子が Eu の近くに位置していることを示している (およそ 6Å 未満). 一方, Eu³⁺-ABNOTA-Neu5Ac ester 錯体は, Neu5Ac ester のメトシキ基のみ検出された (図 3-7 (e)). これは, カルボキシ基が Eu からピークを示すのに十分に離れた位置にある一方で, アセトアミド基とグリセロール基が中心 Eu に近くに位置していることを示している. 3-2 および 3-3 項の結果より, シアル酸はアセトアミド基の酸素原子が中心金属に単座で配位していると考えられることから, アセトアミド基の周囲に位置し, さらにシアル酸特有の官能基であるグリセロール基が配位に関与している可能性が高い. また, 本章 3-2 項で明らかとなった酸解離した配位水がシアル酸認識に大きく関与している (酸解離しなければシアル酸認識しない) ことから, 酸解離した配位水とグリセロール基との水素結合が寄与している可能性が高いと推察した.

3-4 シアル酸認識の推定機構

以上の結果から, Ln³⁺-ABNOTA 錯体のシアル酸認識能は 2 種類の相互作用の相乗効果によって発現していると考えた. すなわち, 1 つは, 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であり, もう 1 つは, 第二配位圏での Ln³⁺錯体配位水分子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との水素結合である. 推定機構を図 3-8 に示す. これら 2 つの相互作用により, Neu5Ac に対する高い選択性と安定度を与えたものと考察した. このような配位結合と, 配位水分子の酸解離の組み合わせによる配位サイトの精密な制御による糖分子の認識様式は初めて報告されるものであり, シアル酸認識モチーフとして非常に興味深い.

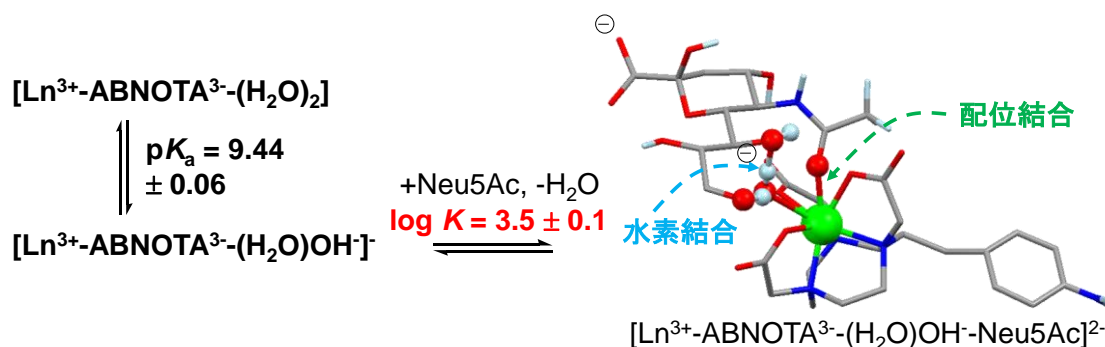


図 3-8 Ln³⁺-ABNOTA 錯体のシアル酸認識機構の推定図.

4 結言

Ln³⁺-ABNOTA 錯体の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, 第二配位圏で 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が明らかとなった。これは、 Ln^{3+} -ABNOTA 錯体中の配位水の酸解離反応によりシアル酸に対する認識場を形成するという、これまで報告例のない新しい機構である。また、シアル酸のカルボキシル基が中心 Ln 金属へ配位に関与しない点も興味深い結果である。Neu5Ac は水溶液中で α -ピラノース、 β -ピラノース、環状ケトン型の平衡で、92.1%は β -ピラノース型で存在する。一方、糖鎖や糖複合体末端の Neu5Ac は、 α -ピラノース型であり、単糖の Neu5Ac のカルボキシル基の立体配座が異なる。従来の Neu5Ac のカルボキシル基が結合に関与するプローブ (図 3-9) では、単糖の Neu5Ac に対してはある程度高い安定度を示すが、 α -ピラノース型の Neu5Ac 配糖体との安定度は低くなるといった問題も生じている。本研究の ABNOTA 錯体系では Neu5Ac のカルボキシル基が結合に関与しないため、カルボキシル基の立体配座の違いによる影響はほとんどないと考えられ、様々な Neu5Ac 含有糖鎖や糖複合体に適用できる可能性があると考えられる。実際、 α -ピラノース型の Neu5Ac を含む diNeu5Ac と Ln-ABNOTA 錯体の安定度定数は Neu5Ac とほぼ同じ値であった。このような新しい認識機構を有する分子モチーフは今後、新しい人工プローブや分離試薬の開発の鍵となると考える。現在、 Ln^{3+} -ABNOTA 錯体を分離試薬として利用することを考えている。例えば、 Ln^{3+} -ABNOTA 錯体はアニオン化 (酸解離) してシアル酸と選択的に結合するため、錯形成によりシアル酸を含む糖鎖の電荷を制御できる可能性があり、分子の電荷で分離を行う電気泳動法の分離試薬として有効であると考えられる。

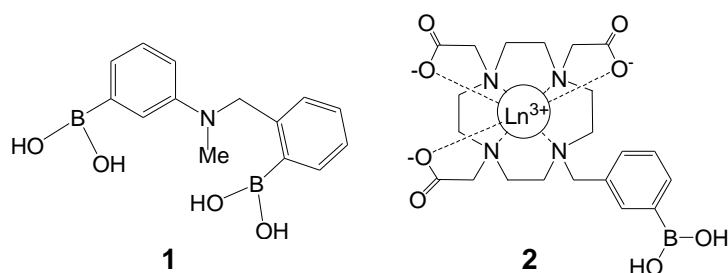


図 3-9 Neu5Ac のカルボキシル基が結合に関与するプローブ 1, 2 の化学構造.

5 参考文献

- 1) P. Thakur, P. N. Pathak, T. Gedris, G. R. Choppin, *J. Solution Chem.*, **2009**, 38, 265–287.
- 2) R. Delgado, J. Costa, K. P. Guerra, L. M. P. Lima, *Pure Appl. Chem.*, **2005**, 77, 569–579.
- 3) F. Fei, P. Britz-McKibbin, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 398, 1349–1356.
- 4) S. Ehala, A. A. Grishina, A. E. Sheshenev, I. M. Lyapkalo, V. Kasicka, *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217, 8048–8053.
- 5) K. Kwac, M. Cho, *J. Chem. Phys.* **2003**, 119, 2247.
- 6) Robert M. Silverstein, Francis X. Webster 著, 荒木 峻, 山本 修, 益子 洋一郎, 鎌田 利紘 訳, *有機化合物のスペクトルによる同定法—MS, IR, NMR の併用—第6版*, **1999**, 東京化学同人, 191–192.

- 7) D. Parker, *Chem. Rev.*, **1991**, 91, 1441–1457.
- 8) Miloslav Polášek, Jan Kotek, Petr Hermann, Ivana Císařová, Koen Binnemans, Ivan Lukeš, *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 466–475.
- 9) Y. Qiuqing, L. Linshu, *J. RARE EARTH*, **1997**, 15, 86–89.

第四章 ボロン酸修飾型スカリリウム色素 (SQ-BA) 群を利用するシアル酸分子の判別分析法の開発

1 緒言

先行研究で、齋藤らは単糖、糖タンパク質およびグラム陽性細菌を蛍光認識するため、ボロン酸を修飾したスカリリウム色素 (SQ-BA1, 図 4-1) を開発し、蛍光増感による検出を試みている。その結果、SQ-BA1 によって pH 10 の弱アルカリ溶液で糖分子を蛍光認識できることが明らかとなった。ここで、pH 10 での SQ-BA と単糖分子とのみかけの安定度定数 (酸解離反応を考慮していない) を表 4-1 に示す^{1,2}。

表 4-1 単糖 - SQ-BA1 錯体のみかけの安定度定数.

| | SQ-BA1 |
|----------------------------|-----------------|
| $\log K_{\text{fructose}}$ | 2.80 ± 0.08 |
| $\log K_{\text{ribosec}}$ | 2.08 ± 0.11 |
| $\log K_{\text{glucose}}$ | 0.86 ± 0.05 |

みかけの安定度定数から、SQ-BA1 が一般的なボロン酸系プローブ同様にフルクトースに対して高い選択性を有し、その安定度定数は $\sim 10^{2.8} \text{ M}^{-1}$ であり、生体中に存在するレクチンよりも安定度定数は小さいものの、ボロン酸系プローブより大きな熱力学的安定性を有していることが分かった。

生体試料のような複雑で夾雑物が多く含まれている中の幾つかの成分を同時に計測することは非常に困難であるが、多変量解析を用いれば、複雑なシグナルからある特定の化学種に対する応答を抽出することが可能である。そこで本章では、多変量解析の一種である多変量判別分析 (MDA) を用いることで生体実試料中のシアル酸分子の判別分析法の開発を試みた。シアル酸の MDA に適する系を構築するためには、シアル酸を含む様々な糖分子に対し応答を示すが、応答パターンが大きく変化するプローブ群を開発する必要がある。ここでは、SQ-BA 色素の糖結合部位であるボロン酸基は様々な糖分子とマイルドに反応することから、シアル酸との反応性を高めることが鍵となる。シアル酸と反応するプローブを開発すること自体が困難であるものの、これまでに、ボロン酸分子系によるシアル酸の認識は、シアル酸と 2 箇所エステル結合するビスボロン酸が有効であることが報告されている (第一章 3-3-1 項)³。

一方、SQ-BA 色素は水溶液中で疎水性相互作用を駆動力とする会合体を形成していることから、この SQ-BA 会合体の形状を制御することで会合体中の 2 つのボロン酸基が Neu5Ac に対し 2 点で結合可能な認識場を形成することができると考えた。そこで、SQ-BA 会合体形成の駆動力である疎水性相互作用すなわちシアニン基に修飾したアルキル鎖長を変えることで SQ-BA 会合体の形状を制御し、MDA 用の蛍光試薬を開発するための要件を満たす分子系を設計することを着想した。SQ-BA 色素の末端アルキル鎖長を変えることで、剛硬で解離しにくい (完全に重なりあった) H-会合体から柔弱で横滑り可能な J-会合体まで、

様々な会合体を形成させることを考えた (図 4-1). そのような分子系として, SQ-BA1 に加えて, シアニン基に *N,N*-ジエチルアミンを修飾した SQ-BA2, *N*-エチル-*N*-メチルアミンを修飾した SQ-BA3 および *N,N*-ジブチルアミンとインドール環にブチル基を修飾した SQ-BA4 の 3 種の新規 SQ-BA 色素を開発した (図 4-1).

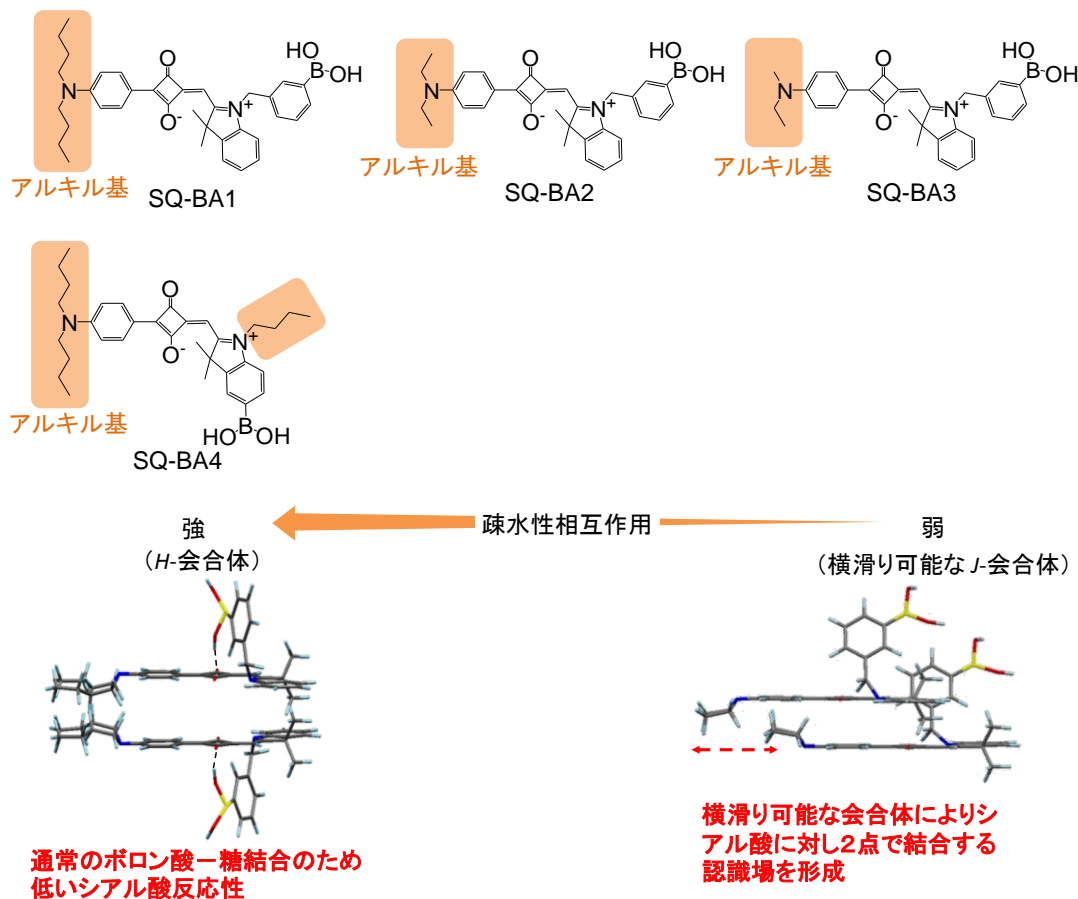


図 4-1 SQ-BA1-4 の化学構造と MDA 系の設計指針.

2 実験

2-1 試薬

UV/vis 吸収スペクトルと蛍光スペクトル測定で用いる pH 緩衝剤には, 和光純薬株式会社 (大阪) から購入した sodium bicarbonate の所定量を超純水で溶解し, NaOH を用いて, pH を調整して用いた (0.1 M, pH 10). HEPES (0.1 M, pH 7.5 または 7.75) および CHES (0.1 M, pH 9.2) pH 緩衝液も同様にして調整した (同仁化学研究所 (熊本)).

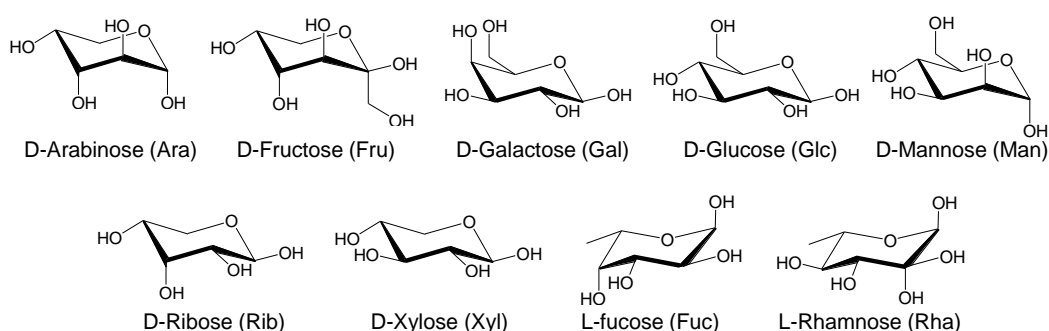
D(-)-arabinose (特級), L(-)-fucose (特級), D(+)-galactose (特級), D(+)-mannose (特級), L(+)-rhamnose (特級) は和光純薬株式会社 (大阪) から購入した. D(-)-fructose (特級) は関東化学株式会社 (東京) から購入した. D(+)-glucose (特級), D(+)-xylose (特級) はキシダ化学株式会社 (大阪) から購入した. D(-)-ribose (特級), sorbitol (特級) は東京化成工業株式会社 (東京) から購入した. *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac, 純度 99% 以上) は長

良サイエンス株式会社（岐阜）から購入した．*N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc, 純度 99% 以上) は EMD chemicals (アメリカ, カルフォルニア州サンディエゴ) から購入した．各々の溶液は劣化を防ぐため冷暗所に保存した．

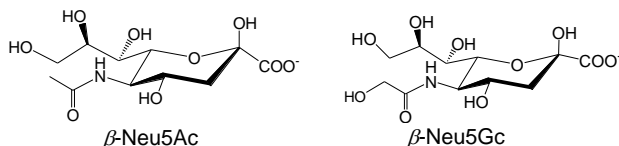
ヒト尿試料は 5 名の健常者 (21 歳男性, 22 歳女性二名, 23 歳男性, 27 歳男性) から採取し, -40°C で保存した．室温にて解凍後, 0.1 M 塩酸を添加し, 80°C で 1 時間加熱することで尿試料中の糖タンパク質を加水分解した．その後, 尿試料中の大部分の疎水性化合物を C18 カラムカートリッジ (InertSep C18, GL サイエンス, 東京) を用いてフィルタリングして除去した．

以下に使用した糖分子の化学構造を示す．

(A) 中性単糖



(B) シアル酸



(C) ポリオール

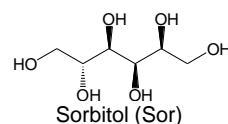


図 4-2 使用した単糖の化学構造．

2-2 SQ-BA 色素の合成と同定

SQ-BA 色素の合成および同定は大阪府立大学有機機能化学研究グループ (中澄博行博士 および前田壮志博士の提供による) により行われた．SQ-BA1 は先行研究において報告した手順で合成および同定した^{1,2}．SQ-BA2-4 は後述の手順で行い, IR (島津製作所 FT-IR-8400S), MALDI-TOF-MS (島津製作所 AXIMA), ^1H -および ^{13}C -NMR (JEOL ECX-400, 400 MHz) により同定した．

1-2-1 SQ-BA2 の合成と同定

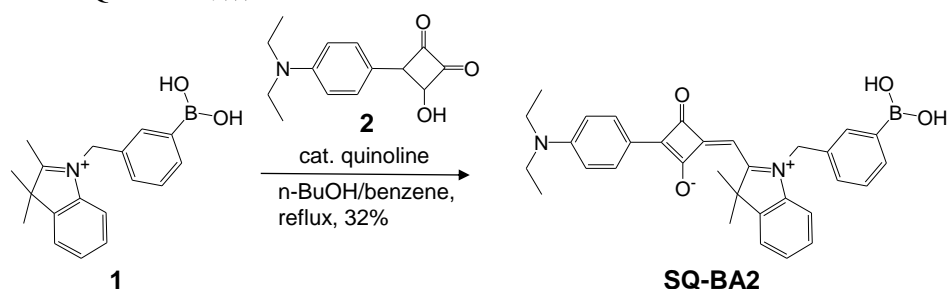
SQ-BA2 は 3-(2,3,3-trimethyl-3H-indolylmethyl)phenyl-boronic acid (**1**) と 3-(4-(diethylamino)phenyl)-4-hydroxycyclobut-3-ene-1,2-dione (**2**) から合成した (スキーム 1)^{4,5}．**1** (0.147 g, 0.5 mmol) と **2** (0.123 g, 0.5 mmol) を 1-butanol (10 mL)/benzene (3.3 mL) 混合溶媒に溶解し, 触媒として quinoline を添加し 50 分間還流した．冷却後, ロータリーエバポレーターにより溶媒を除去し, 残渣をカラムクロマトグラフィー ($\text{CHCl}_3/\text{hexane}$, 20/1 (v/v)) により精製した．

生成物はさらに $\text{CHCl}_3/\text{hexane}$ および THF/hexane により再結晶化し、**SQ-BA2** (緑色結晶, 85 mg, 収率 32%) を得た。

以下に化合物データを示す。(^1H -および ^{13}C -NMR スペクトルは付録に添付した)。

SQ-BA2: ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 1.15 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.18 (s, 6H), 3.45-3.51 (m, 4H), 5.56 (s, 2H), 6.04 (s, 1H), 6.81 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.30-7.46 (m, 4H), 7.65-7.73 (m, 3H), 7.96 (s, 2H), 8.02 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H). ^{13}C -NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (13/1 (v/v)), 100 MHz): δ 185.98, 175.27, 174.28, 151.39, 142.67, 142.14, 133.97, 133.05, 132.77, 131.54, 128.64, 128.36, 127.70, 125.78, 122.61, 118.63, 111.81, 111.23, 89.51, 68.01, 50.59, 48.08, 44.88, 26.56, 25.58, 12.67. IR (KBr, cm^{-1}): 3421, 3342, 2968, 2928, 1597, 1562, 1520, 1475, 1420, 1350, 1305, 1182, 1157, 1062, 932, 825, 733. MALDI TOF-MS: m/z calcd for $[\text{M} (\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{BN}_2\text{O}_4) + \text{H}]^+$, 521.25; found 521.53, $[\text{M} (\text{C}_{96}\text{H}_{93}\text{B}_3\text{N}_6\text{O}_9) + \text{Na}]^+$, 1529.72; found 1529.00.

