



生体亜鉛イオンの動態解析を目指した蛍光分析システムの開発

(課題番号 12559006)

平成 12 年度～平成 14 年度科学研究費補助金 (基盤研究(B)(2)) 研究成果報告書

平成 15 年 3 月

研究代表者 コイケ トオル
小池 透
(広島大学 大学院 医歯薬学総合研究科教授)





亜鉛イオンの微量分析は、癌疾患の早期診断法や外科的手術の治癒状況を知る視診として、あるいは生体における亜鉛イオンの生理学的な役割を解明するためには必須である。本研究では、生理条件下で亜鉛イオンを捕捉する部分構造と、亜鉛錯体形成と同時に強い蛍光を発生する部分構造を併せもつ蛍光分子を開発し、実用的な生体内亜鉛イオンの定量分析法や画像解析法を開発することを目的としている。独自に合成した蛍光プローブの溶液内における特性をpH滴定法、NMR測定法、蛍光分光分析法などにより詳しく調べた。特に、それら蛍光プローブの水溶液中での安定性、亜鉛イオンの捕捉速度、細胞毒性など実用化に必須の化学的性質を検討した。その結果、直鎖状構造のフレキシブルな構造を持つ配位子は捕捉速度が早いですが錯体安定性は小さくなること、環状構造の配位子の場合、亜鉛化合物の安定性は高いが亜鉛イオン捕捉速度が極めて遅いこと、マイクロモル濃度では細胞毒性がほとんどないこと、12員環のトリアミンが亜鉛捕捉に最も適していることなどが明らかとなった。さらに、本研究により得られた知見を基に可視光に蛍光をもつプローブとしてNBDを共有結合させた環状ポリアミン型蛍光プローブや、亜鉛酵素を阻害する新規化合物の開発、リン酸化生体分子を選択的に認識する分子の開発にも成功した。12員環のトリアミン系の亜鉛蛍光プローブとアポトーシスが可能な培養細胞を用いて、細胞内亜鉛イオン動態を調べた結果、アポトーシス誘起時に細胞内のフリーの亜鉛イオンが劇的に増加することが確認できた。

研究組織

研究代表者：小池 透（広島大学 大学院 医歯薬学総合研究科教授）

研究分担者：大谷 和弘（広島大学 大学院 医歯薬学総合研究科助教授）

研究分担者：熊谷 孝則（広島大学 大学院 医歯薬学総合研究科助手）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 12 年度	5,500	0	5,500
平成 13 年度	1,100	0	1,100
平成 14 年度	1,300	0	1,300
総 計	7,900	0	7,900

研究発表

(1) 学会誌等

- T. Koike, T. Abe, M. Takahashi, K. Ohtani, E. Kimura, and M. Shiro
Synthesis and characterization of the zinc(II)-fluorophore, 5-dimethylamino-naphthalene-1-sulfonic acid [2-(1,5,9-triazacyclododec-1-yl)-ethyl]-amide and its zinc(II) complex
J. Chem. Soc. Dalton Trans., **2002**, 1764-1768
- E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and T. Koike
A novel procedure for simple and efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms by using the Zn-cyclen complex
Nucleic Acids Research, **2002**, 30, e126(1-6)
- E. Kimura, H. Kitamura, K. Ohtani, and T. Koike
Elaboration of Selective and Efficient Recognition of Thymine Base in Dinucleotides, Single-stranded and Double-stranded DNA by Zn(II)-Acrydinylcyclen
J. Am. Chem. Soc., **2000**, 122, 4668-4677
- E. Kimura, N. Katsube, T. Koike, M. Shiro, and S. Aoki
Effects of bis(aromatic) pendant on recognition of nucleobase thymine by Zn(II)-cyclen
Supramolecular Chemistry, **2002**, 14, 95-102
- E. Kikuta, R. Matsubara, N. Katsube, T. Koike, and E. Kimura
Selective recognition of consecutive G sequence in double-stranded DNA by Zinc(II)-macrocyclic tetraamine complex appended with an anthraquinone
J. Inorg. Biochem., **2000**, 82, 239-249

(2) 学会発表

- 阿部倫子, 大谷和弘, 小池 透
環状ポリアミン骨格を有する新規蛍光プローブの開発
日本薬学会第122年会, 千葉, 2002.3
- E. Kimura, E. Kinoshita, and T. Koike
"Macrocyclic Zinc(II)-Fluorophores Signaling Apoptosis"
XXVIIth International Symposium on Macrocyclic Chemistry, USA 2002.8

環状ポリアミンの特性を利用した
新規蛍光プローブの開発

I 序 論

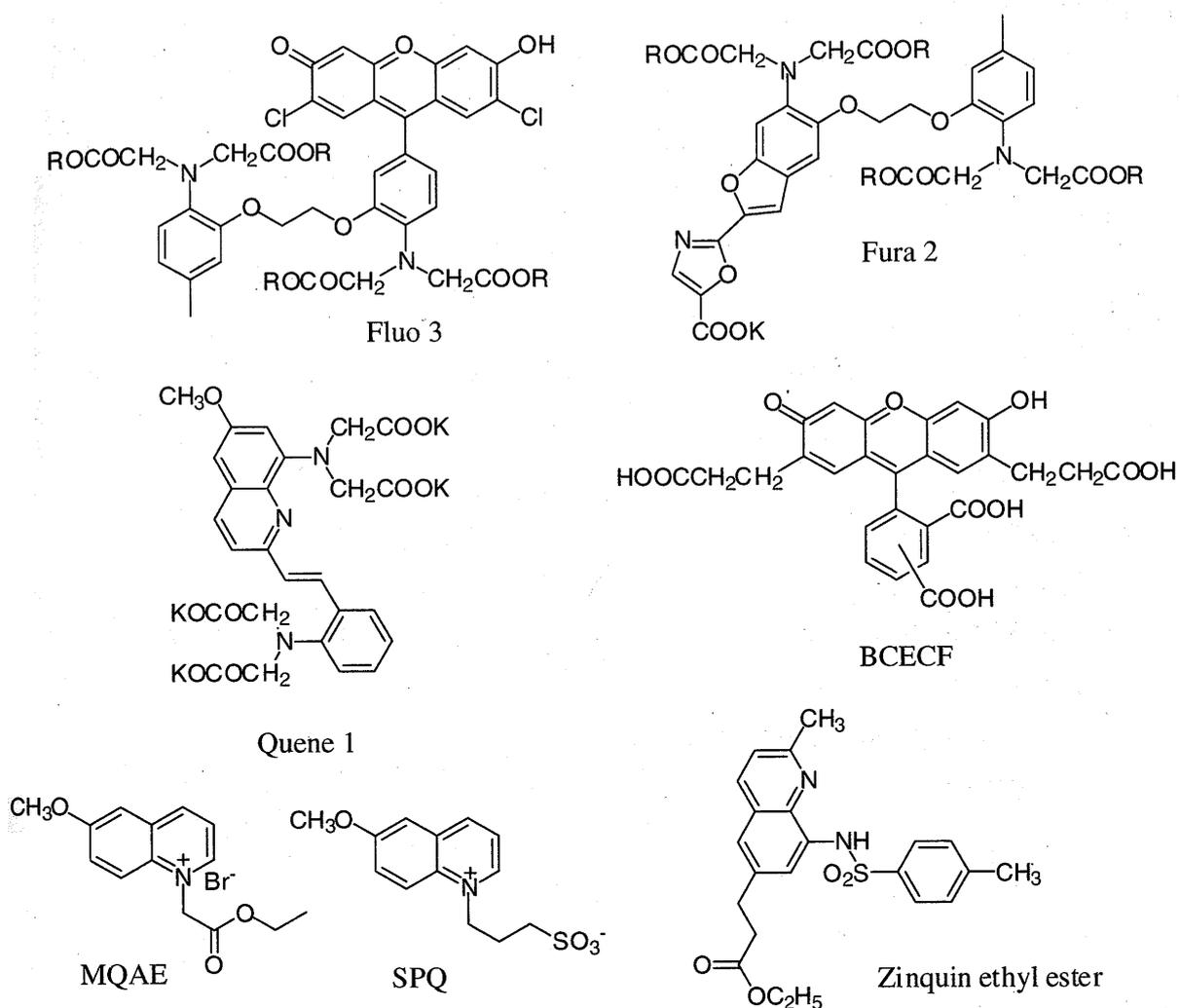
細胞内では、外界刺激を受けて特定のカスケード反応がおこり、細胞の分化、移動、分裂などの現象が起きている。今までにこうした細胞内のシグナル伝達に関わっている分子が数多く同定され、それらの関係が明らかにされてきた。最近では、癌、免疫疾患、老化、痴呆などに関わる鍵分子も徐々に解明され、これらの分子の働きを制御することによる疾患の治療への期待が高まってきている。

これらシグナル伝達における分子ネットワークには、その伝達系におけるフィードバック機構、他の伝達系との相互作用などが複雑にからみあっている。そこで、部分的だけではなく、伝達系全体における動態の解明が必要となる。したがって、各事象が空間的、時間的に制御されているシグナル伝達系を包括的に解明するためには、時空間的スケールで事象を観察することが必要となる。

細胞情報を得る検出手段として、吸光法、蛍光法、化学発光法および放射線同位元素を利用する方法があり、生細胞や組織中でのダイナミクスに関する情報を与える試薬が数多く市販されている。これらのなかでも蛍光法は、感度や操作性等の面から最も取り扱いやすい手段として知られている。蛍光法では、蛍光プローブを細胞内に送り込み蛍光強度などの情報を画像化することによって細胞表面の形態やその変化を観察出来るとともに、物質の動態や動的現象が実時間で可視化できる。また、蛍光は物理現象であるため、その特性を活かせば様々な情報の抽出を行うことが可能となる。例えば、蛍光のエネルギー移動を利用すると、生体分子間の相互作用や生体分子の構造変化を観ることができるとともに、さらに、蛍光のエネルギー移動に限らず、蛍光の偏光、消光、退色、光異性化反応など、あらゆる特性が利用できると考えられる。このように蛍光プローブを用いたリアルタイムでの細胞内現象のイメージングは、生体现象の詳細な解析において有効な手段である。

蛍光プローブの例として、イオンのダイナミクスを観察するための試薬であるカルシウムイオンプローブ (Fluo 3, Fura 2), H^+ プローブ (BCECF, Quene 1), 塩化物イオンプローブ (MQAE, SPQ), 亜鉛イオンプローブ (Zinquin ethyl ester) 等が挙げられる (図 1)。中でも蛍光プローブとして初めての成功例であるカルシウムイオンプローブの開発は、その後の生体内のカルシウムイオンの研究を劇的に進展させた。一方カルシウムイオンに比べ、その他の生体内因子に対する蛍光プローブの開発は大幅に遅れている。そのため、カルシウムイオン以外の生体内因子の動態には未だ不明な点が多い。従って今後は多岐にわたる蛍光プローブの開発が必要となってくる。

図1 各種蛍光プローブ

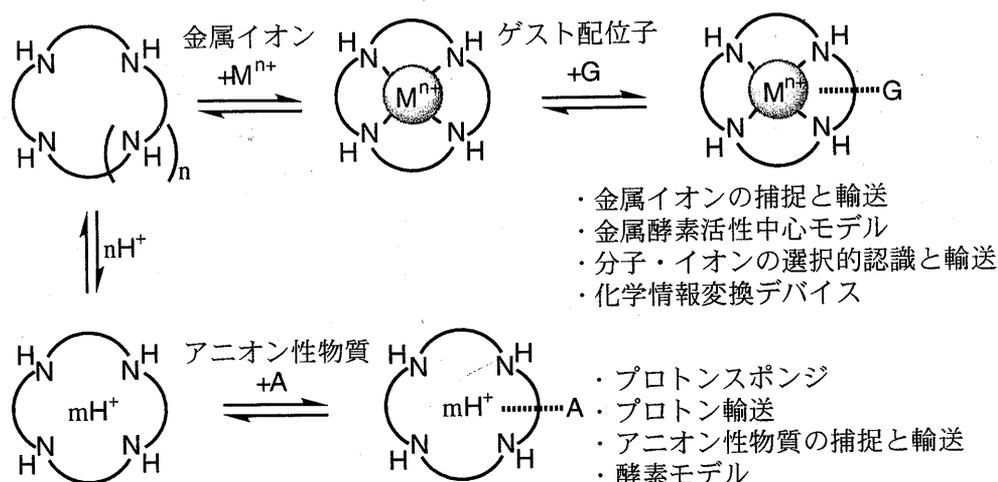


そこで、本研究では、機能性分子として知られている環状ポリアミンの特性を利用することにより、新規の蛍光プローブの合成を行った。

環状ポリアミンは、1975年頃までは、遷移金属イオンの多座キレート剤として一部の錯体化学者の研究対象でしかなかった。しかし、その後、新しいタイプの機能性分子として各方面から注目を集め、環状ポリアミンの新しい機能が数多く見出されてきた。環状ポリアミンは、機能性分子としてすでに確立されているクラウンエーテル（環状ポリエーテル）の酸素原子を窒素に置き換えたホモログにすぎないが、