スキーム 1 **SQ-BA2** の合成スキーム。



1-2-2 **SQ-BA3** の合成と同定

SQ-BA3 は *N*-ethyl-*N*-methylbenzenamine (**3**) と 3,4-dichlorocyclobut-3-ene-1,2-dione (**4**) から合成した (スキーム 2) ^{6,7}. **3** (0.164 g, 12.2 mmol) は dry toluene (35 mL) に溶解し, **4** (1.84 g, 12.2 mmol) を添加し 18 時間還流した. 溶媒を除去後, 残渣を酢酸/0.75 M HCl (40 mL/43 mL) に溶解し 3 時間還流した. その後, 溶媒を除去し dichloromethane で洗浄し 3-(4-(*N*-ethyl-*N*-methylamino)phenyl)-4-hydroxycyclobut-3-ene-1,2-dione (**5**) (茶色固体, 2.38 g, 84%) を得た. **1** (0.132 g, 0.45 mmol) と **5** (5.101 g, 0.45 mmol) は 1-butanol (9 mL) / benzene (3 mL) 混合溶媒に溶解し, 触媒として quinoline を添加し 50 分間還流した. 冷却後, ロータリーエバポレーターにより溶媒を除去し, 残渣をカラムクロマトグラフィー ($\text{CHCl}_3/\text{hexane}$, 25/1 (v/v)) により精製した. その後, $\text{CHCl}_3/\text{hexane}$ と THF/hexane solution で再結晶化し **SQ-BA3** (緑色結晶, 54 mg, 収率 24%) を得た。

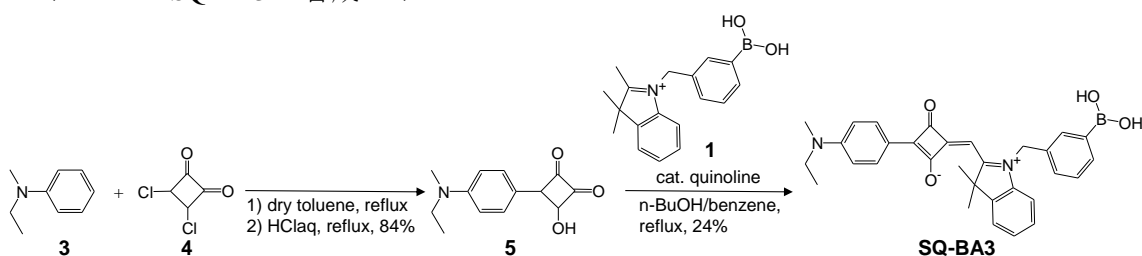
以下に化合物データを示す。(^1H -および ^{13}C -NMR スペクトルは付録に添付した)。

5: ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 1.09 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 3.01 (s, 3H), 3.49 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.00 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.89 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H). ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$ 100 MHz): 194.71, 173.00, 148.75, 130.00, 127.56, 113.66, 47.19, 38.44, 10.96. IR (KBr, cm^{-1}): 3433, 3047, 2987, 2490, 2430, 1770, 1758, 1708, 1570, 1520, 1425, 1305, 1138, 1034, 1020, 866, 851, 825. HRMS (ESI): m/z calcd

for $[M (C_{13}H_{12}NO_3)]^+$, 230.08154; found 230.08172.

SQ-BA3: 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 1.12 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.81 (s, 6H), 3.03 (s, 3H), 3.52 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 5.57 (s, 2H), 6.10 (s, 1H), 6.83 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.32-7.39 (m, 3H), 7.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.65-7.73 (m, 3H), 7.96 (s, 2H), 8.02 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H). ^{13}C -NMR (CDCl₃/CD₃OD (13/1 (v/v)), 100 MHz): δ 186.46, 175.66, 174.15, 152.34, 142.77, 142.14, 134.05, 133.09, 132.77, 131.36, 128.71, 128.45, 127.75, 125.98, 122.68, 118.97, 112.02, 111.41, 89.69, 68.07, 50.74, 48.18, 46.95, 37.74, 26.57, 25.63, 11.88. IR (KBr, cm^{-1}): 3413, 3419, 2974, 2932, 1595, 1521, 1477, 1434, 1412, 1342, 1304, 1277, 1148, 1161, 932, 827, 742. MALDI TOF-MS: m/z calcd for $[M (C_{31}H_{31}BN_2O_4) + H]^+$, 507.24; found 507.68, $[M (C_{93}H_{87}B_3N_6O_9) + Na]^+$, 1487.67; found 1487.69.

スキーム 2 SQ-BA3 の合成スキーム.



1-2-3 SQ-BA4 の合成と同定

SQ-BA4 は 2,3,3-Trimethyl-5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane-2-yl)-3H-indole (**6**) と 3-(4-dibutylaminophenyl)-4-hydroxy-3-cyclobuten-1,2-dione (**8**) から合成した (スキーム 3)⁸. **6** (2.64 g, 9.26 mmol) を acetonitrile (10 mL) に溶解し, 1-iodobutane (8.50 g, 6.20 mmol) を添加, 21 時間還流した. 冷却後, 過剰の ether を添加し生じた沈殿物を濾過し acetonitrile (10 mL) で洗浄した. その後溶媒を除去し 1-butyl-2,3,3-trimethyl-5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-3H-indol-1-ium iodide (**7**) (淡赤色固体, 3.96 g, 収率 91%) を得た. **8** (0.860 g, 2.85 mmol) と **7** (1.57 g, 3.34 mmol) を 1-butanol/benzene (4/1 (v/v), 50 mL) 混合溶媒に溶解し, 110 °C で 6 時間加熱した. 冷却後, 溶媒を除去し, 残渣はカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/AcOEt, (3/2 (v/v))) により精製した. その後, hexane/CHCl₃ で再結晶化することで 4-((1-Butyl-3,3-dimethyl-5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxabolan-2-yl)-3H-indol-1-ium-2-yl)methylene)-2-(4-(dibutylamino)phenyl)-3-oxocyclobut-1-enolate (**9**) (緑色結晶, 0.737 g, 収率 41%) を得た. **9** (101 mg, 0.160 mmol) と diisopropanolamine (2.5 mg, 0.19 mmol) は ether/CH₂Cl₂ (8/1 (v/v), 4.7 mL) 混合溶媒に溶解し, 室温で 3 時間攪拌後, 溶媒を除去した. その残渣に THF (24 mL) と 3 M HCl (6 mL) を添加し 40 °C で 6 時間加熱した. 溶媒の除去後, 残渣はカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/CH₃OH, 10/1 (v/v)) により精製した. さらに, CHCl₃/hexane により再結晶化し **SQ-BA4** (茶色固体, 16 mg, 収率 18%) を得た.

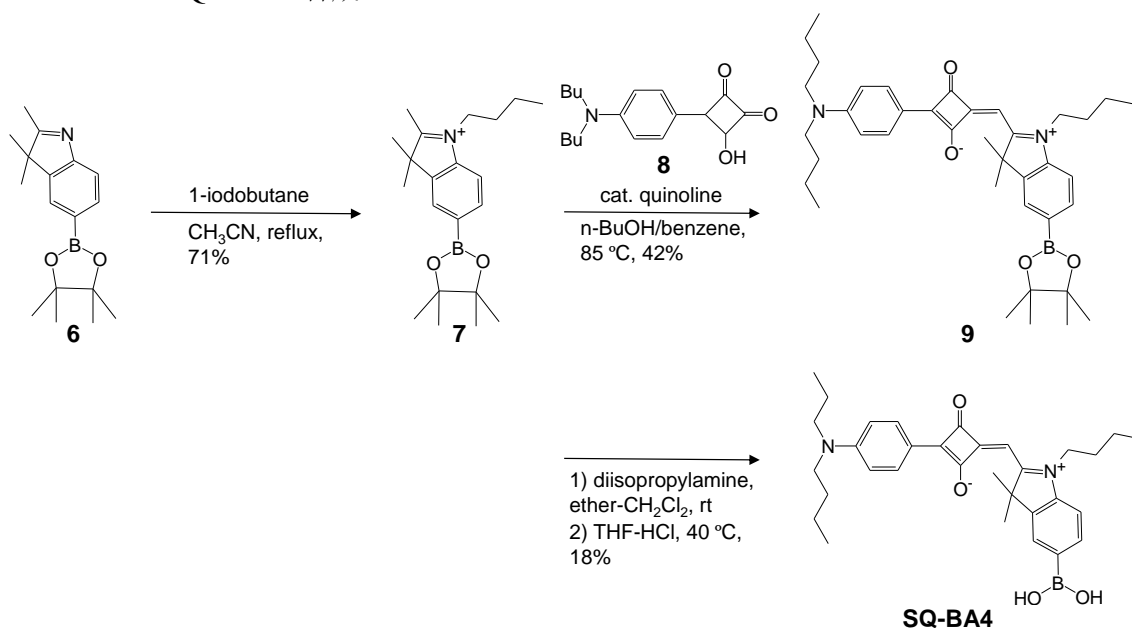
次に化合物データを示す. (1H -および ^{13}C -NMR スペクトルは付録に添付した).

7: $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz, ppm) : δ 8.01 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.94 (s, 1H), 7.60 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 4.72 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 3.16 (s, 3H), 1.96-1.88 (m, 2H), 1.67 (s, 6H), 1.53-1.47 (m, 2H), 1.37 (s, 12H), 1.01 (t, 3H, $J = 7.6$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 196.69, 143.13, 140.85, 136.13, 129.22, 114.48, 84.67, 54.68, 50.17, 29.96, 24.88, 23.20, 20.21, 17.32, 13.74. IR (KBr, cm^{-1}): 2968.25, 2931.60, 1612.38, 1467.73, 1425.30, 1353.94, 1257.50, 1141.78, 1097.42, 1062.70, 1033.77, 964.34, 846.69, 763.76, 686.61. HRMS (ESI): m/z calcd for $[\text{M} (\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{BNO}_2)]^+$: 342.2608, found: 342.2621.

9: $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz, ppm): δ 8.27 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 7.83 (m, 2H), 7.11 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.69 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 6.18 (s, 1H), 4.14 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 3.38 (t, 4H, $J = 8.0$ Hz), 1.85-1.77 (m, 8H), 1.66-1.58 (m, 4H), 1.48-1.37 (m, 18H), 0.976 (t, 9H, $J = 7.2$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 188.19, 184.92, 180.72, 175.90, 174.78, 151.45, 144.26, 142.06, 135.19, 131.42, 128.49, 125.79, 111.83, 110.01, 89.28, 84.09, 50.97, 50.32, 44.19, 29.52, 29.47, 26.63, 24.86, 20.25, 13.92, 13.83. IR (KBr, cm^{-1}): 2956.67, 2931.60, 2871.81, 1598.88, 1556.45, 1517.87, 1415.65, 1350.08, 1315.36, 1286.43, 1178.43, 1139.85, 1120.56, 1110.92, 1058.85, 927.70, 900.70, 846.69, 823.55, 756.04. HRMS (ESI): m/z calcd for $[\text{M} (\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{BN}_2\text{O}_4)]^+$: 624.4105, found: 624.4114.

SQ-BA4: $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz, ppm): δ 8.07 (s, 2H), 8.01 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz), 7.96 (s, 1H), 7.86 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.50 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 6.80 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz), 6.05 (s, 1H), 4.26 (t, 2H, $J = 7.8$ Hz), 3.44-3.37 (m, 4H), 1.78-1.70 (m, 8H), 1.60-1.50 (m, 4H), 1.44-1.31 (m, 6H), 0.96-0.91 (m, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 188.57, 182.96, 179.16, 174.63, 172.43, 150.56, 143.20, 141.30, 134.39, 131.50, 129.50, 127.79, 118.43, 111.92, 111.15, 88.96, 49.96, 49.89, 43.77, 29.21, 29.17, 25.89, 19.59, 19.55, 13.83, 13.70. MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $[\text{M} (\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{BN}_2\text{O}_4)]^+$: 542.33; Found: 542.93.

スキーム 3 SQ-BA4 の合成スキーム.



1-2-4 SQ-BA 色素保存溶液の調製

SQ-BA 色素保存溶液は, 所定量の各々の粉末を DMF に溶解して調製した (2.0×10^{-4} M). 各々の溶液は劣化を防ぐため冷暗所に保存した.

2-3 操作手順

2-3-1 蛍光スペクトルの測定

1 cm 石英セル中で 2.0×10^{-4} M SQ-BA1-4 保存溶液に, 糖溶液および pH 緩衝溶液の適切な量を添加し, 超純水で定容とし, 蛍光スペクトルの測定を行った (日本分光製 FP-6600). 最終的な試料の組成は次のとおりである. SQ-BA 濃度 1.0×10^{-6} M, pH 緩衝溶液濃度 1.0×10^{-2} M, DMF 濃度 0.5% (v/v). また, 測定条件は次のとおりである. SQ-BA1: 励起波長 628.8 nm, 蛍光波長 658.8 nm, SQ-BA2: 励起波長 625.4 nm, 蛍光波長 658.8 nm, SQ-BA3: 励起波長 621.0 nm, 蛍光波長 658.8 nm, SQ-BA4: 励起波長 614.8 nm, 蛍光波長 658.8 nm, 励起バンド幅 5 nm, 蛍光バンド幅 5 nm (600 nm 以下の光の影響を防ぐためにフィルター R-60 を用いた), 感度 Manual (PMT 電圧 750 V), レスポンス 4 sec, データ読取間隔 0.2 nm, 走査速度 200 nm/min とした.

2-3-2 UV-vis 吸収スペクトルの測定

蛍光スペクトル測定と同様の手順で溶液を調整し, UV-vis 吸収スペクトルを測定した (日本分光製 V-660). 測定条件は, レスポンス Medium, データ読取間隔 0.2 nm, 走査速度 200 nm/min とした.

2-3-3 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定

SQ-BA1 の試料は次の手順で調製した. 所定量の粉末を DMSO- d_6 に溶解した 2.0×10^{-3} M SQ-BA1 溶液を調製した. また, 所定量の粉末を D_2O に溶解した Fru 溶液を調製した. SQ-BA1 溶液に Fru 溶液を添加し, NaOD を用いて pH を調整後, $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した (BRUKER ADVANCE 500T). 最終的な試料の組成は次のとおりである. SQ-BA1 濃度 5.0×10^{-4} M, Fru 濃度 4.0×10^{-3} M, DMSO- d_6 濃度 40% (v/v). SQ-BA2 の試料も同様の手順で調製した. 最終的な試料の組成は次のとおりである. SQ-BA2 濃度 5.0×10^{-4} M, pH 緩衝溶液濃度 1.0×10^{-2} M, Fru 濃度 4.0×10^{-3} M または Neu5Ac 濃度 1.0×10^{-1} M, DMSO- d_6 濃度 25% (v/v). 得られたスペクトルは, 水の ^1H ピーク (4.63ppm) を内部標準として化学シフトを決定した.

2-3-4 MDA

MDA の解析ソフトには福井正康らが開発した College Analysis を用いた⁹. 解析に用いた PC のスペックは次のとおりである. OS: Windows 7 Home Premium 64bit, CPU: Core i5 3210M(Ivy Bridge)2.5GHz, メモリ容量: 8G.

3 結果と考察

3-1 SQ-BA および糖 - SQ-BA 錯体の UV-vis および蛍光スペクトル

SQ-BA および糖分子添加時の SQ-BA 錯体の蛍光スペクトルを調査した。結果を図 4-3 に示す。

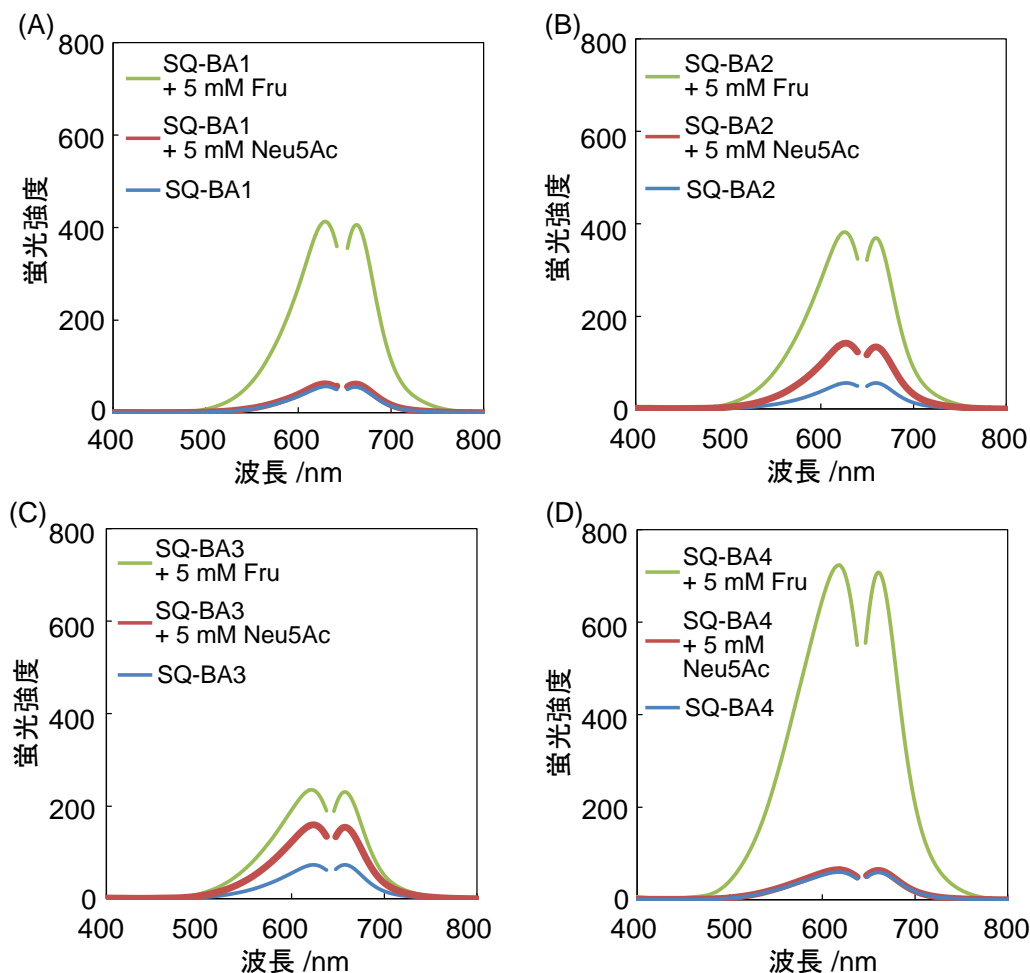


図 4-3 SQ-BA 色素と糖 - SQ-BA 錯体の励起および蛍光スペクトル. (A) [SQ-BA1] = 1 μ M, [carbonate] = 10 mM, pH 9.96. (B) [SQ-BA2] = 1 μ M, [HEPES] = 10 mM, pH 7.76. (C) [SQ-BA3] = 1 μ M, [HEPES] = 10 mM, pH 7.55. (d) [SQ-BA4] = 1 μ M, [CHES] = 10 mM, pH 9.18.

すべての SQ-BA 1-4 水溶液中で、強い蛍光は観測されなかったが (図 4-3), その溶液に単糖を添加したところ、各々の SQ-BA 色素の蛍光強度が著しく増大した (例として図 4-3 に Fru に対する結果を示す). 中でも、SQ-BA4 に Sor を添加した場合に最も大きな増感率 (約 12 倍) が観測された. 一方、5.0 mM の Neu5Ac を添加した場合、SQ-BA1 と 4 (シアニン基に *N,N*-ジブチルアミンを修飾) の蛍光強度に変化はなかった (図 4-3 (A) および (D)). それに対し、SQ-BA2 (シアニン基に *N,N*-ジエチルアミンを修飾) と SQ-BA3 (シアニン基に *N*-エチル-*N*-メチルアミンを修飾) の蛍光強度は明らかに増大した (~2.4 倍, 図 4-3 (B) および (C)). このように、側鎖の疎水性が低い骨格が Neu5Ac に対し選択的な応答を示すことを見出した.

SQ-BA 色素 (1 μM) に様々な 5.0 mM の単糖を添加したときの発光強度の増感率を図 4-4 に示す.

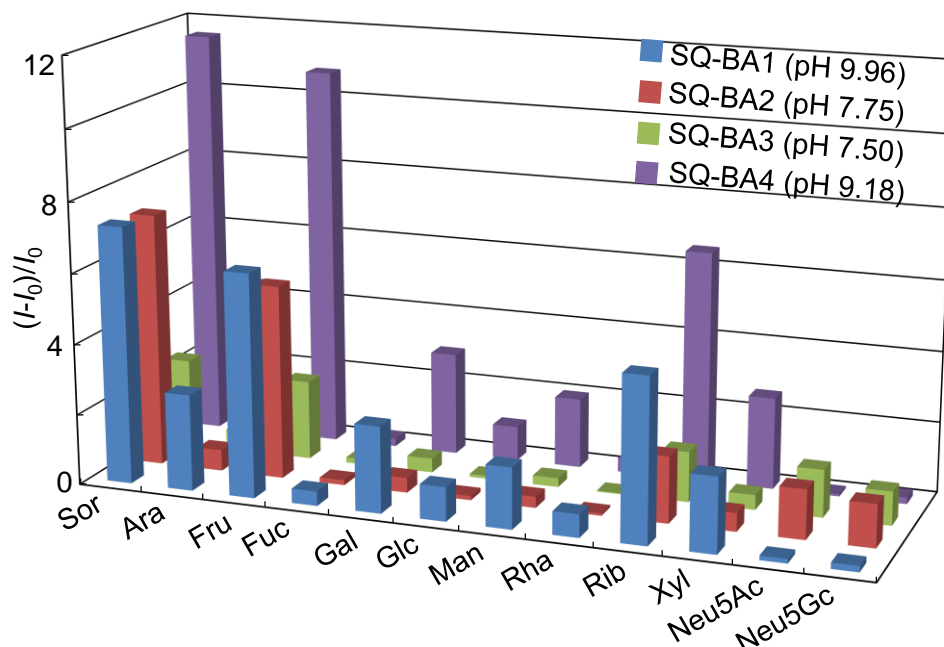


図 4-4 5.0 mM の単糖を添加した場合の SQ-BA 色素の増感率 $((I-I_0)/I_0)$. [SQ-BA] = 1 μM . SQ-BA1: [carbonate] = 10 mM, pH 9.96. SQ-BA2: [HEPES] = 10 mM, pH 7.75. SQ-BA3: [HEPES] = 10 mM, pH 7.50. SQ-BA4: [CHES] = 10 mM, pH 9.18.

SQ-BA1-4 の増感は中性糖に対しても多様なパターンを示した. 例えば, Fru を添加した場合, SQ-BA4 の蛍光強度の増感率が最も大きなり (11 倍), SQ-BA1 と 2 の増感率は同程度であった (6.3 倍). Rib を添加した場合, SQ-BA1 と 4 (それぞれ 5.6 倍と 6.5 倍) の増感率はより短いアルキル基を有する SQ-BA2 と 3 (それぞれ 1.8 倍と 1.4 倍) より大きかった. 一方, シアル酸 (Neu5Ac および Neu5Gc) を添加した場合, SQ-BA2 と 3 の増感率は大きくなったが (1.4 倍と 1.3 倍), SQ-BA1 と 4 は増感が観測されなかった. 以上のように, SQ-BA 骨格のアルキル鎖長を変化させるだけで単糖に対する様々な選択性を与えることに成功した. 特に, 単純なボロン酸系モチーフを用いてシアル酸選択性を得ることは困難であることから, このシアル酸に対する反応性の違いは興味深い. このような多様な応答は MDA に適しており, 中でも SQ-BA2, 3 と 1, 4 のシアル酸に対する全く異なる応答特性は, 複雑な混合系の生体試料中からシアル酸の信号だけを抽出するために利用可能と考えた.

中性単糖に対し Neu5Ac の反応性が異なる原因を探るため pH 緩衝溶液中および有機溶媒中での SQ-BA 色素の吸収スペクトルを測定した. スカリリウム色素は, 主に二種類の会合体が形成し, 単量体の吸収スペクトルと比較してレッドシフトする *J*-会合体 (横滑りした会合体) とブルーシフトする *H*-会合体 (完全に重なりあった会合体) が報告されている^{10,11}.

SQ-BA1-4 の吸収スペクトルを測定した結果を図 4-5 に示す.

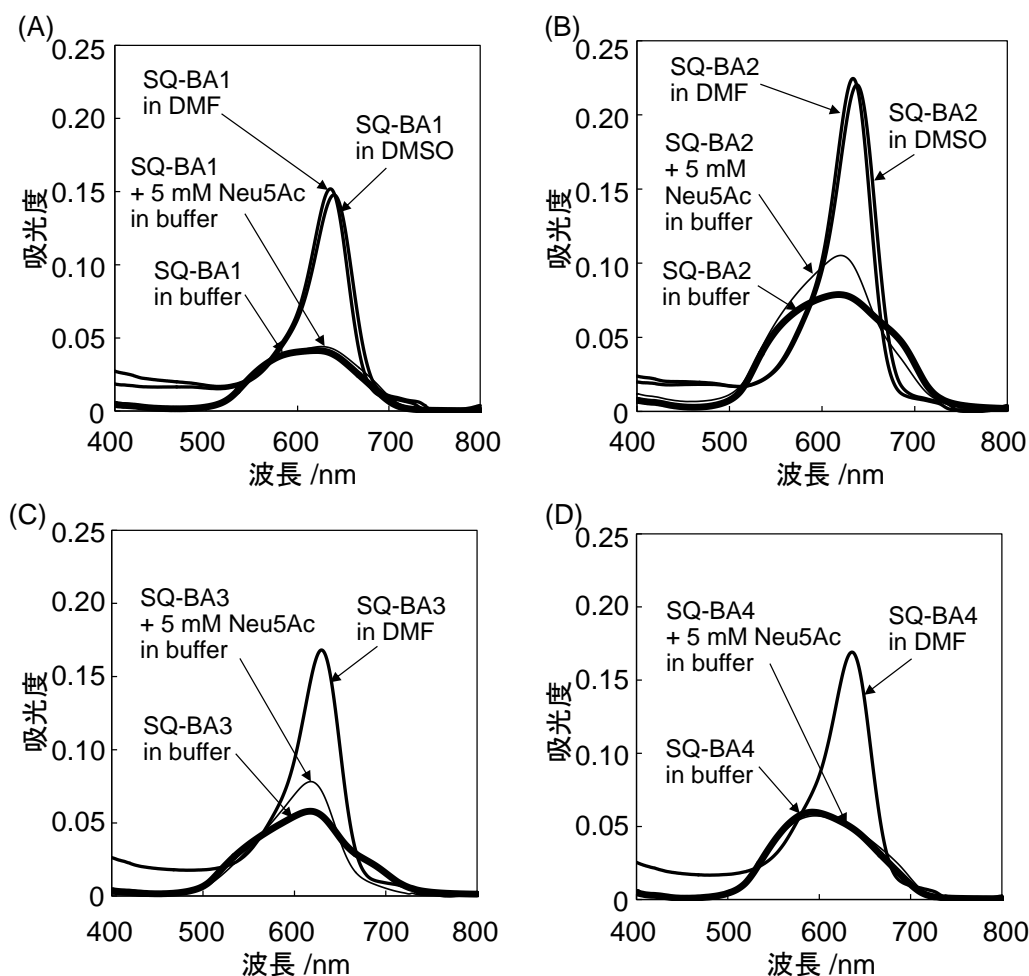


図 4-5 SQ-BA 色素と糖 - SQ-BA 錯体の吸収スペクトル. (A) [SQ-BA1] = 1 μ M, [carbonate] = 10 mM, pH 9.96. (B) [SQ-BA2] = 1 μ M, [HEPES] = 10 mM, pH 7.76. (C) [SQ-BA3] = 1 μ M, [HEPES] = 10 mM, pH 7.55. (d) [SQ-BA4] = 1 μ M, [CHES] = 10 mM, pH 9.18.

DMF 中の SQ-BA 色素の吸収スペクトルは、SQ-BA1-4 のすべてで 633.5~636.5 nm で極大を示すシャープな形状の吸収バンドが観測された。これは、色素分子が基底状態から単一の励起状態への遷移であることから、溶液中で他の色素分子と相互作用しない単量体色素構造で存在することを示している。それに対し、pH 緩衝溶液中では、すべての SQ-BA 色素の吸収スペクトルは 500~750 nm においてブロードな形状を示した。これは、SQ-BA 色素が水溶性の会合体を形成していることを示している。なぜなら、会合体状態の場合、励起された電子は分子間で非局在化し、励起状態のエネルギー準位が様々に変化するためである¹²。SQ-BA1 と 4 は水溶液中で最大吸収波長約 570 nm で、単量体と比較してブルーシフトが観測されたことから、主に *H*-会合体を形成していると推測した (図 4-5 (A) および (D))。Neu5Ac を添加した場合、SQ-BA1 と 4 の吸収スペクトルは変化しなかった。これは、SQ-BA1 と 4 が Neu5Ac と反応していないことを示しており、蛍光増感の結果とも一致している。SQ-BA2 と 3 については、レッドシフトバンド (約 700 nm) とブルーシフトバンド (約 570 nm) の両方が観測されたことから *J*-および *H*-会合体が混在している状態であると推測した (図 4-5 (B) および (C))。これは、SQ-BA2 と 3 はアルキル鎖の疎水性が低く会合体の色

素同士の末端の位置がずれることが可能であるため、*H*-会合体だけでなく横滑りした *J*-会合体も形成することが可能であると考察した。これらの結果から、疎水性の低い SQ-BA2 と 3 は、緩い *J*-会合体状態が存在し、Neu5Ac と多点相互作用可能な認識場を会合体が横滑りすることで形成可能であるのに対し、疎水性の高い SQ-BA1 と 4 は、完全に重なりあった *H*-会合体状態で存在するため、Neu5Ac と多点相互作用を形成できなかつたと推測した (図 4-6 参照)。よって、SQ-BA 色素の会合体の形状が Neu5Ac の独特な認識へ起因していると考えられる。

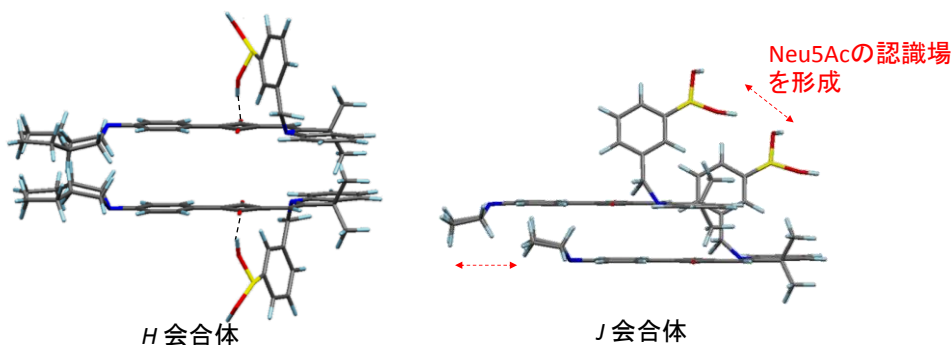


図 4-6 SQ-BA 色素の会合体形状。

3-2 SQ-BA および糖 - SQ-BA 錯体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

SQ-BA2 と 3 による Neu5Ac に対する独特な認識機構を調査するため、長いアルキル鎖を有する SQ-BA の例として SQ-BA1 を、短いアルキル鎖を有する SQ-BA の例として SQ-BA2 を選択し、それらの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを比較した。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定結果を図 4-7 に示す。

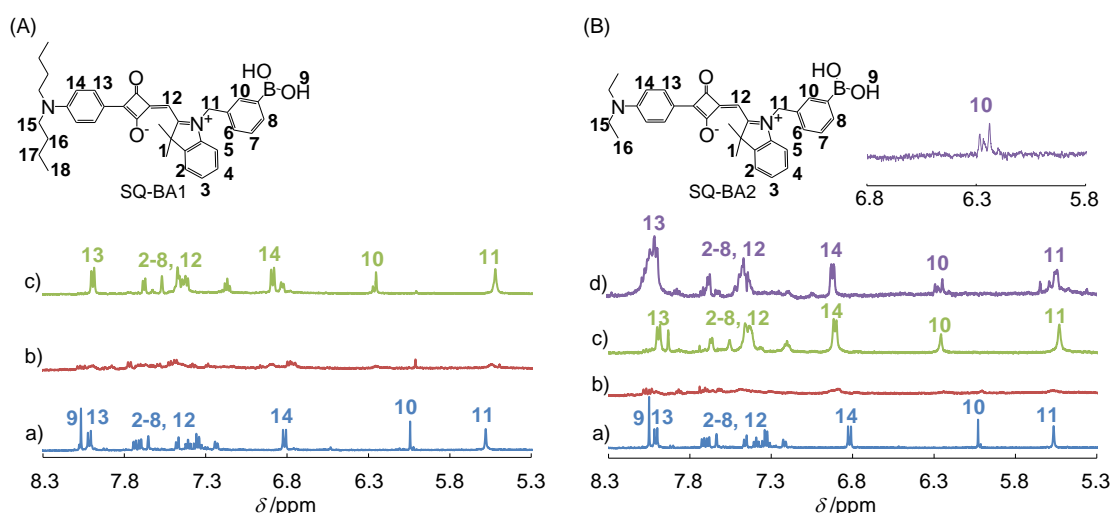


図 4-7 SQ-BA 色素の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル。(A) SQ-BA1. (a) 単量体 ($[\text{SQ-BA1}] = 0.5 \text{ mM}$, $\text{DMSO-}d_6$, $\text{pH } 9.5$), (b) SQ-BA1 会合体 ($[\text{SQ-BA1}] = 0.5 \text{ mM}$, $40\% \text{ DMSO-}d_6\text{-D}_2\text{O}$ 混合溶液, $\text{pH } 9.5$), (c) Fru-SQ-BA1 錯体 ($[\text{SQ-BA1}] = 0.5 \text{ mM}$, $[\text{Fru}] = 40 \text{ mM}$, $40\% \text{ DMSO-}d_6\text{-D}_2\text{O}$ 混合溶液, $\text{pH } 9.5$). (B) SQ-BA2. (a) 単量体 ($[\text{SQ-BA2}] = 0.5 \text{ mM}$, $\text{DMSO-}d_6$, $\text{pH } 8.5$), (b) SQ-BA2 会合体 ($[\text{SQ-BA2}] = 0.5 \text{ mM}$, $25\% \text{ DMSO-}d_6\text{-D}_2\text{O}$ 混合溶液, $\text{pH } 8.5$), (c) Fru-SQ-BA2 錯体 ($[\text{SQ-BA2}] = 0.5 \text{ mM}$, $[\text{Fru}] = 40 \text{ mM}$, $25\% \text{ DMSO-}d_6\text{-D}_2\text{O}$ 混合溶液, $\text{pH } 8.5$), (d) Neu5Ac-SQ-BA2 錯体 ($[\text{SQ-BA2}] = 0.5 \text{ mM}$, $[\text{Neu5Ac}] = 0.1 \text{ M}$, $25\% \text{ DMSO-}d_6\text{-D}_2\text{O}$ 混合溶液, $\text{pH } 8.5$). 差し込み図 : Neu5Ac-SQ-BA2 錯体の H-10 シグナルの拡大図。

DMSO 中の SQ-BA2 の吸収スペクトルは極大吸収波長 638 nm とするシャープな形状であることから、DMSO 中では単量体として存在していることが分かった (図 4-5 (B)). よって、DMSO- d_6 中における SQ-BA2 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、単量体のもと考えられる (図 4-7 (B) (a)). 一方、25% DMSO- d_6 - D_2O 混合溶液中では、明確なシグナルがほとんど観測されなかった (図 4-7 (B) (b)). これは、SQ-BA2 会合体の形成を示していると考察した。なぜなら、SQ-BA 色素と同様に π - π スタッキングを駆動力として会合体を形成する芳香族化合物において、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルがブロード化またはシグナルが消失するということが報告されていることからである¹³⁻¹⁵。例として、陽イオン性のポルフィリンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを図 4-8 に示す¹³。ポルフィリンが単量体で存在する場合 (図 4-8 (b)) では、ポルフィリン骨格の $\text{H}_{\beta a}$ 、 $\text{H}_{\beta b}$ および $\text{H}_{\beta c}$ のシグナルがそれぞれ検出されているが、ポルフィリンが会合体を形成するとそれらのプロトンのシグナルは観測されなかった (図 4-8 (a)). SQ-BA1 についても、SQ-BA2 と同様の結果が得られた (図 4-7 (A) (b)).

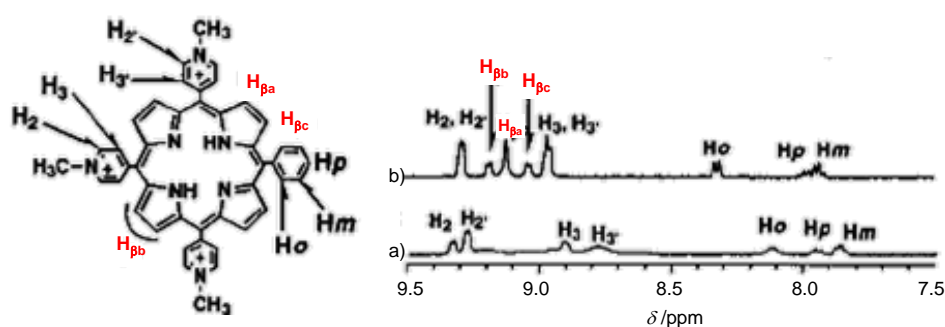


図 4-8 陽イオン性ポルフィリンの化学構造 (左) とその $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (右)¹³. a) ポルフィリン会合体. b) ポルフィリン単量体.

本章 3-5 項で得たみかけの安定度定数 ($K_{\text{calc}} = 10^3 \text{ M}^{-1}$) から判断して、定量的に錯体を形成しているはずの濃度の 0.04 M Fru を $5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ SQ-BA2 の 25% DMSO- d_6 - D_2O 混合溶液に添加した時 (図 4-7 (B) (c)), フェニルボロン酸基の 2 位のプロトン H-10 (図 4-7 (B) の化学構造を参照, 2.62 ppm) が DMSO- d_6 中 (単量体 SQ-BA) と同様にシングレットであることから、SQ-BA は全て等価な単一化学種として存在していると考えられる。すなわち、Fru と SQ-BA 単量体との錯体であると考えられ、通常、Fru とボロン酸は 1:1 で反応する¹⁶⁻²⁰。一方、1:2 での Fru と SQ-BA との反応する場合、互いに環電流効果などによる磁気的環境へ影響を及ぼす程に 2 つのフェニルボロン酸基が接近しなければならず H-10 がシングレットとして観測されないはずである。以上の 2 点から、Fru と SQ-BA 単量体は 1:1 錯体だけを形成していると考えられる。SQ-BA1 についても、SQ-BA2 と同様の結果が得られた (図 4-7 (A) (c)).

一方、0.1 M の Neu5Ac を $5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ SQ-BA2 の 25% DMSO- d_6 - D_2O 混合溶液に添加した場合 (図 4-7 (B) (d)), Fru-SQ-BA2 錯体の時とは異なり、H-10 は非対称形のトリプレットとなった。H-10 の最も右のシグナル (2.62 ppm) は 1:1 Fru-SQ-BA2 錯体のシングレットのと同じ化学シフト値であり、Neu5Ac 濃度を 0.05 から 0.1 M に増大させると 2.62 ppm の

ピーク面積が大きくなることから 1:1 の Neu5Ac-SQ-BA2 錯体のシングレットの H-10 プロトンピークと同定した。また、残りの二本のピークについては、H-10 プロトンは他のプロトンとのカップリングがないことからシングレットであるはずであるため、2種類の磁気的環境を有するプロトン種が存在し、かつこの二つのピーク面積がほぼ等しいことから、2つの SQ-BA2 色素が互いに H-10 の磁気的環境を変化させる程に接近した状態で Neu5Ac と錯体を形成していると考えられ、異なる磁気的環境の H-10 プロトンを持つ 1:2 錯体に相当すると考察した。すなわち、1:1 錯体と 1:2 錯体が混在しており、3本のシングレットが観測されたと結論付けた。吸収スペクトルの結果から、SQ-BA2 は J-会合体を形成している可能性が高く、会合体中では SQ-BA2 が横滑りした形状をとっており、その結果、Neu5Ac に対して、第一章 3-3-1 項で紹介したビスボロン酸プローブと同様に 2点での結合を形成していると考えた。仮に横滑り構造ではなくアルキル基を起点とするピンセット様な結合を形成した場合 (図 4-9)、アルキル鎖長に関係なく 2つの色素のボロン酸基によりシアル酸の認識場を形成することから SQ-BA1 と 2の両方が同様の反応性を示すはずである。しかし、SQ-BA1 は Neu5Ac と反応せず、SQ-BA2 が Neu5Ac と反応したという蛍光および吸収スペクトルの結果 (図 4-3 および図 4-5) と一致しないことから、横滑りした会合体による Neu5Ac の認識場の形成が妥当であると考えられる。

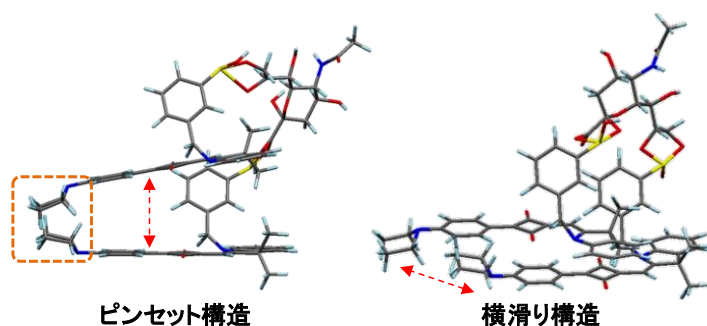


図 4-9 Neu5Ac を認識する会合体の推定構造。

3-3 シアル酸認識の推定機構

本章 3-1 および 3-2 項の結果から、SQ-BA 色素による Neu5Ac の認識機構を推定した。長いアルキル鎖を有する SQ-BA1 と 4 は、末端アルキル鎖同士の疎水性相互作用が強いため会合体における 2つの色素同士の末端の位置がずれることなく、剛健で横滑りできない H-会合体を形成すると考えられる。この時、Neu5Ac に対し 2点で結合する認識場を形成することはできない。一方、末端アルキル鎖同士の疎水性相互作用が弱いため、横滑りした J-会合体を形成可能な SQ-BA2 と 3 は二箇所のボロン酸基で Neu5Ac を認識することが可能であると考察した (図 4-10)。一般的に糖分子の認識部位であるボロン酸基を修飾するのではなく、側鎖の疎水性を変化させることで特異な認識場を形成するというユニークな分子設計指針も得ることができた。

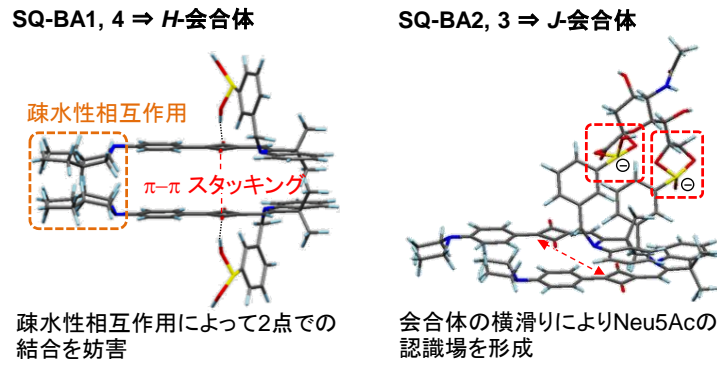


図 4-10 Neu5Ac の認識機構の推定図.