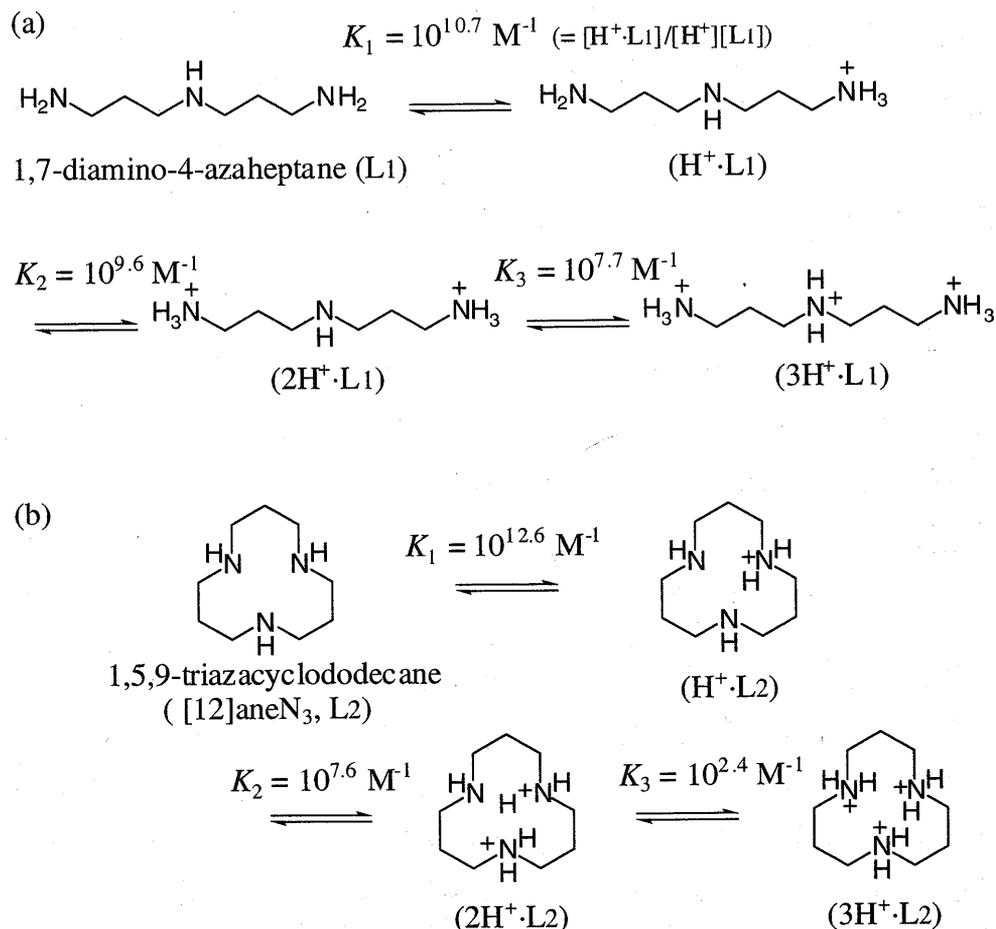
クラウンエーテルとは大きく異なり、ポルフィリン、ペプチド、ポリアミンアルカロイドなどの含窒素生体分子と共通する様々な機能を持っている。環状ポリアミンの一般的な機能を図2に示す。

図2 環状ポリアミンの機能



環状ポリアミンは、その環状構造の中に塩基性を持つ窒素原子を複数含有している。そのため、環サイズや窒素官能基の種類や数に応じて、一定の数のプロトンに対して異常に強い親和性を示す。しかも、複数のアミンが環状構造に散りばめられているため、通常の孤立アミンにはみられない集合体としての独特な塩基性が発揮される。例として直鎖状のトリアミンと12員環のトリアミン ([12]aneN₃) の酸解離反応を図3aと3bに示す。それぞれの化合物の3つの窒素のプロトン化定数 (K_1 , K_2 , K_3) を比較すると、環状のトリアミンの3つの値は直鎖状のトリアミンの値よりもばらついていることがわかる。これは、環状ポリアミンでは環状構造により窒素原子の非共有電子対が環内で重なりあうため、それぞれの窒素原子が協同的に水素イオンを取り込むためである。このため、環状トリアミンのプロトン化は3つの独立したpH領域（酸性、中性、塩基性領域）で起こる。環内に複数個のプロトンを収容した環状ポリアンモニウムカチオンは、環状のコンフォメーションが二級アミン水素とプロトンとの水素結合によって固定化される。さらに酸性領域では、環内に複数のプロトンが集中するので、プラス性の大きなカチオン化合物として振舞う。環状ポリアンモニウムカチオンは、同じ多価イオンであっても金属イオンとは異なり、プロトンを介した水素結合によってアニオン性物質や不対電子対を持つヘテロ元素有機化合物を捕捉することができる。

図3 直鎖状のトリアミンと12員環のトリアミン ([12]aneN₃) の酸解離反応



本研究では、環状ポリアミンの生理 pH (中性領域) でプロトン化により電荷の変化を起こす特性を利用して、酸性オルガネラ移行性蛍光プローブの開発を行った。酸性オルガネラ移行性蛍光プローブとは、酸性オルガネラを有する細胞の蛍光染色や、酸性小胞の開口放出現象の解析に使用することができる機能性化合物である。また、環状ポリアミンの持つ遷移金属キレート能を利用して、亜鉛イオンの動的解析を目的とした亜鉛蛍光プローブの開発も併せて行った。

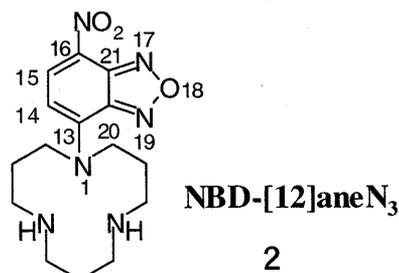
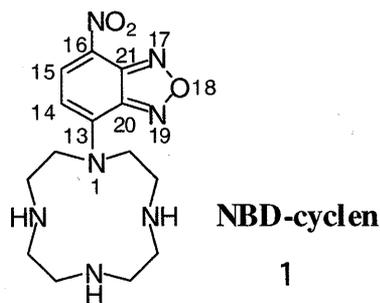
II. 本 論

1. 酸性オルガネラ移行性蛍光プローブの開発

1-1. 背 景

蛍光色素を励起して得られる蛍光を利用した分析手法は、様々な研究分野で利用されている。蛍光分子の励起状態の解析や発光機構そのものの研究を除けば、蛍光色素の使い方には大きくわけて二種類ある。第一は、一定の条件のもとで蛍光色素の量とその蛍光の強さが正確に比例し、その蛍光測定之感度が極めて高いという特徴を利用して、蛍光色素を蛍光量子モニター (fluorescent quantitation monitor) として利用するものである。この場合、微量物質の定量や種々の反応の解析を行うもの (定量モニター) として、また、物質の挙動を知るために添加する物質 (各種トレーサー) として蛍光色素が利用される。第二は、いわゆる蛍光プローブ (fluorescent probe) としての使い方である。蛍光の特性を生かして、低分子、高分子、膜、オルガネラなどを材料として種々の物性やその変化を調べる探索子 (probe) として蛍光色素を利用する。蛍光プローブには、種々の環境条件 (疎水性環境, pH, 酸化還元電位など) に依存して蛍光の性質が変化するものと、比較的環境に依存しない偏光解消やエネルギー移動などの性質を利用したものがある (分子回転運動, 分子間距離, 分子配向などに依存した蛍光プローブ)¹⁾。

本研究では、生理 pH 付近でプロトン化を起こす環状ポリアミンに蛍光発色団である 4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾイル基 (NBD 基) を結合させた二種類の新規蛍光プローブ NBD-cyclen (**1**) と NBD-[12]aneN₃ (**2**) を合成し、それらの化学的性質について検討を行った。**1** および **2** は、複数の二級アミンを持っているため、生理条件下の水溶液中でプロトンを取り込んでプラスイオンとして存在する。そのため **1** および **2** は、細胞の中に入ると pH の低いオルガネラ (ヒスタミンなどを多く含む酸性顆粒など) へ選択的に移行する可能性が高いと考えられる。ヒスタミン遊離細胞である好塩基球細胞の酸性顆粒へこれらの蛍光プローブを導入することができれば、アレルギー反応に伴う顆粒内物質の放出現象 (開口放出反応) の解析に使用することができる⁴⁾ と考え、本研究をスタートした。



1-2. 実験項

1-2-1. 新規蛍光プローブの合成

(a) 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen) の合成

500 mL マイヤー中にジエチレントリアミン (10 mL, 93 mmol) と NaOH (11.5 g, 0.29 mol [3.1 eq]) を測り入れ、蒸留水 150 mL を加えて湯浴上で溶解した後、氷冷下で攪拌した。この溶液とは別に *p*-トルエンスルホニルクロライド (55.1 g, 0.29 mol [3.1 eq]) のトルエン溶液 (200 mL) を作成しておき、これを 200 mL 分液ロートに移し、氷冷下で 500 mL マイヤー中に 2 時間かけて滴下した。滴下開始 20 分後には反応溶液が白濁し始め、滴下終了後、白濁した状態で終夜激しく攪拌した後、ヌッチェにろ紙を 2 枚重ねて白色の沈殿物を吸引ろ取した。ろ取した白色沈殿物を蒸留水で洗った後トルエンで洗い、再び蒸留水でトルエン臭がなくなるまで沈殿を洗い、ジエチレントリアミン 3Ts 体 (N-Ts 体) を白色沈殿として得た (14.7 g, 79% yield)。

TLC (eluent; toluene/AcOEt = 4 : 3) $R_f = 0.48$.

1 L マイヤーにジエタノールアミン (16.2 g, 0.15 mol), トリエチルアミン (54.6 g, 0.54 mol [3.6 eq]) を測り入れ、ジクロロメタン (150 mL) を加え、氷冷下で攪拌した。別に *p*-トルエンスルホニルクロライド (94.4 g, 0.50 mol [3.3 eq]) のジクロロメタン溶液 (150 mL) を作成し、この溶液を 300 mL 分液ロートに移し、氷冷下で 1 L マイヤー中に滴下した。滴下終了後、室温で終夜攪拌すると、白色沈殿が得られた。これをろ取し、5% (v/v) HCl (250 mL) とジクロロメタン (250 mL) で抽出を行い (2 回), 有機層を集め無水 Na_2SO_4 で脱水した。脱水後、溶液を 1/3 の量まで減圧濃縮し、そのまま室温で放置するとジエタノールアミン 3Ts 体 (O-Ts 体) として無色の結晶が得られた (58.5 g, 67% yield)。

TLC (eluent ; toluene/AcOEt = 4 : 1) $R_f = 0.53$.

500 mL ナスフラスコに先に合成したジエチレントリアミン 3Ts 体 (14.1 g, 25 mmol) の DMF 溶液 (100 mL) を入れ、無水 K_2CO_3 (7.4 g, 54 mmol [2.2 eq]) 存在下、85°C で攪拌した。この溶液に、ジエタノールアミン 3Ts 体 (14.2 g, 25 mmol) の DMF 溶液 (100 mL) を窒素存在下で 2 時間かけて滴下し、滴下終了後 105°C で終夜攪拌した。反応溶液をガラスフィルターでろ過した後、ろ液を減圧留去した。得られた残渣に $\text{H}_2\text{O} : \text{DMF} = 1 : 1$ 溶液を湯浴上で攪拌しながら溶液が透明になるまで (約 20 mL) 少しずつ加えた。透明になったところで、MeOH (約 500 mL) を一気に加えて激しく攪拌すると白色沈殿が析出した。溶液を氷冷後、沈殿をヌッチェでろ取し、

得られた沈殿物を MeOH, H₂O の順で洗い, 最後に再び MeOH で洗った。その結果, 白色粉末状化合物として 4Ts-cyclen が得られた^{5,6)} (17.7 g, 90% yield)。

TLC (eluent; toluene / AcOEt = 4 : 1) $R_f = 0.39$.