3-4SQ-BA 色素の発光強度の pH 依存性およびその平衡解析

SQ-BA 色素系の化学量論と会合定数および会合数を決定するために、遊離の SQ-BA 色素の蛍光強度の pH 依存性を調査した. 測定結果を図 4-11 に示す.

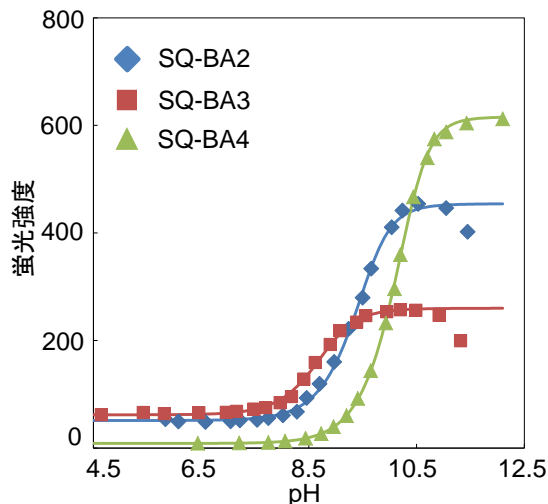
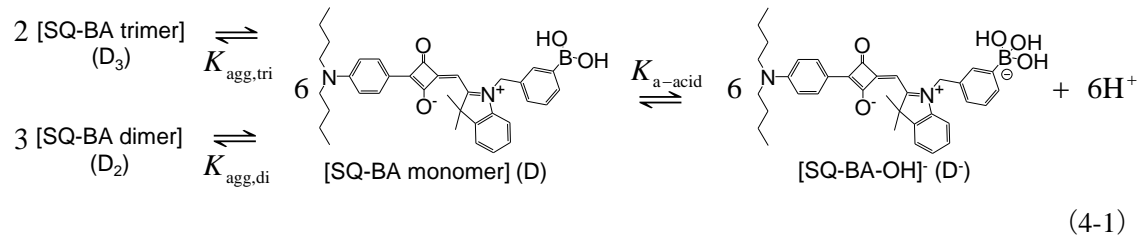


図 4-11 SQ-BA 色素溶液の蛍光強度の pH 依存性. 実線は式 4-14 の非最小二乗フィッティングである. [SQ-BA] = 1 μ M, [HEPES] = 10 mM.

SQ-BA 色素系全体の傾向として pH 5~8 では、消光しており会合体の形成が示唆されたが、pH 8~11 では、蛍光強度が増大した. これは、SQ-BA 色素のボロン酸基の酸解離反応によって色素分子の親水性が増大し、SQ-BA 会合体が解離し、蛍光性の単量体を形成したことに起因している (式 4-1). pH 11.5 以上の強塩基性条件下では、SQ-BA 色素が分解し消光したものと推測した. Chen らは、 π - π スタッキングにより形成する SQ 色素の二量体が極大吸収波長 585 nm を示し、四量体を形成する場合、より強いブルーシフトバンド (100 nm 以上のシフト) を示すことを報告している¹¹. また、SQ-BA 色素が四量体を形成する程に疎水性が高い場合にはすべて H-会合体となり、レッドシフトバンドは観測されないと考えられる. よって、SQ-BA 色素は二量体または三量体を形成していると推測される. そこで、平衡解析から会合数および会合定数を決定することにした. 解析する SQ-BA 色素の蛍光強度の pH

範囲は、会合体の形成により消光している弱酸性 pH 付近 (pH 5) から蛍光強度が極大となる pH 11 付近とした。これは蛍光強度が pH 11.5 以上で減少することから、pH 11.5 以上の強塩基性条件下では、SQ-BA 色素の分解が考えられるためである。

まず、三量体および二量体が混合形成する場合についての解析を行った。三量体会合定数 ($K_{\text{agg,tri}}$)、二量体会合定数 ($K_{\text{agg,di}}$) および SQ-BA 色素中のボロン酸基の酸解離定数 ($K_{\text{a-acid}}$) は蛍光強度の pH 依存性から決定した。全体の平衡反応は次のようになる。



ここで、 D_3 、 D_2 、 D および D^- は SQ-BA 三量体、SQ-BA 二量体、SQ-BA 単量体および酸解離化学種 SQ-BA-OH⁻ を示している。三量体および二量体の会合定数はそれぞれ次で表わされる。

$$K_{\text{agg,tri}} = \frac{[D_3]}{[D]^3} \quad (4-2)$$

$$K_{\text{agg,di}} = \frac{[D_2]}{[D]^2} \quad (4-3)$$

酸解離定数は次のように示すことができる。

$$K_{\text{a-acid}} = \frac{[D^-][\text{H}^+]}{[D]} \quad (4-4)$$

観測される蛍光強度 I_{obs} は次のように示すことができる。

$$I_{\text{obs}} = \frac{[D_3]}{[D]_{\text{T}}} I_{D_3} + \frac{[D_2]}{[D]_{\text{T}}} I_{D_2} + \frac{[D]}{[D]_{\text{T}}} I_{\text{D}} + \frac{[D^-]}{[D]_{\text{T}}} I_{\text{D}^-} \quad (4-5)$$

ここで、 I_{D_3} 、 I_{D_2} 、 I_{D} および I_{D^-} は、SQ-BA 三量体、SQ-BA 二量体、SQ-BA 単量体および SQ-BA-OH⁻ の蛍光強度を示している。SQ-BA の物質収支は次のようになる。

$$[D]_{\text{T}} = 3[D_3] + 2[D_2] + [D] + [D^-] \quad (4-6)$$

$[D]_{\text{T}}$ は SQ-BA の全濃度であり、式 4-2、4-3、4-4、4-5 および 4-6 から式 4-7 を導く。

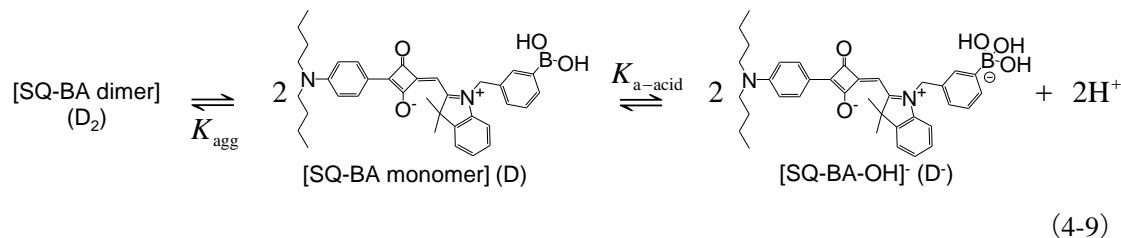
$$I_{\text{obs}} = \frac{3K_{\text{agg,tri}}[D]}{[D]_{\text{T}}} I_{D_3} + \frac{2K_{\text{agg,di}}[D]}{[D]_{\text{T}}} I_{D_2} + \frac{[D]}{[D]_{\text{T}}} I_{\text{D}} + \frac{K_{\text{a}}[D]}{[\text{H}^+][D]_{\text{T}}} I_{\text{D}^{\cdot}} \quad (4-7)$$

式 4-7 中の D は

$$D = \left(\frac{-243K_{\text{agg,tri}}^3[D]_{\text{T}} + K_{\text{agg,di}}^3 - 54K_{\text{agg,tri}}K_{\text{agg,di}}\left(1 + \frac{K_{\text{a}}}{[\text{H}^+]}\right)}{1458K_{\text{agg,tri}}^3} + \sqrt{\left(\frac{-243K_{\text{agg,tri}}^3[D]_{\text{T}} + K_{\text{agg,di}}^3 - 54K_{\text{agg,tri}}K_{\text{agg,di}}\left(1 + \frac{K_{\text{a}}}{[\text{H}^+]}\right)}{1458K_{\text{agg,tri}}^3} \right)^2 + \left(\frac{9K_{\text{agg,tri}}\left(1 + \frac{K_{\text{a}}}{[\text{H}^+]}\right) - 4K_{\text{agg,di}}^2}{81K_{\text{agg,tri}}^2} \right)^3} \right)^{1/3} \\ + \left(\frac{-243K_{\text{agg,tri}}^3[D]_{\text{T}} + K_{\text{agg,di}}^3 - 54K_{\text{agg,tri}}K_{\text{agg,di}}\left(1 + \frac{K_{\text{a}}}{[\text{H}^+]}\right)}{1458K_{\text{agg,tri}}^3} - \sqrt{\left(\frac{-243K_{\text{agg,tri}}^3[D]_{\text{T}} + K_{\text{agg,di}}^3 - 54K_{\text{agg,tri}}K_{\text{agg,di}}\left(1 + \frac{K_{\text{a}}}{[\text{H}^+]}\right)}{1458K_{\text{agg,tri}}^3} \right)^2 + \left(\frac{9K_{\text{agg,tri}}\left(1 + \frac{K_{\text{a}}}{[\text{H}^+]}\right) - 4K_{\text{agg,di}}^2}{81K_{\text{agg,tri}}^2} \right)^3} \right)^{1/3} - \frac{2K_{\text{agg,di}}}{9K_{\text{agg,tri}}} \quad (4-8)$$

である。会合体を形成することで SQ-BA 自体の蛍光は消光していることから I_{D_3} と I_{D_2} は 0 とみなすことができ、式 4-7 を非線形最小二乗法を用いてフィッティングしたが、SQ-BA2-4 すべての色素に対し未知パラメーターの値が収束せず、妥当な K_{agg} および $K_{\text{a-acid}}$ は得られなかった。よって、三量体は形成していないと結論付けた。

次に二量体形成の場合について解析を行った。この場合の全体の平衡反応は次のようになる。



ここで、 D_2 、 D および D^{\cdot} は SQ-BA 二量体、SQ-BA 単量体および酸解離化学種 SQ-BA-OH $^{\cdot}$ を示している。会合定数は次のように定義する。

$$K_{\text{agg}} = \frac{[D_2]}{[D]^2} \quad (4-10)$$

酸解離定数は次のように示すことができる。

$$K_{\text{a-acid}} = \frac{[D^{\cdot}][\text{H}^+]}{[D]} \quad (4-11)$$

観測される蛍光強度 I_{obs} は次のように示すことができる。

$$I_{\text{obs}} = \frac{[D_2]}{[D]_{\text{T}}} I_{D_2} + \frac{[D]}{[D]_{\text{T}}} I_{\text{D}} + \frac{[D^-]}{[D]_{\text{T}}} I_{\text{D}^-} \quad (4-12)$$

ここで、 I_{D_2} 、 I_{D} および I_{D^-} は、SQ-BA 二量体、SQ-BA 単量体および SQ-BA-OH⁻ の蛍光強度を示しており、SQ-BA の物質収支は次のようになる。

$$[D]_{\text{T}} = 2[D_2] + [D] + [D^-] \quad (4-13)$$

$[D]_{\text{T}}$ は SQ-BA の全濃度であり、式 4-10、4-11、4-12 および 4-13 から式 4-14 を導く。

$$I_{\text{obs}} = \frac{K_{\text{agg}}}{[D]_{\text{T}}} \left(\frac{-[H^+] - K_{\text{a-acid}} + \sqrt{[H^+]^2 + 2K_{\text{a-acid}} + K_{\text{a-acid}}^2 + 8K_{\text{agg}}[H^+][D]_{\text{T}}}}{4K_{\text{agg}}[H^+]} \right)^2 I_{D_2} \\ + \frac{-[H^+] - K_{\text{a-acid}} + \sqrt{[H^+]^2 + 2K_{\text{a-acid}} + K_{\text{a-acid}}^2 + 8K_{\text{agg}}[H^+][D]_{\text{T}}}}{4K_{\text{agg}}[H^+][D]_{\text{T}}} I_{\text{D}} \quad (4-14) \\ + \frac{-K_{\text{a-acid}}[H^+] - K_{\text{a-acid}}^2 + K_{\text{a-acid}} \sqrt{[H^+]^2 + 2K_{\text{a-acid}} + K_{\text{a-acid}}^2 + 8K_{\text{agg}}[H^+][D]_{\text{T}}}}{4K_{\text{agg}}[H^+][D]_{\text{T}}} I_{\text{D}^-}$$

ここで、会合体を形成することで SQ-BA 自体の蛍光は消光していることから I_{D_2} は 0 とみなすことができ、非線形最小二乗法を用いて式 4-14 をフィッティングすることで K_{agg} および $K_{\text{a-acid}}$ を求めた。蛍光強度の pH 依存性の実験結果と理論式 4-14 は $R^2 = 0.997\sim 0.999$ でよく一致した (図 4-11)。よって、SQ-BA 色素は水溶液中で二量体を主に形成していると結論付けた。決定された値を表 4-2 にまとめる。

表 4-2 フィッティングにより決定したパラメーター。

| | SQ-BA2 | SQ-BA3 | SQ-BA4 |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|
| R^2 | 0.999 | 0.998 | 0.997 |
| I_{D} | 192 ± 8 | 121 ± 3 | 100 ± 10 |
| I_{D^-} | 456 ± 4 | 260 ± 3 | 612 ± 2 |
| log K_{agg} | 6.7 ± 0.2 | 5.9 ± 0.5 | 7.7 ± 0.8 |
| log $K_{\text{a-acid}}$ | 8.94 ± 0.02 | 8.52 ± 0.02 | 9.25 ± 0.01 |

得られた I_{D} は、SQ-BA3 < SQ-BA2 < SQ-BA4 となった。これは、SQ-BA 色素のアルキル鎖の疎水性の序列と一致しているようだが、アルキル鎖の疎水性の高さと SQ-BA 色素の蛍光強度の関連性については現在のところ不明である。 I_{D} は、 I_{D^-} と比較して 50% 以下となった。先行研究において、遊離の SQ-BA 色素がボロン酸基の水素原子とスカリリウム (SQ) 構造の酸素原子で分子内水素結合を形成することが分子軌道法により示されており¹、分子

内水素結合の形成に伴い SQ 構造の極性が低下する。SQ 構造の極性の低下により、一般的な SQ 色素が示す分子内電荷移動に基づく吸収帯がブルーシフトし、蛍光強度が低下したと推測した。

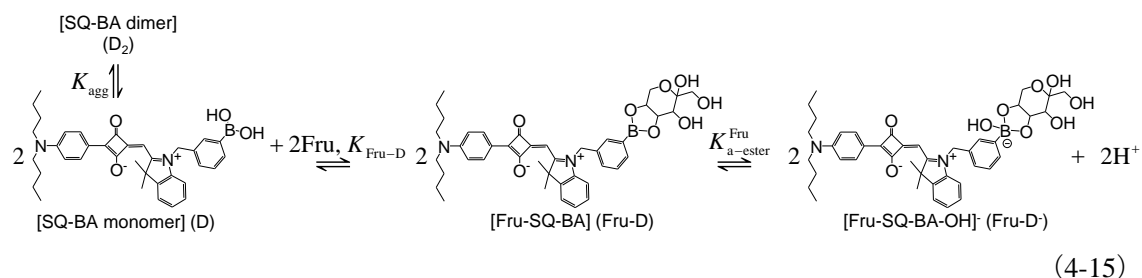
pK_a 値についてはすべての SQ-BQ 色素で同程度 (pK_a = 8.5~9.2) であった。SQ-BA 色素の構造はアルキル鎖長が異なるだけであり、ボロン酸基の酸解離反応への影響はほとんどないと考えられるため、この結果は妥当である。また、これらの値は PBA に対する文献値 (pK_a = 8.8)²⁰ とほぼ同程度であったが、SQ-BA 色素のボロン酸基の酸解離だけを考えている (前段の会合に関しては別の平衡で与えている) ため、この結果も妥当であり、実験および平衡解析が正しくなされたことを示している。一方、会合定数 K_{agg} は、アルキル鎖長の長い順に大きい値を示した (SQ-BA3 < SQ-BA2 < SQ-BA4)。これは、SQ-BA 色素のアルキル鎖の疎水性の序列と一致しており、これらの平衡解析の妥当性を示しており、非常に自然な値と考える。

3-5 SQ-BA 色素と糖分子との安定度定数

SQ-BA 色素と単糖との安定度を調査するため、単糖-SQ-BA 錯体の安定度定数を測定した。

3-5-1 1:1Fru-SQ-BA 錯体の安定度定数の平衡解析

Fru-SQ-BA 錯体の安定度定数 K_{Fru-D} (M⁻¹) を Fru の濃度変化に対する蛍光強度から決定した。¹H-NMR の結果から Fru-SQ-BA 錯体は 1:1 錯体を形成することがわかっているため、全体の平衡反応は次のようになる。すなわち、SQ-BA 会合体の形成平衡 (二量体) K_{agg}, Fru-SQ-BA 錯体の形成平衡 K_{Fru-D} および Fru-SQ-BA 錯体の酸解離反応 K_{a-ester}^{Fru} から成る。



ここで、Fru, Fru-D および Fru-D⁻ は fructose, Fru-SQ-BA 錯体 および Fru-SQ-BA-OH 錯体をそれぞれ示す。ここで K_{Fru-D} は次の式で表せる。

$$K_{\text{Fru-D}} = \frac{[\text{Fru-D}]}{[\text{D}][\text{Fru}]} \quad (4-16)$$

K_{a-ester}^{Fru} は次のように示すことができる。

$$K_{\text{a-ester}}^{\text{Fru}} = \frac{[\text{Fru-D}^-][\text{H}^+]}{[\text{Fru-D}]} \quad (4-17)$$

観測される蛍光強度 I_{obs} は次のように示すことができる。

$$I_{\text{obs}} = \frac{[\text{D}_2]}{[\text{D}]_{\text{T}}} I_{\text{D}_2} + \frac{[\text{D}]}{[\text{D}]_{\text{T}}} I_{\text{D}} + \frac{[\text{Fru-D}]}{[\text{D}]_{\text{T}}} I_{\text{Fru-D}} + \frac{[\text{Fru-D}^-]}{[\text{D}]_{\text{T}}} I_{\text{Fru-D}^-} \quad (4-18)$$

式中の $I_{\text{Fru-D}}$ と $I_{\text{Fru-D}^-}$ はそれぞれ Fru-SQ-BA 錯体と Fru-SQ-BA-OH 錯体の蛍光強度である。SQ-BA の物質収支は次のようになる。

$$[\text{D}]_{\text{T}} = 2[\text{D}_2] + [\text{D}] + [\text{Fru-D}] + [\text{Fru-D}^-] \quad (4-19)$$

式 4-10, 4-16, 4-17, 4-18 および 4-19 から式 4-20 が導ける。

$$I_{\text{obs}} = \frac{K_{\text{agg}}}{[\text{D}]_{\text{T}}} \left(\frac{-1 - K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}] - \frac{K_{\text{a-ester}}^{\text{Fru}} K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}]}{[\text{H}^+]} + \sqrt{\left(1 + K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}] + \frac{K_{\text{a-ester}}^{\text{Fru}} K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}]}{[\text{H}^+}\right]^2 + 8K_{\text{agg}}[\text{H}^+][\text{D}]_{\text{T}}}}{4K_{\text{agg}}} \right)^2 I_{\text{D}_2} \\ + \frac{-1 - K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}] - \frac{K_{\text{a-ester}}^{\text{Fru}} K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}]}{[\text{H}^+]} + \sqrt{\left(1 + K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}] + \frac{K_{\text{a-ester}}^{\text{Fru}} K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}]}{[\text{H}^+}\right]^2 + 8K_{\text{agg}}[\text{H}^+][\text{D}]_{\text{T}}}}{4K_{\text{agg}}[\text{D}]_{\text{T}}} I_{\text{D}} \\ + \frac{K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}]}{[\text{D}]_{\text{T}}} \left(\frac{-1 - K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}] - \frac{K_{\text{a-ester}}^{\text{Fru}} K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}]}{[\text{H}^+]} + \sqrt{\left(1 + K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}] + \frac{K_{\text{a-ester}}^{\text{Fru}} K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}]}{[\text{H}^+}\right]^2 + 8K_{\text{agg}}[\text{H}^+][\text{D}]_{\text{T}}}}{4K_{\text{agg}}} \right) I_{\text{Fru-D}} \\ + \frac{K_{\text{a-ester}}^{\text{Fru}} K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}]}{[\text{H}^+][\text{D}]_{\text{T}}} \left(\frac{-1 - K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}] - \frac{K_{\text{a-ester}}^{\text{Fru}} K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}]}{[\text{H}^+]} + \sqrt{\left(1 + K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}] + \frac{K_{\text{a-ester}}^{\text{Fru}} K_{\text{Fru-D}}[\text{Fru}]}{[\text{H}^+}\right]^2 + 8K_{\text{agg}}[\text{H}^+][\text{D}]_{\text{T}}}}{4K_{\text{agg}}} \right) I_{\text{Fru-D}^-} \quad (4-20)$$

ここで、 I_{D_2} は 0 を、 I_{D} は実験的に得られた 192 (SQ-BA2), 121 (SQ-BA3) および 100 (SQ-BA4) を、 K_{agg} は $10^{6.7}$ (SQ-BA2), $10^{5.9}$ (SQ-BA3) および $10^{7.7} \text{ M}^{-1}$ (SQ-BA4) をそれぞれ用いた (本章 3-4 項参照)。非線形最小二乗法を用いて式 4-20 を図 4-12 の実験値にフィッティングすることで $K_{\text{Fru-D}}$ および $K_{\text{a-ester}}^{\text{Fru}}$ を求めた。実験結果と理論式 4-20 は $R^2 = 0.97\sim 0.997$ でよく一致した (図 4-12)。よって、SQ-BA 色素は Fru と主に 1:1 錯体を形成していると結論付けた。また、決定した値を表 4-3 にそれぞれ示す。

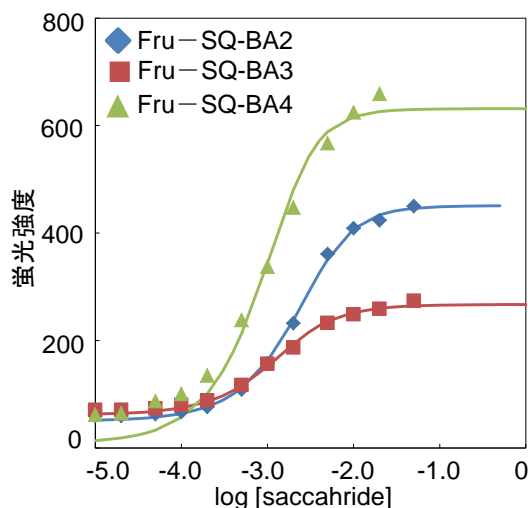


図 4-12 Fru 濃度変化による SQ-BA 色素の蛍光強度. 実線は式 4-20 の非最小二乗フィッティングである. [SQ-BA] = 1 μ M. SQ-BA2: [HEPES] = 10 mM, pH 7.76. SQ-BA3: [HEPES] = 10 mM, pH 7.50. SQ-BA4: [CHES] = 10 mM, pH 9.18.

表 4-3 フィッティングにより決定したパラメーター.

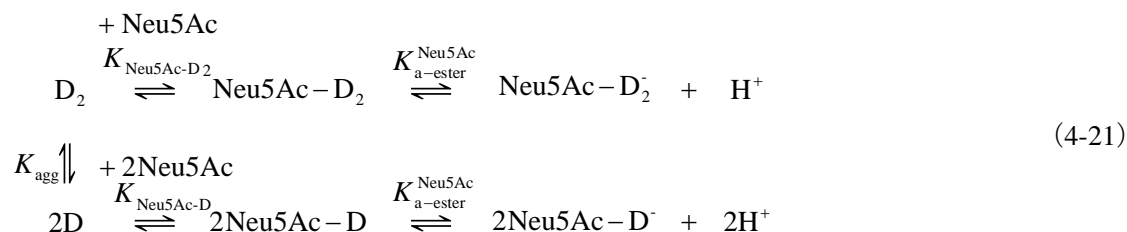
| | SQ-BA2 | SQ-BA3 | SQ-BA4 |
|---|-----------------|-----------------|---------------|
| R^2 | 0.997 | 0.995 | 0.97 |
| $I_{\text{Fru-D}}$ | 294 ± 2 | 177 ± 4 | 400 ± 60 |
| $I_{\text{Fru-D-}}$ | 513 ± 4 | 295 ± 4 | 610 ± 72 |
| $\log K_{\text{Fru-D}}$ | 2.53 ± 0.04 | 2.43 ± 0.08 | 2.4 ± 0.8 |
| $\text{p}K_{\text{a-ester}}^{\text{Fru}}$ | 7.34 ± 0.04 | 6.99 ± 0.08 | 7.7 ± 0.9 |

得られた $I_{\text{Fru-D}}$ と $I_{\text{Fru-D-}}$ は, SQ-BA3 < SQ-BA2 < SQ-BA4 の序列となった. また, $I_{\text{Fru-D}}$ は $I_{\text{Fru-D-}}$ の 60~70%であった. Fru-SQ-BA 錯体も Fru のヒドロキシル基水素原子-SQ 構造の酸素原子間で分子内水素結合を形成することが先行研究において示されていることから¹, 遊離の SQ-BA 色素と同様の過程 (前項を参照) で蛍光強度が低下したと推測した.

$\text{p}K_{\text{a-ester}}^{\text{Fru}}$ 値 (7.0~7.7) は, PBA エステルの文献値 (5.8~6.8)^{21,22} と比較的近い値を示した. SQ-BA 色素中のボロン酸構造は PBA そのものであり, この値は妥当なものと考えた. また, $\log K_{\text{Fru-D}}$ は, SQ-BA 色素のアルキル鎖長によらず同程度であった (2.4~2.5). この点に関しても, Fru と SQ-BA 色素系の結合は, 結合部位の分子構造は互いに全く同じものであり, 前段平衡の色素の会合体平衡以外は, ほぼ同じエネルギー論を有していることが予測されることから妥当であると考えた. $\text{p}K_{\text{a-ester}}^{\text{Fru}}$ と $\log K_{\text{Fru-D}}$ はアルキル鎖長によらず同程度であることから, SQ-BA 色素と Fru とのみかけの安定度は K_{agg} によってコントロールされていることが分かった.

3-5-2 Neu5Ac-(SQ-BA)₂ および Neu5Ac-SQ-BA 錯体の安定度定数の平衡解析

組成比 1:2 の Neu5Ac-(SQ-BA)₂ 錯体の錯形成平衡定数 $K_{\text{Neu5Ac-D}_2}$ (M^{-1}) および 1:1 Neu5Ac-SQ-BA 錯体の錯形成平衡定数 $K_{\text{Neu5Ac-D}}$ (M^{-1}) は Neu5Ac の濃度変化に対する蛍光強度から決定した。¹H-NMR の結果より、水溶液中では Neu5Ac-(SQ-BA)₂ および Neu5Ac-SQ-BA 錯体が混在していると予想されることから、全体の平衡反応は次のようになる。



ここで、 Neu5Ac-D_2 、 Neu5Ac-D_2^- 、 Neu5Ac-D および Neu5Ac-D^- は、 Neu5Ac-(SQ-BA)_2 錯体、 $\text{Neu5Ac-(SQ-BA)}_2\text{-OH}$ 錯体、 Neu5Ac-SQ-BA 錯体および Neu5Ac-SQ-BA-OH 錯体を示す。 $K_{\text{Neu5Ac-D}_2}$ と $K_{\text{Neu5Ac-D}}$ は次の式 4-22 および 4-23 で表せる。

$$K_{\text{Neu5Ac-D}_2} = \frac{[\text{Neu5Ac-D}_2]}{[\text{D}_2][\text{Neu5Ac}]} \tag{4-22}$$

$$K_{\text{Neu5Ac-D}} = \frac{[\text{Neu5Ac-D}]}{[\text{D}][\text{Neu5Ac}]} \tag{4-23}$$

Neu5Ac-D と Neu5Ac-(SQ-BA)_2 錯体の酸解離定数は、同じ官能基の反応 (Neu5Ac -ボロン酸結合) であることから等しいものとみなすことができる (実際に Fru-SQ-BA 錯体の酸解離定数 $K_{\text{a-ester}}^{\text{Fru}}$ は互いにほぼ同じ値をとる (表 4-3))。したがって、 Neu5Ac-SQ-BA 錯体の酸解離定数 $K_{\text{a-ester}}^{\text{Neu5Ac}}$ は次のように示すことができる。

$$K_{\text{a-ester}}^{\text{Neu5Ac}} = \frac{[\text{Neu5Ac-D}_2^-][\text{H}^+]}{[\text{Neu5Ac-D}_2]} = \frac{[\text{Neu5Ac-D}^-][\text{H}^+]}{[\text{Neu5Ac-D}]} \tag{4-24}$$

よって、観測される蛍光強度 I_{obs} は次のように示すことができる。

$$I_{\text{obs}} = \frac{[\text{D}_2]}{[\text{D}]_{\text{T}}} I_{\text{D}_2} + \frac{[\text{D}]}{[\text{D}]_{\text{T}}} I_{\text{D}} + \frac{[\text{Neu5Ac-D}_2]}{[\text{D}]_{\text{T}}} I_{\text{Neu5Ac-D}_2} + \frac{[\text{Neu5Ac-D}_2^-]}{[\text{D}]_{\text{T}}} I_{\text{Neu5Ac-D}_2^-} + \frac{[\text{Neu5Ac-D}]}{[\text{D}]_{\text{T}}} I_{\text{Neu5Ac-D}} + \frac{[\text{Neu5Ac-D}^-]}{[\text{D}]_{\text{T}}} I_{\text{Neu5Ac-D}^-} \tag{4-25}$$

ここで、 $I_{\text{Neu5Ac-D}_2}$ 、 $I_{\text{Neu5Ac-D}_2^-}$ 、 $I_{\text{Neu5Ac-D}}$ および $I_{\text{Neu5Ac-D}^-}$ は Neu5Ac-(SQ-BA)_2 錯体、 $\text{Neu5Ac-(SQ-BA)}_2\text{-OH}$ 錯体、 Neu5Ac-SQ-BA 錯体および Neu5Ac-SQ-BA-OH 錯体の蛍光強度を示す。一方、 SQ-BA の物質収支は式 4-26 で表される。

$$[D]_T = 2[D_2] + [D] + 2[Neu5Ac-D_2] + 2[Neu5Ac-D] + [Neu5Ac-D] + [Neu5Ac-D] \quad (4-26)$$

式 4-10, 4-22, 4-23, 4-24, 4-25 および 4-26 から式 4-27 を導く.

$$I_{obs} = \frac{K_{agg}[D]^2}{[D]_T} I_{D_2} + \frac{[D]}{[D]_T} I_D + \frac{K_{agg} K_{Neu5Ac-D_2} [Neu5Ac][D]^2}{[D]_T} I_{Neu5Ac-D_2} + \frac{K_{agg} K_{a-ester}^{Neu5Ac} K_{Neu5Ac-D_2} [Neu5Ac][D]^2}{[D]_T [H^+]} I_{Neu5Ac-D_2} \\ + \frac{K_{Neu5Ac-D} [Neu5Ac][D]}{[D]_T} I_{Neu5Ac-D} + \frac{K_{a-ester}^{Neu5Ac} K_{Neu5Ac-D} [Neu5Ac][D]}{[D]_T [H^+]} I_{Neu5Ac-D} \quad (4-27)$$

式 4-27 中の $[D]$ は,

$$[D] = \frac{-1 - K_{Neu5Ac-D} [Neu5Ac] - \frac{K_{a-ester}^{Neu5Ac} K_{Neu5Ac-D} [Neu5Ac]}{[H^+]} + \sqrt{\left(1 + K_{Neu5Ac-D} [Neu5Ac] + \frac{K_{a-ester}^{Neu5Ac} K_{Neu5Ac-D} [Neu5Ac]}{[H^+]}\right)^2 + 8K_{agg} \left(1 + K_{Neu5Ac-D_2} [Neu5Ac] + \frac{K_{a-ester}^{Neu5Ac} K_{Neu5Ac-D_2} [Neu5Ac]}{[H^+]}\right) [D]_T}}{4K_{agg} \left(1 + K_{Neu5Ac-D_2} [Neu5Ac] + \frac{K_{a-ester}^{Neu5Ac} K_{Neu5Ac-D_2} [Neu5Ac]}{[H^+]}\right)} \quad (4-28)$$

となる. I_{D_2} には 0 を, I_D には実験的に得られた 192 (SQ-BA2) および 121 (SQ-BA3) を, K_{agg} には $10^{6.7}$ (SQ-BA2) および $10^{5.9}$ (SQ-BA3) をそれぞれ用いた (本章 3-4 項参照). また, Neu5Ac-D 錯体は Fru-D 錯体と同じ官能基の反応 (ジオール-ボロン酸結合) であることから, $I_{Neu5Ac-D}$ および $I_{Neu5Ac-D}$ は, I_{Fru-D} および I_{Fru-D} とそれぞれ等しいとみなすことができ, $I_{Neu5Ac-D}$ は 293 (SQ-BA2) および 177 (SQ-BA3), $I_{Neu5Ac-D}$ は 513 (SQ-BA2) および 295 (SQ-BA3) を用いた (本章 3-5-1 項参照). 非線形最小二乗法を用いて式 4-27 を図 4-13 の結果にフィッティングすることで $K_{Neu5Ac-D_2}$ と $K_{Neu5Ac-D}$ および $K_{a-ester}^{Neu5Ac}$ を決定した. 実験結果と理論式 4-27 は $R^2 = 0.990 \sim 0.991$ でよく一致した (図 4-13). 一方, 1:1 錯体または 1:2 錯体のみ錯形成すると仮定した場合のフィッティング結果は, それぞれ $R^2 = 0.97 \sim 0.98$, $R^2 = 0.97 \sim 0.98$ となった. 1:1 錯体および 1:2 錯体が共存する場合の R^2 値は, 1:1 錯体または 1:2 錯体のみ錯形成すると仮定した場合より高く, 最も実験結果と一致していることから, SQ-BA 色素は Neu5Ac と 1:1 錯体および 1:2 錯体が形成していると結論付けた. 決定した結果を表 4-4 に示す.

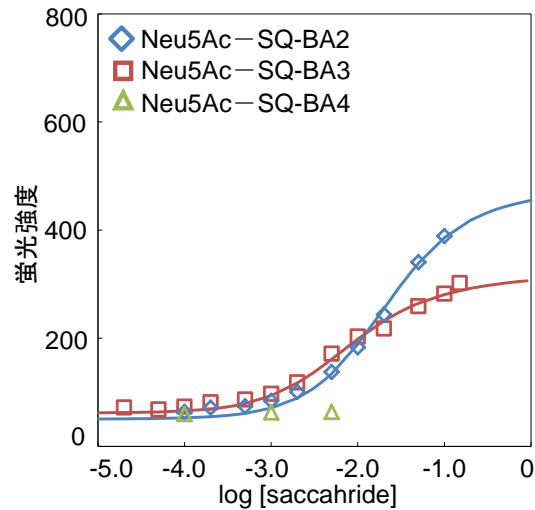


図 4-13 Neu5Ac 濃度変化による SQ-BA 色素の蛍光強度. 実線は式 4-27 の非最小二乗フィッティングである. [SQ-BA] = 1 μ M. SQ-BA2: [HEPES] = 10 mM, pH 7.76. SQ-BA3: [HEPES] = 10 mM, pH 7.50. SQ-BA4: [CHES] = 10 mM, pH 9.18.

表 4-4 フィッティングにより決定したパラメーター.

| | SQ-BA2 | SQ-BA3 | SQ-BA4 |
|--|-----------------|-----------------|----------------|
| R^2 | 0.990 | 0.991 | - ^a |
| $I_{\text{Neu5Ac-D2}}$ | 96 ± 2 | 64 ± 2 | - ^a |
| $I_{\text{Neu5Ac-D2-}}$ | 250 ± 10 | 176 ± 7 | - ^a |
| $\log K_{\text{Neu5Ac-D2}}$ | 0.96 ± 0.08 | 1.70 ± 0.07 | - ^a |
| $\log K_{\text{Neu5Ac-D}}$ | 0.3 ± 0.5 | 0.5 ± 0.5 | - ^a |
| $\text{p}K_{\text{a-ester}}^{\text{Neu5Ac}}$ | 7.0 ± 0.1 | 6.85 ± 0.08 | - ^a |

^a SQ-BA4 は Neu5Ac に対する蛍光強度の変化が小さすぎたため決定できなかった.

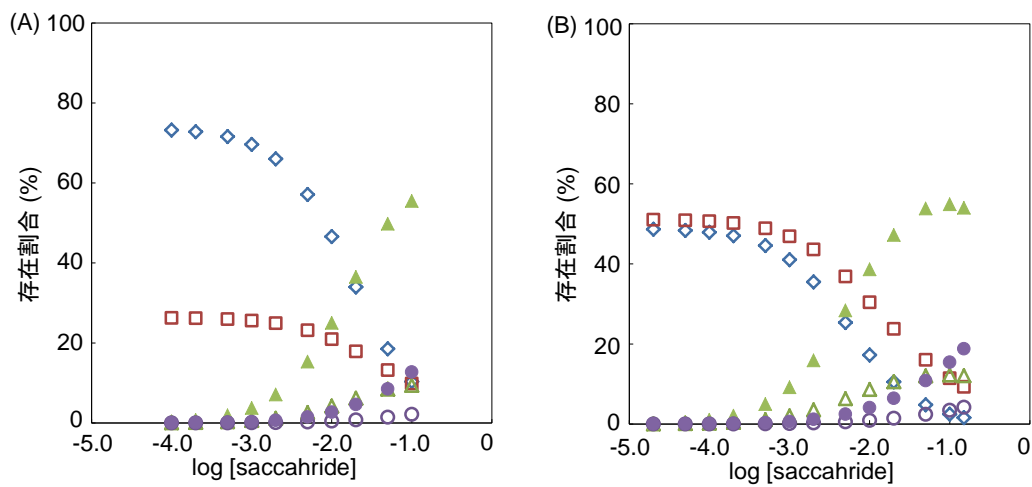


図 4-14 Neu5Ac 濃度変化による (A) SQ-BA2 および (B) SQ-BA3 化学種の存在割合. 実線は式 4-25 の非最小二乗フィッティングである. [SQ-BA] = 1 μ M. \diamond , [SQ-BA]₂; \square , [SQ-BA]; \circ , [Neu5Ac-SQ-BA]; \bullet , [Neu5Ac-SQ-BA-OH]; \triangle , [Neu5Ac-(SQ-BA)₂]; \blacktriangle , [Neu5Ac-(SQ-BA)₂-OH].

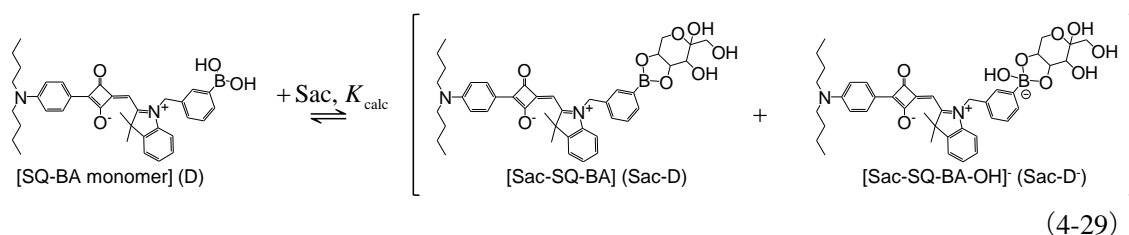
得られた $I_{\text{Neu5Ac-D2}}$ と $I_{\text{Neu5Ac-D2}}$ は, $\text{SQ-BA3} < \text{SQ-BA2}$ の序列となった. また, $I_{\text{Neu5Ac-D2}}$ は $I_{\text{Neu5Ac-D2}}$ の 40% であった. これについても, Fru-SQ-BA 錯体と同様の過程 (前項を参照) で蛍光強度が低下したと推測した.

得られた Neu5Ac-SQ-BA 錯体の $\text{p}K_{\text{a-ester}}$ 値は, PBA エステルの文献値 (5.8~6.8)^{21,22} と比較的近い値であった. この値も SQ-BA 色素中のボロン酸構造が PBA そのものであることから, 妥当なものと考えた. 1:1 の Neu5Ac-SQ-BA 錯体の安定度定数 $K_{\text{Neu5Ac-D}}$ は SQ-BA2 と 3 の両色素で同程度であった. これは, Neu5Ac と SQ-BA 色素の結合は, 結合部位の分子構造は互いに同じものであることから, 妥当なものと考えた. 1:2 Neu5Ac-(SQ-BA)₂ 錯体の安定度定数 $K_{\text{Neu5Ac-D2}}$ は 1:1 Neu5Ac-SQ-BA 錯体の安定度定数 $K_{\text{Neu5Ac-D}}$ より有意に大きかった. 1:2 錯体は Neu5Ac と SQ-BA 色素が 2 箇所結合し, Neu5Ac と 1 箇所結合する 1:1 の錯体よりも安定であると予測できることから, 妥当な結果である. また, SQ-BA 色素間で $K_{\text{Neu5Ac-D2}}$ を比較すると SQ-BA3 の $K_{\text{Neu5Ac-D2}}$ が SQ-BA2 よりも大きかった. これは, SQ-BA3 のアルキル鎖の疎水性は SQ-BA2 より小さく, 会合体を形成する 2 つの色素同士が横滑りしやすいため, より安定な Neu5Ac の認識場を形成したことに起因すると考察した.

さらに, これらの平衡定数から各 SQ-BA 化学種の存在割合を算出した. その結果を図 4-14 に示す. 1:1 錯体は, Neu5Ac 濃度が 10^{-3} M オーダーで形成し始めるのに対し, 1:2 錯体は, より低い Neu5Ac 濃度レベル (10^{-4} ~ 10^{-1} M) で錯形成が認められる. 1:2 錯体は Neu5Ac と 1:1 錯体より安定であることから, この結果は妥当である.