次に, この 4Ts-cyclen (7.0 g, 8.9 mmol) に大過剰量の濃硫酸 (26 mL) を加え, 110°C で終夜攪拌し, 脱 Ts 化を行った。TLC にて反応の終了を確認し, 反応溶液を分液ロートに移し, 氷冷エーテル (160 mL) 中に反応物をゆっくり滴下した。この時の洗い込みは氷冷した蒸留水で行った。エーテル中に滴下すると cyclen の硫酸塩が白色沈殿として生じてくるので, 滴下終了後これを吸引ろ取した。次にろ取物 (硫酸塩) を蒸留水に溶解し, その溶液を乾固直前まで減圧濃縮した後, 残渣に濃塩酸を加えた。沈殿してきた白色化合物 (塩酸塩) を吸引ろ取して減圧乾燥した後, 少量の蒸留水に溶解し, 不純物を取り除くためにジクロロメタンで 2 回抽出を行った。抽出後, 水層に固体 NaOH を加え pH が 11 以上となるよう調整 (イオン型 → 分子型) し, 再び先程の分液ロートに戻しクロロホルム (塩化メチレンでは効率が悪い) で抽出を行った。有機層をまとめて無水 Na₂SO₄ で 30 分間脱水し, ひだ折り濾紙を使用した自然ろ過で無水 Na₂SO₄ を取り除き, クロロホルムを減圧留去した。残渣に CH₃CN (100 mL) を加えて溶解し, 再び溶媒を減圧留去した。得られた白色残渣を最少量の CH₃CN で溶解し, これを室温で放置したところ, cyclen が無色の針状結晶として得られた (0.62 g, 3.6 mmol, 45% yield)。

TLC (eluent ; CH₂Cl₂ / MeOH / 28% NH₃_{aq} = 2 : 2 : 1) $R_f = 0.48$.

市販の cyclen (1,4,7,10-tetraazacyclododecane) には不純物が少量含まれるため, 合成に使用する前に以下のように精製して用いた。市販の cyclen を再少量の CH₃CN に溶解し, 不溶物を綿栓ろ過で取り除いた。得られた透明なろ液を室温で放置し, cyclen を無色の針状結晶として得た (精製収率 80% 以上)。

(b) 1,4,7-tris (*tert*-butyloxycarbonyl) cyclen (3Boc-cyclen) の合成

精製した cyclen (2.6 g, 15 mmol) を CHCl₃ (200 mL) に溶解し, トリエチルアミン (7.6 mL) を加え, 窒素存在下, 室温で攪拌した。この溶液に二炭酸ジ *tert* ブチル (8.9 g, 41 mmol, [2.7 eq]) の CHCl₃ 溶液 (200 mL) を 3 時間かけて滴下した。《この時, 二炭酸ジ *tert* ブチルの当量数は 2.85 eq 以下でなければ 4Boc-cyclen の生成率が上昇する。また, 滴下速度が速すぎても 4Boc-cyclen の生成率が上昇してしまうため, 高収率で 3Boc-cyclen を得るために滴下はゆっくり行う。》滴下後, 室温で終夜攪拌し,

反応溶液を減圧留去したところ無色の油状の残渣が得られた。この残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (FL100D, eluent; AcOEt / Hexane = 3 : 2) で分離精製し, 3Boc-cyclen を無色の非晶系化合物 (アモルファス) として得た (5.9 g, 12 mmol, 83 % yield)。

TLC (eluent; AcOEt / Hexane = 3 : 2) $R_f = 0.42$.

IR (KBr pellet) 3522, 2976, 2818, 1691, 1464, 1418, 1366, 1272, 1250, 1171, 1100 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.45 (18H, br, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.47 (9H, br, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.80-2.90 (4H, m, CH_2), 3.17-3.43 (8H, m, CH_2).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 28.5, 28.7, 45.0, 46.0, 48.9, 49.1, 49.5, 49.9, 50.5, 51.0, 55.4, 79.2, 79.4, 79, 155.6, 155.9.⁷⁾

(c) 4-(1,4,7,10-tetraazacyclododecane)-7-nitrobenzofurazan の合成

NBD-Cl (2.0 g, 9.8 mmol) と 3Boc-cyclen (4.7 g, 9.9 mmol) を THF (100 mL) に溶解し, 窒素存在下で加熱還流を行った。反応開始後の反応の進行確認は TLC にて行った。反応開始 5 日後, 原料が残存しているものの, 目的化合物以外のスポットが確認され始めたため反応停止とした。溶媒をエバポレーターにて減圧留去し, 黄褐色の油状の残渣を得た。この残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (FL100D, eluent; AcOEt / Hexane = 1 : 1) で分離精製したところ, NBD-3Boc-cyclen が橙色の非晶形物として得られた (3.3 g, 5.1 mmol, 52 % yield)。

TLC (eluent; AcOEt / hexane = 2 : 5) $R_f = 0.44$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.40 (18H, br, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.50 (9H, br, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.47-3.67 (12H, m, CH_2), 4.11-4.13 (4H, m, CH_2), 6.35 (1H, d, $J = 8.95$, ArH), 8.43 (1H, d, $J = 8.95$, ArH).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 28.4 (4N, 10N- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.6 (7N- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 49.0 (C-6, 8), 49.9 (C-5, 9), 50.7 (C-3, 11), 55.8 (C-2, 12), 80.9 (4N, 10N- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 81.0 (7N- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 101.8 (C-14), 123.1 (C-16), 134.9 (C-15), 144.5 (C-21), 144.8 (C-20), 156.1 (C-13), 157.8 (CO).

次に, 脱 Boc 化を行うために, NBD-3Boc-cyclen (3.3 g, 5.1 mmol) を少量の EtOH に溶解し, 氷冷しながら濃塩酸 (10 eq) をゆっくり添加した後, 室温で攪拌した。反応開始 3 日後, TLC にて脱保護が確認できたため, 反応溶液を減圧留去し, 橙色の残渣を得た。この粉末状の残渣を再少量の蒸留水に溶解し, 室温で放置したところ, NBD-cyclen \cdot 3HCl \cdot H $_2$ O が橙色板状結晶として得られた (2.0 g, 4.3 mmol, 84 % yield)。

Mp (dec.) 266 $^\circ\text{C}$.

TLC (eluent; CH₂Cl₂ / MeOH / 28% NH₃_{aq} = 8 : 1 : 0.1) R_f = 0.36.

IR (KBr pellet) 3430, 2960, 2773, 1612, 1546, 1508, 1430, 1307 cm⁻¹.

¹H NMR (D₂O) δ 3.31 (4H, t, J = 4.5, HC-5,9), 3.40 (4H, t, J = 4.5, HC-6,8), 3.45 (4H, t, J = 4.8, HC-3,11), 4.30 (4H, d, J = 4.8, HC-2,12), 6.59 (1H, d, J = 8.8, HC-14), 8.50 (1H, d, J = 8.8, HC-15).

¹³C NMR (D₂O) δ 47.1 (C-6, 8), 47.5 (C-5, 9), 48.8 (C-3, 11), 55.6 (C-2, 12), 109.0 (C-14), 126.3 (C-16), 139.8 (C-15), 147.4 (C-21), 148.4 (C-20), 149.1 (C-13).

Anal. Calcd for C₁₄H₂₆N₇O₄C₁₃: C, 36.34; H, 5.66; N, 21.19. Found: C, 36.32; H, 5.69; N, 21.17.

(d) 1,5,9-triazacyclododecane ([12]aneN₃) の合成

1 L の二頸フラスコに NaH (5.9 g, 0.25 mol, [3.6 eq]) を測り入れ, DMF (400 mL) を加えて Ar 存在下で攪拌した。N,N,N'-トリトシルジプロピレントリアミン (40 g, 67 mmol) の DMF 溶液 (100 mL) を滴下ロートに移し, 氷冷しながら二頸フラスコ中に滴下し, 滴下終了後, 80-90°C でジムロートをつけて攪拌した。1 時間半攪拌した後, この溶液に 1,3-ジプロモプロパン (15.0 g, 74 mmol [1.1 eq]) の DMF 溶液 (100 mL) を 2 時間かけて滴下し, 80~90°C で 2 日間攪拌した。室温で放冷後, 反応液を約 100 mL まで減圧濃縮し, 湯浴上で 500 mL の蒸留水を加えつつ激しく攪拌すると粗結晶が析出した。この粗結晶をヌッチェで吸引ろ過し, 得られた白色固体を 1 L のナスフラスコに移して酢酸エチル (500 mL) を加え, 加熱還流を行いながら約 30 分間抽出した。同様の抽出操作を再度行い, 抽出液を合わせて無水 Na₂SO₄ で 30 分間脱水し, 溶液量が約 200 mL になるまで減圧濃縮し, そのまま室温で一晩放置したところ, 白色の粉状固体として 3Ts-[12]aneN₃ が得られた (22.1 g, 35 mmol, 52% yield)。

TLC (eluent; AcOEt / hexane = 1 : 1) R_f = 0.47

3Ts-[12]aneN₃ (22.1 g, 35 mmol) をビーカーに計り取り, 酢酸 (300 mL) を加えて懸濁させたものを二頸フラスコに移し, 48% HBr_{aq} (150 mL) を加えて 130°C 以上で加熱還流を行った。終夜攪拌した後, 反応液が粘稠性になるまで減圧濃縮し, イソプロパノール (100 mL) を一度に加えて良く攪拌した。室温で一晩放置して結晶を析出させ, グラスフィルターで吸引ろ取したところ, [12]aneN₃·3HBr として白色沈殿が得られた (14.7 g, 35 mmol)。得られた [12]aneN₃·3HBr (14.7 g, 35 mmol) を極少量の蒸留水に溶解し, 28% NH₃ 水を加えて pH が 11 付近となるよう調整した。この

溶液を 200 mL の分液ロートへ移し、 CH_2Cl_2 (100 mL \times 10) で抽出を行った。有機層を無水 Na_2SO_4 で脱水し、溶液を減圧留去したところ、白色の残渣を得た。この結晶に再少量のアセトニトリル (約 25 mL) を加え、湯浴上で加温して溶解した。この溶液に酢酸エチルを同量加え、室温で放置したところ [12]ane $\text{N}_3\cdot\text{HBr}$ (2.3 g, 8.9 mmol) として無色のプリズム晶が得られた。この [12]ane $\text{N}_3\cdot\text{HBr}$ を最少量の蒸留水に溶解し、10M NaOH 水を加えて水層の pH を 13 以上に調整し 200 mL 分液ロートに移した後、エーテル (100 mL \times 20) で抽出を行った。有機層を無水 Na_2SO_4 で脱水した後、溶媒を減圧留去したところ、褐色の油状残渣が得られた。この油状残渣を減圧蒸留し、無色の油状化合物として [12]ane N_3 を得た (1.3 g, 7.6 mmol, 22% yield)。

< [12]ane $\text{N}_3\cdot\text{HBr}$ >

TLC (eluent; CH_2Cl_2 / MeOH / 28% $\text{NH}_{3\text{aq}}$ = 5 : 1 : 0.5) R_f = 0.34.

$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ 1.75 (6H, quintet, J = 5.6, CCH_2C), 2.89 (12H, t, J = 5.5, NCH_2).

$^{13}\text{C NMR}$ (D_2O) δ 27.5 (CH_2), 49.7 (NCH_2).

(e) 1,5-bis (*tert*-butyloxycarbonyl)-1,5,9-triazacyclododecane の合成

[12]ane N_3 (2.1 g, 12 mmol) を CHCl_3 (300 mL) に溶解し、トリエチルアミン (3.4 mL) を加え室温で攪拌した。この溶液に二炭酸ジ *tert* ブチル (5.1 g, 23 mmol, 1.9 eq) の CHCl_3 溶液 (100 mL) を 4 時間かけて滴下した後、室温で 5 日間攪拌した。反応溶液を減圧留去し、無色の油状の残渣を得た。この残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (FL100D, eluent; CH_2Cl_2 / MeOH / 28% $\text{NH}_{3\text{aq}}$ = 10 : 1 : 0.1) で分離精製し、2Boc-[12]ane N_3 を無色の非晶系化合物として得た (3.1 g, 8.4 mmol, 69% yield)。

TLC (eluent; CH_2Cl_2 / MeOH / 28% $\text{NH}_{3\text{aq}}$ = 10 : 1 : 0.1) R_f = 0.42.

$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ 1.46 (18H, br, C (CH_3) $_3$), 1.75-1.80 (4H, m, CH_2), 1.87-1.92 (2H, m, CH_2), 2.67 (4H, t, NCH_2), 3.28-3.34 (8H, m, NCH_2).

$^{13}\text{C NMR}$ (D_2O) δ 27.5, 28.5, 46.1, 46.7, 47.1, 79.2, 156.4.

(f) 4-(1,5,9-triazacyclododecane)-7-nitrobenzofurazan の合成

NBD-Cl (1.2 g, 6.0 mmol) と 2Boc-[12]ane N_3 (2.2 g, 6.0 mmol) を 100 mL ナスフラスコに測り入れ、THF (60 mL) を加えて溶解し、窒素存在下で加熱還流を行った。5 日間加熱還流を行った後、溶媒を減圧留去し、橙色の油状の残渣を得た。この残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (FL100D, eluent: CH_2Cl_2 /MeOH/28% $\text{NH}_{3\text{aq}}$ = 20:1:0.1) で分離精製し、橙色の非晶系化合物として NBD-2Boc-[12]ane N_3 を得た (1.6

g, 2.9 mmol, 49 % yield) .