3-5-3 糖-SQ-BA 錯体の安定度定数と文献値との比較

ここまで決定した糖-SQ-BA 錯体の安定度定数を PBA およびビスボロン酸プローブの文献値^{3,14} と比較し, そのエネルギー論を議論するため, 本章 3-4 および 3-5 項で決定した K_{Sac} および $K_{\text{a-ester}}$ より比較可能なみかけ安定度定数 K_{calc} を算出した. 文献でしばしばみかけるボロン酸プローブと糖分子との反応式は次式で表され, この反応のみかけの安定度定数が求められている.



K_{calc} は次式で示すことができる.

$$K_{\text{calc}} = \frac{[\text{Sac-D}] + [\text{Sac-D}^-]}{[\text{D}][\text{Sac}]} = K_{\text{Sac}} \left(1 + \frac{K_{\text{a-ester}}}{[\text{H}^+]} \right) \quad (4-30)$$

よって, SQ-BA 色素系でもこのみかけの安定度を得られた平衡定数から計算することで, 他のボロン酸プローブの文献値と比較した (表 4-5).

表 4-5 糖-SQ-BA 錯体のみかけの安定度定数.

| | SQ-BA2 | SQ-BA3 | SQ-BA4 | PBA ^a | ビスボロン酸プローブ ^b |
|---|-------------|-----------|--------|------------------|-------------------------|
| log $K_{\text{calc,Fru-D}}$ (pH 7.4) | 2.88 ± 0.06 | 3.0 ± 0.1 | 2 ± 1 | 2.2 | - |
| log $K_{\text{calc,Neu5Ac-D}}$ (pH 7.4) | 0.8 ± 0.5 | 1.2 ± 0.5 | - | 1.3 | - |
| log $K_{\text{calc,Neu5Ac-D2}}$ (pH 6.2) | 1.0 ± 0.1 | 1.8 ± 0.1 | - | | 1.5 |

^a文献 20. ^b文献 3.

Fru-SQ-BA 錯体の $K_{\text{calc,Fru-D}}$ は, PBA の文献値より約 6 倍大きかった. これは, SQ-BA 錯体が糖-ボロン酸結合に加え, 先行研究にて報告されている SQ-BA 色素の SQ 構造の酸素原子-糖分子ヒドロキシル基間の分子内水素結合 (結合長 2.22Å, 結合角 162.1°)¹ によるものと考察した. また, 他の 1:1 糖-SQ-BA 錯体でも分子内水素結合を形成している可能性がある. 一方, 1:1 Neu5Ac-SQ-BA 錯体と 1:2 Neu5Ac-(SQ-BA)₂ 錯体の安定度定数 $K_{\text{calc,Neu5Ac-D}}$ および $K_{\text{calc,Neu5Ac-D2}}$ は, PBA およびビスボロン酸プローブの文献値とそれぞれ同程度であった. この結果から, 1:1 錯体および 1:2 錯体の平衡解析の妥当性が確認できるとともに, 1:1 錯体と 1:2 錯体の安定度の違いは, 1:1 糖-ボロン酸結合と 2 箇所の糖-ボロン酸結合に起因していることが確認された. 以上のように, 図 4-4 で示した単糖選択性の違いは, 糖-ボロン酸結合, 多点糖-ボロン酸結合だけではなく分子内水素結合によるものであると考察した.

3-6 多変量判別分析による尿中シアル酸の判別

本章 3-1 から 3-5 項の結果から, SQ-BA 群は様々な糖と反応し, 中でも SQ-BA2 と 3 はシアル酸と選択的に反応することが分かった. また, それらにより様々な蛍光応答パターンが得られることも明らかとなった (本章 3-1 項参照). このようなある一連の物質系に対する多様な蛍光応答は MDA にとって適切である. よって, これら SQ-BA 群を用いて, 複雑な組成を有する試料中の糖分子の分析に応用できる可能性がある. ここでは, その一例として尿試料中のシアル酸に対する MDA へと応用した. 尿試料の組成は表 4-6 に示すように, 非常に複雑である. 尿中のシアル酸分子の約 50% はシアロタンパク質として存在することから²⁸, 一般的には, シアロタンパク質を塩酸等で加水分解し, 遊離のシアル酸をラベル化し HPLC などの空間分離を用いて検出する²⁸. 本研究では, 第一章 4-1 項で記述したように, 尿試料に対する SQ-BA1-4 のそれぞれの蛍光増感率 ($E_{14} = I_{14}/I_0$) を線形結合し, 3 つの判別得点 F_{1-3} を得た. 得られた判別得点は, 各尿試料グループとのマハラノビスの距離により最も近いグループへ帰属した (第一章式 1-15).

表 4-6 ヒト尿試料の主な組成²³⁻²⁸.

| | /mM | | /mM |
|---------------|-------|--------------------|------------|
| Sodium | 150 | Alanine | 0.05 |
| Potassium | 24 | Methionine | 0.03 |
| Urea | 180 | Isoleucine | 0.1 |
| Creatinine | 5.3 | Tyrosine | 0.03 |
| Phosphate | 11.6 | Phenylalanine | 0.04 |
| Calcium | 2 | Lysine | 0.2 |
| Urate | 0.3 | Arginine | 0.1 |
| Iron | 0.007 | Ribose | 0.02 |
| Lactate | 0.9 | Fructose | 0.04 |
| Ammonia | 20.3 | Arabinose | 0.2 |
| Citric acid | 0.98 | Galactose | 0.1 |
| Serine | 0.02 | Xylose | 0.1 |
| Glutamic acid | 0.01 | Glucose | 0.4 |
| Proline | 0.02 | Sialic acid | 0.3 |
| Glycine | 0.09 | | |

3-6-1 尿試料の蛍光応答

尿試料中にはタンパク質や脂質が共存する。そのため、これらは SQ-BA 色素と疎水性相相互作用により結合し、糖分子と SQ-BA 色素の結合を妨害することが予備実験から分かった（データは不記載）。そこで、それらの疎水性の妨害物質を除去するための尿試料の前処理条件の検討を行った。尿試料は、0.1 M HCl を添加しシアロタンパク質の加水分解を行い、その後、限外ろ過フィルター（10K, PALL Corporation）を用いて除タンパク質を行った。尿試料として 27 歳男性の尿を用い、Neu5Ac 2 mM を添加した尿試料に SQ-BA 色素を添加した際の蛍光強度を図 4-15 に示す。

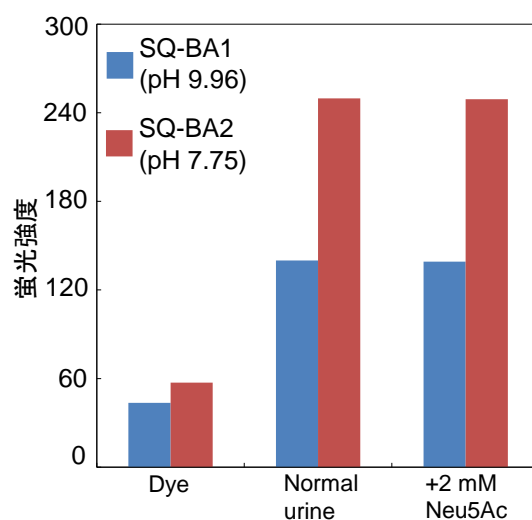


図 4-15 27 歳男性から採取した尿試料を添加した際の SQ-BA 水溶液の蛍光強度。[SQ-BA] = 1 μ M. SQ-BA1: [carbonate] = 10 mM, pH 9.96. SQ-BA2: [HEPES] = 10 mM, pH 7.75.

尿試料を添加した場合、SQ-BA2 の蛍光強度は、4 倍以上に増大した。この蛍光増感は予想される糖分子由来の増感（1.2 倍程度）よりも非常に大きく、Neu5Ac 由来のシグナルの増感を読み取ることができなかった。これは、シアロタンパク質の加水分解後に用いた限界濾過フィルターで除去しきれなかった低分子量ペプチドや脂質と疎水性相互作用によって SQ-BA が結合してしまったためと考察した。そこで、C18 カラムカートリッジによるフィルタリングで尿中の大部分の疎水性化合物除去することにした。尿試料は 5 人の健常者（21 歳男性、2 名の 22 歳女性、23 歳男性、27 歳男性）から得た。また、シアル酸尿症の一つであるサラ病（SD）を想定し Neu5Ac 2 mM を添加した尿試料および幼児性シアル酸蓄積症（ISSD）を想定し Neu5Ac を 6 および 20 mM を添加した尿試料を調製した。例として、23 歳男性から採取した尿およびそれぞれの濃度の Neu5Ac を添加した尿試料を添加した際の SQ-BA の蛍光強度を図 4-16 に示す。

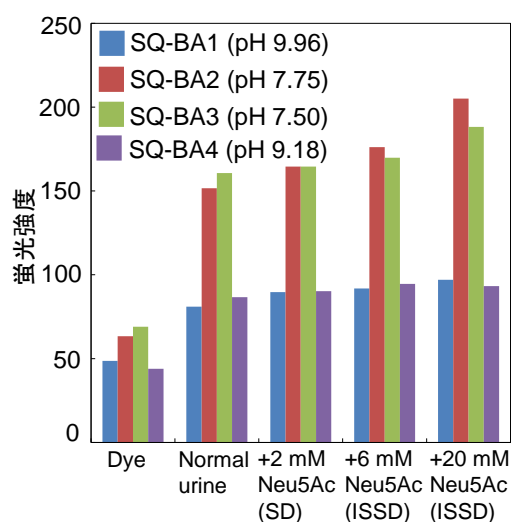


図 4-16 23 歳男性から採取した尿試料を添加した際の SQ-BA 水溶液の蛍光強度。[SQ-BA] = 1 μ M. SQ-BA1: [carbonate] = 10 mM, pH 9.96. SQ-BA2: [HEPES] = 10 mM, pH 7.75. SQ-BA3: [HEPES] = 10 mM, pH 7.50. SQ-BA4: [CHES] = 10 mM, pH 9.18.

シアル酸に対する蛍光応答は、健常尿（シアル酸低濃度 \sim 0.3 mM）の場合、SQ-BA3 の蛍光強度が SQ-BA2 より大きくなったが、シアル酸濃度が増大するとともに SQ-BA2 の蛍光強度が SQ-BA3 の蛍光強度より大きくなり、序列が逆転した。一方、シアル酸と蛍光応答しない SQ-BA1 と 4 の蛍光強度はほぼ一定となった（図 4-16）。これは、SQ-BA2 と 3 が Neu5Ac に対し特異的な応答を示すのに対して、SQ-BA1 と 4 は応答を示さず、他の様々な単糖分子による影響は、SQ-BA1 と 4 による蛍光応答で相殺できる可能性を示している。

3-6-2 尿中シアル酸の判別分析

前項で、尿試料中の Neu5Ac のシグナルの増感の検出に成功したことから、ここでは、各々の尿試料を用いて MDA を行った。MDA により次の 3 つの判別得点を得た ($F_1 = -3.9131E_1 + 19.1705E_2 - 12.9776E_3 - 5.1268E_4 - 3.0391$, $F_2 = -5.7413E_1 + 2.8093E_2 - 3.4918E_3 + 5.318E_4 - 0.4223$, $F_3 = -2.8639E_1 - 0.9163E_2 + 3.2741E_3 - 0.0411E_4 + 0.2875$) (表 4-7)。そのうち判別の寄与率が高い F_1 (99.7%) と F_2 (0.2%) を用いて二次元化した結果を図 4-17 に示す。

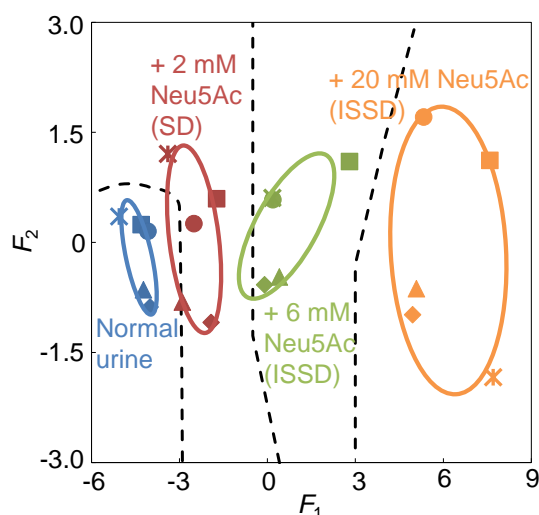


図 4-17 MDA から得た蛍光応答パターンの判別得点プロット。楕円：90%の信頼限界。▲, 21歳男性; ■と●, 22歳女性; ◆, 23歳弾男性; *, 27歳男性。破線：各尿試料の境界線。

F_1 と F_2 を用いて二次元化したところ、Neu5Ac 濃度ごとに 4 つのグループに分離された。図中の実線の楕円は、グループ内の 90%の信頼限界を示しており、各プロットが楕円付近および楕円内に位置することからこの MDA の妥当性が確認できる。また、図中の破線は各尿試料グループの境界線であり、すべてのプロットがそれぞれの Neu5Ac 濃度の尿試料グループ領域に位置していることから、SD レベルの濃度の Neu5Ac を含め、すべての尿試料の判別に成功した。この MDA の精度は、簡易・半定量的なスクリーニング法として利用可能なレベルである。

3-6-3 MDA の精度に関する考察

各々の SQ-BA 色素の MDA 精度への寄与を考察するため、SQ-BA1-4 すべてを用いるのではなく、3 種の SQ-BA のみの MDA (どれか一つの SQ-BA のデータを除く) を行った。例として、シアル酸に対し蛍光応答を示し、判別に大きく寄与すると予測される SQ-BA2 または 3 以外の 3 種の SQ-BA を用いた場合の MDA 結果を図 4-18 に示す。

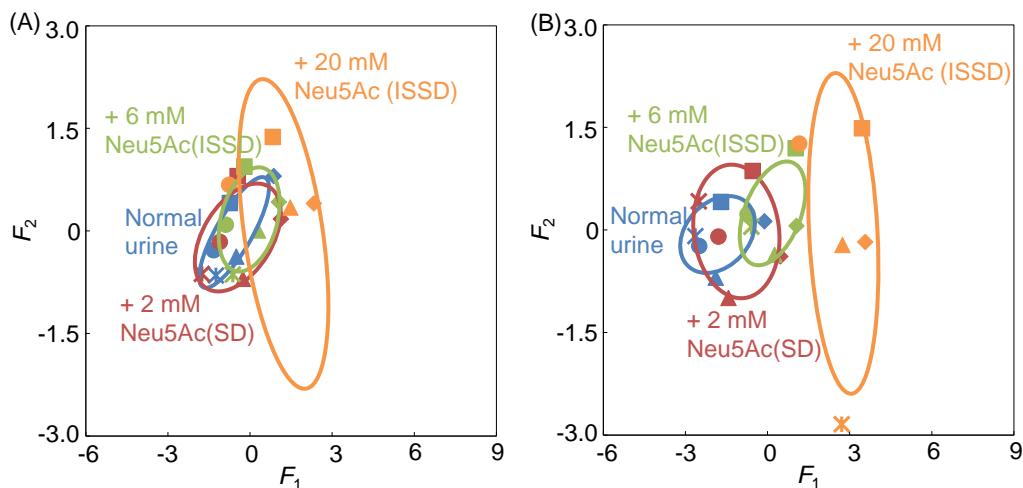


図 4-18 3 種の SQ-BA MDA から得た蛍光応答パターンを判別得点プロット. 楕円: 90% の信頼限界. ▲, 21 歳男性; ■と●, 22 歳女性; ◆, 23 歳弾性; *, 27 歳男性. (A) SQ-BA1, 3, および 4 を用いる MDA. (B) SQ-BA1, 2 および 4 を用いる MDA

SQ-BA2 以外の 3 種の SQ-BA を用いた場合の判別得点および判別結果を表 4-8 に示す. その結果, 20 試料中 10 試料を誤判別した. また, SQ-BA3 以外の 3 種の SQ-BA を用いた場合も 20 試料中 9 試料を誤判別した (表 4-9). SQ-BA2 または SQ-BA3 を除いた場合の判別結果を比較すると, SQ-BA2 を除いた場合の方が 4 つの尿試料グループの重なりが大きいことから, SQ-BA2 はすべてのグループの判別に大きく寄与していると考えられる (図 4-18). 一方, SQ-BA3 を除いた場合, 健常者と 2 mM および 6 mM を添加した尿試料グループの重なりが大きいのが 20 mM を添加した尿試料グループとは重なりが小さいことから, SQ-BA3 は, 比較的 Neu5Ac が低濃度のグループの判別に寄与していると考えられる. これは, SQ-BA3 と Neu5Ac との安定度定数が SQ-BA2 よりも大きく僅かに検出感度が良いことに起因していると考えた. さらに, SQ-BA4 を除いた場合には 2 試料の誤判別, SQ-BA1 を除いた場合, 誤判別はなかったが 90% の信頼限界からはずれるプロットが増大し分離精度の低下が確認された. 以上のように 3 種の SQ-BA のみの MDA ではグループ内の分散や誤判別数が増大したことから, 4 種すべてを適用することで, 現在得られる最大の判別精度を得ていることが分かった.

4 結言

生体試料中のシアル酸の MDA に適する (様々な単糖に対し様々な応答を示し, 特にシアル酸に特異的な応答を示す) SQ-BA 色素群を色素のシアニン基に修飾したアルキル鎖長を変えることで分子設計した. これは, J-会合体形成による多点相互作用に基づくシアル酸に対して特異的な認識場を形成させることによる. すなわち, SQ-BA 骨格中のアルキル鎖長を変化させ, 剛健な H-会合体と横滑りした J-会合体の形成をそれぞれ制御し, シアル酸を認識する会合体と認識しない会合体をそれぞれ得ることに成功した. これによりシアル酸に対し様々な蛍光応答パターンを得ることができた. このような応答をする 4 種の SQ-BA

色素をシアル酸にする MDA に応用し、健常者の 10 倍のシアル酸濃度を示す疾病の模擬試料を判別することに成功した。一般的にシアル酸は、シアロ糖鎖を加水分解後、ラベル化し HPLC や CE を用いて分離分析しているが、本法は、このような空間分離を用いる必要がなく、単純な操作で複雑な混合系からシアル酸を判別可能であることから、簡易・迅速なスクリーニング法として有効であるといえる。以上のように、糖分子の認識部位であるボロン酸基を直接化学修飾するのではなく、ボロン酸基と離れた位置にあるアルキル鎖長を変化させることで、会合体状態を制御し、認識場の形状を“ソフト”に変化させた化学ライブラリーの初めての例である。今後、会合体形状を制御し、認識場を変化させるアプローチは、糖鎖認識にも適用可能な概念であり、様々な応答パターンを利用するアプローチと組み合わせることで、生体試料中の糖鎖にも応用が期待できる。

表 4-7 SQ-BA1-4 を利用するヒト尿試料の MDA 結果.

| Sample | F_1^a | F_2^a | F_3^a | Discrimination | True/False |
|---|---------|---------|---------|--------------------------|------------|
| Normal urine (23 years-old male) | -3.9955 | -0.8808 | 0.8676 | Normal urine | True |
| Normal urine (22 years-old female A) | -4.3041 | 0.2432 | 0.232 | Normal urine | True |
| Normal urine (21 years-old male) | -4.2281 | -0.6445 | 0.376 | Normal urine | True |
| Normal urine (22 years-old female B) | -4.075 | 0.1529 | 0.1885 | Normal urine | True |
| Normal urine (27 years-old male) | -5.0567 | 0.3546 | -1.2687 | Normal urine | True |
| + 2 mM Neu5Ac (23 years-old male) | -1.9206 | -1.0899 | 0.3531 | + 2 mM Neu5Ac (SD) | True |
| + 2 mM Neu5Ac (22 years-old female A) | -1.728 | 0.5954 | 0.4019 | + 2 mM Neu5Ac (SD) | True |
| + 2 mM Neu5Ac (21 years-old male) | -2.9017 | -0.8117 | 0.1222 | + 2 mM Neu5Ac (SD) | True |
| + 2 mM Neu5Ac (22 years-old female B) | -2.5073 | 0.2556 | 0.2349 | + 2 mM Neu5Ac (SD) | True |
| + 2 mM Neu5Ac (27 years-old male) | -3.394 | 1.2063 | -1.7909 | + 2 mM Neu5Ac (SD) | True |
| + 6 mM Neu5Ac (23 years-old male) | -0.0976 | -0.577 | 0.3 | + 6 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 6 mM Neu5Ac (22 years-old female A) | 2.8005 | 1.1026 | 0.385 | + 6 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 6 mM Neu5Ac (21 years-old male) | 0.4076 | -0.4718 | 0.6547 | + 6 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 6 mM Neu5Ac (22 years-old female B) | 0.1843 | 0.5822 | 0.3528 | + 6 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 6 mM Neu5Ac (27 years-old male) | 0.1674 | 0.6079 | -1.3771 | + 6 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 20 mM Neu5Ac (23 years-old male) | 4.9511 | -0.985 | 0.4523 | + 20 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 20 mM Neu5Ac (22 years-old female A) | 7.5843 | 1.1196 | 0.7439 | + 20 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 20 mM Neu5Ac (21 years-old male) | 5.0809 | -0.6301 | 0.9658 | + 20 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 20 mM Neu5Ac (22 years-old female B) | 5.3319 | 1.7077 | 0.1682 | + 20 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 20 mM Neu5Ac (27 years-old male) | 7.7006 | -1.837 | -2.3622 | + 20 mM Neu5Ac (ISSD) | True |

^a $F_1 = -3.9131E_1 + 19.1705E_2 - 12.9776E_3 - 5.1268E_4 - 3.0391$, $F_2 = -5.7413E_1 + 2.8093E_2 - 3.4918E_3 + 5.318E_4 - 0.4223$, $F_3 = -2.8639E_1 - 0.9163E_2 + 3.2741E_3 - 0.0411E_4 + 0.2875$

表 4-8 SQ-BA1, 3, 4 を利用するヒト尿試料の MDA 結果.

| Sample | F_1^a | F_2^a | F_3^a | Discrimination | True/False |
|---|---------|---------|---------|--------------------------|------------|
| Normal urine (23 years-old male) | 0.8696 | 0.7997 | 0.3814 | + 20 mM Neu5Ac (ISSD) | False |
| Normal urine (22 years-old female A) | -0.7393 | 0.4081 | 0.1892 | Normal urine | True |
| Normal urine (21 years-old male) | -0.5032 | -0.3743 | -1.1509 | Normal urine | True |
| Normal urine (22 years-old female B) | -1.3332 | -0.2822 | -1.0976 | Normal urine | True |
| Normal urine (27 years-old male) | -1.2467 | -0.6511 | 1.2189 | + 2 mM Neu5Ac (SD) | False |
| + 2 mM Neu5Ac (23 years-old male) | 1.1261 | 0.1753 | 0.35 | + 20 mM Neu5Ac (ISSD) | False |
| + 2 mM Neu5Ac (22 years-old female A) | -0.4482 | 0.8018 | 0.3819 | + 6 mM Neu5Ac (ISSD) | False |
| + 2 mM Neu5Ac (21 years-old male) | -0.2594 | -0.7003 | -1.1606 | Normal urine | False |
| + 2 mM Neu5Ac (22 years-old female B) | -1.1018 | -0.1608 | -1.0238 | Normal urine | False |
| + 2 mM Neu5Ac (27 years-old male) | -1.7597 | -0.6289 | 1.8229 | + 2 mM Neu5Ac (SD) | True |
| + 6 mM Neu5Ac (23 years-old male) | 1.0522 | 0.4234 | 0.6234 | + 20 mM Neu5Ac (ISSD) | False |
| + 6 mM Neu5Ac (22 years-old female A) | -0.205 | 0.9431 | 0.3447 | + 6 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 6 mM Neu5Ac (21 years-old male) | 0.2918 | 0.0063 | -1.1094 | + 6 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 6 mM Neu5Ac (22 years-old female B) | -0.8833 | 0.0914 | -0.9945 | Normal urine | False |
| + 6 mM Neu5Ac (27 years-old male) | -0.6271 | -0.6366 | 1.2924 | + 2 mM Neu5Ac (SD) | False |
| + 20 mM Neu5Ac (23 years-old male) | 2.3301 | 0.4023 | 0.5053 | + 20 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 20 mM Neu5Ac (22 years-old female A) | 0.8315 | 1.3743 | 0.4218 | + 20 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 20 mM Neu5Ac (21 years-old male) | 1.4713 | 0.3431 | -1.0019 | + 20 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 20 mM Neu5Ac (22 years-old female B) | -0.7645 | 0.6751 | -0.1669 | Normal urine | False |
| + 20 mM Neu5Ac (27 years-old male) | 1.8987 | -3.0099 | 0.1737 | + 20 mM Neu5Ac (ISSD) | True |

$$^a F_1 = 2.4064E_1+3.3533E_3-4.4141E_4-2.2249, F_2 = -5.799E_1+2.5698E_3+3.2023E_4-1.8531 F_3 = -1.7949E_1+0.6094E_3+3.11195E_4-4.2087$$

表 4-9 SQ-BA1, 2, 4 を利用するヒト尿試料の MDA 結果.

| Sample | F_1^a | F_2^a | F_3^a | Discrimination | True/False |
|---|---------|---------|---------|--------------------------|------------|
| Normal urine (23 years-old male) | -0.114 | 0.1257 | 0.182 | + 6 mM Neu5Ac (ISSD) | False |
| Normal urine (22 years-old female A) | -1.6981 | 0.411 | 0.0776 | Normal urine | True |
| Normal urine (21 years-old male) | -1.8937 | -0.6974 | -1.0021 | Normal urine | True |
| Normal urine (22 years-old female B) | -2.4963 | -0.2341 | -0.9886 | Normal urine | True |
| Normal urine (27 years-old male) | -2.6395 | -0.0909 | 1.3471 | Normal urine | True |
| + 2 mM Neu5Ac (23 years-old male) | 0.4679 | -0.3865 | 0.3147 | + 6 mM Neu5Ac (ISSD) | False |
| + 2 mM Neu5Ac (22 years-old female A) | -0.5413 | 0.8611 | 0.1538 | + 6 mM Neu5Ac (ISSD) | False |
| + 2 mM Neu5Ac (21 years-old male) | -1.4276 | -0.9932 | -0.9256 | Normal urine | False |
| + 2 mM Neu5Ac (22 years-old female B) | -1.7954 | -0.0972 | -0.9518 | Normal urine | False |
| + 2 mM Neu5Ac (27 years-old male) | -2.5156 | 0.4194 | 1.9096 | Normal urine | False |
| + 6 mM Neu5Ac (23 years-old male) | 1.0561 | 0.0603 | 0.5044 | + 6 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 6 mM Neu5Ac (22 years-old female A) | 1.0308 | 1.1963 | 0.0679 | + 6 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 6 mM Neu5Ac (21 years-old male) | 0.2624 | -0.3654 | -1.0679 | + 6 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 6 mM Neu5Ac (22 years-old female B) | -0.7325 | 0.2291 | -0.9969 | + 2 mM Neu5Ac (SD) | False |
| + 6 mM Neu5Ac (27 years-old male) | -0.5905 | 0.0486 | 1.4049 | + 2 mM Neu5Ac (SD) | False |
| + 20 mM Neu5Ac (23 years-old male) | 3.5677 | -0.1757 | 0.3978 | + 20 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 20 mM Neu5Ac (22 years-old female A) | 3.4519 | 1.4875 | 0.0262 | + 20 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 20 mM Neu5Ac (21 years-old male) | 2.737 | -0.2187 | -1.0526 | + 20 mM Neu5Ac (ISSD) | True |
| + 20 mM Neu5Ac (22 years-old female B) | 1.1605 | 1.2613 | -0.3713 | + 6 mM Neu5Ac (ISSD) | False |
| + 20 mM Neu5Ac (27 years-old male) | 2.7102 | -2.8414 | 0.9708 | + 20 mM Neu5Ac (ISSD) | True |

$$^a F_1 = -1.4777E_1+5.5944E_2-3.6699E_4-3.7988, F_2 = -6.8117E_1+1.3829E_2-5.0958E_4-1.909, F_3 = -0.1343E_1-0.0681E_2+2.1041E_4-3.5857$$

5 参考文献

- 1) S. Saito, T. L. Massie, T. Maeda, H. Nakazumi, C. L. Colyer, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 2452–2458.
- 2) S. Saito, T. L. Massie, T. Maeda, H. Nakazumi, C. L. Colyer, *Sensors* **2012**, 12, 5420-5431.
- 3) S. M. Levonis, M. J. Kiefel, T. A. Houston, *Chem. Commun.* **2009**, 2278.
- 4) B. Kukrer, E. U. Akkaya, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 9125–9128.
- 5) M. Ohno, Y. Yamamoto, Y. Shirasaki, S. Eguchi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1993**, 1, 263–271.
- 6) G. Cerichelli, G. Mancini, L. Luchetti, *Tetrahedron* **1994**, 50, 3798–3799.
- 7) E. Arunkumar, P. Chithra, A. Ajayaghosh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 6590–6598.
- 8) K. Fukuda, H. Nakahara, *Colloids Surf., A* **1995**, 102, 57–68.
- 9) College Analysis, URL: <http://www.heisei-u.ac.jp/ba/fukui/analysis.html>.
- 10) K. Fukuda, H. Nakahara, *Colloids Surf., A* **1995**, 102, 57–68.
- 11) H. Chen, M. S. Farahat, K.-Y. Law, D. G. Whitten, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2584-2594.
- 12) 水口仁, 日本写真学会誌, 2007, 70, 268–277.
- 13) K. Kano, H. Minamizono, T. Kitae, S. Negi, *J. Phys. Chem. A*, **1997**, 101, 6118–6124.
- 14) K. Kano, K. Fukuda, H. Wakami, R. Nishiyabu, R. F. Pasternack, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7494–7502.
- 15) S. R. LaPlante, R. Carson, J. Gillard, N. Aubry, R. Coulombe, S. Bordeleau, P. Bonneau, M. Little, J. O'Meara, P. L. Beaulieu, *J. Med. Chem.*, **2013**, 56, 5142–5150.
- 16) H. S. Mader, O. S. Wolfbeis, *Microchimica Acta*, **2008**, 162, 1–34.
- 17) X. Wu, Z. Li, X.-X. Chen, J. S. Fossey, T. D. Jamesc, Y.-B. Jiang, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 8032–8048.
- 18) J. A. Peters, *Coord. Chem. Rev.* **2014**, 268, 1–22.
- 19) L.I. Boscha, T.M. Fylesb, T.D. James, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 11175–11190.
- 20) Springsteen, G.; Wang, B. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 5291–5300.
- 21) N. DiCesare, M. R. Pinto, K. S. Schanze, J.R. Lakowicz, *Langmuir* **2002**, 18, 7785–7787.
- 22) X. Gao, Y. Zhang, B. Wang, *Tetrahedron* **2005**, 61, 9111–9117.
- 23) R. L. Jolley, M. L. Freeman, *Clinical Chemistry*, **1968**, 14, 538-547.
- 24) D. S. Young, Agathe J. Jackson, *Clinical Chemistry*, **1970**, 16, 954-959.
- 25) John C. McIntosh, *Clinica Chimica Acta*, **1984**, 143, 169-172.
- 26) T. Kawasaki, H. Akanuma, T. Yamanouchi, *DIABETES CARE*, **2002**, 25, 353-357.
- 27) K. Hayakawa, C. De Felice, T. Watanabe, T. Tanaka, K. Iinuma, K. Nihei, S. Higuchi, T. Ezoe, I. Hibi, K. Kurosawa, *J. Chromatogr.* **1993**, 620, 25-31.
- 28) P. Sillanaukee, M. Pönniö, I.P. Jääskeläinen, *Eur.J. Clin. Invest.* **1999**, 299, 413–425.

第五章 総括と展望

本研究は、分子認識場を精密に制御し、これまで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の認識プローブを与えることに成功した。

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。これまで、水素結合や共有結合などを利用するプローブが開発されているが、水溶液中で Neu5Ac 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。本章では、A) 残余配位座を有する Ln^{3+} 錯体の配位結合および B) アルキル鎖長を変化させ SQ-BA 会合体の形状を制御すること、の 2 つの分子論的アプローチから、シアル酸の分子認識場を形成させることを着想について述べた。

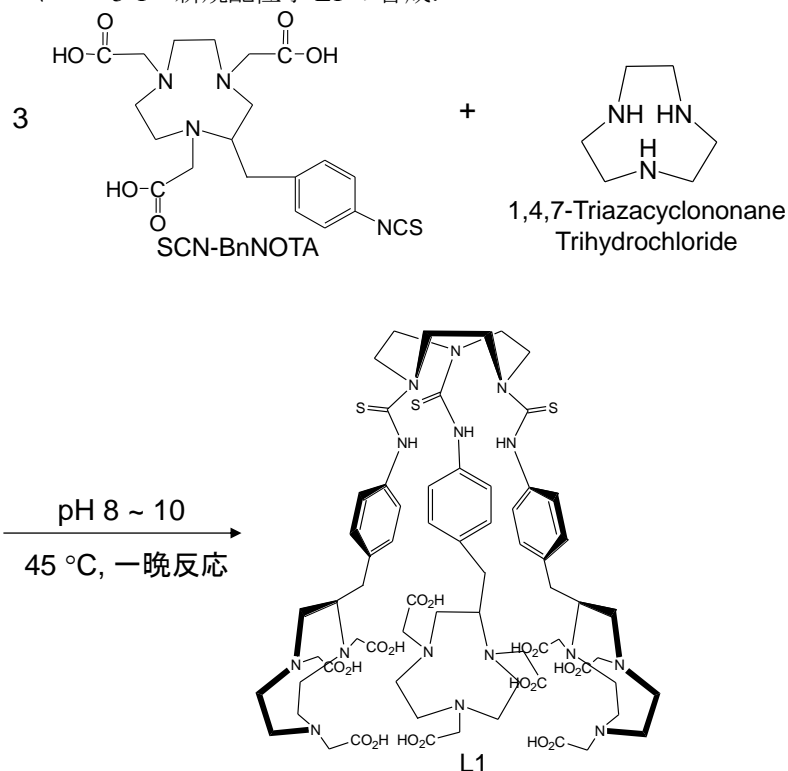
第二章では、3 種類の大環状ポリアミノカルボン酸配位子 (ABNOTA, ABDO3A および ABPCTA) の Ln 錯体を用いてシアル酸認識能の調査を行った。特に、6 座大環状ポリアミノカルボン酸である Ln^{3+} -ABNOTA 錯体はシアル酸に対し従来にはない高い熱力学的安定性と選択性を示すことを見出した。 Ln^{3+} -ABNOTA 錯体を用いた場合、シアル酸の検出限界と定量限界が、健常者の血清シアル酸濃度より低濃度な高感度検出系を与え、 Ln^{3+} -ABNOTA 系が血清のような実サンプルに適用できる可能性を示した。

第三章では、特にシアル酸の認識能が高かった Ln^{3+} -ABNOTA 錯体のシアル酸認識機構の解明を行った。この特異的認識能は、中心金属の第一配位圏での Neu5Ac 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 Ln^{3+} 錯体の配位水の酸解離によって生じたヒドロキシ基と Neu5Ac 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ユニークなものであり、従来にはない認識機構である。

第四章では、もう一つのシアル酸認識のアプローチとして、異なるアルキル修飾鎖を有する SQ-BA 色素群を開発し、その特異な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 分子中のシアニン基に修飾する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、ヒト尿試料中のシアル酸の MDA に適する系を構築した。4 種類の SQ-BA 色素を用いることで、健常者 (シアル酸濃度 ~ 0.3 mM) とシアル酸蓄積症 (シアル酸濃度 2 mM 以上) を想定した異常尿を判別に成功した。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得た化学ライブラリーという意味で新規性のあるアプローチである。一方で、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判別分析に初めて成功したという点は非常に有意義である。

今後の展望として、シアル酸認識機能を持つ Ln^{3+} 錯体を用いて、高度な糖鎖認識分子を開発することを考えている。より発展的な糖鎖認識分子素子として、 Ln^{3+} 錯体の複核化を考えている。第一章 2 項で述べたように、生体中での糖鎖認識は、複数の結合や分子集合体を形成することによって行われており、糖鎖と糖認識タンパク質間の多点 - 多点相互作用により安定度定数を高めていることが知られている。シアル酸認識ユニットとしての Ln^{3+} 錯体を複核化することにより糖鎖との多点相互作用を持ち込むことを考えている。具体的には、ABNOTA 錯体をベースとする L1 錯体をすでに分子設計・合成している（スキーム 5-1）。

スキーム 5-1 新規配位子 L1 の合成.



L1 は、四つの Ln^{3+} イオンと結合可能なことから、糖分子や糖鎖と Ln^{3+} -L1 錯体との多点相互作用が生じることが期待できる。また、中心の NOTA 骨格の Ln イオンとの錯形成に伴い、3 つのペンダント ABNOTA 骨格同士の分子内距離が接近することで、 Ln^{3+} -NOTA 錯体の認識に加え、3 つのベンゼン環による疎水場に基づく相互作用も与えることができ、糖分子および糖鎖との熱力学的安定性の向上が期待できると考えている（図 5-1）。

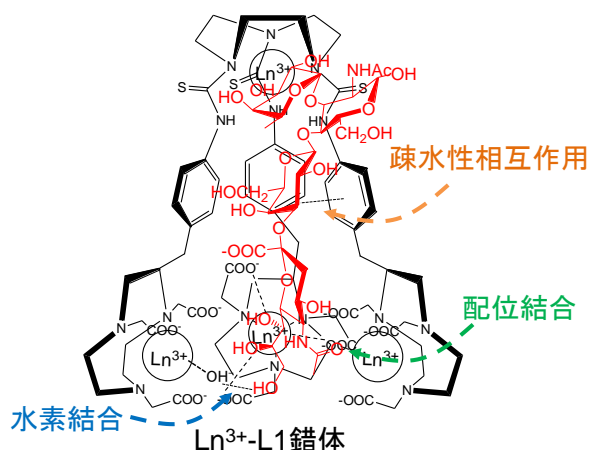


図 5-1 Ln³⁺-L1 錯体と sLex の相互作用の推定図.

現在の進行状況としては、L1 の粗生成物の合成に成功している (L1 の収率: 42%, ESI-MS にて同定). この粗生成物を用いて、L1 錯体のシアル酸認識能を予備的に調査した. Tb³⁺-L1 錯体の発光スペクトルを図 5-2 に示す.

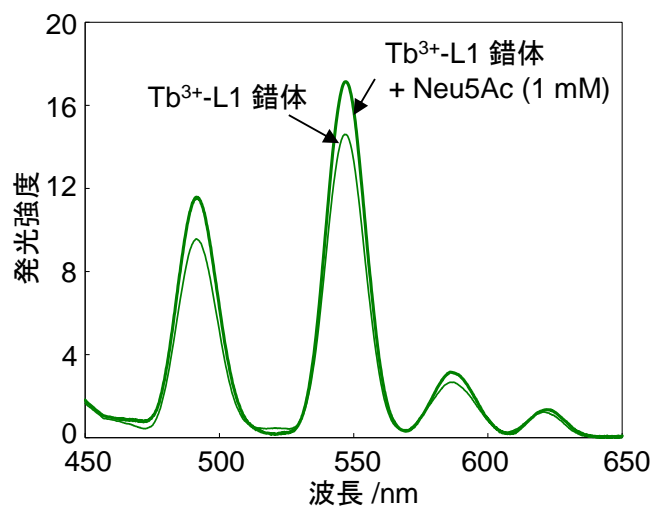


図 5-2 Tb³⁺-L1 錯体の発光スペクトル. [Tb³⁺-L1] = 2.0 × 10⁻⁵ M, pH 7.52.

その結果、Tb³⁺-L1 錯体では、興味深いことに従来の Ln³⁺-ABNOTA 錯体では観測されなかった中性 pH (7.52) での Neu5Ac に対する発光増感が観測された (約 20%). これは、Tb³⁺-L1 錯体の多点相互作用によって中性 pH でも Neu5Ac との熱力学的安定性が増大したためであると考察した. このように、Tb³⁺-L1 錯体によりシアル酸認識能の向上が確認できたことから、今後は、L1 を精製し、より詳細に糖分子の認識能について調査を行う予定である.

以上のように、従来のアプローチに加え、さらに種々の相互作用を取り入れることによりシアル糖鎖の認識場を精密に制御するという新たな挑戦に発展している. これらは将来、

糖鎖認識モチーフとしての高度な分子認識のみならず診断試薬としての応用も期待できる。

また、SQ-BA系では、高度なMDA用化学ライブラリーの開発を考えている。1つは、第四章で開発したような様々なアルキル鎖長を有する色素と異なる末端構造を有するSQ-BA色素を考えている。末端構造を変化させ従来と異なる会合体構造により、シアル酸以外の単糖用の化学ライブラリーの開発を目指す。具体的には、ビス(2-エトキシエチル)アミノ基、ビスブチルカルバミン酸エチルアミノ基およびジュロリジン構造を有するSQ-BA色素を設計している(図5-3)。

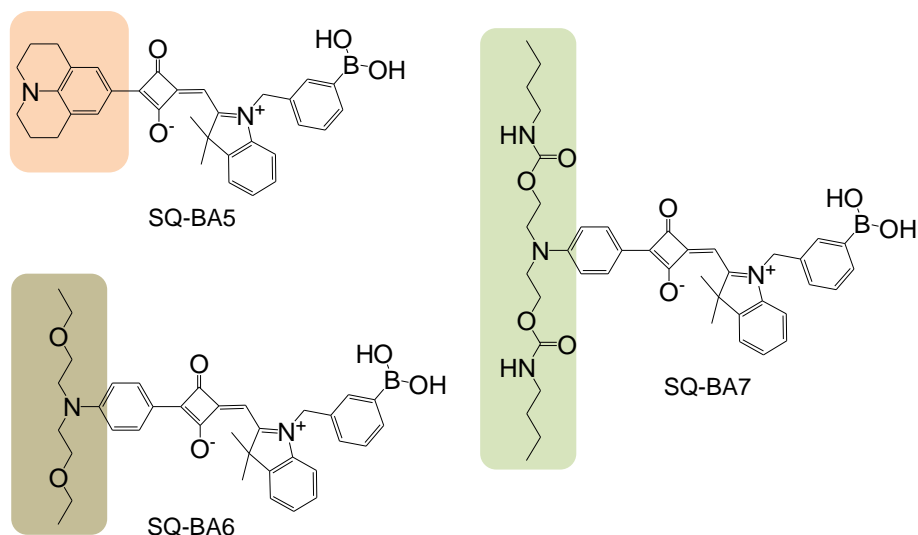


図 5-3 新規 SQ-BA 色素の化学構造.