TLC (eluent; CH₂Cl₂ / MeOH / 28% NH_{3aq} = 20 : 1 : 0.1) R_f = 0.33.

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.49 (18H, br, C (CH₃)₃), 2.06-2.18 (6H, m, CH₂), 3.39 (4H, t, J = 6.87, NCH₂), 3.52 (4H, t, J = 6.05, NCH₂), 4.01 (4H, t, J = 6.87, NCH₂), 6.15 (1H, d, J = 8.94, ArH), 8.38 (1H, d, J = 9.16, ArH) .

¹³C NMR (CDCl₃) δ 27.2 (C-3, 11), 28.5 (C (CH₃)₃), 32.0 (C-7), 46.9 (C-6, 8), 47.3 (C-4, 10), 50.1 (C-2, 12), 80.3 (C (CH₃)₃), 101.1 (C-14), 122.8 (C-16), 135.0 (C-15), 144.5 (C-21), 144.9 (C-20), 145.5 (C-13), 156.3 (CO) .

次に, NBD-2Boc-[12]aneN₃ (1.6 g, 2.9 mmol) を CH₃CN に溶解し, 氷冷しながら濃塩酸 (10 eq) を添加, 一晚室温で攪拌し, 脱保護を行った。溶媒を減圧留去した後, 残渣に EtOH を適量加え, 不溶物を再少量の水で溶解し, その溶液を室温で放置したところ, NBD-[12]aneN₃·2HCl·1.7H₂O が橙色の針状結晶として得られた (0.69 g, 1.5 mmol, 52% yield) .

Mp (dec.) 233°C.

TLC (eluent; CH₂Cl₂ / MeOH / 28% NH_{3aq} = 10 : 1 : 0.1) R_f = 0.43.

IR (KBr pellet) 3446, 2960, 2784, 1616, 1540, 1301, 1157, 1087 cm⁻¹.

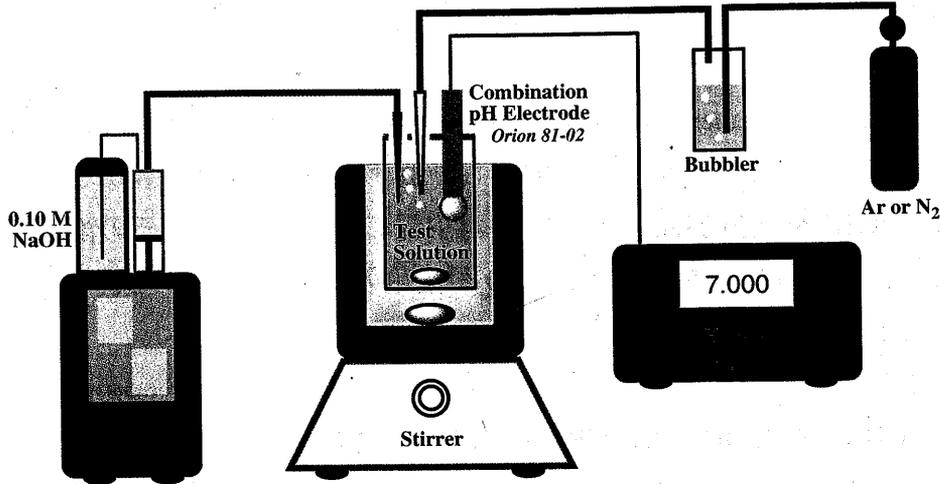
¹H NMR (D₂O) δ 2.20 (2H, quintet, J = 6.5, HC-7), 2.36 (4H, quintet, J = 6.8, HC-3, 11), 3.37 (4H, t, J = 6.5, HC-6, 8), 3.43 (4H, t, J = 6.8, HC-4, 10), 4.17 (4H, t, J = 6.8, HC-2, 12), 6.55 (1H, d, J = 9.2, HC-14), 8.39 (1H, d, J = 9.2, HC-15) .

¹³C NMR (D₂O) δ 20.9 (C-7), 25.6 (C-3, 11), 44.3 (C-4, 6,8,10), 53.8 (C-2,12), 108.9 (C-14), 125.2 (C-16), 139.8 (C-15), 147.3 (C-21), 148.2 (C-20), 150.4 (C-13) .

Anal. Calcd for C₁₅H₂₄N₆O₃C₁₂: C, 41.14; H, 6.31; N, 19.19. Found: C, 41.2; H, 6.17; N, 18.89.

1-2-2. pH 滴定法

新規蛍光プローブの酸解離反応や、それら酸解離反応に影響を与える化学平衡反応（金属や他の物質との錯体形成反応など）について pH 滴定法により検討した。酸解離平衡反応を定義するプロトン化定数 (K_b) および金属錯体生成定数は、滴定解析プログラム (BEST program など) や溶液内マスバランスの式を用いて算出した。本研究で用いた pH 滴定装置を下図に示す。



pH 滴定装置

- ・ pH メータ：電気化学計器 (株) DKK IOL-40
- ・ pH 電極：Orion Research, Inc. Ross Combination pH Electrode 81-02
- ・ オートビュレット：平沼 (株) UCB-900, 0.10 M NaOH 滴定液
- ・ ジャケットセル：ビードレックス社製, 100mL ガラスセル
- ・ 恒温水循環装置：Advantec TE-200 Cool Mate
- ・ マグネティックスターラー：Corning PC-410
- ・ ミクロ天秤：Mettler Toledo AG245
- ・ 不活性ガス：99.999%窒素ガス

(a) 可変容量ピペットの補正と 4 mM HCl 基準溶液の調整

可変容量ピペット (ピペットマンなど：1 mL) の目盛り補正には、長時間一定温度に放置した蒸留水を用いる。使用する水の温度と密度から水 1 mL の質量と可変容量ピペットで量り取った水の質量を比較し、正確に 1.00 mL が計り取れるように可変目盛りを調整する。可変容量ピペットを使用して常に一定量の溶液を計り取るためには、可変ピペットの傾きや液面からチップの先までの距離が常に一定になるように心掛ける。温度の測定は、基準温度計を使用する。pH メーターの補正に使用する基準溶液には、0.100 M の塩酸水溶液 (20°C, $f = 1.000$) を用いる。室温が 20°C と大きく異なる場合、正確な量の塩酸を計り取るためには、水の温度と密度との関

係を考慮してさらに可変容量ピペットの補正が必要である。溶液のイオン強度を一定にするために加えるアルカリ金属の強酸塩 (NaCl など) には、滴定を行う物質の溶液と同じ化合物を使用する。まず初めに、50 mL のメスフラスコに 1.00 M NaCl 水溶液を 5.00 mL 可変容量ピペットを用いて加えた後、蒸留水で 50 mL にメスアップした (できるだけ測定温度と同じ温度で行う)。その溶液を滴定容器 (50 mL の溶液が入るガラスセルなど) に移した後、先程調整した 1 mL を正確に量り取れる可変ピペットを 2 回使用して 2.00 mL を取り除き 48 mL とした。次に、0.100 M の塩酸水溶液 2.00 mL を同じ可変ピペットを 2 回使用して測定溶液に加えた。得られた 50 mL の溶液は、イオン強度が 0.10 であり、塩酸濃度は 4.00 mM である (pH 測定用基準溶液)。

(b) pH メーターの調整

pH メーターに表示される値は、水素イオンの活量の逆数の対数值 ($-\log a_{\text{H}^+}$) である。したがって、測定溶液内の各種化学種 (水素イオンなど) の物質量を求めるためには、水のイオン積 (pK_w)、水素イオンや水酸化物イオンの活量係数 (f_{H^+} , f_{OH^-}) が必要となる。本実験条件であるイオン強度 0.10 におけるそれらの値として、25°C では $pK_w = 13.997$, $f_{\text{H}^+} = 0.825$, $f_{\text{OH}^-} = 0.761$ を用いた (Critical Atability Constants ed. by R. M. Smith and A. E. Martell, Plenum Press, Vol. 1, 1976)。pH メーターの調整は、上記の 4 mM 塩酸水溶液 (50 mL, $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$, $I = 0.10$ (NaCl)) を窒素気流下、0.10 M NaOH 水溶液で滴定する方法により行った。滴定液を加える前の理論的な pH = 2.481, 4 mL (2 当量) の滴定液を加えた時の理論的な pH = 11.448 を 2 点補正值として使用して、pH メーターの補正を行った。上記の方法による pH メーターの調整により、pH が 3 ~ 11 の範囲であれば ± 0.02 の精度の pH 測定が可能となる。

1-2-4. 分光分析法

(a) 試料溶液の濃度決定

可視・紫外線吸収スペクトル測定法と蛍光スペクトル測定法では、同じ試料溶液を用いて測定を行った。試料溶液の濃度は、その吸光度が 0.25~0.7 の範囲にあると測定精度がよい。 ϵ (モル吸光係数) が既知の試料においては最適濃度の推定が可能であるが、本研究で合成した NBD-cyclen (1) および NBD-[12]aneN₃ (2) は ϵ の値が未知であるため、まず 0.10 mM の溶液を正確に作成し、その溶液を用いて徐々に希釈しながら繰り返し測定を行い、吸光度が 0.25~0.7 の範囲にはいるような最適濃度を求めた。

(b) 試料溶液の調製

pH によるスペクトル変化を測定するため、各 pH における溶液を調製した。調製方法は以下の通りである。

2.0 mM の試料溶液 (NBD-cyclen および NBD-[12]aneN₃) を 10 mL 作成した。各 pH に調整した Good's Buffer (NaCl 0.10 M 含有) 4 mL にこの 2.0 mM 試料溶液 40 μ l を加え、これを測定試料溶液とした (最終濃度: 試料濃度 20 μ M, Good's Buffer 濃度 5 mM, NaCl 0.10 M, $I = 0.10$)。各 pH の試料溶液作成に用いた Good's Buffer を表 1 に示す。

表 1 試料溶液作成に用いた Buffer

pH	Good's Buffer
3.77	5 mM Citrate Buffer + NaOH
4.72	5 mM Citrate Buffer + NaOH
5.32	5 mM Citrate Buffer + NaOH
5.78	5 mM MES Buffer + NaOH
6.28	5 mM MES Buffer + NaOH
6.71	5 mM MOPSO Buffer + NaOH
7.13	5 mM MOPSO Buffer + NaOH
7.43	5 mM HEPES Buffer + NaOH
7.81	5 mM HEPES Buffer + NaOH
8.16	5 mM TAPS Buffer + NaOH
8.60	5 mM TAPS Buffer + NaOH

1-2-4-1. 可視・紫外線吸収スペクトル測定法

(a) ベースライン補正

溶液での測定においては溶媒の吸収が影響する。これを除くために、測定前に試料溶液と同一の溶媒のみがはいったセルをセルホルダにセットしてベースライン測定を行い、各測定に対応したベースラインを設定する。

(b) 測定条件

すべての操作は $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ において、2 回行った。

1-2-4-2. 蛍光スペクトル測定法

(a) 装置関数の測定 (スペクトル補正)

通常のスเปクトル測定では、装置 (分光器, ホトマル等) の波長特性の影響を受けるため、試料固有のスぺクトルを測定することができない。そこで、装置の波長特性に影響されない試料固有のスぺクトルを測定する場合には、スぺクトル補正が必要である。そこで、スぺクトル補正を行う場合は装置の波長特性を測定し、装置関数として記憶させ、補正することが必要になる。装置関数の測定は、励起側と蛍光側において行う。

励起側の装置関数を測定するために、光量子計としてローダミン B をセルホルダにセットし、波長走査を行う。装置関数の読み込みは自動で行われる。この時測定可能な範囲は 200~600 nm である。次に蛍光側の装置関数を求める。蛍光側関数の測定を行うためには、励起側装置関数の測定が終了している必要がある。試料室のセルホルダに拡散素子をセットして、蛍光側 (200~600 nm) における装置関数測定を開始する。装置関数を求めた励起側分光器からの光を基準にして、励起/蛍光両波長を同時走査し、励起側、蛍光側の装置関数が組み合わせられた関数を求め、それを先に求め得た励起側の装置関数で割ることにより、蛍光側装置関数を求める。この時測定可能な波長は 200~600 nm である。さらに、蛍光側における 600 nm 以上の長波長における補正を行うために、波長特性が既知のランプの光を蛍光側分光器に入射させ、蛍光側の長波長域での装置関数を求める。この測定には、副標準光源を用いる。副標準光源を装置に取り付け、減光板を資料室にセットして光源部の位置を調整する。副標準光源の電源を入れ、蛍光側 (500~900 nm) において波長走査し、装置関数測定を行う。これにより 500~900 nm における補正が完了する。以上の操作を行い、装置関数を記憶させスぺクトル補正を行った。

(b) 測定条件

すべての操作は $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で行った。NBD-cyclen (1) , NBD-[12]aneN₃ (2) の励起波長はともに 480 nm とした。