もう一つは、ボロン酸基を2つ有するSQDBA色素を新たに設計し、多糖用のライブラリーの開発を目指す(図5-4)。

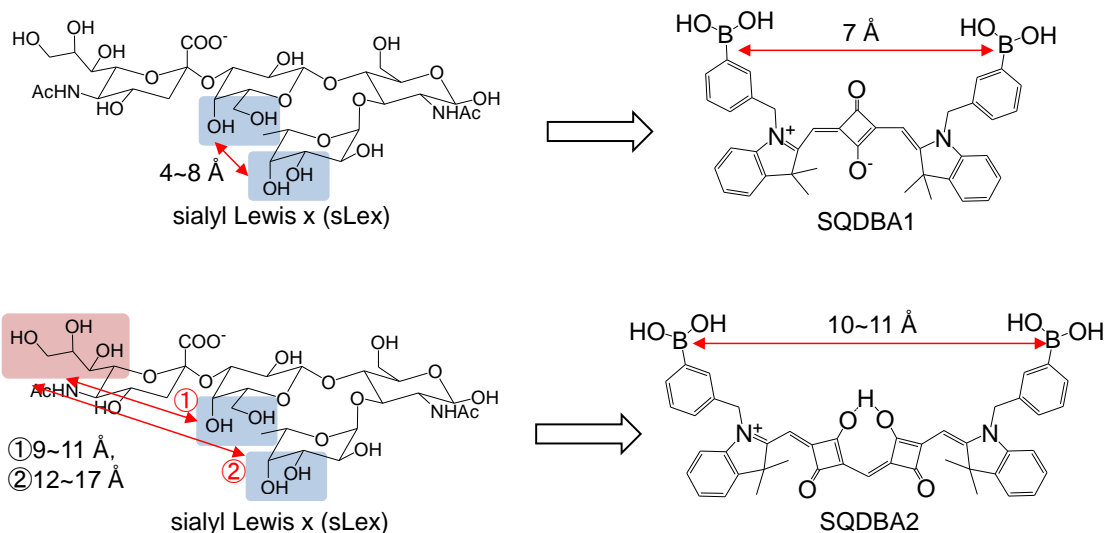


図 5-4 新規 SQDBA 色素の化学構造.

具体的には、SQDBA色素による腫瘍マーカーとして機能するsLexの認識を考えている。

sLex のガラクトース-フコースのジオール間の距離 (4-8 Å) と 2 つのボロン酸基間の距離 (7 Å) が一致する SQDBA1 および sLex の Neu5Ac グリセロール基-ガラクトースジオール間の距離 (9-11 Å) と 2 つのボロン酸基間の距離 (10-11 Å) が一致する SQDBA2 を設計している。

このような糖鎖応答分子素子を組む合わせることで、MDA を利用するアプローチによって、実試料中の糖分子および糖鎖の化合物分析系の構築が期待できる。

後記

本研究は 2012 年 4 月から 2015 年 3 月までの 3 年間を埼玉大学大学院理工学研究科化学系専攻渋川研究室にて、2013 年 10 月から 2013 年 12 月までの 3 ヶ月間を Wake Forest 大学 Christa L. Colyer 研究室にて研究を行った。

付記

本研究に関する学会発表

- 1) K. Ohuchi, S. Saito, M. Shibukawa, “*Emissive Lanthanide-Macrocyclic Polyazacarboxylate Complexes Specifically Recognizing Sialic Acid by Acid Dissociation Reaction of a Coordinated Water Molecule*”, 63rd Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (PittCon2012), CO-914, March, 2012, Orlando, USA
- 2) K. Ohuchi, S. Saito, M. Shibukawa, “*Lanthanide-macrocyclic polyazacarboxylate complexes for luminescence recognition of sialic acid: the mechanism of the specific binding*”, RSC Tokyo International Conference, JASIS Conference, September, 2012, Makuhari Messe, Japan.
- 3) 大内和希, 齋藤伸吾, 前田壮志, 中澄博行, Christa L. Colyer, 渋川雅美, 「複数のフェニルボロン酸修飾型スカリリウム色素を用いるシアル酸の蛍光応答パターン認識」, F2007, 第 74 回分析化学討論会, 2014 年 5 月, 福島.
- 4) 大内和希, 「認識場を精密に制御したシアル酸認識蛍光プローブの開発」, 東日本若手交流会, 2014 年 7 月, 山形, 招待講演.
- 5) 大内和希, 齋藤伸吾, 前田壮志, 中澄博行, Christa L. Colyer, 渋川雅美, 「生体試料中シアル酸の多変量判別分析用ボロン酸修飾型スカリリウム色素の開発」, 3B4-40, 日本化学会第 95 回春季年会, 2015 年 3 月, 千葉, 発表予定.

本研究に関する発表論文

- 1) Kazuki Ouchi, Shingo Saito, and Masami Shibukawa, “*A New Molecular Motif for Recognizing Sialic Acid Using Emissive Lanthanide-Macrocyclic Polyazacarboxylate Complexes: Deprotonation of A Coordinated Water Molecule Controls Specific Binding*”, *Inorganic Chemistry*, 2013, **52**, 6239–6241.
- 2) Kazuki Ouchi, Christa L. Colyer, Sebaiy Mahmoud, Jin Zhou, Takeshi Maeda, Hiroyuki Nakazumi, Masami Shibukawa, and Shingo Saito, “*Molecular Design of Boronic Acid-Functionalized Squarylium Cyanine Dyes for Multiple Discriminant Analysis of Sialic Acid in Biological Samples: Selectivity toward Monosaccharides Controlled by Different Alkyl Side Chain Lengths*”, *Analytical Chemistry*, **2015**, 87, 1933–1940.

参考論文

- 1) Daiki Goto, Kazuki Ouchi, Masami Shibukawa, Shingo Saito, “*A Novel Affinity Capillary Electrophoresis for Selective Control of Electrophoretic Mobility of Sialic Acid Using Lanthanide-Hexadentate Macrocyclic Polyazacarboxylate Complexes*”, *Journal of Chromatography A* (投稿中)

謝辞

多くの方々の支えがあったからこそ、ここまで研究を続けることができました。はじめに、本研究のみならず、研究の楽しさややりがいをの御指導ならびに御鞭撻をいただいた齋藤伸吾准教授に深くお礼申し上げます。そして、埼玉大学でこのような研究をできる環境を作ってくださった渋川雅美教授、加藤美佐技術職員にも心から感謝いたします。Wake Forest 大学への留学の間、研究面だけでなく生活面までサポートしていただきました Christa L. Colyer 教授ならびに研究室の皆さんに感謝申し上げます。また、SQ-BA 色素を提供していただきました大阪府立大学の中澄博行教授、前田壮志助教にお礼申し上げます。さらに、後輩の博士後期課程の和田丈晴さん、中村圭介君、Fouzia Akter さん、博士前期課程の後藤大樹君、前島昭典君、植木晃宏君、倉原佑規君、三宅彩香さん、森永僚太君、学部四年生のみなさんには、色々と迷惑をかけました。この場を借りてお礼申し上げます。みなさんのおかげで、研究に打ち込むことができました。

また、お忙しい身でありながら、私の副査を担当してくださいました渋川雅美教授、松岡浩司教授、藤原隆司准教授にはお手数をおかけしました。謹んで、お礼申し上げます。

付録

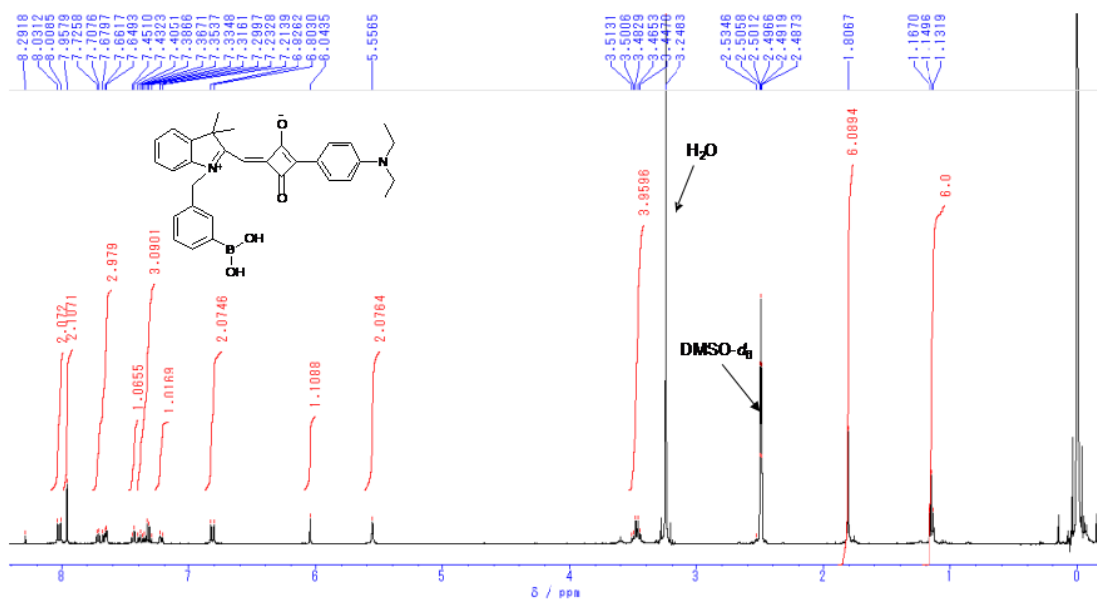


図 1 SQ-BA2 の ¹H-NMR スペクトル (DMSO-*d*₆, 100 MHz).

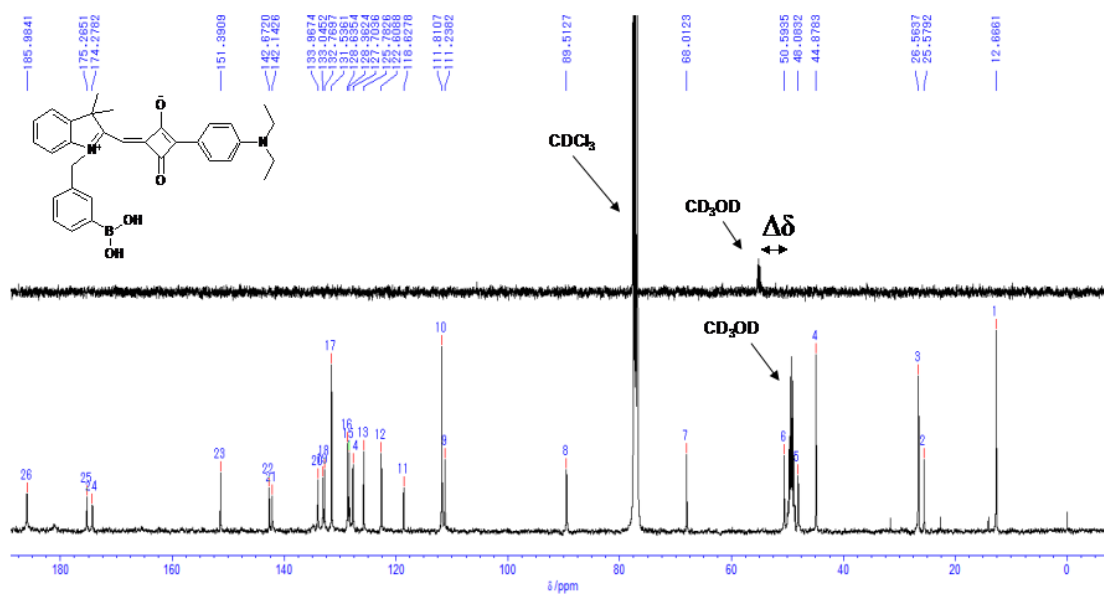


図 2 SQ-BA2 の ¹³C-NMR スペクトル (CDCl₃/CD₃OD (13/1 (v/v), 400 MHz).

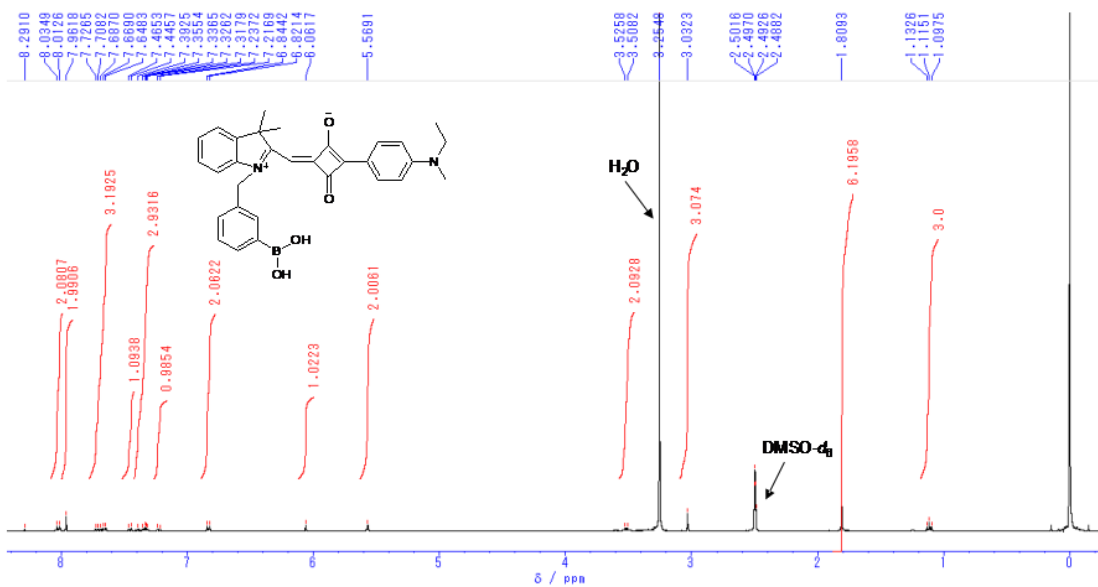


図3 SQ-BA3の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (DMSO- d_6 , 100 MHz).

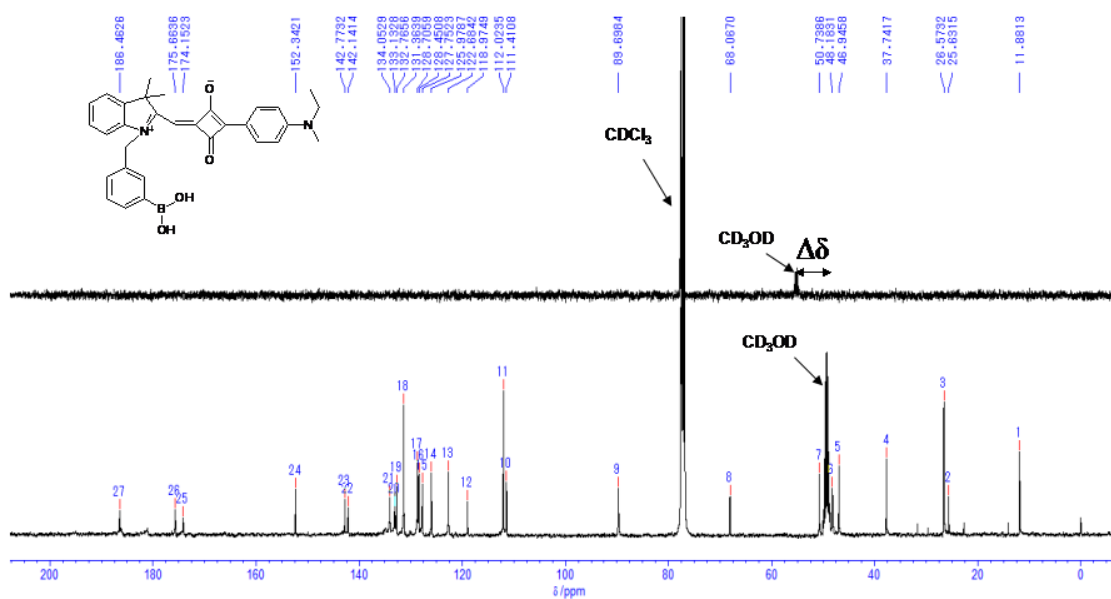


図4 SQ-BA3の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (CDCl₃/CD₃OD (13/1 (v/v), 400 MHz).

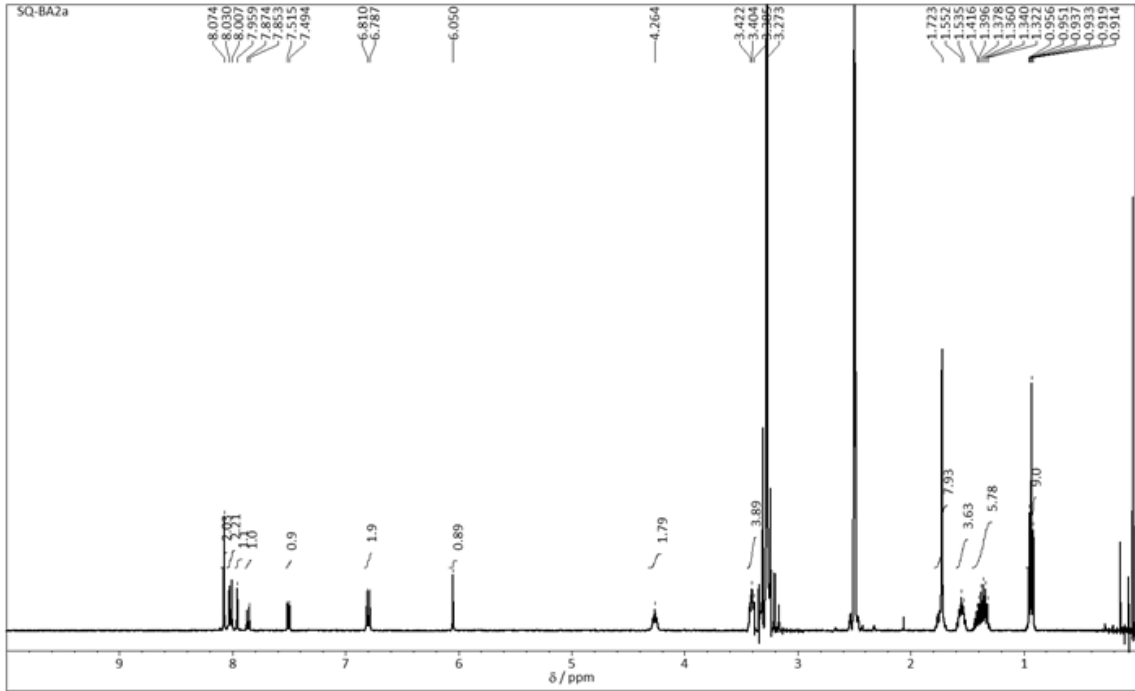


図 5 SQ-BA4 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (DMSO- d_6 , 400 MHz).

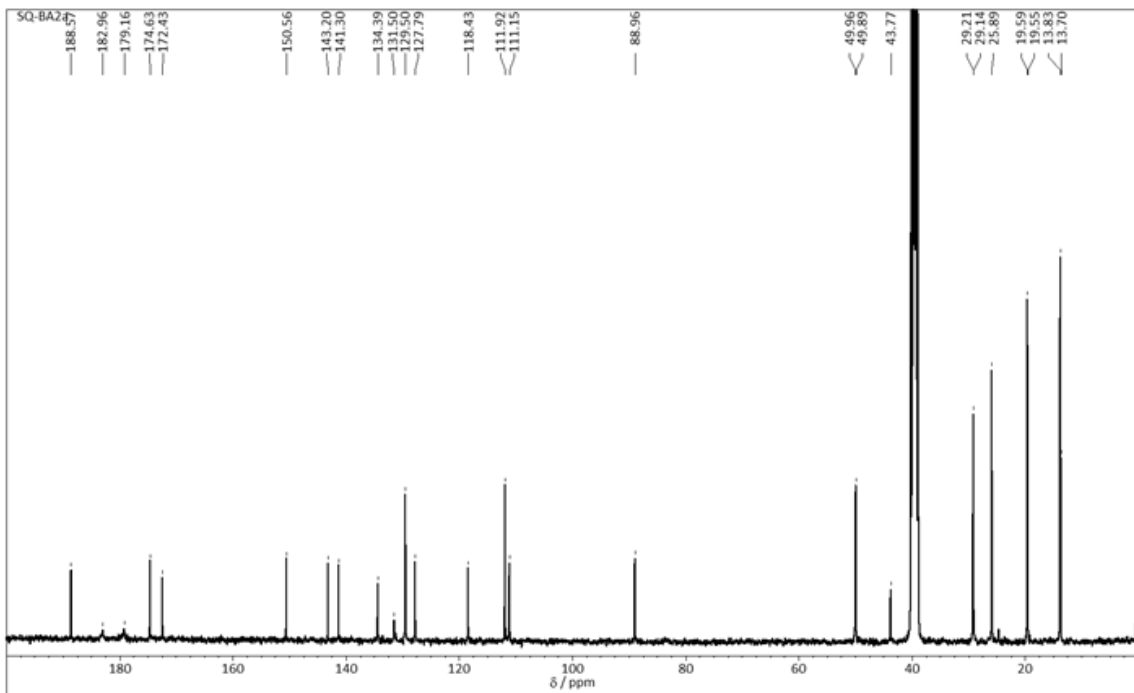


図 6 SQ-BA4 の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (DMSO- d_6 , 100 MHz).