(c) 量子収率の計算^{10, 11)}

光化学反応において、反応系に吸収された光量子の数に対する反応した分子の数の比のことを量子収率といい、蛍光における量子収率は吸収された光量子数と放出された光量子数との比で表される。蛍光量子収率の測定法には、光量子数の比を直接求める絶対測定と、標準蛍光物質の蛍光と比較して求める相対測定の2種類がある。相対測定を行う際の標準物質(既知の量子収率を持つもの)は試料物質と同じ波長領域に発光ピークを示す物質を選択する。測定条件は試料物質と同一条件下(分光蛍光光度計, 励起波長, スリット幅, 温度等を同一にする)で行い, その蛍光強度と比較した相対強度値(相対量子収率)を算出する。今回の測定では, 標準蛍光物質として Fluorescein の 0.10 M NaOH 溶液 ($\phi = 0.85$)⁹⁾ を用い, 相対測定により量子収率を求めた。

①標準蛍光物質の溶液調製 : Fluorescein の 0.10 M NaOH 溶液を作り, 可視・紫外線分光光度計で吸収スペクトルを測定し, 試料溶液と同じ程度の吸光度を示す濃度に調製した。本研究では, 5 μM Fluorescein の 0.10 M NaOH 溶液を基準溶液として用いた。

②量子収率の求め方: 調製した標準試料 (Fluorescein) 溶液および試料 (NBD-cyclen, NBD-[12]aneN₃) 溶液を励起波長 480 nm で測定して得た結果から, 次式を用いて量子収率を算出した。

$$\phi_x = \phi_{st} \cdot FA_x \cdot A_{st} / FA_{st} \cdot A_x$$

ϕ_x : 試料物質の量子収率

ϕ_{st} : 標準物質の量子収率

FA_x : 試料物質のピーク積分値 (面積)

FA_{st} : 標準物質のピーク積分値 (面積)

A_x : 試料物質の吸光度

A_{st} : 標準物質の吸光度

1-2-5. 油水分配係数の測定法

pH による油水分配係数の変化を測定するため、水層には pH 4.54, 5.59, 6.40, 7.39 に調整した Good's Buffer を用いた。用いた Good's Buffer を表 2 に示す。

表 2 分配係数測定に用いた Good's Buffer

pH	Good's Buffer
4.54	10 mM Citrate Buffer / NaOH / 0.10 M NaCl
5.59	10 mM Citrate Buffer / NaOH / 0.10 M NaCl
6.40	10 mM MOPSO Buffer / NaOH / 0.10 M NaCl
7.39	10 mM HEPES Buffer / NaOH / 0.10 M NaCl

(a) 溶媒の調製

①水飽和 1-オクタノールの調製：1-オクタノールをガラス製容器に入れ、飽和に必要とする以上の各 Good's Buffer を加え、8 時間振盪し分離した。

②1-オクタノール飽和水の調製：各 Good's Buffer をガラス製容器に入れ、飽和に必要とする以上の 1-オクタノールを加え、8 時間振盪し分離した。

(b) 試料溶液の調製

溶媒の量、溶媒体積比及び被験物質の使用量の設定は次の要因をもとに設定する。

(1)予備試験で得られた分配係数の推定値

(2)必要な水層および 1-オクタノール層中の被験物質の量を用いる分析方法の感度に適していること

(3)水層および 1-オクタノール層中の被験物質の濃度は、0.01 mol/L 以下であり、かつそれぞれの層の溶解度以下であること

(4)平衡溶液中に占める溶媒の全体積の割合はほぼ一杯 (90%以上) であること

以上をもとに、水層と 1-オクタノール層の比を決定した (NBD-cyclen; 1 : 3, NBD-[12]aneN₃; 1 : 5)。分析方法としては可視・紫外線吸収スペクトル法を用いた。この分析方法では測定に必要な用量が 2~2.5 mL であるため、水層を 4 mL とした。試料溶液には溶媒として 1-オクタノール飽和水 (1-2-5a 参照) を用いた。調製方法ならびに試料濃度 (20 μM) は分光分析と同様とした (1-2-4 参照)。

(c) 測定条件

分液操作は 25°C ± 2°C において、吸光測定は 25°C ± 0.5°C 条件下で行った。

(d) 測定方法

各 pH の試料溶液（水層 4 mL）と 1-オクタノール（NBD-cyclen 測定：20 mL，NBD-[12]aneN₃ 測定：8.0 mL）をコニカル・チューブに入れ，25℃で1時間振盪した。その後 20 分間遠心分離を行い，油層と水層に分離した。遠心機は温度制御のできない装置を使用したため，遠心後 1 時間以上試験温度に保ち，再び平衡状態とした。二層が完全に分離していることを確認し，ピペットを用いてオクタノール層を静かに取り除いた後，新しいピペットの先端を水層の下部に挿入し，約 3 分の 2 以下の水層を採取した。この水層を用いて可視・紫外線吸収スペクトルを測定（測定法に関しては 1-2-4-1 参照）し，油水分配率を算出した。油水分配率は次式を用いて算出した。

$$P_{ow} = C_o / C_w$$

P_{ow} ：油水分配係数

C_o ：1-オクタノール層中の被験物質濃度（mol/L）

C_w ：水層中の被験物質濃度（mol/L）

(e) 空試験

コニカル・チューブへの化合物の吸着による影響を調べるため，空試験を行った。コニカル・チューブに試料溶液のみを入れ，同条件で攪拌振盪し，この溶液を用いてチューブへの吸着の有無を検討した。本研究では NBD-cyclen，NBD-[12]aneN₃ とともに，チューブへの吸着は見られなかった。

1-2-7. 蛍光プローブの細胞への適用法¹²⁾

1-2-7-1. 蛍光プローブの細胞内への導入試験

試料溶液は 25 mM HEPES Buffer (pH 7.4) を用いて希釈調整した。

37°C, 5% (v/v) CO₂ 存在下で 24 穴プレートにまいたラット白血病好塩基球細胞 (RBL-2H3 細胞) を 38 時間培養し, 培地をアスピレートした。これを 37°C HEPES Buffer で洗浄した後, 同温の HEPES Buffer 200 μL を加え, 37°C で 5 分間インキュベートして安定化した。この細胞に試料の HEPES Buffer 溶液 200 μL (NBD-cyclen : 100 μM, 50 μM, 25 μM, 10 μM, NBD-[12]aneN₃ : 50 μM, 25 μM, 10 μM, 5 μM) を添加し, 37°C, 5% (v/v) CO₂ 存在下でインキュベートした (8 h, 4 h, 2 h, 1 h, 0.5 h)。その後, 細胞を洗浄して, 細胞外に存在する試料を取り除き, 蛍光顕微鏡で観察した。

1-2-7-2. トリパンプルー染色法による細胞毒性試験

NBD-cyclen, NBD-[12]aneN₃ の細胞毒性をトリパンプルー染色法により検討した。トリパンプルーは 100 mL の PBS (-) に攪拌して溶解したものをを用いた。

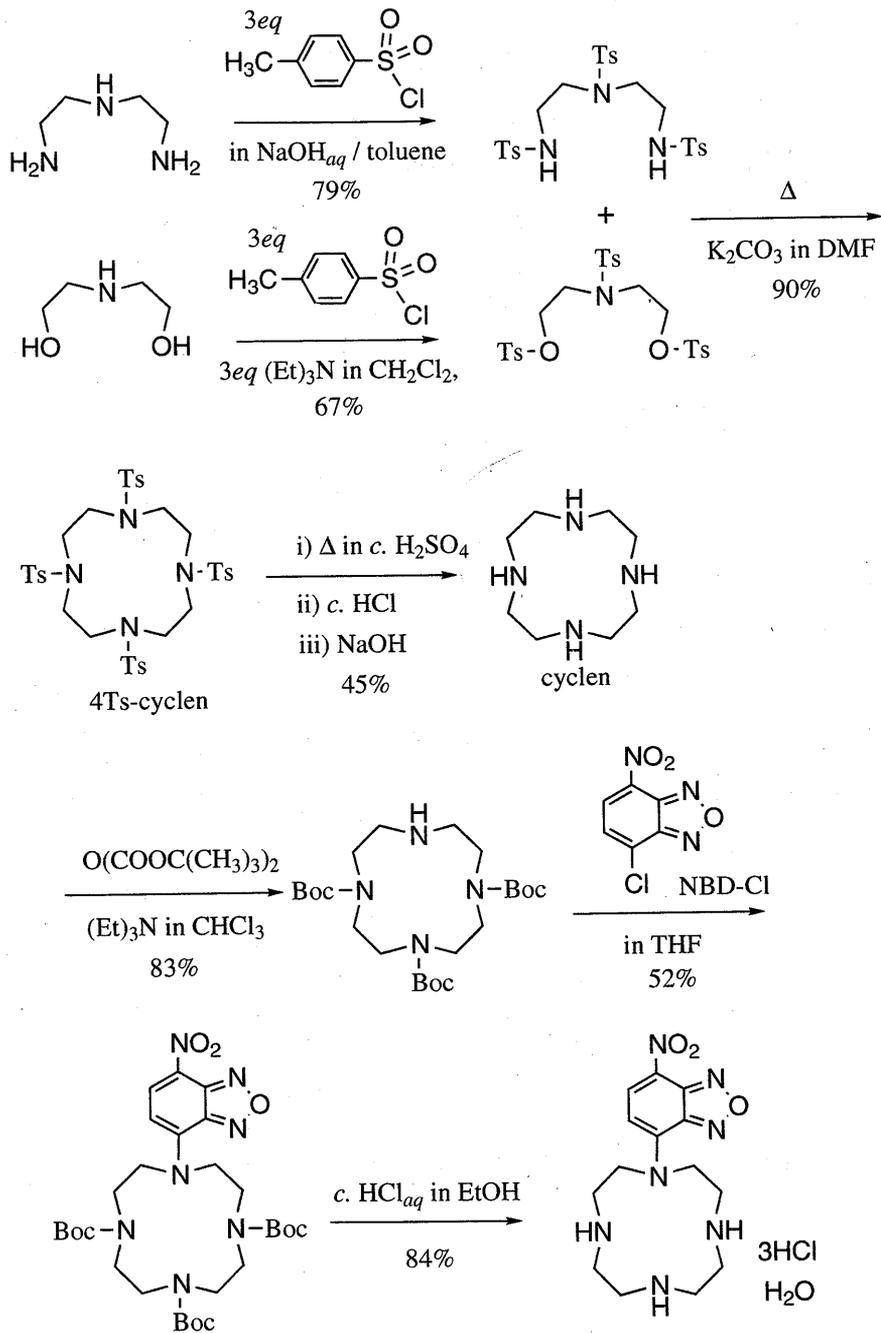
HEPES Buffer で RBL-2H3 細胞を洗浄し, 37°C HEPES Buffer 200 μL を加えて 5 分間水浴上で放置した後, 試料の HEPES Buffer 溶液 200 μL を添加し, 37°C, 5% (v/v) CO₂ 存在下でインキュベートした。培地をアスピレート後, 200 μL の PET 溶液を加え, 3.5 分インキュベートを行った。細胞がそこから剥がれていることを顕微鏡で確認し, 細胞懸濁液を 1.5 mL マイクロチューブに移して遠心分離 (チビタン, 15 秒) した。上清を吸い取り, HEPES Buffer 200 μL を加えて泡立てない様注意しながら懸濁した。これに 20 μL のトリパンプルー溶液を加え, 直ちに血球計算版で細胞をカウントした。青く染色された細胞を死細胞と判定した。

1-3. 結果および考察

1-3-1. 蛍光プローブの合成

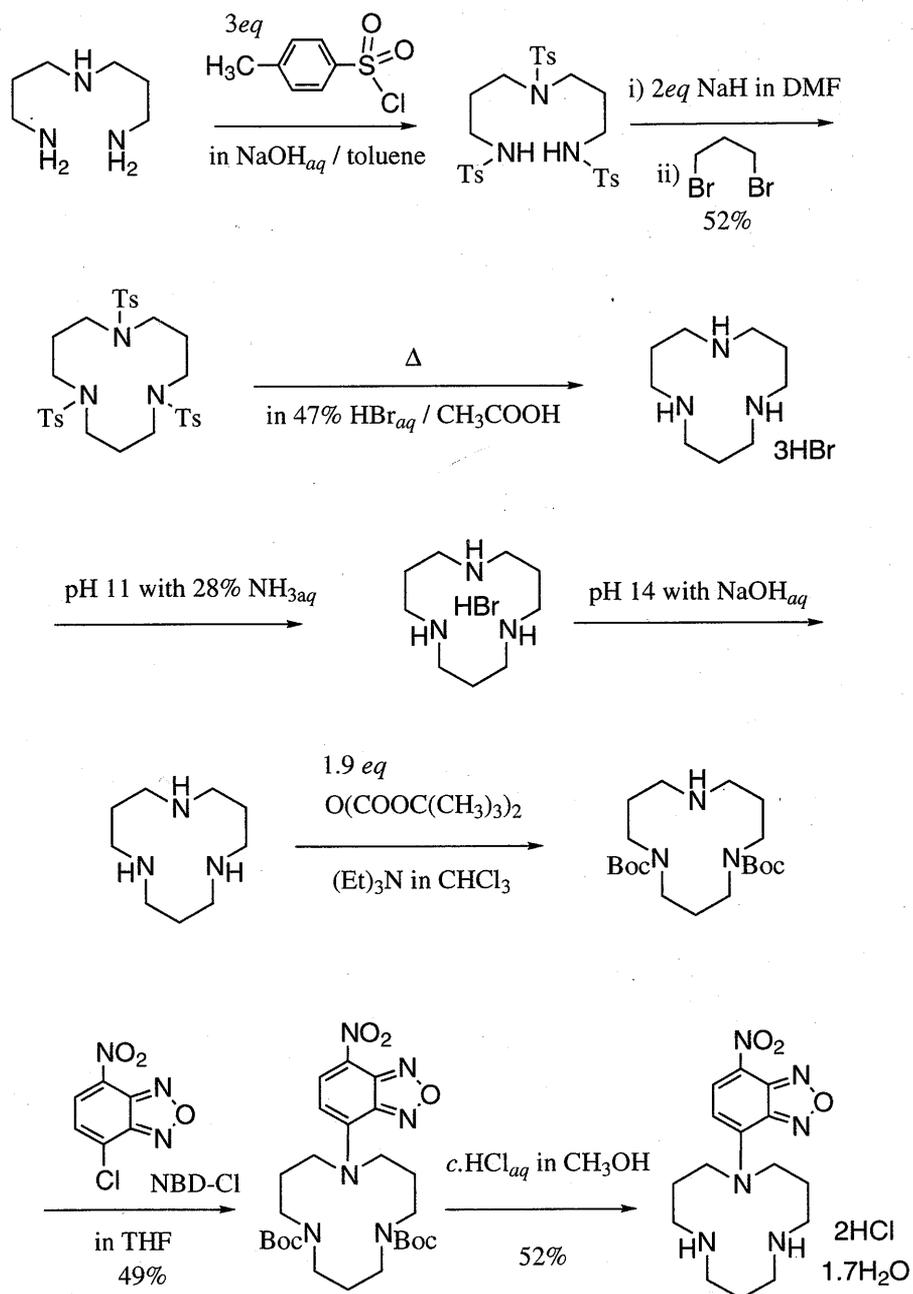
(a) NBD-cyclen の合成

NBD-cyclen は下図に示す反応経路で合成した。



(b) NBD-[12]aneN₃ の合成

NBD-[12]aneN₃ は下図に示す反応経路で合成した。



1-3-2. 溶液内化学種の検討

(a) プロトン化反応の検討

NBD-cyclen および NBD-[12]aneN₃ は、ポリアミン化合物であり、生理 pH の水溶液中ではプロトン化する ($L \cdot H^+ \rightleftharpoons L \cdot 2H^+$)。そこで、本研究で合成した新規蛍光プローブのプロトン化定数 (K_b : 酸解離定数の逆数) を、pH 滴定法を用いて検討した。測定は、 $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 、イオン強度 0.10 M (NaCl)、配位子初期濃度 1.0 mM (すべてのアミンがプロトン化した状態) の水溶液を用いて行った。得られた滴定曲線を、図 4 に示す。NBD-cyclen および NBD-[12]aneN₃ の酸解離平衡反応は、独立した一塩基酸として取り扱えたので、以下に示す溶液内マスバランスの式により K_b を算出した。その場合、計算に使用する滴定データは、アルカリ溶液 0.1 当量から 0.9 当量間の pH と滴定液の当量数を用いて、個々の測定点から求まる K_b 値の平均を最終値とした。

酸解離平衡反応: L (配位子) + H^+ \rightleftharpoons HL^+

$$K_b = [HL^+] / ([L] \times a_{H^+})$$

(i) Proton Mass Balance

$$AL = EQ \times CL - [OH^-] = [L]$$

"EQ" is titrant (added NaOH) equivalent value at every titration point.

"CL" is total ligand concentration at every titration point.

(ii) Ligand Mass Balance

$$CL = [L] + [HL^+] = [L] \times (1 + K_b \times a_{H^+})$$

From the above two equations one can derive following equations.

$$CL = AL \times (1 + K_a \times a_{H^+})$$

$$K_b = (CL - AL) / (AL \times a_{H^+})$$

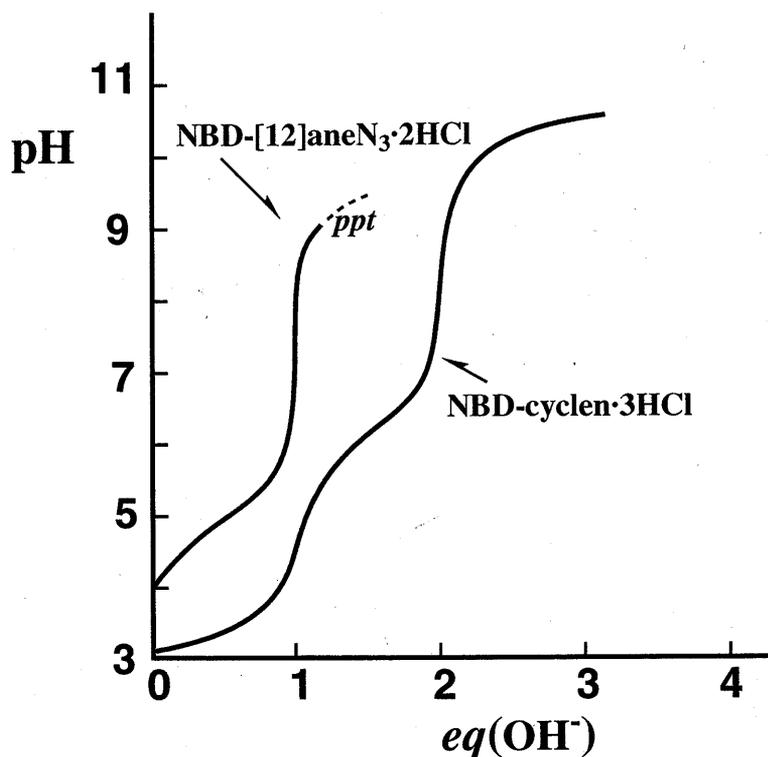
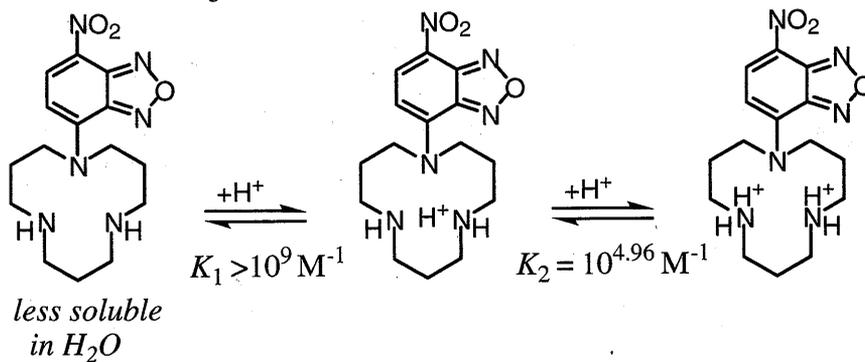


図 4 NBD-cyclen および NBD-[12]aneN₃ の pH 滴定曲線

NBD-[12]aneN₃ の二つのプロトン化定数 ($\log K_b$) は、 >9 および 4.96 ± 0.02 , NBD-cyclen の三つのプロトン化定数は、 10.5 ± 0.1 , 6.11 ± 0.02 , <3 である。滴定の途中 (pH 9 以上) で NBD-[12]aneN₃ は、水溶性の小さいフリーの配位子となり沈殿した。また、NBD-cyclen は、pH >10 のアルカリ性条件下でゆっくりとアルカリを消費して分解した。生理 pH においては、NBD-[12]aneN₃ および NBD-cyclen は、モノプロトン化した化学種として存在し、数日間放置しても安定であった (後述の UV および蛍光分析により確認した)。NBD-[12]aneN₃ および NBD-cyclen の水溶液内酸塩基平衡反応式を図 5 に示す。

NBD-[12]aneN₃



NBD-cyclen

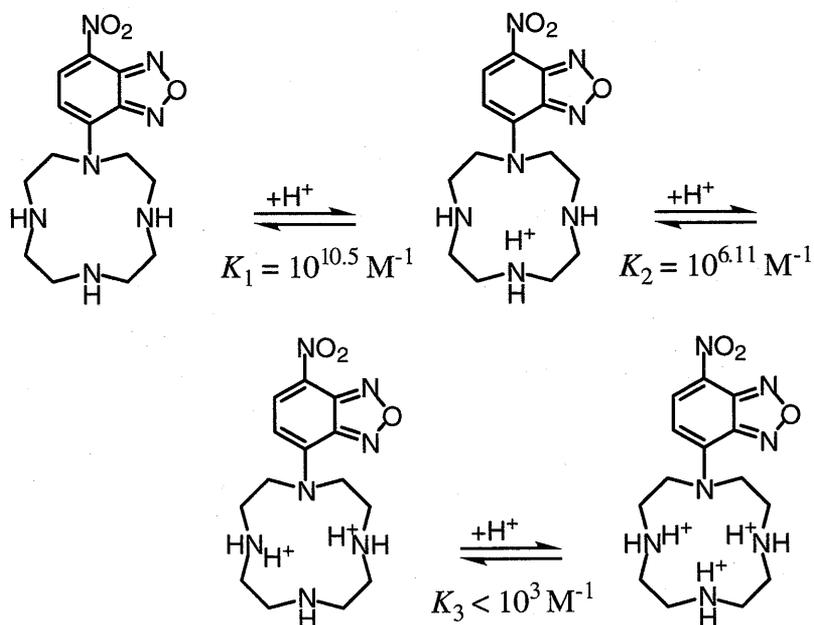
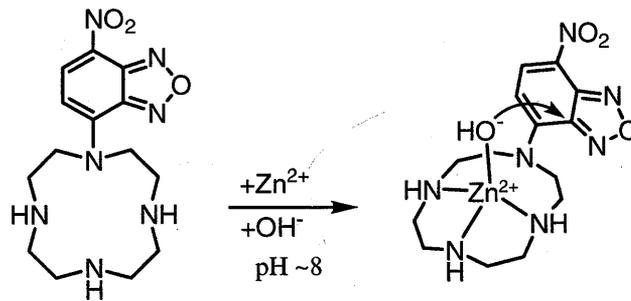


図 5 NBD-[12]aneN₃ および NBD-cyclen の溶液内平衡式

(b) 亜鉛 (II) イオンとの錯体生成反応の検討

NBD-[12]aneN₃ および NBD-cyclen と亜鉛 (II) イオンとの錯体生成反応について pH 滴定法を用い検討した。滴定は、1mM の亜鉛イオン共存下、上記プロトン化反応と同じ条件で行った。その結果、NBD-[12]aneN₃ は亜鉛錯体を形成しないこと、NBD-cyclen は中性 pH で亜鉛錯体を形成した後、pH 8 付近で NBD 部分が分解するアルカリを消費することが明らかとなった。Cyclen は、亜鉛 (II) イオンと 1 : 1 の錯体を形成し、生理 pH で求核性を有する亜鉛 (II) 水酸化物イオンを形成することが知られている。したがって、この亜鉛 (II) オンによる NBD 分解反応は、亜鉛に配位した水酸化物イオンが NBD 部分を求核攻撃することにより促進されていると考えられる (下図参照)。



亜鉛錯体生成による NBD-cyclen の分解

1-3-3. 分光学的性質の検討

(a) 可視・紫外線吸収スペクトル測定法および蛍光スペクトル法を用いた pH による分光学的性質の変化の検討

pH 滴定の結果より, 化合物 1, 2 は生物学的 pH 範囲内 (pH 4~8) でプロトン化する ($L\cdot H^+ \rightleftharpoons L\cdot 2H^+$) (1-3-2 参照)。そこで, 化合物のプロトン化による分光学的性質への影響を検討するため, 可視・紫外線吸収スペクトル測定法および蛍光スペクトル法を用いて, pH によるスペクトルの変化を測定した。

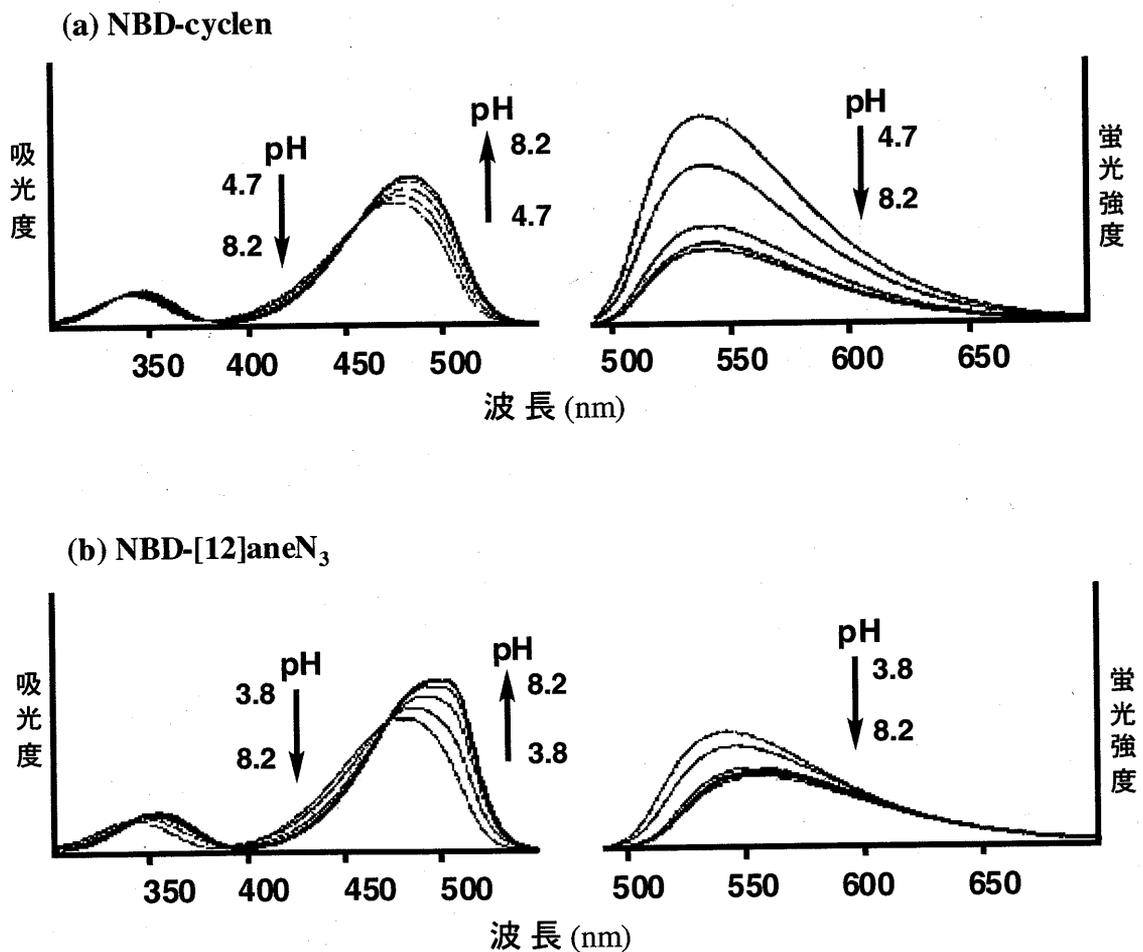


図 6 pH による UV 吸収スペクトルおよび蛍光スペクトル変化

: (a) 20 μ M NBD-cyclen, 25°C, pH 4.72, 5.78, 6.71, 7.43, 8.16 (5 mM Good's Buffer^a), $I = 0.10$ (NaCl) (b) 20 μ M NBD-[12]aneN₃, 25°C, pH 3.77, 4.72, 5.78, 6.71, 7.43, 8.16 (5 mM Good's Buffer^a), $I = 0.10$ (NaCl)

^a) 1-2-4 表 1 参照

図 6 に pH を変化させた時の NBD-cyclen (1) と NBD-[12]aneN₃ (2) の吸収スペクトル・蛍光スペクトルを示す。

吸収スペクトル測定の結果, pH の低下と共に, 極大吸収波長が 1 (図 6a) では 482 nm から 474 nm, 2 (図 6b) では 500 nm から 479 nm に浅色移動し, 等吸収点 (1 : 457 nm, 2 : 472 nm) を持つスペクトル変化が観察された。次に, 励起波長 480 nm で異なる pH 下における 1, 2 の蛍光スペクトルを測定したところ, pH 低下 (プロトン化) に伴い極大発光波長は浅色移動した。また, 1 の 540 nm (λ_{ex} 480 nm) における蛍光は約 2.7 倍増強し, 2 の 554 nm (λ_{ex} 480 nm) における蛍光は約 1.5 倍増強した。この結果は, 化合物 1, 2 がプロトン化することにより, 分子内の電子状態が大きく変化していることを示している。さらに, 等吸収点を持つことにより 2 波長励起 1 波長測光法が可能となるため, より正確な細胞内 pH 差の検出を行うことが可能である。

NBD-cyclen (1) と NBD-[12]aneN₃ (2) の各 pH における測定結果を表 3, 図 7 にまとめた。

表 3 各 pH における分光学的パラメーターの値

pH	NBD-cyclen				NBD-[12]aneN ₃			
	λ_{max}	$\lambda_{em}^{max a)}$	$\epsilon (\times 10^3)^b)$	$\phi (\%)^c)$	λ_{max}	$\lambda_{em}^{max a)}$	$\epsilon (\times 10^3)^b)$	$\phi (\%)^c)$
3.77	473	537	2.28	5.50	479	542	2.55	2.82
4.72	474	536	2.32	5.57	485	545	2.67	2.42
5.32	476	537	2.36	4.71	490	550	2.97	1.91
5.78	478	536	2.44	4.01	495	553	3.15	1.69
6.28	481	539	2.58	2.90	498	554	3.28	1.59
6.71	482	539	2.72	2.25	500	554	3.32	1.54
7.3	483	540	2.79	1.92	500	554	3.34	1.56
7.46	483	539	2.80	1.80	500	555	3.28	1.53
7.81	483	556	2.81	1.81	500	556	3.30	1.53
8.16	482	539	2.82	1.73	500	554	3.27	1.46
8.60	481	540	2.78	1.56	500	556	3.20	1.37

25°C, ^a 励起波長 480 nm, ^b モル吸光係数, ^c 量子収率

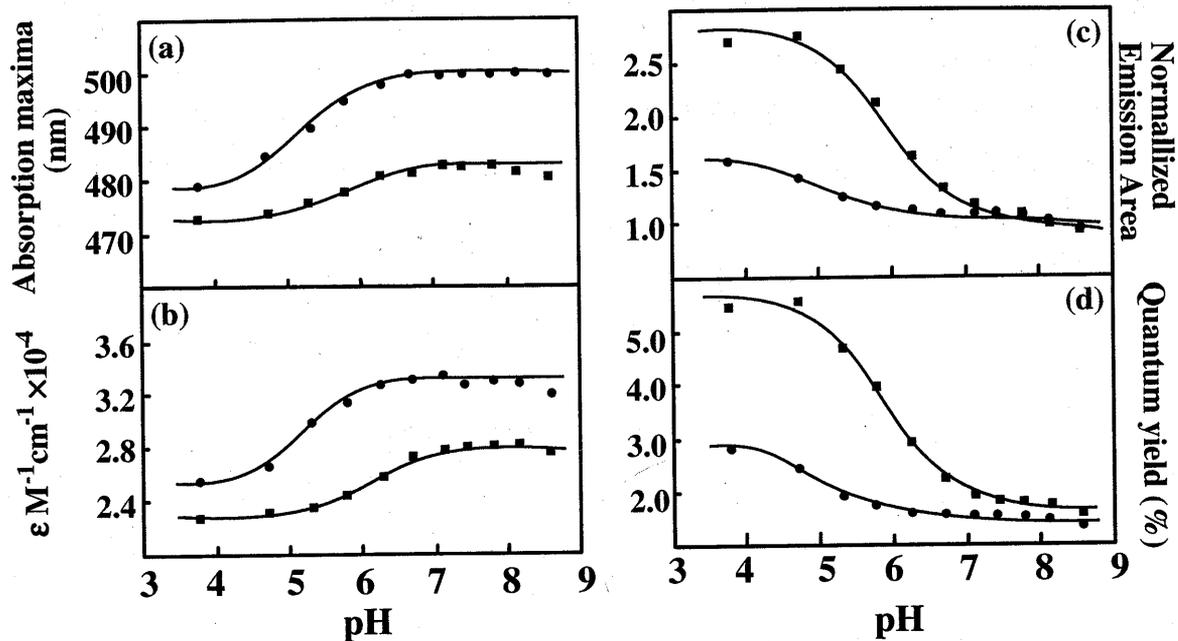


図7 pHと各種分光学的パラメーターの変化

■ 20 μM NBD-cyclen (5 mM Good's Buffer, $I = 0.10$ (NaCl), 25°C), ● 20 μM NBD-[12]aneN₃ (5 mM Good's Buffer, $I = 0.10$ (NaCl), 25°C), (a) 極大吸収波長, (b) モル吸光係数, (c) 蛍光スペクトル積分値 (490 nm~690 nm), (d) 量子収率

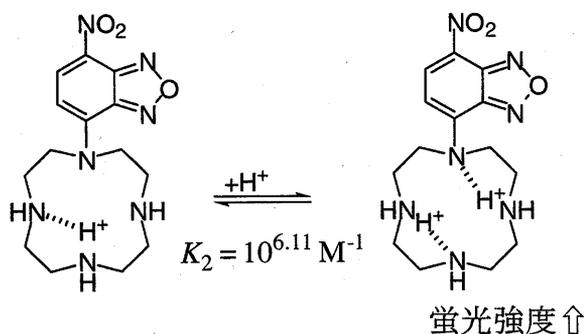
これらの結果は pH 滴定の結果 (pK_2 6.11 (1), 4.96 (2)) と一致した挙動を示す。このことより、スペクトル変化は、プロトン化による発色団の電子密度の変化によるものであることが確認された。pH と蛍光強度との間に、1 は pH 5.5~6.5 付近で、2 では pH 4.5~5.5 付近で直線関係が見られることより、酸性 pH 環境下における pH 測定に適していると考えられる。

(b) 蛍光強度増大の機構

NBD-cyclen (1) と NBD-[12]aneN₃ (2) は、pH 低下に従って極大吸収波長が低波長にシフト (浅色移動) し、モル吸光係数 (ϵ) が減少した。これは、この pH 範囲内 (pH 3~9) に両化合物とも 2 番目の pK_a を持つことより、発色団である NBD 基に直接結合している窒素原子がプロトン化 ($L \cdot H^+ \rightleftharpoons L \cdot 2H^+$) による影響を受けるためであると考えられる。プロトン化していない状態では、窒素原子は sp^2 混成軌道を取り、非共有電子対が p 軌道上に存在する。この非共有電子対が発色団の共役系に参与することにより、発色団の共役系が伸びる。しかし、この窒素原子がプロトン化 (ただし、他のアミンと共有) すると、この非共有電子対はプロトンとの配位結合により sp^3 混成軌道を形成し、発色団の共役系からはずれる (図 8)。以上のことから、プロトン化することにより共役系が短縮するため、極大吸収波長は浅色移動し、モル吸光係数の減少が見られたと考えられる。

また、pH 低下による極大発光波長の浅色移動も、同様の機構によるものと考えられる。蛍光強度の増大機構としては、プロトン化により、非共有電子対が孤立で存在するときに生じる無輻射遷移過程が阻害されるため、つまりプロトン化することによって、アミンによる消光作用が排除されるため蛍光強度が増大すると考えられる。

NBD-cyclen



NBD-[12]aneN₃

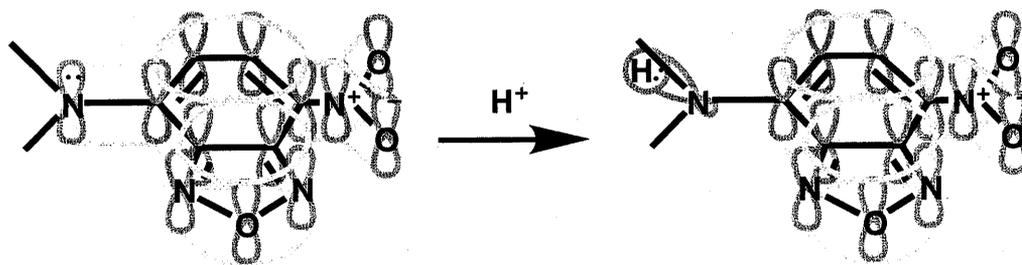
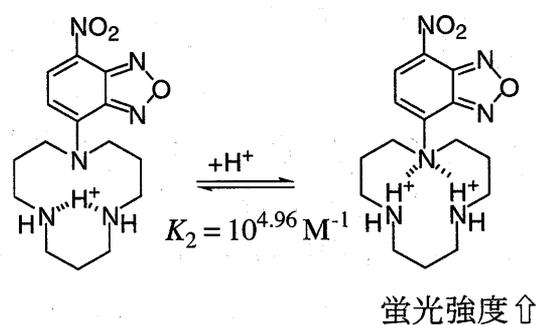


図 8 プロトン化による混成軌道の変化

1-3-4. 細胞内移行性の検討

pH による油水分配係数の変化を測定することにより、蛍光プローブの細胞膜透過性を検討した。その結果を図 9 に示す。NBD-[12]aneN₃ と NBD-cyclen の分配係数を比較すると、NBD-[12]aneN₃ は NBD-cyclen より脂溶性が高く、より細胞内へ移行しやすいと考えられる。また、両化合物とも低 pH 環境下では、化合物のプロトン化による極性変化により分配係数の低下が見られた。これは、これらの化合物は細胞内で脂溶性の膜に囲まれた酸性オルガネラへ移行し、オルガネラ内でプロトン化することによって脂質膜を再透過しにくくなることを示唆している。したがって、一旦酸性オルガネラ内へ移行すると、漏出せずに内部に留まると考えられる。以上の結果と蛍光分析の結果を併せて考えると、これらの蛍光プローブは酸性オルガネラ内 (pH 4.5~pH 6.5) に移行した状態でも蛍光を保持するため、酸性オルガネラ領域の可視化用蛍光プローブ、または染色用色素としての利用が期待できる。

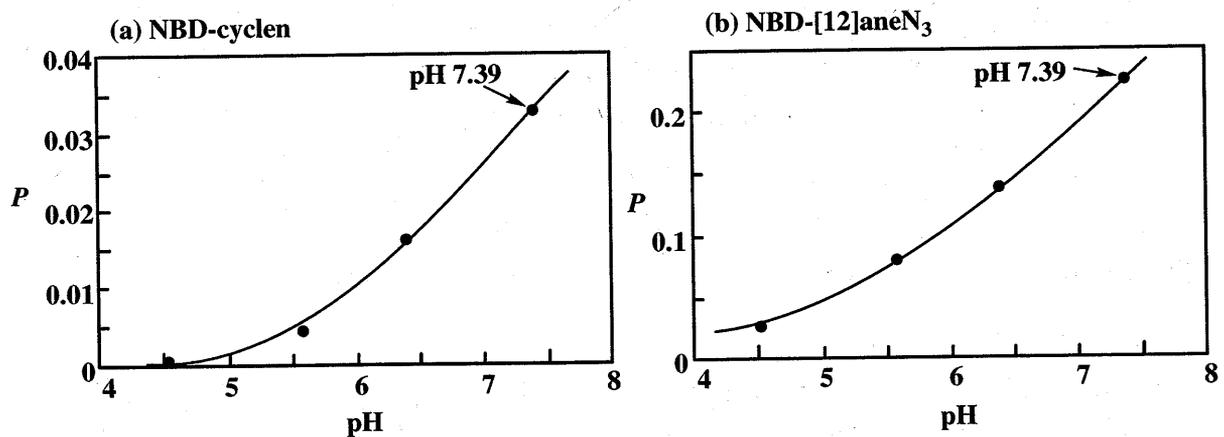


図 9 pH による水/オクタノール分配係数の変化

(a) 20 μ M NBD-cyclen (Octanol 飽和 10 mM Good's Buffer, $I = 0.10$ (NaCl) / 10 mM Good's Buffer 飽和 Octanol, 25°C), (b) 20 μ M NBD-[12]aneN₃ (Octanol 飽和 10 mM Good's Buffer, $I = 0.10$ (NaCl) / 10 mM Good's Buffer 飽和 Octanol, 25°C)

1-3-5. NBD-cyclen と NBD-[12]aneN₃ を用いた細胞染色

今回合成した蛍光プローブは塩基性化合物であることから、細胞内で酸性領域に移行すると考えた。そこで、ラットの白血病化好塩基球細胞 (RBL-2H3 細胞) を用いて、細胞内への移行能力とその分布を検討した。その結果、NBD-[12]aneN₃ (2) は 5 μM 以上の濃度、30 分以上の細胞曝露で細胞内への移行が観察された。NBD-cyclen (1) は 10 μM 以上の濃度、30 分以上の曝露により細胞内への移行は確認できたが、蛍光強度が弱く検出が難しかった。図 10 に蛍光顕微鏡で検出した NBD-[12]aneN₃ を 25 μM, 1 時間曝露後の細胞内蛍光分布図を示す。1 および 2 は細胞内における局所的な移行が見られたことより、これらは酸性オルガネラ領域へ移行したと考えられる。

この結果より、NBD-[12]aneN₃ は NBD-cyclen と比べて細胞内に取り込まれやすいことが明らかとなった。これは、油水分配係数測定の結果と一致する。

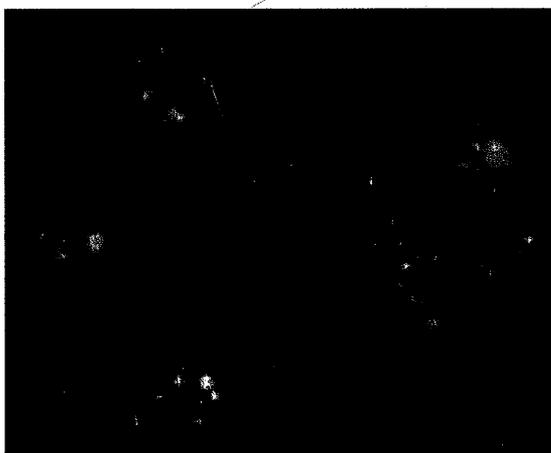


図 10 NBD-[12]aneN₃ の RBL-2H3 細胞内分布図
RBL-2H3 cells, NBD-[12]aneN₃, 25 μM, 1 時間曝露後

1-3-6. NBD-cyclen と NBD-[12]aneN₃ の細胞毒性

NBD-cyclen と NBD-[12]aneN₃ の細胞毒性について、トリパンブルー染色を用いて検討した。その結果、NBD-cyclen は 1 mM において 98 %, NBD-[12]aneN₃ は 100 μM において 97% の生存が確認され、両化合物ともにこの濃度において細胞毒性を示さないことが確認された。

1-4. まとめ

本研究では、分子内蛍光発色団として NBD を持つ環状ポリアミン系蛍光試薬 (NBD-cyclen (1), NBD-[12]aneN₃ (2)) を合成した。NBD-Cl はアミノ基の検出用蛍光試薬として市販化されている化合物であり、これをポリアミンと反応させることによって、それ自身も蛍光を持つ新規の蛍光プローブの開発を行った。合成した蛍光プローブの特性を、pH 滴定、UV 測定、蛍光測定、さらに培養細胞を用いた実験で検討した。

その結果判明したこれらの化合物の特性は以下の通りである。

①それぞれ弱酸性領域に pK_a を一つずつ持つ。

(pK₂ 6.11 : NBD-cyclen, 4.96 : NBD-[12]aneN₃)

② pH 低下にともない蛍光が増強する。また、pH により可視・紫外線吸収スペクトルも変化を示す。

③NBD-[12]aneN₃ は油水分配係数 $P = 0.23$ (pH 7.4) であり、細胞内において局所的に移行し蛍光を発する。また、高濃度でも細胞毒性を示さない。

動物細胞内には、エンドソーム、リソソーム、シナプス小胞、クロマフィン小胞などの液胞系の多彩な酸性オルガネラが存在しており、これらオルガネラの内部はいずれも pH 4.5~6.5 となっている。従って、これらのプローブは細胞膜を通過し、脂質膜に囲まれ内部が酸性に保たれている酸性オルガネラへ移行するとプロトン化 ($L\cdot H^+ \rightleftharpoons L\cdot 2H^+$) すると考えられる。油水分配率の測定により、プロトン化すると膜透過性が大幅に減少することが判明し、酸性オルガネラ移行後は顆粒外へほとんど漏出しないと考えられる。また酸性環境下で蛍光が増強する点でも、酸性領域を可視化する試薬として好都合な性質を持つプローブであるといえる。

さらに、培養細胞を用いた実験結果より、本研究で合成した化合物 2 を用いると局所的な移行が確認された。この時染色されたのは pH の低い領域であると考えられ、リソソーム等の酸性オルガネラの可視化を行うことが可能であることが判明した。これらの化合物は高いモル吸光係数を有しており、酸性顆粒内物質の開口放出現象の測定等に用いた場合には、蛍光による可視的な検出に加え、可視・紫外線吸収スペクトル法による測定も可能であると考えられる。

また、これら新規蛍光プローブは、光照射による構造破壊を受けにくい安定な化合物であることが確認された。さらに、水溶性で励起波長が可視部に存在するという利点も持つ。

以上のことから、長時間の測定にも耐えうる細胞に添加しやすい蛍光プローブであると言える。従って、新規蛍光プローブ NBD-[12]aneN₃ は、細胞内の酸性オルガネラを染色するための蛍光プローブとしての利用が期待できる。

1-5. 参考文献

- 1 蛍光測定, 木下一彦・御橋廣眞, 学会出版センター, 1988,
- 2 P. B. Ghosh; M. W. Whitehouse, *Biochem. J.*, **1968**, *108*, 155-156
- 3 D. Lancet; I. Pacht, *Biochemistry.*, **1977**, *16*, 5150-5157
- 4 K. Ozawa; H. Kobayashi; E. Kawai; E. Suzaki; Y. Nonomura; T. Masujima, *FEBS Letters.*, **1996**, *398*, 67-73
- 5 J. E. Richman; T. J. Atkins, *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, *96*, 2268-2270
- 6 F. Chavez; A. D. Sherry, *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 2990-2992
- 7 E. Kimura; S. Aoki; T. Koike; M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 3068-3076
- 8 R. Nudelman; O. Ardon; Y. Hadar; J. Libman; A. Shanzer, *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 1671-1678
- 9 C. A. Parker.; W. T. Riss, *Analyst.*, **1960**, *85*, 587-600
- 10 ケイ光分析—基礎と応用—, 渡辺光夫, 廣川書店, 1970
- 11 機器分析のてびき, 泉美治; 小川雅彌; 加藤俊二; 塩川二郎; 芝哲夫, 化学同人, 1996
- 12 木下恭子, 広島大学薬学修士学位論文, 2001
- 13 T. Koike; T. Gotoh ; S. Aoki ; E. Kimura; M. Shiro, *Inorg. Chem. Acta*, **1998**, *270*, 424-432
- 14 G. Sidney Cox; N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 422-424
- 15 E. U. Akkaya; M. E. Huston; A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 3590-3593
- 16 M. E. Huston; K. W. Haider; A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *110*, 4460-4462
- 17 Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, R. P. Haugland et al., Molecular Probes
- 18 R. G. W. Anderson; L. Orci, *J. Cell. Biol.*, **1988**, *106*, 539-543
- 19 R. S. Fager; C. B. Kutina; E. W. Abrahamson, *Anal. Biochem.*, **1973**, *53*, 290-294
- 20 L. W. Jiang; V. M. Maher; J. J. McCormick; M. Schindler, *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 4775-4777
- 21 J. Barasch; B. Kiss; A. Prince; L. Saiman; D. Gruenert; Q. Al-Awqati, *Nature*, **1991**, *352*, 70-73
- 22 S. K. Mallya; J. S. Partin; M. C. Valdizan; W. J. Lennarz, *J. Cell. Biol.*, **1992**, *117*, 1211-1221
- 23 L. Orci; P. Halban; A. Perrelet; M. Amherdt; M. Ravazzola ; R. G. W. Anderson, *J. Cell. Biol.*, **1994**, *126*, 1149-1156
- 24 J. Tooze; M. Hollinshead; T. Ludwig; B. Hoflack; H. Kern, *J. Cell. Biol.*, **1990**, *111*, 329-345
- 25 W. A. Dunn, Jr., *J. Cell. Biol.*, **1990**, *110*, 1935-1945
- 26 B. Poole; S. Ohkuma, *J. Cell. Biol.*, **1981**, *90*, 665-669
- 27 S. Ohkuma; B. Poole, *J. Cell. Biol.*, **1981**, *90*, 656-664
- 28 C. W. G. M. Löwik; M. J. Alblas; M. van de Ruit; S. E. Papapoulos; G. van der Pluijm, *Anal. Biochem.*, **1993**, *213*, 426-433
- 29 M. G. Palmgren, *Anal. Biochem.*, **1991**, *192*, 316-321
- 30 A. Niemann; J. Baltés; H. P. Elsässer, *J. Histochem. Cytochem.*, **2001**, *49*, 177-186

- 31 J. Verhoef; S. D. Sharme, *J. Immunology.*, **1983**, *131*, 125–131
- 32 A. Niemann; A. Takatsuki; H. P. Elsasser, *J. Histochem. Cytochem.*, **2000**, *48*, 251–258
- 33 H. Palokangas; K. Metsikkö; K. Väänänen, *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 17577–17585